

Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen

Aus der Klinik für Strahlentherapie

**ARID1B: eine neue Schwachstelle für die Radiosensitivität  
von ARID1A-mutierten kolorektalen Tumoren**

In a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
durch die Medizinische Fakultät  
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von  
Benedikt Walter Niedermaier  
aus Heidelberg  
2021

# DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT  
DUISBURG  
ESSEN

*Offen im Denken*

ub | universitäts  
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

**DOI:** 10.17185/duepublico/78498

**URN:** urn:nbn:de:hbz:465-20230705-081353-8

Alle Rechte vorbehalten.

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. Jan Buer  
1. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. Martin Stuschke  
2. Gutachter: Frau Prof. Dr. med. S Beckebaum  
3. Gutachter: Frau Priv.-Doz. Dr. med. habil. G. Reinhartz

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Mai 2023

## Publikationsliste

Aus den Inhalten dieser Arbeit entstanden folgende Veröffentlichungen:

- 1) **Niedermaier B**, Sak A, Zernickel E, Shan Xu, Groneberg M, Stuschke M (2019) Targeting ARID1A-mutant colorectal cancer: depletion of ARID1B increases radiosensitivity and modulates DNA damage response. Sci. Rep. 9.

Vorträge und publizierte Abstracts:

- 2) **Niedermaier B**, Sak A, Zernickel E, Groneberg M, Stuschke M (2019) ARID1B Knockdown erhöht die Strahlensensitivität und moduliert DNA-Reparatur in ARID1A-mutierten kolorektalen Tumorklinen. Strahlenther Onkol 195 (Suppl 1). Vortrag auf der 25. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie (DEGRO) in Münster.
- 3) **Niedermaier B**, Sak A, Zernickel E, Groneberg M, Stuschke M (2018) Increased sensitivity of colon carcinoma cells with ARID1A mutation to radiotherapy by depletion of ARID1B. Strahlenther Onkol 194 (Suppl 1). Posterpräsentation auf der 24. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie (DEGRO) in Leipzig.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
1.1	CHROMATIN	6
1.1.1	Die Bedeutung der Chromatin-Remodeller	7
1.2	DER SWI/SNF KOMPLEX	9
1.2.1	ARID1A und ARID1B	9
1.2.2	SWI/SNF-Mutationen in Tumoren	10
1.2.3	Inzidenz von ARID1A Mutationen	11
1.2.4	Prognostische Relevanz von ARID1A und ARID1B	11
1.2.5	ARID1A – ein Tumorsuppressor?	12
1.2.6	Die Rolle von ARID1B in ARID1A-mutierten Tumoren	13
1.3	DNA-SCHÄDEN UND REPARATUR	14
1.3.1	Non-Homologous End-Joining	15
1.3.2	Homologe Rekombination	16
1.3.3	Der SWI/SNF-Komplex in DNA-Reparatur	17
1.4	DAS KOLOREKTALE KARZINOM IN DER KLINIK	18
1.5	ZIELSETZUNG	19
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>20</b>
2.1	MATERIAL	20
2.1.1	Biologische und chemische Substanzen	20
2.1.2	Lösungen und Puffer	21
2.1.3	Antikörper und Farbstoffe	22
2.1.4	siRNAs und Inhibitoren	22
2.1.5	Software	23
2.1.6	Technisches Equipment	23
2.2	METHODEN	24
2.2.1	Zellkultur	24
2.2.2	siRNA Transfektion	25
2.2.3	Proteinextraktion und Quantifizierung	25
2.2.4	Western Blot	26
2.2.5	Proliferation Assay	26
2.2.6	Bestrahlung	27
2.2.7	Kolonie Assay	27
2.2.8	Plaque-Monolayer Assay	28
2.2.9	Immunfluoreszenz	28
2.2.10	Zellzyklus Assay	30
2.2.11	EdU Assay	30
2.2.12	Statistische Verfahren	30
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>31</b>
3.1	CHARAKTERISIERUNG VON KOLOREKTALEN TUMORLINIEN	31
3.1.1	Transfektionseffizienz mit siARID1B	32
3.1.2	Vergleich von ARID1A wild-typ und ARID1A-mutierten Zelllinien	32
3.2	KLONOGENES ÜBERLEBEN NACH ARID1B-KNOCKDOWN	33
3.3	DNA REPARATUR NACH ARID1B KNOCKDOWN	36
3.3.1	Rad51 Foci nach ARID1B-Knockdown	36

3.3.2	53BP1 Foci nach ARID1B-Knockdown.....	38
3.4	VERÄNDERUNGEN IM ZELLYKLUS NACH ARID1B-KNOCKDOWN .....	39
3.4.1	Zellzyklus nach Bestrahlung von ARID1B-depletierten Zellen.....	40
3.4.2	Messung aktiver S-Phase-Zellen im EdU Assay .....	41
3.5	PROLIFERATION NACH ARID1B-KNOCKDOWN .....	42
3.6	TUMORKONTROLLE NACH ARID1B-KNOCKDOWN .....	44
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>46</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>52</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>53</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>66</b>
7.1	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	66
7.2	TABELLENVERZEICHNIS.....	66
7.3	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	67
7.4	DANKSAGUNG .....	68
7.5	LEBENS LAUF .....	69

# 1 Einleitung

In der Strahlentherapie sind strahleninduzierte DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) die entscheidenden zellulären Schäden, die zum Tod von Tumorzellen führen. Mechanismen zur Reparatur dieser Schäden kommt daher eine zentrale Rolle für Therapiewirksamkeit bzw. Resistenzentwicklung zu. Für die Regulierung und Ermöglichung von DNA-Reparatur sind Struktur und Dynamik von Chromatin äußerst relevant – mutationsbedingte Veränderungen in der Chromatinregulation werden so zu einem interessanten Ziel für einen selektiveren und somit effektiveren Einsatz von Strahlentherapie (Schiaffino-Ortega et al. 2014).

## 1.1 Chromatin

DNA liegt im Zellkern in stark verdichteter Form vor, verpackt mit Histonen als Chromatin genannter Nukleoproteinkomplex. Die zentrale Einheit ist das Nukleosom, aufgebaut aus jeweils zwei der vier zentralen Histone H2A, H2B, H3 und H4, um die ca. 146 Basenpaare (bp) DNA zu einer Oktamer-ähnlichen Scheibe gewickelt sind (Müller and Muir 2015). Diese grundlegende Einheit wiederholt sich vielfach, mit generell 10-50 bp Abstand (Simpson 1978). Das Nukleosom erfüllt drei grundlegende Funktionen – es stellt die erste Stufe der genomischen

Verdichtung dar; es funktioniert als Mittelpunkt für Signalwege Chromatin-assoziiierter regulatorischer Prozesse, und ermöglicht die höhere Organisation zur weiteren Verdichtung des Chromatins (McGinty and Tan 2015).

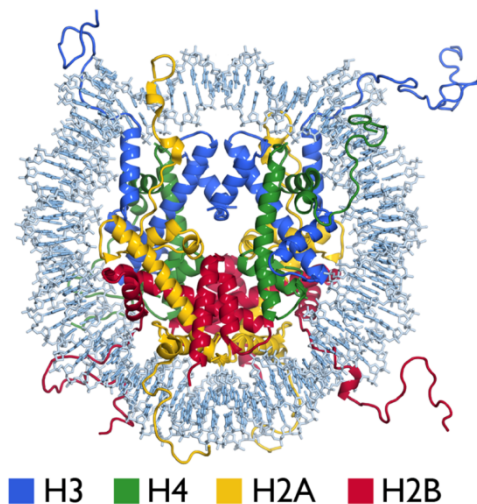


Abbildung 1: Struktur des Nukleosoms. Schematische Darstellung der Organisation eines Nukleosoms mit Dimeren der vier zentralen Histone (farblich gekennzeichnet), um die DNA gewickelt ist. (Bild von McGinty and Tan 2015)

Neben der räumlichen Verdichtung zur Lagerung wird diese Struktur vielfältig beeinflusst und verändert, um zelluläre Prozesse wie Genexpression, Replikati-

on und DNA-Reparatur einzuleiten und zu kontrollieren. Chromatin unterliegt damit einer ständigen Balance zwischen Verdichtung und Zugänglichkeit der DNA für die oben genannten Prozesse, um eine angemessene Reaktion auf die sich ständig verändernde Umgebung der Zelle zu ermöglichen. Auf epigenetischer Ebene wird dieses dynamische Gleichgewicht unter anderem reguliert durch Histon-modifizierende Enzyme und „Chromatin-Remodeller“ (Khorasanzadeh 2004). Letztere sind dabei notwendig, um die Nukleosomstruktur im Sinne kontrollierter Zugänglichkeit der DNA zu beeinflussen, indem Nukleosome bewegt oder Histone verändert werden oder aber DNA lokal abgewickelt wird (Clapier and Cairns 2009).

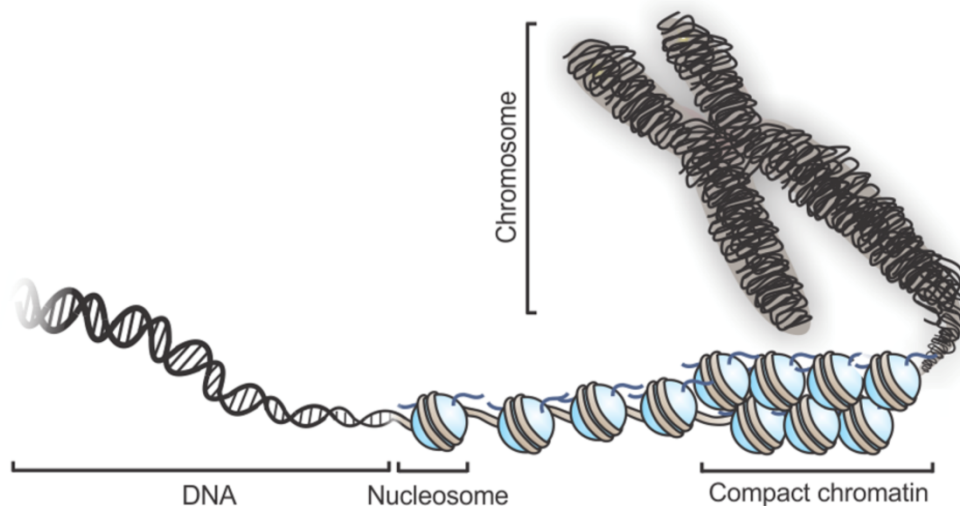


Abbildung 2: Chromatin-Architektur in eukaryotischen Zellen. Schematische Darstellung der genomischen Struktur, mit dem Nucleosom als zentrale, aus Histonen und DNA bestehende Einheit. (Bild von Müller and Muir 2015)

### 1.1.1 Die Bedeutung der Chromatin-Remodeller

In Eukaryoten kommen mindestens fünf Familien wichtiger Chromatin-Remodeller vor: SWI/SNF, ISWI, NURD/Mi-2/CHD, INO80 und SWR1 (Clapier and Cairns 2009). Die Remodelling-Komplexe sind aus spezifischen Untereinheiten aufgebaut, teilen sich aber einige grundlegende Gemeinsamkeiten. So bestehen alle aus einer ähnlichen ATPase-Untereinheit, die DNA-Histon-

Kontakte aufbricht, regulatorischen Untereinheiten mit DNA- und Histon-bindenden Domänen und aus Proteinen/Domänen zur Interaktion mit Chromatin und Transkriptionsfaktoren. Insgesamt entsteht so ein Komplex, der Nukleosome spezifisch erkennen und verändern kann (Saha, Wittmeyer, and Cairns 2006).

Dennoch sind die einzelnen Remodeller-Familien für unterschiedliche Aufgaben und Funktionen spezialisiert und zeichnen sich durch spezifische Unterschiede und Erkennungsmerkmale aus. In dieser Arbeit wird besonders auf den SWI/SNF-Komplex Bezug genommen, der mit vielfältigen zellulären Prozessen assoziiert wird.

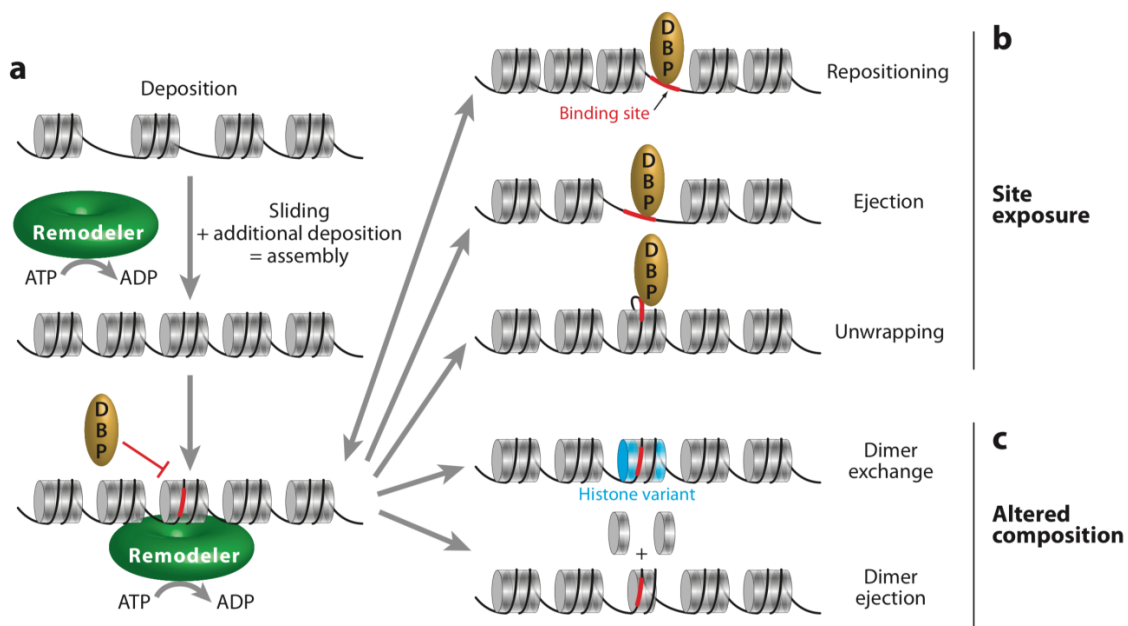


Abbildung 3: Die verschiedenen Folgen von Chromatin-Remodelling. (a) Durch Bewegung von Histon-Oktameren schaffen Chromatin-Remodelling-Komplexe Raum für weitere Anlagerung von Nucleosomen. ATP-abhängige Aktivität der Chromatin-Remodeller kann außerdem zu weiteren, regulatorisch bedeutenden Veränderungen in der Chromatinstruktur führen: (b) Freilegung der Bindestelle eines DNA-bindenden Proteins (DBP) durch Bewegung oder Entfernung von Nucleosomen, oder lokales Abwickeln der DNA, oder (c) Veränderter Aufbau des Nucleosoms durch Veränderung oder Entfernung von Histon-Dimeren.



## 1.2 Der SWI/SNF Komplex

Chromatin-Remodelling-Komplexe der SWI/SNF-Familie führen ATP-abhängige Umwandlungen der Nukleosomstruktur durch. Ursprünglich beschrieben in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, sind Aufbau und Funktion heute auch in menschlichen Zellen in großem Detail bekannt (Stern, Jensen, and Herskowitz 1984; Neigeborn and Carlson 1984; Phelan et al. 1999). Diese Komplexe bestehen aus ca. 15 Untereinheiten, insbesondere den homolog exklusiven katalytischen Untereinheiten. Neben weiteren Kern- und akzessorischen Untereinheiten ist für diese Arbeit besonders das regulatorische, homolog exklusive Paar ARID1A/ARID1B von Interesse. Zusammen kann so die Chromatinstruktur verändert werden, um DNA-bindenden Proteinen Zugang zu verschaffen und somit essentielle zelluläre Prozesse wie DNA-Replikation, Genexpression und DNA-Reparatur zu regulieren (De La Serna, Ohkawa, and Imbalzano 2006; Wilson and Roberts 2011). Rund um die Zielsequenz wird eine lockere, offene Chromatin-Architektur realisiert, welche die oben genannten Prozesse ermöglicht und somit entscheidend reguliert.

### 1.2.1 ARID1A und ARID1B

ARID1A und ARID1B sind zwei Varianten der regulatorischen ARID (AT-rich interactive domain) Untereinheit im SWI/SNF-Komplex. Sie sind strukturell zu 60% gleich und haben als wichtigstes funktionelles Merkmal eine DNA-bindende Domäne. In den meisten Zellen liegen beide Proteine als Alternativen vor (im Gegensatz zu gewebespezifischen Varianten), wobei sie innerhalb der einzelnen SWI/SNF-Komplexe gegenseitig exklusiv vorhanden sind. ARID1A wird generell höher exprimiert als ARID1B, und von beiden ist die Expression über verschiedene Gewebetypen weit verbreitet (X. Wang et al. 2004).

Wie bereits beschrieben, regulieren SWI/SNF-Komplexe durch „Chromatin-Remodelling“ die Zugänglichkeit vieler Zellzyklus-assoziiierter Gene für Transkriptionsfaktoren, können dabei aber sowohl eine positiv als auch negativ regulierende Funktion einnehmen. Die beiden gegenseitig exklusiven Untereinheiten ARID1A und ARID1B sind entscheidend an der Festlegung der spezifischen Rolle als Aktivator oder Repressor der Transkription beteiligt. Einen ers-

ten Hinweis auf die verschiedene Funktionen *in vivo* gaben unterschiedliche Expressionsmuster in der frühen Entwicklung von Primaten (Zheng et al. 2004). Später konnte gezeigt werden, dass ARID1A für den normalen Zellzyklusarrest notwendig ist und dass SWI/SNF-Komplexe mit ARID1A als Ko-Repressor, Komplexe mit ARID1B dagegen als Ko-Aktivator spezifischer Zellzyklus-Gene funktionieren (Nagl et al. 2007, 2005). Auch innerhalb der verschiedenen Zellzyklusphasen zeigen die beiden Untereinheiten verschiedene Expressionsdynamiken (Flores-Alcantar et al. 2011).

### **1.2.2 SWI/SNF-Mutationen in Tumoren**

Die Rolle des SWI/SNF-Komplexes an der Schnittstelle von Genexpression, DNA-Replikation und DNA-Reparatur hat in den letzten Jahren das wissenschaftliche Interesse auf mögliche Verbindungen zu Pathologien, insbesondere Tumorerkrankungen, gelenkt. Besonders die Relevanz von Chromatin-Remodelling für die Reparatur von DSBs unterstreicht die potentielle Bedeutung von SWI/SNF-Mutationen für jegliche DNA-schädigende Therapien. Bemerkenswert ist die extrem hohe Mutationsrate (>20%) verschiedener Untereinheiten in menschlichen Tumoren (Kadoch et al. 2013). Der SWI/SNF-Komplex ist damit der am häufigsten mutierte Chromatin-Remodelling-Komplex, mit einem breiten Mutationsmuster ähnlich den Mutationen von p53.

Entsprechend relevant ist die präklinische Forschung, die therapeutische Ansätze auf Mutationen in SWI/SNF-Untereinheiten zuschneidet (Lu and Allis 2017). Besonders die Untereinheiten ARID1A und ARID1B sind durch ihre bereits beschriebene antagonistische, regulatorische Funktion relevant für die Rolle des SWI/SNF-Komplexes bei der deregulierten Proliferation in vielen Tumoren und für mögliche therapeutische Interventionen. In großangelegten genomischen Studien wurden ARID1A-Mutationen in vielen Tumoren beschrieben (Jones et al. 2011). Im Großteil der Fälle handelt es sich um Mutationen, die zum Verlust der Expression von ARID1A führen (Wiegand et al. 2010). ARID1A wurde daraufhin weiter auf seine Eigenschaften als Tumorsuppressor und potentieller therapeutischer Marker untersucht, jedoch sind zielgerichtete therapeutische Ansätze bei ARID1A-Mutation bisher nicht verfügbar.

### **1.2.3 Inzidenz von ARID1A Mutationen**

Seit 2010 wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen ein gehäuftes Auftreten von ARID1A-Mutationen in verschiedenen Tumortypen beschrieben. Besonders weit verbreitet wurde der Verlust von ARID1A im Ovarialkarzinom (Jones et al. 2010) sowie im Endometrium- und Uteruskarzinom (Wiegand et al. 2010) entdeckt. Auch im Pankreaskarzinom (Shain et al. 2012), Magenkarzinom (K. Wang et al. 2011), hepatozellulärem Karzinom (Guichard et al. 2012), Mammakarzinom (Cornen et al. 2012) und vielen weiteren wurden gehäufte Mutationen von ARID1A beschrieben. Im kolorektalen Karzinom wurde ein Verlust von ARID1A in bis zu 20% der Fälle beschrieben (Jones et al. 2012; Wei et al. 2014). Kolorektale Tumore als Pathologie mit einer hohen Inzidenz bei gleichzeitig hoher Mutationsrate von ARID1A wurden daher in dieser Arbeit als Modell für Untersuchungen zur Behandlung ARID1A-mutierter Tumore verwendet.

### **1.2.4 Prognostische Relevanz von ARID1A und ARID1B**

Aufgrund der hohen Mutationsrate von ARID1A in einer Vielzahl menschlicher Tumore sind mögliche prognostische Rückschlüsse von großer Relevanz für eine effektive Therapieplanung.

Im kolorektalen Karzinom konnte gezeigt werden, dass Mutationen in ARID1A mit einer höheren Rate von entfernten Metastasen und schlechterer pathologischer Differenzierung korrelieren (Wei et al. 2014; Chou et al. 2014). Insgesamt korrelierte ARID1A-Mutation hier aber nicht mit schlechterem Überleben. In einer Studie von 2012 war der Verlust von ARID1A-Expression im hellzelligen Ovarialkarzinom mit kürzerem Überleben von Patienten nach Behandlung mit Platin-basierter Chemotherapie assoziiert (Katagiri et al. 2012). Im Neuroblastom konnte gezeigt werden, dass Mutationen in ARID1A und ARID1B mit schlechteren Überlebenschancen und frühem Therapieversagen korrelieren (Sausen et al. 2013). Auch im Magenkarzinom, Leberkarzinom und Osteosarkom hatten Patienten mit Tumoren mit niedriger ARID1A-Expression signifikant schlechtere Prognosen (Yan et al. 2014; Xu et al. 2017; He et al. 2015).

