Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, und Kinderchirurgie
(Prof. Dr. med. M. Ghadimi)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Die Rolle von *ARID1A* in Pankreas- und kolorektalem Karzinom

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Jacobe Traub, geb. Rapp

aus

Bad Urach

Göttingen 2022

Dekan:	Prof. Dr. Wolfgang Brück
Referent:	Prof. Dr. Steven Johnsen
Ko-Referent:	Prof. Dr. Matthias Dobbelstein

Datum der mündlichen Prüfung: 7. Juni 2023

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Die Rolle von *ARID1A* in Pankreas- und kolorektalem Karzinom" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den ……. ……

(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Sen M, Wang X, Hamdan FH, **Rapp J**, Eggert J, Kosinsky RL, Wegwitz F, Kutschat AP, Younesi FS, Gaedcke J et al. (2019): ARID1A facilitates KRAS signaling-regulated enhancer activity in an AP1-dependent manner in colorectal cancer cells. Clin Epigenetics 11, 92

Schirmer MA, Lüske CM, Roppel S, Schaudinn A, Zimmer C, Pflüger R, Haubrock M, **Rapp J**, Güngör C, Bockhorn M et al. (2016): Relevance of Sp Binding Site Polymorphism in WWOX for Treatment Outcome in Pancreatic Cancer. J Natl Cancer Inst. 108, djv387

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis III

Tabellenverzeichnis IV

Abkürzungsverzeichnis V

1 Einleitung 6

1.1 Das Pankreaskarzinom 6

1.2 Das kolorektale Karzinom 7

1.3 Epigenetische Grundlagen 8

1.4 Der SWI/SNF (BAF) Komplex 9

1.5 *ARID1A* 10

1.5.1 *ARID1A* im Pankreaskarzinom 11

1.5.2 *ARID1A* im kolorektalen Karzinom 12

1.6 Ziele der Arbeit 12

2 Material und Methoden 13

2.1 Technische Geräte 13

2.2 Verbrauchsmaterial 15

2.3 Chemikalien 16

2.4 Inhibitoren 18

2.5 Enzyme 19

2.6 Software 19

2.7 Primer 19

2.8 siRNA 20

2.9 Antikörper 20

2.10 Zellkultur 21

2.10.1 Zellen 21

2.10.2 siRNA vermittelter *knockdown* 21

2.10.3 CRISPR/Cas9-vermittelter *knockout* 22

2.10.4 Behandlung mit Inhibitoren 22

2.10.5 Zellwachstumsanalyse 22

2.10.6 Lebensfähigkeitsanalyse nach Chemotherapie Behandlung 23

2.10.7 Kristallviolettfärbung 23

2.11 Molekulare Analysen 23

2.11.1 RNA-Isolierung 23

2.11.2 DNA-Isolierung 24

2.11.3 cDNA Synthese 24

2.11.4 Genotypisierungs PCR 24

2.11.5 Quantitative real-time PCR 24

2.11.6 Immunhistochemie 25

2.12 Protein Biochemie 25
2.12.1 Natriumdodeylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese und Westernblot 25
2.13 Datenanalyse 26
2.13.1 *National Cancer Institute (NCI)* - genomische Daten 26
2.13.2 cBioPortal 26

3 Ergebnisse 27

3.1 Datenanalyse 27
3.2 Zelllinienauswahl 29
3.3 siRNA vermittelter *knockdown* 31
3.4 Ansprechen auf Gemcitabin 34
3.5 CRISPR-Cas9-vermittelter *knockout* 35
3.5.1 Durchflusszytometrie 35
3.5.2 *ARID1A* knockout auf DNA-Ebene 37
3.5.3 ARID1A *knockout* auf Protein Ebene 40
3.5.4 Wachstumsvergleich 41
3.5.5 Behandlung mit Tazemetostat 43
3.5.6 Überleben mit und ohne *ARID1A* Mutation 45
3.5.7 Analyse von Patientendaten 47

4 Diskussion 50

4.1 *ARID1A* in L3.6pl 50
4.1.1 Gemcitabinbehandlung im Kontext eines Tumorsupressors 50
4.1.2 Überleben bei *ARID1A* Verlust 51
4.1.3 EZH2 Inhibition 51
4.2 *ARID1A* in SW480 52
4.2.1 Überleben bei *ARID1A*-Verlust 52
4.2.2 Epithelial-mesenchymale-Transition (EMT) 53
4.2.3 EZH2-Inhibition 54

5 Zusammenfassung 56

6 Literaturverzeichnis 57

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kompletter *ARID1A Knockout* auf Exon 5. 22
Abbildung 2: Relative Häufigkeit mutierter Gene bei kolorektalen Karzinomen 27
Abbildung 3: Mutationsspezifizierung von *ARID1A* in kolorektalen Karzinomen. 28
Abbildung 4: Relative Häufigkeit mutierter Gene bei Pankreaskarzinomen. 28
Abbildung 5: Mutationsspezifizierung von *ARID1A* in Pankreaskarzinomen. 29
Abbildung 6: Westernblot zur Bestimmung einer kolorektalen Zelllinie. 30
Abbildung 7: Westernblot Analyse in Pankreaskarzinomzellen. 31
Abbildung 8: siRNA- kockdown in SW480 mit Einzelsequenzen. 32
Abbildung 9: siRNA-knockdown in SW480 Pool-Sequenz. 32
Abbildung 10: siRNA-knockdown in L3.6pl Pool-Sequenz. 33
Abbildung 11: EMT-Marker in SW480. 34
Abbildung 12: Gemcitabinbehandlung in L3.6pl Kontrolle vs. Knockdown. 35
Abbildung 13: FACS-Analyse für die L3.6pl Zelllinie. 36
Abbildung 14: FACS-Analyse der SW480 Zelllinie. 37
Abbildung 15: Schematische Darstellung von *ARID1A* und Exon5 38
Abbildung 16: L3.6pl Genotypisierungs-PCR Einzelklone. 38
Abbildung 17: SW480 Genotypisierungs-PCR Einzelklone. 39
Abbildung 18: Genotypisierungs-PCR Pool Zellen. 40
Abbildung 19: *Knockout* Pool-Zellen Westernblot. 40
Abbildung 20: Wachstumsvergleich L3.6pl *knockout*-Kontrolle. 42
Abbildung 21: Wachstumsvergleich SW480 *knockout*.- Kontrolle. 43
Abbildung 22: Tazemetostat Behandlung in der Zelllinie L3.6pl. 44
Abbildung 23: Tazemetostat Behandlung in der SW480 Zelllinie. 45
Abbildung 24: Kaplan-Meyer-Plot von Pankreastumoren nach *ARID1A* Status. 46
Abbildung 25: Kaplan-Meyer-Plot von kolorektalen Karzinomen nach *ARID1A* Status. 47
Abbildung 26: Immunhistochemie von Rektumkarzinomkohorte bezüglich ARID1A Expressivität. 48
Abbildung 27: Krankheitsfreies Überleben im Vergleich. 49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der verwendeten technischen Geräte....13
Tabelle 2: Liste der Verbrauchsmaterialien....15
Tabelle 3: Liste der verwendeten Chemikalien....16
Tabelle 4: Verwendete Inhibitoren....18
Tabelle 5: Verwendete Enzyme....19
Tabelle 6: Software....19
Tabelle 7: Genotypisierungs PCR....19
Tabelle 8: qRT-PCR Primer....20
Tabelle 9: siRNA....20
Tabelle 10: Primäre Antikörper für Westernblot....20
Tabelle 11: sekundäre Antikörper für Westernblot....21
Tabelle 12: Verwendete Zelllinien....21
Tabelle 13: Zusammenfassende Darstellung der Proteinlevel aus Abbildung 6....30
Tabelle 14: Zusammenfassende Darstellung der Proteinlevel aus Abbildung 7....31

Abkürzungsverzeichnis

APC	*adenomatous-polyposis-coli-protein*
ARID	*AT-rich interacting domain containing protein*
ATP	Adenosintriphosphat
BAF	*BRG1 /BRM-associated factor*
BGP	ß-Glycerophosphat
cDNA	Komplementäre DNA
CRC	Kolorektales Karzinom
CRISPR	*clustured regulatory interspace short palindromic repeat*
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	Epitheliale zu mesenchymaler Transition
EZH2	*enhancer of zeste homolog 2*
FBS	Fetales Kälberserum
FSC	*forward scatter*
gRNA	*Guide RNA*
H3K27ac	Histon 3 an Lysin 27 acetyliert
H3K27me3	Histon 3 an Lysin 27 trimethyliert
KRAS	*kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*
NEM	N-Ethylmaleinimid
PanIN	*pancreatic-intraepithelial-neoplasia*
PBAF	*polybromo-associated-BAF*
PBS	*phosphate buffered saline*
PDAC	*pancreatic ductal adenocarcinoma*
PCR	Polymerase Kettenreaktion
qRT-PCR	*quantitative real-time PCR*
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	*small interfering RNA*
SSC	*sideward scatter*
SWI/SNF	*switch defective/sucrose nonfermenting*
Taq	*thermus aquaticus*
TBST	Tris-gepufferte Saline mit Tween20
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

1 Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom stellt eine Krebserkrankung mit schlechter Überlebensrate und steigender Inzidenz dar (McGuigan et al. 2018). Im Jahr 2018 wurden weltweit 432.242 Neuerkrankungen registriert (Bray et al. 2018), das Pankreaskarzinom steht an siebter Stelle der Todesursachen in industrialisierten Ländern, welche auf eine Krebserkrankung zurückzuführen sind (Rawla et al. 2019). Generell ist das Pankreaskarzinom eine Erkrankung des älteren Menschen, 90 Prozent der Erkrankten haben bei Erstdiagnose ein Alter von über 55 Jahren. Männer erkranken häufiger als Frauen (McGuigan et al. 2018). Die Inzidenz entspricht ungefähr der Mortalitätsrate, sodass die 5-Jahres-Überlebensrate bei weniger als 5 Prozent liegt (Shain et al. 2012). Ursächlich für die hohe Mortalität ist vermutlich die späte Diagnosestellung und die frühe Metastasierung, insbesondere *per continuitatem* in anliegende Organe und Lymphknoten (Yachida et al. 2010). Eine einheitliche Risikogruppe konnte bislang, auch aufgrund der Komplexität der Erkrankung, nicht definiert werden. Es sind jedoch die prädisponierenden Faktoren chronische Pankreatitis, Diabetes Mellitus, mangelnde Bewegung und Nikotinkonsum postuliert worden (McGuigan et al. 2018).

Pankreastumoren können aus endokrinen oder exokrinen Zellen entstehen. Hierbei stellen endokrine Tumoren die Minderheit dar, über 90 Prozent aller Pankreastumoren entstehen aus exokrinen Zellen und sind Adenokarzinome, sogenannte *pancreatic ductal adenocarcinoma* (PDAC). Das Adenokarzinom entsteht, vergleichbar mit der Adenom-Karzinom-Sequenz im Kolon, aus Vorläuferläsionen. Die häufigste Vorläuferläsion ist die sogenannte *pancreatic-intraepithelial-neoplasia* (PanIN), welche sich schrittweise, durch Mutationen getriggert, in ein Adenokarzinom umwandelt (Grant et al. 2016). Bei dieser Umwandlung spielt *kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS)* eine führende Rolle (Birnbaum et al. 2011; Ryan et al. 2014; Witkiewicz et al. 2015). Mehr als 90 Prozent der Adenokarzinome haben eine *KRAS*-Mutation aufzuweisen. Es ist anzunehmen, dass *KRAS* ein frühes Event in der Tumorgenese ist und die Tumorentstehung vom frühem ins späte Stadium überführt (Birnbaum et al. 2011). In PanIN Grad 2 und 3 finden sich Mutationen, welche von *KRAS* getriggert zu sein scheinen und die Tumorprogression deutlich vorantreiben (Ryan et al. 2014).

Die Therapiemaßnahmen sind individuell sehr verschieden. Die operative Resektion stellt hierbei nach wie vor die einzige kurative Therapieoption dar, ist jedoch nur nach individueller Analyse der Resektabilitätskriterien verfügbar (McGuigan et al. 2018). Die Chemotherapie stellt sowohl adjuvant als auch neoadjuvant eine weitere Hauptsäule der multimodalen Therapie dar. Hierbei wird je nach klinischem Zustand der Patienten ein Therapieprotokoll

ausgewählt. Die Hauptprotokolle beinhalten sechs Monate adjuvante Chemotherapie mittels modifizierter Folsäure, 5-Fluoruracil, Irinotecan und Oxaliplatin (mFOLFIRINOX), alternativ kann eine Kombination aus Gemcitabin und Capecitabin oder nab-Paclitaxel verwendet werden (Springfeld et al. 2019).

1.2 Das kolorektale Karzinom

Das kolorektale Karzinom (CRC) macht circa 10 Prozent der jährlich diagnostizierten Krebsarten aus und steht damit bei Frauen auf Rang zwei und bei Männern auf Rang drei (Dekker et al. 2019). Männer sind jedoch häufiger betroffen als Frauen (De Rosa et al. 2015). Das mediane Alter bei Erstdiagnose liegt über 50 Jahren, in letzter Zeit hat sich jedoch auch eine merkliche Zunahme der Neudiagnosen unter dem 50. Lebensjahr gezeigt (Dekker et al. 2019). 40-50 Prozent der Patienten mit CRC weisen ein metastasiertes Stadium auf, entweder bereits bei Erstdiagnose oder im Rahmen einer Tumorprogression unter Therapie (Cao et al. 2015). Die Zahl der Erkrankungen ist in westlichen Industriestaaten im Vergleich zu anderen Ländern erhöht, hieraus ergeben sich auch die Risikofaktoren, welche zu einem CRC führen. Zusammengefasst werden sie unter dem sogenannten „westlichen Lebensstil“: Hierzu gehören wenig Sport, fleischreiche Ernährung, sowie Nikotin- und Alkoholkonsum (Lao und Grady 2011; Strum 2016). Auch männliches Geschlecht und ein Alter über 50 Jahren werden zu den Risikofaktoren gezählt (Strum 2016). Außerdem spielt die familiäre Prädisposition eine wichtige Rolle: Hier stellen insbesondere die häufigsten familiären Erkrankungen wie das hereditäre nicht-Polyposis-assoziierte kolorektale Karzinom und die familiäre adenomatöse Polyposis ein enorm erhöhtes Risiko für Adenome dar (Aran et al. 2016).

Ein Großteil der kolorektalen Karzinome entsteht aus einem Polypen. Dieser kann als Vorläuferläsion gesehen werden und entsteht aus aberrantem Drüsenepithel (Dekker et al. 2019). Über die sogenannte Adenom-Karzinom-Sequenz kann durch das Zusammenspiel von Mutationen und epigenetischen Veränderungen über Jahre hinweg ein malignes Karzinom entstehen (Fearon 2011; De Rosa et al. 2015; Aran et al. 2016).

Mehrere hundert Mutationen lassen sich in kolorektalen Karzinomen detektieren (De Rosa et al. 2015). Einige Mutationen können für die maligne Transformation verantwortlich gemacht werden und *driver mutations* genannt; die hieraus resultierenden Mutationen bezeichnet man dann als *passenger mutations* (Lao und Grady 2011). Eine der häufigsten Mutationen ist die *adenomatous-polyposis-coli* (APC)-Mutation, die in über 70% der Adenome zu finden ist. *APC* ist eines der am häufigsten mutierten Tumorsupressorgene, welches zur Aktivierung des WNT-Pathways führt und einen möglichen Mechanismus der Adenom-Karzinom-Sequenz darstellt (Lao und Grady 2011). Neben der *APC*-Mutation stellen eine RAS Aktivierung sowie ein Funktionsverlust von p53 häufige Mutationen dar (Dekker et al. 2019). Epigenetische Veränderungen, welche zu einer veränderten Stabilität der Mikrosatteliten führen, stellen ebenfalls eine häufig detektierte Veränderung im CRC dar (Fearon 2011; Dekker et al. 2019).

Therapeutisch richtet sich das Vorgehen insbesondere nach Lokalisation und Ausdehnung des Tumors (Aran et al. 2016). Der Hauptbestandteil einer kurativen Therapie liegt in der operativen Resektion (Dekker et al. 2019). Rektumkarzinome können von einer präoperativen Bestrahlung profitieren (De Rosa et al. 2015). Die systemische Therapie basiert auf den drei Grundpfeilern Chemotherapie (zum Beispiel mit 5-FU, Folinsäure Oxaliplatin und Irinotecan- FOLFOX, FOLFIRI oder FOLFOXIRI), Immuntherapie und dem Einsatz von Biologika wie *anti-vascular endothelial growth factor* (VEGF) und *anti-epidermal growth factor receptor* (EGFR). Hierbei wird jeder Patient nach Mutationsprofil, körperlichem Zustand und Tumorausdehnung einem individualisiertem Therapiekonzept zugeführt (Dekker et al. 2019).

1.3 Epigenetische Grundlagen

Die Epigenetik beschäftigt sich mit der Frage, wie in der Zelle Genaktivität oder Genomfunktionen reguliert werden, ohne dass dabei die Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Sequenz selbst verändert wird (Moore et al. 2013). Als Träger der Erbinformation liegt die DNA bei eingeschränktem Platzangebot im Zellkern meist verpackt vor (Rothbart und Strahl 2014). Die DNA ist in einer räumlich dreidimensionalen, doppelhelikalen Struktur angeordnet, in welcher die einzelnen Basenpaare komplementär ausgerichtet sind. DNA-Proteinkomplexe im Zellkern heißen Chromatin, diese beinhalten als Hauptstruktur das aus 146 Basenpaaren bestehende Nukleosom, welches sich um einen Histonoktamer wickelt. Histonoktamere bestehen jeweils aus zwei Molekülen H2A, H2B, H3, H4. Die einzelnen Nukleosomen werden mittels Linker-DNA verbunden. Als sogenanntes Heterochromatin kann die DNA auf diese Weise strukturiert und kompakt im Zellkern untergebracht werden (Roberts und Orkin 2004; Klose und Bird 2006; Moore et al. 2013). Aufgrund seiner Kompaktheit ist Heterochromatin der Transkription unzugänglich. Um Genexpression zu ermöglichen muss also die Zugänglichkeit individueller Gene zu sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren geschaffen werden (Roberts und Orkin 2004; Clapier und Cairns 2009; Lorch und Kornberg 2017). Es gibt zwei große Mechanismen, die zur epigenetischen Regulation von Bedeutung sind:

Bei der sogenannten kovalenten Histonmodifikation modifizieren Komplexe mithilfe von Enzymaktivität Histone oder DNA kovalent, zum Beispiel durch Acetylierung, Methylierung oder Phosphorylierung an N-terminalen Aminosäuren (Lawrence et al. 2016). Bekannte Beispiele sind Trimethylierung am Lysin27 des Histon3 (H3K27me3), welche für Repression der Genpromotoren stehen und Acetylierung am Lysin27 des Histon3 (H3K27ac), welche zu einer Aktivierung der Genpromotoren sowie *enhancer* führt (Li et al. 2018).

Der andere Mechanismus, das sogenannte *chromatin remodeling,* nutzt zur Auflockerung von Chromatin die Adenosintriphosphat (ATP)-Hydrolyse als Energielieferant zur Mobilisierung der Histone (Roberts und Orkin 2004). Bekannt sind die vier Komplexe *imitation switch (ISWI), chromodomain, helicase*, *DNA binding (CHD)*, *iniositol requiring 80 (INO80)* und *switch*

defective/sucrose nonfermenting (SWI/SNF), welche die Eigenschaft der ATP-Hydrolyse teilen (Clapier et al. 2017). Zudem besitzen sie eine Affinität zu Nukleosomen mit Untereinheiten, die kovalent modifizierte Histone erkennen können sowie Untereinheiten, die mit Transkriptionsfaktoren interagieren können (Clapier und Cairns 2009). Die jeweiligen Komplexe unterscheiden sich in Ihrer genauen Zusammensetzung in verschiedenen Organismen (Gangaraju und Bartholomew 2007).

Aufgrund ihrer tragenden Rolle in Bezug auf die Genexpression sind Mutationen in den genannten epigenetischen Regulatoren von großer Bedeutung in mutierten Zellen und sind daher ins Augenmerk der Krebsforschung geraten. Ziel ist es, die Mutationen und ihre Rolle bei der Entwicklung maligner Zellen besser zu charakterisieren, um daraus gegebenenfalls neue Therapiemöglichkeiten zu entwickeln.

1.4 Der SWI/SNF (BAF) Komplex

Der Komplex besteht je nach Vorkommen in den jeweiligen Spezies aus neun bis zwölf Untereinheiten. Erstmals entdeckt wurde der SWI/SNF-Komplex im Jahr 1984 ungefähr zeitgleich von zwei Forschergruppen (Neigeborn und Carlson 1984; Stern et al. 1984). Beide beschrieben den Komplex in Hefen. Der SWI/SNF-Komplex existiert auch bei Säugetieren mit vereinzelt anderen Untereinheiten und anderer Nomenklatur, hier wird er dann als *BRG1-BRM-associated factor* (BAF) bezeichnet (Ribeiro-Silva et al. 2019). BRG-1 oder BRM sind die Untereinheiten, welche ATPase Aktivität besitzen (Alfert et al. 2019). Diese wären alleine ausreichend um die Chromatinstruktur zu verändern, die anderen Untereinheiten sind jedoch notwendig um, unter anderem durch Protein-Protein-Interaktionen, eine Regulation und Steuerung der ATPase Aktivität zu ermöglichen (Ribeiro-Silva et al. 2019). Die Untereinheiten können in verschiedenen Gewebetypen oder in einzelnen Zellen unterschiedlich angeordnet sein (Hohmann und Vakoc 2014). Man unterschiedet BAF und *polybromo-associated-BAF* (PBAF) Komplex, im BAF können BRG1 oder BRM als ATPase fähige Untereinheiten vorkommen, wohingegen im PBAF nur BRG1 vorkommt. Zudem gehört *AT-rich interacting domain containing protein* (*ARID)2* anstelle von *ARID1A/B*, zu den Untereinheiten des PBAF (Hodges et al. 2016). Der BAF-Komplex zeigt Einflüsse auf die Regulation der Genexpression (Ribeiro-Silva et al. 2019). In Hefe ist der SWI/SNF-Komplex an der transkriptionellen Aktivierung von circa 5 Prozent aller Gene beteiligt (Sudarsanam et al. 2000). In Säugetieren spielt der BAF-Komplex eine wichtige Rolle in posttranslationaler Modifikation und wird so für viele Gene ein wichtiger Faktor zur optimalen Transkription. Oft ist er mit der transkriptionellen Start-Stelle, Promotoren und anderen 5' Regionen von Genen assoziiert (Shema-Yaacoby et al. 2013). Die vielleicht wichtigste Rolle spielt der BAF-Komplex an *enhancer* Regionen, indem er den Zugang zu diesen mitreguliert (Pillidge und Bray 2019; Xiao et al. 2021).

