

Aus dem Institut für Neuropathologie,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. Walter J. Schulz-Schaeffer

Biochemische und molekularbiologische Untersuchung der Proteine ARID1A und ARID1B in Meningeomen mit einem Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2025

vorgelegt von:
Manuel Hinsberger
geb. am: 08.10.2000 in Saarlouis

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

Tag der Promotion:	11.02.2026
Dekan:	Univ.-Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Walter J. Schulz-Schaeffer
Weitere Berichterstatter:	Prof. Dr. Joachim Oertel Prof. Dr. Christine Stadelmann-Nessler Prof. Dr. David Mick

Widmung

Für meine Familie

1.1 Inhaltsverzeichnis

BIOCHEMISCHE UND MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG DER PROTEINE ARID1A UND ARID1B IN MENINGEOMEN MIT EINEM ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA).....	I
1.1 Inhaltsverzeichnis	I
1.2 Abkürzungsverzeichnis.....	V
2 ZUSAMMENFASSUNG	1
2.1 Deutsche Zusammenfassung.....	1
2.2 Summary	2
3 EINLEITUNG	3
3.1 Meningeome	3
3.1.1 Ätiologie.....	3
3.1.2 Epidemiologie	3
3.1.3 Prognose und Rezidivrate	4
3.1.4 Lokalisation.....	5
3.1.5 Klinische Symptomatik.....	5
3.1.6 Klassifikation	6
3.1.7 Die molekulopathologischen Veränderungen in Meningeomen: Von der Pathogenese bis hin zur Malignisierung	7
3.1.8 Therapie	10
3.2 Chromatin Remodeling	11
3.2.1 Der SWI/SNF Komplex: Klassifikation	11
3.2.2 Der Aufbau des SWI/SNF Komplexes	13
3.2.3 Die molekulare Funktionsweise des SWI/SNF Komplexes	13
3.3 ARID1A und ARID1B	15
3.3.1 Die Proteinstruktur von ARID1A und eine besondere Analyse der zwei Domänen ARID und BAF250_C	15
3.3.2 Biochemische Analyse des Proteins ARID1B	16
3.3.3 Beeinflusste Signalwege und Funktionen von ARID1A in Zellen und der funktionelle Unterschied zu ARID1B	16
3.3.4 Die Rolle von ARID1A als Teil des SWI/SNF Komplexes in Tumoren.....	18

3.3.5	<i>ARID1B</i> -Mutationen und damit assoziierte Erkrankungen.....	19
3.4	Methoden zum Nachweis von ARID1A	20
3.4.1	Immunhistochemie.....	20
3.4.2	ELISA	21
3.5	Ziele der Arbeit / Fragestellung	22
4	MATERIAL UND METHODIK	23
4.1	Gewebeproben	23
4.2	Loss of heterozygosity (LOH)	25
4.3	ELISA	28
4.3.1	Auswahl der ELISA-Platte.....	29
4.3.2	Lysatherstellung	29
4.3.3	Protokoll BCA.....	32
4.3.4	ELISA-Protokolle für ARID1A und Histon H3	32
4.3.5	Auswertung: Standardkurven-Analyse und Akzeptanzkriterien.....	34
4.4	Immunhistochemie.....	38
4.5	Western blot	40
4.6	Statistik	41
4.7	Fremdleistungen.....	42
5	ERGEBNISSE	43
5.1	ELISA-Optimierung	43
5.1.1	Substratentwicklung.....	43
5.1.2	Waschen, Blocken und Pufferlösungen	44
5.1.3	Primäre Antikörper	46
5.2	Standardisierung und Validierung	46
5.2.1	Standardkurve	46
5.2.2	Spezifität	49
5.2.3	Erneute Analyse der Proben.....	52
5.2.4	Spike recovery Analyse	53
5.2.5	Minimal benötigte Konzentration	56

5.2.6	Parallelismus	56
5.3	Patientenkollektiv	58
5.3.1	Verteilung von Alter, Geschlecht und Lokalisation.....	58
5.3.2	Distribution der histologischen Subtypen, WHO-Grade und Rezidive	59
5.4	ELISA-Messung der ARID1A-Konzentrationen.....	61
5.4.1	Vergleich von Meningeomen mit und ohne LOH des Chromosoms 1p.....	61
5.4.2	Vergleich der ARID1A-Level in den unterschiedlichen WHO-Graden	65
5.4.3	Analyse der ARID1A-Konzentrationen in unterschiedlichen Lokalisationen.....	66
5.4.4	Analyse der ARID1A Konzentrationen in Rezidivtumoren	68
5.5	Histologische Auswertung ARID1A-Level	69
5.5.1	Geringgradiger mosaikartiger Ausfall der ARID1A-Expression.....	69
5.5.2	Höhergradiger mosaikartiger Ausfall der ARID1A-Expression.....	71
5.5.3	Weitere Analyse der immunhistochemischen ARID1A-Level.....	71
5.6	Analyse des LOH von Chromosom 6q in Meningeomen	72
5.6.1	Analyse der vier Sonden D6S281, D6S440, D6S473 und D6S1633.....	72
6	DISKUSSION	74
6.1	Etablierung eines ELISAs.....	74
6.1.1	Generelle Vor- und Nachteile von ELISAs	74
6.1.2	Möglichkeiten und Grenzen des neu entwickelten ELISAs	75
6.2	Analyse der ARID1A-Expression mit dem neu entwickelten ELISA in 61 Meningeomen	85
6.2.1	Einschränkungen der Patientenkohorte.....	85
6.2.2	Vergleich der ARID1A-Konzentrationen in Meningeomen mit und ohne LOH auf Chromosom 1p	86
6.3	Der Einfluss von <i>ARID1B</i> als ein weiteres potentiell Treiber Gen auf Chromosom 6q27 in Meningeomen	92
6.4	Ausblick	93
7	LITERATURVERZEICHNIS	96
8	ANHANG	105
8.1	Materialienliste	105

8.2	Puffer und Lösungen.....	106
8.3	Geräte und Software	107
8.4	Supplementäre Bilder.....	108
8.5	Probenmaterial/Ergebnistabellen	109
8.6	Abbildungsverzeichnis.....	115
8.7	Tabellenverzeichnis	116
8.8	Formelverzeichnis.....	117
9	PUBLIKATION / DANKSAGUNG	118
9.1	Publikation	118
9.2	Danksagung.....	118
10	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	120
11	LEBENS LAUF	122

1.2 Abkürzungsverzeichnis

*	$0,01 \leq p < 0,05$
**	$0,001 \leq p < 0,01$
***	$0,0001 \leq p < 0,001$
****	$p < 0,0001$
10-JRR	10-Jahresrezidivrate
10-JÜR	10-Jahresüberlebensrate
4PL	4-parameter logistic
5PL	5-parameter logistic
AE-Modell	All experiments model
AK	Antikörper
AM	Atypisches Meningeom
ANGM	Angiomatöses Meningeom
ANM	Anaplastisches Meningeom
ANOVA	Analysis of Variance
ARID	AT-rich interacting domain
ARID1A	AT-rich interactive domain-containing protein 1A
ARID1B	AT-rich interactive domain-containing protein 1B
ATM	Ataxia telangiectasia-mutated Protein
ATR	Ataxia telangiectasia and RAD3-related protein
BAF	BRG1-associated factor complex
BAP1	Breast cancer [BRCA]1-associated protein 1
BCA	Bicinchoninic acid protein assay
Blank	engl. für Leerwert
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CBTRUS	Central Brain Tumor Registry of the United States
CDKN2A/B	Cyclin dependent kinase inhibitor 2A/B
CEB	Cytoplasmic Extraction Buffer for tissues
CHR bzw. Chromatin	Fraktion aus Proteinen, die nach dem „Subcellular Protein Fractionation Kit for Tissues“ von Thermo Fisher Scientific im Überstand nach der vierten Fraktionierung enthalten sind (subzelluläres Kompartiment: Chromatin), siehe Abbildung 7
CM	Chordoides Meningeom
Coating	engl. für Beschichtung
CV	Coefficient of variation
DAB	Diaminobenzidin
DL	Detektionslimit
DSB	Doppelstrangbruch
Durainf	Durainfiltration
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
engl.	englisch
EMA	European Medicines Agency
EP-Modell	Each plate model
Estimation plot	engl. für Schätzungsdiagramm: Ausmaß eines Effekts wird zusammen mit einer visuellen Darstellung seiner Genauigkeit (Konfidenzintervall) abgebildet
F:M Verhältnis	Frauen zu Männer Verhältnis
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FM	Fibröses Meningeom
FN bzw. Frei nukleär	Fraktion aus Proteinen, die nach dem „Subcellular Protein Fractionation Kit for Tissues“ von Thermo Fisher Scientific im Überstand nach der dritten Fraktionierung enthalten sind (subzelluläres Kompartiment: Frei nukleär), siehe Abbildung 7

Abkürzungsverzeichnis

g	Ortsfaktor bzw. auf der Erde die Erdbeschleunigung g mit $g=9,81\text{m/s}^2$
G	Geringgradiger mosaikartiger Ausfall der ARID1A-Expression
GRAVY	Grand average of hydropathicity index
Gesamt	Gruppe aus Zytosol, Membran, Frei nukleär und Chromatin
h	Stunde, Zeiteinheit
H	Höhergradiger mosaikartiger Ausfall der ARID1A-Expression
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
H3K27ac	Acetyliertes Histon H3K27
H3K27me3	Dreifach methyliertes Histon H3K27
HE	Hämatoxylin-Eosin Färbung
Hirninf	Hirninfiltration
HGNC	HUGO Genome Nomenclature Committee
Hook effect	engl. für Hakeneffekt: Falsch-niedrige Messwerte bei hohen Konzentrationen
HPF	High power field
HRP	Horseradish Peroxidase
ICMJE	International Committee of Medical Journal Editors
inter-assay	Durchführung von Assays an mehreren Tagen
intra-assay	Durchführung eines Assays und Analyse innerhalb desselben
k.A.	Keine Angabe möglich
kB	Kilobasenpaare
KBF	Keilbeinflügel
kDa	Kilodalton
Kern	Gruppe aus Frei nukleär plus Chromatin
Ki-67	Ki-67 Mitose-Index
KM	Klarzelliges Meningeom
KO	Knockout
LBA	Ligand binding assay, engl. für Ligandenbindungstest
LLOQ	Lower limit of quantification
LOH	Loss of heterozygosity
M bzw. Membran	Fraktion aus Proteinen, die nach dem „Subcellular Protein Fractionation Kit for Tissues“ von Thermo Fisher Scientific im Überstand nach der zweiten Fraktionierung enthalten sind (subzelluläres Kompartiment: Membran), siehe Abbildung 7
MA	männliche Patienten
MDA	Megadalton
ME	Meningeom, nicht näher bezeichnet
MEB	Membrane Extraction Buffer for tissues
Mening.	Meningeome
min	Minute, Zeiteinheit
ml	Milliliter
MM	Meningotheliales Meningeom
MNase	Micrococcal Nuclease
MW	Molekulargewicht
mol/l	Einheit Stoffmengenkonzentration c, wird auch als Molarität M abgekürzt
n = xy	n gibt die Anzahl einer Gruppe an, bspw. wurden xy Patienten in einer Studie untersucht
NA	Wert/Zahl nicht auswertbar. Für LOH-Analyse bspw. aufgrund von bspw. Homozygotie, Problemen mit Vervielfältigung der Proben in der PCR, verschwommene Banden oder PCR-Produkte mit inkorrektter Länge
ncBAF	Non-canonical BAF complex
NEB	Nuclear Extraction Buffer for tissues
NF2	Neurofibromatose Typ 2
ng/ml	Nanogramm pro Milliliter
NHEJ	Non-homologous end-joining
nm	Nanometer
ns	$p > 0,05$
NTC	No-Template-Control

Abkürzungsverzeichnis

OD	Optische Dichte
OPD	o-Phenylendiamin
p = xy	Der p-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an mit der die Nullhypothese zutrifft
PARP	Poly (ADP-ribose) Polymerase
PBAF	Polybromo BRG1-associated factor complex
PBRM1	Polybromo 1
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	Programmed cell death protein 1
PD-L1	Programmed death-ligand 1
pH	Abkürzung für Potential des Wasserstoffs, Maß für sauren oder alkalischen Charakter einer Lösung
PHH3	Phosphoryliertes Histon H3, aktiver Mitose-Marker
PM	Psammomatöses Meningeom
PR	Progesteronrezeptor
PRC2	Polycomb repressor complex
Prim.	Primär
Prot.	Protokoll
R	Rezidiv
R2	Korrektheit
Sek.	Sekundär
Sex	engl. für Geschlecht
SM	Sekretorisches Meningeom
SMARCA4	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 4
SMARCE1	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily E member 1
Spike recovery	Wiederfindungsrate gemäß Formel 5
STR	Short tandem repeats
SWI/SNF	Switch/sucrose non-fermentable complex
T	Tween-20
TBS	TRIS-buffered saline
TERT	Telomerase reverse Transkriptase
Tissue strainer	engl. für Gewebesieb
U/min	Umdrehungen pro Minute
ULOQ	Upper limit of quantification
V	Volt
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
w/v	Gewichtseinheit (engl. weight) pro Volumeneinheit
weighted fit	engl. für gewichtete Passform: in einer 4PL oder 5PL kann es sinnvoll sein die Datenpunkte unterschiedlich zu gewichten
Well	engl. für Vertiefung
Western blot	Nachweismethode von Proteinen durch Übertragung (engl. blotting) auf eine Trägermembran
wet transfer	engl. für nasser Transfer
WT	Wildtyp
ZYT bzw. Zytosol	Fraktion aus Proteinen, die nach dem „Subcellular Protein Fractionation Kit for Tissues“ von Thermo Fisher Scientific im Überstand nach der ersten Fraktionierung enthalten sind (subzelluläres Kompartiment: Zytosol), siehe Abbildung 7
µg/ml	Mikrogramm pro Milliliter
°C	Grad in Celsius
„+“	Das ausgewertete Merkmal ist vorhanden, bspw. Sheeting
„-“	Das ausgewertete Merkmal ist nicht vorhanden, bspw. kein LOH
„/“	Probe wurde aufgrund fehlenden Materials nicht analysiert

2 Zusammenfassung

2.1 Deutsche Zusammenfassung

Der Verlust der Heterozygotie (engl. loss of heterozygosity, kurz LOH) von Chromosom 1p und 6q bei Meningeomen ist seit mehr als zwei Jahrzehnten bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass die Deletion von Chromosom 1p36 ein unabhängiger Marker für das Wiederauftreten und Fortschreiten von Meningeomen ist. *ARID1A* ist ein Tumorsuppressorgen auf Chromosom 1p36.11 und das resultierende Protein ARID1A ist Teil des Chromatin-regulierenden SWI/SNF-Komplexes, dessen Untereinheiten in 20 % aller Tumorentitäten mutiert sind. Diese Arbeit untersucht, ob sich Tumore mit oder ohne LOH auf Chromosom 1p in der ARID1A-Expression unterscheiden. Da aktuelle Methoden wie die Immunhistochemie nur semiquantitative Messungen erlauben, wird ein indirekter Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) für ARID1A entwickelt, dessen Validierung auf den aktuellen EMA- und FDA-Kriterien basiert. Die Auswertung zeigt, dass dieser ELISA eine objektive, genaue und präzise Quantifizierung der ARID1A-Konzentration in rekombinanten Proteinlösungen, Zellkulturstandards und Tumor-Gewebelysaten ermöglicht. So ergibt die Analyse der Standardkurven von 11 ELISA-Platten an unterschiedlichen Tagen eine Korrektheit (R^2) von 0,99, die inter-assay Genauigkeit liegt bei 90,26 % und die inter-assay Präzision kann mit einem Variationskoeffizienten von 4,53 % angegeben werden. Der ELISA wird nachfolgend verwendet, um in 61 Meningeomen die ARID1A-Konzentrationen zu messen. Die Ergebnisse zeigen, dass Meningeome mit LOH 1p im Vergleich zu Tumoren ohne LOH 1p signifikant niedrigere ARID1A-Werte aufweisen. Neben der statistischen Signifikanz ergibt die Analyse, dass der ARID1A-Konzentrationsverlust in Tumoren mit LOH 1p im Mittel bis zu 32 % ($p = 0,0172$) beträgt, weshalb eine biochemische Relevanz sinnvoll erscheint. Es kann weiterhin gezeigt werden, dass Tumore mit Rezidiven und multifokalen Lokalisationen signifikant niedrigere ARID1A-Level aufweisen als solche ohne diese Merkmale ($p < 0,05$). Als weitere Fragestellung wird der LOH auf Chromosom 6q analysiert, der ebenfalls in höhergradigen Meningeomen gehäuft auftritt. Das auf Bande 6q25.3 gelegene Gen *ARID1B* könnte bei einer LOH demzufolge eine entscheidende Rolle in der Malignisierung von ARID1A-deletierten Tumoren spielen. Hierfür werden in einer Polymerase chain reaction (PCR) mehrere Sonden für das Chromosom 6q mit dem Fokus auf *ARID1B* getestet. Die detaillierte Analyse ergibt eine signifikante und starke Korrelation zwischen LOH 1p und LOH 6q bei vier Sonden ($p < 0,0001$), was darauf hindeutet, dass der duale Verlust der beiden SWI/SNF-Komplex Untereinheiten ARID1A und ARID1B eine treibende Rolle in der Tumorphogenese von Meningeomen spielen könnte. Die kausale Erklärung des Effekts der LOH 1p durch einen ARID1A-Verlust ist eine wesentliche Erkenntnis dieser Arbeit. Dieser kann sowohl diagnostische als auch prognostische Folgen für den Patienten haben, wobei eine gezielte Behandlungsstrategie mit PARP- und/oder ATR-Inhibitoren in Zukunft evaluiert werden könnte. Außerdem kann die dargestellte ELISA-Methode durch objektive und präzise Messungen sowie eine hohe Reproduzierbarkeit mit folglich hohem Probendurchsatz zur Bestimmung der ARID1A-Konzentration in verschiedenen Tumorentitäten verwendet werden.

2.2 Summary

Biochemical and molecular biological analysis of the proteins ARID1A and ARID1B in meningioma using an Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Loss of heterozygosity (LOH) of chromosome 1p and 6q in meningiomas has been known for more than two decades. Loss of chromosome 1p36 has been shown to be an independent marker for the recurrence and progression of meningiomas. *ARID1A* is a tumor suppressor gene on chromosome 1p36.11 and its protein ARID1A is part of the chromatin remodeling SWI/SNF complex, whose subunits are mutated in 20 % of all tumor entities. This work investigates whether tumors with or without chromosome LOH 1p differ in ARID1A expression. Since current methods such as immunohistochemistry only allow semi-quantitative measurements, an indirect Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) for ARID1A is developed. Validation of this method is based on the current EMA and FDA criteria. The ELISA is shown to provide objective, accurate and precise quantification of ARID1A levels in recombinant protein solutions, cell culture standards and tumor tissue lysates. The analysis of the standard curves of 11 ELISA plates on different days results in a correctness (R^2) of 0.99, the inter-assay accuracy is 90.26 % and the inter-assay precision can be stated with a coefficient of variation of 4.53 %. The ELISA was subsequently used to measure ARID1A levels in 61 meningiomas. The results show that meningiomas with LOH 1p have significantly lower ARID1A levels compared to tumors without LOH 1p. In addition to statistical significance, the analysis shows that the loss of ARID1A concentration in tumors with LOH 1p is on average up to 32% ($p = 0.0172$), therefore a biochemical relevance seems reasonable. Furthermore, it can also be shown that tumors with recurrences and multifocal localizations have significantly lower ARID1A levels compared to those without these features ($p < 0.05$). The LOH on chromosome 6q, which also occurs more frequently in higher-grade meningiomas, is analyzed, as there are indications that the *ARID1B* gene located on band 6q25.3 plays a decisive role in the malignization of ARID1A-deleted tumors. For this purpose, several probes for chromosome 6q with a focus on *ARID1B* are tested in a polymerase chain reaction (PCR). Detailed analysis reveals a significant and strong correlation between LOH 1p and LOH 6q in four probes ($p < 0.0001$), suggesting that the dual loss of the two SWI/SNF complex subunits ARID1A and ARID1B may play a driving role in the tumor pathogenesis of meningioma. The causal explanation of the effect from LOH 1p by ARID1A loss is a key finding of this work. This may have both diagnostic and prognostic implications for the patient, and a targeted treatment strategy for example with PARP and/or ATR inhibitors could be evaluated in the future. Furthermore, the presented ELISA method can be used to determine the ARID1A concentration in different tumor entities due to objective and precise measurements as well as high reproducibility and consequently high sample throughput.

3 Einleitung

3.1 Meningeome

Im Folgenden werden neben der Ätiologie allgemeine Fakten und Zahlen zu Meningeomen erläutert, sodass eine Einordnung dieser Tumorentität in den Gesamtkontext möglich ist.

3.1.1 Ätiologie

Der Begriff Meningeom (engl. meningioma) stammt aus einer Publikation von Harvey Cushing (1922), der beschrieb, dass diese Tumore zwar oft an der Dura mater befestigt sind, allerdings der Ursprung eher in Elementen der daruntergelegenen Arachnoidea anzusehen ist [26]. Nachfolgend wurde diese Theorie bestätigt, da man zeigen konnte, dass die Tumorzellen der Meningeome mesenchymaler Herkunft sind und den arachnoidalen Deckzellen entstammen [51,82]. Für das Auftreten von Meningeomen wurden Risikofaktoren identifiziert, die im Folgenden näher beschrieben werden [25].

Radiotherapie

Bestrahlungen, beispielsweise aufgrund von Tinea capitis im Kindesalter, können nach Sadetzki et al. (2005) dosisabhängig zu einem erhöhten Risiko für das Auftreten von Meningeomen führen, das auch nach mehr als 30 Jahren nach primärer Exposition bestehen bleibt [97]. Zudem gibt es Hinweise, dass die nach einer Bestrahlung entstandenen Meningeome aggressiver wachsen, häufiger rezidivieren, einen höheren WHO-Grad besitzen und vermehrt molekulargenetische Veränderungen wie Chromosom 1p- und 6q-Verluste aufweisen [2]. Außerdem verkürzt sich bei höherer Strahlendosis die Latenzzeit bis zum Auftreten des Meningeoms, sodass auch insbesondere jüngere Patienten betroffen sind [113].

Hormonelle Abhängigkeit

Korhonen et al. (2006) haben analysiert, dass Meningeome in 88 % Progesteron-, 40 % Östrogen- und 39 % Androgen-Rezeptoren exprimieren, sodass ein hormonabhängiges Wachstum vermutet wird [58]. Neben dieser histologischen Beobachtung gibt es auch die, dass Frauen häufiger an Meningeomen erkranken als Männer, was in Abschnitt 3.1.2 genauer erläutert wird (siehe Tabelle 1) [45]. Allerdings konnten Erklärungsversuche für diese Beobachtungen nicht bestätigt werden, sodass der Zusammenhang unklar bleibt [58].

3.1.2 Epidemiologie

Aus einem sehr großen Krebsregister aus den USA, dem Central Brain Tumor Registry of the United States (CBTRUS) mit 455.000 Einträgen, weiß man, dass die meisten – ca. 41 % – aller diagnostizierten Neoplasien in der Gruppe der primären Hirntumore Meningeome sind, gefolgt von Tumoren der Hypophyse mit 17 % und Glioblastomen mit 14 % [83]. Neben diesen zu Lebzeiten entdeckten Meningeomen ist aus Autopsie Studien bekannt, dass sich in etwa 2-3 % aller Autopsien sogenannte inzidentelle Meningeome finden lassen [77], die häufig ein gutartiges Wachstumsverhalten besitzen [47].

Diese Arbeit beschäftigt sich mit Patienten¹, die in der Uniklinik des Saarlandes behandelt wurden, weshalb sich der nachfolgende Abschnitt im Besonderen auf Hollecze et al. (2019) bezieht, die in ihrer epidemiologischen Studie Daten aus dem Krebsregister des Saarlandes verwendet haben [45].

Alter

Das mittlere Alter bei Diagnosestellung liegt bei ca. 63 Jahren [45]. Eine genauere Auswertung der altersspezifischen Inzidenz zeigt, dass Meningeome im Kindesalter bis zum 14. Lebensjahr zu den selteneren primären Hirntumoren zählen und etwa ab dem 20-24. Lebensjahr die Inzidenz kontinuierlich ansteigt [45,83]. Betrachtet man die Gruppe der über 75-Jährigen, so beobachtet man hier neben einer hohen Inzidenz auch einen Anstieg der Mortalität [45].

Inzidenz, Geschlecht und WHO-Grad

Hollecze et al. (2019) beschreiben ein Verhältnis von Frauen zu Männer (F:M Verhältnis), das bei 2,53:1 liegt, wobei insgesamt etwa 72 % der Meningeome bei Frauen auftreten (siehe Tabelle 1). Auf die Inzidenz bezogen bedeutet dies für Deutschland, dass ca. 2,5 und 5,8 Fälle pro 100.000 Männer bzw. Frauen jedes Jahr diagnostiziert werden [45].

Meningeome lassen sich in drei Prognosegruppen – WHO-Grad 1, 2 und 3 – einteilen, auf die in Abschnitt 2.1.5. genauer eingegangen wird. Zur Verteilung auf die drei WHO-Grade beschreiben Hollecze et al. (2019), dass etwa 70 % der Meningeome dem Grad 1, 28 % dem Grad 2 und 3 % dem Grad 3 entsprechen (siehe Tabelle 1) [45].

Betrachtet man den Zusammenhang zwischen WHO-Graden und dem Geschlecht, so ergibt sich, dass sich in gutartigen Tumoren ein höheres Frauen zu Männer-Verhältnis von bis zu 3:1 vorliegt, das sich in höhergradigeren Meningeomen hin zu den Männern verschiebt mit 1,7:1 [45,83].

3.1.3 Prognose und Rezidivrate

Insgesamt haben Meningeome eine gute Prognose, da die 5-Jahres Überlebensrate durchschnittlich bei 85 % liegt und die 10-Jahresüberlebensrate (10-JÜR) bei 72 %. Betrachtet man allerdings die 10-Jahresüberlebensrate verteilt über die WHO-Grade, so beschreiben Hollecze et al. (2019) 77 % für Grad 1, 71 % für Grad 2 und 23 % für Grad 3, was auch in Tabelle 1 sichtbar wird [45]. Das mediane Überleben bei einem Grad 3 Tumor liegt somit bei vier Jahren und einem Monat [45].

Neben dem Überleben ist für den Patienten insbesondere das Auftreten eines Rezidivs entscheidend. Hollecze et al. (2019) sehen eine 5- bzw. 10-Jahresrezidivrate (10-JRR) von durchschnittlich 5 % bzw. 9 % [45]. Auch hier sieht man einen Unterschied in der Verteilung über die drei WHO-Grade. Die Autoren berichten, dass nach 10 Jahren im Durchschnitt 6 %, 17 % bzw. 30 % der Patienten mit einem

¹ Die in dieser Arbeit gewählte männliche Form bezieht sich immer zugleich auf weibliche, männliche und diverse Personen. Auf eine Mehrfachbezeichnung wird in der Regel zugunsten einer besseren Lesbarkeit verzichtet.

Meningeom des WHO-Grades 1, 2 bzw. 3 ein Rezidiv erleiden [45]. Sowohl die 10-JÜR als auch die 10-JRR unterliegen geschlechtsspezifischen Unterschieden (siehe Tabelle 1) [45].

Vergleicht man diese Daten mit anderen Quellen, so zeigt sich, dass die WHO-Klassifikation 2021 beispielsweise für Grad 1 Meningeome generelle Rezidivraten von 7-25 % angibt, wobei ein Grad 2 oder 3 Meningeom in 29-52 % bzw. 50-94 % der Fälle rezidiert [131]. Es ist jedoch anzumerken, dass sich diese Rezidivhäufigkeiten auf die Lebensspanne beziehen, sodass diese Abweichungen durchaus nachvollziehbar sind. Rogers et al. (2015) beschreiben in der Analyse von 923 Patienten mit Grad 1 und Simpson Grad I-III Resektion (siehe Abschnitt 3.1.8) eine 15-Jahresrezidivrate von 24-60 % [94], weshalb sich zusammenfassend sagen lässt, dass Rezidive im Verlauf durchaus wahrscheinlich sind und in einem Beobachtungsregime berücksichtigt werden sollten [6].

Kategorie	10-JÜR	10-JRR	F:M Verhältnis	Bemerkung
Insgesamt	72 %	9 %	2,53:1	41 % der primären Hirntumore [83]
WHO-Grad 1	77 %	6 %	3:1	70 % aller Mening.
WHO-Grad 2	71 %	17 %	1,7:1	28 % aller Mening.
WHO-Grad 3	23 %	30 %		3 % aller Mening.
Frauen	73 %	8 %	k.A.	Kein signifikanter Unterschied
Männer	69 %	12 %	k.A.	

Tabelle 1. Tabellarische Zusammenfassung epidemiologischer Daten zu Meningeomen nach Hollecze et al. (2019) [45].

Legende: „10-JÜR“ beschreibt die 10-Jahresüberlebensrate, wohingegen „10-JRR“ für die 10-Jahresrezidivrate steht. Das „F:M Verhältnis“ meint das Frauen zu Männer-Verhältnis und die Abkürzung „Mening.“ steht für Meningeome. „k.A.“ bedeutet der Wert ist nicht anzugeben. Erklärungen siehe Text.

3.1.4 Lokalisation

Etwa 90 % aller Meningeome befinden sich intrakraniell und nur in ca. 10 % sind die Ausgangsgewebe dieser Tumore die spinalen Meningen [45]. Intrakraniell finden sich Meningeome sowohl an der Schädelbasis, etwa in der Olfaktoriusrinne, dem Tuberculum sellae, in der spheno-orbitalen Region, der parasellären Region oder im Bereich der sphenoidalen Flügel, als auch außerhalb der Schädelbasis wie beispielsweise in der cerebralen Konvexität, der Falx, der parasagittalen Region, der tentoriellen Region oder im Bereich der cerebellären Konvexität [67].