Für ARID1B dagegen korrelierte im Urothelkarzinom der Harnblase eine hohe Expression mit schlechteren Überlebenschancen, ein weiterer Hinweis auf die antagonistische Funktion der beiden Untereinheiten. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Herunterregulation (knock-down) von ARID1B zu verringerter Proliferation, Migration und Invasion in Zelllinien von Blasenkarzinomen führt (B. Wang et al. 2017).

### **1.2.5 ARID1A – ein Tumorsuppressor?**

Die bereits näher beschriebenen funktionellen Unterschiede von ARID1A und ARID1B implizieren ARID1A als potentiellen Tumorsuppressor. Der prognostische Wert von ARID1A-Mutation unterstreicht diese Klassifikation. Im Mausmodell konnte bereits experimentell gezeigt werden, dass ARID1A im Kolon als Tumorsuppressor agiert (Mathur et al. 2016). Mögliche Mechanismen, durch die die Inaktivierung von ARID1A zur Tumorgenese beiträgt, sind allerdings erst kürzlich weiter beschrieben worden. Funktionell treten dabei Proliferation, Differenzierung, Migration und Invasion als relevante Prozesse hervor (Wu and Roberts 2013; Sun et al. 2017).

Unter Berücksichtigung der hohen Mutationsrate vieler Untereinheiten des SWI/SNF-Komplexes in Tumoren erscheint es wahrscheinlich, dass die tumorsupprimierende Aktivität von ARID1A mit dessen Rolle im Komplex zusammenhängt. Die genauen mechanistischen Zusammenhänge liegen bisher aber weitestgehend im Dunkeln. Sun et al. (2017) beschreiben jedoch auch kontextspezifische onkogene Eigenschaften von ARID1A – so kann Überexpression von ARID1A initial zur Tumorgenese beitragen, während späterer Verlust von ARID1A in etablierten Tumoren Migration und Bildung von Metastasen fördert.

### **1.2.6 Die Rolle von ARID1B in ARID1A-mutierten Tumoren**

Die aufkommende Klassifikation von ARID1A als häufig mutierter Tumorsuppressor fordert therapeutische Ansätze, die ARID1A-Mutation berücksichtigen und mechanistisch ausnutzen. In einer großangelegten genomischen Analyse wurde ARID1B als wichtigstes Gen identifiziert, das für das Überleben von ARID1A-mutierten Tumoren erforderlich ist (Helming et al. 2014). Hier wurde gezeigt, dass der Verlust von ARID1B in ARID1A-mutierten Tumorklinien zu einer Destabilisierung des SWI/SNF-Komplexes und somit zu verminderter Proliferation führt. Helming et al. (2014) argumentieren für ARID1B als therapeutisches Zielmolekül (Target) durch die funktionelle Abhängigkeit bei Verlust von ARID1A.

Zusätzlich wurde beobachtet, dass die Ausschaltung von entweder ARID1A oder ARID1B zu verminderter Reparatur mittels nicht-homologer Reparatur (Non-Homologous End-Joining) und somit zu erhöhter Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung führt (Watanabe et al. 2014). Dies ist ein überzeugendes Argument dafür, die Rolle von ARID1B in ARID1A-mutierten Tumoren weiter zu untersuchen. Funktionell sind dabei besonders Mechanismen zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen von Bedeutung, die im Folgenden beschrieben werden.

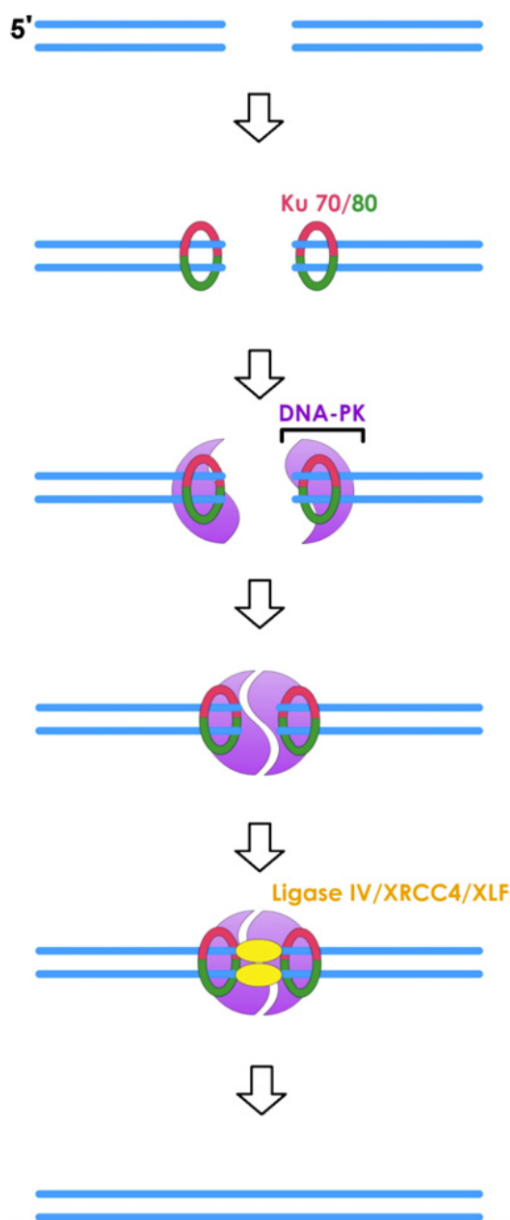
### 1.3 DNA-Schäden und Reparatur

Zellen sind einer Vielzahl von Stressfaktoren ausgesetzt, die zu Schäden in der DNA führen können. Dazu gehören endogene Faktoren wie reaktive Sauerstoffspezies oder Replikationsstress, und exogene Faktoren wie Strahlung, Toxine und chemotherapeutische Wirkstoffe. Von den ausgelösten Schäden haben DNA-Doppelstrangbrüche die toxischsten Effekte und können die chromosomale Integrität und somit die Teilungsfähigkeit entscheidend beeinträchtigen (Mehta and Haber 2014). Werden Doppelstrangbrüche nicht richtig repariert, können sie zu Mutationen und Tumorgenese, zu Apoptose oder zu klonogenem Zelltod führen. Klonogener Zelltod beschreibt den Verlust der Teilungsfähigkeit einer Zelle und trägt gemeinsam mit Apoptose zur Wirksamkeit der Strahlentherapie bei (Hall and Giacca 2006). Weil Bestrahlung eine wichtige Modalität in der Tumorthherapie ist, ist ein tieferes Verständnis der Reparaturmechanismen strahleninduzierter DSBs und davon, wie dieser Prozess in Tumoren verändert ist, von großer Bedeutung.

Die Reparatur von Doppelstrangbrüchen ist ein essentieller Schutzmechanismus, der in Tumorzellen maßgeblich zur Resistenzentwicklung gegenüber Strahlen- und Chemotherapie beiträgt. Die zwei wichtigsten Mechanismen zur Reparatur sind die nicht-homologe Reparatur (Non-Homologous End-Joining, NHEJ) und die homologe Rekombination (HR). Das bisherige Verständnis dieser Reparaturmechanismen legt nahe, dass Veränderungen in der Chromatinstruktur für effektive Reparatur notwendig sind (Jeggo and Downs 2014). Spezifische Unterschiede zwischen diesen beiden Reparaturmechanismen bestehen sowohl in ihrer Verfügbarkeit, als auch in der biologischen Genauigkeit. Über welchen Reparaturmechanismus ein spezifischer DNA-Schaden repariert wird, unterliegt diversen Regulationsmechanismen, deren Zusammenspiel Gegenstand aktueller Forschung und noch nicht abschließend geklärt ist. Neben Zellzyklusposition und Verfügbarkeit homologer DNA-Sequenzen als Vorlage wird dabei unter anderem die Konkurrenz zwischen Ku Proteinen und Rad51 für die Wahl des Reparaturmechanismus diskutiert (Sonoda et al. 2006; Shrivastav, De Haro, and Nickoloff 2008; Takata et al. 1998). Die Rekrutierung von Chromatin-Remodellern wurde außerdem mit der Bevorzugung von HR in Verbindung gebracht (Bennett, Papamichos-Chronakis, and Peterson 2013).

### 1.3.1 Non-Homologous End-Joining

Im NHEJ-Reparaturweg werden DNA-Enden auf beiden Seiten des Doppelstrangbruchs erkannt, beschädigte DNA herausgeschnitten, von einer DNA Polymerase neue DNA synthetisiert und in einem letzten Schritt durch eine Ligase verbunden (Lieber 2010). Entsprechend ist keine homologe Sequenz als Vorlage nötig – DNA-Enden werden einfach und direkt verbunden, wobei Veränderungen in der DNA-Sequenz an der Bruchstelle entstehen können. Die Reparatur über NHEJ ist im Vergleich zu HR also schneller, aber auch anfälliger für Fehler. Im Folgenden wird ein Überblick über die wichtigsten beteiligten Enzyme gegeben. Erkennung der DNA-Enden erfolgt durch Binden des Ku70/ Ku80



Heterodimers, der einen ringähnlichen Komplex mit der DNA bildet (Walker, Corpina, and Goldberg 2001). Die anschließende Rekrutierung von DNA-PKcs ermöglicht die Modifizierung beider DNA-Enden: DNA-PKcs schneidet als Nuklease überhängende Enden beschädigter DNA (Bartlett et al. 2015). Abhängig von der Struktur der DNA-Enden ist vor Ligation zusätzlich ein Auffüllen von Einzelstrang-Überhängen durch DNA-Polymerase  $\mu$  oder  $\lambda$  erforderlich (McElhinny et al. 2005). An die so verarbeiteten Enden bindet anschließend der Ligase IV Komplex, der unter anderem die Cofaktoren XRCC4 und XLF enthält (Ochi, Wu, and Blundell 2014). Rekrutierung des LigaseIV/ XRCC4/XLF Komplexes durch Ku ist entscheidend für erfolgreiche Verbindung der DNA-Enden (Nick McElhinny et al. 2000).

Abbildung 4: Mechanismus der NHEJ-Reparatur. Übersicht über die wichtigsten Schritte im NHEJ-Mechanismus, wie im Text beschrieben (Helleday et al.

2007).

### 1.3.2 Homologe Rekombination

Im Gegensatz zum Non-Homologous End-Joining ist für homologe Rekombination (HR) eine homologe DNA-Sequenz als Vorlage nötig. So wird beschädigte DNA entsprechend der exakten Kopie wiederhergestellt, wodurch Reparatur durch HR sehr präzise und größtenteils fehlerfrei ist (Kowalczykowski 2015). Normalerweise dient das Schwesterchromatid als Vorlage zur Reparatur, was HR auf S- und G2-Phase im Zellzyklus beschränkt, wo ein Schwesterchromatid zur Verfügung steht (Ranjha, Howard, and Cejka 2018).

HR wird durch 5' zu 3' Resektion initiiert, wobei große Enden ssDNA (Einzelstrang-DNA) um den DSB freigelegt werden. Der MRN-Komplex, bestehend aus Mre11, Rad50 und Xrs2, spielt eine entscheidende Rolle in der Initiation der Resektion (Mimitou and Symington 2009; Johzuka and Ogawa 1995) und rekrutiert zusätzliche Resektionsenzyme wie EXO1 und DNA2 (Nimonkar et al. 2011; Nicolette et al. 2010; Zhu et al. 2008). An die so verarbeiteten ssDNA Enden bindet das Replikationsprotein A (RPA). In einem nächsten Schritt wird RPA, vermittelt von Rad52, durch Rad51 ersetzt (Stauffer and Chazin 2004). Rad51 katalysiert die Invasion der beschädigten DNA-Sequenz in die Doppelstrang-DNA der unbeschädigten homologen Vorlage, wodurch ein unbeschädigter Strang verdrängt wird und ein D-Loop entsteht. (Lisby and Rothstein 2016; Baumann and West 1997). Nach DNA-Synthese und Ligation werden die entstandenen Strukturen entsprechend des Holliday-Modells aufgelöst (Christmann et al. 2003; Holliday 1964).

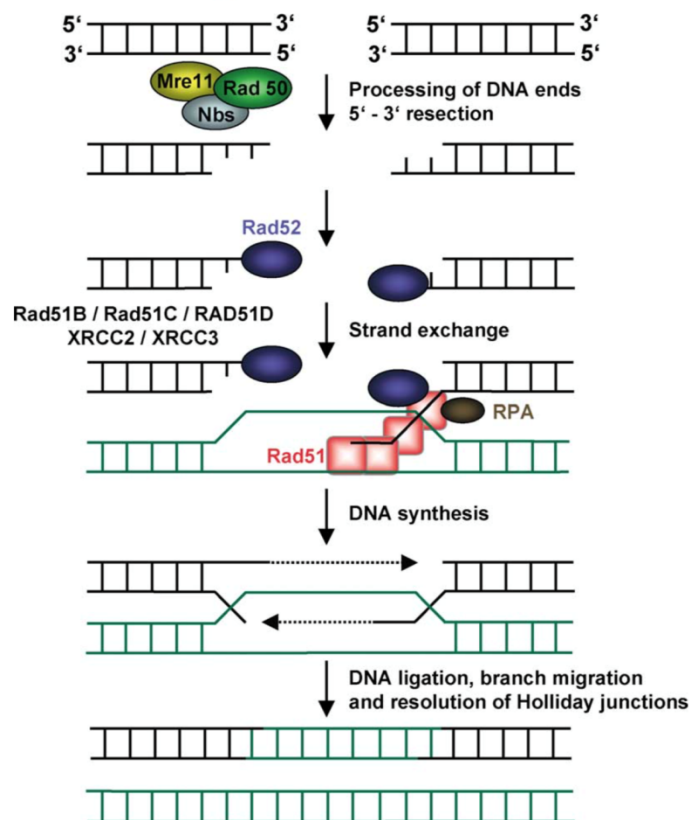


Abbildung 5: Mechanismus der homologen Rekombination. Nach Resektion der DNA-Enden durch den MRN-Komplex katalysiert Rad51 die Invasion der homologen DNA-Sequenz. (Christmann et al. 2003)



### 1.3.3 Der SWI/SNF-Komplex in DNA-Reparatur

Naturgemäß stellt die dichte Kompaktierung des Chromatins ein Hindernis für das Erreichen der Bruchstelle durch Reparaturproteine dar. Modulation der Chromatinstruktur muss demnach ein entscheidender Schritt in der Regulierung von DNA-Reparatur sein; die klassischen Signalwege von NHEJ und HR müssen eng in die Chromatin-Architektur integriert sein (Price and D'Andrea 2013). Während jedoch die Rolle von Chromatin-Remodelling-Komplexen für Transaktion im Detail beschrieben wurde, ist die Bedeutung für Reparatur-Signalkaskaden bisher nur unzureichend verstanden.

Besonders die Reparatur über homologe Rekombination ist auf lange, zugängliche DNA-Sequenzen angewiesen, damit homologe Sequenzen gefunden und gepaart werden können. Entsprechend besteht eine starke Rationale für die Bedeutung von SWI/SNF-Aktivität in der Reparatur von DSBs, und erste Erkenntnisse können hier kurz zusammengefasst werden: Inaktivierung von SWI/SNF-Komplexen führte *in vitro* zu erhöhter Sensitivität gegenüber DNA-Schäden und deutlich verminderter Phosphorylierung von H2AX. Die zentrale Rolle von  $\gamma$ H2AX in effizienter DNA-Reparatur legt nahe, dass SWI/SNF-Komplexe DNA-Reparatur wenigstens teilweise über Interaktion mit  $\gamma$ H2AX beeinflussen (J. H. Park et al. 2006).

Weiterhin konnten Chai et al. zeigen, dass der SWI/SNF-Komplex während Reparatur von Doppelstrangbrüchen mit dem HR-Mechanismus zu der homologen DNA-Sequenz rekrutiert wird. Er war dort relativ früh aktiv, noch vor oder während der Invasion durch die beschädigte DNA-Sequenz (Chai et al. 2005). Auf der anderen Seite wurden SWI/SNF-Untereinheiten auch mit der Rekrutierung von NHEJ-Faktoren in Verbindung gebracht (Ogiwara et al. 2011; Vélez-Cruz et al. 2016). Die genaue Interaktion einzelner SWI/SNF-Untereinheiten mit Reparaturproteinen liegt aber größtenteils noch im Dunkeln.

#### **1.4 Das kolorektale Karzinom in der Klinik**

Kolorektale Tumoren sind ein in der Onkologie äußerst relevantes Krankheitsbild: prozentual an zweiter (Frauen) bzw. dritter (Männer) Stelle aller bösartigen Neuerkrankungen. Trotz leicht abnehmender Inzidenz prognostiziert das Robert-Koch-Institut für 2020 immer noch 58.100 Neuerkrankungen in Deutschland (Barnes et al. 2016). Sowohl in der Strahlentherapie, Onkologie als auch chirurgischer Tumortherapie sind kolorektale Tumore also von zentralem Interesse. Bei einem 5-Jahres-Überleben von 63% besteht großer Bedarf für Optimierung der Therapie, insbesondere durch gezielte molekularbiologische Ansätze im Sinne der individualisierten Tumortherapie.

In kolorektalen Tumoren gibt es bisher keine molekularen Marker für das Ansprechen auf Strahlen- oder Chemotherapie. Weitere Forschung ist daher notwendig, um Fortschritte in der personalisierten Medizin auf diesem Gebiet zu erzielen (Labianca et al. 2013; Glimelius et al. 2013). Außerdem sind besonders in der Bestrahlung rektaler Tumore späte Nebenwirkungen bekannt (Birgisson et al. 2007). Die Entwicklung molekularer Marker für Strahlensensitivität sowie Strategien zur Modulation der Strahlenantwort in Tumorzellen können helfen, Strahlentherapie effektiver und in geringerer Dosis einzusetzen. Die in dieser Arbeit beschriebene Schwachstelle bei ARID1A-Mutation ist ein solcher Ansatz.

## 1.5 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollte bestimmt werden, welche Rolle ARID1B für die Radiosensitivität von ARID1A-mutierten kolorektalen Tumorklinien spielt. Dies geschah vor dem Hintergrund, dass ARID1A im kolorektalen Karzinom oft (>20%) mutiert ist. ARID1A-Mutationen wurden außerdem mit späten TNM-Stadien, Fernmetastasen und schlechter Differenzierung assoziiert (Wei et al. 2014). Dennoch gibt es bisher keinen Ansatz, der ARID1A-Mutationen therapeutisch instrumentalisieren kann. Daher ist es klinisch relevant, ARID1B als potentielle Schwachstelle in Tumorklinien mit ARID1A-Mutation zu beurteilen.