Der BAF Komplex spielt eine Schlüsselrolle in der embryonalen Entwicklung und ist insbesondere an der neuronalen Entwicklung beteiligt. So sind Mutationen im BAF Komplex

mit neuronalen Entwicklungsstörungen wie zum Beispiel dem Nicolaides-Baraitser-Syndrom, dem Coffin-Siris-Syndrom oder Autismus-Spektrum-Störungen assoziiert (Alfert et al. 2019). Chromatin Remodeling spielt eine wichtige Rolle bei DNA-Reparaturmechanismen, welche vor Genominstabilität und Tumorgenese schützt. Insgesamt kann dem BAF-Komplex hier also eine wichtige Rolle zugeschrieben werden (Roberts und Orkin 2004; Ribeiro-Silva et al. 2019).

Studien belegen, dass 20 Prozent aller Krebserkrankten eine oder mehrere Mutationen im BAF Komplex aufweisen (Vakoc, 2014). Somit gehört der BAF Komplex zu den am häufigsten mutierten Chromatin-remodellierenden Komplexen bei Malignitätsnachweis (Hodges et al. 2016). Meist handelt es sich um *loss of function* Mutationen, weswegen dem BAF Komplex eine tumorsuppressive Eigenschaft zugeschrieben wird (Roberts und Orkin 2004; Hohmann und Vakoc 2014; Hodges et al. 2016; Ribeiro-Silva et al. 2019). Vor allem durch seine tumorsuppressive Bedeutung in rhabdoiden Karzinomen wurde der SWI/SNF Komplex bekannt (Versteege et al. 1998; Alfert et al. 2019). Durch die erhöhte Mutationsrate gerät der SWI-SNF Komplex immer mehr in das Augenmerk der Forschung, denn wenn die einzelnen Aufgaben der verschiedenen Mitglieder besser oder überhaupt verstanden sind können sich hieraus wichtige neue Therapieansätze entwickeln.

1.5 ARID1A

ARID1A, auch BAF 250A genannt, stellt eine Untereinheit des SWI/SNF-Komplexes dar (Mathur 2018). Es ist eines von 15 im Menschen bekannten Proteinen, die eine charakteristische 100 Aminosäuren lange, DNA-bindende *ARID*-Domäne besitzen (Wang SC et al. 2019). Obwohl Mitglieder der *ARID* Familie vorzugsweise an AT-reiche Sequenzen binden, zeigt *ARID1A* interessanterweise einen ausgeprägten generellen DNA-bindenden Charakter, ohne spezielle Sequenzen zu bevorzugen (Wu und Roberts 2013). Ebenfalls zur *ARID* Familie gehören *ARID1B* und *ARID2*. *ARID1A* und *ARID1B* schließen sich gegenseitig aus, somit liegt in einem BAF Komplex nur eines der beiden Proteine vor (Helming et al. 2014). Die beiden Untereinheiten teilen etwa 60 Prozent ihrer Aminosäuresequenzen und haben dennoch Unterschiede in ihrer Wirkungsweise (Helming et al. 2014).

ARID1A ist die am häufigsten mutierte Untereinheit des BAF Komplexes (Hodges et al. 2016). Die Erstbeschreibung von *ARID1A* Mutationen erfolgte im klarzelligen Ovarialkarzinom. Hier fanden sich in circa 50 Prozent der Fälle eine inaktivierende *ARID1A* Mutation (Jones et al. 2010). Mutationen treten auch bei anderen Krebsarten auf und finden sich bei etwa 10 Prozent der Kolonkarzinome (Mathur 2018) und 5 bis 8 Prozent der Pankreastumoren (Wu et al. 2014; Hodges et al. 2016). Die inaktivierenden Mutationen sind meist *frame-shift* und *nonsense* Mutationen (Wu und Roberts 2013). Verschiedene Studien zeigen, dass der Verlust von *ARID1A* zu erhöhten Wachstumsraten und Tumorgenese führt (Guan et al. 2012, S. 1; Wu und Roberts 2013; Wu et al. 2014). *ARID1A* fungiert somit als

Tumorsuppressor (Wu und Roberts 2013; Hodges et al. 2016; Mathur 2018). Hierbei können *ARID*1A Funktionen als *gatekeeper*, welche die Zellproliferation kontrollieren, sowie als *caretaker*, welche die Integrität des Genoms schützen, zugeschrieben werden (Wu et al. 2014).

Es wurde sowohl in Kolonkarzinomen als auch in Ovarialtumoren gezeigt, dass *ARID1A*-Verlust zu verminderter H3K27 Acetylierung von Enhancern führen kann, was zu einem Aktivitätsverlust selbiger führt (Lakshminarasimhan et al. 2017; Mathur et al. 2017). Auch im Zellzyklus konnte *ARID1A* eine wichtige Rolle zugewiesen werden. Bei *ARID1A*-Verlust zeigte sich ein defekter Zellzyklus Kontrollpunkt mit hieraus vermehrt resultierenden DNA Schäden (Shen et al. 2015). *ARID1A* zeigt zudem Interaktionen mit anderen Onkogenen und Tumor-supprimierenden Signalwegen (Wu und Roberts 2013). *ARID1A* Mutationen sind oft zusammen mit aktivierenden Mutationen von PI3KCA oder einem Verlust von PTEN assoziiert vorzufinden (Mathur et al. 2017). Im klarzelligen Ovarialkarzinom konnte bei *ARID1A* Verlust eine Zunahme der AKT Phosphorylierung nachgewiesen werden, welche auf eine gegenseitige Abhängigkeit zwischen *ARID1A* Mutation und Aktivierung des PI3K/AKT Signalweges schließen lässt (Wiegand et al. 2014). *ARID1A*, beziehungsweise dem BAF Komplex kann eine gegensätzliche Wirkungsweise zu Polycomb-Proteinkomplexen zugewiesen werden, hier scheint ein Defekt dem Polycombkomplex den Zugang zu Chromatin zu erleichtern (Mathur 2018). Insgesamt können somit Inaktivierung oder Depletion von *ARID1A*, welcher unter anderem die oben genannten Assoziationen auslösen, in der Zukunft potentielle neue Therapiestrategien darstellen (Wu und Roberts 2013).

1.5.1 *ARID1A* im Pankreaskarzinom

Als Teil des BAF Komplexes kann *ARID1A* in etwa 10 bis 15 Prozent aller PDAC als mutiert gefunden werden und stellt somit eines der häufigsten mutierten Gene in PDAC dar (Ryan et al. 2014). Die Effekte des Verlusts von *ARID1A* in Pankreastumoren sind bislang noch nicht suffizient beschrieben worden. In mehreren Studien konnte die bereits bekannte tumorsuppressive Eigenschaft bestätigt werden (Numata et al. 2013; Kimura et al. 2018; Wang SC et al. 2019; Tomihara et al. 2020). Beim Verlust von *ARID1A* zeigt sich eine vermehrte epitheliale zu mesenchymaler Transition (EMT), welche ein Passieren der Basalmembran ermöglicht (Tomihara et al. 2020). *ARID1A* Verlust triggert in Anwesenheit von *KRAS* die Entstehung von PDAC (Kimura et al. 2018). *ARID1A* wird eine kontextabhängige Wirkung nachgesagt, so konnten erstaunlicherweise in Einzelfällen gezeigt werden, dass Patienten mit *ARID1A* Deletion in einem kurzen Nachbeobachtungsintervall ein längeres Überleben im Vergleich zu Patienten ohne Mutation aufweisen(Sausen et al. 2015). Somit steht die genaue Einordnung der Funktion von *ARID1A* im Pankreaskarzinom bis heute aus.

1.5.2 *ARID1A* im kolorektalen Karzinom

In kolorektalen Karzinomen liegt die Mutationsfrequenz von *ARID1A* bei etwa 10 Prozent (Erfani et al. 2020). Hier ließen sich in mehreren Studien die tumorsuppressiven Funktionen von ARID1A bestätigen (Erfani et al. 2020). Es zeigt sich in *ARID1A*-mutierten Zellen eine verminderte Enhancer Aktivität sowie ein vermindertes Level an H3K27ac (Mathur et al. 2017). *ARID1A* Verlust führt auch im kolorektalen Karzinom zu einer erhöhten Rate an Mikrosatelliten Instabilität (Putra und Suriawinata 2015), welche zu einer vermehrten klinischen Progression im Sinne von Metastasierungen führen kann (Ye et al. 2014). In mehreren klinischen Studien ließ sich eine Verbindung von *ARID1A* Verlust und schlechter Tumordifferenzierung zeigen, jedoch ohne signifikanten Überlebensnachteil (Lee et al. 2016). Im kolorektalen Karzinom zeigt sich, wie auch in Pankreastumoren, eine Kontextabhängigkeit der Wirkungsweise von *ARID1A* (Sun et al. 2017).

1.6 Ziele der Arbeit

Aus den oben genannten Punkten geht hervor, dass eine *ARID1A* Mutation eine wichtige Rolle in vielen Tumoren innehat. In dieser Arbeit soll das Augenmerk auf kolorektale Karzinome und Pankreastumoren gerichtet werden. Es erfolgte die Auswahl der beiden Tumorentitäten aufgrund gewisser Parallelitäten, sowohl auf der molekularen Ebene als auch in der Behandlung: So sind beide Entitäten oft mit *KRAS* und p53 Mutationen vergesellschaftet, metastasieren häufig in die Leber und werden mittels ähnlicher Chemotherapieschemata (FOLFIRINOX bei Pankreaskarzinom, mFOLFOX oder FOLFIRI bei kolorektalem Karzinom) behandelt. Beide Entitäten sind mit einer eher schlechten Prognose vergesellschaftet und werfen die Frage auf, ob und wenn ja inwieweit, in Zukunft neue Therapiestrategien zur besseren Behandlung gefunden werden können. Die Zielsetzung dieser Arbeit ist es daher, die Rolle von *ARID1A* Mutationen in diesen Tumoren genauer zu charakterisieren.

Ein besseres Verständnis von Zellen und Tumoren mit *ARID1A* Mutationen kann die Grundlage für potentielle neue Therapiekonzept darstellen. Besonders relevant ist dies vor dem Hintergrund der personalisierten Medizin, welche in den nächsten Jahren einen immer größeren Stellenwert in der onkologischen Therapie einnehmen wird. So könnte Patienten eine bessere, auf das jeweilige Mutationsprofil personalisierte, Therapie ermöglicht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Technische Geräte

Tabelle 1: Liste der verwendeten technischen Geräte

Gerät	**Firma**
Agarose-Gel Kammer	Apogee Electrophoresis, Baltimore, USA
Balance	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Bead bath „isotemp“	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Biological saftey Cabinet „Safe 2020“	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Bioruptor® Pico sonication device	Diagenode, Seraing, Belgien
Celigo S Cell Imaging Cytometer	Nexcelom Bioscience LLC, Lawrence, USA
CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
ChemiDocTM MP System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Gefrierschrank -20°C	Liebherr GmbH, Biberach, Deutschland
Gefrierschrank -80°C „New Brunswick™Innova® ”	Eppendorf GmbH, Wesseling- Berzdorf, Deutschland
Gefrierschrank -150°C	Ewald Innovationstechnik, Bad Nenndorf, Deutschland
Gel Imager “Gel iX imager”	Intas Science Imaging, Göttingen, Deutschalnd
Ice-machine B100	Ziegra, Isernhagen, Deutschland
Incubator (cell culture) “Hera cell 150i”	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Invert Microscope „Axiovert 40 CFL“	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland
Isotemp® Wasserbad	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kühlschrank 4°C	Liebherr GmbH, Biberach, Deutschland
Magnetic stirrer “IKA®RCT-basic”	IKA® -Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland

Gerät	**Firma**
Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Mr. Frosty® Cryo Freezing Container	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nanodrop DS-11 „Spectrophotometer"	DeNovix Inc., Wilmington, USA
NucleofectorTM 2b electroporation device	Lonza Bioscience, Basel, Schweiz
pH-meter "WTW-720"	InoLab® Series WTW GmbH, Weilheim, Deutschland
Pipette Aid® portable XP	Drummond Scientific Co., Broomall, USA
Pipettes "Research plus" Series	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
PowerPac™ HC High-Current Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Qubit® 2.0 Fluorometer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Roller mixer	A.Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Scanner (Epson Perfection V700)	Seiko Epson Corporation; Nagano, Japan
Shaker	A.Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Stickstofftank LS4800	Worthington Industries, Theodore, USA
T100™ Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
ThermomixerC	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vakuum Pumpe	Vacuubrand GmbH + Co Kg, Wertheim, Deutschland
Vortex mixer	Scientific Industries, Inc., Bohemia, USA
Zählkammer (Neubauer)	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Zentrifuge (Megafuge 8R)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge 4°C (5417R)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

2.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2: Liste der Verbrauchsmaterialien

Materialbezeichnung	**Firma**
Amersham™ Protran™ 0,45 µM nitrocellulose Transfermembran	GE Healthcare Europe GmbH, München, Deutschland
Cell scraper (16 cm, 25 cm)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Cellstar 6- 12- and 24 well Zellkulturplatte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar Zellkulturschale 100×20 mm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar Zellkulturschale 145×20 mm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar tubes, 15mL and 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Cryo TubeTM Vial (1,8 ml)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Disposable Safety Scalpel	FEATHER Safety Razor Co., Osaka, Japan
FACS tube with cell strainer cap (12 x 75 mm)	BD Biosciences, Bedford, USA
Filterpipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Gel blotting paper (Whatman)	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Injekt-F Syringes (1 ml)	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Klebeband für qPCR Platten	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Microtube 1.5 ml, 2 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Multiply PCR Microtube strip (8 x 0,2 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Parafilm®M	Pechiney Plastic Packing, Chicago, USA
PCR -Platte, weiß 96-well Multiplate	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Petrischale 92x16 cm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Spritzenfilter, 0,2µm	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Tecan ® Infinite reader	Tecan, Crailsheim, Deutschland

2.3 Chemikalien

Tabelle 3: Liste der verwendeten Chemikalien

Bezeichnung	**Firma**
Agarose	GeneOn GmbH, Ludwigshafen am Rhein, Deutschland
Albumin Fraktion V (*Bovine serum albumin*)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Amoniumperoxidsulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumsulfat (NH4)2SO4	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
β-Glycerolphosphate (BGP)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Bromophenolblau	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Calciumchlorid (CaCl2)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Chlorwasserstoff	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP)	Jena Bioscience GmbH, Jena, Deutschland
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dinatriumhydrogenphsophat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DL-Dithiothreitol (DTT), BioUltra, ≥99,0%	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO®	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
Disuccinimidylglutarat (DSG)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethylenglycol (EGS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ethanol absolut	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland

Bezeichnung	**Firma**
Ethansäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum (FBS)	Thermo Scientific HyClone, Logan, USA
Formaldeyhd (37%)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Glutaraldehyd (25%)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
HD Green® DNA stain	Intas Science Imaging GmbH, Göttingen, Deutschland
Immobilon™ Western HRP Substrat	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Iodacetamid	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kristallviolett	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Leupeptin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Lithiumchlorid (LiCl), 8M	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Magnesiumchlorid (MgCl2)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
MEM GIBCO®	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Bezeichnung	Firma
N- Ethylmaleinimid (NEM)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
PBS Tabletten GIBCO®	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pefabloc® SC Protease Inhibitor	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin- Streptomycin Lösung	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
pH-Lösung (pH 4,01; 7,01; 10,01)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ponceau S Lösung	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
RPMI 1640 GIBCO®	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
PrestoBlue®	Thermo Scientific HyClone, Logan, USA
Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TRIzol® Reagenz	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
Trypsin-EDTA (0,05%) GIBCO®	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tween-20	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H2O2) 30%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

2.4 Inhibitoren

Tabelle 4: Verwendete Inhibitoren

Inhibitor	Angriffspunkt	Quelle	Bestellnummer
EPZ	EZH2	Selleckchem	S7128

2.5 Enzyme

Tabelle 5: Verwendete Enzyme

Enzym	**Firma**
Proteinase K	Life Technology, Carlsbad, USA
Reverse Trankriptase (M-MuLV)	New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
RNase inhibitor	New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Taq-Polymerase (5U/µl)	Primetech, Minsk, Weißrussland

2.6 Software

Tabelle 6: Software

Software	**Quelle**
Celligo S Imaging Cytometer Enviroment	Nexcelom Bioscience, Lawrence, USA
Epson Scanner Software	Seiko Epson Corporation, Nago, Japan
Image Lab 5.2	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Microsoft Excel, PowerPoint, Word	Microsoft, Redmond, USA
MIT CRISPR design software	http://crispr.mit.edu/
Primer designing tool NCBI/ Primer-BLAST	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/
Zeiss ZEN lite Software	http://www.zeiss.com/microscopy/en_de/products/microscope-software/zen-lite.html

2.7 Primer

Tabelle 7: Genotypisierungs PCR

Gen	**5‘-3‘ (Vorwärts)**	**3‘-5‘ (Rückwärts)**
ARID1A knockout	ACTGGAAGAAGACAAAAGTGC	CTGCTGCTCCAGACAAAGAA

Tabelle 8: qRT-PCR Primer

Gen	**5‘-3‘ (Vorwärts)**	**3‘-5‘ (Rückwärts)**
ARID1A Exon 2	GCAAGATGAGACCTCAGCCA	CCATAAGGAGGAATCTGCTGTGT
CBX 5	GAATCGCAGCTTCTGAGACCA	CTGGCGATAGCTGTAGGAAGT
KRT 19	CARGAGGAGGAAATCAGTACGCT	TTGGCTTCGCATGTCACTCA

2.8 siRNA

Tabelle 9: siRNA

Gen	**Sequenz (5‘-3‘)**	**Quelle**	**Bestellnummer**
ON-TARGET plus siRNA ARID1A		Dharmacon	LU-017263-00-0005
#1	GAAUAGGGCCUGAGGGAAA		
#2	AGAUGUGGGUGGACCGUUA		
#3	GCAACGACAUGAUUCCUAU		
#4	GGACCUCUAUCGCCUCUAU		

2.9 Antikörper

Tabelle 10: Primäre Antikörper für Westernblot

Antikörper	**Gattung**	**Klon**	**Quelle**	**Bestellnummer**	**Verdünnung**
ARID1A	Hase	D4A8U	CST	12354	1:1000
CD24	Maus	SWA11	Hans Peter		1:2
E-cadherin	Hase	24E10	Cell signaling	3195	1:1000
HSC-70	Maus	B-6	Santa Cruz	#2184	1:10000
Snail-1	Maus		Abcam	Ab17732	1:1000
SMARCC1	Hase	D7F8S	CST	11956	1:1000

Tabelle 11: sekundäre Antikörper für Westernblot

Antikörper	Bestellnummer	Quelle	Verdünnung
Goat Anti-Mouse immunoglobulin G-HRP	Sc-2004	Santa Cruz	1:10000
Goat Anti-Rabbit immunoglobulin G-HRP	Sc-2005	Santa Cruz	1:10000

2.10 Zellkultur

2.10.1 Zellen

Tabelle 12: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Tumor	Kulturmedium	Quelle
L3.6pl	Pankreaskarzinom	MEM	Dr. Elisabeth Heßmann, Universitätsmedizin Göttingen
SW480	Kolorektalkarzinom	RPMI 1640	ATCC® (CCL-228™)

Die Zelllinie für dieses Projekt wurden in den in **Tabelle 12** genannten Medien kultiviert. Es erfolgte die Zugabe von 10% FBS, 100 IE/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin. Die Bebrütung erfolgte bei 37 °C und 5% CO_2. Für die jeweiligen *Clustured Regulatory Interspace Short Palindromic Repeat* (CRISPR) /Cas9-Klone wurde kein anderes Medium verwendet.

2.10.2 siRNA vermittelter *knockdown*

Small interfering RNA (siRNA) Transfektion wurde mittels RNAiMAX, gemäß der Anleitung der Firma, durchgeführt. Für Transfektionen im 6-Well Format wurde für jedes Well 1,5 µl siRNA mit 500 µl OPtiMEM Medium gemischt. Hierauf wurden 5 µl RNAimax gegeben, dieses Gemisch wurde dann für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurden die Zellen trypsiniert und mit Antibiotika-freiem Medium verdünnt bis 2,5 ml Medium pro Well 250.000 Zellen enthielten. Dieses Zellengemsich wurde dann in die bereits siRNA-RNAiMAX Gemisch enthaltenden Wells eingefüllt. Das Medium wurde nach 24 Stunden durch frisches, Antibiotika enthaltendes Medium ersetzt. Die Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion geerntet.

2.10.3 CRISPR/Cas9-vermittelter *knockout*

CRISPR vermitteltes Gen-*Knockout* erfolgte in SW480- und L3.6pl- Zellen, um einen *ARID1A*-defizienten Tumor zu imitieren. Die *guide RNAs* (gRNA) wurden so designt, dass Exon 5 des *ARID1A* Gens von der gRNA flankiert wird und möglichst keine anderen Sequenzen gebunden werden. Beim Designen der gRNA wurde darauf geachtet, dass die Nukleotide zwischen den Bindungspunkten zu einer Leserasterverschiebung führen. Der Verlust des Fragments verursachte einen Verlust des Leserahmens (*out of frame*) und führte somit zum Proteinverlust. Die gRNA wurde mithilfe des Bbsl-Restriktionsenzyms in das pSpCas9(BB)-2A-GFP Plasmid kloniert. 4 – 6 µg des Plasmids wurden mithilfe von Elektroporation in die Zellen gebracht. Hierfür wurde der Lonza Nukleofector™ mittels V-Kit und dem Programm D-032 verwendet. 3 – 5 Millionen Zellen wurden nach Transfektion mittels Transfektionspuffer resuspendiert und 48 Stunden nach Transfektion mittels Durchflusszytometrie (Sabrina Becker, Cell-Sorting, Universitätsmedizin Göttingen) anhand ihrer GFP Positivität sortiert. Die einzelnen Zellklone wurden kultiviert und vermehrt.

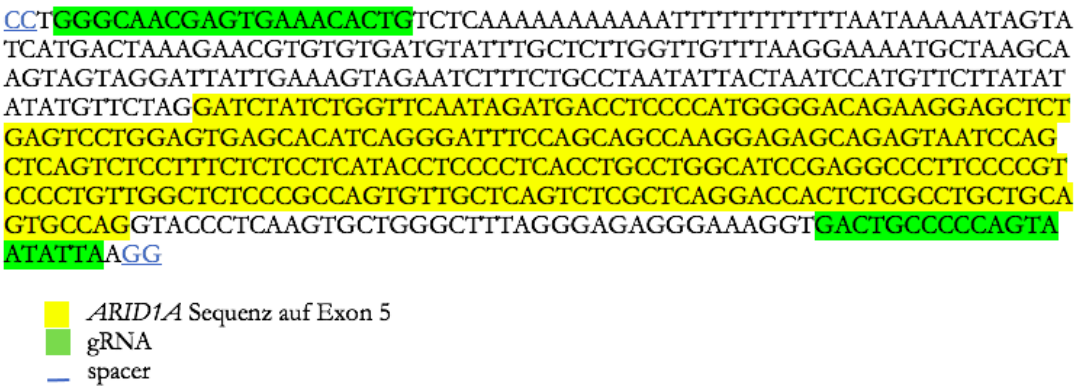


Abbildung 1: Kompletter *ARID1A Knockout* auf Exon 5. Die gelb markierte Sequenz stellt *ARID1A* auf Exon 5 dar, umgeben von den grün markierten guideRNA (gRNA) Sequenzen. Am Ende stehen die blau markierten *Spacer*, welche die Cas9-Bindung ermöglichen.