Mehrere Studien beschreiben, dass Meningeome an der Schädelbasis oder in spinaler Lage seltener einen histologisch höhergradigen Subtyp aufweisen, kleiner sind, weniger Rezidive verursachen [22,67] und molekularbiologische Unterschiede aufweisen (vgl. Abschnitt 3.1.7) [22].

3.1.5 Klinische Symptomatik

Die klinisch-neurologische Symptomatik beschränkt sich im Wesentlichen auf fokale neurologische Defizite in Abhängigkeit der Tumorlokalisierung, erhöhten intrakraniellen Druck, Epilepsie oder unspezifische Symptome wie Tinnitus oder Kopfschmerzen [6].

3.1.6 Klassifikation

Meningeome werden nach der WHO-Klassifikation für Tumore des zentralen Nervensystems eingeteilt, die in ihrer neuesten fünften Auflage im Jahr 2021 erschienen ist [131]. Im Vergleich zur vierten Edition aus dem Jahr 2016 [63] wurden zum Beispiel mit dem *Telomerase reverse Transkriptase (TERT)*-Promotor- und der *Cyclin dependent kinase inhibitor 2A/B (CDKN2A/B-)* Mutation molekularpathologische Kriterien in die Diagnostik integriert, die bisher nur zu wissenschaftlichen Zwecken dienten [131]. Ein Vorschlag wie etwa die Gradierung von Meningeomen anhand von Methylierungsprofilen durch Sahm et al. (2017) spielt in der aktuellen Fassung keine zentrale Rolle [98]. Wie in Abbildung 1 ersichtlich wird, beruht die Einteilung vor allem auf histologischen Kriterien.

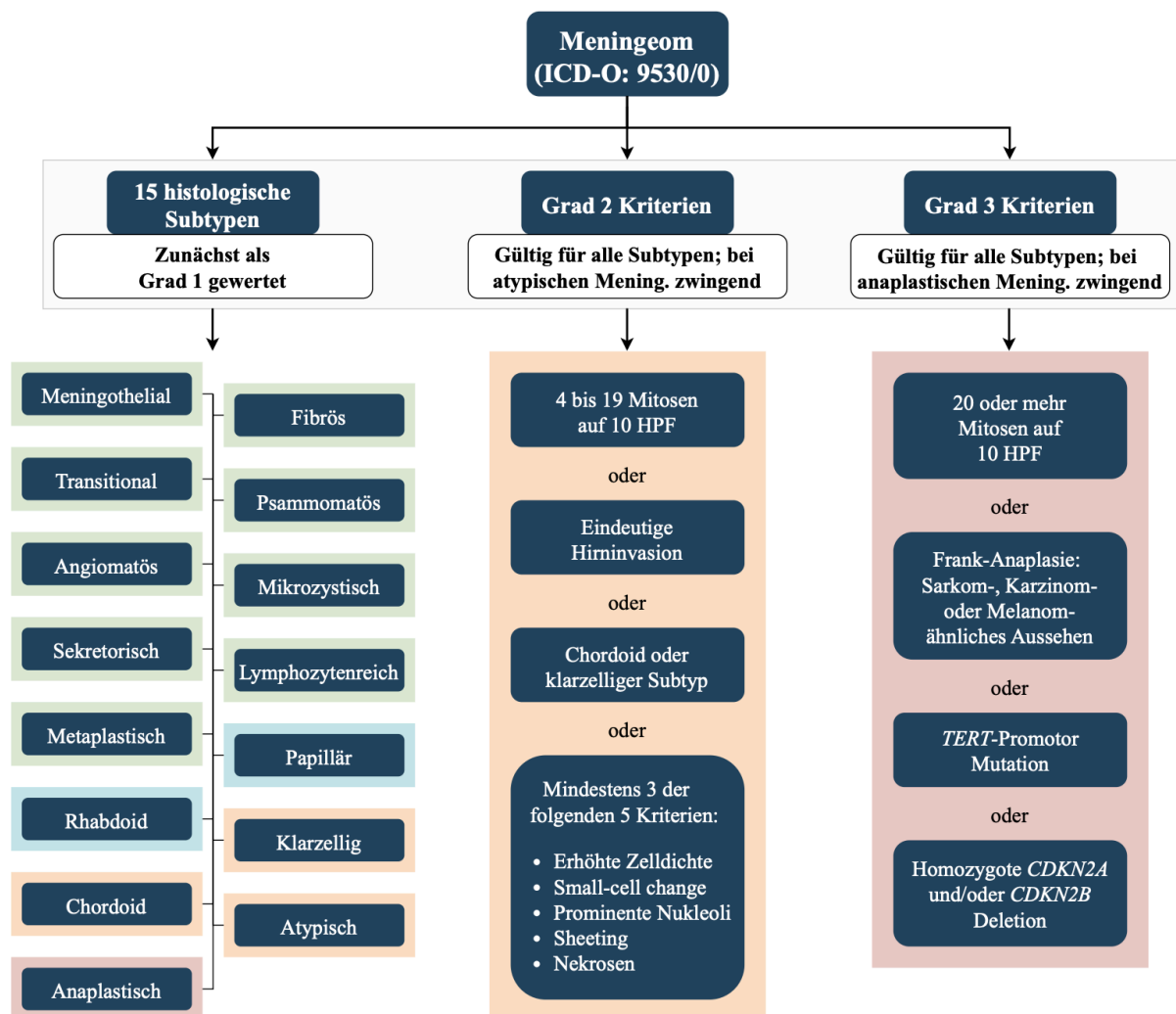


Abbildung 1. Einteilung der Meningeome nach WHO-Klassifikation aus dem Jahr 2021 [131].

Legende: Nach der Einteilung in 15 histologischen Subtypen wird eine Höhergradierung anhand der Grad 2 (orange) und Grad 3 (rot) Kriterien erwogen. Die Grad 1 Subtypen (grün) wurden um zwei ehemals als Grad 3 gewertete Subtypen (türkis) erweitert. Zur genaueren Klassifikation siehe Erläuterungen im Text.

In Kürze funktioniert die Klassifikation so, dass zunächst ein histologischer Subtyp identifiziert wird und nachfolgend die Grad 2 und Grad 3 Kriterien geprüft werden. Für den Grad 2 sind diese prognostischen Kriterien (a) eine erhöhte Mitoserate von 4-19 Mitosen pro 10 HPF (high power field = engl. für hochaufgelöstes Gesichtsfeld), (b) eine eindeutige Hirninvasion des Tumors in das angrenzende Gehirnparenchym, oder (c) es liegen drei der folgenden fünf Kriterien vor: erhöhte Zelldichte, „Small cell change“ (engl. für eine Anhäufung kleiner Tumorzellen als Zellverband), prominente Nukleoli, „Sheeting“ (engl. für ein flächiges Wachstum, der sonst in Zügen und Wirbeln organisierten Tumorzellverbände) oder Nekrosen. Trifft eines dieser Kriterien zu, wird ein atypisches Meningeom WHO-Grad 2 diagnostiziert. Ein histologisch klarzelliger oder chordoider Subtyp, wird sofort als Grad 2 gewertet.

Ein Grad 3 Meningeom kann vorliegen, sofern eines der nachfolgenden Kriterien zutrifft: (a) die Mitoserate liegt bei über 20 Mitosen pro 10 HPF, (b) der Tumor besitzt histologisch ein Sarkom-, Karzinom- oder Melanom-ähnliches Aussehen, (c) eine *TERT*-Promotormutation oder (d) eine homozygote Deletion von *CDKN2A* und/oder *CDKN2B* liegt vor (siehe Abbildung 1) [131].

Im Folgenden Abschnitt soll auf die molekularpathologischen Veränderungen in Meningeomen detaillierter eingegangen werden. Allerdings ist es wichtig anzumerken, dass die *TERT*-Promotor Mutation [74] und die homozygote Deletion von *CDKN2A* und/oder *CDKN2B* [107] bisher die einzigen unabhängigen Risikofaktoren sind, die in der aktuellen WHO-Klassifikation berücksichtigt werden (siehe Abbildung 1, 2) [131].

3.1.7 Die molekularpathologischen Veränderungen in Meningeomen: Von der Pathogenese bis hin zur Malignisierung

Histologische Unterschiede in Meningeomen spielen bis heute eine wichtige Rolle in Meningeomen [131], allerdings geht man nach aktuellem Forschungsstand davon aus, dass die meisten Tumore genetische oder epigenetische Veränderungen in sich tragen [125], die sowohl für die Diagnose als auch für die Prognose entscheidend sind [27]. Zu den genetischen Veränderungen gehören beispielsweise Mutationen, Genkopienzahlvariationen (engl. gene copy number variations, CNV) oder der Verlust der Heterozygotie (engl. loss of heterozygosity, LOH). Dem gegenüber stehen epigenetische Prinzipien wie etwa Veränderungen in Histonen oder der DNA Methylierung, sowie der Imprintingverlust (engl. loss of imprinting, LOI) [125].

In den nachgeschalteten transkriptionellen Signalwegen tragen zwei generelle Prinzipien zur Tumorentstehung bei: die Aktivierung von Proto-Onkogenen oder der Verlust von Tumorsuppressorgenen [125]. Die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen wurde erstmals durch das Zwei-Treffer-Modell von Knudson (1971) vorgestellt [56]. Hierbei fand der Autor heraus, dass erst die Kombination aus Mutation und einer weiteren Mutation oder einem Allel-Verlust etwa durch einen LOH zum Auftreten von Tumoren führt. Das einzelne Ereignis hat allerdings keinen Einfluss auf die Malignität [57].

Im Rahmen dieser Arbeit spielt das Zwei-Treffer-Modell eine wichtige Rolle. Im Folgenden wird nun das bisherige Wissen über die molekularpathologischen Veränderungen in Meningeomen erläutert.

Häufigkeiten der Chromosomenverluste

Betrachtet man zunächst die Verluste von Chromosomenabschnitten in einer Studie von Driver et al. (2021) mit 527 Meningeomen, zeigen sich in absteigender Reihenfolge die folgenden Häufigkeiten: 22q (61 %), 1p (36 %), 6q (21 %), 14q/18q (beide 19 %), 18p (17 %), 7p (13 %), 3p/20p (beide 12 %), 1q/6p/10q/20q (alle 11 %). Die seltenen Chromosomengewinne sind in Abbildung 2 ersichtlich. Der Verlust der auf Chromosom 9p21 gelegenen Gene *CDKN2A* oder *CDKN2B* wird in 5 % gefunden [27].

Der Verlust des Neurofibromatose Typ 2 Gens in Meningeomen

Trofatter et al. (1993) und Rouleau et al. (1993) konnten den Verlust im Sinne eines LOH des Chromosoms 22q, der in Meningeomen mit circa 61 % am häufigsten auftritt, dem auf Bande 22q12.1 gelegenen Tumorsuppressorgen *Neurofibromatose Typ 2 (NF2)* zuordnen, das für das Protein Merlin kodiert [95,119]. Dieses Gen ist auch verantwortlich für die autosomal dominante vererbte Neurofibromatose Typ 2, die mit typischerweise mit multiplen Meningeomen und/oder bilateralen Vestibularisschwannomen einhergeht [89]. Neben Genverlusten gibt es auch Mutationen des *NF2* Gens. Beide Gruppen zusammen, kennzeichnen über eine Fehlfunktion im Merlin Protein die Gruppe der *NF2* Meningeome (siehe Abbildung 2) [22]. Meningeome dieser Gruppe werden häufiger als höhergradig eingestuft und finden sich öfter in den cerebralen und cerebellären Hemisphären. Davon abzugrenzen ist die Gruppe der non-*NF2* Meningeome, die insbesondere Mutationen in den *TRAF7*-, *KLF4*-, *AKT1*- und *SMO*-Genen zeigen und eher gutartig wachsen [22,131].

Modell der klonalen zytogenetischen Evolution von Meningeomen nach Ketter et al. (2007)[53]

Andere Chromosomenverluste konnten bisher nicht explizit einem Gen zugewiesen werden. Allerdings weiß man, dass es eine Reihenfolge der chromosomalen Verluste gibt [53,130]. So beschreiben Weber et al. (1997) in ihrer Studie, dass einzelne Zellen möglicherweise nacheinander unterschiedliche genetische Veränderungen erfahren müssen, sodass letztendlich ein sich schnell teilender Klon die Grundlage für die Tumorentstehung bildet [130]. Ein darauf aufbauendes Modell liefern Ketter et al. (2007), indem sie mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH-) Analyse onkogenetische Stammbäume erstellt haben, in denen der erste Verlust immer das Chromosom 22q betrifft, gefolgt vom LOH 1p. Danach gibt es die zwei Möglichkeiten, dass entweder ein Verlust von Chromosom 6q folgt oder eines der Chromosomen 19, 18 oder 10 verloren geht (siehe Abbildung 2). Die Autoren haben außerdem gezeigt, dass man einen einzelnen Tumor nach seinem häufigsten zytogenetischen Muster einteilen und darauf basierend seine Prognose besser abschätzen kann als nach der WHO-Klassifikation [53]. Die Erkenntnisse von Ketter et al. (2007) können weiterhin in aktuellen Studien belegt werden, sodass dem LOH eine entscheidende – wenn auch unvollständig verstandene – Rolle in Meningeomen zugerechnet wird [27].

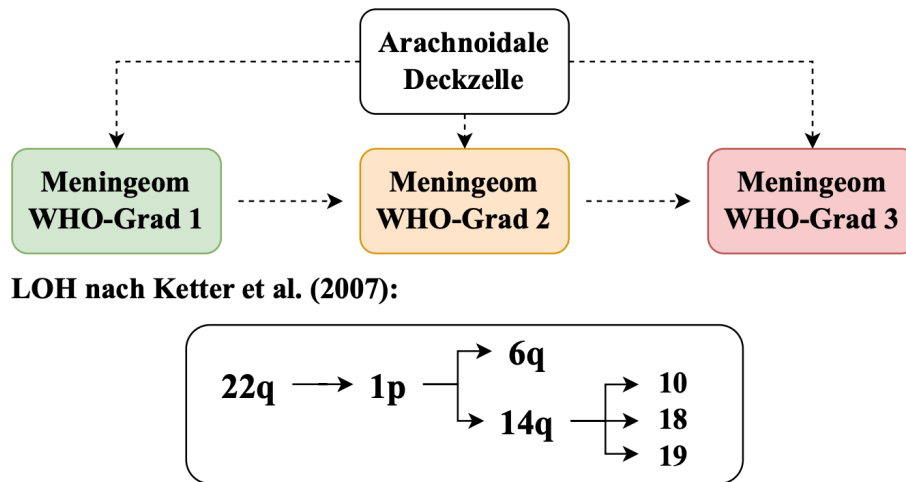


Abbildung 2. LOH nach Ketter et al. (2007) [27].

Legende: Meningeome der WHO-Grade 1 (grün), 2 (orange) und 3 (rot) entstehen aus arachnoidalen Deckzellen (weiß, oben) unter anderem durch aufeinanderfolgende LOH (losses of heterozygosity).

Verlust des Chromosom 1p im Sinne eines LOH

In der bereits erwähnten Studie von Driver et al. (2021) weisen 36 % der 527 Meningeome einen Verlust des Chromosoms 1p auf, der mit einem ca. 7,31-fach erhöhten Hazard Ratio (engl. für Risikoverhältnis) für das Auftreten eines Rezidivs assoziiert ist [27]. Diese Erkenntnis wurde bereits von Linsler et al. (2014) beschrieben, wobei die Autoren zeigen konnten, dass der Chromosomenabschnitt 1p36 als ein unabhängiger Prädiktor für das Auftreten eines Rezidiv sowie die Progression eines Meningeoms angesehen werden kann [62]. Der Verlust des Chromosoms 1p ist nach dem Verlust von Chromosom 22q die zweithäufigste Anomalie, sodass diesem Chromosom und insbesondere der Region 1p36 eine besondere Rolle in Meningeomen zugeschrieben wird [27,53,62,95,119,123,130].

In der Folge wurde versucht diesem Verlust der Heterozygotie auf Chromosom 1p36 ein Gen zuzuweisen und es konnte gezeigt werden, dass die DNA-Verluste insbesondere den Abschnitt des *AT-rich interactive domain-containing protein 1A (ARID1A)*, einem Tumorsuppressorgen auf Chromosom 1p36.11 beinhalten [12,13,50].

ARID1A-LOH in Meningeomen

Pemov et al. (2020) beschreiben in ihrer Studie die Wachstumsraten von Meningeomen in Neurofibromatose Typ 2 erkrankten Patienten. Das Meningeom mit der schnellsten Wachstumsrate wies interessanterweise einen LOH der Gene *ARID1A* und *SMARCE1* (*SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily E member 1*) auf, sodass eine kombinierte Mutation möglicherweise eine wichtige Rolle in dem Wachstumsverhalten von Meningeomen besitzt [87]. Weitere LOH-Analysen zu *ARID1A* fehlen.

Verlust des Chromosom 6q im Sinne einer LOH

Driver et al. (2021) fanden einen Verlust auf Teilen des Chromosoms 6q in 21 % der Fälle, wobei der Verlust mit einem Hazard Ratio von 6,89 für Rezidive korreliert ist [27]. Daher scheint dieser Verlust eine relevante Molekularpathologie in Meningeomen zu sein.

Weiterhin ist es interessant, dass sich in dem Modell von Ketter et al. (2007) zum einen zeigt, dass diesen 6q-Verlusten Verluste der Chromosomen 22q und 1p vorangehen und zum anderen, dass danach keine weiteren spezifischen Verluste folgen [53]. Da sich eben diese molekularpathologischen Veränderungen in anaplastischen WHO-Grad 3 Meningeomen häufen, wurde bereits von Weber et al. (1997) beschrieben, dass 6q-Verluste in dieser Gruppe die vierthäufigsten sind, mit etwa 53 % [130]. Weitere Arbeiten zu 6q-Verlusten in Meningeomen konnten diese Häufung bis jetzt nicht endgültig erklären [25,88], wobei zwei Gene des SWI/SNF Komplexes (Switch/sucrose non-fermentable complex) als mögliche Treiber der Tumorphagenese von Meningeomen angesehen werden: *AT-rich interactive domain-containing protein 1B (ARID1B)*, auf Chromosom 6q25.3, oder *PHD finger protein 10 (PHF10)*, auf Chromosom 6q27 [25,41]. Wie auch *ARID1A* sind die korrespondierenden Proteine ARID1B und PHF10 Untereinheiten des SWI/SNF Komplexes, der sowohl strukturell in den Abschnitten 3.2.1 und 3.2.2 als auch funktionell in Abschnitt 3.2.3 erläutert wird.

3.1.8 Therapie

Die Erstlinien-Therapie des Meningeoms ist die Operation [6], was auch dadurch bestätigt wird, dass in der Studie von Holczek et al. (2019) 92 % der Patienten durch eine Operation therapiert wurden [45]. Der Resektionszustand und die damit einhergehende Prognose wird post-operativ nach Simpson (1957) in fünf Grade eingeteilt, wobei der Grad I einer makroskopisch kompletten Resektion und der Grad V lediglich einer Biopsie entspricht [109]. Die Rezidivraten nach 5 Jahren unterscheiden sich erheblich, so sind bei einer Operation mit Simpson Grad I Rezidive in 9 % der Fälle zu erwarten, wohingegen es 16 % und 29 % in den Grad II und III sind. Simpson Grad IV (partielle Resektion) und V (Biopsie) führen zwangsläufig zum Fortbestehen eines Resttumors, sodass folglich kein Rezidiv im engeren Sinne diagnostiziert werden kann. Allerdings beobachtet man das Weiterwachsen des Tumors in 39 % bzw. 100% der Fälle [109].

Trotz technischer Fortschritte in der Bildgebung, wurde mehrfach nachgewiesen, dass die postoperative Gradierung nach Simpson Patientengruppen, unabhängig von deren histologischen WHO-Gradierung in Grad 1, 2 oder 3, mit einer erhöhten Tumorrezidivneigung selektieren kann von Patienten mit niedrigeren Rezidivraten [28,78], sodass sie weiterhin im Fokus des post-operativen Beobachtungsregimes stehen soll [6].

Weitere Optionen sind eine wait-and-see Strategie (engl. für abwartendes Beobachten) oder eine Bestrahlung [6]. Letzteres kann auch bei ungünstiger anatomischer Lage für eine Operation als Erstlinientherapie eingesetzt werden [90]. Bei subtotaler Resektion (Simpson Grad IV), totaler Resektion (Simpson Grad I) und WHO-Grad 3 oder einem Rezidiv bietet die Bestrahlung eine adjuvante Therapieoption

[6]. In einer Studie zeigte sich beispielsweise, dass trotz der Diagnose eines histologischen dritten Grades und einer Simpson Grad I oder II Resektion, das Rezidiv-freie 5 Jahres-Intervall von 28 % bei alleiniger Operation auf 57 % bei Operation mit adjuvanter Radiotherapie gesteigert werden konnte [30].

Aktuelle Chemotherapie-Regime erfolgen in klinischen Studien und stellen keine Standardtherapie dar [6]. Wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben haben hormonelle Therapien in einer Phase III Studie mit Mifepriston oder Tamoxifen keine Erfolge erzielt [46]. Inhibitoren des mTOR-Signalweges sollen aufgrund der bereits beschriebenen Interaktion mit *Neurofibromatose Typ 2 (NF2-)* Mutationen (siehe Abschnitt 3.1.7) in der Zukunft eine mögliche Therapieoption sein, da sie bereits in der Zellkultur anti-proliferative Eigenschaften zeigen [15]. Eine klinische Phase II Studie gibt zudem Hinweise auf den Nutzen einer Kombinations-Chemotherapie mittels Bevacizumab (VEGF-Signalweg) und Everolimus (mTOR-Signalweg) [106].

Aktuelle klinische Studien testen die Effekte von PD-L1 (programmed death-ligand 1) Inhibitoren wie Pembrolizumab (NCT03279692, [147]) oder Nivolumab (NCT03173950, [148]) in anaplastischen Grad 3 Meningeomen. Erste Ergebnisse zeigen in einer Phase II Studie mit Pembrolizumab den Autoren nach vielversprechende Ergebnisse für die Patienten [40].

3.2 Chromatin Remodeling

3.2.1 Der SWI/SNF Komplex: Klassifikation

Chromatin Remodeling wird unter anderem durch den SWI/SNF Komplex organisiert [21], dessen Phänomen zuerst 1984 in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt wurde [80,112]. Dieser Proteinkomplex ist eine hoch konservierte Struktur, so findet er sich neben Hefen beispielsweise auch in der Fliegen-Spezies *Drosophila melanogaster* [136]. In Säugetieren wie dem Menschen gibt es drei solcher „mammalian SWI/SNF Komplexe“ (der Einfachheit halber im Folgenden „SWI/SNF Komplexe“ genannt): BAF (BRG1-associated factor complex), PBAF (Polybromo BRG1-associated factor complex) und ncBAF (non-canonical BAF complex) [69].

Obwohl sich diese drei Spezies stark unterscheiden, weisen die namentlich unterschiedlichen Komplexe jeweils strukturell homologe Untereinheiten auf [116], die auch gleiche biochemische Funktionen besitzen [55]. Zum Beispiel ist das Protein Brahma aus der Spezies *Drosophila melanogaster* ein Homolog zum Protein SWI2/SNF2 aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* [116], das wiederum den menschlichen Proteinen SMARCA2 und SMARCA4 aus humanen Zellen funktionell und strukturell gleich zu sein scheint (siehe Tabelle 2) [55,69]. Gemeinsam ist dieser SWI/SNF-Familie das ATP-abhängige Chromatin Remodeling durch das die Struktur des Chromatins und folglich die Transkription verschiedenster Gene verändert werden kann.

H. sapiens (Gen)	Alias	Modul	D. melano-gaster	S. cerevisiae	Mutationsrate in % ([103] [50])	
SMARCA2	<i>hBRM, BAF190B, SNF2A, SNF2L2</i>	ATPase	<i>Brahma (BRM)</i>	<i>SNF2/ SWI2</i>	0,5	1,2
SMARCA4	<i>BRG1, BAF190A, SNF2B, SNF2L4, Brahma homolog 1</i>				3	3,5
SMARCB1	<i>BAF47, INI1, hSNF5</i>	BAF-Kern	<i>Snr1</i>	<i>SNF5</i>	0,3	0,6
SMARCC1	<i>BAF155</i>	BAF-Kern	<i>mor</i>	<i>SWI3</i>	0,6	0,8
SMARCC2	<i>BAF170</i>				0,4	0,9
SMARCD1	<i>BAF60A</i>	BAF-Kern	<i>Bap60</i>	<i>SNF12</i>	0	0,4
SMARCD2	<i>BAF60B</i>				0	0,3
SMARCD3	<i>BAF60C</i>				0,1	0,4
SMARCE1	<i>BAF57</i>	BAF-Kern	<i>Bap111</i>	<i>k.A.</i>	0	0,3
ARID1A	<i>SMARCF1, BAF250A, C1orf4, hOSAI, p270, B120</i>	BAF spezifisch	<i>OSA</i>	<i>SWI1</i>	9	4,6
ARID1B	<i>BAF250B, hOSA2 SMARCF2, p250R, pKIAA1235</i>				2	2,2
ARID2	<i>BAF200, SMARCF3</i>	PBAF spezifisch	<i>k.A.</i>	<i>k.A.</i>	2	2,6
DPF1	<i>BAF45B</i>	BAF spezifisch	<i>D4</i>	<i>Swp82</i>	0	0,4
DPF2	<i>BAF45D</i>				0,2	0,5
DPF3	<i>BAF45C</i>				0	0,5
ACTL6A	<i>BAF53A</i>	ATPase	<i>Bap55</i>	<i>ARP7/ 9</i>	0,3	0,4
ACTL6B	<i>BAF53B</i>				0	0,5
ACTB	<i>β-actin</i>	ATPase	<i>ACT2</i>	<i>k.A.</i>	k.A.	k.A.
BCL7A	<i>k.A.</i>	ATPase	<i>BCL7-like</i>	<i>k.A.</i>	k.A.	1,2
BCL7B	<i>k.A.</i>				k.A.	0,2
BCL7C	<i>k.A.</i>				k.A.	0,2
SS18	<i>SYT, SSXT</i>	cBAF, ncBAF	<i>CG1055 5</i>	<i>k.A.</i>	k.A.	0,2
SS18L1	<i>CREST</i>				k.A.	k.A.
PHF10	<i>BAF45A</i>	PBAF	<i>k.A.</i>	<i>k.A.</i>	k.A.	0,5
BRD9	<i>k.A.</i>	ncBAF	<i>k.A.</i>	<i>k.A.</i>	k.A.	0,6
PBRM1	<i>BAF180</i>	PBAF	<i>k.A.</i>	<i>k.A.</i>	4	1,2
BRD7	<i>k.A.</i>	PBAF	<i>k.A.</i>	<i>k.A.</i>	0,1	k.A.
BICRA	<i>GLTSCR1</i>	ncBAF	<i>k.A.</i>	<i>k.A.</i>	k.A.	k.A.
BICRAL	<i>GLTSCR1L</i>				k.A.	k.A.

Tabelle 2. Die Synonyme der Komponenten des SWI/SNF Komplexes sowie deren durchschnittlichen Mutationsraten in verschiedenen Tumorentitäten.

Legende: Diese Tabelle verdeutlicht die Homologie zwischen den Untereinheiten des SWI/SNF Komplexes in den drei Spezies Homo sapiens (Mensch), Drosophila melanogaster und Saccharomyces cerevisiae. Gene werden kursiv geschrieben und benannt nach dem HGNC (HUGO Genome Nomenclature Committee) [121]. Die Zeile Alias enthält weitere Symbole, die teilw. veraltet sind, jedoch in der Literatur noch verwendet werden [19,69,115,126]. „Modul“ charakterisiert die Funktion. „k.A.“ (= keine Angabe) bedeutet, dass trotz einer detaillierten Suche keine weiteren Homologe anzugeben sind. Rechte Spalte veranschaulicht zwei große Studien, in denen die Mutationsraten der einzelnen Untereinheiten untersucht wurden, die Zahlen sind in Prozent angegeben und geben die durchschnittliche Mutationsrate in unterschiedlichen Tumorarten wieder, wobei „k.A.“ meint, dass die Mutationsrate nicht explizit erwähnt wurde. Somit sind zum Beispiel nach Shain und Pollack (2013) 9 % beziehungsweise nach Kadoch et al. (2013) 4,6 % aller Tumore von einer Mutation im *ARID1A*-Gen betroffen [50,103].

3.2.2 Der Aufbau des SWI/SNF Komplexes

Die 1,0 bis 1,5 MDa schweren SWI/SNF Komplexe werden aus bis zu 15 Untereinheiten zusammengesetzt, die ausgehend von 29 Genen kodiert werden, weshalb sich die genauen Kompositionen unterscheiden. Mashtalir et al. (2018) konnten zeigen, dass die Anordnung der Untereinheiten zu einem Komplex einem strikten Schema folgt [69]. Hervorzuheben ist, dass Proteine der ARID1-Subfamilie, ARID1A oder ARID1B, ausschließlich in BAF-Komplexen vorkommen und hier eine wichtige Verbindungsfunktion zwischen BAF-Kern und dem ATPase Modul bilden (siehe Abbildung 3). So ist ohne ARID1A oder ARID1B keine vollständige BAF-Komplexbildung möglich. Die Autoren beschreiben den gleichen Effekt für das Fehlen von ARID2: ein gescheiterter Aufbau des PBAF Komplexes [69].