Um dies zu erreichen, wurde der Effekt von siRNA-vermitteltem ARID1B-Knockdown auf die Strahlensensitivität von kolorektalen Tumorklinien mit und ohne ARID1A-Mutation bestimmt. Zum besseren Verständnis der molekularen Vorgänge wurde der Effekt auf Signalwege der DSB-Reparatur (NHEJ, HR) und auf Zellzyklusprogression analysiert. Ziel dieser Untersuchungen war es, zu zeigen, dass im Hintergrund von ARID1A-Mutation ARID1B zu einer spezifischen Schwachstelle wird. ARID1B wird so zu einem potentiellen pharmazeutischen Target, durch das in Tumoren mit ARID1A-Mutation die Radiosensitivität erhöht werden kann.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Biologische und chemische Substanzen

Substanz	Produzent
Antibiotic-Antimycotic (100X)	Gibco™
BSA	Calbiochem
Click-iT™ Plus EdU Assay Kit	Invitrogen™
DC Protein Assay Reagent A & B	Bio-Rad
DMSO	Sigma-Aldrich
ECL Prime Blocking Agent	GE Healthcare
EDTA	Sigma-Aldrich
Ethanol	Honeywell
FBS	Gibco™
Fibroblast Basal Medium	ATCC®
Formaldehyd 37%	Roth
HBSS	Gibco™
Immu Mount™	Thermo Scientific™
Kristallviolett	Merck
Lipofectamine® RNAiMAX	Invitrogen™
LowCross Buffer	Candor
MEM	Gibco™
NEAA, Nicht essentielle Aminosäuren	Gibco™
Methanol	J.T.Baker
NuPAGE Transfer Buffer 20x	Invitrogen™
NuPAGE 7% Tris-Acetat Gel 12 Well	Invitrogen™
OptiMEM	Gibco™
PBS (20x)	Gibco™
Phosphatase & Protease Cocktail 100x	Thermo Scientific™
Pierce® RIPA Buffer	Thermo Scientific™
Roti®-Histofix 4%	Roth
RPMI	Gibco™

Super Signal Stable Peroxide Puffer	Thermo Scientific™
Super Signal Luminol/ Enhancer Solution	Thermo Scientific™
Tris-Acetat SDS Running Buffer 20x	Invitrogen™
Triton 100	Sigma-Aldrich
Trypan Blue Stain 0,4%	Logos Biosystems
0,05 % Trypsin-EDTA	Gibco™
Tween20	Sigma-Aldrich

Tabelle 1: Biologische und chemische Substanzen

### 2.1.2 Lösungen und Puffer

<b>Kristallviolett</b>	3,75g Kristallviolett 1,75g NaCl 162,5ml Ethanol 43,2ml Formaldehyd 37% ad 500ml dH <sub>2</sub> O
<b>P1 Puffer</b> (Permeabilisierung)	100mM Tris-Cl pH 7,4 50nM EDTA 0,5% Triton 100
<b>Block Puffer (IF)</b>	3% BSA 7,7 mM NaN <sub>3</sub> 4x SSC 0,1% Tween20 in dH <sub>2</sub> O
<b>Block Puffer (WB)</b>	5 % ECL Prime Blocking Agent 0,5 % TWEEN20 in TBS
<b>TBS</b>	10mM Tris-Cl pH 7,4 150mM NaCl in dH <sub>2</sub> O

Tabelle 2: Lösungen und Puffer

### 2.1.3 Antikörper und Farbstoffe

Erstantikörper	Produzent	Katalog Nr.	Host	Verdünnung
ARID1B	GeneTex	GTX130708	Mouse	1:500 (WB)
ARID1B	LSBio	LS-C382223	Rabbit	1:500 (WB)
ARID1B	Abcam	Ab57461	Mouse	1:500 (WB)
ARID1A	CellSignalling	12354P	Rabbit	1:1000 (WB)
GAPDH	Abcam	ab8245	Mouse	1:2000 (WB)
$\gamma$ H2A.X	EMD Millipore	05-636	Mouse	1:500 (IF)
Rad51	Calbiochem®	PC130-100UL	Rabbit	1:500 (IF)
53BP1	Abcam	ab21083	Rabbit	1:500 (IF)
Cyclin B1	EMD Millipore	05-373	Mouse	1:500 (IF)

Tabelle 3: Erstantikörper

Zweitantikörper / Farbstoff	Produzent	Katalog Nr.	Host	Verdünnung
Anti-Mouse, Alexa Fluor 488	Invitrogen™	A11029	Goat	1:2000 (WB)
Anti-Mouse, Alexa Fluor 488	Invitrogen™	A11017	Goat	1:500 (IF)
Anti-Mouse, HRP linked	GE Healthcare	NA931V	Sheep	1:10000 (WB)
Anti-Rabbit, HRP linked	GE Healthcare	NA934V	Donkey	1:100000 (WB)
Anti-Rabbit, Cyanine Cy™3	Jackson	111-165-008	Goat	1:500 (IF)
DAPI	Invitrogen™	D1306		1 $\mu$ g/ml (Flow Cytometry) 20 $\mu$ g/ml (IF)

Tabelle 4: Zweitantikörper und Farbstoffe

### 2.1.4 siRNAs und Inhibitoren

	Produzent	ID
siARID1B a	Ambion®	s199170
siARID1B b	Ambion®	s199168
si Negative Control No. 1	Ambion®	Cat# 4390843
VE-821 (ATR Inhibitor)	Selleckchem	S8007

Tabelle 5: siRNAs und Inhibitoren

### 2.1.5 Software

Software	Version	Produzent
Prism	6	Graphpad Software, Inc.
FloMax	2.4	Partec GmbH
Imagelab	4.1	Bio Rad
Multicycle für Windows	3	Washington Universität, USA
Axiovision	8.4.2	Zeiss

Tabelle 6: Software

### 2.1.6 Technisches Equipment

Chemidoc™ MP Imaging System	Bio Rad
<u>Zentrifugen</u>	
Rotina 380R	Hettich
Heraeus Fresco 21	Thermo Scientific
Galaxy Durchflusszytometer	DAKO
<u>Inkubatoren</u>	
Heracell 1501 CO <sub>2</sub> Inkubator	Thermo Scientific
Heraeus CO <sub>2</sub> Inkubator	Thermo Scientific
LUNA™ Automated Cell Counter	Logos Biosystems
Multiskan Ascent 96 Plate Reader	MTX Lab Systems
XStrahl Cabinet Irradiator	XStrahl Life Sciences
ImagerZ1 (Fluoreszenzmikroskop)	Zeiss
Leitz DM IL (Lichtmikroskop)	Leica

Tabelle 7: Technisches Equipment

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die verwendeten Geräte und Materialien wurden vor Benutzung desinfiziert, sterilisiert oder autoklaviert; die Werkbank wurde nach Benutzung mit UV-Licht bestrahlt. Als Kulturmedien wurden RPMI, MEM und FBM verwendet (Tabelle 8). RPMI wurde mit 10% FBS und 1% Antibiotic-Antimycotic Lösung verwendet, MEM mit 15% FBS, 1% Antibiotic-Antimycotic Lösung und 1% NEAA, FBM mit Low Serum Additive und 1% Antibiotic-Antimycotic Lösung. Kulturmedien wurden regelmäßig frisch angesetzt und entsprechend der Halbwertszeit der Antibiotic-Antimycotic Lösung maximal 14 Tage verwendet.

Zelllinie	Medium	Gewebe	Pathologie	ARID1A
LS180	MEM	Kolonepithel	Kolorektales Karzinom	-
RKO	MEM	Kolonepithel	Kolorektales Karzinom	-
SW48	MEM	Kolonepithel	Kolorektales Karzinom	-
HCT15	RPMI	Kolonepithel	Kolorektales Karzinom	+
HCT116	RPMI	Kolonepithel	Kolorektales Karzinom	+
Colo320DM	RPMI	Kolonepithel	Kolorektales Karzinom	+
PCS 201-010	FBM	Fibroblast	-	+
PCS 201-012	FBM	Fibroblast	-	+

Tabelle 8: Zelllinien.

Kolorektale Tumorklinien wurden entsprechend beschriebener Mutationen in ARID1A ausgewählt; drei wildtyp Linien und drei mutierte Linien (Mouradov et al. 2014). Das COSMIC Projekt beschreibt heterozygote Frameshift Deletionen von ARID1A in LS180, RKO und SW48.

Die Zelllinien wurden in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und alle drei bis vier Tage passagiert. Um Zellen aus Kultur zu dissoziieren, zu „ernten“, wurde der Protease-Cocktail 0,05% Trypsin-EDTA verwendet. Dazu wurde das Medium entnommen, mit HBSS gewaschen und anschließend für 5min mit 0,05% Trypsin-EDTA inkubiert. Nach mikroskopischer Kontrolle der Zelldissoziation wurde Trypsin durch Hinzugeben von Medium inhibiert. Für ei-



ne 1:4 Passage wurde 25% der so hergestellten Zellsuspension in die Flasche zurückgegeben und mit 10ml frischem Medium weiter inkubiert. Zur Einsaat für weiterführende Experimente wurden Zellen nach dem gleichen Protokoll geerntet, und die Zellsuspension 5min bei 300 rpm zentrifugiert. Der Überstand aus Medium und Trypsin-Resten wurde verworfen und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit dem LUNA™ Automated Cell Counter bestimmt. Dazu wurden 15 µl der Zellsuspension mit 15 µl Trypan Blue Stain 0,4% gemischt, in LUNA counting slides pipettiert, und entsprechend den Angaben des Herstellers ausgewertet.

### **2.2.2 siRNA Transfektion**

Zur Herunterregulierung von ARID1B wurde eine transiente Transfektion mit Lipofectamine und siRNA durchgeführt. Zellen wurden in 6-Kammer-Platten ausgesät, sodass nach 24 Stunden eine Zelldichte von 70-80% Konfluenz im Monolayer erreicht war.

Die Zellen wurden dann in HBSS und OptiMEM gewaschen, und für vier Stunden in Transfektionslösung inkubiert. Als Transfektionslösung wurde pro Kammer 500 µl OptiMEM mit 80 nM siRNA und 6 µl Lipofectamine RNAiMAX gemischt und 20 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Für ARID1B wurde die Kombination aus zwei siRNAs zu je 40 nM für eine optimale Transfektionseffizienz etabliert. Als Kontrollen wurde negative siRNA und H<sub>2</sub>O verwendet. Nach 4 Stunden wurde pro Kammer 500 µl Medium mit der doppelten normalen Menge FBS dazugegeben, und die Zellen nach 48-72 Stunden Inkubation für weiterführende Experimente geerntet.

### **2.2.3 Proteinextraktion und Quantifizierung**

Die Zellsuspension wurde 5 min bei 300 rpm zentrifugiert. Dann wurde das Zellpellet in 100 µl RIPA Puffer mit 1x Phosphatase-Protease Cocktail resuspendiert und 15 min bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Zellsuspension wurde 20 min bei 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und bei -20°C gelagert. Zur Bestimmung des Proteingehalts wurden das Bio-Rad Protein Assay Kit entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Im Mul-

tiskan Ascent 96 Plate Reader wurde die optische Absorption bei 750 nm gemessen und anhand einer Eichkurve der Proteingehalt bestimmt. Jede Probe wurde in Duplikaten gemessen und der Mittelwert errechnet.

### **2.2.4 Western Blot**

Aus Proteinextrakten wurde 60 µg Protein mit 5 µl LDS Sample Buffer und H<sub>2</sub>O auf eine Probengröße von 20 µl gemischt. Die Proben wurden 5 min bei 95°C gekocht, zentrifugiert, und in 7% Tris-Acetat 12-Kammer Gel (Invitrogen) aufgetragen. Die Gelelektrophorese lief mit SDS Tris-Acetat Running Buffer 70 min bei 160 V. Die so getrennten Proteine wurden mit 1x NuPAGE Transfer Buffer mit 10% Methanol vom Gel auf eine PDFV Membran transferiert. Der Transfer lief eine Stunde bei 60 V. Für den Transfer wurde die Membran zuerst 30 sec in Methanol inkubiert.

Danach wurde die Membran 45 min mit Block Puffer (2.1.2) bei RT inkubiert, und mit dem entsprechenden Erstantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Alle verwendeten Erstantikörper wurden entsprechend den angegebenen Konzentrationen in LowCross Buffer verdünnt. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurde für 90 min mit dem Zweitantikörper inkubiert, verdünnt in TBS mit 20% Block Puffer. Danach wurde wieder dreimal in PBS gewaschen. Als Referenz zu dem nachzuweisenden Protein wurde GAPDH detektiert. HRP-linked Zweitantikörper wurden vor der Detektion 5 min mit Super Signal Stable Peroxide und Luminol/Enhancer Lösung im Verhältnis 1:1 inkubiert. Das Chemidoc™ MP Imaging System mit Chemilumineszenz (für HRP-linked Zweitantikörper) und Fluoreszenz (für A488-Zweitantikörper) wurde zur Detektion verwendet. Quantifizierung der Proteinmengen wurde mit der Imagelab Software von BioRad durchgeführt.

### **2.2.5 Proliferation Assay**

Zellen wurden geerntet und mit 5 ml Medium in 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen (Greiner) eingesät, 0,5 x 10<sup>6</sup> Zellen pro Flasche. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Einsaat wurden die Zellen geerntet und im LUNA Automated Cell Counter (Bioszym) die Zellzahl bestimmt.

### 2.2.6 Bestrahlung

Zellen wurden im „XStrahl Cabinet Irradiator“ mit verschiedenen Dosen Röntgenstrahlung bestrahlt, gemäß dem jeweiligen experimentellen Protokoll. Das Gerät wurde mit einer Leistung von 300 kV und 10 mA betrieben, Zellkulturplatten wurden auf einem Drehteller mit 60 cm Abstand von der Strahlenquelle platziert. Im Zentrum des Drehtellers wurde eine effektive Dosis von etwa 1,15 Gy/min geliefert. Direkt nach der Bestrahlung wurden die Zellen zurück in den CO<sub>2</sub> Inkubator gestellt.

### 2.2.7 Kolonie Assay

Im Kolonie Assay wurde klonogenes Überleben nach Bestrahlung gemessen. Dazu wurden zuvor transfizierte Zellen nach dem unter 2.2.1 beschriebenen Protokoll geerntet und gezählt. Die Zellen wurden in 6-Kammer-Platten (TPP) eingesät und vier Stunden nach Einsaat mit 0, 2, 4, und 6 Gy bestrahlt. Für Fibroblasten wurden 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen statt 6-Kammer-Platten verwendet, um die größeren Kolonien der migrierenden Zellen gut auswerten zu können. Als unbestrahlte Kontrolle wurden 200 Zellen pro Kammer eingesät (für Fibroblasten 1000 pro 25 cm<sup>2</sup> Flasche), für bestrahlte Proben wurde die Zellzahl entsprechend erhöht. Nach 10-16 Tagen Inkubation wurden die Zellen mit Kristallviolett Lösung fixiert und gefärbt. Die Zahl der Kolonien (Mindestgröße 50 Zellen) wurde manuell bestimmt.

Jede Probe wurde in Triplikaten angesetzt und der Mittelwert errechnet. In unbestrahlten Proben ergab sich als Quotient aus eingesäten Zellen und gezählten Kolonien die Platierungs-Effizienz (PE). Für bestrahlte Proben wurde die Überlebensfraktion (Surviving Fraction, SF) als Maß für klonogenes Überleben nach Bestrahlung berechnet (Hall and Giacca 2006).

$$PE = \frac{\text{Kolonien}}{\text{eingesäte Zellen}} \times 100$$

$$SF = \frac{\text{gezählte Kolonien}}{\text{eingesäte Zellen} \times (PE/100)}$$

### **2.2.8 Plaque-Monolayer Assay**

Neben dem Kolonie Assay wurde der Plaque-Monolayer Assay als zweiter Test zur Beurteilung der Radiosensitivität verwendet. Etwa 1500 Zellen wurden in einem 5  $\mu$ l Tropfen ins Zentrum jeder Kammer von 24-Kammer-Platten (Greiner) platziert. Nach 20-30 Minuten Inkubation waren die Zellen adhären und jede Kammer wurde mit 1 ml Medium geflutet. Pro Probe und Behandlung wurden 12-24 Replikate angesetzt. 24 Stunden später wurden die Monolayer mikroskopisch kontrolliert und vermessen. Nur Kammern mit einem definierten Monolayer von bis zu 3 mm Durchmesser wurden in die Bewertung miteingeschlossen. Die so eingesäten Monolayer hatten einen Durchmesser von 2-3 mm und etwa 60-70% der Zellen hatten einen Zell-Zell-Kontakt. Die Proben wurden mit Dosen von 4-24 Gy bestrahlt und sechs Wochen lang inkubiert. Ausgehend von der Vermessung zum Zeitpunkt der Bestrahlung wurde jede Woche die Entwicklung der „Monolayer“ beurteilt und das Medium gewechselt. Als Überlebenskriterium wurde das Erreichen von >50% Konfluenz oder eine zehnfache Zellzahl-Verdopplung gewertet. Ansonsten wurden die Monolayer als geheilt bewertet.

### **2.2.9 Immunfluoreszenz**

Per Immunfluoreszenz wurde die Ansammlung von Rad51 und 53BP1 Proteinen an DNA-Doppelstrangbrüchen als so genannte „Foci“ (Anreicherung von Proteinen) bestimmt. Dazu wurden  $0,03 \times 10^6$  Zellen pro Kammer in 8-Kammer-Objektträger (Falcon) eingesät und 24 Stunden nach Einsaat bestrahlt. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Bestrahlung wurden die Zellen auf dem Objektträger fixiert. Dazu wurden sie 20 min in Roti®-Histofix 4% inkubiert, 15 min in P1 Puffer inkubiert und dann in Blocking Puffer bei 4°C gelagert. Zwischen diesen Schritten wurde jeweils zweimal in PBS gewaschen. Für die Antikörperreaktion wurden die Objektträger dreimal in PBS mit 1% FBS gewaschen und für 90 min mit dem Erstantikörper inkubiert. Danach wurden sie erneut dreimal gewaschen und für 90 min mit dem Zweitantikörper und DAPI inkubiert. Die Antikörper wurden entsprechend den in 2.1.3 angegebenen Konzentrationen in PBS mit 1% BSA und 0,1% Tween20 angesetzt. Nach der Antikörperfärbung wurden die Objektträger gewaschen, getrocknet und Deckgläschen mit Immu

Mount angebracht. Die Präparate wurden am Imager.Z1 Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) ausgewertet. Es wurden nur Foci im Bereich des mit DAPI markierten Zellkerns gezählt. Pro Behandlung wurden 50 Zellen gezählt und der Mittelwert errechnet. Rad51, als Kennzeichen der nur in später S- und G2-Phase aktiven HR Reparatur, sollte gezielt nur in G2-Phase-Zellen ausgewertet werden. Dazu wurde eine Doppelfärbung mit Cyclin B1 durchgeführt. Cyclin B1 wird während G2-Phase und Mitose exprimiert, wobei Zellen in Mitose durch die DAPI-Färbung optisch identifiziert und ausgeschlossen wurden.

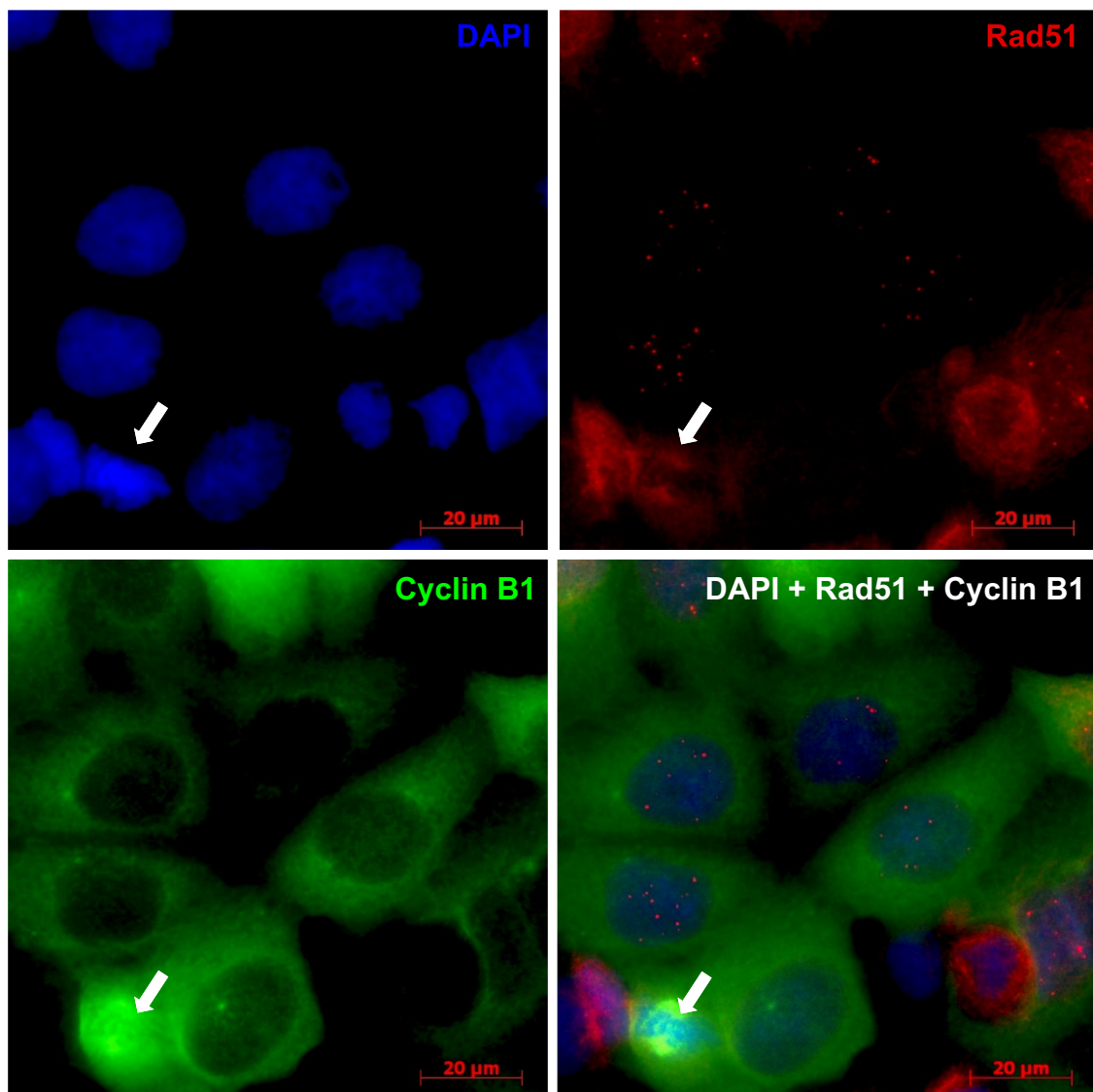


Abbildung 6: Übersichtsaufnahme von Rad51 Foci in G2-Phase-Zellen. HCT15-Zellen wurden mit 4 Gy bestrahlt, 4h nach Bestrahlung fixiert und gefärbt. Rad51 Foci wurden nur in Cyclin B1-positiven G2-Phase-Zellen gezählt. Der Pfeil markiert eine mitotische Zelle: anhand des typischen mitotischen Phänotyps wurden diese Zellen von der Wertung ausgeschlossen.

### **2.2.10 Zellzyklus Assay**

Der Zellzyklus Assay beruht auf der Färbung von DNA mit DAPI, durch die Zellen in unterschiedliche Zellzyklusphasen eingeteilt werden können. Hierzu wurden die Zellen geerntet und mit 5 ml Medium in 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen (Greiner) eingesät, 0,5 x 10<sup>6</sup> Zellen pro Flasche. Die Flaschen wurden 2-4 Stunden nach Einsaat mit 0, 4 und 10 Gy bestrahlt. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Bestrahlung wurden die Zellen geerntet, zentrifugiert und das Pellet in 80% Ethanol fixiert. Zur Färbung wurden die Proben zentrifugiert, in PBS gewaschen und über Nacht in 3 ml TBS mit 1 µg/ml DAPI inkubiert. Die Proben wurden im Durchflusszytometer (DAKO) gemessen und mit Multicycle Software quantifiziert.

### **2.2.11 EdU Assay**

Mit dem EdU Assay wurde DNA-Synthese in Zellen nachgewiesen und so der Anteil an aktiven S-Phase-Zellen erfasst. Der Nachweis beruht auf dem Einbau des Nukleosid-Analogons 5-Ethynyl-2-Desoxyuridin während der DNA-Synthese, das dann mit einem fluoreszierenden Antikörper detektiert werden kann. Zellen wurden geerntet und mit 5 ml Medium in 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen (Greiner) eingesät, 0,5 x 10<sup>6</sup> Zellen pro Flasche. Die Flaschen wurden 2-4 Stunden nach Einsaat mit 0, 4 und 10 Gy bestrahlt und zu den angegebenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit EdU markiert und fixiert. Dazu wurde das Click-iT™ Plus EdU Flow Cytometry Assay Kit entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. EdU wurde in der Konzentration 10µM verwendet. Die Proben wurden im Durchflusszytometer (DAKO) gemessen und mit Multicycle Software analysiert.