2.10.4 Behandlung mit Inhibitoren

Die Inhibitoren (**Tabelle 4**) wurden in verschiedenen Dosierungen in DMSO vorbereitet. Die Verdünnung erfolgte mittels entsprechender Zellkulturmedien (Zielverdünnung DMSO: 1:1000). Es erfolgte die Behandlung der Zellen. Die Inhibitoren wurden alle 48 Stunden neu auf die Zellen gegeben. Zur Kontrolle dienten Zellen, die nur mit der DMSO Zielverdünnung oder gar nicht behandelt worden waren.

2.10.5 Zellwachstumsanalyse

50.000-70.000 Zellen wurden in jeweils ein Well einer 24-Well-Platte gegeben. Es erfolgte die Analyse in Duplikaten oder Triplikaten. Das Wachstum wurde anhand der Ausbreitung der Zellen auf der verfügbaren Fläche bestimmt. Die Bestimmung erfolgte alle 24 Stunden

mittels Celligo S Cell Imaging Cytometer. Die gemessene Ausbreitung wurde jeweils zur Ausbreitung an Tag 1 normalisiert.

2.10.6 Lebensfähigkeitsanalyse nach Chemotherapie Behandlung

Die Zellen wurden 24 Stunden nach Transfektion mittels siRNA trypsinisiert und mit einer Dichte von 3.000 Zellen/100µl auf eine 96-well-Platte gegeben. Anschließend wurde Gemcitabin in verschiedenen Konzentrationen hinzugegeben. Neben den behandelten Zellen dienten unbehandelte Kontrollen zur Referenz. Zur Detektion eines Fluoreszenzsignals, die Lebensfähigkeit der Zelle widerspiegelnd, erfolgte die Zugabe von PrestoBlue® (ein auf Resazurin basierender Farbstoff). Die Vitalitäsanalyse erfolgte nach 4 Stunden. Vitale Zellen sind dazu in der Lage das blaue Resazurin in rotes Resofurin umzuwandeln. Das gemessene Signal ist somit als proportional zur Anzahl von metabolisch aktiven Zellen zu werten. Die Messung erfolgte mittels Tecan Ultra Plate®.

2.10.7 Kristallviolettfärbung

Die Zellen wurden in verschiedenen Konditionen angezüchtet. Bei ausreichendem Wachstum erfolgte die einmalige Waschung mittels *phosphate buffered saline* (PBS). Zur Fixierung der Zellen wurde 99% Methanol verwendet. Die Färbung erfolgte dann mit 1% Kristallviolett in 2% Ethanol. Die Analyse wurde mittels Färbeintensitätsunterscheidung mit ImageJ durchgeführt.

2.11 Molekulare Analysen

2.11.1 RNA-Isolierung

Die Ribonukleinsäure (RNA)-Isolierung wurde mit QIAzol® nach den Anweisungen der Firma vorgenommen. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und durch Zugabe von 500 µl QIAzol® lysiert. Die geernteten Zellen wurden anschließend in einem 1,5 ml Reagenzröhrchen gesammelt. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurden die Proben gevortext und anschließend bei 10000 G für 20 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Nun wurde die wässrige Phase abgenommen. Es schloss sich eine weitere Chloroform Extraktion an, indem ein gleiches Volumen Isopropanol zur wässrigen Phase hinzufügt wurde und sich über Nacht bei -20°C ein Überstand gebildet hat. Am Folgetag erfolgte die Zentrifugation bei 12000G für 20 Minuten sowie das zweimalige Waschen des Pellets mit 70% Ethanol. Nachdem das Pellet getrocknet war, wurde es in 40 µl DEPC-Wasser gelöst. Die RNA Konzentration wurde mit Hilfe des NanoDrops® gemessen.

2.11.2 DNA-Isolierung

Zur DNA-Isolierung wurden jeweils 300 µl Lysierungspuffer und 2 µl Proteinase K zu den geernteten Zellen gegeben mit anschließender Inkubation bei 65 °C über Nacht. Es erfolgte die Zugabe des geleichen Volumens Isopropanol zum bereits bestehenden Volumen sowie die Zentrifugation bei 10000 G für 10 Minuten. Der Überstand wurde verworfen. Die DNA wurde dann zweimal mit jeweils 500 µl 70% Ethanol gewaschen und anschließend bei 37 °C getrocknet. Das trockene Pellet wurde in 50 µl ddH_2O resuspendiert und noch einmal für 30 Minuten bei 55 °C gelagert.

2.11.3 cDNA Synthese

Zur Herstellung der komplementären DNA (cDNA) wurde 1 µg RNA verwendet. Diese wurden mit 2 µl der 9 µM zufälligen Primer und mit 4 µl der 2,5 mM dNTP gemischt. Anschließend wurde das Volumen mit DEPC-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 16 µl ergänzt. Das Gemisch wurde daraufhin für 5 Minuten bei 70 °C inkubiert. Danach wurden 4 µl des *Reversen Transkriptase Master-Mixes*, bestehend aus 2 µl 10x Reaktionspuffer, 10 Einheiten RNAse Inhibitor, 25 Einheiten M-MuLV reverse Transkriptase sowie 1,625 µl DEPC-Wasser jeder Probe beigefügt. Die cDNA Synthese erfolgte bei einer einstündigen Inkubation bei 42 °C, gefolgt von einer Inaktivierung der Enzyme bei 95°C für 5 Minuten. Abschließend wurden die Proben mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 50 µl verdünnt.

2.11.4 Genotypisierungs PCR

Für jede Polymerase Kettenreaktion (PCR) erfolgte die Verwendung von 100 ng DNA. Für jede PCR Reaktion wurde der nachfolgende Mix verwendet und auf ein Gesamtvolumen von 25 µl gebracht. Dieses Gemisch bestand aus 2,5 µl 10x Puffer B, 2,5 µl 2 mM dNTP, 2 µl 25 mM $MgCl_2$,1 µl 10 µM vorwärts Primer, 10 µM rückwärts Primer sowie 0,15 µl *Thermus aquaticus* (Taq)-Polymerase. Nach 15-minütiger initialer Denaturierung erfolgten 35 Zyklen von 30 Sekunden bei 95 °C zur Denaturierung gefolgt von 45 Sekunden bei 60 °C zum *Annealing* sowie 60 Sekunden bei 72 °C zur Polymerisation. Zum Abschluss erfolgte die endgültige Polymerisation bei 72 °C für 10 Minuten. Die PCR wurde auf 1% Agarosegel bei 100 Volt für 45 Minuten gefahren und anschließend mittels INTAS sichtbar gemacht.

2.11.5 Quantitative real-time PCR

Es erfolgte die PCR in einem Gesamtvolumen von jeweils 25 µl. Hierfür wurde 1µl der cDNA Probe mit 8,5 µl ddH_2O sowie 1,5 µl der 5 µM Primer (gemischt aus vorwärts und rückwärts Primern) sowie aus 14 µl des *quantitative real-time PCR* (qRT-PCR) Mixes verwendet. Der qRT-PCR-Mix setzte sich aus 75 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)-HCl (pH 8,8), 20 mM $(NH_4)2SO_4$, 0,01% Tween-20, 3 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTP, 0.5 U/Reaktion Taq-DNA-Polymerase, 0.25% Triton X-100, 1:80.000 SYBR Green I und 300 mM Trehalose zusammen.

Ein Protokoll aus 2 Minuten 95 °C, 15 Sekunden 95 °C, und einer Minute 60 °C wurde für jedes Primer-Paar verwendet, wobei die letzten beiden Schritte 40-mal wiederholt wurden. Die Analyse erfolgte mithilfe des Schmelzpunktes von 65 °C bis 95 °C, mit Messungen im Abstand von 0.5 °C.

Die cDNA Proben wurden mit einer Standardkurve, die sich aus allen Proben zusammensetzte, quantifiziert. Vor der Analyse wurden alle qRT-PCR Proben zum Referenzgen *HNRPK* normalisiert. Die Expressionslevel wurden relativ zum Referenzgen ermittelt und beschreiben folglich die relative *messenger RNA* Expression.

2.11.6 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Färbungen wurden mit Unterstützung der Abteilung für Allgemein-, Viszeral-, und Kinderchirurgie der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt. Für die Färbung von ARID1A wurden die Objektträger deparrafinisiert, rehydriert und mit EDTA und Tween 20 für 6 Minuten in einem Druckkocher inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur erfolgte die Waschung und Inkubation in 3%-igem H_2O_2 für 10 Minuten. Hiernach schloss sich eine erneute Waschung sowie die Inkubation mittels ARID1A Antikörper (1:500) über Nacht an. Am nächsten Tag erfolgte die Inkubation mit einem sekundären Antikörper sowie die Färbung mit 3,3‘-Diaminobenzin für 8 Minuten bei Raumtemperatur. Die Analyse wurde mikroskopisch durchgeführt, die Gruppierung ergab sich aus der Intensität der ARID1A-Färbung.

2.12 Protein Biochemie

2.12.1 Natriumdodeylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese und Westernblot

Die Zellen wurden zur Proteinextraktion in RIPA-Puffer und einem Puffer zur Proteinase Inhibition (1 nM Pefabloc, 1 ng/µl Aprotinin/Leupeptin, 10 mM BGP, 1 mM NEM) lysiert und geerntet. Daraufhin wurden die Proben für zehn Zyklen für je 30 Sekunden in einen Bioruptor Pico® (Diagenode) gegeben, um die genomische DNA zu zerkleinern. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben unter Zugabe von Leammlipuffer (375 mM Tris/HCL, 10% Natriumdodecylsulfat (SDS), 50% Glycerol, 0,06% Bromophenolblau, 600 mM DTT) bei 95 °C für 5-10 Minuten gekocht. Es erfolgte die Beladung eines 7-10% SDS-Gels (375 mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,04% Tetramethylethylendiamin) mit gleichen Mengen Protein. Die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese wurde dann bei 20 mA für 1,5-2 Stunden in *running buffer* (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,01% SDS) durchgeführt. Es erfolgte die Übertragung der aufgeteilten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran bei 4 °C und 100 V für circa 1,5 Stunden mit Hilfe des Transferpuffers (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol). Der Transfer wurde anhand einer Ponceau S-Färbung sichtbar gemacht. Die Blockierung der Membran erfolgte durch 5% Milchpulver in Tris-gepufferter Saline mit Tween20 (TBST). Die Inkubation mit

primärem Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurde die Membran 3-mal in TBST für jeweils 10 Minuten gewaschen. Hierauf folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach erneuter dreimaliger TBST Waschung wurde das HRP Substrat hinzugefügt. Die fertige Nitrocellulose Membran wurde dann unter dem ChemicDOC™ unter Zuhilfenahme der Bio-Rad Software analysiert.

2.13 Datenanalyse

2.13.1 *National Cancer Institute (NCI)* - genomische Daten

Es wurden mit Hilfe der frei zugänglichen genomischen Daten des National Cancer Institutes GDC Datenportals (https://portal.gdc.cancer.gov) Analysen durchgeführt (Heath et al. 2021). Für Pankreas- und Kolonkarzinome wurde die Kohorte des *is cancer gene census* verwendet (Sondka et al. 2018). Dieser wurde mit Hilfe des verfügbaren Plots aufbereitet.

2.13.2 cBioPortal

Das *cBio Cancer genomics Portal* (http://cbioportal.org) stellt eine frei zugängliche Plattform zur Entdeckung und Verarbeitung von genomischen Datensätzen dar (Cerami et al. 2012). Es erfolgte die Verwendung eines Datensatzes des The Cancer Genome Atlas, der PanCancerAtlas. Dieser wurde für Kolorektalekarzinome und Pankreaskarzinome auf *ARID1A* Mutation detektiert und mit Hilfe der Suchanfrage zum Mutationsplot geführt.

3 Ergebnisse

3.1 Datenanalyse

Mittels online verfügbaren Studiendaten wurde zunächst eine genauere Analyse des zu untersuchenden Gens *ARID1A* durchgeführt. Anhand frei zugänglichen Datensätzen des National Cancer Institute (NCI) Genomic Data Commons (GDC) erfolgte die Analyse der häufigsten mutierten Gene in Pankreas- und Kolorektalkarzinomen. In der repräsentativ gewählten Kohorte von Patienten mit kolorektalen Karzinomen (**Abbildung 2**) gehört *ARID1A* zu den 15 häufigsten mutierten Genen. Hier zeigte sich *ARID1A* bei 91 von 579 Fällen mutiert, dies entspricht einer Frequenz von 15,72%. Im gesamten GDC Register war dagegen nur bei 1068 von 13035 Fällen *ARID1A* mutiert (9,4%). Auch für *KRAS* zeigte sich bei Patienten mit kolorektalem Karzinom eine höhere Mutationsfrequenz (37,8%) im Vergleich zum gesamten Register (12,9%).

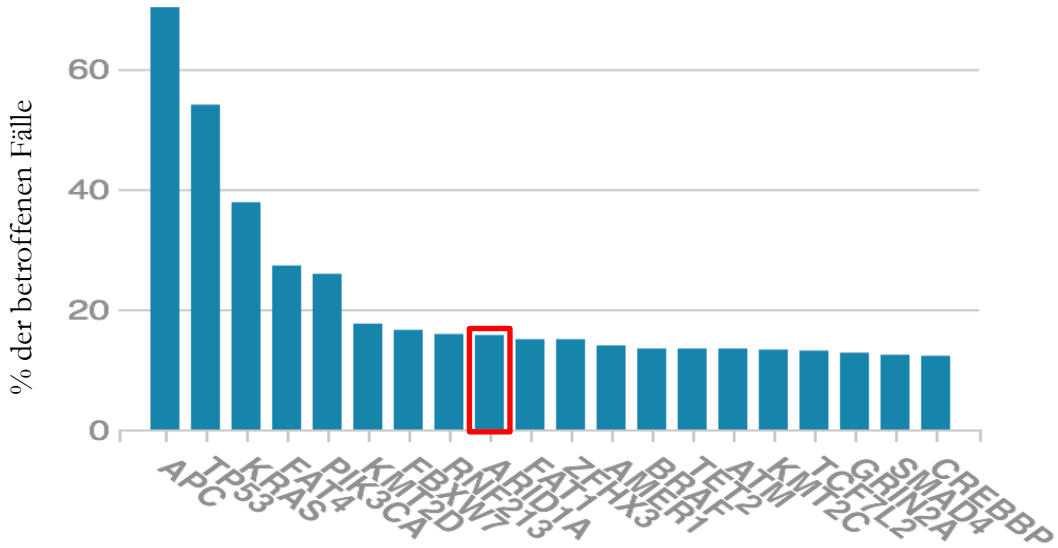


Abbildung 2: Relative Häufigkeit mutierter Gene bei kolorektalen Karzinomen(n=579; Quelle: NCI genomic data commons) *ARID1A* in rot markiert mit einer Mutationsfrequenz von 91/579 Fällen an Stelle 9 (Mutationsfrequenz 17,5%). Im Vergleich dazu zeigt sich *APC* zu 70,3% mutiert (407/579) sowie *KRAS* mit 37,8% (219/579).

Mithilfe der Analyse von Daten aus dem Pan-Cancer-Projekt erfolgte die genauere Betrachtung der Mutationen, welche bei kolorektalen Karzinomen in *ARID1A* vorherrschend sind. Hierbei zeigten sich insbesondere *missense* Mutationen sowie trunkierende Mutationen über das gesamte Gen verteilt (**Abbildung 3**).

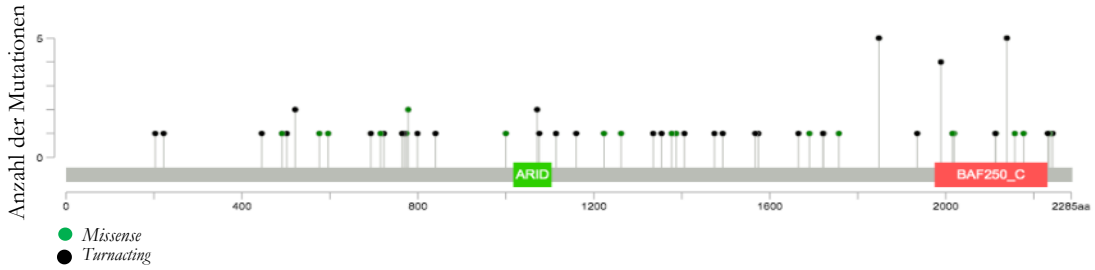


Abbildung 3: Mutationsspezifizierung von *ARID1A* in kolorektalen Karzinomen. Darstellung des *ARID1A* kodierenden Abschnitts mit Aminosäuren Nummerierung auf der y-Achse und Anzahl der Mutationen auf der x-Achse. die verschiedenfarbigen Punkte stehen jeweils für Mutationen; grün steht für *missense* und schwarz für *truncating* Mutationen. (n=526; somatische Mutationsfrequenz 11%)

In Pankreaskarzinomen erfolgte analog die Datenanalyse zur Detektion der Häufigkeit von *ARID1A* Mutationen. Hier stellt *ARID1A* mit einer Mutationsfrequenz von 5,1% das neunthäufigste mutierte Gen dar (**Abbildung 4**). Während sich in der gesamten GDC Datenbank bei 1089 von 12035 Fällen (0,9%) eine *ARID1A* Mutation zeigte, fand sich diese in der ausgewählten Pankreaskarzinom Kohorte bei 16 von 316 Fällen (5,1%). *KRAS* Mutationen fanden sich bei 82,6% der Pankreaskarzinom Fälle.

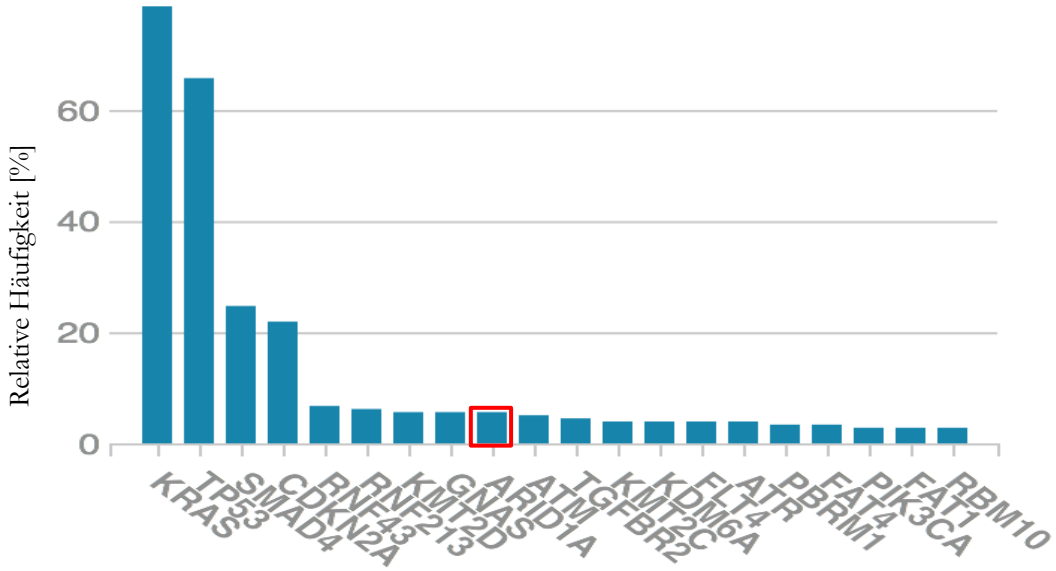


Abbildung 4: Relative Häufigkeit mutierter Gene bei Pankreaskarzinomen. (n=316; Quelle: NCI Genomic Data Commons) *ARID1A* in rot markiert mit einer Mutationsfrequenz von 16/316 Fällen (Mutationsfrequenz 5,1%). Im Vergleich dazu zeigt sich *KRAS* mit 81,8% mutiert (261/319) sowie TP53 mit 65,8% (210/319).

Die genauere Analyse der Mutationen die Sequenz des *ARID1A*-Gens erbrachte die in **Abbildung 5** dargestellten *missense* und *truncating* Mutationen über die Basensequenzen verteilt.

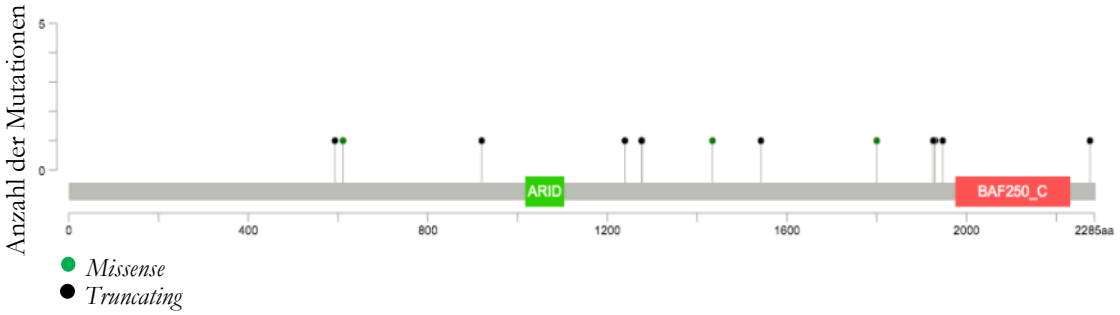


Abbildung 5: Mutationsspezifizierung von *ARID1A* in Pankreaskarzinomen. Darstellung des *ARID1A* kodierenden Abschnitts mit Aminosäurenummerierung auf der y-Achse und Anzahl der Mutationen auf der x-Achse, die verschiedenfarbigen Punkte stehen jeweils für Mutationen; grün steht für *Missense* und schwarz für *Truncating* Mutationen. (n=175; somatische Mutationsfrequenz 5,7%)

3.2 Zelllinienauswahl

Nachdem die große Häufigkeit von *ARDI1A*-Mutationen in kolorektalen- und Pankreaskarzinomen gezeigt werden konnte, erfolgte im nächsten Schritt die Auswahl einer geeigneten Zelllinie für die hier vorliegende experimentelle Arbeit. Hierfür wurden verschiedene Zelllinien der jeweiligen Tumoren auf ihre Proteinlevel bezüglich verschiedener Bestandteile des BAF Komplexes getestet, mit besonderem Augenmerk auf der Expression von ARID1A, auch unter dem Gesichtspunkt, dass ARID1A nur in Abwesenheit von ARID1B vorliegen kann und umgekehrt.