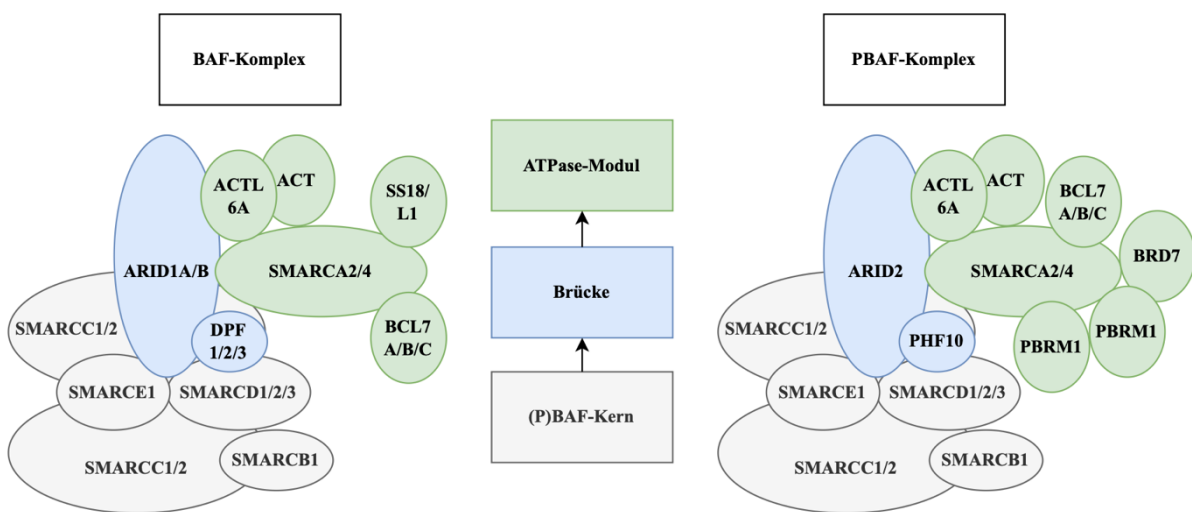


Abbildung 3. Aufbau des BAF und PBAF Komplexes nach Mashtalir et al. (2018) [69].

Legende: Diese Abbildung zeigt schemenhaft, dass die Brücke (blau) den Kern (grau) mit ATPase Modul (grün) verbindet. Sich überlappende Ellipsen stellen eine biochemische Interaktion dar: ARID1A/B mit ACTL6A, SMARCA2/4, SMARCC1/2, SMARCE1 und SMARCD1/2/3. ACT = β -Actin.

3.2.3 Die molekulare Funktionsweise des SWI/SNF Komplexes

Chromatin Remodeling Komplexe verändern die Chromatin Struktur auf drei unterschiedlichen Wegen: (a) Nucleosomenaufbau sowie -organisation, (b) Regulierung des Chromatinzugangs und (c) Nucleosomenbearbeitung (Hinzufügen oder Herausschneiden von Histonvarianten) [21].

SWI/SNF-Remodeling Komplexe erleichtern etwa den Zugang zu Chromatin, da sie Nucleosomen verschieben und ausstoßen können (siehe Abbildung 4 A-C) [21]. Im Detail führt ein Histonverlust zur Schleifenbildung in der DNA und nachfolgend binden Transkriptionsaktivatoren oder -repressoren erleichtert an diese nun zugänglicheren Stellen. Hierbei handelt es sich etwa um proximal von einem Gen gelegene Promotoren oder weiter distal gelegene Enhancer (siehe Abbildung 4 C) [136,138]. Der SWI/SNF Komplex reguliert insbesondere aktive Genbereiche, die durch acetyliertes Histon H3K27 gekennzeichnet sind (H3K27ac) [3,70]. Abgeschaltete Genbereiche, durch dreifach methylierte Histon

H3K27 Reste (H3K27me3) gekennzeichnet, werden vor allem durch die Histon-Lysin-N-Methyltransferase „Enhancer of zeste homologue 2“ (EZH2) als katalytische Untereinheit des „Polycomb repressor complex“ (PRC2) reguliert. Der PRC2 stellt somit einen Gegenspieler zum SWI/SNF-Komplex dar (siehe Abbildung 4 D) [75].

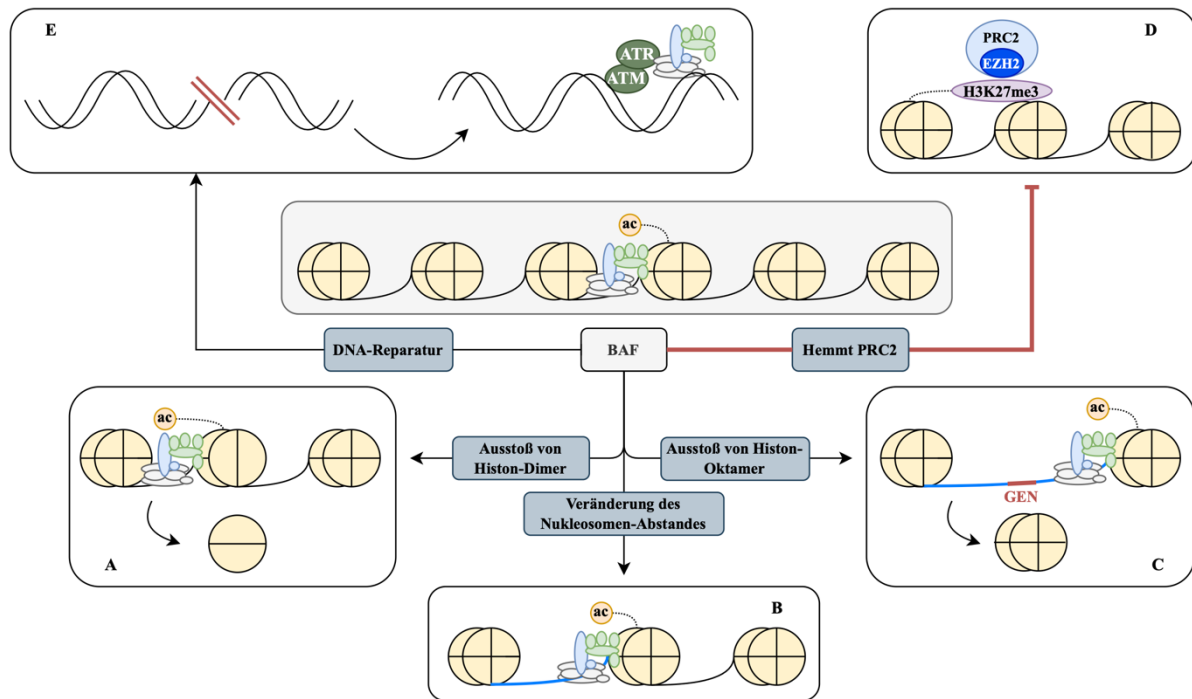


Abbildung 4. Funktionelle Zusammenfassung des SWI/SNF Komplexes.

Legende: (A-C): Das Chromatin besteht aus Histon-Oktameren (gelb) und der DNA-Helix (schwarze Linie). In der Nähe von Bereichen mit H3K27ac (orange) befindet sich der SWI/SNF-Komplex (grau/blau/grün, BAF). Dieser kann Histon-Dimere ausstoßen (A), die Nucleosomenabstände (B) verändern oder ganze Histon-Oktamer-Verluste (C) initiieren. Folglich werden DNA-Abschnitte als freie Schleifen (blau), und damit auch Gene (rot), freigelegt [21,120]; (D) Der PRC2 (hellblau) trimethyliert mit seiner katalytischen Untereinheit EZH2 (tiefblau) H3K27 Reste wird negativ durch den SWI/SNF-Komplex reguliert (rote Linie) [75]; (E) In Bereichen eines Doppelstrangbruchs (zwei rote Linien) werden Proteine wie ATM oder ATR (beide dunkelgrün) angereichert, die über den SWI/SNF-Komplex DNA-Reparatur Prozesse einleiten [105].

Durch die Fähigkeit des SWI/SNF Komplexes an vielen unterschiedlichen DNA-Bindestellen modulierend zu agieren, resultiert daraus ein breites Spektrum an Auswirkungen auf den Zellstoffwechsel (siehe Tabelle 2) [69,110]. Dabei konnten Raab et al. (2015) herausarbeiten, dass es einen wesentlichen Unterschied macht, welches der drei Proteine ARID1A, ARID1B oder ARID2 im Chromatin Remodeling Komplex enthalten ist, da sie jeweils eigene Cluster an Transkriptionsfaktoren in diesen Bereichen rekrutieren [91]. Daher wird im Folgenden die Proteinstruktur von ARID1A näher erläutert und in einen Zusammenhang mit der Funktion von ARID1A im SWI/SNF Komplex gebracht. Daneben soll ARID1B als weiteres Tumorsuppressor Protein vorgestellt werden.

3.3 ARID1A und ARID1B

3.3.1 Die Proteinstruktur von ARID1A und eine besondere Analyse der zwei Domänen ARID und BAF250_C

ARID1A ist ein Produkt des *ARID1A*-Gens, das auf Chromosom 1p, genauer in der Bande 1p36.11, gelegen ist [13]. Das Protein wird in drei Isoformen durch alternatives Splicing exprimiert und weist jeweils eine Länge von 1902, 2068 und 2285 Aminosäuren auf, wobei die längste Form als die Kanonische angesehen wird [13]. ARID1A ist ein nukleozytoplasmatisches Protein, wobei ein Ubiquitin-Proteasom System im Zellkern die ein Homöostase zwischen den beiden Kompartimenten reguliert [39].

ARID

Namensgebend für dieses 242 kDa schwere Protein ist die AT-rich interacting domain (ARID) [13], die sich vollständig innerhalb der Aminosäuren 1017 bis 1108 befindet [14]. Diese konservierte Domäne ist 88-95 Aminosäuren lang [29] und findet sich in 15 humanen Proteinen wieder [85]. Über diese Domäne interagiert ARID1A mit der DNA, was funktionell eine zentrale Rolle spielt (Abbildung 5) [36].

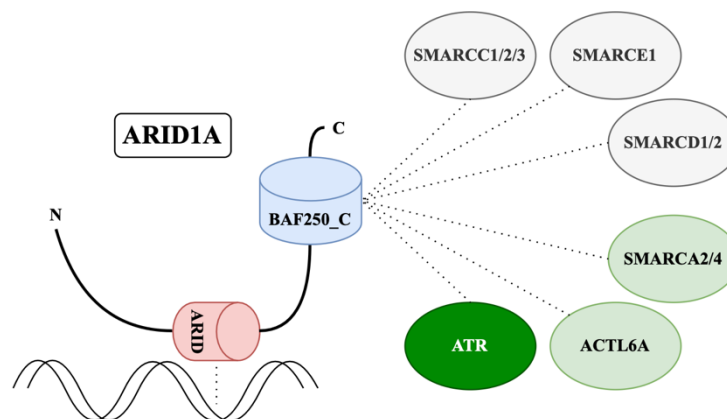


Abbildung 5. Schematische Darstellung des Proteins ARID1A und seinen Domänen.

Legende: ARID (rot) stellt eine Verbindung zur DNA her und BAF250_C (blau) fungiert als Brücke im BAF-Komplex, wobei hier die wichtigsten Partner in grau und hellgrün dargestellt sind. Weiterhin gibt es eine Interaktion mit ATR (dunkelgrün), welche für die DNA-Reparatur sehr wichtig ist.

BAF250_C

Im SWI/SNF Komplex ist hervorzuheben, dass ARID1A eine starke Verbindung zu anderen BAF-Kern Mitgliedern hat, wobei die C-terminale Region eine besondere Rolle spielt [69]. Mashtalir et al. (2018) benennen hier drei potenzielle Domänen [69], die vor Kurzem in PFAM als BAF250_C (PF12031) zusammengefasst wurden [86]. Sie enthält die Aminosäuren 1976 – 2231 und übt eine Vermittlerrolle zwischen dem BAF Kern über Interaktionen mit SMARCC1/2, SMARCD1/2/3 oder SMARCE1 und

dem ATPase Modul über SMARCA2/4 und ACTL6A aus (siehe Abbildung 5) [69]. Das nukleäre Exportsignal (2004-2021) liegt hingegen innerhalb der BAF250_C Domäne [14] und spielt eine Rolle in der Protein-Homöostase von Zytosol zu Zellkern [39].

3.3.2 Biochemische Analyse des Proteins ARID1B

ARID1B ist ein 244 kDa schweres Protein, das in seiner kanonischen Form 2319 Aminosäuren besitzt [13]. Sein Gen *ARID1B* ist auf dem Chromosom 6 in der Bande 6q25.3 zu finden [121]. Biochemisch gesehen ist das Protein ARID1B zu 59 % identisch zu seinem Paralog ARID1A [99]. Es besitzt eine ARID-Domäne innerhalb der Aminosäuren 1136-1227 [13] und kann dadurch wie oben bereits erwähnt funktionell betrachtet mit der DNA interagieren kann [14,85]. Im Bereich der Aminosäuren 2010 bis 2265 erstreckt sich die Domäne BAF250_C, die auch in ARID1A vorhanden ist [86]. Über diese Domäne kann ARID1B Interaktionen mit anderen SWI/SNF-Komplex Mitgliedern wie SMARCA2 oder SMARCA4 ausüben [108].

3.3.3 Beeinflusste Signalwege und Funktionen von ARID1A in Zellen und der funktionelle Unterschied zu ARID1B

Als Teil eines SWI/SNF Chromatin Remodeling Komplexes beeinflussen ARID1A, ARID1B und ARID2 in HepG2-Zellen, der Zelllinie eines hepatozellulären Karzinoms, die Expression von ca. 20 % aller Gene [91]. Die zentrale Rolle wird im Folgenden für ARID1A und ARID1B dargestellt. Exemplarisch wird zunächst die Rolle bei der DNA-Reparatur in *ARID1A*-kompetenten Zellen beschrieben, da dieser Signalweg ein potentiell therapeutisches Target ist (siehe Tabelle 3):

Ein DNA-Schaden kann etwa durch eine therapeutische Bestrahlung oder Chemotherapeutika hervorgerufen werden [105]. Entsteht dabei ein Doppelstrangbruch (DSB) führt dies zu einer Anreicherung von ATM (ataxia telangiectasia-mutated Protein) in dieser Region und es wird die Reparatur eingeleitet, wobei auch teilweise eine einzelsträngige Läsion entstehen und infolgedessen ATR (Ataxia telangiectasia and RAD3-related protein) aktiviert wird (siehe Abbildung 4 E) [23]. ARID1A bindet nun über seine BAF250_C Domäne an ATR, das somit als eine Art Gerüst für ARID1A zum DSB fungiert und verändert die Chromatinstruktur als Teil des SWI/SNF Komplexes dahingehend, dass der Schaden über eine homologe Rekombinationsreparatur (HR) oder die nicht homologe Endverknüpfung (engl. Non-homologous end-joining, kurz NHEJ) beseitigt werden kann, bei der mitunter das Enzym Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) eine Rolle spielt (siehe Tabelle 3) [23,105]. Weiterhin wird neben der Reparatur auch der G₂-M Checkpoint aktiviert, wodurch ein Übergang in die Mitose verhindert wird, und ein Zellzyklusarrest eintritt [105]. Durch diese beiden Schritte ist zum einen die DNA-Stabilität gewährleistet und zum anderen die Tumorentstehung sowie -entartung minimiert [75,105].

Weitere Signalwege, die durch ARID1A beeinflusst werden, sind in der nachfolgenden Tabelle 3 neben Auswirkungen eines *ARID1A*-Defektes und einer Therapieoption zusammengefasst.

Signalweg	Funktion/ Regulation	ARID1A Depletion	Therapie
PI3K(CA)/ AKT	Zellgröße; Proliferation; Zellmetabolismus; Genomstabilität; inhibiert durch ARID1A auf Transkriptionsebene [138]	Überaktivierung von AKT; in Pankreas: Strahlenresistenz erhöht [138]; in Ovar, Kolorektal, Brust: koinzidente Mutationen [18,50]	Ja [68,138]
Immun-checkpoint	Interleukin-6 Signalweg in Tumorigenese involviert [71]; ARID1A reguliert negativ PD-L1 [138]	In Ovar: anti-IL6-Knockdown oder Checkpoint-Inhibitoren mindern Tumorprogress [71,138]	Ja [68,138]
DNA-Reparatur	1. Fehlpaarungsreparatur (z.B. PARP) 2.1. Homologe Rekombinationsreparatur (z.B. PARP, ATR, ATM) 2.2. Nicht-homologe Endverknüpfung von DSB (z.B. PARP) [84,105]	Abnormale Chromosomenverteilung; Sensitivierung von Zellen für PARP-Inhibitoren oder Bestrahlung (DSB entstehen) [105]; in Magen: Mikrosatelliteninstabilität (MSI), Metastasierung, schlechtere Prognose [138]	PARP: ja ATR: ja [16,64,101,133]
TOP2A	Chromosomenkondensation, Chromatidenseparierung, Replikation [135]; ARID1A stabilisiert DNA-Lokalisierung von TOP2A [18]	Anaphasebrücken; Sensitivierung für ATR-Inhibition [135]	(Ja) noch keine klinischen Studien [68]
TERT	Erhalt reichender Telomerlänge bei hoher Proliferationsrate; ARID1A reguliert negativ (H3K9me) [71]	TERT-Transkription ↑ [68,71]; In Meningeomen: konkordanter Mutation hat schlechte Prognose [35]	k.A.
EZH2	Katalytische Untereinheit des PRC2, Histonmethyltransferase, produziert H3K27me3; SWI/SNF Komplex reguliert negativ [71]	In Meningeomen: PRC2 ↑[25,87]; dadurch Transkriptionsrate betroffener Gene gehemmt [71,136]	Ja [18,68]
HDAC	HDAC6 deacetyliert Lysinreste im Zytosol (Proteinhomöostase); ARID1A reguliert negativ [71]	In Ovar: HDAC2 [18] & HDAC6-Inhibition selektiv für <i>ARID1A</i> -mutierte Tumore [18,71]	Ja [18,68,138]
P53	Gering erhöht → Zellzyklusarrest, stark erhöht → Apoptose; direkte Interaktion (BAF_250C); ARID1A reguliert positiv p53 [71,138]	In Zelllinien von Endometrium und Ovar: Verringerte Expression tumorsupprimierender Gene (CDKN1A and SMAD3) [71,138]	k.A.
Zellzyklus, p21/WAF1	DNA-Schaden → ARID1A ↑ → p21 ↑ → Bindung an CDK2/4 → Zellzyklusarrest in G ¹ : ARID1A akkumuliert in G ⁰ ; ARID1A in hochproliferativen Zellen inaktiv [138]	In Lunge: Hochregulation von Cyclin D1 und Bcl-2, somit Inhibition der Apoptose [138]; in Ovar: Dasatinib-Behandlung induziert Expression von p21 [18]	k.A.
YAP/TAZ	Tumorwachstum, Metastasierung, hemmt ARID1A-haltige SWI/SNF-Komplexe; wird selbst durch ARID1A gehemmt [138]	In Leber: YAP-Hochregulierung → Tumorentstehung [138]; in Zervix: YAP1-Hemmung unterdrückt Tumorigenese [33]	Ja [33]
YES1	Regulierung von Zellwachstum, Zytoskelett und Differenzierung [18]	In Ovar: <i>ARID1A</i> -mutierte Tumoren abhängig von YES1 [71]	Ja [18,71]
BET (BRD2)	BET-Bromodomänen binden acetylierte Lysin-Histonreste → Transkriptionsregulation [18]	In Ovar: BET-Hemmung → selektive Inhibition von ARID1A-defizienten Zellen [18]	Ja [18,68]

Tabelle 3. Wichtige Signalwege, die durch den SWI/SNF-Komplex und speziell ARID1A beeinflusst werden und eine Rolle in der Pathogenese und Therapie von *ARID1A*-depletierten Tumoren spielen.

Legende: Neben dem Signalweg (linke Spalte) werden die Funktionsweise und der Regulationsmechanismus erläutert. Zudem erfolgt eine Analyse, welchen Effekt eine *ARID1A*-Fehlfunktion hat. Dabei meint „In ...“ (Organ), dass hierfür Tumore in diesem Organ untersucht wurden. In der rechten Spalte sind potentielle gezielte Therapiemöglichkeiten der einzelnen Signalwege dargestellt. „k.A.“ bedeutet es sind keine Studien anzugeben, die die Therapie möglich machen. Weitere Erklärungen siehe Text.

3.3.4 Die Rolle von ARID1A als Teil des SWI/SNF Komplexes in Tumoren

Im Jahr 2010 wurde *ARID1A* erstmals in klarzelligen und endometrioiden Ovarialkarzinomen mit einer Mutationsrate von 50 % entdeckt [48,132] und weitere Untersuchungen stellten die weitreichende, bis dahin unbekannte Rolle der Chromatin Remodeling Komplexe in Tumoren fest. So berichten Kadoch et al. (2013) sowie Shain und Pollack (2013), dass knapp 20 % aller Tumorentitäten Mutationen innerhalb des SWI/SNF Komplexes beinhalten [50,103].

Die Analyse von Shain und Pollack (2013) zeigt, dass *ARID1A* am häufigsten von Mutationen innerhalb des SWI/SNF Komplexes betroffen ist (siehe Tabelle 2) [103]. In absteigender Reihe folgen *SMARCA4*, *PBRM1*, *ARID2*, *ARID1B*, *SMARCA2*, *SMARCC1* und *SMARCC2* mit einer Frequenz von über 0,5 %. Die Analyse von Kadoch et al. (2013) konnte weiterhin zeigen, dass die Gene *ARID1A*, *SMARCA4*, *PBRM1*, *ARID2* und *ARID1B* nicht nur beiläufige Mutationen sind, sondern als Treibermutationen zu werten sind, die im Tumorgeschehen eine wichtige Rolle einnehmen [50]. Kadoch et al. (2013) beschreiben eine Entitäten-Spezifität wobei gynäkologische Tumore wie das endometrioide oder das klarzellige Ovarialkarzinom am häufigsten Mutationen des *ARID1A*-Gens enthalten [50].

Die Autoren haben daraufhin festgestellt, dass Tumore mit mindestens einer Mutation oder Deletion einer SWI/SNF Komplex Untereinheit in etwa 14,3 % aller Fälle auch Mutationen oder Deletion in anderen SWI/SNF Komplex Untereinheiten aufweisen. In mehr als einem Drittel der Tumore mit mehreren betroffenen Untereinheiten ist das *ARID1A* Gen betroffen [50].

Wang et al. (2020) konnten zudem in einem Mausmodell zeigen, dass weder der alleinige Verlust von *ARID1A* noch der von *ARID1B* zu einer tumorähnlichen Läsion in Mäuselebern führt, sondern erst ein gemeinsamer Doppelknockout von *ARID1A* und *ARID1B* sowohl hepatozelluläre als auch cholangiozelluläre Karzinome mit Metastasen und einen verfrühten Tod in den Mäusen hervorrufen. Neben diesem Mausmodell haben die Autoren auch in der Zelllinie eines Endometriumkarzinoms, MFE-296, diese synergistischen Effekte bestätigen können [127].

Aufgrund dieser Erkenntnisse scheint eine intensivere Untersuchung eines koexistenten Verlusts von *ARID1A* und *ARID1B* sinnvoll und soll in dieser Arbeit näher untersucht werden.

Funktionelle Erklärungsansätze für ARID1A-mutierte Tumore

Die Häufung von Mutationen im SWI/SNF Komplex in Tumoren ist nicht einfach kausal mit einem Ausfall des Komplexes zu begründen [75]. Allerdings weist das Verteilungsmuster der Nonsense- sowie Missense-Mutationen eine Häufung im C-terminalen Abschnitt auf, einem Bereich, der die BAF250_C Domäne beinhaltet [86] und eine wichtige Rolle in der Bindung von *ARID1A* zu anderen BAF-Untereinheiten besitzt. Eine gestörte Interaktion mit anderen Proteinen ist daher möglich, allerdings bleibt ein exakter Erklärungsmechanismus aus [69,127]. Möglicherweise spielt auch eine gestörte DNA-Bindung der ARID-Proteine eine Rolle, die bisher noch nicht konkretisiert werden konnte [127].

Eine gestörte DNA-Reparatur in *ARID1A*-mutierten Tumoren wird jedoch als eine wichtige Rolle angesehen (siehe Unterpunkt 2.3.2). Funktionell gesehen ist in einem ARID1A-depletierten Tumor insbesondere die Reparatur von Doppelstrangbrüchen eingeschränkt. Das Fehlen von ARID1A vermindert die ATR-Aktivität, was nachfolgend zu einer Störung in der Aktivierung des G₂-M Checkpunktes führt (siehe 3.3.3). Die Konsequenz ist, dass trotz fehlerhafter DNA ein Zellzyklus Arrest ausbleibt und eine Entartung möglich ist. Um den therapeutischen Ansatz zu verstehen, muss erwähnt werden, dass diese Zellen trotzdem in der Lage sind Einzelstrangbrüche über andere Enzyme, wie beispielsweise PARP-1, zu beseitigen. Daher führen PARP1-Inhibitoren in *ARID1A*-mutierten Tumoren zu einer gleichzeitigen Hemmung mehrerer DNA-Reparaturmechanismen. In der Folge entsteht ein zytotoxischer Effekt und die *ARID1A*-mutierten Zellen gehen nahezu selektiv in Apoptose über (siehe Tabelle 3) [105].

Aktuelle Studien zur Therapie von ARID1A-mutierten Tumoren

Luchini et al. (2015) konnten in einer Meta-Analyse von 5.651 Patienten zeigen, dass unabhängig von der Tumorentität eine *ARID1A* Mutation mit einem 2,55-fach erhöhten Sterberisiko und einem 1,93-fach erhöhtem Rezidivrisiko einhergeht, sodass eine spezifische Therapie dieser Gruppe in mehreren Studien geprüft wird und aktuell sinnvoll erscheint [65]. Nach Wu et al. (2013) wiesen 73 % der *ARID1A*-mutierten Tumore einen Expressionsverlust des Proteins auf [137], sodass insbesondere nachgeschaltete Signalwege, wie sie in Tabelle 3 dargestellt sind, als therapeutische Ziele dienen [68].

Weitere potentielle Angriffspunkte in *ARID1A* mutierten Tumore stellen hochregulierte PRC2 Komplexe dar mit dem EZH2-Inhibitor Tazemetostat [25,87], wie es beispielsweise in der klinischen Phase II Studie NCT05023655 untersucht wird [149]. Das auf dem Leukozyten gelegene Oberflächenprotein PD-1 (Programmed cell death protein 1) kann mittels des Medikaments Nivolumab inhibiert werden. Da in ARID1A-depletierten Tumoren eine Hochregulation dieses Proteins zu finden ist, wird dieser Signalweg in einer klinischen Phase II Studie NCT04957615 getestet [150].

Es gibt auch die Idee der kombinierten Therapie von *ARID1A*-mutierten Tumore mit einem PI3K-Inhibitor und dem PARP-Inhibitor Olaparib, die in einem Magenkarzinommodell eine Hemmung der Proliferation, Invasion und Migration zeigen [140]. Zudem gibt es einen Einzelfallbericht von einem Patienten mit einem duktalem Adenokarzinom des Pankreas, der mit dem PARP-Inhibitor Olaparib behandelt wurde und damit 13 Monate lang ein progressionsfreies Überleben aufwies (siehe Tabelle 3) [35,144].

3.3.5 *ARID1B*-Mutationen und damit assoziierte Erkrankungen

Es weisen sowohl ARID1A als auch ARID1B eine Regulation der neuronalen Stammzellen auf [108]. ARID1A spielt beispielsweise auch in pluripotenten Stammzellen eine wichtige Rolle, da es die Selbsterneuerungskapazität, die Differenzierung sowie die Zelllinien-spezifischen Entscheidungen moduliert [34]. ARID1B ist auch in eben diese Signalwege involviert [139], allerdings besitzt es teils gegenteilige Funktionen zu ARID1A [76].

Entsteht eine Haploinsuffizienz des *ARID1B*-Gens, wurde beispielsweise von Santen et al. (2012) beschrieben, dass dies mit dem Coffin-Siris-Syndrom vergesellschaftet sein kann [100]. Betroffene weisen eine geistige Behinderung aber auch schwere Sprachstörungen, grobe Gesichtszüge, Mikrozephalie, Entwicklungsverzögerungen und hypoplastische Nägel des fünften Fingers auf [108].

In der Tumorphathogenese wird *ARID1B* als Tumorsuppressorgen angesehen, wie bereits in Abschnitt 3.3.4 beschrieben. Aktuelle Studien berichten in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (engl. Non-small cell lung cancer, NSCLC) davon, dass *ARID1B* möglicherweise eine Rolle in der Entdifferenzierung von Tumorzellen besitzt. Allerdings betonen die Autoren, dass in ihrer Untersuchungsgruppe von 133 Patienten neben *ARID1B* auch *ARID1A* und *SMARCB1* mutiert waren [141]. Daneben soll eine Mutation des *ARID1B*-Gens in der Entität der NSCLC die Rolle einer Treibermutation einnehmen [114] und auch als prognostischer Marker eingesetzt werden [145,146]. Zhu et al. (2021) sowie Zhu et al. (2022) haben an insgesamt mehr als 5000 Patienten gezeigt, dass Mutationen der Gene *ARID1A*, *ARID1B* und *ARID2* eine höhere Wahrscheinlichkeit besitzen auf eine Immuncheckpoint-Therapie mittels PD-1 oder PD-L1 Inhibitoren anzusprechen [145,146].

3.4 Methoden zum Nachweis von ARID1A

Um das Protein ARID1A zu quantifizieren, werden in aktuellen Studien oftmals immunhistochemische Methoden eingesetzt. Beispielsweise Luchini et al. (2015) analysierten, dass 25 der 28 untersuchten Studien in ihrer Meta-Analyse zur Mortalität der ARID1A-depletierten Tumore die Immunhistochemie als Methode zur Klassifikation der ARID1A-Expression verwendeten [65]. Die anderen drei Studien nutzten dahingegen den genetischen Status. Hierbei ist anzumerken, dass neben der immunhistochemischen Bestimmung von ARID1A aktuell kaum Alternativen gibt. Daher ist eines der Ziele dieser Arbeit eine einfach handhabbare und breit einsetzbare Methode zu entwickeln, die quantitativ ist.

3.4.1 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie wird häufig verwendet, allerdings hat diese Methode ihre Limitationen, welche im Folgenden kurz beschrieben werden sollen. Zunächst ist wichtig zu erwähnen, dass die Immunhistochemie keine quantitative, sondern eine semiquantitative Methode ist [118]. Das bedeutet, dass lediglich bestimmte Bereiche der Proteinkonzentrationen abgeschätzt werden können und somit relativ subjektive Schätzungen gemacht werden [118,124].