### **2.2.12 Statistische Verfahren**

Für statistische Analysen wurde das Programm GraphPad Prism in der Version 6 für Mac verwendet. Die deskriptiven Daten wurden in absoluter und relativer Häufigkeit mittels Mittelwert und Standardabweichung bzw. Standardfehler des Mittelwerts dargestellt. Mittels two-way ANOVA wurde geprüft, ob zwischen verglichenen Gruppen signifikante Unterschiede bestehen. Kurven wurden mittels nichtlinearer Regression modelliert und durch einen F-Test auf signifikante Unterschiede verglichen. P-Werte unter 0,05 wurden als signifikant bewertet.

### 3 Ergebnisse

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche Rolle ARID1B für die Strahlensensitivität von ARID1A-mutierten kolorektalen Tumorkolonien spielt. ARID1B sollte so als potentielles Target für die Behandlung ARID1A-mutierter Tumoren evaluiert werden. Dafür wurde mittels siRNA Transfektion die Expression von ARID1B in ausgewählten kolorektalen Tumorkolonien vermindert und der Effekt auf Strahlensensitivität (Colony Assay), Tumorkontrolle (Plaque-Monolayer Assay), Proliferation, Zellzyklus und DNA-Reparatur-Signale gemessen.

#### 3.1 Charakterisierung von kolorektalen Tumorkolonien

Für Untersuchungen in dieser Arbeit wurden die kolorektalen Tumorkolonien HCT15, HCT116 und Colo320 ohne ARID1A-Mutation, sowie LS180, RKO und SW48 mit ARID1A-Mutation verwendet (Mouradov et al. 2014). In den hier verwendeten mutierten Zelllinien sind in der COSMIC Datenbank Frameshift Mutationen mit Funktionsverlust beschrieben. Expression von ARID1A in den mutierten und wild-typ Linien wurde im Western Blot überprüft. Der verwendete Antikörper bindet etwa in der Mitte der Aminosäuren-Sequenz von ARID1A; bei Verringerung des Signals im Western Blot kann daher vom Verlust eines erheblichen und funktionell essentiellen Teils des Proteins ausgegangen werden.

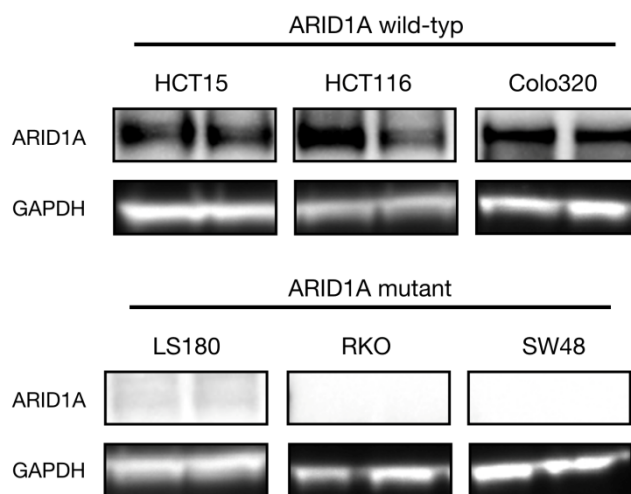


Abbildung 7: Expression von ARID1A in kolorektalen Tumorkolonien.

Gezeigt sind repräsentative Western Blots von ARID1A und GAPDH als interne Kontrolle in den mutierten Zelllinien LS180, RKO und SW48 und den wild-typ Zelllinien HCT15, HCT116 und Colo320. Der verwendete Antikörper von Cell Signaling (#12354) bindet an Glycin1293 von ARID1A, bei einer Gesamtlänge von 2285 Aminosäuren.

### 3.1.1 Transfektionseffizienz mit siARID1B

Um mögliche Effekte von ARID1B-Knockdown auf Strahlensensitivität, Proliferation, DNA-Reparatur und Zellzyklus zu analysieren, wurde die Expression von ARID1B mittels siRNA-Transfektion transient verringert (Abbildung 8a). ARID1B-Expression konnte auf 20-50% im Vergleich zur Kontroll-siRNA reduziert werden (Abbildung 8b). Die Transfektionseffizienz wurde regelmäßig im Western Blot überprüft.

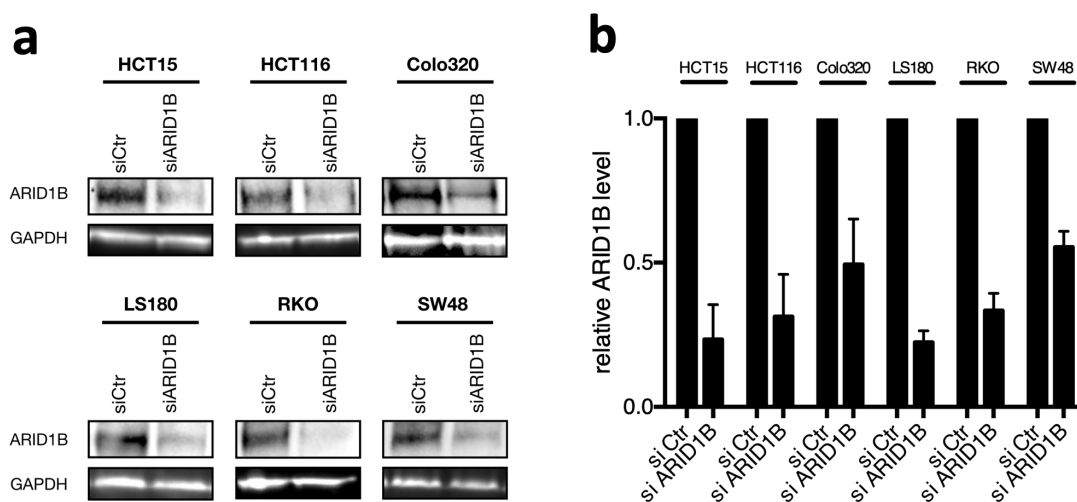


Abbildung 8: ARID1B-Expression nach siRNA-Transfektion.

(a) Repräsentative Western Blots zeigen ARID1B und GAPDH als interne Kontrolle nach siRNA-Transfektion. (b) Verbleibendes ARID1B-Level nach ARID1B-Knockdown relativ zur si-Kontrolle als Mittelwert 3-4 unabhängiger Experimente.

### 3.1.2 Vergleich von ARID1A wild-typ und ARID1A-mutierten Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien wurden hinsichtlich ihrer Strahlensensitivität im Colony Assay charakterisiert. Dazu wurden Zellen mit den angegebenen Dosen Röntgenstrahlung bestrahlt, für 12-16 Tage inkubiert, und die Zahl der gebildeten Kolonien manuell ausgewertet. Das Verhältnis der Platierungs-Effizienz in bestrahlten Proben zur unbestrahlten Kontrolle wurde, als sogenannte Überlebensfraktion, als Maß für Strahlensensitivität verwendet. ARID1A-Mutation korrelierte nicht mit erhöhter Strahlensensitivität (Tabelle 9).



Zelllinie	SF 2 Gy	SF 4 Gy	SF 6 Gy
HCT15 (wt)	0,55 ( $\pm$ 0,13)	0,170 ( $\pm$ 0,044)	0,026 ( $\pm$ 0,009)
HCT116 (wt)	0,30 ( $\pm$ 0,07)	0,052 ( $\pm$ 0,025)	0,006 ( $\pm$ 0,004)
Colo320 (wt)	0,37 ( $\pm$ 0,053)	0,073 ( $\pm$ 0,012)	0,009 ( $\pm$ 0,003)
LS180 (mt)	0,33 ( $\pm$ 0,058)	0,085 ( $\pm$ 0,017)	0,015 ( $\pm$ 0,016)
RKO (mt)	0,38 ( $\pm$ 0,012)	0,080 ( $\pm$ 0,007)	0,013 ( $\pm$ 0,003)
SW48 (mt)	0,25 ( $\pm$ 0,023)	0,029 ( $\pm$ 0,012)	0,003 ( $\pm$ 0,001)

Tabelle 9: Charakterisierung der Zelllinien: Strahlensensitivität.

Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung der Überlebensfraktion normiert auf unbestrahlte Kontrollen aus 5 unabhängigen Ergebnissen.

### 3.2 Klonogenes Überleben nach ARID1B-Knockdown

Die zentrale Hypothese dieser Arbeit ist, dass in ARID1A-mutierten Tumorzellen ARID1B zu einer spezifischen Schwachstelle für die Erhöhung der Strahlensensitivität wird. Dafür wurden mit ARID1A-mutierten und ARID1A wild-typ Zelllinien Kolonie Assays durchgeführt. In Zellen mit ARID1A-Mutation führte ARID1B-Knockdown zu einer signifikanten Verringerung des klonogenen Überlebens (Abbildung 9a). In allen ARID1A-mutierten Zelllinien wurde die Strahlensensitivität im Dosisbereich von 2 bis 6 Gy erhöht. Die Dosis-modifizierenden Faktoren durch ARID1B-Knockdown sind Tabelle 10 gezeigt. Diese Dosis-modifizierenden Faktoren entsprechen einer Reduktion der Überlebensfraktion auf  $87,3\% \pm 2,1\%$  (LS180),  $86,0\% \pm 1,1\%$  (RKO) und  $77,2 \pm 1,5\%$  (SW48) pro 1 Gy im Dosisbereich von 0 bis 6 Gy ( $p < 0,0001$ , F-Test). Im Vergleich dazu hatte ARID1B-Depletion auf die Sensitivität von ARID1A wild-typ Zellen keinen wesentlichen sensitivierenden Effekt (Abbildung 9b). Lediglich in HCT116 führte ARID1B-Knockdown zu einer Reduktion im Überleben mit einem Dosis-modifizierenden Faktor etwa halb so groß wie der Effekt in ARID1A-mutierten Zelllinien. Um mögliche Effekte auf Normalgewebe zu untersuchen, wurden zusätzlich neonatale Fibroblasten (PCS201-010) und adulte Fibroblasten (PCS201-012) verwendet. Auch hier zeigte sich nach ARID1B-Knockdown kei-

ne erhöhte Strahlensensitivität (Abbildung 9c). In ARID1A wild-typ Tumorklinien sowie den Fibroblasten waren die Dosis-modifizierenden Faktoren nach ARID1B-Knockdown signifikant kleiner als in ARID1A-mutierten Linien. Die Spearman Rangkorrelation beschreibt den generellen Zusammenhang zwischen den Variablen Mutationsstatus und Dosis-modifizierendem Faktor und zeigt eine signifikante Korrelation von ARID1A-Mutation und strahlensensitivierendem Effekt nach ARID1B-Knockdown ( $r_s=0,88$ ,  $p=0,02$ ).

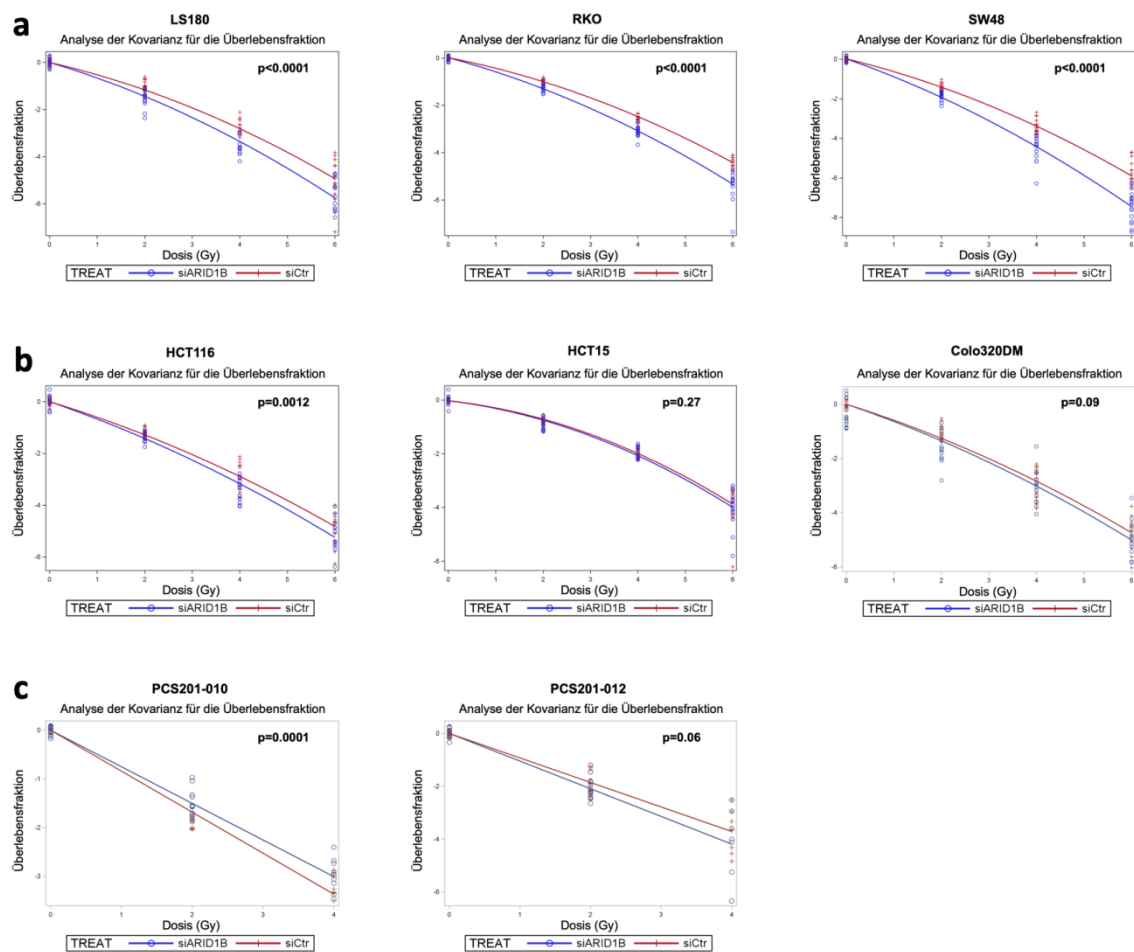


Abbildung 9: Effekt von ARID1B-Knockdown auf klonogenes Überleben.

Depletion von ARID1B verringert die Überlebensfraktion in ARID1A-mutierten kolorektalen Zelllinien nach Bestrahlung (a), aber nicht in ARID1A wild-typ Linien (b) und Fibroblasten (c). Die Überlebenskurven nach ARID1B-Knockdown sind gemeinsam mit der Kontrolle durch nicht-bindende siRNA gezeigt. Überlebensfraktion: natürlicher Logarithmus der auf die nicht-bestrahlten Kontrollen normalisierten Überlebensfraktion von Proben mit si-Kontrolle oder si-ARID1B. P-Werte zeigen die Ergebnisse des ANOVA F-Tests für den Strahlen-modifizierenden Effekt von ARID1B-Knockdown. Ergebnisse von 5 unabhängigen Wiederholungen für Tumorklinien, und 3-4 unabhängigen Wiederholungen für Fibroblasten sind gezeigt.

Zelllinie	Dosis-modifizierender Faktor ( $\alpha_{\text{ARID1B}} - \alpha_{\text{ctr}}$ ) [ $\text{Gy}^{-1}$ ]	p
SW48 (mt)	$-0.259 \pm 0.020$	<0.0001
RKO (mt)	$-0.151 \pm 0.013$	<0.0001
LS180 (mt)	$-0.136 \pm 0.024$	<0.0001
HCT116 (wt)	$-0.070 \pm 0.021$	0.0012
Colo320DM (wt)	$-0.045 \pm 0.026$	0.092
HCT15 (wt)	$-0.020 \pm 0.019$	0.27
PCS201-010	$+0.090 \pm 0.022$	0.0001
PCS201-012	$-0.120 \pm 0.063$	0.06

Tabelle 10: Strahlensensitivierender Effekt von ARID1B-Knockdown.

### **3.3 DNA Reparatur nach ARID1B knockdown**

Um den mechanistischen Hintergrund der Strahlensensitivierung durch ARID1B Knockdown in ARID1A-mutierten Zelllinien zu untersuchen, wurden Marker der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur gemessen. DDR (DNA Damage Repair) ist entscheidend für die Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung verantwortlich. Mögliche Veränderungen in diesen Signalwegen sollten daher als Ursache der erhöhten Sensitivität nach ARID1B-Knockdown evaluiert werden. Dafür wurden transfizierte Zellen bestrahlt und per Immunfluoreszenz Rad51 Foci als Marker der homologen Rekombination (HR), und 53BP1 Foci als Marker für Non-Homologous End-Joining (NHEJ) Reparatur benutzt.

#### **3.3.1 Rad51 Foci nach ARID1B-Knockdown**

Für erfolgreiche homologe Rekombination ist erhebliches Chromatin-Remodelling notwendig; entsprechend vermuteten wir Effekte auf diesen Signalweg durch die von siARID1B ausgelöste Manipulation im SNI/SNF-Komplex. Um Effekte von ARID1B-Knockdown auf homologe Rekombination zu evaluieren, wurden Rad51 Foci als essentielle Marker der HR gemessen. Zellen wurden transfiziert, mit 4 Gy bestrahlt und nach 4 sowie nach 24 Stunden fixiert, um entsprechend initiale und residuale Foci zu untersuchen. Die Zellen wurden mit Cyclin B1 gegengefärbt und Rad 51 Foci nur in Cyclin B1-positiven G2-Phase-Zellen ausgewertet (Abbildung 10a). Die homologe Rekombination überwiegt in der S- und G2-Phase, wo nach DNA-Replikation homologe DNA-Sequenzen zur Verfügung stehen. In allen ARID1A-mutierten Zelllinien ging die Anzahl an Rad51 Foci nach ARID1B-Knockdown 4 Stunden nach Bestrahlung (maximales initiales Level) signifikant zurück, ebenso in der ARID1A-wt Linie HCT116 (Abbildung 10b). Rad51 Foci Bildung in den anderen wild-typ Zelllinien wurde dagegen nicht beeinflusst (Abbildung 10c). Genauso hatte ARID1B-Knockdown auch in den Fibroblasten-Zelllinien keinen Einfluss auf die Bildung von Rad51 Reparatur-Foci (Abbildung 10d). Während Depletion ARID1B in den mutierten Zelllinien zu einer signifikant verringerten Ausbildung von Rad51 Reparatur Foci führte, wurde die Expression von Rad51 nicht direkt beeinflusst (Abbildung 10e).

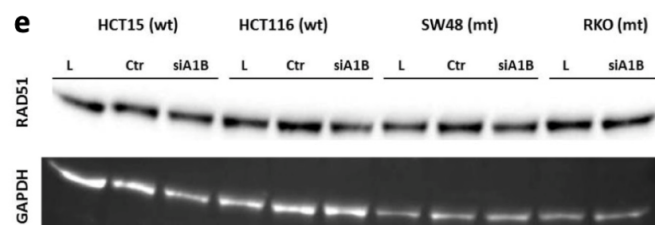
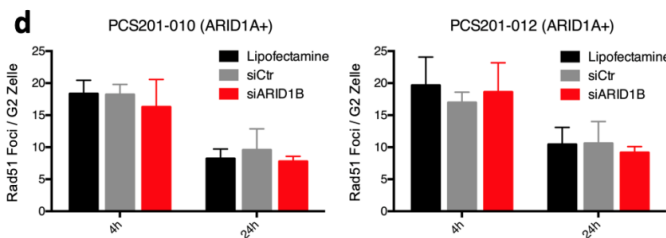
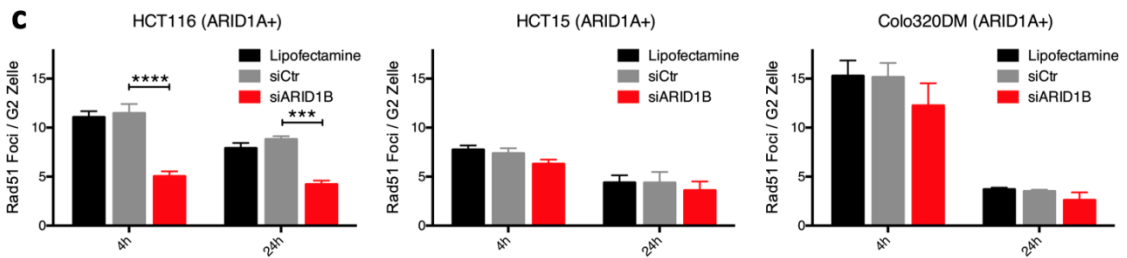
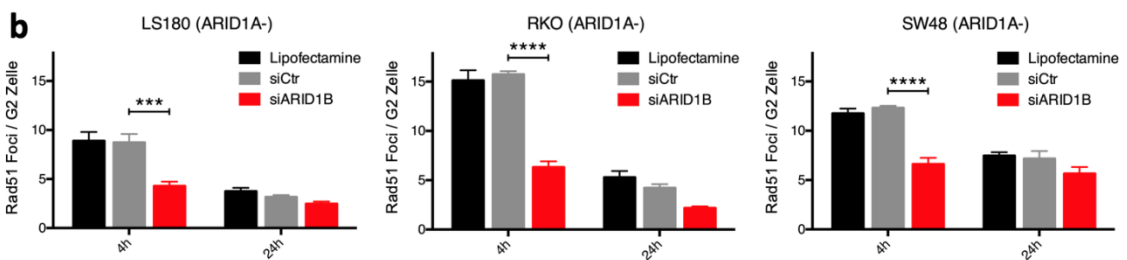
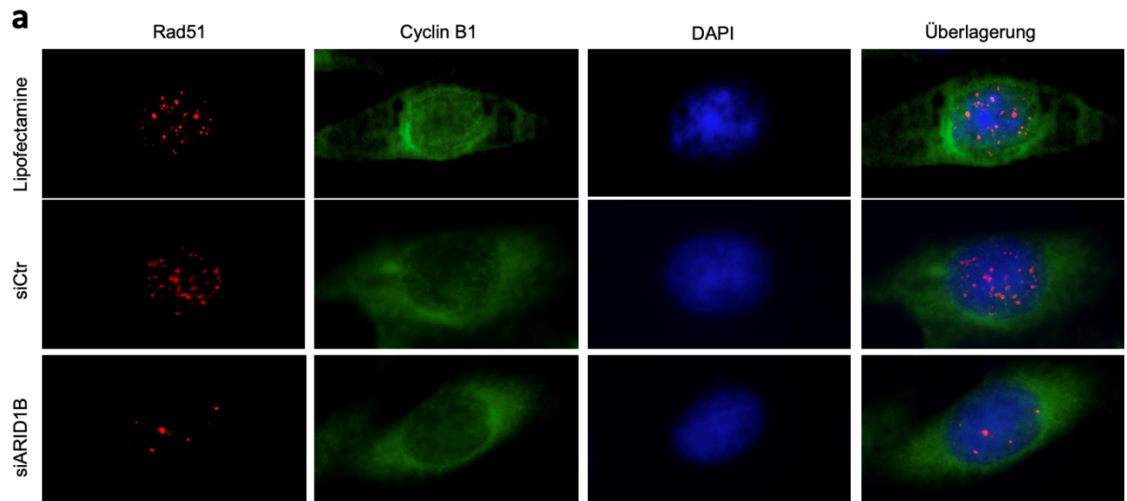


Abbildung 10: Effekt von ARID1B-Knockdown auf Rad51 Foci Bildung.