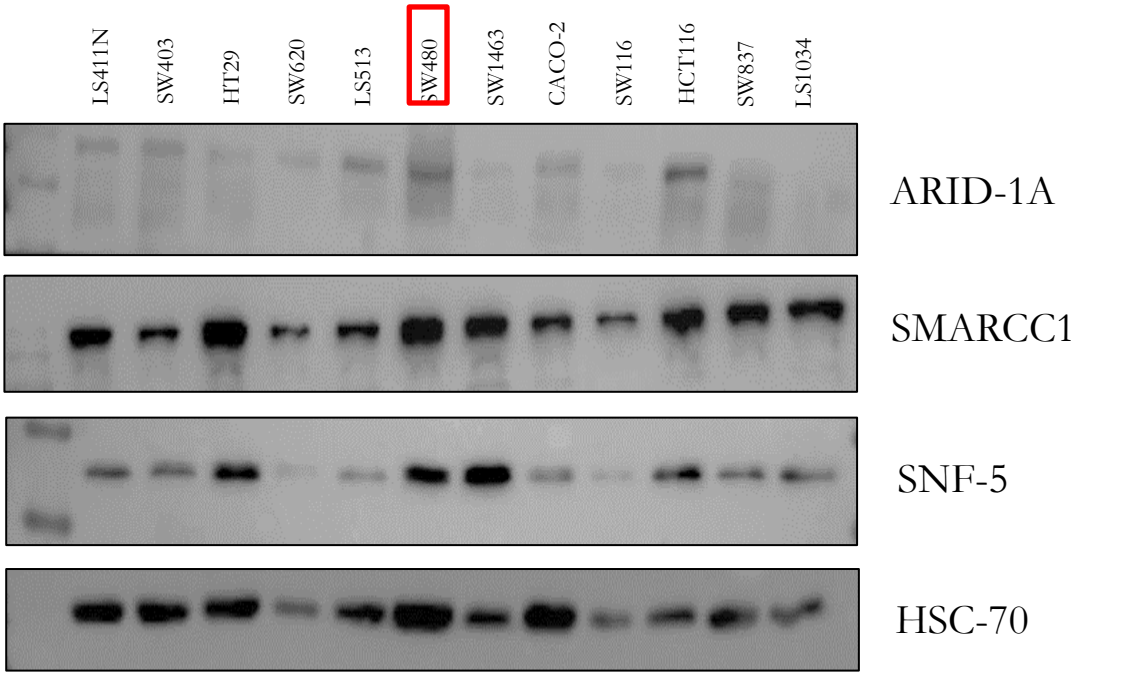


Abbildung 6: Westernblot zur Bestimmung einer kolorektalen Zelllinie. ARID1A, SMARCC1, SNF5 als Mitglieder des BAF Komplexes und HSC-70 als Ladekontrolle des Westernblots.

Tabelle 13: Zusammenfassende Darstellung der Proteinlevel aus Abbildung 6. Semiquantitative Intensität der Proteinbanden: (-) keine Intensität; (+) etwas Intensität; (++) normale Intensität; (+++) starke Intensität.

	LS411N	SW403	HT29	SW620	LS513	SW480	SW1463	CACO2	SW116	HCT116	SW837	LS1034
ARID1A	++	++	++	+	++	+++	+	++	-	+++	-	-
SMARCC1	++	++	+++	+	++	+++	+++	+++	+	+++	+++	++
SNF5	++	++	+++	+	+	+++	+++	+++	++	++	++	++

Beim Vergleich der Proteinlevel der verschiedenen Zelllinien von kolorektalen Karzinomen (**Abbildung 6**) bezüglich der ARID1A Expression zeigte sich ein gutes Ergebnis für SW480. Diese zeigt noch einmal **Tabelle 13**, in welcher zur besseren Übersicht die Proteinbandenintensität vereinfacht dargestellt ist. In Zusammenschau der dargestellten Ergebnisse wurde somit die Zellline SW480 für die nachfolgenden Experimente als Beispiel für kolorektale Karzinome ausgewählt.

Analog hierzu erfolgte die Detektion der Proteinlevel der BAF Komplex Untereinheiten in Pankreaskarzinom Zelllinien (**Abbildung 7**). Hier zeigt sich eine gute Expressivität für Capan-2 und L3.6pl (**Tabelle 14**), bei guter Verfügbarkeit der Zelllinie L3.6pl erfolgten alle weiteren Experimente zum Pankreaskarzinom mit L3.6pl Zellen.

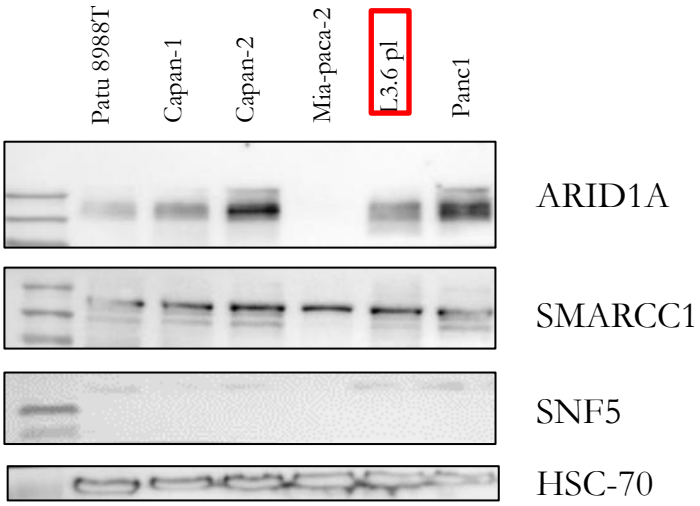


Abbildung 7: Westernblot Analyse in Pankreaskarzinomzellen. ARID1A, SMARCC1, SNF5 als Mitglieder des BAF Komplexes und HSC-70 als Ladekontrolle des Westernblots.

Tabelle 14: Zusammenfassende Darstellung der Proteinlevel aus Abbildung 7. Semiquantitative Intensität der Proteinbanden: (-) keine Intensität; (+) etwas Intensität; (++) normale Intensität; (+++) starke Intensität.

	Patu 8988T	Capan-1	Capan-2	Mia-paca-2	L3.6pl	Panc1
ARID1A	++	++	+++	-	++	++
SMARCC1	++	+++	+++	+++	+++	++
SNF5	++	++	++	+	++	++

3.3 siRNA vermittelter *knockdown*

Um einen *knockdown* von ARID1A in den Zelllinien zu erzielen, erfolgte die Verwendung von siRNA. Die siRNA kodiert für ein Protein, in diesem Fall für ARID1A und ermöglicht durch komplementäre Bindung an die RNA und der damit verbundenen RNA-Interferenz eine gezielte, temporäre Ausschaltung des Proteins- ein *knockdown*. Hierfür wurden zunächst einzelne siRNA-Sequenzen erprobt, welche in **Tabelle 9** aufgeführt sind. Diese Erprobung erfolgte sowohl in der kolorektalen Zelllinie SW480 als auch in der Pankreaskarzinomlinie L3.6pl. **Abbildung 8** zeigt die deutliche Reduktion der Proteinlevel im Vergleich zur Kontrolle, jedoch kein vollständiges Verschwinden der Bande. Dies lässt den Schluss zu, dass kein vollständiger *knockdown* mittels Einzelsequenzen erreicht werden konnte. In einem weiteren Experiment wurden daher alle vier Einzelsequenzen in gleichen Anteilen gemischt (Pool). Hierunter zeigte sich ein vollständiges Verschwinden der Proteinbanden und somit

ein gutes Ergebnis eines ARID1A-*knockdowns* in SW480 Zellen (Abbildung 9). Der siRNA vermittelte *knockdown* in L3.6pl erfolgte aufgrund der Ergebnisse der SW480 Zellen direkt mittels gepoolter Sequenz. Es resultierte ebenfalls ein vollständiges Verschwinden der Proteinbande für ARID1A (**Abbildung 10**). Jede siRNA zeigt sich in ¼ der Pool-Mischung repräsentiert, da in gleichen Teilen gemischt, somit lässt sich der ggf. vermutete *off-target*-Effekt ebenfalls nicht bestätigen, da die Sequenzen alleinig keinen Effekt haben und somit bei reduzierter Dosis ebenfalls von keinem Effekt auszugehen ist. Insgesamt konnte also ein *knockdown* in beiden Zelllinien etabliert werden.

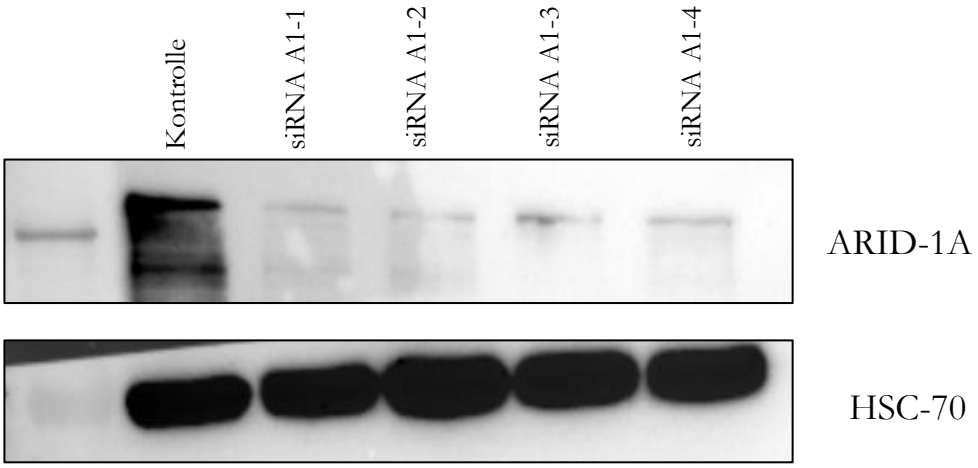


Abbildung 8: siRNA- kockdown in SW480 mit Einzelsequenzen. Als Kontrolle wurden Zellen mit siRNA welche auf keine Sequenz abzielt (*non targeting*) verwendet, HSC-70 diente als Ladekontrolle.

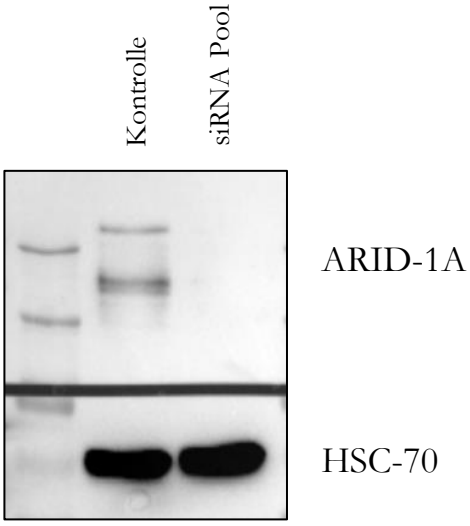


Abbildung 9: siRNA-knockdown in SW480 Pool-Sequenz. Als Kontrolle dienten SW-480-Zellen mit *non targeting* siRNA. siRNA-Pool wurde zu gleichen Teilen aus siRNA A1-1, A1-2, A1-3, A1-4, hergestellt. HSC-70 diente als Ladekontrolle.

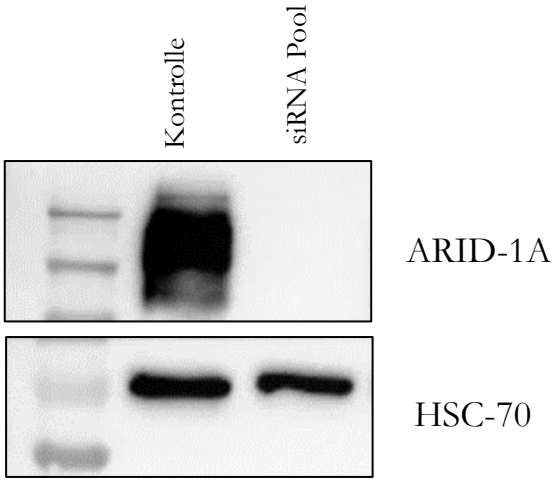


Abbildung 10: siRNA-knockdown in L3.6pl Pool-Sequenz. Als Kontrolle dienten SW-480-Zellen mit *non-targeting* siRNA. siRNA-Pool wurde zu gleichen Teilen aus siRNA A1-1, A1-2, A1-3, A1-4, hergestellt. HSC-70 diente als Ladekontrolle.

Die nachfolgenden Experimente in beiden Zelllinien wurden daher jeweils mit der gepoolten siRNA aller 4 Einzelsequenzen durchgeführt. Aufgrund der Vermutung, dass *ARID1A* als Tumorsuppressor fungiert, wurden im nächsten Schritt einzelne EMT-Marker mittels Westernblotanalyse in siRNA *knockdown* SW480 Zellen dargestellt. E-Cadherin, als eines von 114 Cadherinen stellt ein wichtiges Protein in der Adhäsion von Epithelzellen dar. E-cadherin gilt als Tumorsupressor, da in Tumorzellen oft herunterreguliert. Es besteht eine Korrelation zwischen niedrigem E-Cadherin und hochregulierten EMT Transkriptionsfaktoren, weswegen E-Cadherin als EMT-Marker gilt. In **Abbildung 11** zeigt sich in der Gegenüberstellung von unbehandelten SW480 Zellen im Vergleich zu Zellen mit siRNA vermitteltem *knockdown* für ARID1A ein reduziertes Proteinlevel für E-Cadherin, und lässt somit auf eine vermehrte EMT-Neigung schließen. CD24 als Zelladhäsionsmolekül, zeigt sich in **Abbildung 11** ebenfalls in ARID1A *knockdown*, konsistent zu den Erwartungen bei vermehrter EMT-Neigung, vermindert. Snail1 als EMT-Marker führt zu einer Verminderung von Proteinen, welche für Zellverbindungen wichtig sind und sorgt somit für Veränderungen zu Gunsten eines mesenchymalen Phänotyps, die in **Abbildung 11** dargestellte Zunahme des Proteinlevels von Snail1 bei ARID1A *knockdown,* spricht folglich für eine vermehrte Transformation von epithelalen hin zu mesenchymalen Phänotypen bei Verlust von ARID1A.

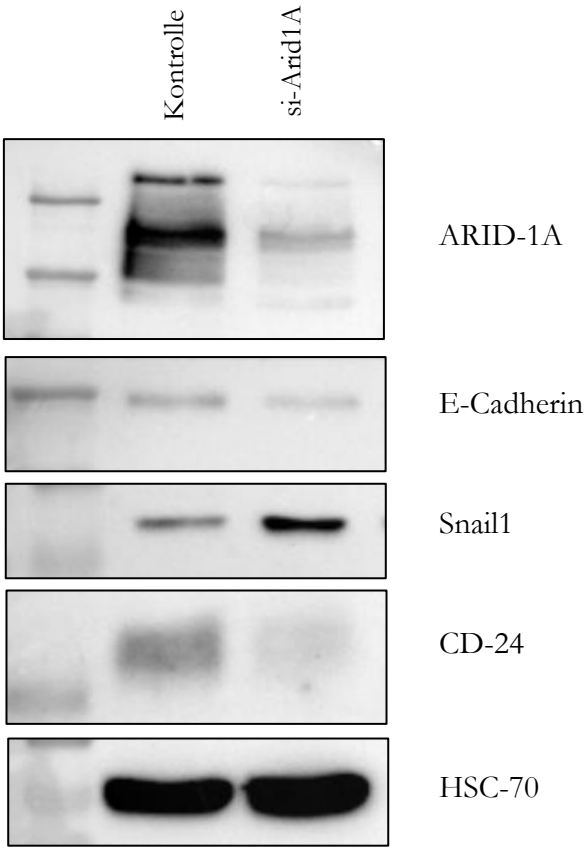


Abbildung 11: EMT-Marker in SW480. Als Kontrolle wurden die mit *non-targeting* siRNA behandelten SW-480 Zellen verwendet, bei siRNA wurde der siRNA-Pool zu gleichen Teilen aus siRNA A1-1, A1-2, A1-3, A1-4 verwendet, HSC-70 diente der Ladekontrolle.

In Zusammenschau der Ergebnisse in **Abbildung 11** zeigt sich in den Zellen nach siRNA *knockdown* eine vermehrte Transition der Zellen vom epithelialen zum mesenchymalen Typ, damit kann auf eine vermehrte Invasivität der Zellen nach ARID1A-Verlust geschlossen werden. Die Hypothese stärkt somit die Rolle von *ARID1A* als Tumorsuppressor.

3.4 Ansprechen auf Gemcitabin

In Pankreastumoren stellt Gemcitabin nach wie vor eines der wichtigsten Chemotherapeutika dar. Im nachfolgenden Experiment wurde das Ansprechen auf Gemcitabin von normalen L3.6pl-Zellen (Kontrolle) gegenüber ARID1A *knockdown* Zellen beobachtet. Hierfür wurden die Zellen unterschiedliche Konzentrationen von Gemcitabin ausgesetzt mit Auswertung nach verschiedenen Zeitintervallen (2, 4 und 6 Stunden). Wie in **Abbildung 12** dargestellt, ergab sich insgesamt bereits ein schwächeres Wachstum der Zellen ohne ARID1A. Für die Interpretation der normierten Überlebensanteile ist insbesondere die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von Bedeutung. Er gibt die Konzentration an,

bei der eine halbmaximale Hemmung beobachtet wird. Die *knockdown* Zellen benötigen, trotz initial geringerer Zellzahl, eine höhere Konzentration von Gemcitabin zum Erreichen des IC_{50}. Somit ergibt sich, in Einklang mit der vermuteten Funktion von *ARID1A* als Tumorsupressor, in der relativen Wachstumstendenz ein Überlebensvorteil von *knockdown*-Zellen.

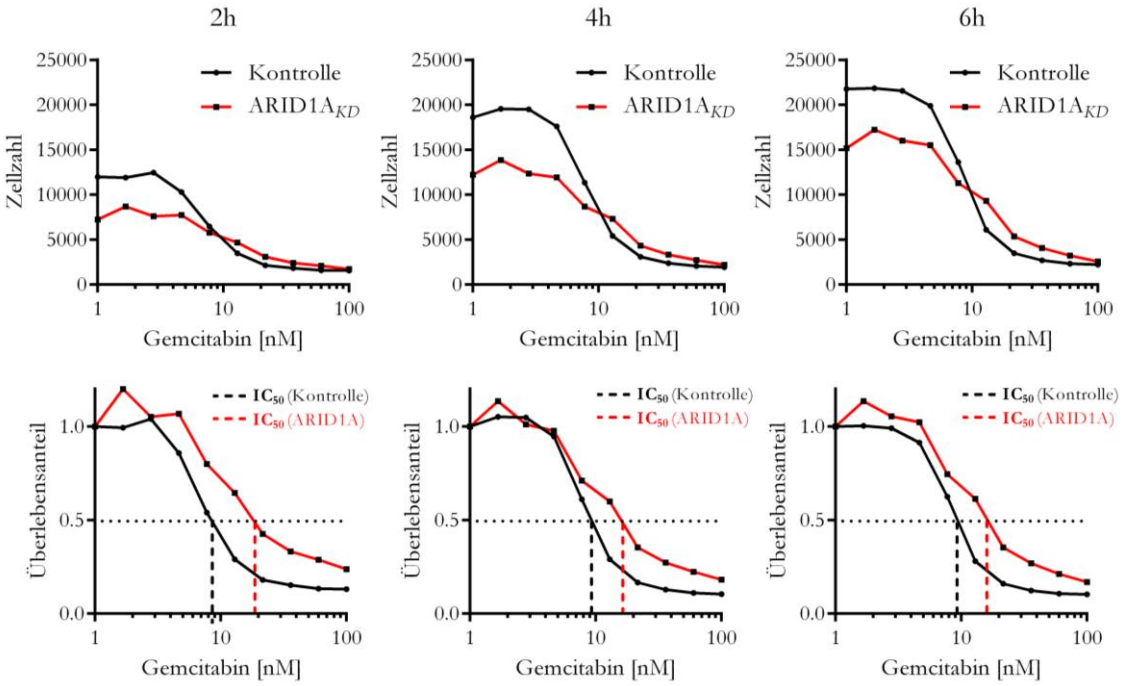


Abbildung 12: Gemcitabinbehandlung in L3.6pl Kontrolle vs. Knockdown. Oben: Darstellung der Zellzahl von Kontrolle (schwarz) und ARID1A *knockdown* (rot) in Abhängigkeit der Gemcitabin Konzentration 72h nach Behandlung mit der jeweils genannten Gemcitabinkonzentration. Messung jeweils 2, 4 und 6 Stunden nach Zugabe von Prestoblue®. Unten: Überlebensanteil nach Normierung der Zellzahl. Vitale Zellen, angefärbt mit Prestoblue® wurden mittels TecanUltraPlate gemessen. IC_{50} = mittlere inhibitorische Konzentration (n=1 pro Gruppe und Zeitpunkt).

3.5 CRISPR-Cas9-vermittelter *knockout*

Die mittels siRNA gewonnen knockdown Zellen ermöglichten die Durchführung von Experimenten mit zeitlicher Limitation, da ein *knockdown* nicht dauerhaft bestand hat. Angestrebt wurde also eine Generierung von dauerhaft bestehendem *ARID1A* Verlust, um so auch längere Versuchsreihen ermöglichen zu können. Hierfür wurde das CRISPR-Cas9-System (2.10.3) zum Erzielen eines dauerhaften *knockouts* etabliert.

3.5.1 Durchflusszytometrie

Nach der Einbringung des pSpCas9(BB)-2A-GFP Plasmids mittels Elektroporation wurde eine durchflusszytometrische Analyse zur Bestätigung des erfolgreich eingebrachten Plasmids und zur Gewinnung von Einzelklonen durchgeführt. Hier wurde anhand der FACS-Analyse die Auftragung nach GFP-Signal vorgenommen. Die Sortierung erfolgte in

Einzelzellklone mit hoher GFP-Positivität, welche dann einzeln kultiviert und vermehrt wurden. Zudem erfolgte die Aufteilung in sogenannte Pool-Zellen, welche insgesamt einen hohen Anteil an GFP-aufwiesen, jedoch von Beginn an mehrere Zellen waren und nicht aus Einzelzellklonen vermehrt wurden.

In **Abbildung 13** zeigt sich auf der linken Seite die FACS-Analyse der unbehandelten L3.6pl Zellen, zunächst nach Größe in *side scatter* (SSC-A) und *forward scatter* (FSC-A) aufgeteilt, anschließend nach Größe und GFP-Exprimierung. Wie zu erwarten, zeigten sich die unbehandelten Zellen ohne jede GFP-Expression, somit waren hier keine Zellen im P4 Gate (GFP^+). Auf der rechten Seite stellen sich im Vergleich die Zellen nach Einbringen des Plasmids dar. Bei ähnlicher Größenverteilung im oberen Bild ergab sich in diesem Fall eine gute Nachweisbarkeit von GFP. Es konnte also davon ausgegangen werden, dass in den GFP positiven Zellen eine erfolgreiche Einbringung des Plasmids stattgefunden hatte. Die erfolgreiche Einbringung des Plasmids war mit einem erfolgreichen *knockout* von *ARID1A* gleichzusetzten. Wie bereits oben genannt, wurden die Zellen mit den höchsten nachzuweisenden GFP-Anteilen als Einzelzellklone und Pool-Zellen kultiviert. Diese Zellen wurden dem P4 Gate (GFP^+) der rechten unteren **Abbildung 13** entnommen.