Zudem gibt es pro Objektträger keine Kalibratoren, womit Unterschiede der einzelnen Schnitte in der Fixierung, dem Schnitt, der Antigendemaskierung, der Antikörperverdünnung etc. nicht objektiviert werden können. Die fehlende Nachkorrektur dieser Differenzen schränkt daher die an verschiedenen Tagen angefertigten Proben ein und eine Vergleichbarkeit ist herabgesetzt [118,124]. Daraus resultiert beispielsweise die Beobachtung einer Studie, dass bei der immunhistochemischen Auswertung eines Tumorschnittes eine intra-observer Variabilität von bis zu 50 % besteht. Das bedeutet, dass wenn ein

Pathologe den gleichen Schnitt ein zweites Mal beurteilt, er in 50 % der Fälle eine andere Bewertung durchführt als zuvor [17].

Ein weiteres Problem ist der Fakt, dass die immunhistochemische Färbung keine durchgehend lineare Beziehung zur Menge des Antigens oder Proteins besitzt. So ist es etwa so, dass nur bei niedrigen Antigenkonzentrationen eine lineare Steigerung des Signals auf eine gleichermaßen lineare Erhöhung des Proteins schlussfolgern lässt. Allerdings erfolgt bei höheren Proteinkonzentrationen eine Sättigung des Tests, sodass insbesondere hier keine lineare Beziehung mehr besteht [72,124]. Diese Beispiele beleuchten eindrucksvoll, dass die Messung mittels Immunhistochemie ihre Grenzen hat und insbesondere in der Fragestellung dieser Arbeit, ob es einen geringen – aber trotzdem messbaren – Unterschied in der ARID1A-Konzentration der beiden Gruppen von Meningeomen mit und ohne LOH von Chromosom 1p gibt, einen Unsicherheitsfaktor darstellt.

3.4.2 ELISA

In dieser Arbeit wird daher die quantitative Methode des Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) getestet [118,124]. Diese wird seit den 1960ern eingesetzt [61] und dient der objektiven Messungen von Proteinkonzentrationen mit Hilfe von Kalibratoren (= Standards), anhand derer eine Standardkurve erstellt wird (siehe Abschnitt 4.3.5), die dann dazu beiträgt, dass die eben angesprochenen Unterschiede der Fixierung, der Antikörperverdünnung, der Raumtemperatur, der Luftfeuchtigkeit, etc. mitberücksichtigt werden [10]. Somit wird ein Umrechnungsfehler der Messsignale in Proteinkonzentrationen minimiert und eine objektive Analyse gewährleistet.

Die Validierung des ELISAs erfolgt anhand der European Medicines Agency (EMA) und der U.S. Food and Drug Administration (FDA) Kriterien [31,122]. Diese Kriterien sind grundsätzlich für die Industrie geeignet, deren neu entwickelten Produkte anhand der Validierungsparameter gemessen werden. Eine Zulassung durch die EMA oder FDA kann dementsprechend nur bei Erfüllung der Validierungskriterien erfolgen. Der in dieser Arbeit entwickelte ELISA soll dennoch nicht für industrielle Zwecke genutzt werden. Die hohe Güte dieser Kriterien erlauben eine Qualitätssicherung, weshalb sich ein neu entwickelter ELISA daran messen lassen sollte.

Da es mehrere ELISA Methoden gibt – direkter, indirekter und Sandwich ELISA – ist es wichtig zu erwähnen, dass in dieser Arbeit mit einem indirekten ELISA gearbeitet wird. In diesem Verfahren werden zuerst Proteine auf eine Platte aufgetragen, anschließend mit primären sowie sekundären Antikörper beschichtet, wobei Letztere mit einem Enzym gekoppelt sind, das zur Umsetzung eines Farbstoffs dient. Zwischen diesen Schritten erfolgen regelmäßige Waschschrte, die zu einer höheren Spezifität führen sollen. Mit Hilfe eines Messgerätes werden dann Absorptionswerte gemessen, die zur Umrechnung in Konzentrationen verwendet werden [44].



4 Material und Methodik

4.1 Gewebeproben

Die LOH 1p Analyse von Meningeomen wird seit einiger Zeit standardmäßig am Institut für Neuropathologie durchgeführt (Etablierung siehe Ethikantrag Nr. 178-07; Ärztekammer des Saarlandes), sodass keine zusätzlichen klinischen Tests oder Probenentnahmen für die Patienten anfallen. Diese Studie wird an bereits reseziertem, überschüssigem Tumorgewebe durchgeführt. Neben der bestehenden Tumordiagnostik im Rahmen der neuropathologischen Routine des Universitätsklinikums des Saarlandes wird lediglich eine weitere Untersuchungsmethode (proteinbasierter ELISA) eingeführt. Für die Analyse des 6q-Status werden neue Sonden eingeführt und getestet. Einschlusskriterien zur Studie sind Patienten, deren Meningeome im Zeitraum seit 2018 in der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes reseziert wurden und bei denen ausreichend Tumormaterial zur Verfügung stand. Außerdem sollte in der Studie ein hoher Anteil an Tumoren mit Chromosom 1p-Verlusten sowie einige Tumore ohne LOH 1p als Kontrollgruppe vorhanden sein, um eine aussagekräftige Antwort liefern zu können. Ausgeschlossen von dieser Studie sind Proben, die nicht genügend Restmaterial enthalten oder nach Diagnoseabschluss kein Meningeom sind. Die Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes hat diese Arbeit durch ein positives Ethikvotum genehmigt (Ethikantrag Nr. 51/22).

Nr.	Alter	Sex	Histologischer Subtyp	WHO-Grad	Rezidiv	Lokalisation	LOH 1p	LOH 6q	TERT-Mutation	CDKN2A/B Deletion
1	53	MA	AM	2	-	Temporal	LOH	/	-	-
2	50	W	CM	2	-	Multifokal	LOH	/	-	-
3	68	MA	ME	1	-	KBF	LOH	2/3	-	-
4	63	W	ME	1	-	Falx	LOH	4/4	-	-
5	72	MA	ME	1	-	Multifokal	LOH	-	-	-
6	63	MA	ME	1	-	Falx	LOH	1/1	-	-
7	58	W	ANGM	1	-	Frontal	LOH	-	-	-
8	64	W	ME	1	-	Frontal	-	1/1	-	-
9	68	W	ME	1	R	Multifokal	LOH	2/3	-	-
10	76	MA	MM	1	R	Okzipital	LOH	-	-	-
11	43	W	ME	1	-	Parietal	LOH	-	-	-
12	82	W	ANM	3	R	Parietal	LOH	1/4	-	Verlust
13	82	W	ANM mit Hirninfilt-ration	3	-	Frontal	LOH	1/1	C228T	-
14	53	W	ME	1	-	KBF	-	-	-	-
15	62	MA	AM	2	R	Multifokal	LOH	-	-	-
16	84	MA	AM	2	R	Okzipital	LOH	2/4	-	-
17	70	W	AM	2	-	Multifokal	LOH	1/3	-	-
18	60	W	ME	1	R	Multifokal	LOH	-	-	-
19	58	MA	ME mit Durainf.	1	-	KBF	LOH	1/2	-	-

20	49	MA	ANM mit CM- Anteilen	3	R	Multifokal	LOH	3/4	-	-
21	35	W	ME	1	-	Temporal	LOH	1/4	-	-
22	62	W	KM mit Hirninf.	2	-	Temporal	LOH	1/3	-	-
23	49	W	ME	1	-	Okzipital	LOH	1/2	-	-
24	44	W	ME	1	-	Frontal	LOH	1/4	-	-
25	29	MA	ME	1	-	Temporal	LOH	1/3	-	-
26	62	W	AM	2	R	Parietal	LOH	1/4	-	-
27	57	W	ME	1	-	Frontal	LOH	-	-	-
28	64	MA	ME	1	-	Frontal	LOH	2/3	-	-
29	80	MA	ME	1	-	Frontal	LOH	-	-	-
30	68	W	AM	2	-	Olfaktorius	LOH	2/4	-	-
31	66	W	PM	1	-	Falx	LOH	1/3	-	-
32	60	W	ANM mit Hirninf.	3	-	Petroclival	LOH	-	C228T	-
33	64	W	AM	2	R	KBF	LOH	-	-	-
34	84	MA	ANM	3	R	Frontal	LOH	1/4	-	Verlust
35	68	W	ME	1	R	Falx	LOH	-	-	-
36	58	W	MM	1	-	Olfaktorius	-	-	-	-
37	79	W	ME	1	-	Olfaktorius	-	-	-	-
38	80	W	FM	1	-	Petroclival	-	-	-	-
39	55	W	M mit BW-inf.	1	-	Spinal	-	-	-	-
40	92	W	ME	1	-	Spinal	-	-	-	-
41	71	MA	ANGM	1	-	Parietal	-	1/4	-	-
42	88	W	AM mit Hirninf.	2	-	Olfaktorius	-	-	-	-
43	63	W	ME	1	-	Okzipital	-	-	-	-
44	57	MA	ME	1	-	Petroclival	-	-	-	-
45	45	W	ANGM	1	-	KBF	-	1/4	-	-
46	62	W	ME	1	-	Petroclival	-	-	-	-
47	70	W	MM mit Durainf.	1	R	Frontal	-	-	-	-
48	70	MA	AM mit Hirninf.	2	-	Olfaktorius	-	-	-	-
49	34	MA	AM	2	-	Okzipital	-	-	-	-
50	67	W	PM	1	-	Frontal	-	-	-	-
51	83	W	SM	1	-	Frontal	-	-	-	-
52	85	MA	ME	1	-	Frontal	-	-	-	-
53	67	MA	ME	1	-	Olfaktorius	-	-	-	-
54	90	MA	AM	2	-	Frontal	-	-	-	-
55	70	MA	MM	1	R	Multifokal	-	-	-	-
56	60	W	ME	1	-	Parietal	-	-	-	-
57	69	W	AM	2	-	Spinal	-	-	-	-
58	80	MA	AM	2	-	Frontal	-	-	-	-
59	70	MA	AM	2	R	Temporal	-	-	-	-
60	78	W	ME	1	-	Frontal	-	-	-	-
61	81	W	ME	1	-	Spinal	-	-	-	-

Tabelle 4. Patientenproben.

Legende: In der dritten Spalte („Sex“ engl. für Geschlecht) steht „MA“ für männliche Patienten, „W“ für weibliche. In der vierten Spalte steht „ME“ = Meningeom, nicht näher bezeichnet, „ANGM“ = An-

giomatöses Meningeom, „MM“ = Meningotheliales Meningeom, „PM“ = Psammomatöses Meningeom, „SM“ = Sekretorisches Meningeom, „FM“ = Fibröses Meningeom, „AM“ = Atypisches Meningeom, „CM“ = Chordoides Meningeom, „KM“ = Klarzelliges Meningeom, „ANM“ = Anaplastisches Meningeom. Die Abkürzung „Durainf.“ steht für eine Durainfiltration, entsprechend „Hirninfl.“ für Hirninfiltration. „R“ steht dafür, dass das Meningeom ein Rezidiv ist, „-“ sofern es keines ist. „KBF“ steht für Keilbeinflügel. Die Bezeichnung der Spalte „LOH 1p“ meint einen loss of heterozygosity, wenn ein „LOH“ vorhanden ist oder präziser bei den 6q-Sonden, bei denen die auswertbaren Sonden (y) ins Verhältnis gesetzt werden zu denen, bei denen ein LOH zu beobachten ist (x), sodass x/y angegeben wird. „-“ meint keinen Ausfall einer Sonde, somit kein LOH. „/“ gibt an, dass keine Auswertung erfolgen konnte. Für *TERT*-Mutationen wird auf eine C228T-Mutation gescreent, für *CDKN2A/B* Deletionen wird ein Verlust untersucht.

4.2 Loss of heterozygosity (LOH)

	D1S1608	D1S548	D1S1592	D1S1161	D1S1184	ARID1A
Binde-region	1p36.32	1p36.23	1p36.13	1p35.2	1p31.3	1p36.11
DNA-Sequenz	5'GATGGC TTTTGGG GACTATT 3' 5'CACTGA GCCAAGT GACACAG 3'	5'GAACCT CATTGGC AAAAGG AA3' 5'GCCTCT TTGTTGC AGTGATT 3'	5'GGTGA CAGGTAT TGACTGC C3' 5'TTGAG GGCAGA GATTGTC TC3'	5'AGAAT GGTGTGA ACCCAGG 3' 5'AAGGA TTATACA GCAGCTG TT3'	5'AGCCA AGATCAT GCCACTG 3' 5'CCTCCT GGCAAA ATATCCA T3'	5'AACCC ACTGTCT CTTTGGG AAGGC3' 5'TGAGC CAAGATT GGA3'
Länge	278 bp	163 bp	239 bp	299 bp	258 bp	222 bp
Annealing	53 °C	53 °C	53 °C	53 °C	53 °C	56 °C
Firma	Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany					

Tabelle 5. Mikrosatelliten und Sonden für Chromosom 1p [12].

	D6S281	D6S440	D6S473	D6S1633
Binde-region	6q27	6q25.1	6q25.2	6q25.3
DNA-Sequenz	5'CTGGTAGTGT CAGGCATGGC3' 5'CCTATGTTTC AGGCAAAGGC3'	5'GCTAAGGAT AACTTTCTGCT AGAC3' 5'TTCTTCATTT TACGGATGG3'	5'AGAACTTGGT ATTCCTGCC3' 5'GCCACCTTGA GGAGTTT3'	5'TCATGGAGCTT ATAGCCTGG3' 5'TTCCTTGATGT TATCAGGACAC3'
Länge	209 bp	271 bp	184 bp	127 bp
Annealing	56 °C	56 °C	56 °C	56 °C
Firma	Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany			

Tabelle 6. Mikrosatelliten und Sonden für Chromosom 6q.

Mit Hilfe einer PCR (polymerase chain reaction, engl. für Polymerase-Kettenreaktion) werden die beiden Tumorsuppressorgene *ARID1A* und *ARID1B* auf einen „loss of heterozygosity“ oder kurz LOH untersucht. Wie in Abschnitt 3.1.7 beschrieben, ist bei einem LOH nur noch ein Allel des zu untersuchenden Gens vorhanden. Funktionell kann dies letztlich eine Inaktivierung des Gens bedeuten, die mit der Tumorphagenese verknüpft ist [96].

In der Methode der PCR macht man sich diesen Allelverlust zu Nutze, indem man Mikrosatelliten beziehungsweise short tandem repeats (STR) im untersuchten Gen selbst oder in der näheren Umgebung des Gens verwendet. Diese STR variieren in ihrer Länge von Mensch zu Mensch [32], sodass immer ein Vergleich der Tumorproben mit dem Blut des Patienten erfolgen muss, um einen Verlust im Tumor des entsprechenden Mikrosatelliten festzustellen. Wie nachfolgend beschrieben wird daher ein Verlust, sichtbar durch eine verringerte Signalintensität des PCR-Produktes in der Tumorprobe, immer erst nach einem Vergleich mit der Blutprobe als positives Ergebnis – LOH – gewertet.

Die Interpretation ist ein Chromosomenteilverlust beziehungsweise eine Mikrodeletion des Mikrosatelliten. Allerdings kann auch eine Annahme für die nähere Umgebung getroffen werden, sodass auch von einem Gen zentromer oder telomer gelegene STR einen zusätzlichen Verlust des untersuchten Gens nahelegen, allerdings nicht beweisen.

Die in dieser Arbeit verwendete LOH-Analyse für das Chromosom 1p (siehe Tabelle 5) und insbesondere die Region von *ARID1A* entstammen der Doktorarbeit von Katrin Bartelmei [12], die die Primer selbst mitentworfen hat und das dazugehörige Protokoll entwickelt hat. Teile dieses Protokolls stammen aus der Publikation von Hartmann et al. (2005), das routinemäßig für Oligodendrogliome im Labor der Neuropathologie angewandt wird [42]. Die PCR-Sonden für das Chromosom 6q (siehe Tabelle 6) und das dazugehörige Protokoll werden im Rahmen dieser Arbeit eigens erarbeitet, allerdings basieren sie auf den beiden zuvor bereits beschriebenen Methoden und stimmen mit diesen in vielen Punkten überein, sodass die nachfolgenden Schritte – sofern keine explizite Erwähnung erfolgt – sowohl für Sonden des Chromosoms 1p als auch 6q gelten.

DNA-Isolierung

Zunächst wird aus nativem Tumorgewebe oder einem in Paraffin fixierten Schnitt des Tumors die DNA isoliert. Weiterhin wird auch DNA aus dem Blut des gleichen Patienten isoliert, sodass ein Vergleich der Signalintensitäten möglich wird, wobei die venöse Blutprobe in einem EDTA-Röhrchen transportiert wird. Sofern keine Blutprobe des Patienten vorlag, wurde die DNA aus Teilen der Meningen – also nicht tumorös veränderten Anteilen – des in Paraffin fixierten Schnittes isoliert, als Kontrolle des patienten-spezifischen Bandenmusters. Alle bisher erwähnten Schritte erfolgten im Rahmen der routinemäßigen neuropathologischen Molekulardiagnostik mittels des QIAamp DNA Micro Kit nach Anweisungen des Herstellers (56403, Qiagen, Deutschland) unter Zuhilfenahme des ThermoMixer C (Eppendorf).

Primer-Mix, Kombination mit der isolierten DNA und Negativ-Kontrolle

Pro Probe werden 1 µl Primer-Mix (forward und reverse Primer jeweils 20 pmol/µl, Eurofins Genomic) des entsprechenden Mikrosatelliten zu 12,5 µl „Hot-Star Master-Mix“ (Qiagen) und 10,2 µl Wasser sowie 1,3 µl DNA pipettiert. Dies wird sowohl für Tumor-DNA als auch für Blut-DNA durchgeführt. Eine mögliche Kontamination muss aufgedeckt werden, sodass in jeder Versuchsreihe eine Negativ-Kontrolle etabliert wurde. Hierbei enthält die sogenannte No-Template-Control (NTC) keine Proben-DNA, weder aus dem Tumor noch aus dem Blut, sondern stattdessen 1,3 µl RNase-freies Wasser.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Der Primer-Mix ist nun mit der isolierten DNA vermischt, wobei die Sequenz zwischen dem Primer-Paar im folgenden Schritt vervielfältigt werden soll, was einer Polymerase-Kettenreaktion entspricht. Hierfür wurde ein etabliertes Protokoll in dem Mastercycler MC Nexus X2 (6337000019, Eppendorf) ausgeführt. Die Schmelztemperatur bestimmt die Anlagerungstemperatur, sodass entsprechend die Temperaturen entsprechend der Tabelle 6 für jeden Primer angepasst werden. Die Polymerase-Kettenreaktion kann in vier aufeinanderfolgende Schritte eingeteilt werden, die in Tabelle 7 dargestellt sind.

Reaktion	Schritt	Temperatur in °C	Dauer	Wiederholung
Denaturierung	1	94	15 min	1 x
	2	94	30 sec	37 x
Anlagerung	3	53 bzw. 56	40 sec	
Elongation	4	72	40 sec	
	5	72	5 min	1 x
Ende	6	4	Ende	Bis manuelle Beendigung

Tabelle 7. Polymerase-Kettenreaktion.

Der erste Schritt ist die Denaturierung der Proben bei 94 °C, wobei insbesondere die zwei komplementären DNA-Doppelstränge voneinander getrennt werden, sodass die DNA einzelsträngig vorliegt [129]. Die initiale Denaturierung in Schritt 1 mit einer Dauer von 15 Minuten führt außerdem zu einer Aktivierung der Taq-Polymerase im Hot-Star Master-Mix (203445, Qiagen) [129].

An die Einzelstränge der DNA sollen sich nun die Primer anlagern, wobei wie eben erwähnt jeder Primer seine optimale Anlagerungstemperatur – 53 °C oder 56 °C (vgl. Tabelle 5, Tabelle 6) – besitzt, auf welche die Probe nun abgekühlt wird. Da jeder Primer eine komplementäre Sequenz zu seiner DNA-Zielsequenz aufweist, wodurch er spezifisch an dieser Stelle binden kann, soll durch eine optimale Anlagerungstemperatur möglichst sensitiv ein spezifisches Produkt gebildet werden. Im Rahmen einer Problemsuche ist es daher wichtig zu wissen, dass zu niedrige Temperaturen insbesondere zu unspezifischen Produkten führen können und bei zu hohen Temperaturen typischerweise die Primer-Anlagerung erschwert sein kann, sodass kein PCR-Produkt gebildet wird [129].

Nachfolgend füllt die sich anlagernde Taq-Polymerase den Strang auf und produziert somit die gesuchte DNA-Sequenz, die vom forward und reverse Primer flankiert wird. Die Elongation erfolgt bei 72 °C, dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase [129].

In diesem Zyklus, der 37-mal wiederholt wird, erfolgen stetig die drei Schritte Denaturierung, Anlagerung und Elongation, sodass die Menge der gesuchten DNA-Sequenz sich pro Zyklus verdoppelt [129]. Anschließend kühlt der Mastercycler MC Nexus X2 (Eppendorf) die Proben auf 4 °C ab, die entweder direkt weiter analysiert oder bei -20 °C eingefroren wurden.

Gel-Elektrophorese auf dem Flash-Gel

Nach der Polymerase-Kettenreaktion werden die PCR-Produkte, weiterhin 25 µl, mit 50 µl Probenpuffer (Sample Loading Buffer (5x), 30 34, abc biopply, Switzerland) vermischt (Verhältnis 1:2). Anschließend werden 1,5 µl davon in die Taschen des FlashGel™ Systems pipettiert, wobei FlashGel™ DNA Cassettes, 2,2 % (57032, Lonza, Switzerland) und FlashGel™ DNA Marker, 50 bp – 1.5 kB, (57033, Lonza) verwendet werden. Anschließend wird ein Spannungsfeld angelegt und die PCR-Produkte der Größe nach aufgetrennt und Bilder mit Hilfe des FlashGel Camera Packs (857065, Lonza) aufgenommen und gespeichert. Diese Analyse diene lediglich zur Überprüfung der entstandenen PCR-Produkte und nicht einer LOH-Analyse per se aufgrund der unschärferen Trennung der Banden.

Gel-Elektrophorese auf dem Spreadex-Gel

Von allen Proben, in denen sicher PCR-Produkte nachgewiesen werden konnte mittels Flash-Gel, wurden 1,5 µl der PCR-Produkte auf einem Spreadex™ EL 800 Wide Mini (3446.01, Serva, Deutschland) zusammen mit DNA-Gelelektrophorese Größenmarkern (Spreadex-Gel) anschließend zur LOH-Analyse in die Taschen des Spreadex® EL 800 Wide Mini (Serva) pipettiert. Dieses Gel wiederum liegt im Tris-Acetat-EDTA-Puffer (42548.01, TAE-Puffer (40x), Serva) des submarinen horizontalen Gelelektrophorese-Systems (Origins by Elchrom™ Scientific, AL-Labortechnik & Diagnostik GmbH, Österreich, AL), der sogenannten LOH-Laufkammer. In dieser wird bei 120 V und 54 °C eine Gel-Elektrophorese durchgeführt. Nach Abschluss dieses Schrittes wird das Gel mit Aqua dest. gespült und 30 Minuten lang mit SYBR-Gold (0,8x TAE, 0,8x Entfärbelösung (3037.01, Serva), 2x SYBR Gold, (S11494, Thermo Fisher Scientific, USA)) gefärbt und anschließend wieder mit Wasser gespült. Das Bandenmuster unter UV-Licht mit Hilfe des Programms „EOS Utility“ (Canon, Deutschland) dokumentiert.

Die Bilder werden im direkten Vergleich von Tumor und Kontrollgewebe (Blut beziehungsweise Nicht-Tumorgewebe) einer LOH-Analyse unterzogen. Dabei stellt die Kontrollprobe die beiden Allele des Patienten dar, die aufgrund ihrer spezifischen Größe unterschiedliche Laufzeiten auf dem Spreadex-Gel aufweisen. Weist der Tumor die gleichen zwei Banden auf, wird er als heterozygot gewertet. Der Verlust einer Bande, sichtbar durch eine geringe Signalintensität, wird als loss of heterozygosity (LOH) gewertet. Fälle, in denen das Kontrollgewebe nur eine Bande aufweisen, werden als homozygot charakterisiert und können daher nicht ausgewertet werden (vgl. Tabelle 23).

4.3 ELISA

Ein ELISA erfordert zunächst eine Optimierung, anschließend eine Standardisierung und zuletzt eine Validierung, um eine verlässliche Quantifikationsmethode zu sein [73]. In diesem Abschnitt werden die nötigen Grundlagen und Randbedingungen zur Validierung eines ELISAs erläutert.

Leitlinien zur Validierung einer bioanalytischen Methode

Die European Medicines Agency (EMA) und die U.S. Food and Drug Administration (FDA) haben Leitlinien erstellt, nach denen Firmen geprüft werden, ob Produkte die dort beschriebenen Kriterien erfüllen. Diese Leitlinien besitzen separierte Abschnitte für „Ligand binding assays“ (LBA, engl. für Ligandenbindungstests), die unter anderem die Methode des ELISAs miteinbeziehen [31,122].

Daneben gibt es Publikationen, die sich mit der detaillierten Erstellung einer Standardkurve beschäftigen, wobei Kelley et al. (2015) und Azadeh et al. (2017) als Hauptquellen zur Erstellung der Validierung des ELISAs dieser Arbeit dienen [10,52].

4.3.1 Auswahl der ELISA-Platte

Es ist entscheidend die richtige ELISA-Platte auszuwählen, da es unterschiedliche Modelle mit distinkten Eigenschaften gibt. Die Hersteller beschreiben welche Kriterien zu Rate gezogen werden sollen, wobei vor allem die Hydrophobizität, auch Hydropathie genannt, eine Rolle spielt.

Deshalb wurde zunächst analysiert, ob ARID1A ein hydrophiles oder ein hydrophobes Protein ist. Dabei wurde der GRAVY (engl. Grand average of hydropathicity index) verwendet, der von Kyte und Doolittle (1982) vorgeschlagen wurde [59]. In dieser Modellierung besitzen hydrophobe Aminosäuren positive Werte bis 4,5 (Aminosäure Isoleucin) und hydrophile Aminosäuren negative Werte bis einschließlich -4,5 (Aminosäure Arginin). Die Berechnung mit dem Expasy's ProtParam Server ergab für ARID1A einen Wert von -0,778 [29]. Barrios-Llerena et al. (2006) klassifizierten Proteine mit einem GRAVY-Score von über 0,3 als hydrophob, sodass ARID1A dementsprechend unter -0,3 lag und als hydrophil klassifiziert wurde [11].

Daher fiel die Auswahl der Platte auf NUNC MaxiSorp (VWR), da der Hersteller angibt diese sei für Proteine mit hydrophilem Charakter optimal nutzbar und außerdem habe sie eine hohe Bindungskapazität. Zudem erlaubt eine sehr geringe Beeinflussung der Proteinstrukturen eine optimale Antikörperbindung [81].

4.3.2 Lysatherstellung

Das Protokoll „Subcellular Protein Fractionation Kit for Tissues“ (Thermo Fisher Scientific) wurde für die Aufbereitung der untersuchten Kohorte angewandt. Mit diesem Protokoll kann gewährleistet werden, dass eine vollständige Extraktion insbesondere auch nukleärer Proteine – bspw. ARID1A – in das Lysat erfolgt. Daher erfolgt eine Trennung in vier Fraktionen. Der Einfachheit halber werden alle Fraktionen – Zytosol, Membran, Frei nukleär und Chromatin – immer mit einem großen Anfangsbuchstaben geschrieben. Dadurch wird eine Einheitlichkeit gewährleistet, auch wenn eine kleine Schreibweise von etwa der Fraktion Frei nukleär möglich wäre, wird davon abgesehen. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte der Lysatherstellung aufgelistet.

1. 100 mg Tumorgewebe einwiegen und in ein vorgekühltes 2 ml Lysat Röhrchen „Precellys Ceramic tubes“ (VWR) geben.
2. 1000 µl eisgekühltes CEB mit 10 µl Halt Protease Inhibitor Cocktail dazu pipettieren.
3. Für zweimal 30 Sekunden im Minilys Homogenisator (VWR) auf Stufe 3 homogenisieren.
4. Für 2 Minuten auf Eis stehen lassen, sodass sich der Schaum reduziert. Währenddessen einen Tissue strainer (engl. für Gewebesieb) in ein 15 ml Röhrchen stecken und dieses auf Eis kühlen.
5. Homogenisierte Lösung in das 15 ml Röhrchen pipettieren, sodass es im Tissue strainer aufgefangen wird (siehe Abbildung 7) oben.
6. Zentrifugieren bei 500 g für 5 Minuten in Zentrifuge EBA 8S (da Rotordurchmesser 85 mm, bei 2292 U/min $\approx 42,5$ % der maximalen Drehzahl von 5500 U/min).
7. Tissue strainer entfernen und sehr vorsichtig den Überstand (Zytosol Fraktion) in ein vorgekühltes 1,5 ml Röhrchen pipettieren.
8. Das entstandenen lockere Pellet wird nun mit 650 µl MEB und 6,5 µl Halt Protease Inhibitor Cocktail im 15 ml Röhrchen vermischt, für 5 Sekunden auf der höchsten Einstellung gevortext und anschließend in ein 1,5 ml Röhrchen überführt. Das Röhrchen wird nun für 10 Minuten auf Eis gestellt und gelegentlich leicht geschüttelt, sodass eine optimale Extraktion aus dem Pellet stattfindet.
9. Zentrifugieren bei 3.000 g für 5 Minuten in Zentrifuge Eppendorf.
10. Überstand (Membran Fraktion) in ein vorgekühltes 1,5 ml Röhrchen pipettieren.
11. Zum Pellet nun 225 µl NEB mit 2,25 µl Halt Protease Inhibitor Cocktail pipettieren, für 15 Sekunden auf der höchsten Einstellung vortexen und anschließend das Röhrchen für 30 Minuten auf Eis stellen und gelegentlich schütteln.
12. Zentrifugieren bei 5.000 g für 5 Minuten in Zentrifuge Eppendorf.
13. Überstand (Frei nukleäre Fraktion) in ein vorgekühltes 1,5 ml Röhrchen pipettieren.
14. Zum Pellet nun 170 µl NEB mit 1,7 µl Halt Protease Inhibitor Cocktail, 8,5 µl CaCl_2 und 5,1 µl Micrococcal Nuclease pipettieren, für 15 Sekunden auf der höchsten Einstellung vortexen und anschließend das Röhrchen für 15 Minuten in den Wärmeschrank bei 37 °C stellen.
15. Vortexen für 15 Sekunden auf der höchsten Einstellung und zentrifugieren bei etwa 22.000 g (höchste Einstellung) für 5 Minuten.
16. Überstand (Chromatin Fraktion) in ein vorgekühltes 1,5 ml Röhrchen pipettieren.