(a) Repräsentative Immunfluoreszenzbilder von Rad51 Foci in RKO-Zellen (ARID1A mt) 4 Stunden nach Bestrahlung mit 4 Gy. Initiale und residuale Rad51 Foci nach Bestrahlung mit 4 Gy sind als Maß für homologe Rekombination gezeigt in ARID1A-mutierten (b), wildtyp (c) und Fibroblasten-Zelllinien (d). Die Zellen wurden 48 Stunden lang mit der angegebenen siRNA transfiziert, geerntet und für Reparaturexperimente

eingesät. 4 Stunden nach Einsaat wurden die Zellen mit 0 und 4 Gy bestrahlt und zu angegebenen Zeitpunkten nach Bestrahlung fixiert. Die Foci wurden in G2-Phase-Zellen gezählt, nach Immunfärbung auf Rad51 als Marker für HR und Cyclin B1 als Marker für G2-Phase. Mittelwerte und SEM aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten sind gezeigt, mit Sternen als Marker für signifikante Unterschiede zwischen siCtr und siARID1B analysiert im two-way ANOVA:  $p < 0,001$  (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).

### 3.3.2 53BP1 Foci nach ARID1B-Knockdown

Um mögliche Effekte auf den anderen wichtigen DSB-Reparaturweg zu untersuchen, das Non-Homologous End-Joining, wurden zusätzlich 53BP1 Foci als wichtiger Marker des NHEJ-Signalwegs gemessen. Zellen wurden mit 0, 0,5 und 4 Gy bestrahlt und 1, 4 und 24 Stunden nach Bestrahlung fixiert und gefärbt. Sowohl in ARID1A-mutierten als auch in ARID1A wild-typ Zelllinien wurde kein Unterschied in der Anzahl initialer oder residualer 53BP1 Foci nach Depletion von ARID1B gemessen.

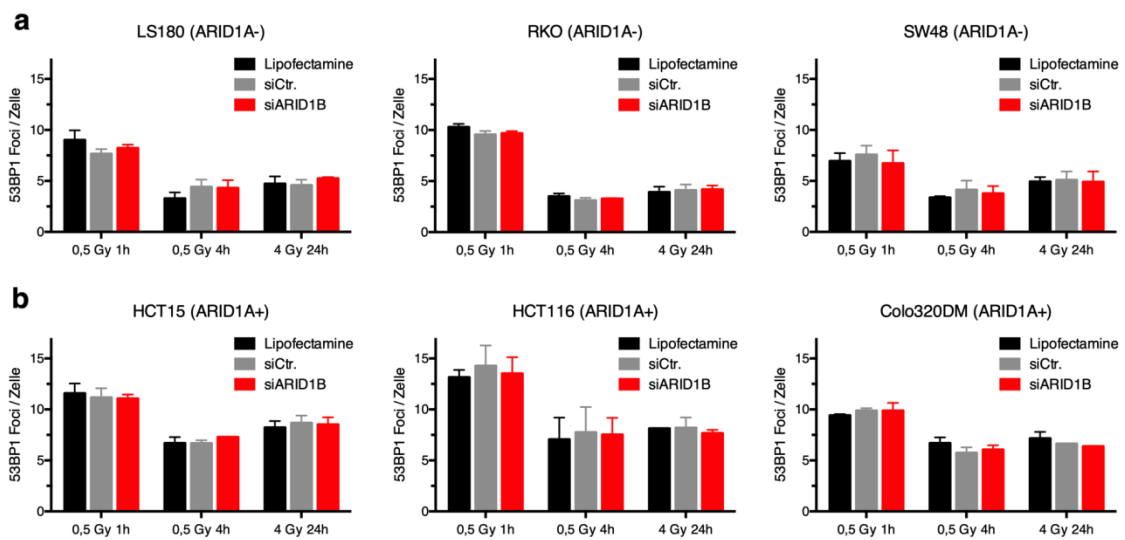


Abbildung 11: Effekt von ARID1B-Knockdown auf 53BP1 Foci Bildung.

Als Maß für NHEJ-Aktivität wurde die Bildung von 53BP1 Foci initial eine Stunde und residual 24 Stunden nach Bestrahlung von ARID1A-mutierten (a) und wild-typ (b) Zelllinien gemessen. Zellen wurden transfiziert, eingesät und 4 Stunden nach Einsaat mit 0, 0,5 und 4 Gy bestrahlt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen fixiert und auf 53BP1 Foci immunfluoreszent gefärbt. Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten mit SEM sind gezeigt.

### 3.4 Veränderungen im Zellzyklus nach ARID1B-Knockdown

Zusätzlich wurden Effekte von ARID1B-Depletion auf Zellzyklusprogression analysiert, um einen möglichen Einfluss der Zellzyklus-Verteilung auf die Strahlensensitivität nach ARID1B-Knockdown auszuschließen. Neben den bereits beschriebenen Veränderungen in der Reparatur von DNA-Schäden sollte so untersucht werden, ob die unterschiedliche Sensitivität in verschiedenen Zellzyklusphasen als weitere Ursache der erhöhten Sensitivierung im Colony Assay eine Rolle spielt. Die Zellzyklusanalyse beruht auf der Färbung von DNA mit DAPI, durch die Zellen in der Durchflusszytometrie entsprechend ihrem DNA-Gehalt in die verschiedenen Zellzyklusphasen eingeteilt werden können. Zellen wurden mit siARID1B und Kontroll-siRNA transfiziert und nach 48 Stunden Inkubation zur Analyse im Durchflusszytometer fixiert und gefärbt. In den untersuchten Zelllinien konnten keine signifikanten Veränderungen nach ARID1B-Knockdown festgestellt werden (Abbildung 12).

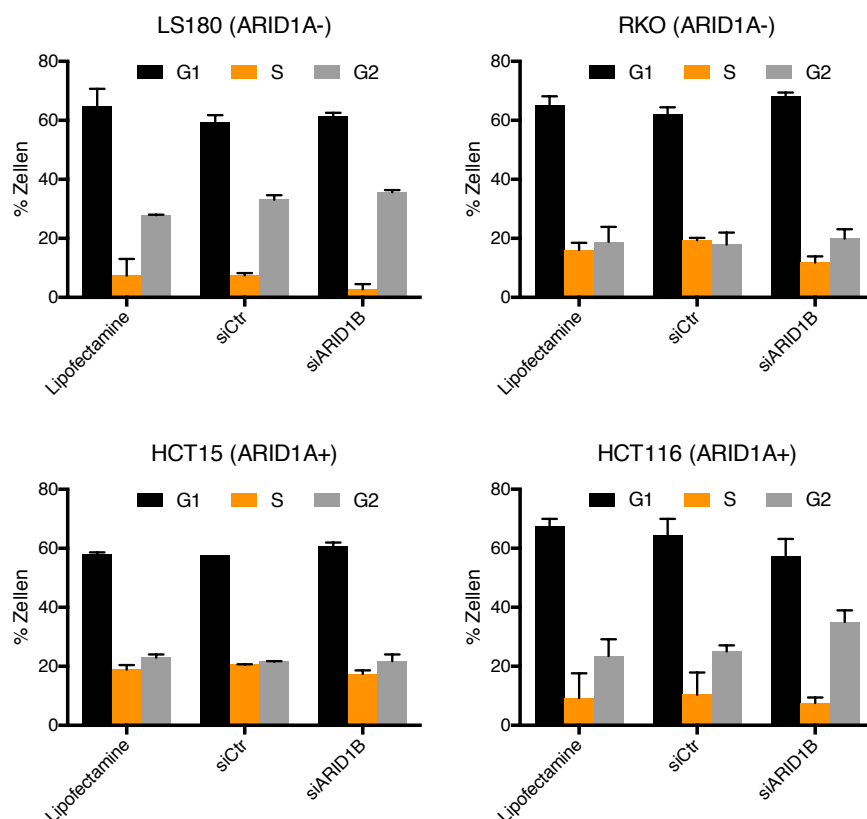


Abbildung 12: Zellzyklus nach Depletion von ARID1B.

Zellen wurden jeweils mit siCtr oder siARID1B transfiziert, nach 48 Stunden Inkubation in 80% Ethanol fixiert und mit DAPI gefärbt. Proben wurden mittels Flowzytometrie analysiert und mit Multicycle Software (DAKO) quantifiziert. Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten sind als Mittelwert und SEM gezeigt.

### 3.4.1 Zellzyklus nach Bestrahlung von ARID1B-depletierten Zellen

Um Veränderungen in der Zellzyklusprogression auch nach Bestrahlung zu evaluieren, wurden transfizierte RKO- und HCT15-Zellen mit 0, 4 und 10 Gy bestrahlt, zu angegebenen Zeitpunkten nach Bestrahlung fixiert und mit DAPI gefärbt. In beiden Zelllinien wurde unabhängig von ARID1B-Knockdown der typische G2-Block nach Bestrahlung sichtbar, besonders deutlich nach Bestrahlung mit 10 Gy. In RKO-Zellen wurde zusätzlich speziell nach ARID1B-Knockdown ein strahleninduzierter G1-Block gemessen. Diese spezifische Veränderung wurde erst 24 Stunden nach Bestrahlung deutlich und war sowohl bei 4 Gy als auch bei 10 Gy stark ausgeprägt. In HCT15-Zellen wurden keine signifikanten Veränderungen durch ARID1B-Knockdown gezeigt.

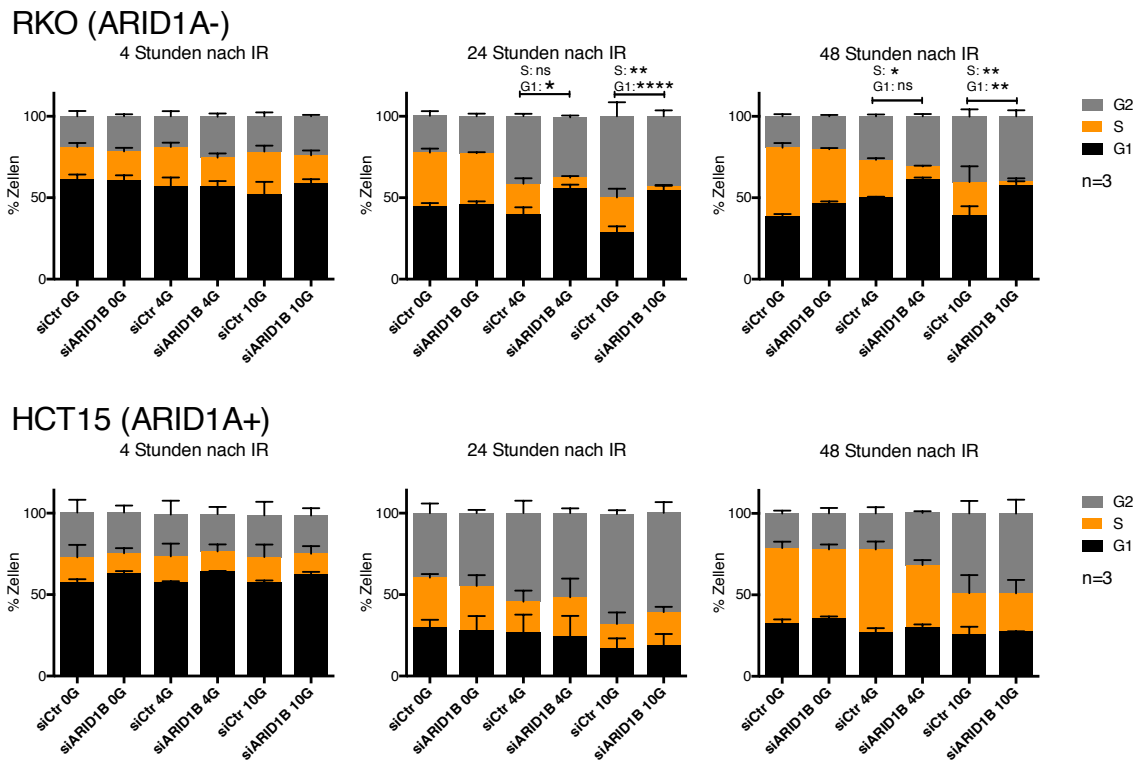


Abbildung 13: Effekt von ARID1B-Knockdown auf Zellzyklus nach Bestrahlung.

RKO- und HCT15-Zellen wurden mit 0, 4 und 10 Gy bestrahlt, zu angegebenen Zeitpunkten nach Bestrahlung fixiert und mit DAPI gefärbt. Proben wurden mittels Durchflusszytometrie gemessen und mit Multicycle Software (DAKO) quantifiziert. 3 unabhängige Experimente sind gezeigt. Fehlerbalken geben Mittelwert und SEM an. Statistische Analyse: 2-way ANOVA,  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) und  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).



### 3.4.2 Messung aktiver S-Phase-Zellen im EdU Assay

Die in der DAPI-Zellzyklusanalyse gezeigten charakteristischen Veränderungen von ARID1B-depletierten RKO-Zellen nach Bestrahlung wurden im EdU Assay weiter charakterisiert und verifiziert. Durch den Einbau des Nukleosid-Analogons EdU wurden dabei Zellen in aktiver DNA-Synthese markiert. Die Daten sind so ein zuverlässiger Indikator für den Anteil an aktiven S-Phase-Zellen.

Die bereits in der DAPI-Analyse gezeigte Verringerung an S-Phase-Zellen in ARID1B-depletierten Zellen 24 Stunden nach Bestrahlung konnte hier bestätigt werden. Zusätzlich wurde auch 4 Stunden nach Bestrahlung ein verminderter Anteil an S-Phase-Zellen gemessen, dieser Effekt war allerdings unabhängig von der Strahlendosis.

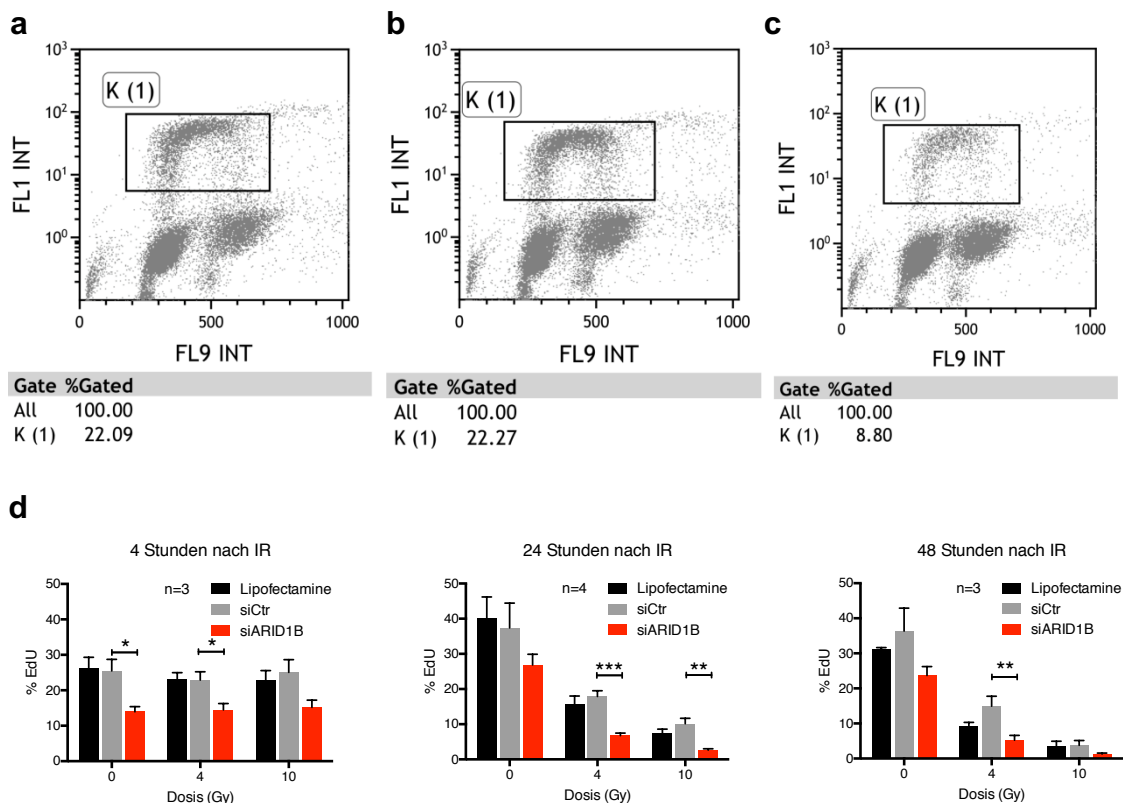


Abbildung 14: Effekt von ARID1B-Knockdown auf EdU-Einbau nach Bestrahlung.

Exponentiell wachsende RKO-Zellen wurden mit 0 Gy, 4 Gy und 10 Gy bestrahlt, zu angegebenen Zeitpunkten nach Bestrahlung für 2h mit EdU inkubiert und fixiert. Proben wurden mit Flowzytometrie analysiert und mit Multicycle Software (DAKO) quantifiziert. Gezeigt sind repräsentative Histogramme der EdU-positiven Fraktion nach Transfektion mit Lipofectaminen (a), siCtr (b), siARID1B (c) und Bestrahlung mit 4 Gy. Zellen wurden 24h nach Bestrahlung fixiert. (d) Repräsentative Daten aus 3-4 unabhängigen Experimenten; Fehlerbalken geben den Mittelwert und SEM an. Statistische Analyse: T-Test mit Holm-Sidak Posttest,  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) und  $p < 0,001$  (\*\*\*)

### 3.5 Proliferation nach ARID1B-Knockdown

Das primäre Ziel dieser Arbeit war es, Effekte von ARID1B-Knockdown auf die Strahlensensitivität zu evaluieren. Zunächst wurden die Effekte auf die Proliferation der Zellen untersucht. Dazu verglichen wir zuerst das kurzfristige proliferative Potential von ARID1A-mutierten und ARID1A wild-typ Zelllinien nach ARID1B-Knockdown. Die Daten der kurzfristigen Proliferations-Tests zeigen, dass die Depletion von ARID1B besonders in ARID1A wild-typ Zellen zu einer verminderten Proliferationsrate führt, während ARID1A-mutierte Zelllinien unbeeinträchtigt blieben (Abbildung 15).

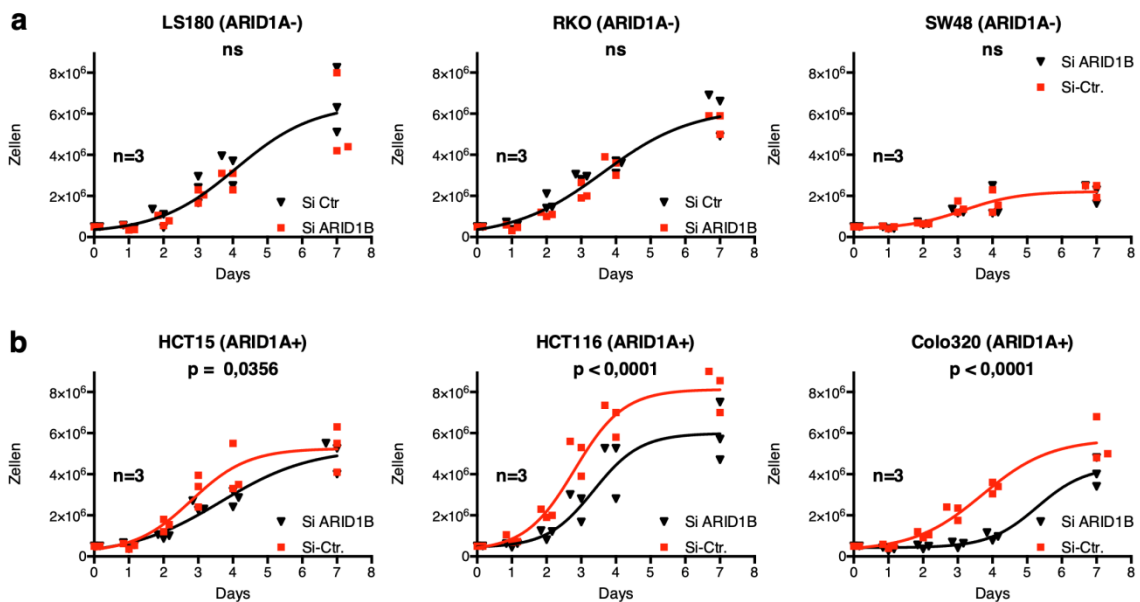


Abbildung 15: Proliferation nach ARID1B-Knockdown.

ARID1B-mutierte (a) und wild-typ (b) Zelllinien wurden mit siARID1B und siControl 48 Stunden lang transfiziert und anschließend geerntet. Etwa  $0,5 \times 10^6$  Zellen wurden in  $25 \text{ cm}^2$  Kulturfalschen eingesät, zu angegebenen Zeitpunkten geerntet und gezählt. Ergebnisse von 3 unabhängigen Ergebnissen sind gezeigt. Statistische Analyse: Nichtlineare Regression mit F-Test, p Werte beschreiben signifikante Unterschiede zwischen siCtr und siARID1B.