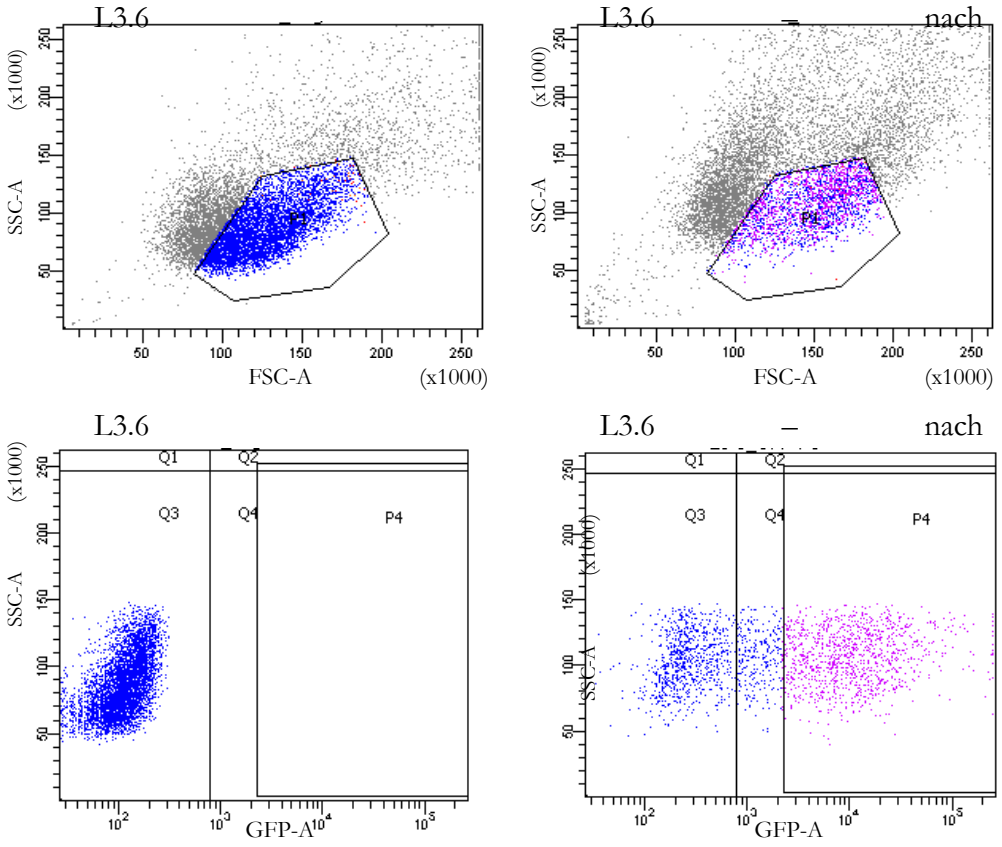


Abbildung 13: FACS-Analyse für die L3.6pl Zelllinie. Punkte repräsentieren einzelne Zellen. SSC = sideward scatter; FSC = forward scatter. GFP = grün fluoreszierendes Protein. Links die Darstellung der Zellen ohne Plasmidtransfektion, rechts mit Plasmidtransfektion, GFP wurde ins Plasmid integriert um die Sortierung zu ermöglichen.

Die gleiche Aufschlüsselung mittels FACS erfolgte in der Zelllinie SW480 (**Abbildung 14**). Hierbei erfolgte genau wie für L3.6pl zunächst die durchflusszytometrische Analyse unbehandelter Zellen (**Abbildung 14** links) mit fehlendem GFP-Nachweis in nichtbehandelten Zellen. In **Abbildung 14** rechts sind die Zellen nach Transfektion des Plasmids dargestellt. Auch hier wurden Einzelzellkultivierung und Pool-Kultivierung der FP-reichsten Zellen (Gate P4 in **Abbildung 14**) durchgeführt.

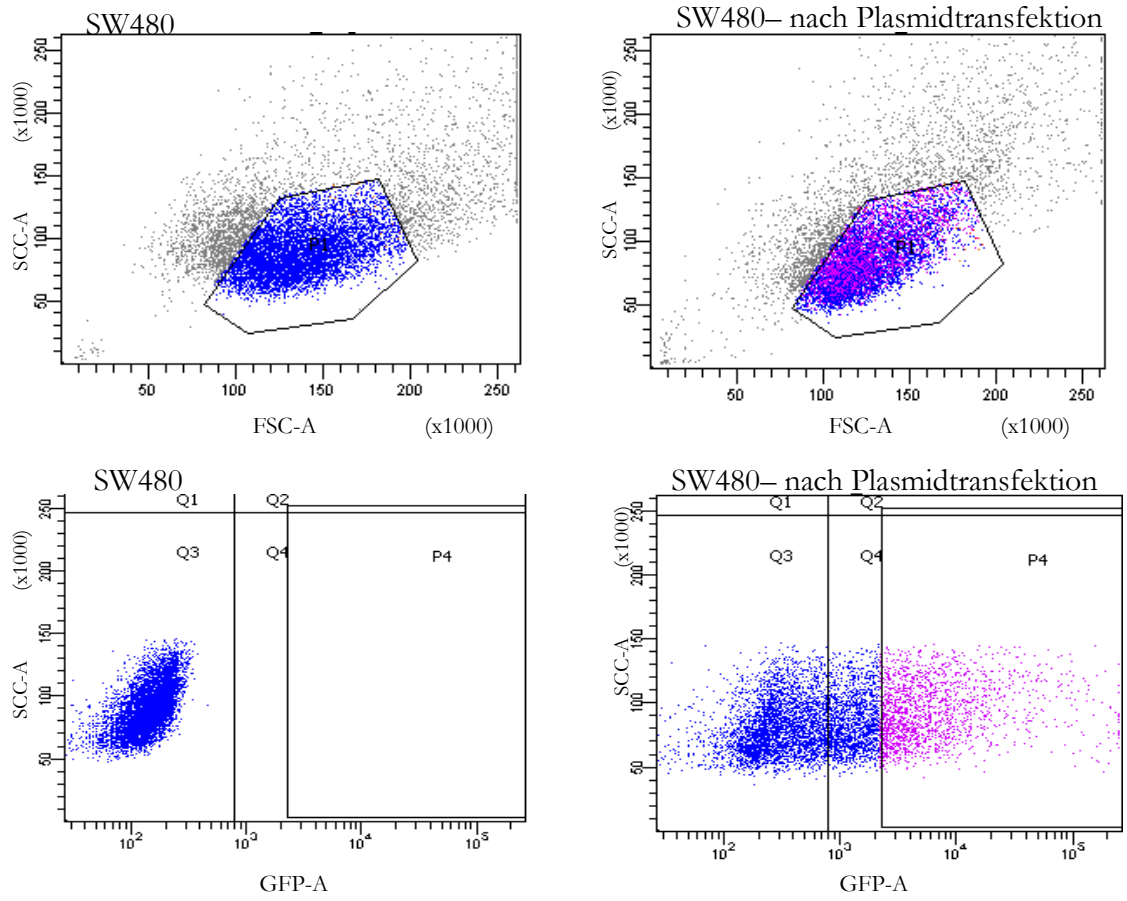


Abbildung 14: FACS-Analyse der SW480 Zelllinie. Punkte repräsentieren einzelne Zellen. SSC = sideward scatter; FSC = forward scatter. Links die Darstellung der Zellen ohne Plasmidtransfektion, rechts mit Plasmidtransfektion, GFP wurde ins Plasmid integriert um die Sortierung zu ermöglichen.

3.5.2 *ARID1A* knockout auf DNA-Ebene

Zur Detektion des *ARID1A knockout* auf DNA-Niveau erfolgte im nächsten Schritt eine Genotypisierungs-PCR (2.11.4). Die theoretische Grundlage hierfür ist in Abbildung 15 schematisch dargestellt. Die Wildtypsequenz für *ARID1A*, auf Exon 5 befindlich und mittels roten Pfeiles markiert, enthält insgesamt 1205 Basenpaare. Im Gegensatz dazu steht der *knockout* mit 761 Basenpaaren. Nach erfolgreichem *knockout* von *ARID1A* sollte die Bande des Proteins also um 444 Basenpaare verschoben detektiert werden können.

In Abbildung 16 ist die Genotypisierungs-PCR in der Pankreaskarzinomzelllinie L3.6pl dargestellt. Die PCR wurde durchgeführt in den aus der Durchflusszytometrie gewonnenen

Einzelzellklone, welche durch Zahlen gekennzeichnet wurden, gegenüber einer Kontrolle. Die gepoolten Zellen wurden ebenfalls als eigene Probe aufgetragen. Es zeigte sich ein Mischbild aus Klonen, welche *ARID1A* auf DNA-Ebene verloren haben und solche, welche die gesamte Sequenz in sich tragen und somit bei 1205 Basenpaaren zu detektierten waren. Insgesamt ergab sich bei neun Einzelklonen und den gepoolten Zellen ein *ARID1A* Verlust auf DNA-Ebene.

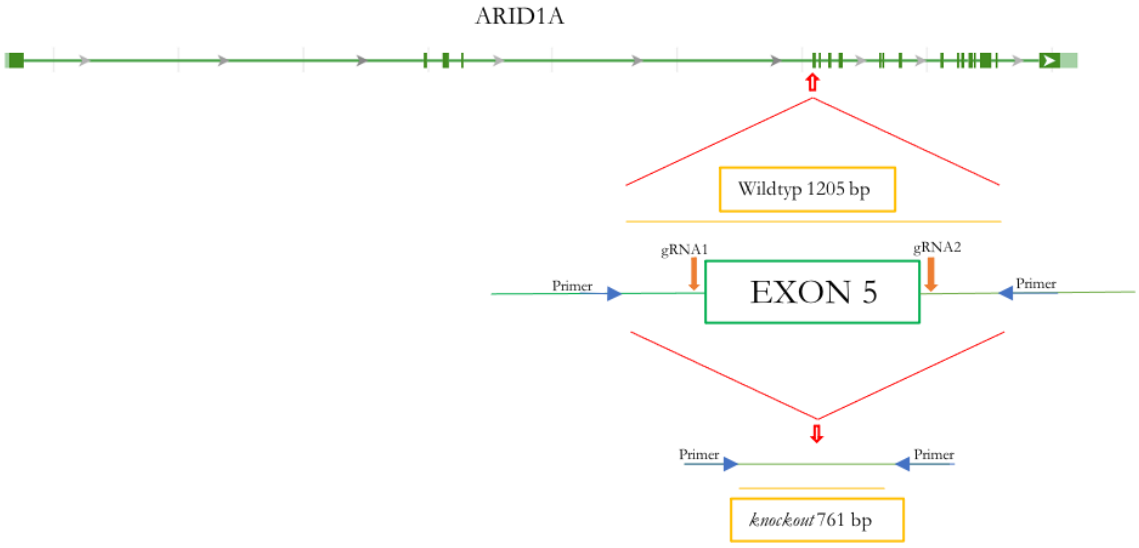


Abbildung 15: Schematische Darstellung von *ARID1A* und Exon5 und der damit verbundene knockout. Grün dargestellt sind *ARID1A* mit seinen Exons und Introns. Herausvergrößert Exon 5. gRNA1 und gRNA2 als orangene Pfeile mit ihrer Bindung an Exon 5. Blaue Pfeile markieren die Primer. Gelb dargestellt die Länge der Basenpaarsequenz des Wildtyp ohne herausgeschnittenes Exon 5 (1205 Basenpaare lang) sowie unten mit 761 Basenpaaren nach Schnitt der gRNA1 und gRNA2.

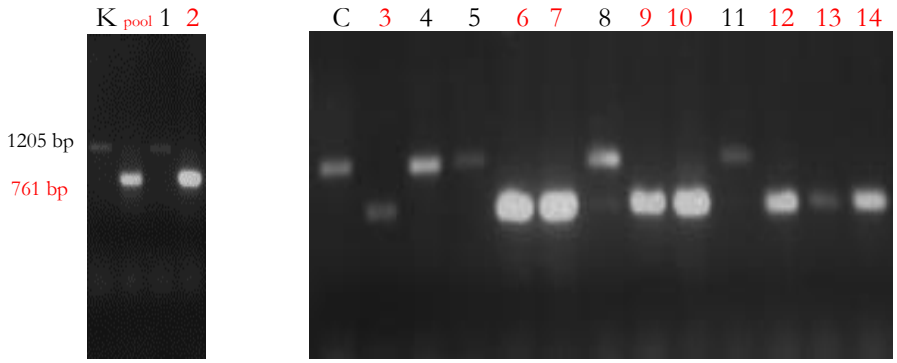


Abbildung 16: L3.6pl Genotypisierungs-PCR Einzelklone. Rot dargestellte Zahlen befinden sich auf Niveau von 761 Basenpaaren, somit liegt hier ein *ARID1A knockout* vor. Die Zahlen stehen jeweils für einen Einzelzellklon. Pool entspricht den gepoolten GFP-positiven Zellen. K steht für die Kontrolle, welche aus unbehandelten L3.6pl Zellen gewonnen wurde. Schwarz dargestellt sind alle Klone, welche 1205 Basenpaare enthalten und somit die Sequenz des gesamten *ARID1A* enthalten.

Neben L3.6pl erfolgte ebenfalls in den SW480 Zellen einen Genotypisierungs-PCR um einen *ARID1A knockout* auch in der kolorektalen Zelllinie zu zeigen. Auch hier erfolgte die Auftragung der Einzelklone gegenüber einer Kontrolle mit 1205 Basenpaaren. Hier zeigten sich 6 Einzelklone und die gepoolten Zellen mit 761 Basenpaaren und wiesen somit einen *ARID1A knockout* auf DNA-Ebene auf.

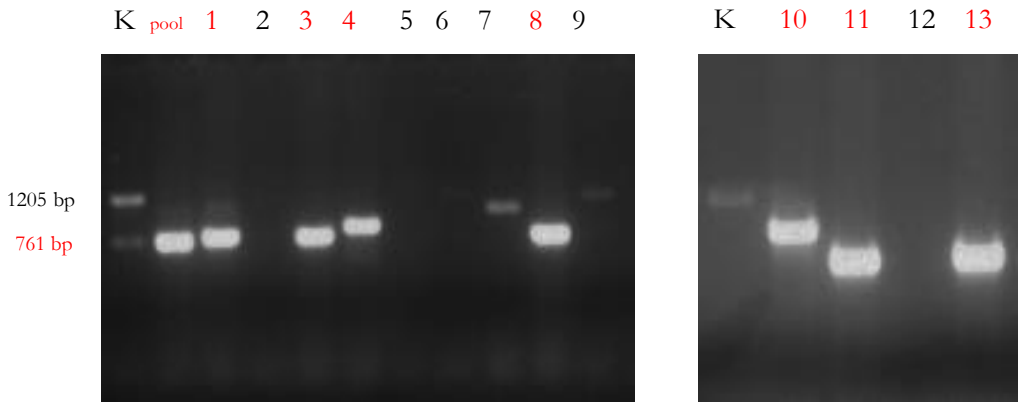


Abbildung 17: SW480 Genotypisierungs-PCR Einzelklone. Rot dargestellte Zahlen befinden sich auf dem Niveau von 761 Basenpaaren, somit liegt hier ein *ARID1A knockout* vor. Die Zahlen stehen jeweils für einen Einzelzellklon. Pool entspricht den gepoolten GFP-positiven Zellen. K steht für die Kontrolle, welche aus unbehandelten SW480 Zellen gewonnen wurde. Schwarz dargestellt sind alle Klone, welche 1205 Basenpaare enthalten und somit die Sequenz des gesamten *ARID1A* enthalten.

Aufgrund der hohen Variabilität der Einzelklone und der damit verbundenen Unübersichtlichkeit sowie der guten Ergebnisse der gepoolten Zellen wurde erneut jeweils eine PCR zur Einzeldarstellung der gepoolten Zellen durchgeführt. Hier zeigte sich sowohl für die L3.6pl Zellen (Abbildung 18 links), als auch für SW480 Zellen (Abbildung 18 rechts) ein reproduzierbares Ergebnis des *ARID1A knockout* auf DNA-Ebene.

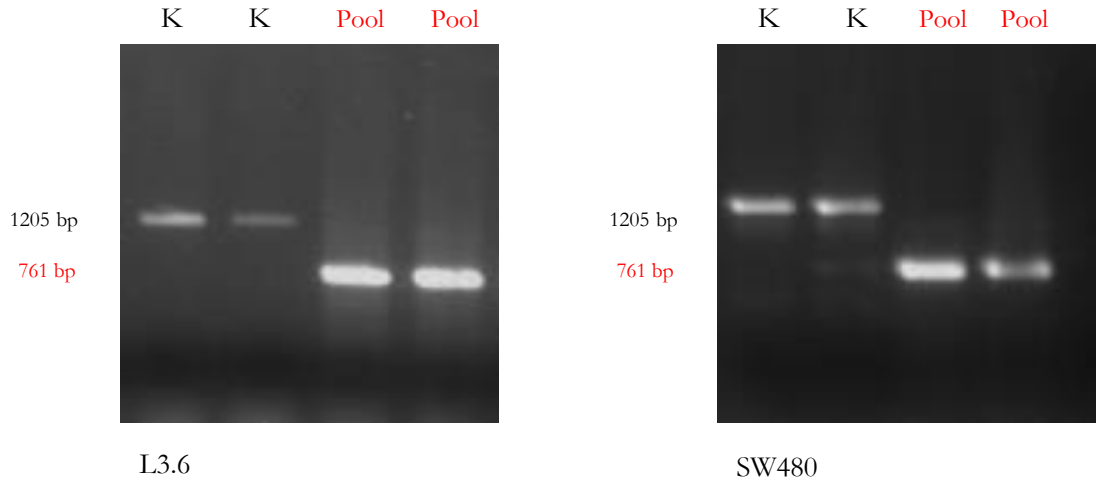


Abbildung 18: Genotypisierungs-PCR Pool Zellen. In Rot dargestellte; Niveau von 761 Basenpaaren, somit *ARID1A knockout*. K steht für die Kontrolle aus unbehandelten Zellen. Pool für die gepoolten GFP-positiven Zellen In Schwarz dargestellt sind alle Klone, welche 1205 Basenpaare enthalten und somit die vollständige Sequenz von *ARID1A* enthalten.

3.5.3 ARID1A *knockout* auf Protein Ebene

Aufgrund der guten Ergebnisse der gepoolten Zellen in der Genotypisierungs-PCR sowie der guten Handhabung erfolgte die Verifizierung des ARID1A Proteinverlusts primär in den gepoolten Zellen. Sowohl für die Pankreaskarzinomzelllinie (**Abbildung 19** links) als auch für die Zelllinie für das kolorektale Karzinom (**Abbildung 19** rechts) zeigte sich ein vollständiger Proteinverlust.

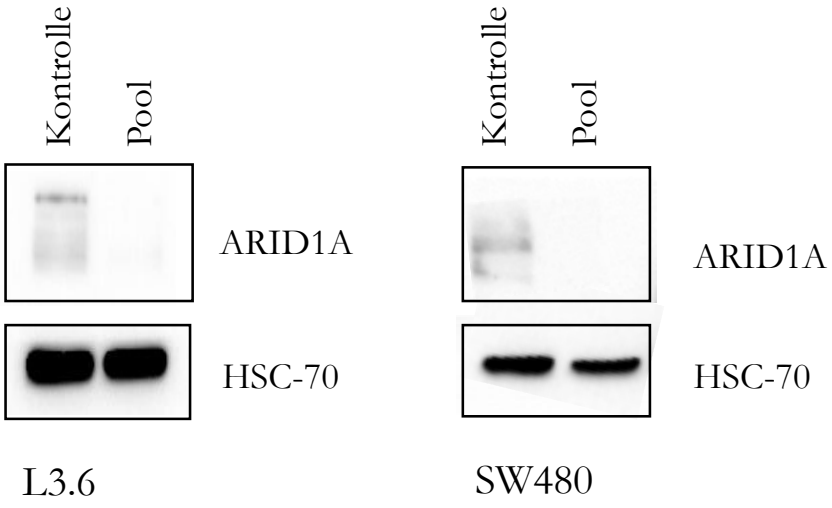


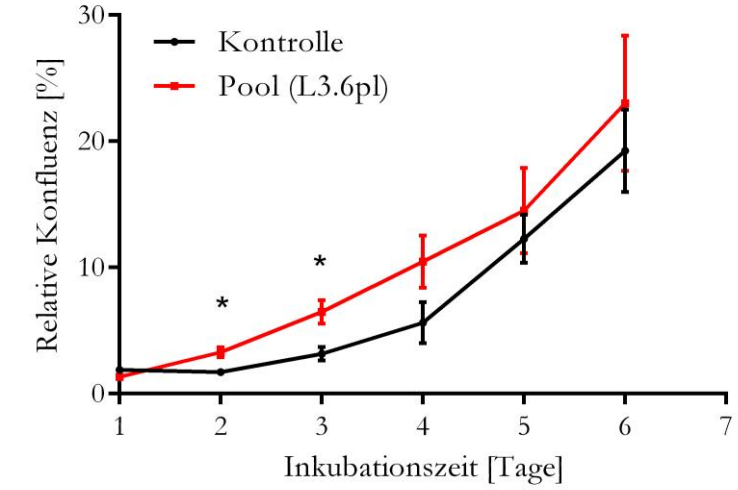
Abbildung 19: *Knockout* Pool-Zellen Westernblot. Proteinbanden zur Verifizierung der *knockouts* auch auf Proteinniveau. Pool entspricht den gepoolten GFP-positiven Zellen der jeweiligen Zelllinie. HSC-70 diente als Ladekontrolle.

Somit konnte mittels PCR und Westernblot jeweils der *ARID1A knockout* auf Protein und DNA-Ebene bestätigt werden. In den darauffolgenden Experimenten wurden die gepoolten Zellen verwendet.

3.5.4 Wachstumsvergleich

Bereits während der Kultivierung der Zellen fiel ein verändertes Wachstum der zwei Zellreihen auf. Die L3.6pl-Zellen mussten im Vergleich zur kolorektalen Zelllinie SW480 häufiger geteilt werden. Anhand zytometrischer Bestimmungen über 7 Tage wurde die Konfluenz der Zellen gemessen. Zur besseren Visualisierung erfolgte die Färbung mittels Kristallviolett nach 7 Tagen jeweils im direkten Vergleich von normalen Zellen zu *ARID1A-knockout* Zellen (Abbildung 20, Abbildung 21). Hier zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen beiden Zelllinien. Die *knockout* Pankreaskarzinomzellen wiesen ein im Vergleich zur Kontrolle beschleunigtes Wachstum auf (Abbildung 20). Dieses Ergebnis für die Pankreaskarzinomzelllinie war retrospektiv bereits im siRNA-vermittelten *knockdown* zu sehen (Abbildung 12), in welcher verschiedene Wachstumsraten sichtbar sind. Somit stützt diese Erkenntnis der Wachstumsbeschleunigung bei Verlust von *ARID1A* die Theorie der tumorsuppressiven Funktion von *ARID1A*.

Erstaunlicherweise wiesen die SW480 Zellen ein absolut konträres Verhalten auf. Es zeigte sich im Wachstumsvergleich eine deutliche Reduktion der Geschwindigkeit bei den *ARID1A knockout* Zellen im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 21). Im Gegensatz zur vermuteten tumorsuppressiven Wirkweise von *ARID1A* zeigte sich ein unübliches Verhalten, es lässt sich eine Kontext-abhängigen Funktion von ARID1A vermuten.