Um das Protokoll näher zu erläutern, wird in Abbildung 7 die Lysatherstellung illustriert, wobei anhand einer einzelnen Zelle schematisch dargestellt werden soll, welche Fraktionen welche Zellbestandteile enthalten. Die Fraktion Zytosol ist selbsterklärend, wobei in der Fraktion Membran vordringlich Zellmembran, Golgi-Apparat und endoplasmatisches Retikulum enthalten sind. Anschließend werden in der Fraktion Frei nukleär lösliche, nicht an DNA-gebundene Proteine aus dem Zellkern gelöst. Letztlich

werden schwer lösliche, an die DNA und somit das Chromatin gebundenen Proteine durch den Zusatz der MNase und das Erhitzen auf 37 °C in der Fraktion Chromatin in Lösung gebracht.

Zusätzlich werden in dieser Arbeit Summationsgruppen wie die Gruppe Kern (Frei nukleär plus Chromatin) und die Gruppe Gesamt (Zytosol, Membran, Frei nukleär und Chromatin) verwendet, wobei diese die jeweiligen Summen aus den jeweiligen Fraktionen darstellen und bei entsprechender Verwendung erläutert werden.

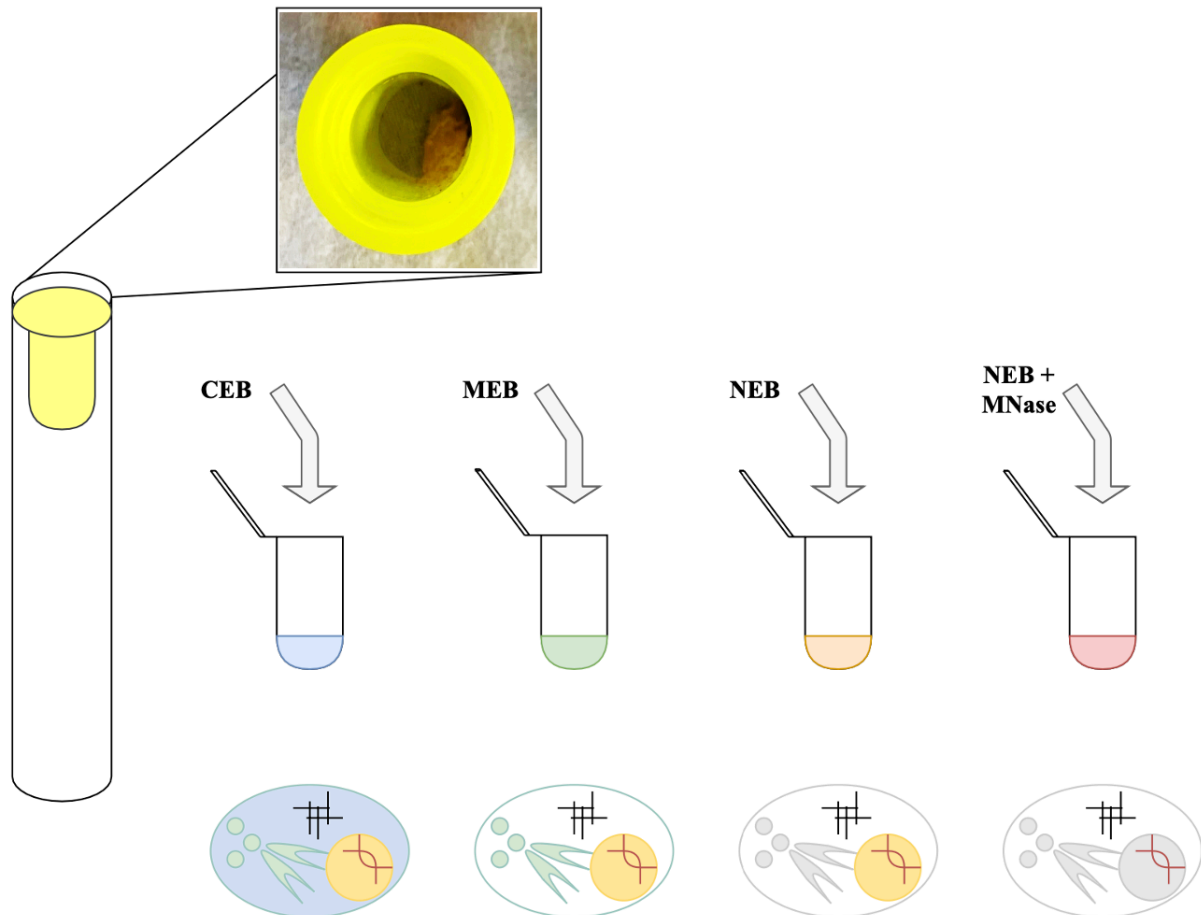


Abbildung 7. Lysatherstellung.

Legende: Abbildung nach „Subcellular Protein Fractionation Kit for Tissues“ (87790, Thermo Fisher Scientific). Der „Tissue strainer“ (gelb) fängt überschüssiges Meningeom Gewebe (Knochenfragmente sowie Bindegewebe) ab. Anschließend erfolgt eine Auftrennung mittels CEB, MEB, NEB und NEB mit MNase in die vier Fraktionen Zytosol (blau), Membran (grün), Frei nukleär (orange) und Chromatin (rot) nach Herstellerangaben. Das Zytoskelett (schwarze Linien) wird nicht in Lösung gebracht. Der Unterschied der Fraktionen Frei nukleär und Chromatin besteht darin, dass Erstere lösliche, nicht an DNA-gebundene Proteine aus dem Zellkern und Letztere die schwer löslichen, an die DNA und somit das Chromatin gebundenen Proteine enthält. Das Lösen der an die DNA-gebundenen Proteine erfolgt durch den Zusatz der MNase und Erhitzen auf 37 °C.

4.3.3 Protokoll BCA

Zunächst werden acht standardisierte Verdünnungen sowie ein Blank (engl. für Leerwert) hergestellt mit einer Konzentration des bovinen Serumalbumins (BSA) von 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 µg/ml nach Angaben des Herstellers zum „Pierce bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit“ (Thermo Fisher Scientific).

Die Standards werden als Duplikate, in manchen Versuchsreihen auch als Triplikate, mit 25 µl pro Well (engl. für Vertiefung) auf einer 96-Well NUNC MaxiSorp Platte (VWR) aufgetragen. Auch die Lysate werden als Duplikate mit 25 µl pro Well aufgetragen. Anschließend werden in ein 50 ml Röhrchen zuerst 20 ml Reagent A pipettiert und anschließend 400 µl Reagent B, sodass eine grünliche Flüssigkeit entsteht, die anschließend für 15 Sekunden bei höchster Einstellung gevortext wird, sodass eine regelrechte Durchmischung erfolgt. Es werden anschließend 200 µl pro Well mit einer Acht-Kanal-Pipette aufgetragen, sodass in jedem Well die Reaktion annäherungsweise gleichzeitig startet. Die Platte wird mit einem Parafilm-Zuschnitt bedeckt und für 30 Minuten bei 37 °C in den Wärmeschrank gestellt. Anschließend erfolgt eine Messung mit dem Omega FLUOstar (BMG Labtech, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 562 nm. Da der Hersteller eine Inkubation bis zu zwei Stunden erlaubt, wurde eine weitere Messung nach insgesamt einer Stunde und eine dritte Messung nach zwei Stunden Inkubation vorgenommen. Während diesen anderthalb Stunden wurde die Platte bei Raumtemperatur aufbewahrt, während sie mit Parafilm bedeckt war. Auf jeder Platte dienten Standards und Blanks als Referenzwerte, die eine Quantifizierung des gemessenen Signals (angegeben als OD = optische Dichte) ermöglicht.

4.3.4 ELISA-Protokolle für ARID1A und Histon H3

Der ELISA wurde als indirekter ELISA konzipiert und optimiert, wobei diese Ergebnisse in den Abschnitten 5.1 und 5.2 dargestellt werden. Das Protokoll, das zur Untersuchung der Patienten-Kohorte diente, soll im Folgenden vorgestellt werden (siehe Abbildung 8). Die Messung von Histon H3 erfolgt nach dem gleichen Protokoll. Der primäre Antikörper wurde auch 1:1000 verdünnt, lediglich der sekundäre Antikörper im Verhältnis 1:100 wurde verdünnt.

Materialien, die spezifisch zur Detektion von ARID1A im ELISA sowie zur Validierung verwendet wurden, sind Tabelle 8 zu entnehmen. Das ARID1A Fragment (Abnova) wird zur Erstellung der Standardkurve benötigt. Die *ARID1A* Wildtyp- und Knockout Zellpellets ab278824 (Abcam) und Zelllystae ab257250 (Abcam) werden zur Bestimmung der Spezifität im ELISA bzw. Western blot benötigt.

ARID1A-spezifische Materialien	Herstellername
ARID1A Fragment	ABN-H00008289-Q01, Abnova, Taipei, Taiwan
<i>ARID1A</i> knockout HEK-293T cell pellet	ab278824, Abcam, Cambridge, UK
<i>ARID1A</i> WT and KO Western blot Lysate	ab257250, Abcam, UK

Tabelle 8. Verwendete ARID1A-spezifische Materialien.

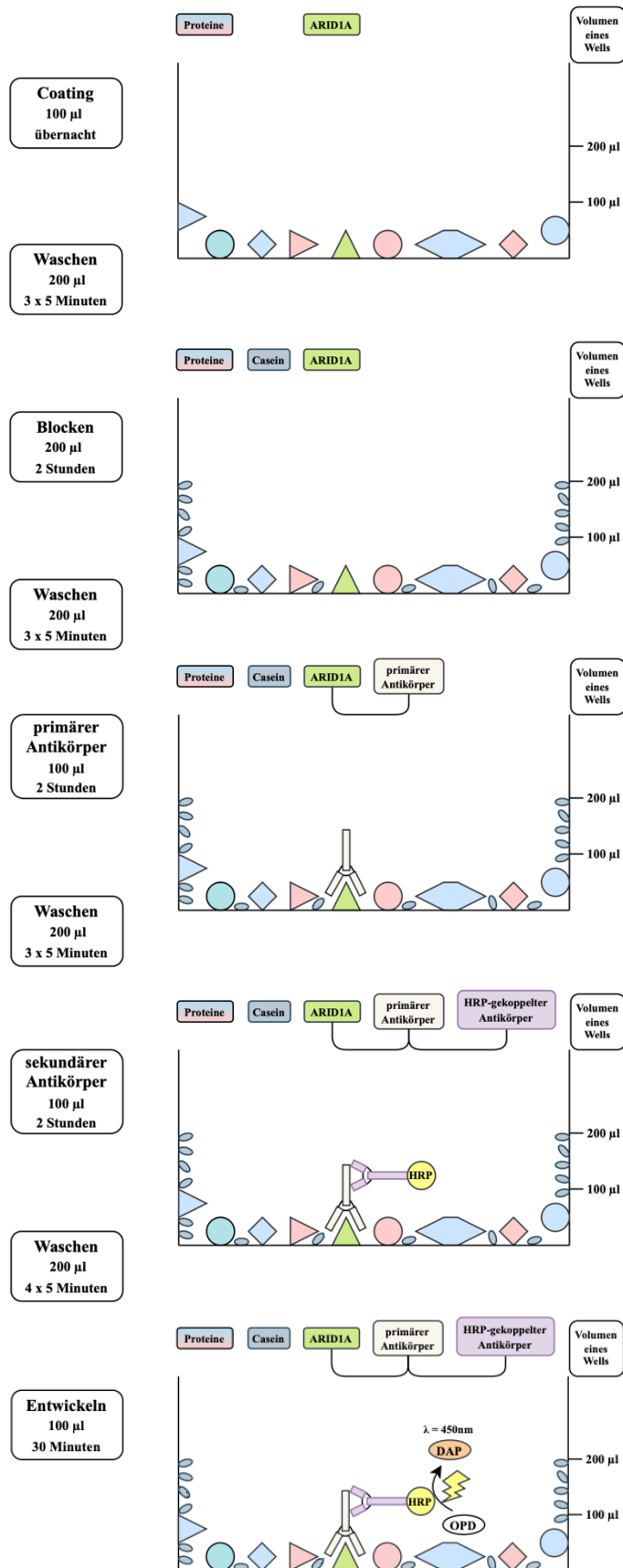


Abbildung 8. Schematische Darstellung des ELISA Protokolls.

Legende: Die Proteine (blau bis rot) lagern sich beim Coating (engl. für Beschichtung) an die Oberfläche der Wells an und freie Stellen werden durch Casein (grau) geblockt, um unspezifische Bindungen

- Coating:** Tumorlysaten 1:26 in Carbonat-Puffer pH 9,6 verdünnen. Jedes Lysat in Duplikaten mit 100 µl auftragen. Platte mit Parafilm bedecken und bei 4 °C im Kühlschrank über Nacht für 17-18 h inkubieren.
- Waschen:** Am nächsten Morgen Platte leeren. Anschließend Platte auf Papiertuch ausklopfen. 3 x 5 Minuten mit 200 µl/Well PBS pH 7,4 plus 0,1 % Tween-20 waschen. Dabei Platte auf Plattenschüttler stellen.
- Blocken:** Blocking Puffer 200 µl/Well pipettieren. Für 2 Stunden Inkubation auf Plattenschüttler.
- Waschen:** wie in Schritt 2.
- Primärer Antikörper:** 1:1000 in Blocking Puffer verdünnen und 100 µl/Well pipettieren. Platte mit Parafilm bedecken, 2 Stunden Inkubation.
- Waschen:** wie in Schritt 2.
- Sekundärer Antikörper:** 1:2 in Blocking Puffer verdünnen und 100 µl/Well pipettieren. Platte mit Parafilm bedecken, 2 Stunden Inkubation.
- Waschen:** wie in Schritt 2, allerdings 4 x 5 Minuten.
- Entwickeln:** Farbloses OPD (5 mg/10 ml) ansetzen und 100 µl/Well pipettieren. Bedecken mit Parafilm, dunkel lagern.
- 1. Messung** nach 30 Minuten Inkubation mit FLUOstar Omega bei 450 nm.
- Stoppen:** 100 µl/Well H₂SO₄ 2,5 mol/l (M); dann **2. Messung** bei 490 nm.

der Antikörper zu verhindern. Der ARID1A-spezifische primäre Antikörper (beige) aus der Spezies Hase (engl. rabbit) wird durch den anti-rabbit spezifischen HRP-gekoppelten Antikörper (violett) detektiert. Anschließend kann das noch ungefärbte OPD durch die Horseradish Peroxidase (gelb) in DAP (orange) umgewandelt werden, welches bei einer Wellenlänge (λ) 450 nm ein Absorptionsmaximum besitzt. Nicht dargestellt wird das Stoppen der HRP-Reaktion mittels H_2SO_4 , wodurch das Signal verstärkt wird. Es wird angedeutet, dass das Blocken mit Blocking Puffer (Casein 0,2 % in PBST 0,05 %) und Waschen mit 200 μl Volumen stattfinden, wobei alle anderen Schritte mit 100 μl durchgeführt werden.

4.3.5 Auswertung: Standardkurven-Analyse und Akzeptanzkriterien

Ein wesentlicher Schritt beim ELISA ist die Auswertung, da somit die gemessenen Werte zwischen 0 und 3,5 in der Einheit der optischen Dichte (OD), in eine geschätzte Konzentration mit der Einheit $\mu\text{g/ml}$ oder ng/ml umgerechnet werden können. Die Berechnungen werden mit der „MARS Data Analysis Software“ (BMG Labtech) und GraphPad Prism (Version 10.2.0 for Mac, GraphPad Software, USA) durchgeführt. Zunächst wurde von jedem Einzelmesswert der sogenannte Blank abgezogen, sodass „Blank korrigierte Messwerte“ entstehen. Der Blank ergibt sich aus der OD, die gemessen wird, wenn kein zu analysierendes Protein beim Coating (engl. für Beschichtung) aufgetragen wird. Durch diese Berechnung wird gewährleistet, dass jeder Messwert auf eine tatsächliche Interaktion mit einem Protein aus dem Lysat zurückzuführen ist und nicht etwa auf eine unspezifische Reaktion eines Antikörpers mit freien Stellen an der Plattenoberfläche oder dem Blocking Puffer. Zudem werden auch Absorptionen herausgerechnet, die durch abgelenkte Strahlen des Messgeräts aus anderen Wells entstehen.

Als nächstes wird aus den Standards und den dazugehörigen „Blank korrigierten Messwerten“ eine Standardkurve erstellt, wobei eine nicht lineare Regressionsanalyse durchgeführt wurde. Sowohl eine 4-parameter logistic (4PL) als auch eine 5-parameter logistic (5PL) wurden angewandt. Zudem wurden ein „weighted fit“ (engl. für gewichtete Passform) mit $\frac{1}{y^2}$ [10] und die Verwendung von Ankerpunkten erwogen, sofern dies die Modellierung optimierte [52]. Weiterhin wird eine Korrektheit (R^2 , engl. Correctness) von $> 97\%$ der Standardkurve vorausgesetzt [79].

Da sowohl jedes einzelne Experiment als auch die Zusammenschau aller Experimente validiert werden müssen, wurde die Validierung der Standardkurve aller Versuche mit GraphPad Prism (Version 10.2.0 for Mac, GraphPad Software, USA) durchgeführt. Hierbei wurden alle ELISA-Platten, insgesamt 11, aus den Versuchen analysiert. EMA und FDA fordern in dieser Untersuchung mindestens 6 Experimente an unterschiedlichen Tagen, gemessen in Duplikaten, was somit erfüllt wurde. Im AE-Modell („AE“ steht für „all experiments model“) dienen alle 11 Experimente der unterschiedlichen ELISA-Platten zur Erstellung einer einzigen Standardkurve. Wird eine Standardkurve hingegen nur aus den Duplikaten der Standards einer ELISA-Platte erstellt, so ist dies das EP-Modell („EP“ steht für „each plate model“). Es werden jeweils für alle 11 Experimente die Duplikate einer ELISA-Platte zur Erstellung einer Standardkurve im EP-Modell herangezogen.

Die folgenden Parameter dienen nach EMA und FDA der Validierung eines ELISA [31,122]:

Richtigkeit (engl. accuracy)

Dieser Wert beschreibt den Grad der Übereinstimmung eines gemessenen Wertes zu einem vorher definierten, erwarteten Wert (vgl. Abbildung 9). Das arithmetische Mittel der Richtigkeit aller Standards in einem Versuch ergibt die intra-assay Richtigkeit. Man kann auch die Richtigkeit aller Standards von mehreren Versuchen arithmetisch mitteln, um die inter-assay Richtigkeit zu erhalten.

$$\text{Richtigkeit (\%)} = \frac{\text{Messkonz}_{\text{Standard}X}}{\text{Sollkonz}_{\text{Standard}X}} * 100$$

Formel 1. Der ELISA-Validierungsparameter Richtigkeit.

$\text{Messkonz}_{\text{Standard}Xn}$: nach Modellierung gemessene Konzentration in Well n des Standards X .

$\text{Sollkonz}_{\text{Standard}X}$: erwartete Konzentration des Standards X , die auch in der Modellierung für den dazugehörigen Messwert angenommen wurde.

$$\text{Intra - assay Richtigkeit (\%)} = \frac{(\text{Richtigkeit}_{\text{Standard}1} + \dots + \text{Richtigkeit}_{\text{Standard}(n)})}{n_{\text{Standards}}}$$

Formel 2. Der ELISA-Validierungsparameter Intra-assay Richtigkeit.

Relativer Fehler $_{\text{Standard}1}$: Richtigkeit in % des ersten Standards

Relativer Fehler $_{\text{Standard}(n)}$: Richtigkeit in % des letzten (bzw. n -ten) Standards

$n_{\text{Standards}}$: Menge aller gemessenen Standards

$$\text{Inter - assay Richtigkeit (\%)} = \frac{(\text{Richtigkeit}_{\text{Standard}(1V1)} + \dots + \text{Richtigkeit}_{\text{Standard}(nVx)})}{n_{\text{Standards} * \text{Versuche}}}$$

Formel 3. Der ELISA-Validierungsparameter Inter-assay Richtigkeit.

Relativer Fehler $_{\text{Standard}(1V1)}$: Richtigkeit in % des ersten Standards im ersten Versuch

Relativer Fehler $_{\text{Standard}(nVx)}$: Richtigkeit in % des letzten (bzw. n -ten) Standards im x -ten Versuch

$n_{\text{Standards} * \text{Versuche}}$: Menge aller gemessenen Standards in allen Versuchen

Präzision (engl. precision)

Dieser Wert beschreibt den Grad der Übereinstimmung mehrerer Messwerte, die die gleiche zu analysierende Probe beinhalten, wenn für alle Versuche dasselbe Protokoll verwendet wurde (siehe Abbildung 7). Um diesen Parameter zu berechnen, wird die nachstehende Formel angewandt, bei der der Variationskoeffizient (engl. Coefficient of variation (CV)) die Präzision angibt:

$$\text{CV (\%)} = \frac{\text{Standardabweichung}_{\text{Standard}X}}{\text{Mittelwert}_{\text{Standard}X}} * 100$$

Formel 4. Der ELISA-Validierungsparameter Präzision.

Standardabweichung $_{\text{Standard}X}$: nach Modellierung errechnete Standardabweichung der Duplikate eines Standards X .

Mittelwert $_{\text{Standard}X}$: arithmetisches Mittel der zurückgerechneten Konzentrationen im Standard X .

Für die Präzision können auch intra-assay und inter-assay Werte berechnet werden, wobei Formeln 2 und 3 analog zu verwenden sind.

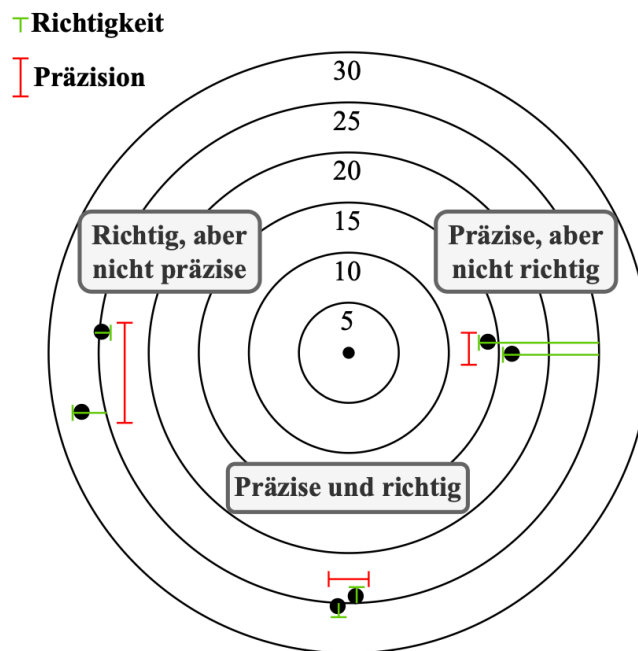


Abbildung 9. Schematische Darstellung von Richtigkeit und Präzision.

Legende: In diesem Beispiel werden Duplikate eines Standards mit einer Sollkonzentration von 25 ng/ml in 3 unterschiedlichen Experimenten dargestellt. Die zurückgerechneten Werte sind als schwarze Punkte dargestellt. Links sind die Werte nahe der gewünschten Sollkonzentration (grüne Balken sind klein), allerdings besitzen die Messwerte eine hohe Standardabweichung zueinander und somit eine ungenügende Präzision. Rechts sind die Werte sehr präzise (roter Balken ist klein), allerdings sind sie sehr weit von der Sollkonzentration entfernt und somit nicht richtig. Unten ist die Messung sowohl präzise als auch richtig [73].

Sensitivität (auch Detektionslimit, engl. detection limit (DL))

Nach Armbruster und Pry (2008) ist diese Grenze deswegen wichtig, da mit ihr klassifiziert wird, ab welchem Signal mit statistischer Sicherheit angenommen werden kann, dass der Blank nicht fälschlicherweise als eine niedrige Konzentration quantifiziert wird [8]. Daher wird der niedrigste Kalibrator der Standardkurve, der eine ausreichende Richtigkeit von mehr als 75 % und eine ausreichende Präzision von weniger als 25 % besitzt, als Detektionslimit definiert. Verfehlt das Standard mit der niedrigsten Standardkonzentration diese Kriterien, wird der nächsthöhere Kalibrator genommen, der die entsprechenden Richtigkeits- und Präzisionskriterien erfüllt [31,122].

Unteres Quantifizierungslimit (engl. lower limit of quantification (LLOQ))

Die niedrigste Konzentration, die mit akzeptabler Richtigkeit und Präzision gemessen werden kann. Im Unterschied zum DL geht es hier um eine sichere Quantifizierung und weniger um eine Unterscheidung zum Blank, was sich jedoch nicht gegenseitig ausschließt. Es kann sein, dass das LLOQ dem DL entspricht [8]. Als akzeptable Messwerte werden solche angesehen, die > 75 % Richtigkeit aufweisen und

< 25 % Abweichung in der Präzision besitzen. Verfehlt ein Standard in einem Versuch das Kriterium von maximal 25 % Abweichung, so werden beide Duplikate dieser Konzentration ausgeschlossen und dienen nicht zur Erstellung der Standardkurve in diesem einzelnen Experiment. Eine Ausnahme stellt ein Pipettierfehler dar, wenn dieser im Protokoll notiert wurde. Bei einem Ausschluss des ehemaligen ULOQ verschiebt sich dieses zum nächstgrößeren Wert [31,122].

Oberes Quantifizierungslimit (engl. upper limit of quantification (ULOQ))

Die höchste Konzentration, die mit akzeptabler Richtigkeit und Präzision gemessen werden kann. Bei dieser Konzentration müssen die Messwerte, wie auch beim LLOQ, > 75 % Richtigkeit aufweisen und < 25 % Abweichung in der Präzision besitzen [31,122].

Messspanne (engl. Quantitative range)

Werte, die innerhalb des LLOQ und des ULOQ gemessen werden, liegen innerhalb des messbaren Bereichs, wenn die dazugehörigen Standards auf der gemessenen Platte > 80 % Richtigkeit aufweisen und < 20 % Abweichung in der Präzision besitzen, was nach EMA- und FDA-Leitlinien von zentraler Bedeutung für die Auswertung des Versuchs ist. Allerdings können auch Standards nach Berücksichtigung definierter Randbedingungen verworfen werden. Es dürfen nicht zwei aufeinanderfolgende Standards verworfen werden und innerhalb der Messspanne müssen mindestens sechs Standard-Duplikate und mehr als 75 % der verwendeten Standards enthalten sein. Die Verwerfung eines einzelnen Standards unter Beibehaltung des zweiten Duplikats darf nur bei dokumentiertem Pipettierfehler erfolgen [31,122].

Qualitätskontrollen

Qualitätskontrollen enthalten eine bekannte Menge des Analyten gelöst in der gleichen biologischen Matrix wie die zu untersuchenden Proben. Hierfür wurden Lysat Vorräte angesetzt, die nachfolgend in den Experimenten mitgemessen wurden. Dabei beschreibt die erneute Analyse der Proben (auf engl. incurred sample reanalysis) eine wiederholte Messung von sowohl gleichen Lysaten im Rahmen einer Nachmessung zur Untersuchung der Messgenauigkeit als auch von unterschiedlichen Lysaten zur Analyse der Reproduzierbarkeit des Lysierungsprotokolls und der damit gemessenen ARID1A-Konzentration eines Tumors. Die ausgewählten Proben müssen eine hohe Konzentration in der frei nukleären Fraktion, eine mittlere Konzentration im Chromatin und eine geringe Konzentration im Zytosol besitzen. Auf einer Platte werden zwei Tumore mit jeweils drei Fraktionen in Duplikaten aufgetragen, sodass sechs Qualitätskontrollen pro Versuch untersucht werden. Mindestens 67 % der Qualitätskontrollproben müssen > 75 % Richtigkeit und < 25 % Abweichung in der Präzision aufweisen [31,122].

Spike recovery Analyse

Die Spike recovery ist der Anteil des wiedergefundenen ARID1A-Fragments in der mit Fragment versetzten Matrixprobe im Vergleich zu der mit Fragment versetzten reinen Pufferprobe. Die Spike recovery drückt letztlich aus wie gut der primäre Antikörper sein Epitop in einer Matrix finden kann.

Einfluss auf diese Bindung kann beispielsweise eine Protein-Protein-Interaktionen im Sinne einer Komplexbildung des Zielproteins nehmen, welche exemplarisch zu falsch-niedrigen Konzentrationsmessungen führen würde. Werte zwischen 80-120 % sind anzustreben [31,122].

Um die Spike recovery (engl. für Wiederfindungsrate) zu berechnen, werden drei Arten von Proben hergestellt und anschließend wird gemäß Formel 5 die Rate der Wiederfindung des ARID1A-Fragments in einer Matrix im Vergleich zu einer Pufferlösung berechnet:

1. „Matrix-unsiked“: Fraktionen des *ARID1A*-Knockout Zellpellets (ab278824, Abcam) werden 1:26 verdünnt in Karbonatpuffer;
2. „Matrix-spiked“: *ARID1A*-Knockout-Zellpelletfraktionen von ab278824 werden 1:26 verdünnt in Karbonatpuffer, um mit Endkonzentrationen des ARID1A-Fragments von 25 ng/ml, 12,5 ng/ml und 6,25 ng/ml versetzt;
3. „Puffer-spiked“: ARID1A-Fragment wurde in Karbonatpuffer verdünnt, sodass Endkonzentrationen des ARID1A-Fragments von 25 ng/ml, 12,5 ng/ml und 6,25 ng/ml entstehen.

$$\text{Spike recovery (\%)} = [(2) - (1)] / (3) \times 100$$

Formel 5. Der ELISA-Validierungsparameter Spike recovery.