Zusätzlich konnte das langfristige Überleben nach Herunterregulation von ARID1B mittels Kolonie-Assay bewertet werden. Die Platierungs-Effizienz, ein Maß für die Fähigkeit zur Koloniebildung und somit für das langfristige proliferative Potential, ging bei fast allen Zelllinien zurück. Besonders betont waren die Effekte in den ARID1A-wt Linien HCT15, HCT116, Colo320 (Abbildung 16).

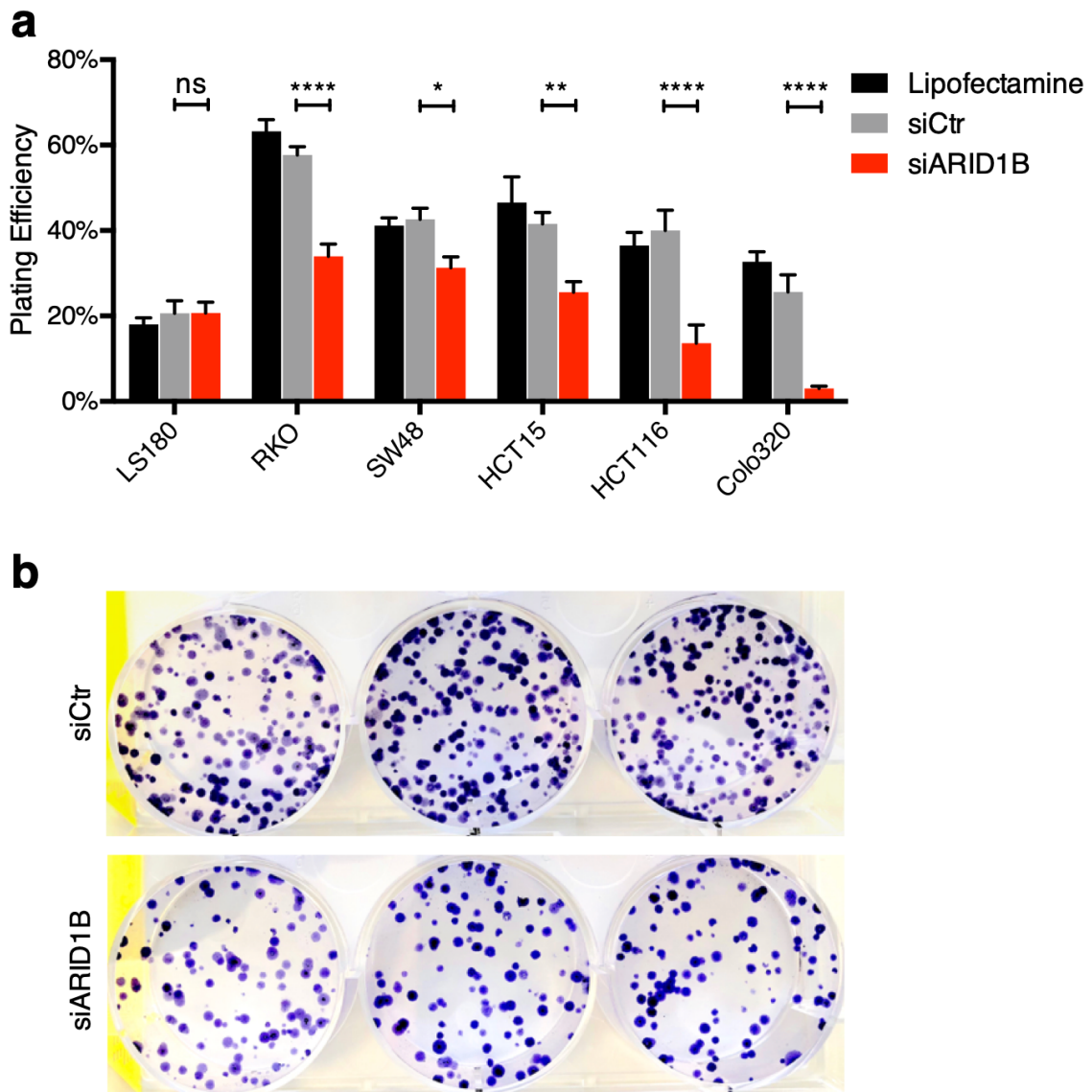


Abbildung 16: Effekt von ARID1B-Knockdown auf die Platierungs-Effizienz.

(a) ARID1A-mutierte und ARID1A wild-type Zelllinien wurden mit siARID1B und siControl transfiziert, geerntet, als Einzelzell-Suspension ausgesät und 12-16 Tage inkubiert. Kolonien wurden mit Kristallviolett gefärbt und manuell ausgezählt. Ergebnisse von 5-6 unabhängigen Ergebnissen sind gezeigt, Fehlerbalken geben den Mittelwert und SEM an. Statistische Analyse: two-way ANOVA,  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) und  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*). (b) Exemplarische Bilder der Koloniebildung von RKO-Zellen.

### **3.6 Tumorkontrolle nach ARID1B-Knockdown**

Um die Effekte auf Strahlensensitivität und Proliferation nach ARID1B-Knockdown weiter zu charakterisieren, wurde der Plaque-Monolayer Assay als in vitro Tumormodell verwendet. Hier wurden durch die Bestrahlung von Plaques bestehend aus ca. 1500 Zellen auch Effekte durch Zell-Zell-Interaktion und Botenstoffe der Tumorumgebung berücksichtigt, sowie der Effekt der Repopulierung nach Bestrahlung (Sak et al. 2012).

In einer ersten Reihe von Experimenten wurden die Plaques mit Einzeldosen bestrahlt und die Tumorentwicklung über 6 Wochen dokumentiert. Als Endpunkt für Proliferation wurde eine zehnfache Zellzahlverdopplung bzw. 50% Konfluenz in der Kammer gewertet, während nicht-proliferierende Tumoren als kontrolliert galten. Die Daten zeigen eine signifikante Sensitivierung nach Depletion von ARID1B, sowohl in getesteten Zelllinien mit, als auch ohne ARID1A-Mutation. Die Strahlungsdosen für die Proliferationskontrolle von 50% aller Zellplaques, auch als „Tumor Control Dose 50 (TCD50)“ bezeichnet, waren in ARID1B-depletierten Zelllinien um 0,5 bis 2,2 Gy niedriger als in den jeweiligen Kontrollen.

Um klinische Bestrahlungsprotokolle realistischer zu simulieren, wurden HCT15- und SW48-Zellen fraktioniert mit 4 Gy pro Tag bestrahlt, mit einer Gesamtdosis zwischen 0 und 28 Gy. Bestrahlung fand bis zur jeweiligen Maximaldosis täglich statt, bei 28 Gy entsprechend 7 Tage in Folge. Ähnlich wie nach der Einzeldosis-Bestrahlung wurde in beiden Zelllinien eine Sensitivierung nach ARID1B-Knockdown gezeigt. In HCT15 wurde die TCD50-Dosis nach fraktioniertem Protokoll um 3,2 Gy verringert, deutlich stärker als nach Einzeldosis-Bestrahlung.

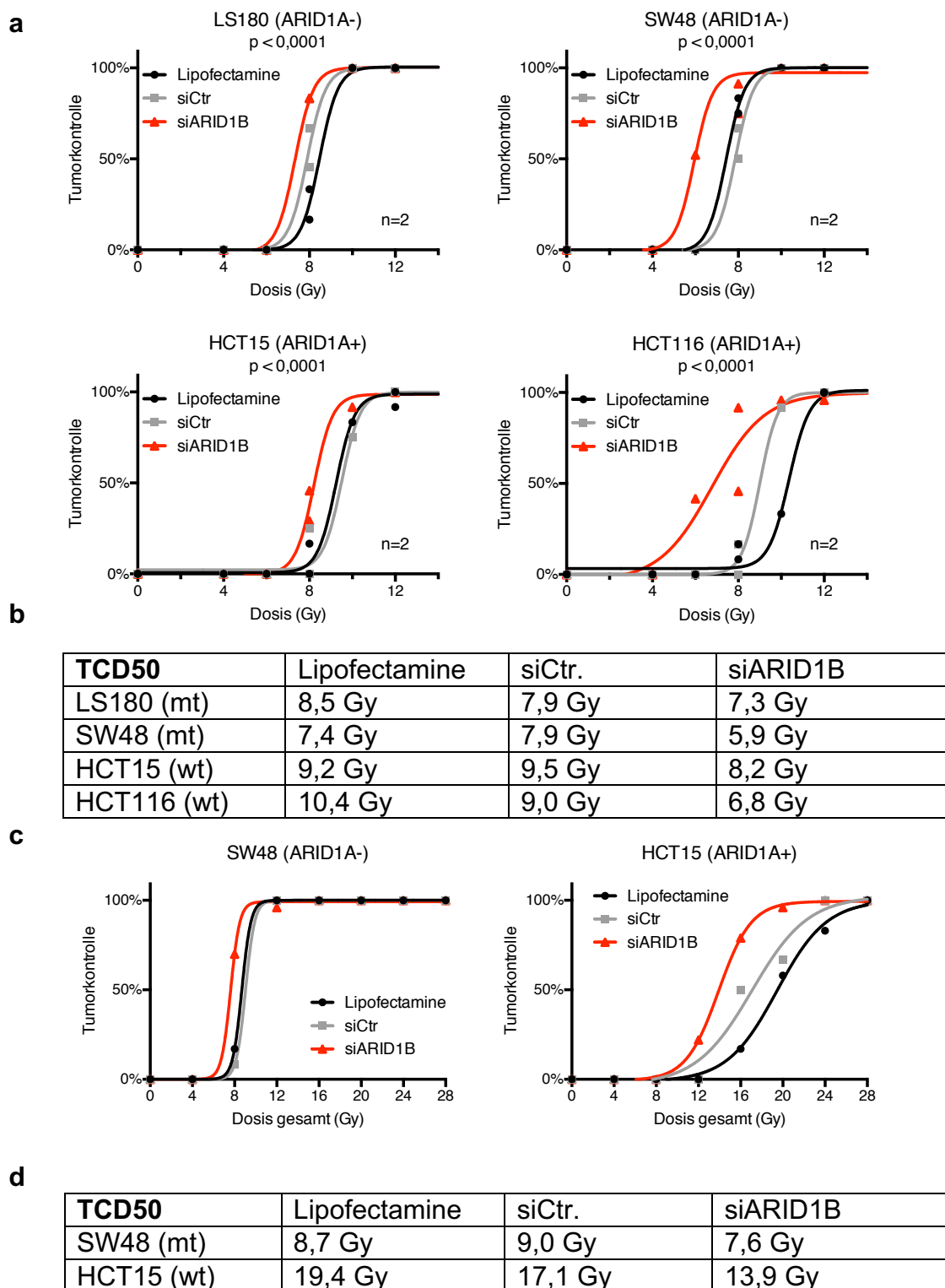


Abbildung 17: Effekt von ARID1B-Knockdown auf Tumorkontrolle nach Bestrahlung. (a) Monolayer aus je 1500 Zellen wurden mit Einzeldosen von 0-24 Gy bestrahlt und über 6 Wochen begutachtet. Pro Dosis und Behandlung wurden 12 Replikate angesetzt. Gezeigt sind Ergebnisse von 2 unabhängigen Experimenten. Statistische Analyse: Nichtlineare Regression mit F-Test, p Werte beschreiben signifikante Unterschiede zwischen siCtr und siARID1B. (b) TCD50 Werte zu Experiment (a). (c) Monolayer wurden mit 4 Gy täglich bestrahlt, mit Gesamtdosen von 0-28 Gy. Pro Dosis und Behandlung wurden 12 Replikate angesetzt, gezeigt sind Ergebnisse von einem Experiment. (d) TCD50 Werte zu Experiment (c).

## 4 Diskussion

Die Forschung der letzten Jahre hat gezeigt, dass Tumor-spezifische Schwachstellen in der zellulären Reparatur von Strahlenschäden großes therapeutisches Potential haben (Yunos et al. 2020; Carrassa and Damia 2017; Morel et al. 2017). Solche Schwachstellen zu identifizieren und zu evaluieren kommt deshalb eine zentrale Rolle in der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze zu. Auch durch Mutationen im SWI/SNF-Komplex, welche die Chromatinstruktur modulieren (J. H. Park et al. 2006; Mohrmann and Verrijzer 2005), entstehen spezifische Veränderungen im Tumor, die solche Angriffspunkte bieten können (Savas and Skardasi 2018; Wilson and Roberts 2011; Schiaffino-Ortega et al. 2014). Durch zielgerichteten Einsatz von auf das Chromatin wirkender Therapie kann so im Kontext dieser spezifischen SWI/SNF-Veränderungen Radiotherapie klinisch wirksamer eingesetzt werden. Im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom wurde bereits beschrieben, dass in BRG1-mutierten NSCLC-Zellen BRM zu einer spezifischen Schwachstelle wird (Zernickel et al. 2018). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob und wie ARID1B als Zielstruktur in kolorektalen Tumoren mit ARID1A-Mutation die Strahlensensitivität beeinflusst.

Unsere Ergebnisse zeigen eine neue Strategie, mit der die Strahlensensitivität von ARID1A-mutierten kolorektalen Tumoren wirksam verbessert werden kann (Niedermaier et al. 2019). Die Daten aus dem Kolonie Assay ergeben, das ARID1B-Knockdown speziell in ARID1A-mutierten Tumorkulturen zu verringertem Überleben nach Bestrahlung führt. Dieser Effekt war unabhängig von Proliferation und Plating-Effizienz der Zellen, was verdeutlicht, wie spezifisch ARID1B-Knockdown auf die Strahlensensitivität wirkt. Im Gegensatz dazu führte ARID1B-Knockdown in Zelllinien ohne ARID1A-Mutation nicht zu Veränderungen der Strahlensensitivität, bis auf eine geringfügige Sensitivierung in HCT116. Die weitere Quantifizierung des sensitivierenden Effekts von ARID1B-Knockdown, als Dosis-modifizierender Faktor, erlaubte einen Vergleich von ARID1A-Mutationsstatus und Sensitivierung. Hier zeigte sich die klare Korrelation von ARID1A-Mutation und Strahlensensitivierung durch ARID1B-Knockdown.

In ARID1A-mutierten CRC-Zelllinien führte ARID1B-Knockdown zu einer deutlichen, dosisabhängigen Strahlensensitivierung, die nicht von anti-proliferativen Effekten abhängig war. Verringerung in Proliferation oder Plating-Effizienz war in diesen Zelllinien gering oder nicht vorhanden, was den spezifischen strahlensensitivierenden Effekt von ARID1B-Knockdown weiter hervorhebt. In der fraktionierten Bestrahlung von kolorektalen Karzinomen könnte dieser strahlensensitivierende Effekt daher auf eine große Wirkung multipliziert werden. Diese Ergebnisse stellen eine sehr präzise und definierte Schwachstelle von Tumoren mit ARID1A-Mutation dar, die aus den vielfältigen Veränderungen durch SWI/SNF-Mutationen heraussticht.

Um die mechanistischen Hintergründe dieses Effekts weiter zu charakterisieren, untersuchten wir, ob ARID1B-Knockdown die Bildung von DSB-Reparatur Foci nach Bestrahlung beeinflusst. Da die Reparatur von Doppelstrangbrüchen wesentlich zur Strahlensensitivität beiträgt und der SWI/SNF-Komplex bereits mit verschiedenen Reparaturmechanismen in Verbindung gebracht wurde (Jeggo and Downs 2014), vermuteten wir hier die mechanistische Grundlage der Sensitivierung durch Depletion von ARID1B. Übereinstimmend mit den Daten aus dem Kolonie-Assay führte Knockdown von ARID1B in allen ARID1A-mutierten Zelllinien zu einer signifikanten Verringerung an initialen Rad51 Foci. Dagegen hatte ARID1B-Knockdown in ARID1A wild-typ Zellen keinen Einfluss auf die Anzahl von Rad51 Foci, außer in HCT116. Genauso wurde die Bildung von Rad51 Foci auch in Fibroblasten, als Modell für Normalgewebe, nicht beeinflusst. Rad51 Foci wurden in allen Zelllinien nur in Cyclin B1-positiven Zellen der G2-Phase ausgewertet – so zeigt dieser Assay besonders spezifisch die Aktivität der homologen Rekombination, die ja erst ab der späten S-Phase möglich ist. Diese deutliche Korrelation von erhöhter Sensitivität und verringerter Bildung von Rad51 Foci nach ARID1B-Knockdown ist ein überzeugendes Argument dafür, dass die Ursache der erhöhten Strahlensensitivität Veränderungen in der homologen Rekombination sind.

Letztendlich ist auch denkbar, dass direkte Interaktionen von SWI/SNF-Untereinheiten mit HR-Enzymen durch ARID1B-Knockdown verändert werden und zur erhöhten Strahlensensitivität in ARID1A-mutierten Zelllinien beitragen.

Jedoch sind diese direkten Interaktionen zwischen dem SWI/SNF-Komplex und DNA-Reparatur-Proteinen bisher größtenteils unbekannt. ARID1A wird von ATR zu DNA-Doppelstrangbrüchen rekrutiert (Bitler et al. 2015). Zusätzlich akkumuliert auch ARID1B an DNA-Doppelstrangbrüchen. Es wurde beschrieben, dass Knockdown von sowohl ARID1A als auch ARID1B zu verminderter Non-Homologous End-Joining Aktivität führt (Watanabe et al. 2014). Obwohl wir in dieser Studie keinen Hinweis auf Veränderungen in der NHEJ-Reparatur als Ursache der erhöhten Strahlensensitivität von ARID1A-mutierten CRC-Zelllinien nach ARID1B-Knockdown finden konnten, schließt das mögliche Effekte auf den NHEJ-Signalweg keinesfalls aus. Insbesondere wurde berichtet, dass in ARID1A-mutierten Tumoren Dann-Doppelstrangbrüche schlechter von 53BP1 erreicht werden können, was zu einem Rückgang der NHEJ-Aktivität führte (Y. Park et al. 2019). Im generellen Vergleich der SF2 Werte als Maß für Strahlensensitivität von ARID1A-mutierten und ARID1A wild-typ Zelllinien sahen wir eine große Überschneidung der zwei Gruppen. Insgesamt muss gesagt werden, dass aus verschiedenen Studien gute Evidenz dafür besteht, das ARID1B-Knockdown sowohl HR- als auch NHEJ-Aktivität beeinflussen kann.

Eine andere denkbare Erklärung für die erhöhte Strahlensensitivität ist die Verschiebung der Zellzyklusverteilung durch ARID1B-Knockdown hin zu sensitiveren Zellzyklusphasen. Die Strahlensensitivität variiert je nach Zellzyklusphase erheblich (Hall and Giacca 2006), jedoch konnten wir in der Zellzyklusanalyse mittels DAPI-Färbung keine Effekte von ARID1B-Knockdown nachweisen. Obwohl die Rolle von ARID1B in der Zellzyklusregulation nicht abschließend geklärt ist, macht das die Zellzyklusverteilung als maßgebliche mechanistische Ursache der Sensitivierung zumindest unwahrscheinlich.

Während die spezifische Strahlensensitivierung nach ARID1B-Knockdown in ARID1A-mutierten Zelllinien kaum mit Effekten auf Proliferation und Plating-Effizienz einherging, führte ARID1B-Knockdown in ARID1A wild-typ Zellen und in Fibroblasten zu einem deutlichen Rückgang der Proliferation ohne DNA-Schaden; hier aber ohne eine dosis-abhängige Sensitivierung. Zu diesen Effekten auf Normalgewebe muss allerdings gesagt werden, dass typische dosis-limitierende Gewebe um den Tumor oft nicht-proliferativ sind, sodass hier



keine entscheidende Einschränkung besteht. Weiterhin sind unsere Daten zu dem anti-proliferativen Effekt von ARID1B-Knockdown in ARID1A wild-typ Zellen übereinstimmend mit den bereits beschriebenen gegensätzlichen Rollen von ARID1A und ARID1B in der Tumorbilogie (Nagl et al. 2007). Entsprechend könnte Knockdown von ARID1B in wild-typ Zellen zu einem Überwiegen der die Proliferation bremsenden Eigenschaften von ARID1A führen, was zur verminderten Proliferation von unbestrahlten ARID1A wild-typ Zellen führt. Dieser Zusammenhang wurde auch von Wang und Kollegen beschrieben, die zeigten, dass Knockdown von ARID1B im ARID1A wild-typ Urothelkarzinom die Proliferationsrate vermindert (B. Wang et al. 2017). Diese These unterstützen klinische Beobachtungen, in denen hohe sowie niedrige Expression von ARID1A in mehreren Tumorarten mit schlechterem klinischen Outcome assoziiert waren (B. Wang et al. 2017; Xu et al. 2017; Shao et al. 2015; Chou et al. 2014; Yan et al. 2014). Im Gegensatz dazu beschrieben Helming und Kollegen (2014) eine synthetische Letalität von ARID1A und ARID1B in manchen ARID1A-mutierten kolorektalen Tumorklinen, aber nicht in allen der Studie. In ausgewählten Zelllinien zeigten sie, dass ARID1B-Knockdown bei ARID1A-Mutation zu verminderter Proliferation führt.

Einen möglichen mechanistischen Hintergrund der verminderten Proliferation nach ARID1B-Knockdown beschrieben Shao und Kollegen (Shao et al. 2015) in Brustkrebs-Zellen. Sie zeigten, dass die Proliferationshemmung nach ARID1B-Knockdown mit einer Verzögerung im Übergang von G1- zur S-Phase einhergeht. Weiterhin wurde in ARID1B-defizienten humanen Fibroblasten eine verzögerte Zellzyklusprogression von G1- zur S-Phase beobachtet (Sim et al. 2014). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen zeigen unsere Daten aus dem EdU Assay, dass in RKO-Zellen der Anteil aktiver S-Phase-Zellen nach ARID1B-Knockdown signifikant verringert ist. Dieser Effekt war mit und ohne Bestrahlung sichtbar. Allerdings war die Proliferation durch Depletion von ARID1B in dieser Zelllinie nicht signifikant verlangsamt, sondern in ARID1A wild-typ Linien HCT15, HCT116 und Colo320DM.