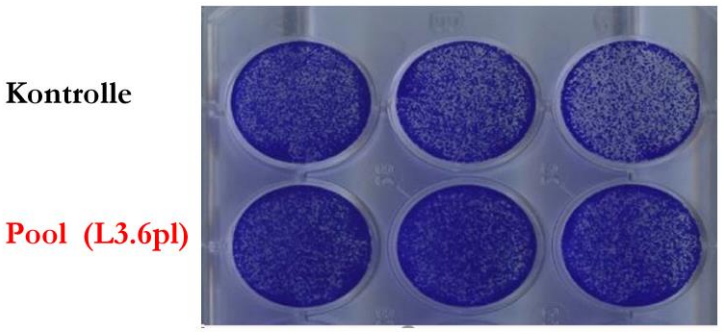


Abbildung 20: Wachstumsvergleich L3.6pl *knockout*-Kontrolle. Kontrolle stellen unbehandelte Zellen der Linie L3.6pl dar, im Vergleich zu gepoolten L3.6pl *ARID1A knockout* -Zellen. Färbung mit 1% Kristallviolett. Balken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes (n=2 pro Gruppe und Zeitpunkt; * = $p<0.05$; ungepaarter t-Test).

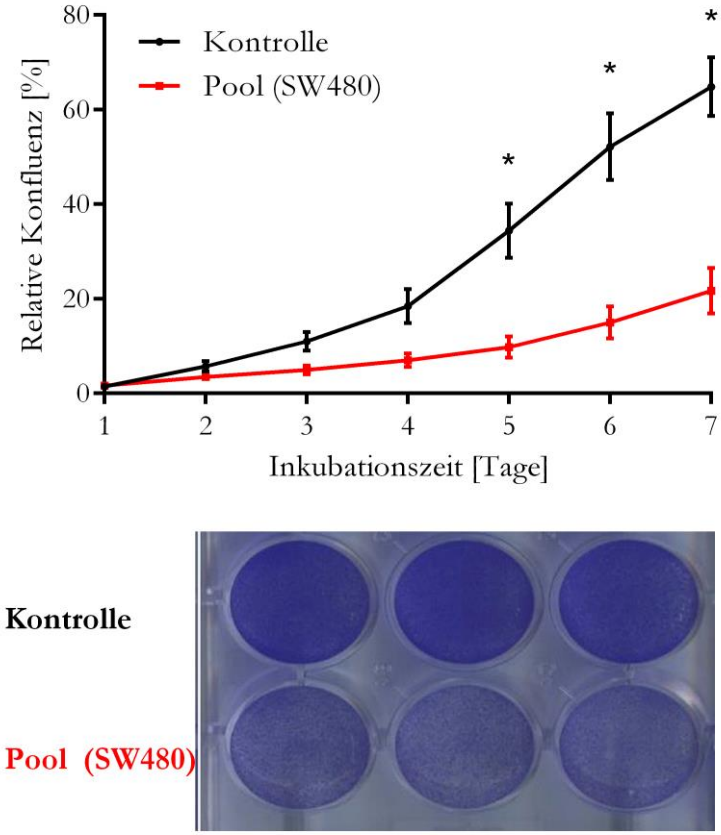


Abbildung 21: Wachstumsvergleich SW480 *knockout*.- Kontrolle. Kontrollen stellen unbehandelte Zellen der Linie SW480 dar, im Vergleich zu gepoolten Sw480 *ARID1A knockout* -Zellen Färbung mit 1% Kristallviolett. Balken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes (n=2 pro Gruppe und Zeitpunkt; * = $p<0.05$; ungepaarter t-Test).

3.5.5 Behandlung mit Tazemetostat

Nachdem die Wachstumsunterschiede auch quantifiziert werden konnten, wurde in den nächsten Experimenten die Behandlung mit Inhibitoren getestet. Es sollte die Wirkung des Inhibitors, auch in Anbetracht der im Wachstum bemerkten Unterschiede, in beiden Zelllinien beleuchtet werden. Hierfür wurden jeweils die Kontrollen und die Pool-Zellen miteinander verglichen.

Die Experimente erfolgten mit Tazemetostat, einem *enhancer of zeste homolog 2* (EZH2) -Inhibitor. Die Entscheidung einen solchen Inhibitor zu verwenden basierte auf den vorangegangenen Publikationen, welche eine synthetische Lethalität zwischen *ARID1A* und EZH2 beschrieben haben. Bei vorhandener *ARID1A* Mutation führt in der Literatur die zusätzliche Inhibition von EZH2 zum Zelltod. Basierend auf diesen Erkenntnissen erfolgte die Wahl des EZH2 Inhibitors und damit Verwendung von Tazemetostat.

Die Behandlung mittels EZH2-Inhibitor (Tazemetostat) erfolgte in DMSO gelöst an Tag 1. Zur Observation der jeweiligen Konfluenz der Zellen wurden täglich zytometrische

Bestimmungen durchgeführt. Aufgrund der großen Variabilität der Werte zu Beginn des Experiments wurde eine Normalisierung durchgeführt. In diesem Experiment wurden jeweils unterschiedliche Konzentrationen des Inhibitors verwendet. Die Versuche erfolgten parallel in beiden Zelllinien.

In der Pankreaszelllinie L3.6pl zeigte sich insbesondere die hohe Konzentration von 10 µM sowohl in der Kontrolle als auch in den *knockout*-Zellen wachstumslimitierend. Die übrigen Konzentrationen zeigten ein Ansprechen wie in Abbildung 22 dargestellt, welches ein Konzentrationsgefälle erkennen lässt, jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen An- und Abwesenheit von *ARID1A* erkennen lässt.

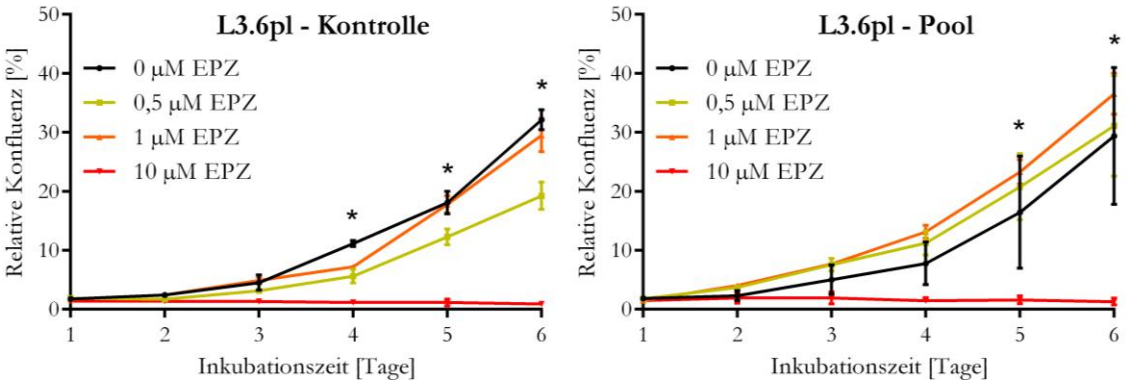


Abbildung 22: Tazemetostat Behandlung in der Zelllinie L3.6pl. Verschiedene Tazemetostat Dosierungen sind farbkodiert aufgetragen. Gemessene Konfluenz der Zellen auf y-Achse dargestellt im Vergleich zur Inkubationszeit auf der x-Achse dargestellt. Balken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes (n=2 pro Gruppe und Zeitpunkt; * = $p<0.05$; einfache Varianzanalyse (ANOVA)).

In der kolorektalen Zelllinie bestätigte sich insbesondere der bereits in **Abbildung 21** dargestellte Wachstumsunterschied von *knockout* im Vergleich zur Kontrolle. Die verschiedenen Tazemetostat Konzentrationen zeigten ein vermindertes Wachstum bei steigenden Konzentrationen. Im Vergleich von Kontrolle zu knockout zeigte sich auch hier kein signifikant verändertes Ansprechen (**Abbildung 23**).

Insgesamt ließ sich der vermutete synthetisch letale Effekt in den o.g. Experimenten nicht bestätigen.

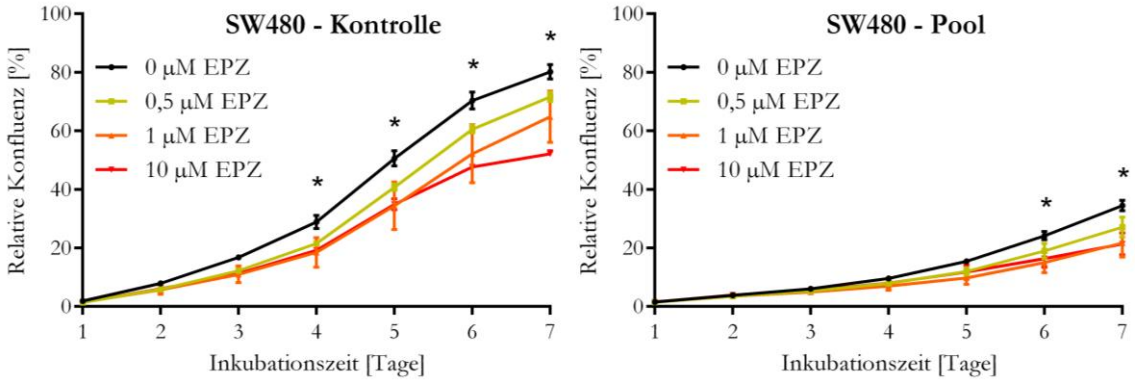


Abbildung 23: Tazemetostat Behandlung in der SW480 Zelllinie. Tazemetostat Dosierungen sind farbkodiert aufgetragen. Gemessene Konfluenz der Zellen auf y-Achse dargestellt im Vergleich zur Inkubationszeit auf der x-Achse dargestellt. Balken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes (n=2 pro Gruppe und Zeitpunkt; * = $p<0.05$; einfache Varianzanalyse (ANOVA)).

3.5.6 Überleben mit und ohne *ARID1A* Mutation

Aufgrund der bereits dargestellten unterschiedlichen Auswirkungen auf das Wachstum der Zellen mit und ohne *ARID1A knockout*, stellte sich die Frage des Einflusses einer *ARID1A* Mutation auf das Überleben übertragen auf ein Patientenkollektiv. Anhand einer erneuten Analyse der online verfügbaren Daten des *National Cancer Institute (NCI) genomic data commons* wurde der Vergleich des Überlebens in Fällen mit *ARID1A*-Mutation und in Fällen ohne *ARID1A* Mutation durchgeführt. Zur besseren Übersichtlichkeit wurde der Datensetz, welcher bereits im Abschnitt Datenanalyse verwendet wurde, erneut eingesetzt. **Abbildung 24** zeigt mithilfe eines Kaplan-Meyer-Plots die Überlebensraten nach Diagnosestellung in Monaten.

Der in **Abbildung 24** genutzte Datensatz für Pankreastumoren enthielt insgesamt 185 Fälle, davon 22 mit *ARID1A* Mutationen. Insgesamt bestätigt sich im Überlebensplot das für Pankreastumoren bekannte schlechte Überleben. Es ergibt sich ein medianes Überleben für die *ARID1A*-Muationsgruppe von 19,81 Monaten im Vergleich zur Gruppe „*ARID1A* wildtyp“ in *ARID1A* mit 20,34 Monaten ohne signifikanten Unterschied.

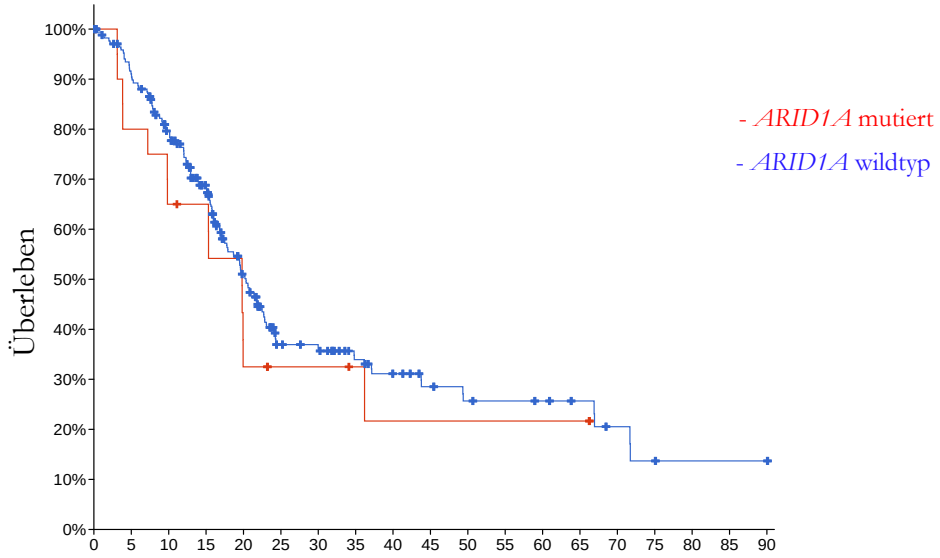


Abbildung 24: Kaplan-Meyer-Plot von Pankreastumoren nach *ARID1A* Status. Insgesamt wurden 185 Fälle aufgetragen, davon 22 mit *ARID1A* Mutation und 163 ohne *ARID1A* Mutation als Kontrollgruppe. Medianes Überleben *ARID1A*-Gruppe: 19,8 Monate, medianes Überleben Kontrollgruppe 20,3 Monate (n=185; p=0,409; Log-Rank Test).

Der in **Abbildung 25** genutzte Datensatz für kolorektale Karzinome enthielt 472 Fälle in der Gruppe „*ARID1A* wildtyp“ im Vergleich zur Gruppe „*ARID1A* mutiert“ mit 58 Fällen. Im Vergleich der zwei Gruppen zeigte sich ein besseres Überleben in der Gruppe mit „*ARID1A* mutiert“. Im Rahmen der Studie erfolgte keine Datenanalyse des medianen Überlebens.

Wie bereits in den Wachstumstendenzen der Experimente abzulesen, zeigte sich auch bei der Analyse der Datensätze eine Varianz der Ergebnisse. Die Patienten*innen mit kolorektalen Karzinomen als auch die mit Pankreaskarzinomen zeigen in den hier dargestellten Analysen keinen signifikanten Überlebensvor- oder wenn eine *ARID1A* Mutation vorliegt.

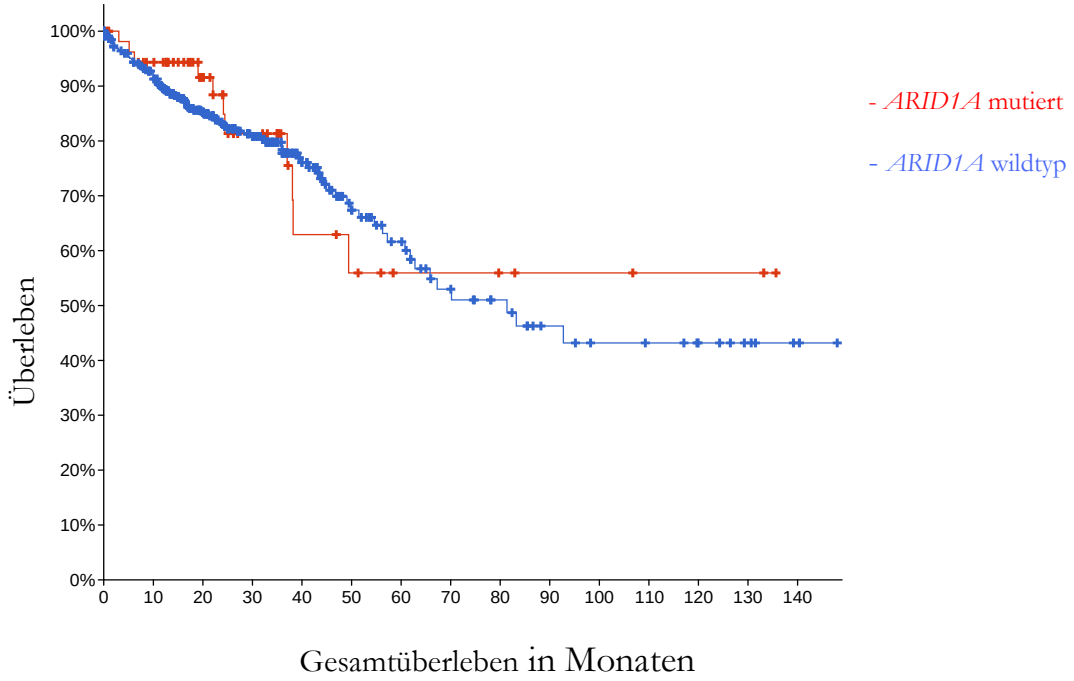


Abbildung 25: Kaplan-Meyer-Plot von kolorektalen Karzinomen nach *ARID1A* Status. Insgesamt wurden 530 Fälle aufgetragen, davon 58 mit *ARID1A* Mutation und 472 als Kontrollgruppe ohne *ARID1A* Mutation (n=530; p=0,645; Log-Rank Test).

3.5.7 Analyse von Patientendaten

Da *ARID1A* eine häufige Mutation in den untersuchten Tumoren darstellt erfolgte die Überlebensanalyse nicht nur, wie bereits oben beschrieben in frei zugänglichen Daten, sondern auch in Patientendaten, welche durch die Klinik für Allgemein-, Viszeral-, und Kinderchirurgie anonymisiert erhoben wurden. Hierfür wurde von 182 Patienten*innen, welche sich bei Rektumkarzinomen in Behandlung befanden Daten und Proben erhoben und mittels Microarray analysiert. Zudem erfolgte die Asservation von Probenmaterialien, welche mittels Immunhistochemie für ARID1A gefärbt wurden. Hierfür wurden Gruppen unterschiedlicher Intensitäten gebildet von (-) keine ARID1A Färbung, bis (+++) starke Färbung, ansteigend. Mithilfe des Instituts für medizinische Statistik wurden die Daten in Hinblick auf das Überleben der Patientenkohorte bei unterschiedlicher *ARID1A* Ausprägung ausgewertet.

Bezüglich der Färbungen stellt **Abbildung 26** eine exemplarische Auswahl von Schnitten der vier Untergruppierungen dar. Dargestellt ist die Intensität der Färbung in absteigender Anordnung von Schnitt a) bis Schnitt d). Die jeweilige Zuordnung erfolgte durch eine auflichtmikroskopische Analyse der Schnitte. Die Bilder wurden bei 10-facher Vergrößerung aufgenommen und zur Darstellung jeweils individuell zur besseren Beurteilung der Färbungsintensität zugeschnitten. In der linken Ecke befindet der jeweils für die Abbildung

gültige Skalierungsbalken. Es zeigten sich starke individuelle Unterschiede bezüglich der Färbeintensität und somit verschiedene Expressionen von ARID1A. Es konnte jedoch nicht zwischen Mutation und nicht-Mutation im Detail unterschieden werden. Wir gingen am ehesten von einer Mutation bei fehlender ARID1A Anfärbbarkeit aus.

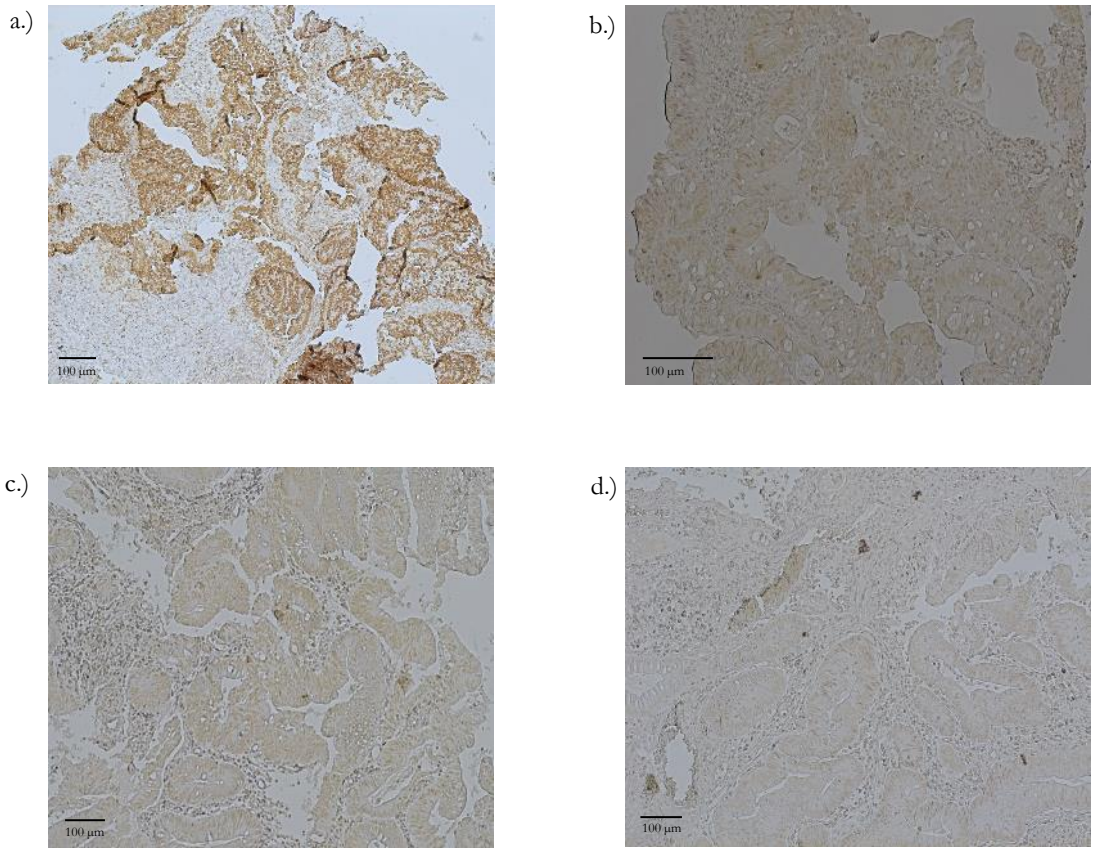


Abbildung 26: Immunhistochemie von Rektumkarzinomkohorte bezüglich ARID1A Expressivität. Immunhistochemische Färbung von ARID1A in Schnitten von Patienten mit Rektumkarzinomen. Exemplarische Schnitte der vier Untergruppen an Intensitäten. Die Bilder wurden jeweils mit 10facher Vergrößerung aufgenommen, die Skalierungsbalken in der linken unteren Ecke zeigen jeweils die Länge von 100 µm an.) zeigt deutliche Intensität bei Färbung mit ARID1A und wird mit +++ betitelt. b.) zeigt milde Intensität und steht stellvertretend für ++. c.) Hier zeigte sich eine schwach ausgeprägte Färbung der Zellkerne, dieser Schnitt wurde der Gruppe + zugeordnet. d.) Keine Färbung auf ARID1A sichtbar somit der Gruppe – zugordnet.