Legende: Die im Text beschriebenen drei Werte (1: „Matrix-unsiked“, 2: „Matrix-spiked“, 3: „Puffer-spiked“) werden ins Verhältnis zueinander gesetzt, sodass letztlich die Spike recovery in Prozent für eine bestimmte Konzentration des ARID1A-Fragments angegeben werden kann.

Stabilität

Nach der Lysatherstellung werden die Proben bei -20 °C gelagert. Um eine hohe Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, werden acht Lysate auf einmal hergestellt, auch der ELISA wird simultan auf mehreren Platten durchgeführt, um Schwankungen zu minimieren. Einige Lysate wurden erst nach mehreren Wochen bis teilweise Monaten Lagerung bei -20 °C gemessen, wobei sich keine Auffälligkeiten zeigten.

4.4 Immunhistochemie

Bezeichnung	Firma, Artikelnummer
Anti alpha-Tubulin	ab7291, Abcam, Cambridge, UK
Anti-ARID1A - C-terminal	ab176395, Abcam, UK
ARID1A (Abcam)	ab182560, Abcam, UK
ARID1A (PSG3)	sc-32761, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA
ARID1A (C-7)	sc-373784, Santa Cruz Biotechnology, USA
Anti-Histon H3	ab1791, Abcam, UK
Goat Anti-rabbit IgG	ab6721, Abcam, UK
EnVision+ System-HRP Labelled Polymer Anti-Mouse	K4001, Agilent/ Dako, Santa Clara, CA, USA
EnVision+ System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit	K4003, Agilent/ Dako, USA
EnVision+ System-HRP Rabbit/Mouse	K5007, Agilent/ Dako, USA

Tabelle 9. Antikörper.

Neben der Proteinexpression von ARID1A mittels eines ELISAs (siehe Abschnitt 4.1) wurde von ausgewählten Patientenproben eine immunhistochemische Analyse durchgeführt. In diesem Verfahren führt ein Neuropathologe den Zugschnitt der Tumorprobe durch, die anschließend in dem Einbettautomaten (Shandon) in Paraplast Plus (McCormicks Scientific) eingebettet wird.

Eingebettete Tumorproben wurden an einem Schlittenmikrotom (Leica) unter Kühlung der Proben auf einer Kühlplatte (RWW Medizintechnik) auf 1-2 µm Dicke geschnitten und mit Hilfe eines Wasserbads auf Objektträger (SuperFrost Plus, R. Langenbrinck GmbH) transferiert. Anschließend erfolgte eine Wärmebehandlung der Objektträger für mindestens 12 Stunden bei 56 °C im Wärmeschrank (Heraeus Instruments). Durch diesen letzten Schritt wird eine verbesserte Haftung des Gewebeschnittes auf den Glasobjektträger erzielt, sodass eine Weiterbehandlung am nächsten Tag erfolgen konnte.

Im Rahmen der Weiterbehandlung zur Darstellung ARID1A-enthaltender Strukturen mittels Antikörper wurden mehrere Objektträger gleichzeitig entparaffiniert und anschließend rehydriert. Dabei ist der erste Schritt eine dreimal 10-minütige Inkubation in Xylol (Herauslösen des Paraffins), gefolgt von einer zweimalig 2-minütigen Inkubation mit 100 % Ethanol. Es folgen jeweils 2-minütige Intervalle in 90 % Ethanol, 80 % Ethanol und letztlich 70 % Ethanol bis die Schnitte mit Aqua dest. gespült werden.

Nachfolgend werden die endogenen Peroxidasen durch eine 10-minütige Behandlung mit 1 %-iger Wasserstoffperoxid-Lösung blockiert und die Objektträger anschließend in Aqua dest. gespült.

Durch das Aufkochen der Objektträger in Puffer (pH 6,1, Agilent/ Dako) für 30 Minuten in einem Dampfgarer (Phillips) erfolgte eine Antigendemaskierung. Anschließend wurden die Proben für 30 Minuten abgekühlt, in Aqua dest. gespült und in TBST (siehe 3.1.4) gestellt.

In einem nächsten Schritt wurden Coverplates (Thermo Fisher Scientific) mittels TBST ohne Luft einschüsse direkt an die Objektträger angelegt, sodass diese durch hydrostatische Kräfte haften bleiben. Um die korrekte Anhaftung zu überprüfen, wird als Durchlaufkontrolle TBST in den kleinen Spalt zwischen Coverplate und Objektträger pipettiert, sodass bei langsamer Durchlaufzeit des TBST eine korrekte Lage angenommen werden konnte.

In der immunhistochemischen Färbung wurde anschließend der Primärantikörper ab182560 (Abcam, UK) in einer Verdünnung von 1:1000 mit Dako REAL Antibody Diluent verwendet. Die Objektträger wurden jeweils mit 100 µl der Antikörper-Verdünnung für 45 Minuten bei 20-25 °C Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wurde dreimal mit TBST gespült und es erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper „EnVision /HRP Rabbit/Mouse“ (Dako) für 30 Minuten bei Raumtemperatur, gefolgt von drei weiteren Spülschritten mit TBST.

Anschließend erfolgte die Farbentwicklung in der feuchten Kammer: Hierzu wurde ein Objektträger mit jeweils 200 µl DAB-Lösung (Dako REAL DAB+ Chromogen kombiniert mit Dako REAL Substrate Buffer, Agilent, 1:50, frisch angesetzt) bedeckt und für 6-8 Minuten inkubiert. Die sich entwickelnde Farbreaktion wurde abgewartet, sodass die zuvor beschriebenen 6-8 Minuten individuell für jeden Objektträger bestimmt wurden. Zum Stoppen der Reaktion wurden die Objektträger mehrfach mit Aqua dest. gespült.

Die ARID1A gefärbten Strukturen sind nun sichtbar und es erfolgte eine Gegenfärbung mittels Mayer's Hämalanlösung (Merck) für 20 Sekunden. Nach kurzem Spülen mit Aqua dest. wurden die Objektträger unter lauwarmes Leitungswasser gestellt und gebläut. Der hierbei höhere pH-Wert des Wassers führte zu einem Farbumschlag mit intensiver Blaufärbung der Zellkerne. Nach einer Spülung mit Aqua dest. wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Hierfür wurden die Schnitte kurz in 70 % Ethanol getaucht, gefolgt von einer kurzen Behandlung mit 80 % Ethanol und letztlich 90 % Ethanol. Anschließend wurde zweimalig für zwei Minuten in 100 % Ethanol inkubiert sowie zweimalig 2-minütig in Xylol.

Die Objektträger wurden aus dem Xylol mit Entellan (Merck) eingedeckt. Dann erfolgte eine Trocknung im Wärmeschrank für 10 Minuten bei 80 °C. Ein Durchlichtmikroskop (BH-2, Olympus) mit externer Lichtquelle (LED-DC Regelnetzgerät, BW-Optik) diente zur Interpretation der Ergebnisse. Das rot-braun angefärbte ARID1A Protein wurde hierbei verglichen mit bläulich Strukturen, die durch die Hämalan-Gegenfärbung entstanden sind. Im Wesentlichen erfolgte die Analyse aufgrund der Lokalisation innerhalb verschiedener Zellkompartimente, innerhalb verschiedener Tumorbereiche eines einzelnen Meningeoms und im Vergleich zu Meningeomen. Zuletzt erfolgte mithilfe des Programms „Leica Application Suite (LAS) Version 3.8“ (Leica Microsystems) eine digitale Speicherung der Bilder.

4.5 Western blot

Die Entwicklung des ELISA stellt eine neue Methode dar, die bis dato keiner Fremdkontrolle unterzogen wurde. Trotz frei verkäuflicher ARID1A Sandwich ELISAs wurde der in dieser Arbeit entwickelte ELISA nicht extern validiert. Um den neu etablierten ELISA daher zu evaluieren, wurde eine Western blot Analyse (Nachweismethode von Proteinen durch Übertragung (engl. blotting) auf eine Trägermembran) durchgeführt nach der Methode von Laemmli (1970) [60]. Diese diente der Bestätigung, ob das ARID1A-Fragment mit den Antikörpern korrekt interagiert und ob das Antikörperpaar eine hohe Spezifität aufweist. Weiterhin wird untersucht, ob eine Auftrennung der Tumorsate in einzelne Zellfraktionen sinnvoll erscheint.

Im ersten Schritt werden die Tumorsate so verdünnt, dass eine Probe mit 30 µg Tumorsat entsteht. Anschließend erfolgt eine Verdünnung im Verhältnis 1:4 mit dem LDS-Puffer (Thermo Fisher Scientific). Davon werden 30 µl im AnykD-SDS-PAGE Gels in dem TRIS-glycin buffer system (Bio-Rad Laboratories) aufgetragen. Weiterhin wird im Laufpuffer (siehe 8.2) vorverdünntes ARID1A-Fragment einer definierten Konzentration im Verhältnis 1:3 mit dem Laemmli-Probenpuffer (siehe 8.2). versetzt. Anschließend werden von verdünnten Tumorsaten sowie ARID1A-Fragment (Abnova) jeweils 15 µl im SDS-PAGE Gel zusammen mit einem Größenmarker (Bio-Rad Laboratories) aufgetragen. Das Gel wird für 1,5 Stunden bei 120 V im Laufpuffer unter ständiger Kühlung laufen gelassen.

Im nächsten Schritt wird das Gel in TBS (siehe 8.2) für 15 Minuten unter ständigem Schwenken gewaschen. Danach werden die Nitrocellulose Membran (Bio-Rad Laboratories), der Schwamm sowie das

Filterpapier (GE Healthcare Life Sciences) im Transferpuffer (Laemmli-Probenpuffer) benässt. Es erfolgt anschließend der „wet transfer“ (engl. für nasser Transfer) der Proteine vom Gel auf die Membran bei 100 V im Wet blot (Bio-Rad Laboratories). Sofern das ARID1A-Fragment (Abnova), 37,84 kDa schwer, von Interesse des Versuchs war, wurde die Spannung unter ständiger Kühlung in der Elektrophoresekammer Western blot (Bio-Rad Laboratories) für 30 Minuten angelegt. Lag der Fokus des Experiments auf Vollängen-ARID1A, 242 kDa schwer, so wurde die Spannung für 60 Minuten angelegt, um einen besseren Transfer größerer Proteine zu gewährleisten.

Anschließend wird die Membran für 10 Minuten in TBS-T 0,05 % gewaschen und über Nacht mit 0,2 % Casein (Tropix I-Block, Thermo Fisher Scientific) in PBS-T 0,05 % im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wird die Membran viermal 5 Minuten mit TBS-T 0,05 % gewaschen und danach mit 10 ml des primären Antikörper ab182560 (Abcam) in einer 1:2000 Verdünnung mit TBS-T 0,05 % unter ständigem Schwenken bei Raumtemperatur für 2 Stunden inkubiert. Es erfolgt erneut ein Waschschrift, bei dem viermal 5 Minuten mit TBS-T 0,05 % gewaschen wird. Nachfolgend werden 10 ml des 1:500 in TBS-T 0,05 % verdünnten sekundären Antikörper K4003 (HRP-gekoppelte anti-rabbit, Dako) auf die Membran pipettiert. Dieser wird für 2 Stunden bei Raumtemperatur und ständigem Schwenken mit der Membran inkubiert. Es erfolgt erneut ein Waschschrift, bei dem viermal 5 Minuten mit TBS-T 0,05 % gewaschen wird. Dann werden 1 ml des Amersham™ ECL Select™ Western blotting detection reagent (VWR) angesetzt und auf die Membran pipettiert. Die Membran wird nun im Dunkeln inkubiert, während der Arbeitsplatz in der Dunkelkammer vorbereitet wird. Letztlich wird der Hyperfilm™ ECL™ Film (VWR) im Dunkeln für 10-240 Sekunden auf die chemi-lumineszierende Membran gelegt. Anschließend wird der Film in den Entwickler (Heraeus Kulzer) und den Fixierer (Heraeus Kulzer) für jeweils 1-3 Minuten gelegt. Nach dem Waschen in Wasser wird der Film getrocknet. Zur Auswertung wird der Größenmarker herangezogen, der auf jedem Gel mitaufgetragen wird. Anhand dieses Markers werden weitere Banden auf dem geschwärzten Film analysiert, da durch den Marker eine Größenzuordnung möglich wird. Weitere Charakteristika der Analyse eines Western blots werden in den entsprechenden Abschnitten ausgeführt.

4.6 Statistik

Die Auswertung der Ergebnisse sowie grafische Darstellung erfolgte mithilfe von „Microsoft Excel 2021“ (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA), „GraphPad Prism“ (Version 10.2.0, GraphPad Software) und „MARS Data Analysis Software“ (BMG Labtech).

Statistische Tests werden anhand des p-Wertes bemessen, wobei Folgendes gilt: $p > 0,05$ (ns); $0,01 \leq p < 0,05$ (*); $0,001 \leq p < 0,01$ (**); $0,0001 \leq p < 0,001$ (***) ; $p < 0,0001$ (****). Ein Test gilt daher als signifikant mit einem p-Wert kleiner 0,05 (Signifikanzniveau). Weiterhin wurde das Konfidenzintervall sowie der Standardfehler des Mittelwertes (SEM, englisch für standard error of the mean) in die Interpretation miteinbezogen.

Die Standardkurven-Analyse, die Interpolation der Daten mit einem logistischen 4-Parameter-logistic fit (4PL) oder einem 5-Parameter-logistic fit (5PL) – erforderlich, um die Anpassung der Kurve zu verbessern – erfolgten mit GraphPad Prism (Version 10.2.0).

Der D'Agostino & Pearson-Test wurde als Test auf Normalverteilung verwendet, wobei ein p-Wert > 0,05 auf Normalverteilung hinweist. Ungepaarte parametrische t-Tests wurden dann für Gruppen mit Gaußscher Normalverteilung durchgeführt, während der Mann-Whitney-Test als nichtparametrischer Test verwendet wurde. Dabei diente ein F-Test bei normalverteilten Gruppen zur Überprüfung der Varianz-Homogenität.

Die Korrelation zwischen Biomarkern (LOH von 1p und 6q) in Tumorgewebe und Serum wird mit dem exakten Test von Fisher unter Verwendung von Kontingenztabellen bewertet. Beim Vergleich von Werten in mehr als zwei Gruppen wird die ANOVA (Analysis of Variance) angewendet, wenn die Werte normalverteilt sind, andernfalls wurde Kruskal-Wallis verwendet. Zur Bewertung der wichtigsten Variablen und zur Anpassung an Störfaktoren wird eine multiple lineare Regression unter Berücksichtigung der Multikollinearität durchgeführt.

4.7 Fremdleistungen

Die DNA-Isolation wird routinemäßig in der molekularpathologischen Diagnostik des Instituts für Neuropathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes durchgeführt. Entsprechende Schritte der DNA-Aufbereitung wurden daher durch wissenschaftliche Mitarbeiter des Instituts ausgeführt und die Reste dieser DNA-Isolation konnten freundlicherweise für die Chromosom 6q Analyse in dieser Arbeit genutzt werden. In Teilen wurde die Ausführung der PCR und Mikrosatteliten-Analyse für Chromosom 6q durch wissenschaftliche Mitarbeiter des Instituts unterstützt und übernommen.

Die Chromosom 1p Analyse wird zudem standardmäßig am Institut für Neuropathologie durchgeführt und eine eingehende Analyse bereits in einer Doktorarbeit durch Katrin Bartelmei publiziert [12]. Freundlicherweise konnten die Daten dieser LOH 1p Analyse übernommen werden. Proben 1-11 sind auch in der Arbeit von Katrin Bartelmei verwendet worden, alle weiteren wurden noch nicht in anderen Studien verwendet.

Außerdem wurden der Zugschnitt der Paraffinblöcke mittels des Kryostaten und die Färbung des HE (Hämatoxylin-Eosin Färbung), PR (Progesteronrezeptor), Ki67 (Ki-67 Mitose-Index) und PHH3 (Phosphoryliertes Histon H3, aktiver Mitose-Marker) durch das Fachpersonal des Instituts für Neuropathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes übernommen. Die Auswertung erfolgte nach neuropathologischem Facharztstandard und die Daten konnten freundlicherweise übernommen werden.

Die Angabe des Lokalisationsstatus wurde den Einsendebögen der Kollegen der Neurochirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes entnommen und im Einzelfall selbstständig durch Kontaktaufnahme überprüft.

5 Ergebnisse²

5.1 ELISA-Optimierung

Das Ziel der Versuchsreihe ist ein einfach handhabbares Verfahren zu entwickeln mit dem akkurat und präzise das ARID1A-Level in Tumorslysaten gemessen werden kann. Allerdings blieb ein schneller Erfolg aus, sodass angenommen wurde, dass das Protokoll des indirekten ELISAs (Enzyme-linked Immunosorbent Assays) Problemen unterliegt. Nachfolgende Versuche mit dem ARID1A-Fragment (ABN-H00008289-Q01, Abnova) zeigen, dass eine Optimierung möglich ist (vgl. Tabelle 10).

5.1.1 Substratentwicklung

Zunächst wurde ein indirektes ELISA-Verfahren getestet, wobei DAB+ (Diaminobenzidin) als chromogene Substanz zum Entwickeln der HRP-gekoppelten sekundären Antikörper (1:1 verdünnt anti-rabbit/mouse K5007, Dako, USA; 1:1 verdünnt anti-mouse K4001, Dako) verwendet wird (siehe Protokoll 1, Tabelle 10).

Es zeigte sich, dass bei einer Konzentration von 1 µg/ml ARID1A-Fragment (Abnova) die Entwicklung mittels DAB+ einen Absorptionsmesswert (Einheit: OD = optische Dichte; Werte zwischen 0 und 3,5) bei der Wellenlänge 471 nm von 0,09 liefert. Ändert man das Protokoll dahingehend, dass OPD (o-Phenyldiamin) als Substrat im letzten Schritt des ELISA hinzugegeben wird, so erhält man 8,5-fach höhere Messwerte mit 0,76. Dabei kann die Umwandlung des Substrates OPD zu 2,3-Diaminophenazin durch die Horseradish Peroxidase (HRP) [117] bei 450 nm gemessen werden. Allerdings läuft diese Reaktion, genauso wie auch die DAB-Reaktion kontinuierlich weiter. Daher wurde ein Zeitintervall von 30 Minuten definiert, bis die Reaktion gestoppt wird. Dieser Stopp wird durch 2,5 M Schwefelsäure ausgelöst, wobei der Farbstoff von Gelb zu Orange umschlägt und bei 490 nm messbar ist. Neben einem veränderten Absorptionsspektrum gewinnt der Farbstoff zusätzlich an optischer Dichte, sodass ein weiterer Anstieg des Signals um den Faktor 3,5 erreicht werden kann auf einen Absorptionswert von 2,67. Letztlich wurde durch diese beiden Veränderungen eine Erhöhung des Absorptionssignals um den Faktor 30 erreicht, was zur ersten Veränderung im Protokoll führte (vergleiche Protokolle 3 und 4, Tabelle 10). Ein Test der zu verwendenden Reaktionsvolumina – 50 µl oder 100 µl – ergab, dass ein Volumen von 100 µl einen Sensitivitätsgewinn erbringt (siehe Protokoll 2, Tabelle 10).

² Es ist anzumerken, dass die Ergebnisse dieser Arbeit bereits veröffentlicht wurden [44] oder sich noch im Publikationsprozess befinden (siehe 9.1). Formal gesehen müsste eine Zitierung der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse stattfinden, allerdings wird darauf aufgrund einer besseren Lesbarkeit verzichtet. Abbildungen wurden auf deutsch übersetzt und angepasst, auch hier wird aufgrund des einfacheren Verständnisses von einer ständigen Zitierung abgesehen.

5.1.2 Waschen, Blocken und Pufferlösungen

Neben der Substratentwicklung wurde hinterfragt, welchen Einfluss unterschiedliche Blocking-Lösungen auf die Sensitivität und Spezifität des ELISA haben. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Es zeigte sich, dass Casein 5 % (Thermo Fisher Scientific) in PBS (Phosphate-buffered saline, pH 7,4) keine Verbesserung im Vergleich zu Casein 1 % in PBS aufweist (siehe Protokolle 5, Tabelle 10). Verwendet man jedoch eine andere Pufferlösung für Casein 1 % – PBS mit 0,05 % Tween-20 (Caesar & Loretz) statt PBS – so zeigt sich insbesondere eine erhöhte Spezifität des ELISA (vergleiche Protokoll 6, Tabelle 10). Fortan ist daher das Detergens Tween-20 in einer Konzentration von 0,05 % (PBST 0,05 %) Bestandteil der Pufferlösung für Casein 1 %.

Eine veränderte Blocking-Lösung, BSA 5 % (Bovines Serumalbumin) in TBS (TRIS-buffered saline, pH 7,8), zeigte keine Verbesserungen im Vergleich zu Casein 1 % in PBS, sodass dieses Blocking-Agens nicht in das Protokoll aufgenommen wurde (siehe Protokoll 8, Tabelle 10). Letztlich konnte durch die Verdünnung von Casein von 1 % auf 0,2 % (= Blocking Puffer) eine Verbesserung in der Sensitivität erzielt werden (vergleiche Protokoll 9, Tabelle 10). Nachfolgend wurde untersucht, ob die Zugabe von Tween-20 im Waschpuffer eine Optimierung der Spezifität darstellt und es zeigte sich auch hier eine Optimierung der Spezifität (vergleiche Protokoll 7, Tabelle 10).

Protokoll 8 zeigte außerdem, dass es einen wesentlichen Unterschied macht, in welcher Pufferlösung man den primären Antikörper verdünnt. So zeigt eine Verdünnung in 1 % BSA und TBS eine verbesserte Spezifität im Vergleich zur Verdünnung im Waschpuffer PBS. Dieser Effekt wurde nochmal gesteigert, indem Casein 0,2 % in PBST 0,05 %, der Blocking Puffer, als Lösungspuffer für den primären Antikörper diente (vergleiche Protokoll 10, Tabelle 10).

Zur Evaluation des Protokolls 10 wurde eine Analyse des Hintergrundsignals durchgeführt mit Hilfe des Protokolls 12, bei dem statt dem primären Antikörper PBS aufgetragen wird, sodass ausschließlich eine Interaktion des sekundären Antikörpers K4003 (Dako) mit dem Tumorlysat ein Signal produzieren kann. Hierbei zeigt sich mit Protokoll 10 ein Hintergrundsignal im Chromatin, das circa 45 % des eigentlichen Absorptionssignals (angegeben als OD) ausmacht, jedoch in keiner anderen Fraktion zu sehen ist.

Eine Optimierung erfolgte, indem der sekundäre Antikörper im Blocking Puffer, Casein 0,2 % in PBST 0,05 %, mit 1:2 verdünnt wurde. Mit diesem Protokoll misst man noch ein Hintergrundsignal von 19 % OD. Daher wurde Protokoll 11 als optimales ELISA-Protokoll identifiziert, mit dem man ARID1A bestmöglich quantifizieren kann. Dieses wird daher standardmäßig in den folgenden Experimenten verwendet. Insbesondere erfolgt damit die Validierung und die Auswertung der 61 Meningeome in der Untersuchungskohorte.

Schritte	Protokoll 1	Prot. 2	Prot. 3	Prot. 4	Prot. 5	Prot. 6
Volumen	50 µl	100 µl				
Coating	Carbonat-Puffer pH 9,6					
Waschen 1	PBS pH 7,4	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
Blocken	1 % Casein, PBS	1 % Casein, PBS	1 % Casein, PBS	1 % Casein, PBS	5 % Casein, PBS	1 % Casein, PBST 0,05 %
Waschen 2	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
Primärer AK	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
Waschen 3	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
Sekundärer AK	1:1 unverdünnt	1:1 unverdünnt	1:1 unverdünnt	1:1 unverdünnt	1:1 unverdünnt	1:1 unverdünnt
Waschen 4	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
Substrat	DAB+	DAB+	OPD	OPD	OPD	OPD
Stopp				H ₂ SO ₄ 2,5M	H ₂ SO ₄	H ₂ SO ₄
Ergebnis (a: Sensitivität; b: Spezifität)	a: - b: (- - -)	a: + b: (- - -) → 100 µl ab sofort	a: ++ b: - - - → OPD ab sofort	a: +++ b: - - - → zusätzlich Stoppen	a: +++ b: (- - -)	a: +++ b: (- -) → Tween-20 dazu

Schritte	Protokoll 7	Prot. 8	Prot. 9	Prot. 10	<u>Prot. 11</u>	Prot. 12
Volumen	100 µl					
Coating	Carbonat-Puffer					
Waschen 1	PBST 0,1 %	PBST 0,1%	PBS	PBST 0,1%	PBST 0,1%	PBST 0,1%
Blocken	1 % Casein, PBS	5 % BSA, TBS	0,2 % Casein, PBST 0,05 %	Blocking Puffer (= Prot. 9)	Blocking Puffer	Blocking Puffer
Waschen 2	PBST 0,1 %	PBST 0,1%	PBS	PBST 0,1%	PBST 0,1%	PBST 0,1%
Primärer AK	PBS	1% BSA, TBS	PBS	Blocking Puffer	Blocking Puffer	PBS ohne AK
Waschen 3	PBST 0,1 %	PBST 0,1%	PBS	PBST 0,1%	PBST 0,1%	PBST 0,1%
Sekundärer AK	1:1 unverdünnt	1:1 unverdünnt	1:1 unverdünnt	1:1 unverdünnt	1:2 in Blocking Puffer	1:2 in Blocking Puffer
Waschen 4	PBST 0,1 %	PBST 0,1%	PBS	PBST 0,1%	PBST 0,1%	PBST 0,1%
Substrat	OPD	OPD	OPD	OPD	OPD	OPD
Stopp	H ₂ SO ₄ 2,5 M	H ₂ SO ₄	H ₂ SO ₄	H ₂ SO ₄	H ₂ SO ₄	H ₂ SO ₄
Ergebnis (a: Sensitivität; b: Spezifität)	a: +++ b: (-) → ab sofort waschen mit PBST 0,1 %	a: +++ b: (+) → AK in Blocking Puffer verdünnen; BSA kein Vorteil	a: +++ b: (++) → 0,2 % Casein äquivalent zu 1 %	a: +++ b: ++ (45 % Hintergrund in Chromatin) → Prim. AK in 0,2 % Casein verdünnen	a: +++ b: +++ (19 % Hintergrund in Chromatin) → Sek. AK in 0,2 % Casein verdünnen	Untersuchung des Hintergrundsignals (Siehe Protokoll 10 & 11)

Tabelle 10. Darstellung unterschiedlicher Protokolle und deren Einfluss auf das Ergebnis.

Legende: Das Ergebnis wird semiquantitativ dargestellt mit einer Skala von - - - bis + + +. Ist das Ergebnis in Klammern () angegeben, so erfolgt die Interpretation aus einem Vergleich mit anderen Tumorlysaten ohne den bestmöglichen Vergleich mit dem *ARID1A* Knockout-Lysat. Verbesserungen in **rot** hervorgehoben. Veränderungen, von links nach rechts gelesen, in **fett und kursiv hervorgehoben**. Protokoll 11 wird unterstrichen, da dieses für die Auswertung des Patientenkollektivs dient. „AK“ meint Antikörper, „Prot.“ meint Protokoll. Blocking Puffer = 0,2 % Casein, PBST 0,05 %. H₂SO₄ wird routinemäßig als 2,5 M (mol/l) Lösung verwendet (aus Platzgründen nicht angegeben).

5.1.3 Primäre Antikörper

Zunächst wurde mit dem primären C-7 ARID1A-Antikörper (sc-373784, Verdünnung 1:30 bis 1:3000, Santa Cruz, USA) gearbeitet, der sein Bindungsepitop (1236-1325) innerhalb der Sequenz des ARID1A-Fragments (Aminosäuren 1216-1325, Abnova) besitzt. Weiterhin wurde auch der PSG-3 Antikörper (sc-32761, 1:30 bis 1:3000, Santa Cruz) getestet. Beide Antikörper lieferten jedoch im Vergleich zum Antikörper ab182560 (Verdünnung 1:300 bis 1:3000, Abcam, UK) eine niedrigere Sensitivität und der Antikörper sc-32761 (Santa Cruz) hat den Nachteil, dass sein Bindungsepitop (Aminosäuren 600-1018) außerhalb des ARID1A-Fragments (Aminosäuren 1216-1325, Abnova) liegt.

Verdünnungen 1:300, 1:1000 und 1:3000 von ab182560 (Abcam) werden evaluiert und es zeigt sich, dass eine Verdünnung von 1:1000 eine sehr gute Sensitivität und Spezifität besitzt und verwendet werden muss, um die niedrigen Konzentrationen von ARID1A in den Tumorgewebe zu quantifizieren. Das Bindungsepitop des Antikörpers ab182560 (Aminosäuren 1200-1350, Abcam) liegt innerhalb des ARID1A-Fragments (Aminosäuren 1216-1325, Abnova).

5.2 Standardisierung und Validierung

In Abschnitt 4.3.5 wird beschrieben mittels welcher Parameter ein ELISA validiert wird. Die folgenden Abschnitte erläutern die Ergebnisse der Experimente zur Standardisierung und Validierung. Die Primärdaten mit Angabe der Messwerte in der Einheit der optischen Dichte sind für die Standardkurve in Tabelle 19 und Tabelle 20 im Anhang (Kapitel 8.5) einzusehen. Eine Darstellung der Rohdaten für die erneute Analyse der Proben ist in Tabelle 21 zu finden.