Während wir in diesen Zelllinien in der DAPI-Zellzyklusanalyse keine Effekte durch ARID1B-Knockdown feststellen konnten, können wir anhand dieser Da-

ten einen möglichen mechanistischen Zusammenhang von ARID1B-Knockdown und Zellzyklusprogression nicht ausschließen. Die genauen Mechanismen hier bleiben weitgehend im Dunkeln, und benötigen weitere Experimente zur Aufklärung.

Die Daten aus dem Plaque-Monolayer Assay zeigen weiterhin, dass ARID1B-Knockdown sowohl in ARID1A-mutierten als auch in ARID1A wild-typ Zelllinien die Tumorkontrolle verbessert. Die Bestrahlung der Mini-Monolayer, durch die die klinische Realität realistischer modelliert werden sollte, berücksichtigt neben strahlensensitivierenden Effekten von ARID1B-Knockdown auch Effekte auf Proliferation, Repopulierung und die Reparatur nicht-tödlicher Strahlenschäden (Stuschke et al. 1992). Dieser sensitive Assay zeigt die Wirksamkeit von ARID1B-Knockdown in kolorektalen Tumorkonstruktionen mit und ohne ARID1A-Mutation, wobei die entscheidenden Wirkmechanismen hierbei größtenteils im Dunkeln bleiben und sich eventuell je nach ARID1A-Mutationsstatus deutlich unterscheiden.

In dieser Arbeit zeigen wir, dass ARID1B-Knockdown ARID1A-mutierte kolorektale Tumorkonstruktionen gegenüber ionisierender Strahlung sensitiviert, und zwar unabhängig von einer Hemmung der Proliferation. Diese Sensitivierung ging einher mit einer Verminderung initialer Rad51 Foci, als Anzeichen für reduzierte homologe Rekombination. So wird es möglich, ARID1A-mutierte Tumoren über ARID1B als Angriffspunkt effektiv zu behandeln. Da ARID1B über sein E3 Ubiquitin-Ligase aktives Zentrum einen Angriffspunkt für kleinmolekulare Inhibitoren bietet (Li et al. 2010), halten wir die Entwicklung eines solchen zielgerichteten Inhibitors für einen wichtigen nächsten Schritt.

Ähnliche Ansätze, bei denen ARID1A-mutierte Tumoren mit zielgerichteten kleinmolekularen Inhibitoren behandelt werden, wurden bereits demonstriert. So zeigten Bitler und Kollegen, dass die EZH2 Methyltransferase zu einer spezifischen Schwachstelle in ARID1A-mutierten Tumoren wird, über die im Sinne einer synthetischen Letalität mit einem kleinmolekularen Inhibitor das Wachstum signifikant gehemmt werden kann (Bitler et al. 2015). Auch Inhibitoren der DNA-Schaden Checkpoint Kinase ATR wirken speziell in ARID1A-mutierten

Tumoren und bewirken eine signifikante Hemmung der Proliferation (Williamson et al. 2016). Weiterhin wurden auch PARP-Inhibitoren als spezifisch wirksam bei ARID1A-Mangel beschrieben (Shen et al. 2015). Entsprechend dieser Strategien wäre es sinnvoll, ARID1A-mutierte Tumoren gezielt mit einem ARID1B-Inhibitor zu behandeln, um über eine Verminderung der homologen Rekombination die Strahlensensitivität zu verbessern. Während die oben beschriebenen Arbeiten mögliche Ansätze vorstellen, um das Wachstum von ARID1A-mutierten Tumoren durch zielgerichtete kleinmolekulare Inhibitoren zu hemmen, zeigt diese Arbeit unseres Wissens nach zum ersten Mal, dass der ARID1A-Mangel therapeutisch für die Verbesserung der Strahlensensitivität genutzt werden kann.

Zusammenfassend zeigt diese Studie, dass in ARID1A-mutierten kolorektalen Tumorklinen durch ARID1B-Knockdown gezielt die Strahlensensitivität verbessert werden kann. Diese Ergebnisse stellen ARID1B als neues therapeutisches Target vor, um die Strahlensensitivität von ARID1A-mutierten Tumoren zu verbessern.

## 5 Zusammenfassung

Verlust der Switch/Sucrose Non-Fermentable (SWI/SNF) Untereinheit AT-Rich Interaction Domain 1A (ARID1A) ist im kolorektalen Karzinom eine der häufigsten Mutationen und ist mit späten Tumorstadien, Fernmetastasen und schlechter Differenzierung assoziiert. Die Identifikation von Tumor-spezifischen Schwachstellen im Kontext von solchen SWI/SNF-Mutationen kann von großer klinischer Relevanz sein und neue therapeutische Ansätze begründen, was für andere Untereinheiten bereits gezeigt wurde. Vor diesem Hintergrund sollte in der vorliegenden Arbeit evaluiert werden, ob man AT-Rich Interaction Domain 1B (ARID1B) als potentielle Schwachstelle in ARID1A-mutierten Tumoren benutzen kann, um gezielt die Strahlensensitivität zu verbessern.

Um den Effekt von ARID1B-Knockdown zu untersuchen, wurde mit kolorektalen Tumorkulturen mit wild-typ ARID1A und mit ARID1A-Mutation gearbeitet. Die Daten aus dem Kolonie Assay zeigen, dass ARID1B-Knockdown spezifisch in ARID1A-mutierten kolorektalen Tumorkulturen zu verringertem Überleben nach Bestrahlung führt. In ARID1A wild-typ Tumorkulturen und in Fibroblasten als Modell für Normalgewebe wurde die Strahlensensitivität nicht beeinflusst. Diese Ergebnisse beschreiben einen klar definierten Effekt auf die Strahlensensitivität, der unabhängig von proliferationshemmenden Effekten ist. Um mögliche mechanistische Ursachen der ARID1B-abhängigen Sensitivierung von ARID1A-mutierten Zelllinien zu untersuchen, wurden Doppelstrangbruch-Reparatursignale und Zellzykluseffekte untersucht. Übereinstimmend mit den Ergebnissen des Kolonie Assay zeigen die Daten aus der Immunfluoreszenz in ARID1A-mutierten Zelllinien einen deutlichen Rückgang an initialen Rad51 Foci nach Bestrahlung. Dies interpretieren wir als verminderte Aktivität der HR-Reparatur als Folge von ARID1B-Knockdown in ARID1A-mutierten Zelllinien.

Diese Ergebnisse zeigen, dass im Kontext von ARID1A-Mutation ARID1B zu einer spezifischen Schwachstelle wird. Dieser neue therapeutische Ansatz hat das Potential, klinisch bedeutsam zu werden und in ARID1A-mutierten Tumoren einen effektiveren Einsatz von Strahlentherapie durch Kombination mit auf ARID1B gezielter Therapie zu ermöglichen.

## 6 Literaturverzeichnis

- 1) Barnes, Benjamin, Joachim Bertz, Nina Buttmann-Schweiger, Julia Fiebig, Susanne Jordan, Klaus Kraywinkel, Hildegard Niemann, Enno Nowossadeck, Christina Poethko-Müller, Franziska Prütz, Petra Rattay, Ina Schönfeld, Anne Starker, Antje Wienecke, Ute Wolf 2016. "Bericht Zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016." *Bericht Zum Krebsgeschehen in Deutschland*, 16–77. <https://doi.org/10.17886/rkipubl-2016-014>.
- 2) Bartlett, Edward J., Nigel C. Brissett, Przemyslaw Plocinski, Tom Carlberg, and Aidan J. Doherty. 2015. "Molecular Basis for DNA Strand Displacement by NHEJ Repair Polymerases." *Nucleic Acids Research* 44 (5): 2173–86. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv965>.
- 3) Baumann, Peter, and Stephen C. West. 1997. "The Human Rad51 Protein: Polarity of Strand Transfer and Stimulation by HRP-A." *EMBO Journal* 16 (17): 5198–5206. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.17.5198>.
- 4) Bennett, Gwendolyn, Manolis Papamichos-Chronakis, and Craig L. Peterson. 2013. "DNA Repair Choice Defines a Common Pathway for Recruitment of Chromatin Regulators." *Nature Communications* 4 (May): 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms3084>.
- 5) Birgisson, Helgi, Lars Pålman, Ulf Gunnarsson, and Bengt Glimelius. 2007. "Late Adverse Effects of Radiation Therapy for Rectal Cancer - A Systematic Overview." *Acta Oncologica* 46 (4): 504–16. <https://doi.org/10.1080/02841860701348670>.
- 6) Bitler, Benjamin G, Katherine M Aird, Azat Garipov, Hua Li, Michael Amatangelo, Andrew V Kossenkov, David C Schultz, Qin Liu, Ie-Ming Shih, Jose R Conejo-Garcia, David W Speicher & Rugang Zhang. 2015. "Synthetic Lethality by Targeting EZH2 Methyltransferase Activity in ARID1A-Mutated Cancers." *Nature Medicine* 21 (3): 231–38. <https://doi.org/10.1038/nm.3799>.
- 7) Carrassa, Laura, and Giovanna Damia. 2017. "DNA Damage Response Inhibitors: Mechanisms and Potential Applications in Cancer Therapy." *Cancer Treatment Reviews* 60: 139–51.

- <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.08.013>.
- 8) Chai, Bob, Jian Huang, Bradley R Cairns, and Brehon C Laurent. 2005. "Distinct Roles for the RSC and Swi / Snf ATP-Dependent Chromatin Remodelers in DNA Double-Strand Break Repair." *Genes & Development* 19: 1656–61. <https://doi.org/10.1101/gad.1273105>).
  - 9) Chou, Angela, Christopher W. Toon, Adele Clarkson, Loretta Sioson, Michelle Houang, Nicole Watson, Keshani Desilva, and Anthony J. Gill. 2014. "Loss of ARID1A Expression in Colorectal Carcinoma Is Strongly Associated with Mismatch Repair Deficiency." *Human Pathology* 45 (8): 1697–1703. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2014.04.009>.
  - 10) Christmann, Markus, Maja T. Tomicic, Wynand P. Roos, and Bernd Kaina. 2003. "Mechanisms of Human DNA Repair: An Update." *Toxicology* 193 (1–2): 3–34. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(03\)00287-7](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00287-7).
  - 11) Clapier, Cedric R., and Bradley R. Cairns. 2009. "The Biology of Chromatin Remodeling Complexes." *Annual Review of Biochemistry* 78 (1): 273–304. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.062706.153223>.
  - 12) Cornen, S, J Adelaide, F Bertucci, P Finetti, A Guille, D J Birnbaum, D Birnbaum, and M Chaffanet. 2012. "Mutations and Deletions of ARID1A in Breast Tumors." *Oncogene* 31 (January): 4255. <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2011.598>.
  - 13) Flores-Alcantar, Angel, Adriana Gonzalez-Sandoval, Diana Escalante-Alcalde, and Hilda Lomelí. 2011. "Dynamics of Expression of ARID1A and ARID1B Subunits in Mouse Embryos and in Cells during the Cell Cycle." *Cell and Tissue Research* 345 (1): 137–48. <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1182-x>.
  - 14) Glimelius, B., E. Tiret, A. Cervantes, and D. Arnold. 2013. "Rectal Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up." *Annals of Oncology* 24 (SUPPL.6). <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt240>.
  - 15) Guichard, Cécile, Giuliana Amaddeo, Sandrine Imbeaud, Yannick Ladeiro, Laura Pelletier, Ichrafe Ben Maad, Julien Calderaro, Paulette Bioulac-Sage, Mélanie Letexier, Françoise Degos, Bruno Clément,

- Charles Balabaud, Eric Chevet, Alexis Laurent, Gabrielle Couchy, Eric Letouzé, Fabien Calvo & Jessica Zucman-Rossi. 2012. "Integrated Analysis of Somatic Mutations and Focal Copy-Number Changes Identifies Key Genes and Pathways in Hepatocellular Carcinoma." *Nature Genetics* 44 (6): 694–98. <https://doi.org/10.1038/ng.2256>.
- 16) Hall, Eric J., and Amato J. Giacca. 2006. *Radiobiology for the Radiologist*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- 17) He, Fei, Jie Li, JianFeng Xu, Sheng Zhang, YaPing Xu, WenXiu Zhao, ZhenYu Yin, and XiaoMin Wang. 2015. "Decreased Expression of ARID1A Associates with Poor Prognosis and Promotes Metastases of Hepatocellular Carcinoma." *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR* 34: 47. <https://doi.org/10.1186/s13046-015-0164-3>.
- 18) Helleday, Thomas, Justin Lo, Dik C. van Gent, and Bevin P. Engelward. 2007. "DNA Double-Strand Break Repair: From Mechanistic Understanding to Cancer Treatment." *DNA Repair* 6 (7): 923–35. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2007.02.006>.
- 19) Helming, Katherine C, Xiaofeng Wang, Boris G Wilson, Francisca Vazquez, Jeffrey R Haswell, Haley E Manchester, Youngha Kim, Gregory V Kryukov, Mahmoud Ghandi, Andrew J Aguirre, Zainab Jagani, Zhong Wang, Levi A Garraway, William C Hahn & Charles W M Roberts. 2014. "ARID1B Is a Specific Vulnerability in ARID1A-Mutant Cancers." *Nature Medicine* 20 (3): 251–54. <https://doi.org/10.1038/nm.3480>.
- 20) Holliday, Robin. 1964. "A Mechanism for Gene Conversion in Fungi." *Genetical Research* 5 (2): 282–304. <https://doi.org/10.1017/S0016672300001233>.
- 21) Jeggo, Penny A., and Jessica A. Downs. 2014. "Roles of Chromatin Remodellers in DNA Double Strand Break Repair." *Experimental Cell Research* 329 (1): 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.09.023>.
- 22) Johzuka, K., and H. Ogawa. 1995. "Interaction of Mre11 and Rad50: Two Proteins Required for DNA Repair and Meiosis-Specific Double-Strand Break Formation in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Genetics* 139 (4): 1521–32.
- 23) Jones, Siân, Meng Li, D. Williams Parsons, Xiaosong Zhang, Jelle Wesseling, Petra Kristel, Marjanka K. Schmidt, Sanford Markowitz, Hai

- Yan, Darell Bigner, Ralph H. Hruban, James R. Eshleman, Christine A. Iacobuzio-Donahue, Michael Goggins, Anirban Maitra, Sami N. Malek, Steve Powell, Bert Vogelstein, Kenneth W. Kinzler, Victor E. Velculescu, and Nickolas Papadopoulos. 2012. "Somatic Mutations in the Chromatin Remodeling Gene ARID1A Occur in Several Tumor Types." *Human Mutation* 33 (1): 100–103. <https://doi.org/10.1002/humu.21633>.
- 24) Jones, Siân, Tian-Li Wang, Ie-Ming Shih, Tsui-Lien Mao, Kentaro Nakayama, Richard Roden, Ruth Glas, Dennis Slamon, Luis A. Diaz Jr, Bert Vogelstein, Kenneth W. Kinzler, Victor E. Velculescu, and Nickolas Papadopoulos. 2010. "Frequent Mutations of Chromatin Remodeling Gene ARID1A in Ovarian Clear Cell Carcinoma." *Science (New York, N.Y.)* 330 (6001): 228–31. <https://doi.org/10.1126/science.1196333>.
- 25) Kadoch, Cigall, Diana C. Hargreaves, Courtney Hodges, Laura Elias, Lena Ho, Jeff Ranish, and Gerald R. Crabtree. 2013. "Proteomic and Bioinformatic Analysis of Mammalian SWI/SNF Complexes Identifies Extensive Roles in Human Malignancy." *Nature Genetics* 45 (6): 592–601. <https://doi.org/10.1038/ng.2628>.
- 26) Katagiri, Atsuko, Kentaro Nakayama, Mohammed Tanjimur Rahman, Munmun Rahman, Hiroshi Katagiri, Naomi Nakayama, Masako Ishikawa, Tomoka Ishibashi, Kouji Iida, Hiroshi Kobayashi, Yoshiro Otsuki, Satoru Nakayama and Kohji Miyazaki. 2012. "Loss of ARID1A Expression Is Related to Shorter Progression-Free Survival and Chemoresistance in Ovarian Clear Cell Carcinoma." *Modern Pathology* 25 (2): 282–88. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.161>.
- 27) Khorasanizadeh, Sepideh. 2004. "The Nucleosome." *Cell* 116 (2): 259–72. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00044-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00044-3).
- 28) Kowalczykowski, Stephen C. 2015. "An Overview of the Molecular Mechanisms of Recombinational DNA Repair." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7 (11): a016410. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016410>.
- 29) La Serna, Ivana L. De, Yasuyuki Ohkawa, and Anthony N. Imbalzano. 2006. "Chromatin Remodelling in Mammalian Differentiation: Lessons from ATP-Dependent Remodellers." *Nature Reviews Genetics* 7 (6): 461–73. <https://doi.org/10.1038/nrg1882>.



- 30) Labianca, R., B. Nordlinger, G. D. Beretta, S. Mosconi, M. Mandalà, A. Cervantes, and D. Arnold. 2013. "Early Colon Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up." *Annals of Oncology* 24 (SUPPL.6). <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt354>.
- 31) Li, Xuan Shirley, Patrick Trojer, Tatsushi Matsumura, Jessica E Treisman, and Naoko Tanese. 2010. "Mammalian SWI / SNF-A Subunit BAF250 / ARID1 Is an E3 Ubiquitin Ligase That Targets Histone H2B □" 30 (7): 1673–88. <https://doi.org/10.1128/MCB.00540-09>.
- 32) Lieber, Michael R. 2010. "The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway." *Annual Review of Biochemistry* 79 (1): 181–211. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.052308.093131>.
- 33) Lisby, Michael, and Rodney Rothstein. 2016. "Cell Biology of Mitotic Recombination," 1–22.
- 34) Lu, Chao, and C. David Allis. 2017. "SWI/SNF Complex in Cancer." *Nature Genetics* 49 (2): 178–79. <https://doi.org/10.1038/ng.3779>.
- 35) Mathur, Radhika, Burak H Alver, Adrianna K San Roman, Boris G Wilson, Xiaofeng Wang, Agoston T Agoston, Peter J Park, Ramesh A Shivdasani, and Charles W M Roberts. 2016. "ARID1A Loss Impairs Enhancer-Mediated Gene Regulation and Drives Colon Cancer in Mice." *Nature Genetics* 49 (2): 296–302. <https://doi.org/10.1038/ng.3744>.
- 36) McElhinny, Stephanie A. Nick, Jody M. Havener, Miguel Garcia-Diaz, Raquel Juárez, Katarzyna Bebenek, Barbara L. Kee, Luis Blanco, Thomas A. Kunkel, and Dale A. Ramsden. 2005. "A Gradient of Template Dependence Defines Distinct Biological Roles for Family X Polymerases in Nonhomologous End Joining." *Molecular Cell* 19 (3): 357–66. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.06.012>.
- 37) McGinty, Robert K., and Song Tan. 2015. "Nucleosome Structure and Function." *Chemical Reviews* 115 (6): 2255–73. <https://doi.org/10.1021/cr500373h>.
- 38) Mehta, Anuja, and James E. Haber. 2014. "Sources of DNA Double-Strand Breaks and Models of Rec." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6: 1–19. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016428>.
- 39) Mimitou, Eleni P., and Lorraine S. Symington. 2009. "DNA End

- Resection: Many Nucleases Make Light Work.” *DNA Repair* 8 (9): 983–95. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.04.017>.
- 40) Mohrmann, Lisette, and C. Peter Verrijzer. 2005. “Composition and Functional Specificity of SWI2/SNF2 Class Chromatin Remodeling Complexes.” *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression* 1681 (2–3): 59–73. <https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2004.10.005>.
- 41) Morel, D., G. Almouzni, J. C. Soria, and Sophie Postel-Vinay. 2017. “Targeting Chromatin Defects in Selected Solid Tumors Based on Oncogene Addiction, Synthetic Lethality and Epigenetic Antagonism.” *Annals of Oncology* 28 (2): 254–69. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw552>.
- 42) Mouradov, Dmitri, Clare Sloggett, Robert N. Jorissen, Christopher G. Love, Shan Li, Antony W. Burgess, Diego Arango, Robert L. Strausberg, Daniel Buchanan, Samuel Wormald, Liam O'Connor, Jennifer L. Wilding, David Bicknell, Ian P.M. Tomlinson, Walter F. Bodmer, John M. Mariadason, and Models of the Main Molecular Subtypes of Primary Cancer.” *Cancer Research* 74 (12): 3238–47. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0013>.
- 43) Müller, Manuel M., and Tom W. Muir. 2015. “Histones: At the Crossroads of Peptide and Protein Chemistry.” *Chemical Reviews* 115 (6): 2296–2349. <https://doi.org/10.1021/cr5003529>.
- 44) Nagl, Norman G, Antonia Patsialou, Dale S Haines, Peter B Dallas, George R Beck, and Elizabeth Moran. 2005. “The P270 (ARID1A/SMARCF1) Subunit of Mammalian SWI/SNF-Related Complexes Is Essential for Normal Cell Cycle Arrest.” *Cancer Research* 65 (20): 9236 LP – 9244. <http://cancerres.aacrjournals.org/content/65/20/9236.abstract>.
- 45) Nagl, Norman G, Xiaomei Wang, Antonia Patsialou, Michael Van Scoy, and Elizabeth Moran. 2007. “Distinct Mammalian SWI/SNF Chromatin Remodeling Complexes with Opposing Roles in Cell-Cycle Control.” *The EMBO Journal* 26 (3): 752–63. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601541>.
- 46) Neigeborn, Lenore, and Marian Carlson. 1984. “Genes Affecting T H E Regulation O F Sucz Gene.” *Genetics* 108: 845–58.