Nach den verschiedenen Expressionen von ARID1A eingeteilt, erfolgte die Analyse der zu den Tumorbiopsien erhobenen Patientendaten. Aufgrund der bereits im Datensatz (**Abbildung 25**) gezeigten Überlebenskurven richtete sich das Interesse insbesondere auf das Gesamtüberleben im Vergleich der unterschiedlichen Gruppierungen.

Es zeigte sich bei relativ kleinen Kollektiven der Untergruppierungen eine schlechte Verwertbarkeit bei Aufteilung in vier Untergruppen. Daher wurden lediglich ARID1A positiven Schnitte mit ARID1A negativen Schnitten verglichen. **Abbildung 27** zeigt auf der linken Seite das Gesamtüberleben der Patienten*innen Kohorte und auf der rechten Seite

die Darstellung der oben genannten, zusammengeführten Gruppen. Die erhobenen Ergebnisse zeigen sich konsistent mit den genomischen Daten; es zeigt sich kein signifikanter Unterschied im Hinblick auf das Überleben zwischen Tumoren mit und ohne ARID1A.

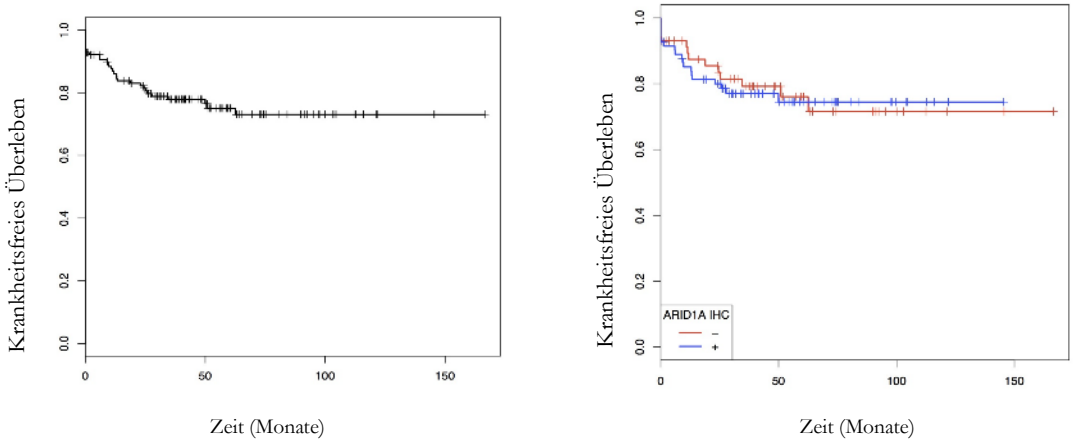


Abbildung 27: Krankheitsfreies Überleben im Vergleich. Kaplan-Meyer-Plots des krankheitsfreien Überlebens. Links aller Studienpatienten*innen (n=140) und rechts gruppiert nach ARID1A Färbung. Rot stellt die Gruppe der nicht gefärbten Schnitte nach IHC dar (n=27), blau die Angefärbten in einer Mischgruppe aus verschiedenen Färbungsintensitäten (+, ++, +++) (n=113) (p=0,85; Log-Rank Test).

4 Diskussion

Das Ziel der hier vorliegenden Studie waren es, die Wirkung eines *ARID1A* Verlusts in Pankreaskarzinomen und kolorektalen Karzinomen näher zu untersuchen. Es ging darum, Unterschiede und Gemeinsamkeiten zu finden, um das molekulare Verständnis von *ARID1A* in den oben genannten Tumoren besser zu klassifizieren. Viele der im Ergebnissteil gezeigten Zusammenhänge dienten der Etablierung einzelner *ARID1A*-Verlust Modelle. (siRNA-knockdown und CRISPR/Cas9-knockout). In der nachfolgenden Diskussion soll daher insbesondere auf die Experimente, in welchen die etablierten Methoden genutzt wurden, eingegangen werden. Auf eine Diskussion der Etablierung der Modelle wird daher bewusst verzichtet.

4.1 *ARID1A* in L3.6pl

4.1.1 Gemcitabinbehandlung im Kontext eines Tumorsupressors

ARID1A wird als Tumorsupressor gehandelt (Wu und Roberts 2013). Gemcitabin ist das standardmäßig eingesetzte Chemotherapeutikum in der Behandlung von Pankreastumoren (Burris et al. 1997). Die Wirkweise von Gemcitabin im Kontext eines *ARID1A*-Verlusts wurde in dieser Studie untersucht (**Abbildung 12**). In der klinischen Praxis treten immer mehr Fälle auf, in denen eine Resistenz bezüglich der Gemcitabintherapie gezeigt werden kann (Amrutkar und Gladhaug 2017). Als Ursache hierfür werden unterschiedliche molekulargenetische Mechanismen diskutiert. Einige Studien zeigten bereits, dass eine Veränderung im JAK2-STAT-Signalweg zu vermehrter Chemoresistenz gegenüber Gemcitabin führt (**Abbildung 12**). Dieser Mechanismus könnte bei *ARID1A*- Verlust ebenfalls eine Rolle spielen. Es wurde bereits in Studien zu klarzelligen Ovarialtumoren gezeigt, dass ein *ARID1A* Verlust zum Auftreten von PI3K-Mutationen führen kann (De und Dey 2019). So könnte sich beispielsweise die in **Abbildung 12** dargestellte zunehmende Resistenz gegenüber Gemcitabin im Vergleich von Kontrolle zu ARID1A *knockdown* erklären lassen. Konkordant zum Ansprechen auf die jeweilige Gemcitabin Konzentration zeigt sich die IC_{50} bei ARID1A knockdown ebenfalls erhöht. In der Literatur weichen die Normwerte jeweils stark voneinander ab, je nachdem welche Zelllinie verwendet wurde (Awasthi et al. 2013). Bislang findet sich in der Literatur keine IC_{50} für L3.6pl Zellen. Zu erwähnen bleibt, dass die IC_{50} bezüglich PDAC-Zelllinien, welche mit L3.6pl vergleichbar sind, eine Varianz der Gemcitabin-Dosierung von 494 nM bis 23,9 µM hatten (Awasthi et al. 2013). Im Vergleich hierzu zeigt sich in **Abbildung 12** ein deutlich niedrigerer Wert, sowohl für die Kontrolle, als auch für ARID1A-*knockdown*. Die Ergebnisse passen zu dem für L3.6pl- Zellen beschriebenen guten Ansprechen bereits auf niedrigere Chemotherapeutika Konzentrationen (Gervasoni et al. 2004). Die bislang beschriebenen Chemotherapeutika zeigten diesen Effekt bei Daunorubicin, Doxorubicin, Paclitaxel und 5-FU (Gervasoni et al. 2004). Bislang blieb eine Beschreibung der niedrigeren IC50-Konzentration für Gemcitabin

im Speziellen jedoch aus. Die hier dargestellten Daten zeigen einen solchen Effekt auch für Gemcitabin.

4.1.2 Überleben bei *ARID1A* Verlust

ARID1A wurde in seinen funktionellen Erstbeschreibungen stets die Rolle eines Tumorsupressors zugeordnet. Dies liegt unteranderem an den häufig auftretenden *„loss of function"* Mutationen (Sun et al. 2017). Passend zur Rolle des Tumorsupressors lässt sich in den dargestellten Ergebnissen in **Abbildung 20** ein vermehrtes Wachstum bei Verlust von *ARID1A* darstellen. *ARID1A* wird oft als kontextabhängiger Tumorsupressor beschrieben, welcher auch die Tumorprogression fördern kann (Mathur 2018). In der Literatur zeigt sich bei Auswertungen der TCGA-Daten bereits bei einer Gesamtdarstellung des SWI/SNF-Komplexes eine verminderte Überlebensrate bei Mutationen in verschiedenen Tumorerkrankungen, insbesondere jedoch in Pankreastumoren (Savas und Skardasi 2018). In unserer Studie erfolge die einzelne Auflistung von *ARID-1A* Mutationen in Pankreastumoren und innerhalb dieser Gruppe der Vergleich des Überlebens. Hier zeigte sich kein signifikanter Überlebensvor-/oder Nachteil bei *ARID1A* Mutation (**Abbildung 24**). Limitierend bleibt zu erwähnen, dass die Fallzahlen bei *ARID1A* Mutationen eine wesentlich geringere im Vergleich zur Kontrollgruppe darstellt, was die Vergleichbarkeit der Gruppen erschwert. Gründe für diesen nicht signifikanten Unterschied das Überleben betreffend können die verschiedenen Wege sein, welche zur Tumorgenese beitragen (Peters und Gonzalez 2018). Tumorgenese stelle ein multifaktorielles Geschehen dar und schient nicht nur auf einer *ARID1A* Mutation zu beruhen. Es zeigt sich in mehreren Arbeiten, dass *ARID1A* mit einer zweiten Mutation zu einem wichtigen Faktor in der Tumorsuppression wird (Castellanos und Grippo 2019). Dieses Konzept wird auch gerne als synthetische Lethalität beschrieben (Li et al. 2020), hier reicht eine Mutation nicht aus um die Tumorgenese zu beeinflussen, mit einer zweiten Mutation in einem anderen spezifischen Gen führt die Kombination zum Zelltod. So kann, die in **Abbildung 24** dargestellte Kurve Ausdruck der alleinigen *ARID1A* Mutation sein, welche keinen signifikanten Überlebensunterschied zeigt, jedoch ggf. in Kombination mit einer weiteren Mutation.

4.1.3 EZH2 Inhibition

EZH2 gilt als katalytische Untereinheit der PRC2, welche durch Methylierung von Histonen oder unabhängig von Methylierung zur Tumorprogression führen kann (Biter et al. 2015; Yamagishi und Uchimaru 2017, S. 2). Für *ARID1A* und EZH2 konnte in mehreren Studien das Konzept der synthetischen Letalität (*„synthetic lethality"*) gezeigt werden (Biter et al. 2015; Yamada et al. 2021), dieses beinhaltet, wie bereits oben beschrieben die Eigenschaft, dass bei gelichzeitigem Auftreten von zwei Mutationen der Zelltod eintritt, jedoch bei alleinigem Vorliegen einer der beiden Mutationen diese Mutation keinen Einfluss auf das Überleben der Zelle hat (Li et al. 2020). Es konnte bereits in mehreren Studien die Abhängigkeit einer *ARID1A* Mutation, von einer EZH2- Inhibition in mehreren Tumoren als therapeutische

Strategie eingesetzt werden (Duan et al. 2020). Basierend auf der Idee einer synthetischen Letalität von EZH2 bei *ARID1A* Mutation und den vorangegangenen Studien (Bitler et al. 2015) erfolgte die Behandlung der Pankreastumorzellen mit und ohne *ARID1A* mittels EZH2-Inhibitor. In vorangegangenen Studien zu Pankreaskarzinomen konnte hier ebenfalls die Rolle der Regulation von EZH2 die Tumorprogression betreffend dargestellt werden (Agrawal et al. 2020, S. 2; Patil et al. 2020). In unsere Studie zeigte sich in **Abbildung 22** ein Ansprechen in Abhängigkeit zur EZH2 Inhibitor Konzentration. Dieses war jedoch unabhängig von einem *ARID1A* Verlust und blieb somit konträr zum erwarteten Bild. In der Literatur sind solche Fälle vereinzelt beschrieben (Bisserier und Wajapeyee 2018; Wu et al. 2018). Als Ursachen für die fehlende Wirksamkeit sind in diesen Studien die insbesondere die Hochregulation von anti-apoptotischen Signalwegen genannt (Bisserier und Wajapeyee 2018). Soweit bekannt, erfolgte noch keine Studie zur Wirksamkeit von EZH2-Inhibitoren in Pankreastumoren mit *ARID1A*-Mutation. Daher kann über die Mechanismen, welche zu oben gezeigten Ergebnissen führen, beziehungsweise die Vergleichbarkeit mit anderen Studien, zum aktuellen Stand der Forschung nur gemutmaßt werden kann. Es bedarf hier sicherlich noch einiger weiterführenden Experimente um die Wirkweise genauer zu charakterisieren.

4.2 *ARID1A* in SW480

4.2.1 Überleben bei *ARID1A*-Verlust

In der Literatur (Wu und Roberts 2013; Sun et al. 2017) und in dieser Studie für die Pankreaskarzinomzelllinie (**Abbildung 20**) konnte, wie bei einem Tumorsupressor erwartet, bei fehlendem Protein ein gesteigertes Wachstum gezeigt werden. In der kolorektalen Zelllinie erfolgte eine analoge Versuchsdurchführung (**Abbildung 21**). Es ergab sich ein vermindertes Wachstum im Vergleich zur Kontrolle, nach Verlust von *ARID1A*. Dies entsprach nicht den initialen Erwartungen und folgte ebenso wenig der Theorie eines klassischen Tumorsupressors. In der Literatur wird *ARID1A* oft als kontextspezifischer Tumorsupressor beschrieben (Sun et al. 2017). Dies scheint auch bei der von uns gewählten kolorektalen Zelllinie der Fall zu sein. Sen et al. 2019 zeigt basierend auf den hier gezeigten Experimente, das Phänomen des verminderten Wachstums bei *ARID1A* Verlust in Zelllinien mit *KRAS* Mutation (Sen et al. 2019). Die Zelllinie SW480 trägt eine *KRAS*-Mutation auf beiden Allelen. Es lässt sich also der bereits für HCT1116 und DLD1 gezeigte Effekt bei *KRAS* Mutation auch für SW480 Zellen beschreiben (Sen et al. 2019). Somit lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass die anderen Mechanismen, welche *ARID1A* in *KRAS* mutierten kolorektalen Zelllinien beschreibt, ebenfalls für SW480 anwendbar sind. So konnte gezeigt werden, dass *KRAS* mutierte Zellen abhängig von *ARID1A* sind und bei Fehlen eine Herunterregulation der *KRAS* abhängigen Enhancer Aktivität erfolgt (Sen et al. 2019). Die tumorsuppressive Funktion rückt damit in diesem Kontext eher in den Hintergrund und es

scheint die bereits beschriebene Enhancer regulierende Funktion zu dominieren (Lakshminarasimhan et al. 2017; Mathur et al. 2017).

Die in vitro gesehene Abnahme der Wachstumsrate führte zur vergleichenden Gegenüberstellung des Gesamtüberlebens mit und ohne *ARID1A* Mutation. Die frei zugänglichen Daten wurden hierfür mittels Kaplan-Meyer-Plot ausgewertet (**Abbildung 25**). Es zeigt sich kein signifikanter Überlebensvorteil bei Mutation von *ARID1A* im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne ARID1A Mutation. Dies stützt die vorangegangene Hypothese nicht, dass *ARID1A* in kolorektalen Karzinomen eher eine Enhancer-regulierende Funktion übernimmt (Mathur et al. 2017). Limitierend bleibt hier sicherlich zu erwähnen, dass *ARID1A* eine kleine Fallzahl aufweist. Zudem werden die Mutationsumstände in der Darstellung nicht berücksichtigt. Die Literatur beschreibt auch bei großen Fallzahlen im Hinblick auf das Gesamtüberleben jeweils einen nicht signifikanten Unterschied (Kim et al. 2015; Shin et al. 2016; Erfani et al. 2020).

Im Rahmen einer klinischen Studie erfolgte die Gewinnung von Rektumbiopsien nach Tumorentfernung. Diese wurden mittels Immunhistochemie ausgewertet und zeigten unterschiedlichste Expressionslevel von ARID1A (**Abbildung 26**). Die unterschiedliche Anfärbbarkeit könnte auf unterschiedliche Expression von ARID1A zurückzuführen sein, so könnten die negativen Biopsien homozygot und die schwach positiven Biopsien heterozygot mutiert sein (Sen et al. 2019). Eine andere Erklärung der unterschiedlichen Expressionslevel könnte der Einfluss von DNA-Methylierung auf die Repression der einzelnen Allele sein (Moore et al. 2013) welcher sich dann in unterschiedlicher Anfärbbarkeit in der Immunhistochemie zeigt. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit stellt die unterschiedliche Deletion von ARID1A dar, dieses Phänomen des „Teilverlusts" ist bereits als Prädisposition für Tumoren beschrieben (Borrelli et al. 2016) und scheint in Endometriosen eine nachgewiesene Rolle zu spielen. Der in den Patientendaten gesehene milde Überlebensnachteil von *ARID1A* Mutationen im Vergleich zu *ARID1A* Expression überrascht, da die Mutationsprofile in Rektumkarzinomen mit erhöhter Frequenz *KRAS* mutiert sind (Baskin et al. 2014). Es wäre also zu erwarten gewesen, dass hier der *in vitro* gesehene Effekt der Wachstumsminderung ebenfalls eine Rolle spielt. Jedoch passen die Ergebnisse zu den in der Literatur gesehenen Unterschieden in vitro und im Gesamtüberleben, welche keine signifikante Veränderung des Gesamtüberlebens zeigten (Kim et al. 2015; Shin et al. 2016; Erfani et al. 2020).

4.2.2 Epithelial-mesenchymale-Transition (EMT)

In der Tumorprogression spielt die EMT eine wichtige Rolle, insbesondere bei der Metastasierung von Tumorzellen (Petrova et al. 2016; Saitoh 2018). In dieser Studie wurde mittels Analyse auf Proteinniveau eine Untersuchung von typischen EMT-Markern bei ARID1A-*knockdown* durchgeführt (**Abbildung 11**). Passend zu den Ergebnissen der Literatur zeigte sich das transmembrane Glykoprotein E-Cadherin vermindert (Petrova et al. 2016).

Die wissenschaftliche Hypothese ist, dass Snail-1 als Zinkfinger-Transkriptionsfaktor über WNT-Signalwege unter anderem zum Verlust von E-Cadherin führt (Kaufhold und Bonavida 2014). In **Abbildung 11** zeigt sich hier für SNAIL-1 eine vermehrte Proteinbande. Diese beiden Proteine unterstützen die These, dass ein Verlust von ARID1A zu einer vermehrten Tumorprogression im Sinne von EMT führt. Dies zeigt sich passen zu Ergebnissen, welche bereits für andere Tumorerkrankungen (Nierenzellkarzinom, klarzelliges Ovarialkarzinom und Pankreastumoren) bei Verlust von ARID1A eine vermehrte EMT-Neigung gezeigt haben (De und Dey 2019; Somsuan et al. 2019; Wang W et al. 2019). Bislang erfolgte diese Darstellung noch nicht für kolorektale Karzinome. Etwas konträr zu den bisherig beschriebenen Ergebnissen steht der Oberflächenmarker CD24, welcher häufig in Tumorzellen vorkommt und oft als Onkogen gilt (Fang et al. 2010). In **Abbildung 11** zeigt sich die Proteinbande nach *knockdown* vermindert. Es könnten mehrere Hypothesen angenommen werden. Einerseits könnte die verminderte Bande einen Hinweis auf eine verminderte WNT-Stabilisierung sein, dies zeigt sich in Pankreastumoren bei verminderter CD24 Bande (Lubeseder-Martellato et al. 2016). Diese könnte in der Abhängigkeit von MEK/ERK- Signalweg und WNT-Signalweg liegen (Jeong et al. 2018). Bei verminderter Enhanceraktivität von MEK/ERK könnte dies ebenfalls zu eingeschränkter Aktivierung des WNT-Signalwegs führen und so zu einer verminderten CD24 Proteinbande, trotz anderer erhöhter EMT-Marker. Diese Hypothese würde der in 4.2.1 erhobene These der kontextabhängigen Funktion, beziehungsweise der Regulation der *KRAS* abhängigen Enhanceraktivität, folgen (Wang et al. 2017). Im Gegensatz dazu steht, dass bei einigen Tumorerkrankungen z.B. Mammakarzinomen und oralen Tumoren eine CD24+/CD44- Konstellation eher zu einem epithelialen Phänotypen und eine CD24-/CD44+ Konstellation zu einem mesenchymalen Phänotypen führt (Ghuwalewala et al. 2016; Da Cruz Paula et al. 2017). Weitere Experimente sollten sich anschließen, um die Bedeutung in Pankreas und Kolorektalenkarzinomen für diese zu klären.

4.2.3 EZH2-Inhibition

Basierend auf der Idee der synthetischen Lethalität von *ARID1A* und EZH-2 (Bitler et al. 2015), erfolgte auch in den SW480 Zellen die Behandlung von Kontrollen im Vergleich zu *knockout* Zellen mittels Tazemetostat (**Abbildung 23**). Die erwartete, deutliche Reduktion des Wachstums bei EZH2-Inhibition in Kombination mit *ARID1A*-Verlust blieb aus (Yamagishi und Uchimaru 2017). Die Literaturanalyse zeigt, dass bislang zwar kolorektale Karzinome mittels EZH2-Inhibition in ihrer Wachstumstendenz eingeschränkt werden konnten (Fussbroich et al. 2011), jedoch noch keine Analyse von *ARID1A* und EZH2-Inhibition in kolorektalen Karzinomen erfolgt ist. So kann bei PTEN- Mutationen eine Resistenz gegenüber EZH-2-Inhibitoren vorliegen (Ma et al. 2019). Der Theorie von Sen et al. (2019) folgend, welche *ARID1A* als Regulator von Enhanceraktivität postuliert, könnte in unserem Fall die *KRAS* Mutation eine Resistenz gegenüber EZH2-Inhibition verursachen. Ebenso bleibt die Möglichkeit zu diskutieren, inwieweit die Enhanceraktivität, welche bei

ARID1A-Verlust abnimmt, die in **Abbildung 23** dargestellte, eher abnehmende Wirksamkeit von Tazemetostat, bei Verlust von *ARID1A* erklären könnte. Es bedarf hier weiterer Studien, um dieser Frage auf den Grund zu gehen, da die Literatur hier noch keine Ergebnisse liefern kann.

5 Zusammenfassung

Insgesamt zeigte *ARID1A* in dieser Studie eine stark Kontext-abhängige Funktion (Sun et al. 2017). Insbesondere in Pankreastumoren konnte teilweise die tumorsuppressive Funktion von *ARID1A* in Bezug auf die Wachstumsrate bestätigt werden. Bezüglich möglicher therapeutischer Interventionen bleiben jedoch noch einige Fragen ungeklärt, hier sollten sich weitere Studien anschließen, um den Pathomechanismus hinter der fehlenden Wirksamkeit von EZH2-Inhibition zu klären und damit gegebenenfalls andere Agenzien zu finden, welche potentielle therapeutische Optionen bieten können. Bezüglich der Gemcitabin Wirkung auf die hier verwendete L3.6pl Zelllinie konnte erstmalig ein sehr gutes Ansprechen auf bereits niedrige Dosierungen des Chemotherapeutikums gezeigt werden. Für kolorektale Karzinome zeigte sich die Abhängigkeit von *KRAS* Mutationen als wichtiger Faktor für die Wirkweise von *ARID1A* (Sen et al. 2019). Zudem konnte mittels EMT Markern eine vermehrte Metastasierungsneigung bei *ARID1A* Verlust gezeigt werden.