5.2.1 Standardkurve

Zu Beginn der Versuchsreihe erfolgt die Erstellung einer Standardkurve nach den Parametern, wie sie in Abschnitt 4.3.5 beschrieben sind. Die Standardkurve, auch Kalibrierungskurve genannt, wird benötigt um Absorptionssignale, gemessen in der Einheit der optischen Dichte (OD, Werte zwischen 0 bis 3,5), in Konzentrationen, gemessen in ng/ml, umzurechnen. Exemplarisch zeigt daher Abbildung 10A Duplikate eine Standardkurve, wie sie für jeden Versuch erstellt wurde. Von links nach rechts sind steigende Konzentrationen in den Wells zu finden, die auch schon optisch eine intensivere Orangefärbung aufzeigen (schwarzes Rechteck, Abbildung 10A).

Die EMA und die FDA verlangen, dass sowohl für jeden Analyten als auch für jedes Experiment eine Standardkurve erstellt wird, weshalb die Validierung sowohl für die Methode allgemein (AE-Modell, alle Experimente dienen zur Erstellung einer Standardkurve) als auch für jeden einzelnen Versuch (EP-Modell, es werden jeweils für alle 11 Experimente die Duplikate einer ELISA-Platte zur Erstellung einer Standardkurve zur Rate gezogen) vorgenommen wurde (siehe Abschnitt 4.3.5).

Für die Versuche 1, 2, 4 und 5 diente der Wert 3,5 als Ankerpunkt „Top“, da diese das Modell optimierten (siehe Tabelle 19). Anhand dieser Werte kann die Richtigkeit (siehe Formel 1) ermittelt werden, die zusammenfassend in Tabelle 11 gezeigt sind. So liefert die Modellierung mit Hilfe des AE-Modell eine

inter-assay Richtigkeit (Formel 3) von 90,26 % und von 93,16 % mittels des EP-Modell. Die inter-assay Präzision liegt im EP-Modell bei 4,45 % Coefficient of variation (CV, siehe 4.3.5) und im AE-Modell liefert der selbst entwickelte ELISA eine inter-assay Präzision von 4,53 % CV. R^2 -Werte von über 0,99 werden in 9 von 11 Versuchen im EP-Modell erreicht. Auch das AE-Modell liefert als Zusammenfassung für alle 11 Standardkurven einen R^2 -Wert von 0,99.

Die Sensitivität (auch Detektionslimit, engl. detection limit (DL), genannt) wird, wie in Abschnitt 4.3.5 beschrieben, bestimmt und es zeigt sich ein Detektionslimit von 0,39 ng/ml ARID1A-Konzentration (siehe Abbildung 10). Das Standard bei 0,39 ng/ml verfehlt jedoch die Kriterien der Richtigkeit mit $> 75 \%$ und die Kriterien der Präzision von $< 25 \%$ CV, wenn man ihn in das AE-Modell integrieren möchte, sodass ein unteres Quantifikationslimit (LLOQ, siehe Abschnitt 4.3.5) für den in dieser Arbeit entwickelten ELISA mit 0,78 ng/ml ermittelt werden konnte (siehe Abbildung 10). Die Messspanne liegt zwischen 0,78 ng/ml und 50 ng/ml, wobei das obere Quantifikationslimit (ULOQ, siehe Abschnitt 4.3.5) mit 50 ng/ml um den Faktor 64 höher liegt als das LLOQ und 128-mal höher als das Detektionslimit.

Um die Ergebnisse mit einer etablierten, aber weniger quantitativen Methode zu vergleichen, werden Western blot Analysen mit den gleichen Antikörpern durchgeführt, die auch im ELISA zur Anwendung kommen (primärer Antikörper: ab182560, sekundärer Antikörper K4003, Dako). Die Analyse des Tumorslysats, hergestellt nach dem in 4.3.2 beschriebenen Protokoll, zeigt in den vier Zellfraktionen im Western blot, dass die ARID1A-Signale in den Fraktionen Frei Nukleär und Chromatin höher sind als die im Zytosol und in der Membran (siehe Abbildung 10C und Abbildung 28C, rechts). Somit ergibt sich eine Übereinstimmung mit den ELISA-Ergebnissen (vgl. Abbildung 10B).

Bei Verwendung des ARID1A-Fragments (Abnova) in verschiedenen Verdünnungen (0,5-1000 ng/ml, Abbildung 10B) lassen sich Banden in etwa auf der erwarteten Höhe von 37,84 kDa (Molekulargewicht ARID1A-Fragment) finden. Diese Banden zeigen auch eine adäquate Verringerung der Signalintensität von höheren zu niedrigeren Konzentrationen, welche in der densitometrischen Analyse einer sigmoidalen Kurve ähneln und somit die dargestellten Ergebnisse des ELISAs belegen (siehe Abbildung 28A). Weiterhin sind zusätzliche Banden bei einem Molekulargewicht von etwas weniger als 20 kDa sichtbar, welche insbesondere bei höheren Konzentrationen zu sehen sind (Abbildung 10B).

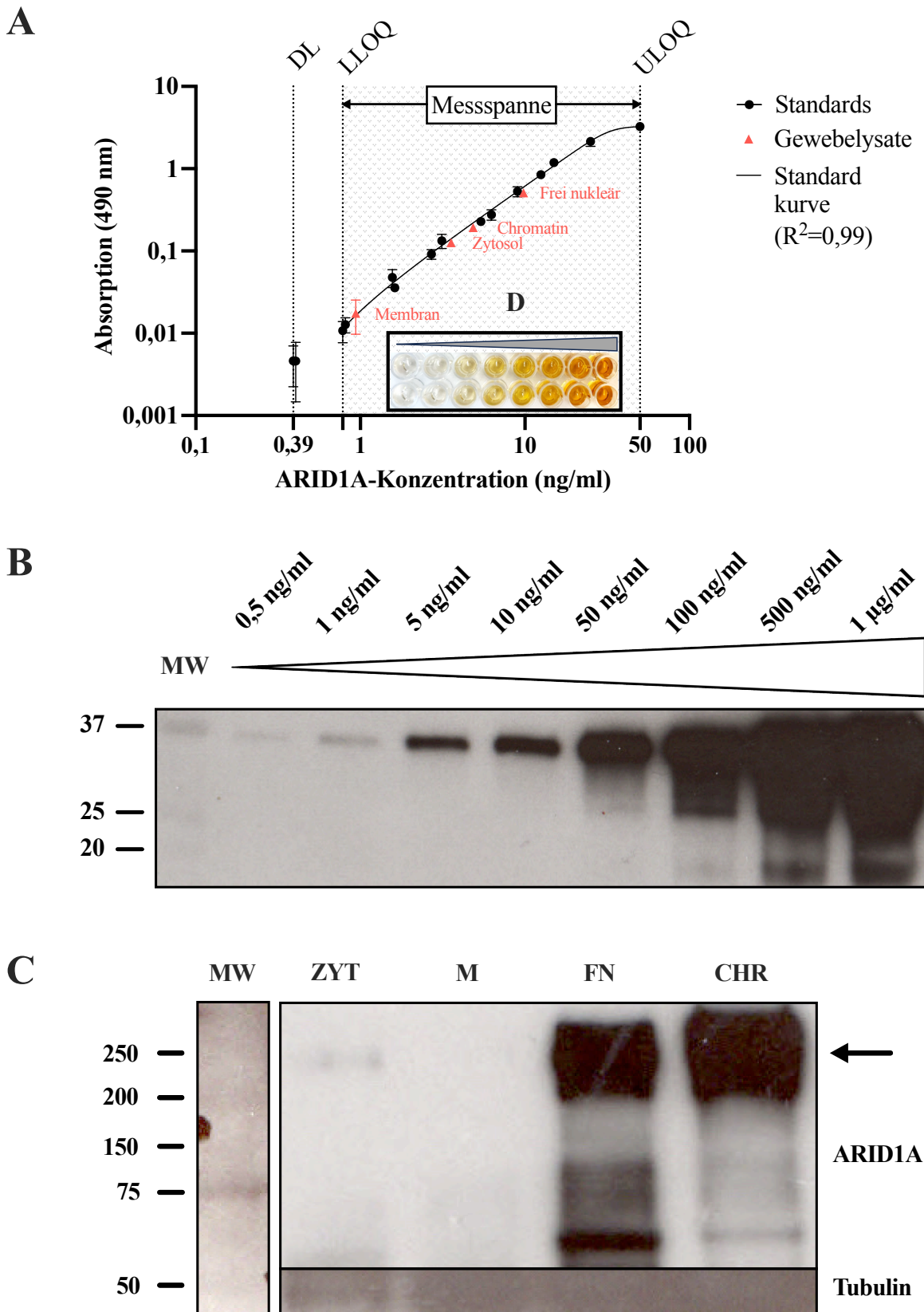


Abbildung 10. Standardkurve des ARID1A-ELISA mit Messspanne und Einzelmessungen in vier Fraktionen eines Gewebelysates im AE-Modell.

Legende: Als Antikörperpaare wurden in allen Versuchen ab182560 (Abcam, UK) als primärer Antikörper (1:2000 verdünnt) und K4003 (1:2 verdünnt, Dako, USA) verwendet, wie in Abschnitt 4 beschrieben. (A) Dargestellt sind das Detektionslimit (DL) sowie das untere Quantifizierungslimit (LLOQ) und das obere Quantifizierungslimit (ULOQ). LLOQ und ULOQ definieren die Messspanne.

Zudem sind vier Zellfraktionen aus einem Tumor gezeigt (rote Dreiecke) und es erfolgt eine graphische Darstellung einer ELISA-Platte, wie sie am Ende eines Versuchs aussieht (schwarzer Kasten). **(B)** Auf der linken Spur befinden sich 6 µl des Molekulargewichtsmarkers (MW). ARID1A-Standards werden in SDS-PAGE-Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 1 % SDS (w/v), pH 8,4) auf die über der Trägermembran angegebenen Konzentrationen verdünnt. Die mit ImageJ ermittelten Messwerte Densitometrie sind in Abbildung 28 angegeben [24]. **(C)** Die Lysat Fraktionierung des Tumorgewebes erfolgt in Zytosol (ZYT), Membran (M), Frei nukleär (FN) und Chromatin (CHR). Der Vergleich mit einem Molekulargewichtsmarker (MW, linke Spur) erlaubt die Größenabschätzung der intensiven Bande bei etwa 242 kDa, die spezifisch ARID1A kennzeichnet (schwarzer Pfeil). Als primären Antikörper gegen alpha-Tubulin als Ladekontrolle wird ab7291 (Abcam, UK) verwendet mit einem Signal bei ca. 50 kDa.

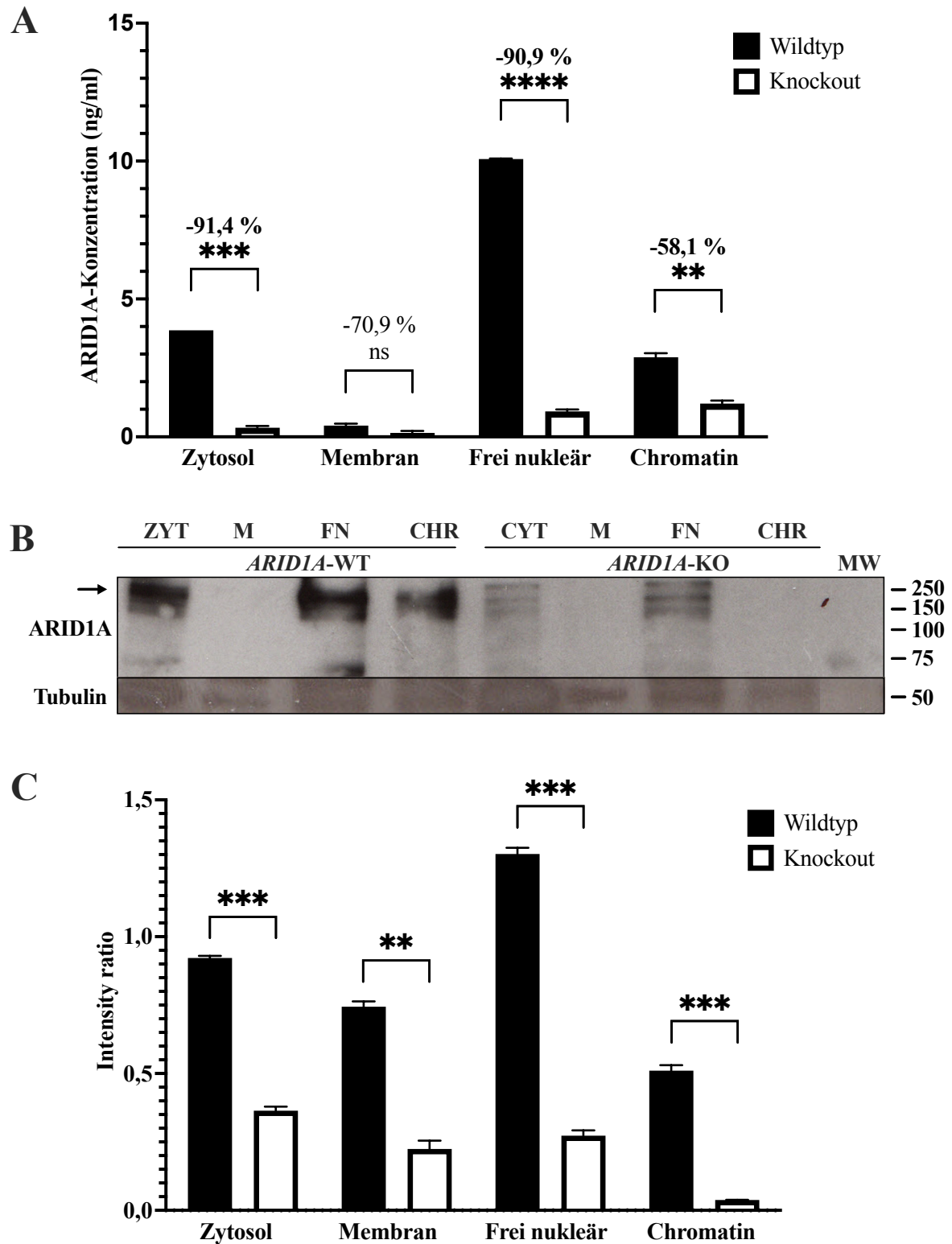
5.2.2 Spezifität

Wie in Abschnitt 5.1.3 ausgeführt wird, ist der Antikörper ab182560 (Abcam, UK) in Bezug auf die Sensitivität besser als die anderen getesteten primären Antikörper und wird auch zur Analyse des Patientenkollektivs verwendet. Zur Überprüfung der Spezifität werden zwei Zell Pellets (ab278824, Abcam) – *ARID1A*-Wildtyp und *ARID1A*-Knockout – miteinander verglichen mit dem ELISA-Protokoll 11 aus Tabelle 10. Die mit Hilfe der Standardkurve ermittelten ARID1A-Konzentrationen sind in Abbildung 11A dargestellt. Im Zytosol finden sich im Wildtyp 3,86 ng/ml ARID1A verglichen mit 0,33 ng/ml im Knockout. Dies entspricht einer Reduktion des Signals um 91,4 %, wobei anzumerken ist, dass dieser Unterschied statistisch hoch signifikant ist ($p = 0,0002$). Für die Fraktion Membran ergeben sich ARID1A-Konzentrationen von 0,41 ng/ml verglichen mit 0,12 ng/ml im Knockout, sodass eine Verminderung von 70,9 % festzuhalten ist, die nicht signifikant ist ($p = 0,0791$).

Es fällt außerdem auf, dass in den beiden Fraktionen Werte zurückgerechnet werden, die unterhalb der Messspanne liegen (siehe Abschnitt 5.2.1). Daher ist es wichtig anzumerken, dass diese Werte extrapoliert sind aus der Standardkurve und somit streng genommen nicht quantifiziert werden dürfen. Allerdings liegen diese Werte noch oberhalb der unteren Asymptote, weshalb der 5-parameter logisitc fit sie zurückrechnen kann und die Angabe dieser Werte besser erscheint als die simple Annahme eines Wertes „0“ oder die Angabe „nicht auswertbar“. In der Fraktion Frei nukleär zeigen sich im Wildtyp die höchsten Konzentrationen mit 10,07 ng/ml, wobei eine signifikante ($p < 0,0001$) Reduktion von 90,9 % auf 0,93 ng/ml ARID1A-Konzentration im Knockout sichtbar ist. Im Chromatin findet sich eine signifikante ($p = 0,0057$) Reduktion von 58,1 %, wobei im Knockout noch 1,21 ng/ml gemessen werden im Vergleich zum Wildtyp mit 2,89 ng/ml (Abbildung 11A).

Um die Ergebnisse der Spezifitätstestung im ELISA zu bestätigen, werden Western blot Analysen von sowohl analogen Lysaten (ab278824, Abcam, UK) als auch von speziell für die SDS-PAGE geeignete Lysate (ab257250) durchgeführt. Es zeigt sich in diesen Untersuchungen, dass eine Bande bei ca. 242 kDa nur im Wildtyp-Lysat sichtbar ist und im Knockout fehlt (siehe Abbildung 11B und Abbildung 28E, sowie Abbildung 11D und Abbildung 28D, links). Die subzellulär fraktionierten Zelllysate von *ARID1A*-Wildtyp und Knockout (ab278824) zeigen im Western blot eine signifikante Abnahme ($p \leq 0,01$) der Signalintensität der vermuteten ARID1A Bande bei etwa 242 kDa (Abbildung 11B). Bei der

densitometrischen Analyse jeder Spur mittels ImageJ [24] zeigt sich auch hier eine signifikante Verringerung der Signalintensität ($p \leq 0,01$ bzw. $p \leq 0,001$) in allen vier Fraktionen der *ARID1A* Knockout-Zellen verglichen mit dem *ARID1A*-Wildtyp (siehe Abbildung 11C, Abbildung 28E).



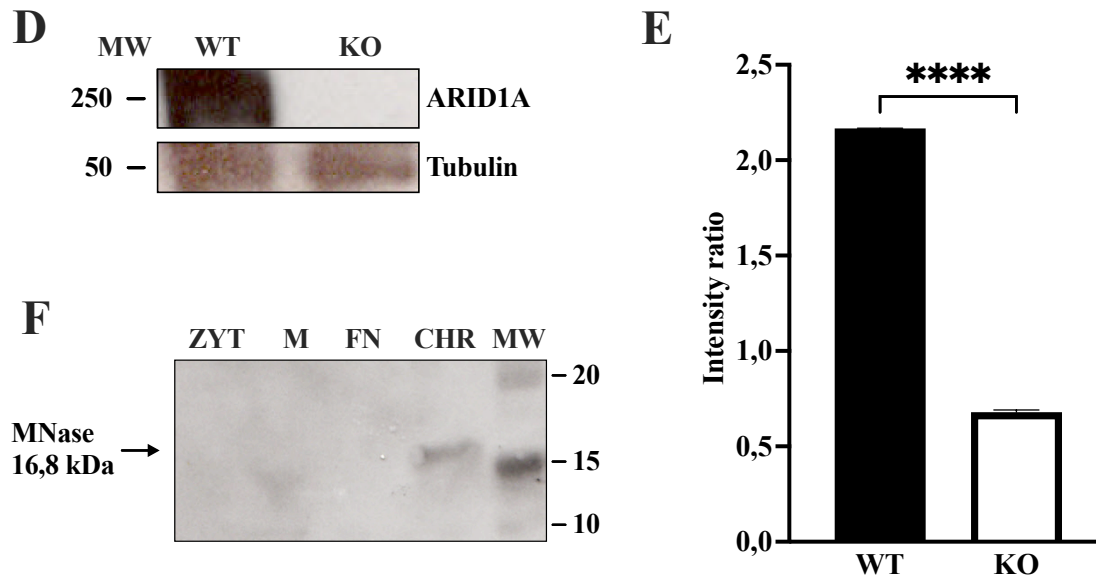


Abbildung 11. Der Vergleich von *ARID1A*-Wildtyp und -Knockout Lysaten im ELISA und Western blot.

Legende: (A) Subzelluläre Fraktionen, aus HEK-293T *ARID1A*-Knockout- (weiß) und Wildtyp-Zelllinien (schwarz), werden nach dem in 4.3.4 beschriebenen ELISA-Protokoll mit dem primären Antikörper ab182560 (Abcam) untersucht. Zur Bestimmung der p-Werte wird ein t-Test herangezogen; (B) Die Western blot Analyse erfolgt wie in 4.5 beschrieben, unter Verwendung von ab182560 gegen ARID1A und ab7291 (Abcam) gegen alpha-Tubulin als primären Antikörpern. HEK-293T-Zellen (ab278824, Abcam, UK) von *ARID1A* WT und KO werden in Zytosol (ZYT), Membran (M), Frei nukleär (FN) und Chromatin (CHR) fraktioniert. Die densitometrische Analyse konzentriert sich auf eine Bande bei fast 242 kDa im Vergleich zu einem Molekulargewichtsmarker (rechte Spur), die für ARID1A spezifisch ist (schwarzer Pfeil in B); (D) Western blot Analyse unter Verwendung der primären Antikörper ab182560 und ab7291. Für die Analyse von *ARID1A*-Knockout (KO) und Wildtyp (WT) wird das lyophilisierte Zellpellet ab257250 (Abcam, UK) verwendet, wobei jede Spur 6 µL der resuspendierten Pellets gemäß den Anweisungen des Herstellers enthält. Die Molekulargewichtsmarker (MW) bei 250 kDa und 50 kDa kennzeichnen das vermutete ARID1A (242 kDa schweres Protein) bzw. alpha-Tubulin (50 kDa schweres Protein, siehe auch Abbildung 28F, blauer Pfeil); (C, E) zeigen die in (B, D) mit ImageJ [24] gemessenen Intensitätsverhältnisse sowie die mit dem T-test ermittelten p-Werte. $p > 0,05$ (ns); $0,01 \leq p < 0,05$ (*); $0,001 \leq p < 0,01$ (**); $0,0001 \leq p < 0,001$ (***); $p < 0,0001$ (****). (F) Unspezifische Antikörperinteraktion im Chromatin von Zelllysaten. Die Western blot Analyse wird wie in 4.5 beschrieben durchgeführt mit ab182560 (Abcam, UK) und K4003 (Dako, USA). *ARID1A*-Knockout HEK-293T-Zellen (ab278824) werden in Zytosol (ZYT), Membran (M), Frei nukleär (FN) und Chromatin (CHR) fraktioniert. Eine Bande – im Vergleich zu einem Molekulargewichtsmarker (rechte Spur) – ist bei ca. 16,8 kDa (Pfeil) im Chromatin zu sehen und entspricht dem erwarteten Gewicht der MNase.

Das für den Western blot geeignete lyophilisierte Lysat ab257250 (Abcam, UK) wurde resuspendiert nach den Angaben des Herstellers und anschließend analysiert. Sowohl optisch (Abbildung 11D) als auch densitometrisch mit ImageJ [24] ermittelt, zeigt sich eine signifikante Reduktion ($p < 0,0001$) im *ARID1A*-Knockout verglichen mit dem *ARID1A*-Wildtyp (Abbildung 11E, Abbildung 28D, links). Auch in der Western blot Analyse zeigen sich Banden, die am ehesten als Hintergrundsignale eingeordnet werden können. So findet man eine 16 kDa schwere Bande im Western blot in der Fraktion Chromatin der *ARID1A*-Wildtyp und -Knockout Lysate, jedoch in keiner anderen Fraktion (Abbildung 11F und Abbildung 28E und F, roter Pfeil). Diese Bande scheint unabhängig von der *ARID1A*-Deletion sichtbar

zu sein, sodass es sich um eine unspezifische Bindung handeln könnte, die auf der Höhe der MNase (Molekulargewicht: 16,8 kDa) zu finden ist (siehe Abbildung 28F, roter Pfeil). Außerdem findet man beispielsweise eine Bande bei etwa 60 kDa (Abbildung 11B) in beiden Lysaten (*ARID1A*-Wildtyp und -Knockout, ab257250, Abcam) des Western blots, wobei keine Zuordnung zu einem Protein möglich ist (Abbildung 28F, oberhalb des blauen Pfeils).

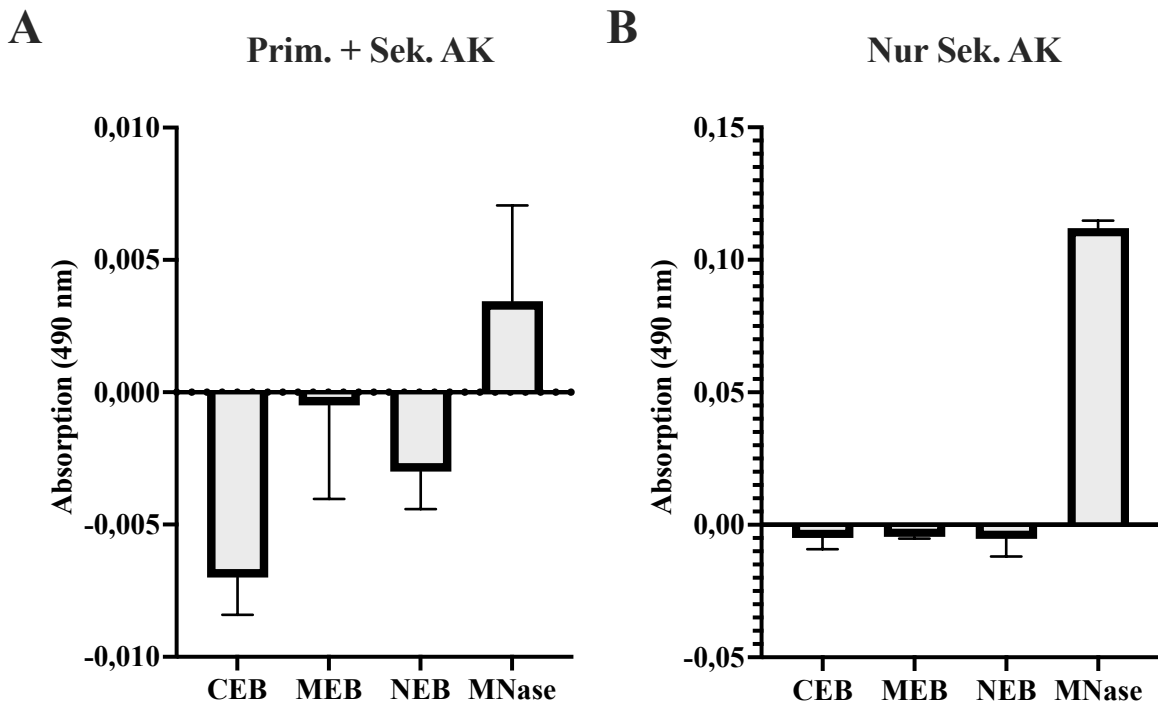


Abbildung 12. Hintergrundsignale des sekundären Antikörpers in verschiedenen Lysat-Puffern.

Legende: (A) In diesem ELISA-Versuch werden die Extraktionspuffer (CEB, MEB, NEB und mit MNase versetztes NEB, wie in 5.1.2, Protokoll 11) im Verhältnis 1:26 in Carbonatpuffer verdünnt und als Beschichtungslösung im ersten Schritt (Coating) des ELISA-Protokolls (siehe 4.3.4) verwendet. (B) Im Gegensatz zum Protokoll von (A), in dem sowohl die primären („Prim.“) als auch die sekundären („Sek.“) Antikörper („AK“) auf der Platte inkubiert wurden, wurde dieser ELISA wie folgt modifiziert: nur der sekundäre Antikörper K4003 (Dako, USA), 1:2 verdünnt, wurde in die Wells gegeben, nicht aber der primäre Antikörper ab182560 („Nur Sek. AK“), wie in 5.1.2, Protokoll 12).

5.2.3 Erneute Analyse der Proben

Zur Analyse von gleichen Lysaten wird ein Lysat unter anderem an unterschiedlichen Tagen, in unterschiedlichen Wells einer Platte, anhand der Standardkurven anderer Platten, mit Hilfe neu angesetzter Puffer und Lösungen, etc. nochmals analysiert. Dies dient der Kontrolle, ob die einmal festgestellte *ARID1A*-Konzentration reproduzierbar ist, was mit Hilfe der inter-assay Präzision als Prozentwert des CV ausgedrückt werden kann (siehe 4.3.5).

Es zeigt sich für die gleichen Lysate eine Abweichung des CV von 10,05 % in der Fraktion Zytosol, wohingegen Frei nukleär und Chromatin einen CV von 10,75 % beziehungsweise 11,06 % aufweisen (siehe Tabelle 11, vierte Spalte). Für die Fraktion Membran können solche Berechnungen nicht angestellt werden, da zu viele Werte unterhalb des LLOQ liegen und somit nicht auswertbar sind (siehe

„k.A.“; Tabelle 22 im Anhang). Insgesamt werden 18 Tumorpatienten in dieser Gruppe analysiert und es wird eine inter-assay Präzision von 10,61 % ermittelt. Zur Berechnung dieses Wertes dient eine arithmetische Mittelung aller Abweichungen in den unterschiedlichen Tumoren und Fraktionen der gleichen Lysate (siehe Tabelle 11, vierte Spalte).

Zur Analyse der Reproduzierbarkeit des Herstellungs-Protokolls der Lysate und der damit gemessenen ARID1A-Konzentration werden unterschiedliche Lysate wie folgt hergestellt: Aus einem Tumor werden zwei Stücke von jeweils 100 mg herausgeschnitten und abgewogen, welche nachfolgend an zwei unterschiedlichen Tagen mit Hilfe des Protokolls in Abschnitt 4.3.2 fraktioniert werden. Es zeigt sich hierbei ein CV von 12,23 % im Zytosol, sowie von 26,28 % in der Fraktion Frei nukleär und 19,2 % im Chromatin. Die inter-assay Präzision der Tumore von sechs Patienten über alle Fraktionen gemittelt liegt bei 21,31 % (siehe Tabelle 11, fünfte Spalte).

Fasst man die beiden Gruppen der gleichen und unterschiedlichen Lysate zusammen, so erhält man eine Aussage über alle wiederholten Messungen (siehe Tabelle 11, rechte Spalte). Im Zytosol erhält man somit einen CV von 10,31 %, in der Frei nukleären Fraktion von 12,57 % und im Chromatin von 12,46 %. Über alle Fraktionen gemittelt liegt der Wert bei 11,78 % (siehe Tabelle 11, rechte Spalte).