- 47) Nick McElhinny, S. A., C. M. Snowden, J. McCarville, and D. A. Ramsden. 2000. "Ku Recruits the XRCC4-Ligase IV Complex to DNA Ends." *Molecular and Cellular Biology* 20 (9): 2996–3003. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.9.2996-3003.2000>.
- 48) Nicolette, Matthew L, Kihoon Lee, Zhi Guo, Mridula Rani, Julia M Chow, Sang Eun Lee, and Tanya T Paull. 2010. "Mre11–Rad50–Xrs2 and Sae2 Promote 5' Strand Resection of DNA Double-Strand Breaks." *Nature Structural & Molecular Biology* 17 (12): 1478–85. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1957>.
- 49) Niedermaier, B., A. Sak, E. Zernickel, S. Xu, M. Groneberg, and M. Stuschke. 2019. "Targeting ARID1A-Mutant Colorectal Cancer: Depletion of ARID1B Increases Radiosensitivity and Modulates DNA Damage Response." *Scientific Reports* 9 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54757-z>.
- 50) Nimonkar, Amitabh V., Jochen Genschel, Eri Kinoshita, Piotr Polaczek, Judith L. Campbell, Claire Wyman, Paul Modrich, and Stephen C. Kowalczykowski. 2011. "BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN Constitute Two DNA End Resection Machineries for Human DNA Break Repair." *Genes and Development* 25 (4): 350–62. <https://doi.org/10.1101/gad.2003811>.
- 51) Ochi, Takashi, Qian Wu, and Tom L. Blundell. 2014. "The Spatial Organization of Non-Homologous End Joining: From Bridging to End Joining." *DNA Repair* 17: 98–109. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.02.010>.
- 52) Ogiwara, H., A. Ui, A. Otsuka, H. Satoh, I. Yokomi, S. Nakajima, A. Yasui, J. Yokota, and T. Kohno. 2011. "Histone Acetylation by CBP and P300 at Double-Strand Break Sites Facilitates SWI/SNF Chromatin Remodeling and the Recruitment of Non-Homologous End Joining Factors." *Oncogene* 30 (18): 2135–46. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.592>.
- 53) Park, Ji Hye, Eun Jung Park, Han Sae Lee, So Jung Kim, Shin Kyoung Hur, Anthony N. Imbalzano, and Jongbum Kwon. 2006. "Mammalian SWI/SNF Complexes Facilitate DNA Double-Strand Break Repair by Promoting  $\gamma$ -H2AX Induction." *EMBO Journal* 25 (17): 3986–97. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601291>.

- 54) Park, Youngran, M Herman Chui, Yohan Suryo Rahmanto, Zheng-cheng Yu, Raghavendra A Shamanna, Marina A Bellani, Stephanie Gaillard, Ayse Ayhan, Akila Viswanathan, Michael M. Seidman, Sonia Franco, Anthony K.L. Leung, Vilhelm A. Bohr, Ie-Ming Shih, and Tian-Li Wang. 2019. "Loss of ARID1A in Tumor Cells Renders Selective Vulnerability to Combined Ionizing Radiation and PARP Inhibitor Therapy" *25* (18): 5584–95. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-4222>.
- 55) Phelan, Michael L., Saïd Sif, Geeta J. Narlikar, and Robert E. Kingston. 1999. "Reconstitution of a Core Chromatin Remodeling Complex from SWI/SNF Subunits." *Molecular Cell* *3* (2): 247–53. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80315-9](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80315-9).
- 56) Price, Brendan D., and Alan D. D'Andrea. 2013. "Chromatin Remodeling at DNA Double-Strand Breaks." *Cell* *152* (6): 1344–54. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.011>.
- 57) Ranjha, Lepakshi, S. M. Howard, and Petr Cejka. 2018. "Main Steps in DNA Double-Strand Break Repair: An Introduction to Homologous Recombination and Related Processes." *Chromosoma*, 1–28. <https://doi.org/10.1007/s00412-017-0658-1>.
- 58) Saha, Anjanabha, Jacqueline Wittmeyer, and Bradley R. Cairns. 2006. "Chromatin Remodelling: The Industrial Revolution of DNA around Histones." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *7* (6): 437–47. <https://doi.org/10.1038/nrm1945>.
- 59) Sak, Ali, Martin Stuschke, Michael Groneberg, Dennis Kübler, Christoph Pöttgen, and Wilfried E E Eberhardt. 2012. "Inhibiting the Aurora B Kinase Potently Suppresses Repopulation during Fractionated Irradiation of Human Lung Cancer Cell Lines." *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* *84* (2): 492–99. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2011.12.021>.
- 60) Sausen, Mark, Rebecca J. Leary, Siân Jones, Jian Wu, C. Patrick Reynolds, Xueyuan Liu, Amanda Blackford, Giovanni Parmigiani, Luis A Diaz Jr, Nickolas Papadopoulos, Bert Vogelstein, Kenneth W Kinzler, Victor E Velculescu & Michael D Hogarty 2013. "Integrated Genomic Analyses Identify ARID1A and ARID1B Alterations in the Childhood Cancer Neuroblastoma." *Nature Genetics* *45* (1): 12–17.

- <https://doi.org/10.1038/ng.2493>.
- 61) Savas, Sevtap, and Georgia Skardasi. 2018. "Critical Reviews in Oncology / Hematology The SWI / SNF Complex Subunit Genes : Their Functions , Variations , and Links to Risk and Survival Outcomes in Human Cancers." *Critical Reviews in Oncology / Hematology* 123 (August 2017): 114–31. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.01.009>.
- 62) Schiaffino-Ortega, Santiago, Carlos Balinas, Marta Cuadros, and Pedro P Medina. 2014. "SWI/SNF Proteins as Targets in Cancer Therapy." *Journal of Hematology & Oncology* 7 (1): 81. <https://doi.org/10.1186/s13045-014-0081-5>.
- 63) Shain, A Hunter, Craig P Giacomini, Karen Matsukuma, Collins A Karikari, Murali D Bashyam, Manuel Hidalgo, Anirban Maitra, and Jonathan R Pollack. 2012. "Convergent Structural Alterations Define SWItch/Sucrose NonFermentable (SWI/SNF) Chromatin Remodeler as a Central Tumor Suppressive Complex in Pancreatic Cancer." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (5): E252–59. <https://doi.org/10.1073/pnas.1114817109>.
- 64) Shao, Fei, Tiantian Guo, Pei Jou Chua, Lili Tang, Aye Aye Thike, Puay Hoon Tan, Boon Huat Bay, and Gyeong Hun Baeg. 2015. "Clinicopathological Significance of ARID1B in Breast Invasive Ductal Carcinoma." *Histopathology* 67 (5): 709–18. <https://doi.org/10.1111/his.12701>.
- 65) Shen, Jianfeng, Yang Peng, Leizhen Wei, Wei Zhang, Lin Yang, Li Lan, Prabodh Kapoor, Zhenlin Ju, Qianxing Mo, Ie-Ming Shih, Ivan P. Uray, Xiangwei Wu, Powel H. Brown, Xuetong Shen, Gordon B. Mills, and Guang Peng. 2015. "ARID1A Deficiency Impairs the DNA Damage Checkpoint and Sensitizes Cells to PARP Inhibitors." *Cancer Discovery* 5 (7): 752–67. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0849>.
- 66) Shrivastav, Meena, Leyma P. De Haro, and Jac A. Nickoloff. 2008. "Regulation of DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice." *Cell Research* 18 (1): 134–47. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.111>.
- 67) Simpson, Robert T. 1978. "Structure of the Chromatosome, a Chromatin Particle Containing 160 Base Pairs of DNA and All the Histones." *Biochemistry* 17 (25): 5524–31. <https://doi.org/10.1021/bi00618a030>.

- 68) Sonoda, Eiichiro, Helfrid Hochegger, Alihossein Saberi, Yoshihito Taniguchi, and Shunichi Takeda. 2006. "Differential Usage of Non-Homologous End-Joining and Homologous Recombination in Double Strand Break Repair." *DNA Repair* 5 (9–10): 1021–29. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.05.022>.
- 69) Stauffer, Melissa E., and Walter J. Chazin. 2004. "Physical Interaction between Replication Protein A and Rad51 Promotes Exchange on Single-Stranded DNA." *Journal of Biological Chemistry* 279 (24): 25638–45. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400029200>.
- 70) Stern, Michael, Robert Jensen, and Ira Herskowitz. 1984. "Five SWI Genes Are Required for Expression of the HO Gene in Yeast." *Journal of Molecular Biology* 178 (4): 853–68. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(84\)90315-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(84)90315-2).
- 71) Stuschke, Martin, Volker Budach, Wilfried Budach, Horst Jürgen Feldmann, and Horst Sack. 1992. "Radioresponsiveness, Sublethal Damage Repair and Stem Cell Rate in Spheroids from Three Human Tumor Lines: Comparison with Xenograft Data." *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 24 (1): 119–26. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(92\)91030-Q](https://doi.org/10.1016/0360-3016(92)91030-Q).
- 72) Sun, Xuxu, Sam C. Wang, Yonglong Wei, Xin Luo, Yuemeng Jia, Lin Li, Purva Gopal, Adam C. Yopp, Amit G. Singal, and Hao Zhu. 2017. "Arid1a Has Context-Dependent Oncogenic and Tumor Suppressor Functions in Liver Cancer." *Cancer Cell* 32 (5): 574–589.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.10.007>.
- 73) Takata, M, M S Sasaki, E Sonoda, C Morrison, M Hashimoto, H Utsumi, Y Yamaguchi-Iwai, Akira Shinohara and Shunichi Takeda. 1998. "Homologous Recombination and Non-Homologous End-Joining Pathways of DNA Double-Strand Break Repair Have Overlapping Roles in the Maintenance of Chromosomal Integrity in Vertebrate Cells." *The EMBO Journal* 17 (18): 5497–5508. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.18.5497>.
- 74) Vélez-Cruz, Renier, Swarnalatha Manickavinayaham, Anup K. Biswas, Regina Weaks Clary, Tolkappiyan Premkumar, Francesca Cole, and David G. Johnson. 2016. "RB Localizes to DNA Double-Strand Breaks

- and Promotes DNA End Resection and Homologous Recombination through the Recruitment of BRG1." *Genes and Development* 30 (22): 2500–2512. <https://doi.org/10.1101/gad.288282.116>.
- 75) Walker, John R, Richard A Corpina, and Jonathan Goldberg. 2001. "Structure of the Ku Heterodimer Bound to DNA and Its Implications for Double-Strand Break Repair," 607–14.
- 76) Wang, Beihe, Huyang Xie, Chunguang Ma, Guiming Zhang, Hualei Gan, Qifeng Wang, Xiaohang Liu, Yiping Zhu, Yao Zhu, Guohai Shi, Hailiang Zhang, Bo Dai, Yijun Shen, and Dingwei Ye. 2017. "Expression of ARID1B Is Associated With Poor Outcomes and Predicts the Benefit from Adjuvant Chemotherapy in Bladder Urothelial Carcinoma." *Journal of Cancer* 8 (17): 3490–97. <https://doi.org/10.7150/jca.19109>.
- 77) Wang, Kai, Junsuo Kan, Siu Tsan Yuen, Stephanie T. Shi, Kent Man Chu, Simon Law, Tsun Leung Chan, Wai Yin Tsui, Siu Po Lee, Siu Lun Ho, Anthony K W Chan, Grace H W Cheng, Peter C Roberts, Paul A Rejto, Neil W Gibson, David J Pocalyko, Mao Mao, Jiangchun Xu & Suet Yi Leung. 2011. "Exome Sequencing Identifies Frequent Mutation of ARID1A in Molecular Subtypes of Gastric Cancer." *Nature Genetics* 43 (12): 1219–23. <https://doi.org/10.1038/ng.982>.
- 78) Wang, Xiaomei, Norman G Nagl, Deborah Wilsker, Michael Van Scoy, Stephen Pacchione, Peter Yaciuk, Peter B Dallas, and Elizabeth Moran. 2004. "Two Related ARID Family Proteins Are Alternative Subunits of Human SWI/SNF Complexes." *Biochemical Journal*. <https://doi.org/10.1042/BJ20040524>.
- 79) Watanabe, Reiko, Ayako Ui, Shin Ichiro Kanno, Hideaki Ogiwara, Takahiro Nagase, Takashi Kohno, and Akira Yasui. 2014. "SWI/SNF Factors Required for Cellular Resistance to DNA Damage Include ARID1A and ARID1B and Show Interdependent Protein Stability." *Cancer Research* 74 (9): 2465 LP – 2475.
- 80) Wei, Xiao-Li, De-Shen Wang, Shao-Yan Xi, Wen-Jing Wu, Dong-Liang Chen, Zhao-Lei Zeng, Rui-Yu Wang, Ya-Xin Huang, Ying Jin, Feng Wang, Miao-Zhen Qiu, Hui-Yan Luo, Dong-Sheng Zhang, Rui-Hua Xu. 2014. "Clinicopathologic and Prognostic Relevance of ARID1A Protein Loss in Colorectal Cancer." *World J. Gastroenterol.* 20 (48): 18404–12.

- 81)Wiegand, Kimberly C, Sohrab P Shah, Osama M Al-Agha, Yongjun Zhao, Kane Tse, Thomas Zeng, Janine Senz, Melissa K. McConechy, Michael S. Anglesio, Steve E. Kalloger, Winnie Yang, Alireza Heravi-Moussavi, Ryan Giuliany, Christine Chow, John Fee, Abdalnasser Zayed, Leah Prentice, Nataliya Melnyk, Gulisa Turashvili, Allen D. Delaney, Jason Madore, Stephen Yip, Andrew W. McPherson, Gavin Ha, Lynda Bell, Sian Fereday, Angela Tam, Laura Galletta, Patricia N. Tonin, Diane Provencher, Dianne Miller, Steven J.M. Jones, Richard A. Moore, Gregg B. Morin, Arusha Oloumi, Niki Boyd, Samuel A. Aparicio, le-Ming Shih, Anne-Marie Mes-Masson, David D. Bowtell, Martin Hirst, Blake Gilks, Marco A. Marra, and David G. Huntsman. 2010. "ARID1A Mutations in Endometriosis-Associated Ovarian Carcinomas." *The New England Journal of Medicine* 363 (16): 1532–43.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1008433>.
- 82)Williamson, Chris T., Rowan Miller, Helen N. Pemberton, Samuel E. Jones, James Campbell, Asha Konde, Nicholas Badham, Rumana Rafiq, Rachel Brough, Aditi Gulati, Colm J. Ryan, Jeff Francis, Peter B. Vermulen, Andrew R. Reynolds, Philip M. Reaper, John R. Pollard, Alan Ashworth & Christopher J. Lord. 2016. "ATR Inhibitors as a Synthetic Lethal Therapy for Tumours Deficient in ARID1A." *Nature Communications* 7: 13837. <https://doi.org/10.1038/ncomms13837>.
- 83)Wilson, Boris G., and Charles W.M. Roberts. 2011. "SWI/SNF Nucleosome Remodellers and Cancer." *Nature Reviews Cancer* 11 (7): 481–92. <https://doi.org/10.1038/nrc3068>.
- 84)Wu, Jennifer N, and Charles W M Roberts. 2013. "ARID1A Mutations in Cancer: Another Epigenetic Tumor Suppressor?" *Cancer Discovery* 3 (1): 35 LP – 43.  
<http://cancerdiscovery.aacrjournals.org/content/3/1/35.abstract>.
- 85)Xu, Ning, Lili Wang, Ping Sun, Suyang Xu, Shiping Fu, and Zhihua Sun. 2017. "Low Arid1a Expression Correlates with Poor Prognosis and Promotes Cell Proliferation and Metastasis in Osteosarcoma," no. 136.
- 86)Yan, Hai Bo, Xue Fei Wang, Qian Zhang, Zhao Qing Tang, Ying Hua Jiang, Hui Zhi Fan, Yi Hong Sun, Peng Yuan Yang, and Feng Liu. 2014. "Reduced Expression of the Chromatin Remodeling Gene ARID1A



- Enhances Gastric Cancer Cell Migration and Invasion via Downregulation of E-Cadherin Transcription.” *Carcinogenesis* 35 (4): 867–76. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt398>.
- 87) Yunos, Ryia Illani Mohd, Nurul Syakima Ab Mutalib, Francis Yew Fu Tieng, Nadiah Abu, and Rahman Jamal. 2020. “Actionable Potentials of Less Frequently Mutated Genes in Colorectal Cancer and Their Roles in Precision Medicine.” *Biomolecules* 10 (3). <https://doi.org/10.3390/biom10030476>.
- 88) Zheng, Ping, Bela Patel, Malgorzata McMenamin, Ann Marie Paprocki, R Dee Schramm, Jr. Nagl Norman G., Deborah Wilsker, Xiaomei Wang, Elizabeth Moran, and Keith E Latham. 2004. “Expression of Genes Encoding Chromatin Regulatory Factors in Developing Rhesus Monkey Oocytes and Preimplantation Stage Embryos: Possible Roles in Genome Activation1.” *Biology of Reproduction* 70 (5): 1419–27. <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.103.023796>.
- 89) Zhu, Zhu, Woo-Hyun Chung, Eun Yong Shim, Sang Eun Lee, and Grzegorz Ira. 2008. “Sgs1 Helicase and Two Nucleases Dna2 and Exo1 Resect DNA Double Strand Break Ends.” *Cell* 134 (6): 981–94. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.037>

## 7 Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: STRUKTUR DES NUKLEOSOMS .....	6
ABBILDUNG 2: CHROMATIN-ARCHITEKTUR IN EUKARYOTISCHEN ZELLEN .....	7
ABBILDUNG 3: DIE VERSCHIEDENEN FOLGEN VON CHROMATIN REMODELLING.....	8
ABBILDUNG 4: MECHANISMUS DER NHEJ REPARATUR .....	15
ABBILDUNG 5: MECHANISMUS DER HOMOLOGEN REKOMBINATION .....	16
ABBILDUNG 6: ÜBERSICHTSAUFNAHME VON RAD51 FOCI IN G2-PHASE ZELLEN .....	29
ABBILDUNG 7: EXPRESSION VON ARID1A IN KOLOREKTALEN TUMORLINIEN. ....	31
ABBILDUNG 8: ARID1B EXPRESSION NACH siRNA TRANSFEKTION.....	32
ABBILDUNG 9: EFFEKT VON ARID1B KNOCKDOWN AUF KLONOGENES ÜBERLEBEN. ....	34
ABBILDUNG 10: EFFEKT VON ARID1B KNOCKDOWN AUF RAD51 FOCI BILDUNG.....	37
ABBILDUNG 11: EFFEKT VON ARID1B KNOCKDOWN AUF 53BP1 FOCI BILDUNG.....	38
ABBILDUNG 12: ZELLZYKLUS NACH DEPLETION VON ARID1B .....	39
ABBILDUNG 13: EFFEKT VON ARID1B KNOCKDOWN AUF ZELLZYKLUS NACH BESTRAHLUNG .....	40
ABBILDUNG 14: EFFEKT VON ARID1B KNOCKDOWN AUF EDU-EINBAU NACH BESTRAHLUNG .....	41
ABBILDUNG 15: PROLIFERATION NACH ARID1B KNOCKDOWN. ....	42
ABBILDUNG 16: EFFEKT VON ARID1B KNOCKDOWN AUF DIE PLATIERUNGS-EFFIZIENZ. ....	43
ABBILDUNG 17: EFFEKT VON ARID1B KNOCKDOWN AUF TUMORKONTROLLE NACH BESTRAHLUNG. ....	45

### 7.2 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: BIOLOGISCHE UND CHEMISCHE SUBSTANZEN .....	21
TABELLE 2: LÖSUNGEN UND PUFFER .....	21
TABELLE 3: ERSTANTIKÖRPER .....	22
TABELLE 4: ZWEITANTIKÖRPER UND FARBSTOFFE .....	22
TABELLE 5: siRNAs UND INHIBITOREN .....	22
TABELLE 6: SOFTWARE .....	23
TABELLE 7: TECHNISCHES EQUIPMENT .....	23
TABELLE 8: ZELLINIEN.....	24
TABELLE 9: CHARAKTERISIERUNG DER ZELLINIEN: STRAHLENSENSITIVITÄT .....	33
TABELLE 10: STRAHLENSENSITIVIERENDER EFFEKT VON ARID1B KNOCKDOWN. ....	35

### 7.3 Abkürzungsverzeichnis

bp	Basen Paare
DDR	DNA Damage Repair (DNA-Reparatur)
DSB	Doppelstrangbruch
h	Stunden
HR	Homologe Rekombination
IF	Immunfluoreszenz
IR	Irradiation (=Bestrahlung)
mt	Mutiert
min	Minuten
NHEJ	Non-Homologous End-Joining
n.s.	nicht signifikant
PE	Platierungs-Effizienz, Plating Efficiency
RT	Raumtemperatur
SF	Surviving Fraction
WB	Western Blot
wt	Wild-Typ

## 7.4 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Univ.-Prof. Dr. med. Martin Stuschke, für seine wissenschaftliche Vision, für die regelmäßige Auseinandersetzung mit den Ergebnissen, und sein Vorbild an wissenschaftlicher Integrität.

Ich möchte mich außerdem bei Dr. rer. nat. Ali Sak bedanken, der mich bei der Konzeption und Auswertung der experimentellen Arbeiten stets unterstützt hat, und mir immer mit Hintergrundwissen und Erfahrung zur Seite stand.

Weiterhin möchte ich den Mitarbeitern der experimentellen Strahlenbiologie danken, allen voran Michael Groneberg, Dr. rer. nat. Erika Zernickel und Yasin Bahadir, von denen ich viele Methoden lernen durfte, und die mich während der gesamten experimentellen Arbeiten immer wieder praktisch unterstützt haben.

Ich danke Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Verena Jendrossek, für die beratenden Gespräche und kritische Diskussion der Ergebnisse.

Auch bei allen weiteren Mitgliedern des GRK1739 möchte ich mich für die regelmäßigen Diskussionen und den wissenschaftlichen Austausch bedanken, ebenso bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die Finanzierung.

Außerdem danke ich meinen Freunden und Familie für die emotionale Unterstützung und Ermutigung bei der Durchführung meiner Promotion, insbesondere meiner Mutter Dr. Anita Wolf-Niedermaier für das Lektorat des Manuskripts.

## **7.5 Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Onlineversion aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.