Die Hauptaufgabe der Studie lag auch in der Etablierung von Modellen, welche den *ARID1A*-Verlust darstellen können und somit weiteren Experimenten zur Verfügung stehen. Zum Zeitpunkt der durchgeführten Experimente stellte ein *ARID1A knockout* kein etabliertes bzw. publiziertes System dar. Wir konnten im Rahmen dieser Arbeit sowohl einen temporären ARID1A *knockdown* mittels siRNA, als auch einen dauerhaftem *ARID1A knockout* mittels CRISPR/CAS9 etablieren. Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Modelle sollten für weiterführende Studien zum besseren Verständnis der jeweiligen Funktion und damit einhergehenden Therapieoption bezüglich *ARID1A* verwendet werden.

Die aktuelle Literatur zeigt in Pankreastumoren bei einem *ARID1A knockout* initial eine kontextabhängige Rolle eines Tumorsupressors mit verminderter Metastasierung (Xu und Tang 2021). In Mausmodellen konnte jedoch auch in späterem Alter eine schnellere PDAC-Formatierung und damit verbundene Aggressivität gezeigt werden (Wang SC et al. 2019).In kolorektalen Karzinomen zeigt ein *ARID1A*-Verlust eine veränderte Histonmodifikation an Enhancern und einer damit einhergehenden Veränderungen in Genaktivierungen (Mathur et al. 2017). Diese Aktivitätsänderung scheint hierbei ebenfalls kontextabhängig zu sein (Xu und Tang 2021). Der aktuelle Stand der Wissenschaft zeigt, dass ein komplexes, kontextabhängiges Verständnis von *ARID1A* notwendig ist, um sich den einzelnen Wirkweisen und damit einhergehenden Funktionen zu nähren.

Abschließend lässt sich festhalten, die Mutationsraten von *ARID1A* in Tumoren ist hoch, jedoch ist das wissenschaftliche Interesse erst über die letzten Jahre gewachsen und so steht das Verständnis von *ARID1A* in verschiedenen Kontexten bei verschiedenen Tumoren noch am Anfang. Eine Weiterentwicklung verschiedener Konzepte, auch um individuelle therapeutische Strategien entwickeln zu können, wird sich in den nächsten Jahren aber sicher nach sich ziehen (Xu und Tang 2021). Es laufen aktuell viele vorklinische und klinische Studien um *ARID1A* und seine hohe Mutationsfrequenz in Tumoren auch therapeutisch nutzen zu können (Mullen et al. 2021).

6 Literaturverzeichnis

Agrawal R, Chen M, Bukhari Z, Ogunwobi OO, Haseeb MA, Martello LA (2020): EZH2 downregulation augments the effect of irradiation in reducing pancreatic cancer cell proliferation in vitro. Ann Clin Lab Sci 50, 45–56

Alfert A, Moreno N, Kerl K (2019): The BAF complex in development and disease. Epigenetics Chromatin 12, 19

Amrutkar M, Gladhaug IP (2017): Pancreatic cancer chemoresistance to gemcitabine. Cancers (Basel) 9, 157

Aran V, Victorino AP, Thuler LC, Ferreira CG (2016): Colorectal cancer: epidemiology, disease mechanisms and interventions to reduce onset and mortality. Clin Colorectal Cancer 15, 195–203

Awasthi N, Zhang C, Schwarz AM, Hinz S, Wang C, Williams NS, Schwarz MA, Schwarz RE (2013): Comparative benefits of nab-paclitaxel over gemcitabine or polysorbate-based docetaxel in experimental pancreatic cancer. Carcinogenesis 34, 2361–2369

Baskin Y, Dagdeviren YK, Calibasi G, Canda AE, Sarioglu S, Ellidokuz H, Oztop I (2014): KRAS mutation profile differences between rectosigmoid localized adenocarcinomas and colon adenocarcinomas. J Gastrointest Oncol 5, 265–269

Birnbaum DJ, Adélaïde J, Mamessier E, Finetti P, Lagarde A, Monges G, Viret F, Gonçalvès A, Turrini O, Delpero JR et al. (2011): Genome profiling of pancreatic adenocarcinoma. Genes Chromosom Cancer 50, 456–465

Bisserier M, Wajapeyee N (2018): Mechanisms of resistance to EZH2 inhibitors in diffuse large B-cell lymphomas. Blood 131, 2125–2137

Biter BG, Aird KM, Garipov A, Li H, Amatangelo M, Kossenkov AV, Schultz DC, Liu Q, Shih IM, Conejo-Garcia JR et al. (2015): Targeting EZH2 methyltransferase activity in ARID1A mutated cancer cells is synthetic lethal. Nat Med 21, 231–238

Borrelli GM, Abrão MS, Taube ET, Darb-Esfahani S, Köhler C, Chiantera V, Mechsner S (2016): (Partial) Loss of BAF250a (ARID1A) in rectovaginal deep-infiltrating endometriosis, endometriomas and involved pelvic sentinel lymph nodes. Mol Hum Reprod 22, 329–337

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018): Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin 68, 394–424

Burris HA, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Cripps MC, Portenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff P et al. (1997): Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a

randomized trial. J Clin Oncol 15, 2403–2413

Cao H, Xu E, Liu H, Wan L, Lai M (2015): Epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer metastasis: a system review. Pathol Res Pract 211, 557–569

Castellanos KJ, Grippo PJ (2019): ARID1A: guardian of normal pancreatic ducts. Transl Cancer Res 8, 133–134

Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E et al. (2012): The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. Cancer Discov 2, 401–404

Clapier CR, Cairns BR (2009): The biology of chromatin remodeling complexes. Annu Rev Biochem 78, 273–304

Clapier CR, Iwasa J, Cairns BR, Peterson CL (2017): Mechanisms of action and regulation of ATP-dependent chromatin-remodelling complexes. Nat Rev Mol Cell Biol 18, 407–422

Da Cruz Paula A, Leitão C, Marques O, Rosa AM, Santos AH, Rêma A, de Fátima Faria M, Rocha A, Costa JL, Lima M et al. (2017): Molecular characterization of CD44+/CD24-/Ck+/CD45- cells in benign and malignant breast lesions. Virchows Arch 470, 311–322

De P, Dey N (2019): Mutation-driven signals of ARID1A and PI3K pathways in ovarian carcinomas: alteration is an opportunity. Int J Mol Sci 20, 5732

De Rosa M, Pace U, Rega D, Costabile V, Duraturo F, Izzo P, Delrio P (2015): Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer (review). Oncol Rep 34, 1087–1096

Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB (2019): Colorectal cancer. Lancet 394, 1467–1480

Duan R, Du W, Guo W (2020): EZH2: a novel target for cancer treatment. J Hematol Oncol 13, 104

Erfani M, Hosseini SV, Mokhtari M, Zamani M, Tahmasebi K, Alizadeh Naini M, Taghavi A, Carethers JM, Koi M, Brim H et al. (2020): Altered ARID1A expression in colorectal cancer. BMC Cancer 20, 350

Fang X, Zheng P, Tang J, Liu Y (2010): CD24: from A to Z. Cell Mol Immunol 7, 100–103

Fearon ER (2011): Molecular Genetics of Colorectal Cancer. Annu Rev Pathol 6, 479–507

Fussbroich B, Wagener N, Macher-Goeppinger S, Benner A, Fälth M, Sültmann H, Holzer A, Hoppe-Seyler K, Hoppe-Seyler F (2011): EZH2 depletion blocks the proliferation of colon cancer cells. PLoS One 6, e21651

Gangaraju VK, Bartholomew B (2007): Mechanisms of ATP dependent chromatin remodeling. Mutat Res 618, 3–17

Gervasoni JE, Hindenburg AA, Vezeridis MP, Schulze S, Wanebo HJ, Mehta S (2004): An effective in vitro antitumor response against human pancreatic carcinoma with paclitaxel and

daunorubicin by induction of both necrosis and apoptosis. Anticancer Res 24, 2617–2626

Ghuwalewala S, Ghatak D, Das P, Dey S, Sarkar S, Alam N, Panda CK, Roychoudhury S (2016): CD44(high)CD24(low) molecular signature determines the cancer stem cell and EMT phenotype in oral squamous cell carcinoma. Stem Cell Res 16, 405–417

Grant TJ, Hua K, Singh A (2016): Molecular pathogenesis of pancreatic cancer. Prog Mol Biol Transl Sci 144, 241–275

Guan B, Gao M, Wu CH, Wang TL, Shih IM (2012): Functional analysis of in-frame indel ARID1A mutations reveals new regulatory mechanisms of its tumor suppressor functions. Neoplasia 14, 986–993

Heath AP, Ferretti V, Agrawal S, An M, Angelakos JC, Arya R, Bajari R, Baqar B, Barnowski JHB, Burt J et al. (2021): The NCI genomic data commons. Nat Genet 53, 257–262

Helming KC, Wang X, Wilson BG, Vazquez F, Haswell JR, Manchester HE, Kim Y, Kryukov GV, Ghandi M, Aguirre AJ et al. (2014): ARID1B is a specific vulnerability in ARID1A-mutant cancers. Nat Med 20, 251–254

Hodges C, Kirkland JG, Crabtree GR (2016): The many roles of BAF (mSWI/SNF) and PBAF complexes in cancer. Cold Spring Harb Perspect Med 6, a026930

Hohmann AF, Vakoc CR (2014): A rationale to target the SWI/SNF complex for cancer therapy. Trends in Genetics 30, 356–363

Jeong WJ, Ro EJ, Choi KY (2018): Interaction between Wnt/β-catenin and RAS-ERK pathways and an anti-cancer strategy via degradations of β-catenin and RAS by targeting the Wnt/β-catenin pathway. NPJ Precis Oncol 2, 5

Jones S, Wang TL, Shih IM, Mao TL, Nakayama K, Roden R, Glas R, Slamon D, Diaz LA, Vogelstein B, et al. (2010): Frequent mutations of chromatin remodeling gene ARID1A in ovarian clear cell carcinoma. Science 330, 228–231

Kaufhold S, Bonavida B (2014): Central role of Snail1 in the regulation of EMT and resistance in cancer: a target for therapeutic intervention. J Exp Clin Cancer Res 33, 62

Kim KJ, Jung HY, Oh MH, Cho H, Lee JH, Lee HJ, Jang S-H, Lee MS (2015): Loss of ARID1A Expression in Gastric Cancer: Correlation with mismatch repair deficiency and clinicopathologic features. J Gastric Cancer 15, 201–208

Kimura Y, Fukuda A, Ogawa S, Maruno T, Takada Y, Tsuda M, Hiramatsu Y, Araki O, Nagao M, Yoshikawa T et al. (2018): ARID1A maintains differentiation of pancreatic ductal cells and inhibits development of pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. Gastroenterology 155, 194-209.e2

Klose RJ, Bird AP (2006): Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. Trends in Biochemical Sciences 31, 89–97

Lakshminarasimhan R, Andreu-Vieyra C, Lawrenson K, Duymich CE, Gayther SA, Liang G, Jones PA (2017): Down-regulation of ARID1A is sufficient to initiate neoplastic transformation along with epigenetic reprogramming in non-tumorigenic endometriotic cells. Cancer Lett 401, 11–19

Lao VV, Grady WM (2011): Epigenetics and colorectal cancer. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 8, 686–700

Lawrence M, Daujat S, Schneider R (2016): Lateral thinking: how histone modifications regulate gene expression. Trends Genet 32, 42–56

Lee LH, Sadot E, Ivelja S, Vakiani E, Hechtman JF, Sevinsky CJ, Klimstra DS, Ginty F, Shia J (2016): ARID1A expression in early stage colorectal adenocarcinoma: an exploration of its prognostic significance. Human Pathology 53, 97–104

Li F, Wan M, Zhang B, Peng Y, Zhou Y, Pi C, Xu X, Ye L, Zhou X, Zheng L (2018): Bivalent histone modifications and development. Curr Stem Cell Res Ther 13, 83–90

Li S, Topatana W, Juengpanich S, Cao J, Hu J, Zhang B, Ma D, Cai X, Chen M (2020): Development of synthetic lethality in cancer: molecular and cellular classification. Signal Transduct Target Ther 5, 241

Lorch Y, Kornberg RD (2017): Chromatin-remodeling for transcription. Q Rev Biophys 50, e5

Lubeseder-Martellato C, Hidalgo-Sastre A, Hartmann C, Alexandrow K, Kamyabi-Moghaddam Z, Sipos B, Wirth M, Neff F, Reichert M, Heid I et al. (2016): Membranous CD24 drives the epithelial phenotype of pancreatic cancer. Oncotarget 7, 49156–49168

Ma L, Yan Y, Bai Y, Yang Y, Pan Y, Gang X, Karnes RJ, Zhang J, Lv Q, Wu Q et al. (2019): Overcoming EZH2 inhibitor resistance by taxane in PTEN-mutated cancer. Theranostics 9, 5020–5034

Mathur R (2018): ARID1A loss in cancer: Towards a mechanistic understanding. Pharmacol Ther 190, 15–23

Mathur R, Alver BH, San Roman AK, Wilson BG, Wang X, Agoston AT, Park PJ, Shivdasani RA, Roberts CWM (2017): ARID1A loss impairs enhancer-mediated gene regulation and drives colon cancer in mice. Nat Genet 49, 296–302

McGuigan A, Kelly P, Turkington RC, Jones C, Coleman HG, McCain RS (2018): Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. World J Gastroenterol 24, 4846–4861

Moore LD, Le T, Fan G (2013): DNA methylation and its basic function. Neuropsychopharmacology 38, 23–38

Mullen J, Kato S, Sicklick JK, Kurzrock R (2021): Targeting ARID1A mutations in cancer. Cancer Treat Rev 100, 102287

Neigeborn L, Carlson M (1984): Genes affecting the regulation of Suc2 gene expression by glucose repression in saccharomyces cerevisiae. Genetics 108, 845–858

Numata M, Morinaga S, Watanabe T, Tamagawa H, Yamamoto N, Shiozawa M, Nakamura Y, Kameda Y, Okawa S, Rino Y et al. (2013): The clinical significance of SWI/SNF complex in pancreatic cancer. Int J Oncol 42, 403–410

Patil S, Steuber B, Kopp W, Kari V, Urbach L, Wang X, Küffer S, Bohnenberger H, Spyropoulou D, Zhang Z et al. (2020): EZH2 regulates pancreatic cancer subtype identity and tumor progression via transcriptional repression of GATA6. Cancer Res 80, 4620–4632

Peters JM, Gonzalez FJ (2018): The evolution of carcinogenesis. Toxicol Sci 165, 272–276

Petrova YI, Schecterson L, Gumbiner BM (2016): Roles for E-cadherin cell surface regulation in cancer. Mol Biol Cell 27, 3233–3244

Pillidge Z, Bray SJ (2019): SWI/SNF chromatin remodeling controls Notch-responsive enhancer accessibility. EMBO Rep 20, e46944

Putra J, Suriawinata AA (2015): Clinical significance of loss of ARID1A expression in colorectal and small intestinal carcinoma. Clin Transl Gastroenterol 6, e131

Rawla P, Sunkara T, Gaduputi V (2019): Epidemiology of pancreatic cancer: global trends, etiology and risk factors. World J Oncol 10, 10–27

Ribeiro-Silva C, Vermeulen W, Lans H (2019): SWI/SNF: Complex complexes in genome stability and cancer. DNA Repair (Amst) 77, 87–95

Roberts CWM, Orkin SH (2004): The SWI/SNF complex — chromatin and cancer. Nat Rev Cancer 4, 133–142

Rothbart SB, Strahl BD (2014): Interpreting the language of histone and DNA modifications. Biochim Biophys Acta 1839, 627–643

Ryan DP, Hong TS, Bardeesy N (2014): Pancreatic adenocarcinoma. N Engl J Med 371, 1039–1049

Saitoh M (2018): Involvement of partial EMT in cancer progression. J Biochem 164, 257–264

Sausen M, Phallen J, Adleff V, Jones S, Leary RJ, Barrett MT, Anagnostou V, Parpart-Li S, Murphy D, Kay Li Q et al. (2015): Clinical implications of genomic alterations in the tumour and circulation of pancreatic cancer patients. Nat Commun 6, 7686

Savas S, Skardasi G (2018): The SWI/SNF complex subunit genes: their functions, variations, and links to risk and survival outcomes in human cancers. Crit Rev Oncol Hematol 123, 114–131

Sen M, Wang X, Hamdan FH, Rapp J, Eggert J, Kosinsky RL, Wegwitz F, Kutschat AP, Younesi FS, Gaedcke J et al. (2019): ARID1A facilitates KRAS signaling-regulated enhancer

activity in an AP1-dependent manner in colorectal cancer cells. Clin Epigenetics 11, 92

Shain AH, Giacomini CP, Matsukuma K, Karikari CA, Bashyam MD, Hidalgo M, Maitra A, Pollack JR (2012): Convergent structural alterations define SWItch/Sucrose NonFermentable (SWI/SNF) chromatin remodeler as a central tumor suppressive complex in pancreatic cancer. PNAS 109, 252–259

Shema-Yaacoby E, Nikolov M, Haj-Yahya M, Siman P, Allemand E, Yamaguchi Y, Muchardt C, Urlaub H, Brik A, Oren M et al. (2013): Systematic identification of proteins binding to chromatin-embedded ubiquitylated H2B reveals recruitment of SWI/SNF to regulate transcription. Cell Reports 4, 601–608

Shen J, Peng Y, Wei L, Zhang W, Yang L, Lan L, Kapoor P, Ju Z, Mo Q, Shih IM et al. (2015): ARID1A deficiency impairs the DNA damage checkpoint and sensitizes cells to PARP Inhibitors. Cancer Discov 5, 752–767

Shin YR, Kim KA, Im S, Hwang SS, Kim K (2016): Prediction of KRAS mutation in rectal cancer using MRI. Anticancer Res 36, 4799–4804

Somsuan K, Peerapen P, Boonmark W, Plumworasawat S, Samol R, Sakulsak N, Thongboonkerd V (2019): ARID1A knockdown triggers epithelial-mesenchymal transition and carcinogenesis features of renal cells: role in renal cell carcinoma. FASEB J 33, 12226–12239

Sondka Z, Bamford S, Cole CG, Ward SA, Dunham I, Forbes SA (2018): The COSMIC Cancer Gene Census: describing genetic dysfunction across all human cancers. Nat Rev Cancer 18, 696–705

Springfeld C, Jäger D, Büchler MW, Strobel O, Hackert T, Palmer DH, Neoptolemos JP (2019): Chemotherapy for pancreatic cancer. Presse Med 48, 159–174

Stern M, Jensen R, Herskowitz I (1984): Five SWI genes are required for expression of the HO gene in yeast. J Mol Biol 178, 853–868

Strum WB (2016): Colorectal adenomas. N Engl J Med 374, 1065–1075

Sudarsanam P, Iyer VR, Brown PO, Winston F (2000): Whole-genome expression analysis of snf/swi mutants of saccharomyces cerevisiae. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 3364–3369

Sun X, Wang SC, Wei Y, Luo X, Jia Y, Li L, Gopal P, Zhu M, Nassour I, Chuang JC et al. (2017): Arid1a has context-dependent oncogenic and tumor suppressor functions in liver cancer. Cancer Cell 32, 574-589

Tomihara H, Carbone F, Perelli L, Huang JK, Soeung M, Rose JL, Robinson FS, Lissanu Deribe Y, Feng N, Takeda M et al. (2020): Loss of ARID1A promotes epithelial-mesenchymal transition and sensitizes pancreatic tumors to proteotoxic stress. Cancer Res 81, 332-343

Versteege I, Sévenet N, Lange J, Rousseau-Merck MF, Ambros P, Handgretinger R, Aurias

A, Delattre O (1998): Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer. Nature 394, 203–206

Wang SC, Nassour I, Xiao S, Zhang S, Luo X, Lee J, Li L, Sun X, Nguyen LH, Chuang JC et al. (2019): SWI/SNF component ARID1A restrains pancreatic neoplasia formation. Gut 68, 1259–1270

Wang W, Friedland SC, Guo B, O'Dell MR, Alexander WB, Whitney-Miller CL, Agostini-Vulaj D, Huber AR, Myers JR, Ashton JM et al. (2019): ARID1A, a SWI/SNF subunit, is critical to acinar cell homeostasis and regeneration and is a barrier to transformation and epithelial-mesenchymal transition in the pancreas. Gut 68, 1245–1258

Wang X, Lee RS, Alver BH, Haswell JR, Wang S, Mieczkowski J, Drier Y, Gillespie SM, Archer TC, Wu JN et al. (2017): SMARCB1-mediated SWI/SNF complex function is essential for enhancer regulation. Nat Genet 49, 289–295

Wiegand KC, Hennessy BT, Leung S, Wang Y, Ju Z, McGahren M, Kalloger SE, Finlayson S, Stemke-Hale K, Lu Y et al. (2014): A functional proteogenomic analysis of endometrioid and clear cell carcinomas using reverse phase protein array and mutation analysis: protein expression is histotype-specific and loss of ARID1A/BAF250a is associated with AKT phosphorylation. BMC Cancer 14, 120

Witkiewicz AK, McMillan EA, Balaji U, Baek G, Lin WC, Mansour J, Mollaee M, Wagner KU, Koduru P, Yopp A et al. (2015): Whole-exome sequencing of pancreatic cancer defines genetic diversity and therapeutic targets. Nat Commun 6, 6744

Wu JN, Roberts CWM (2013): ARID1A mutations in cancer: another epigenetic tumor suppressor? Cancer Discovery 3, 35–43

Wu RC, Wang TL, Shih IM (2014): The emerging roles of ARID1A in tumor suppression. Cancer Biol Ther 15, 655–664

Wu S, Fatkhutdinov N, Fukumoto T, Bitler BG, Park PH, Kossenkov AV, Trizzino M, Tang HY, Zhang L, Gardini A et al. (2018): SWI/SNF catalytic subunits' switch drives resistance to EZH2 inhibitors in ARID1A-mutated cells. Nat Commun 9, 4116

Xiao L, Parolia A, Qiao Y, Bawa P, Eyunni S, Mannan R, Carson SE, Chang Y, Wang X, Zhang Y et al. (2021): Targeting SWI/SNF ATPases in enhancer-addicted prostate cancer. Nature 601, 434-439

Xu S, Tang C (2021): The role of ARID1A in tumors: tumor initiation or tumor suppression? Front Oncol 11, 745187

Yachida S, Jones S, Bozic I, Antal T, Leary R, Fu B, Kamiyama M, Hruban RH, Eshleman JR, Nowak MA et al. (2010): Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. Nature 467, 1114–1117

Yamada L, Saito M, Thar Min AK, Saito K, Ashizawa M, Kase K, Nakajima S, Onozawa H,

Okayama H, Endo H et al. (2021): Selective sensitivity of EZH2 inhibitors based on synthetic lethality in ARID1A-deficient gastric cancer. Gastric Cancer 24, 60–71

Yamagishi M, Uchimaru K (2017): Targeting EZH2 in cancer therapy. Curr Opin Oncol 29, 375–381

Ye J, Zhou Y, Weiser MR, Gönen M, Zhang L, Samdani T, Bacares R, DeLair D, Ivelja S, Vakiani E et al. (2014): Immunohistochemical detection of ARID1A in colorectal carcinoma: loss of staining is associated with sporadic microsatellite unstable tumors with medullary histology and high TNM stage. Hum Pathol 45, 2430–2436