Abweichung der ARID1A Konzentration	Standards (AE Modell)	Standards (EP Modell)	Gleiche Lysate (n=18)	Unterschiedliche Lysate (n=6)	Alle wiederholten Messungen (n=24)
Zytosol (%CV)	k.A.	k.A.	10,05 %	12,23 %	10,31 %
Frei nukleär (%CV)	k.A.	k.A.	10,76 %	26,28 %	12,57 %
Chromatin (%CV)	k.A.	k.A.	11,06 %	19,2 %	12,46 %
Inter-assay Richtigkeit	90,26 %	93,16 %	k.A.	k.A.	k.A.
Inter-assay Präzision (%CV)	4,53 %	4,45 %	10,61 %	21,31 %	11,78 %

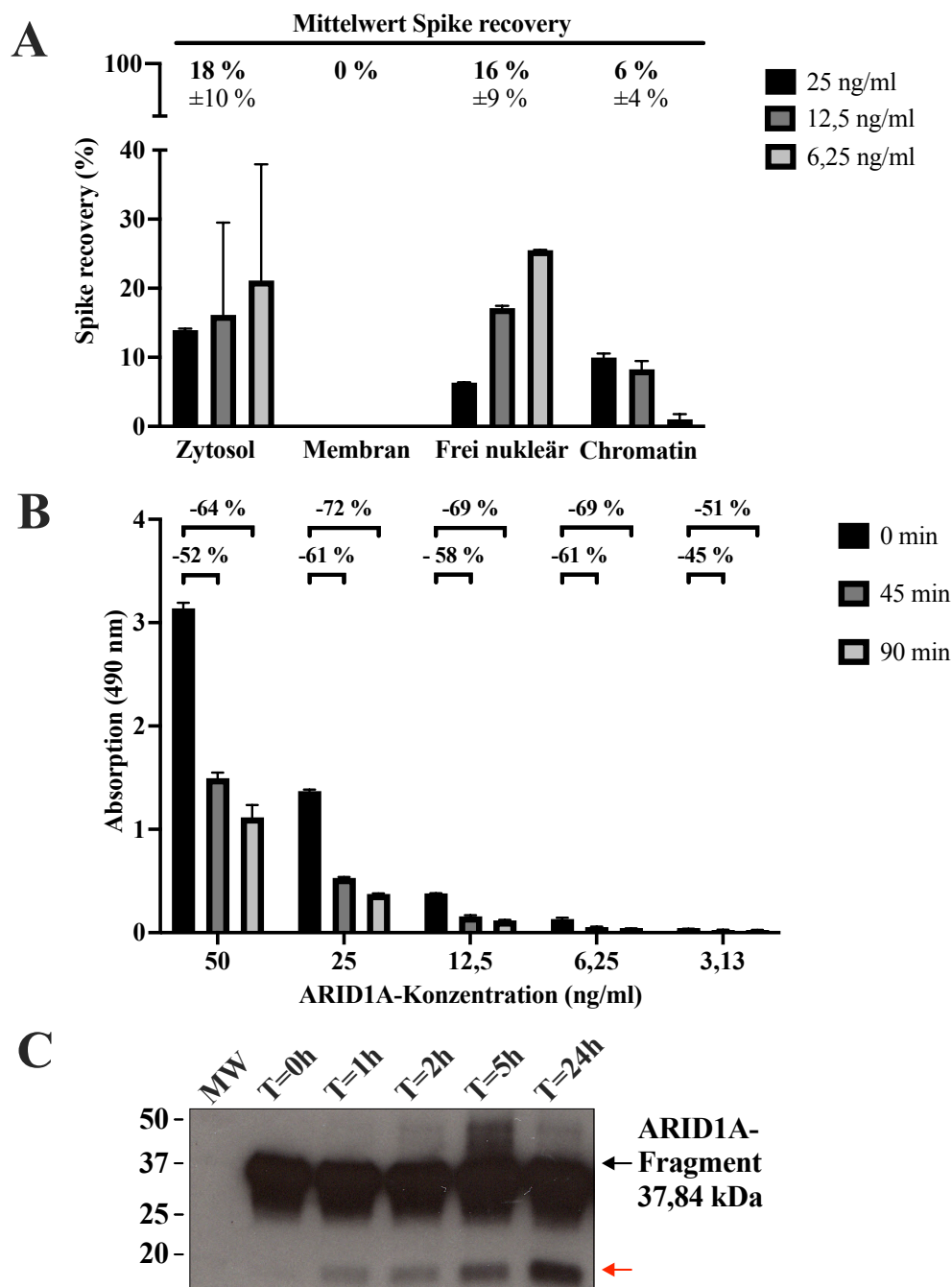
Tabelle 11. Richtigkeit und Präzision des ARID1A-ELISAs.

Legende: Die zwei Modelle (AE Modell und EP Modell, siehe 4.3.5) werden anhand der inter-assay-Richtigkeit (ausgedrückt als Prozentsatz des Nominalwerts bei der Durchführung von Assays an mehreren Tagen, Formel 3) und der inter-assay-Präzision (ausgedrückt als Mittelwert des Variationskoeffizienten (CV) jedes Analyten, Formel 4) bewertet. Die Analyse der gleichen Lysate und unterschiedlichen Lysate erfolgt in vier Fraktionen. Messergebnisse der „Membran“ können aufgrund zu geringer Signale nicht dargestellt werden. In der Spalte „Gleiche Lysate“ wird ein Lysat analysiert, das in einer Sitzung erzeugt, aber an mehreren verschiedenen Tagen gemessen wurde. In der Spalte „Unterschiedliche Lysate“ werden Lysate von einem Tumor ausgewertet, die in verschiedenen Sitzungen und aus unterschiedlichen Regionen des Tumors hergestellt wurden. In beiden Experimenten werden die zurückgerechneten ARID1A-Konzentrationen anhand des Coefficient of Variation (%CV, Formel 4) verglichen. Die Spalte „Alle wiederholten Messungen“ zeigt den mittleren %CV aller durchgeführten Messungen (gleiches Lysat und unterschiedliches Lysat, n = 24) in jeder Fraktion. Die inter-assay-Präzision der Lysat-Analyse spiegelt den Mittelwert der %CVs aller Fraktionen wider. „k.A.“ gibt an, dass die Werte nicht anzugeben sind.

5.2.4 Spike recovery Analyse

Die Analyse der Spike recovery (engl. für Wiederfindungsrate) wird mittels der drei Konzentrationen 6,25 ng/ml, 12,5 ng/ml und 25 ng/ml des ARID1A-Fragments analysiert. Diese werden zu den bereits

vorbereiteten Fraktionen des *ARID1A*-Knockout-Zellpellets pipettiert („Matrix-spiked“ in 4.3.5). Anschließend erfolgt die Berechnung der Spike recovery nach Formel 5. Es ergibt sich ein Mittelwert von 18 %, 0 %, 16 % und 6 % für die Spike recovery in den vier Fraktionen Zytosol, Membran, Frei nukleär und Chromatin (siehe Abbildung 13A). Eine weitere Analyse des ARID1A-Wildtyp-Zellpellets ab278824 (Abcam, UK) sowie zwei Tumorgewebe im ELISA bestätigen diese Ergebnisse. Somit finden sich in allen Lysaten ähnlich niedrige Raten für die Spike recovery und es können somit methodische sowie technische Fehler ausgeschlossen werden.



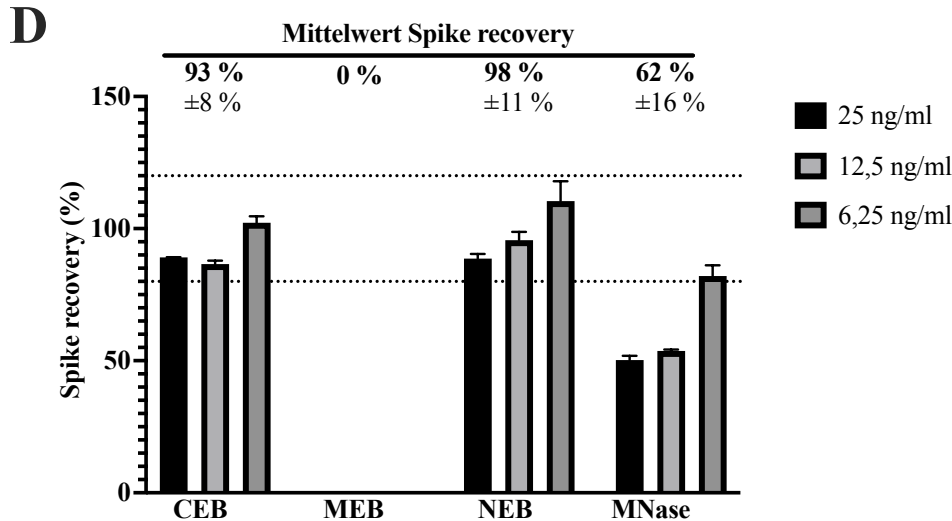


Abbildung 13. Spike recovery Analyse des ARID1A-Fragments in vier subzellulären Fraktionen und Tests zur Fragment Stabilität/Degradation über mehrere Inkubationszeiträume.

Legende: (A) Vor der Durchführung des Standard-ELISA-Protokolls werden drei unterschiedliche Proben hergestellt: (1: „Matrix-unsiked“) *ARID1A*-Knockout-Zellpelletfraktionen (ab278824, Abcam) 1:26 verdünnt in Karbonatpuffer; (2: „Matrix-spiked“) Fraktionen des *ARID1A*-Knockout-Zellpellets von ab278824 1:26 verdünnt in Karbonatpuffer versetzt mit Endkonzentrationen des ARID1A-Fragments von 25 ng/ml (schwarz), 12,5 ng/ml (dunkelgrau) und 6,25 ng/ml (hellgrau); und (3: „Puffer-spiked“) Karbonatpuffer, der mit den zuvor genannten drei Endkonzentrationen des ARID1A-Fragments versetzt ist, wie 3.4.5 beschrieben. Anschließend erfolgt die Berechnung der Spike recovery nach Formel 5. Die Mittelwerte der Spike recovery (**fett**) +/- Standardabweichungen (nicht fett) sind am oberen Rand der Abbildung dargestellt. Diese werden durch Mittelung aller Wiederfindungsraten bei verschiedenen Verdünnungen in den einzelnen subzellulären Fraktionen berechnet; (B) Verschiedene Standardverdünnungen werden vor der Messung der ARID1A-Konzentrationen für 0 min (schwarz), 45 min (dunkelgrau) und 90 min (hellgrau) auf Eis inkubiert. Die nachfolgenden Absorptionssignale bei diesen Verdünnungen sind in der Grafik aufgetragen, wobei die Signalverringernach 45 Minuten Inkubationszeit in der unteren Reihe dargestellt ist, während die Veränderungen nach 90 Minuten in der oberen Reihe dieser Abbildung zu sehen sind. Die Messungen zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen von Duplikaten; (C) Dargestellt ist die Stabilitätsuntersuchung des ARID1A-Fragments (Abnova) im Western blot. Ein Molekulargewichtsmarker (MW, linke Spur) wird verwendet, um die resultierenden Bandenhöhen abzuschätzen. Das ARID1A-Fragment (Abnova) wird auf 100 ng/ml in SDS-PAGE-Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 1 % SDS (w/v), pH 8,4) verdünnt und für 0 h, 1 h, 2 h, 5 h und 24 h (siehe obere Reihe) bei 4 °C inkubiert, bevor der 3X Laemmli-Probenpuffer (150 mM Tris, 30 % Glycerin (v/v), 15 % β -Mercaptoethanol (v/v), 0,03 % Bromphenolblau (w/v), 6 % SDS (w/v), pH 6,8) dazugegeben wird und das gesamte Gefäß für 10 Minuten bei 95 °C erhitzt und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert wird. Zusätzlich zum Fragment (37,84 kDa, schwarzer Pfeil) ist eine Bande bei fast 18 kDa (roter Pfeil) in den inkubierten Fragmenten ($T > 0$ h), aber nicht in der direkt hergestellten Fragment Verdünnung ($T = 0$ h) sichtbar; (D) Analyse der Spike recovery des rekombinanten ARID1A-Fragments (Abnova) in verschiedenen Fraktionierungspuffern, wobei keines dieser Puffer Tumor-/Zellgewebe enthält. Die mittlere Spike recovery (**fett gedruckt**) wird berechnet, indem die Spike recovery bei verschiedenen Fragment Konzentrationen gemittelt werden. Die Messungen zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung von Duplikaten. Die gestrichelten Linien zeigen den akzeptierten Bereich der Spike recovery, zwischen 80 % und 120 %, gemäß den FDA/EMA-Kriterien [31,122].

Diese überraschenden Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass eine Verfälschung der eigentlichen Spike recovery des Volllängen ARID1A-Proteins besteht, sodass als nächstes die Fragment-Stabilität getestet wird. Dafür werden mehrere Standardverdünnungen vorbereitet, und für 0, 45 und 90 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wird die Verringerung der Absorptionssignale im Laufe der Zeit bestimmt und

graphisch aufgetragen (Abbildung 13B). Hierbei zeigt sich in allen Standardkonzentrationen ein massiver Signalverlust, der auch mit steigender Inkubationszeit zunimmt (vergleiche 0 min mit 90 min in Abbildung 13B). Eine Western blot Analyse kann die im ELISA aufgestellte Vermutung der Degradation des verwendeten ARID1A-Fragments (Abnova) bestätigen: Gleiche Mengen des ARID1A-Fragments werden bei 4 °C bis zu 24 Stunden lang inkubiert, wobei neben der Bande des ARID1A-Fragments (37 kDa) ab einer Stunden Inkubationszeit eine weitere Bande bei etwa 18 kDa erscheint, deren Intensität stetig zunimmt (siehe Abbildung 13C). Interessanterweise zeigt die Fraktion eine Spike recovery von 0 % im Gegensatz zu den anderen Fraktionen (6 % - 18 %, Abbildung 13A). Daher wird der Einfluss der Pufferlösungen auf die ARID1A Messung untersucht: bekannte Konzentrationen des ARID1A-Fragments werden in die vier reinen Pufferlösungen des „Subcellular Protein Fractionation Kit for Tissues“ (siehe 8.2) im Verhältnis 1:26 pipettiert und analysiert. Hierbei zeigt sich eine nahezu vollständige Spike recovery im CEB (93 %), im NEB (98 %) und im NEB, der mit MNase versetzt wird (62 %), jedoch eine Spike recovery von 0 % im Membranextraktionspuffer (siehe Abbildung 13D).

5.2.5 Minimal benötigte Konzentration

Zur Untersuchung der minimal benötigten Konzentration wird zunächst ein Gewebelysat mit einer hohen Gesamtproteinkonzentration immer weiter verdünnt. Letztere wird mit Hilfe des BCA-Assays ermittelt (siehe Abschnitt 4.3.5), Anschließend werden die ARID1A-Konzentrationen der einzelnen Verdünnungsstufen mit dem indirekten ELISA gemessen (siehe in Abschnitt 4.3.5). Die Analyse zeigt, dass unterhalb einer Gesamtproteinkonzentration von 20,08 µg/ml die gemessene ARID1A-Konzentration exponentiell abfällt (siehe Abbildung 14A).

Weiterhin ist auch kein Hook effect (engl. für Hakeneffekt: Falsch-niedrige Messwerte bei hohen Konzentrationen) sichtbar, was eine Unterdrückung der Detektion mittels der Antikörper durch Matrixeffekte bedeuten würde. Daher werden die gemessenen Gesamtproteinkonzentrationen für jede Fraktion und für jeden Patienten gemessen und die Mindestkonzentration von 20 µg/ml für jedes Lysat gemessen.

5.2.6 Parallelismus

Man benötigt den Beweis des Parallelismus der Absorptionen von Standards und Gewebelysaten, um anschließend die Absorptionen der Gewebelysate, gemessen in der Einheit der optischen Dichte (= OD), anhand der Standardkurve in nominale ARID1A-Konzentrationen umzurechnen. Abbildung 14B zeigt, dass es zwei Bereiche der Verdünnungskurven gibt. Bei niedriger Verdünnung der Gewebelysate (schwarze Quadrate), erfolgt eine Sättigung der Bindungsoberfläche, wie in Abschnitt 5.2.5 bereits erklärt. Daher ist hier die Kurve der Gewebelysate parallel zur x-Achse. Erst ab der zweifachen Verdünnung mit dem Verdünnungsfaktor 2 ergibt sich eine lineare Kurve in der doppelt-logarithmischen Darstellung (siehe Abbildung 14B rechter Teil). Es zeigt sich hierbei, dass die obere Kurve (schwarze Kreise) parallel zu der Kurve der Gewebelysate verläuft (siehe linker Teil der Abbildung 14B).

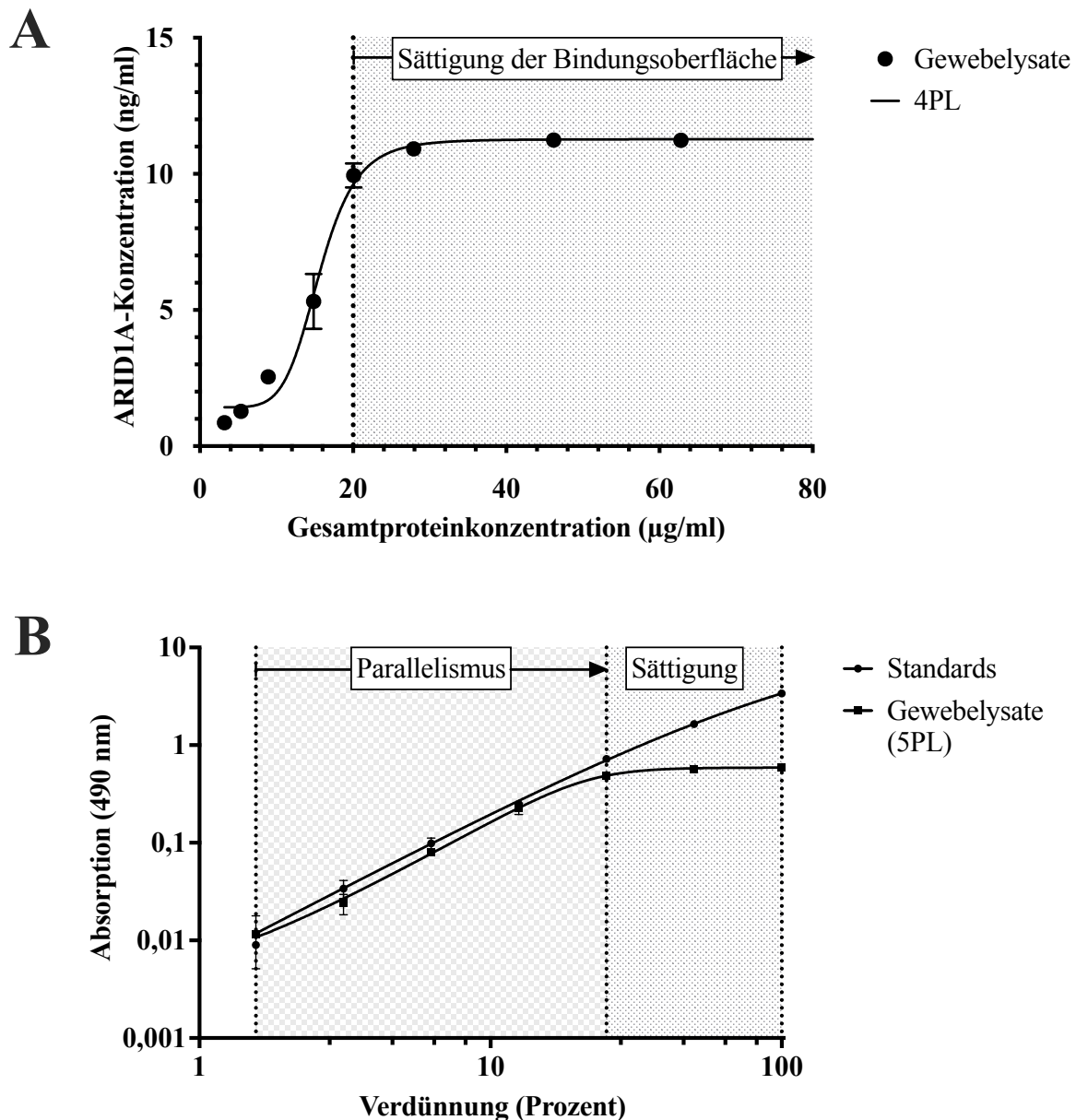


Abbildung 14. Minimal benötigte Konzentration und Parallelismus.

Legende: **(A)** Freie Zellkernfraktionen und ARID1A-Proteinstandards werden auf eine 96-Well-Platte aufgetragen, um die ARID1A-Konzentration (angegeben in ng/ml) zu bestimmen. Gesamtproteinkonzentrationen (angegeben in $\mu\text{g/ml}$) werden auf einer anderen unabhängigen Platte mit einem BCA-Assay bestimmt, der BSA als Standardprotein verwendet (siehe 4.3.3). Die ARID1A-Konzentrationen in den Lysaten werden auf Grundlage der ARID1A-Standardkurve extrapoliert. Die Messungen zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen von Duplikaten. Die ARID1A-Konzentrationen und die Gesamtproteinkonzentrationen werden mit Hilfe einer 4-parameter logistic (4PL) korreliert; **(B)** Unverdünnzte, reine Tumorkernlysate und ARID1A-Standards werden mindestens sechsmal seriell verdünnt und auf eine ELISA-Platte aufgetragen. Nach Durchführung des Standard ELISA-Protokolls (4.3.4), erfolgt die Messung der Absorption bei 490 nm. 100 % entspricht der höchsten gemessenen Proteinkonzentration, welche 62,79 ng/ml beträgt. Die Messungen zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen von Duplikaten. Beide Kurven werden durch eine 5-parameter logistic (5PL) interpoliert.

5.3 Patientenkollektiv

5.3.1 Verteilung von Alter, Geschlecht und Lokalisation

Alter

Das mittlere Alter im Patientenkollektiv beträgt 65,48 Jahre (Standardabweichung: 13,9). Die Altersspanne liegt zwischen 29-92 Jahren mit einem Median bei 66 Jahren. Insgesamt waren 18 % (n = 11), 56 % (n = 34) und 26 % (n = 16) in einem Alter von ≤ 54 , 55-74 und ≥ 75 Jahren.

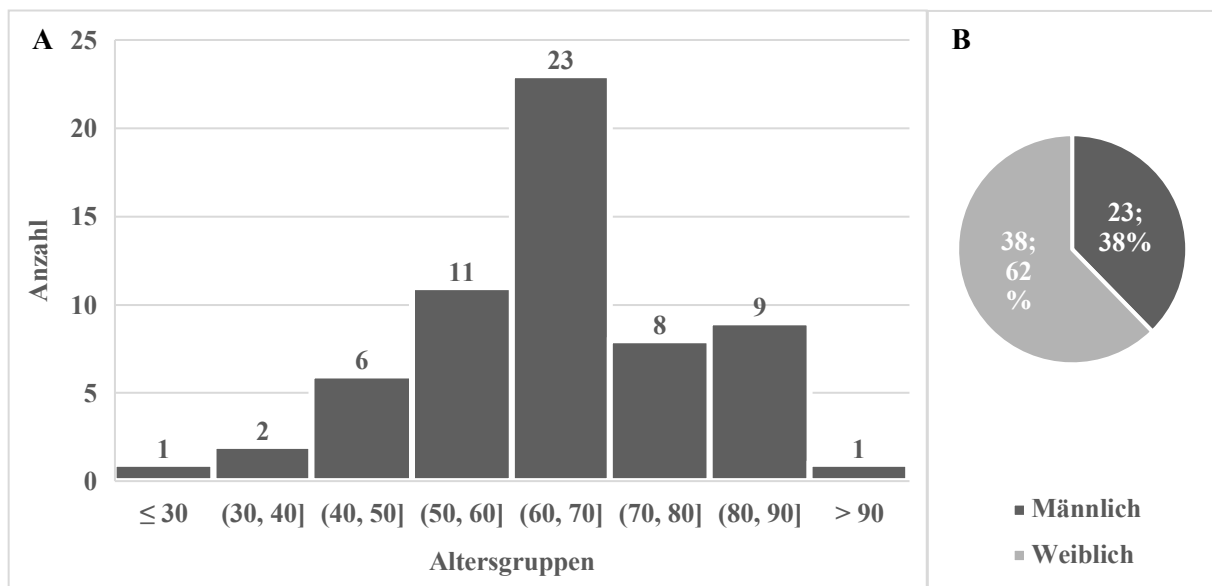


Abbildung 15. Alters- (A) und Geschlechtsverteilung (B) im Patientenkollektiv.

Legende: (A) Angegeben ist die absolute Anzahl an Patienten innerhalb einer Altersspanne; (B) Die erste angegebene Zahl gibt die absolute Anzahl des Geschlechts der Patienten an, wohingegen die zweite Zahl die relative Anzahl in Prozent angibt. Weiblich (hellgrau) und Männlich (dunkelgrau).

Geschlecht

In der untersuchten Kohorte befinden sich 38 Frauen (62 %) und 23 Männer (38 %). Von den Frauen hatten 27 (71 %), 8 (21 %) und 3 (8 %) ein Grad 1, 2 oder 3 Meningeom, wohingegen es bei den Männern 13 (56 %), 8 (35 %) und 2 (9 %) sind. Es zeigt sich somit, dass das männliche Geschlecht einen Risikofaktor für das Auftreten von höhergradigen Meningeomen – WHO-Grad 2 und 3 – darstellt. Statistisch gesehen haben Männer ein 1,5-fach erhöhtes relatives Risiko für höhergradige Meningeome (95 % Intervall: 0,75 bis 2,93), wobei dieser Unterschied in der Untersuchungskohorte nicht signifikant ist ($p = 0,2773$). Das Frauen zu Männer -Verhältnis (F:M-Verhältnis) insgesamt beträgt 1,65:1, wobei sich ein Unterschied von den niedriggradigen Meningeomen mit 2,08:1 und den höhergradigen Tumoren mit 1,1:1 zeigt.

Lokalisation

Insgesamt lassen sich neun solide Lokalisationen ausmachen, die in Abbildung 16 dargestellt sind. Neben solitären Meningeomen zeigen sich acht multifokal lokalisierte Meningeome. Singulär lokalisierte Meningeome lassen sich unterteilen in Tumore der Schädelbasis (SB), der Konvexität beziehungsweise der Nicht-Schädelbasis (N) und des spinalen Segments (S) wie in der Publikation von Maiuri et al. (2019) [67] (vergleiche Abschnitt 3.1.4). Demnach können Keilbeinflügel-, Olfaktorius- und petroclivale Meningeome der Schädelbasis zugeordnet werden ($n = 15$; 24,6 %). Zu der Gruppe Konvexitätsmeningeome lassen sich Tumore der Falx, der frontalen Konvexität, der temporalen Konvexität, des Okzipital Pols sowie des Parietals zuordnen ($n = 34$; 55,7 %). Die vier Tumore des spinalen Segments machen 6,6 % der Meningeome in dieser Untersuchungskohorte aus und die acht multifokalen Tumore nehmen einen Anteil von 13,1 % ein.

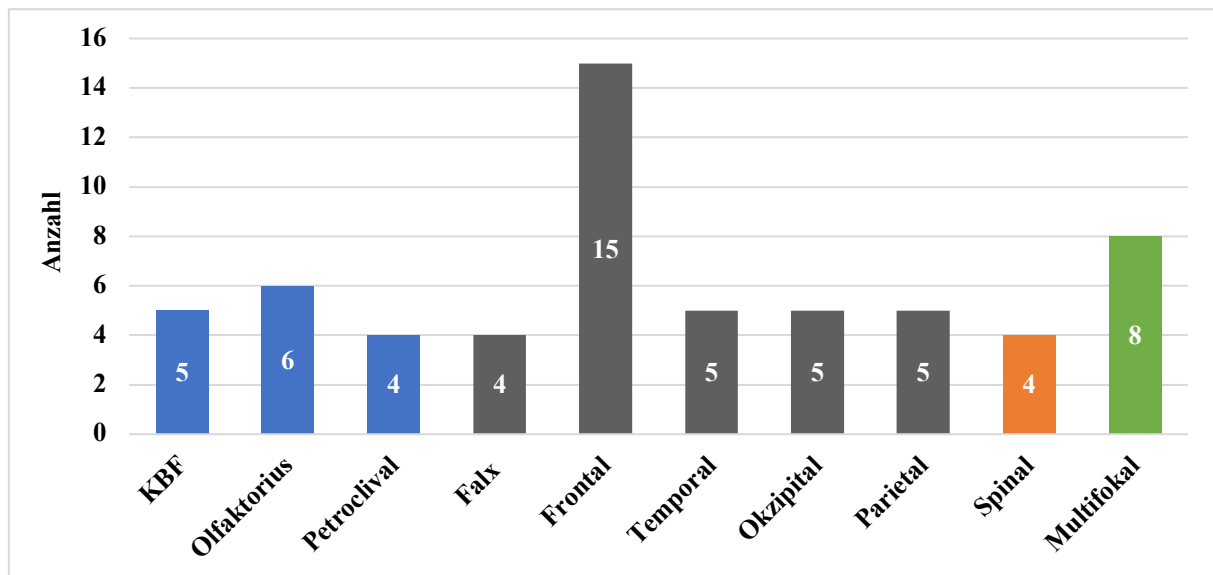


Abbildung 16. Verteilung der Lokalisationen im Patientenkollektiv.

Legende: Die angegebenen Zahlen stellen absolute Werte dar. Die Gruppe der Schädelbasismeningeome sind blau, die Konvexitätsmeningeome sind dunkelgrau und die Tumore des spinalen Segments sind orange dargestellt. Grün: Meningeome mit multifokalen Lokalisationen. KBF = Keilbeinflügel.

5.3.2 Distribution der histologischen Subtypen, WHO-Grade und Rezidive

Histologische Subtypen

Es lassen sich nach der WHO-Klassifikation aus 2021 [64] die Tumore dieser Untersuchungskohorte in mehrere histologische Subtypen einteilen (siehe Abschnitt 3.1.6). Es zeigen sich im Patientenkollektiv 29 Grad 1 Meningeome, die histologisch nicht näher kategorisierbar sind (M in Abbildung 17). Zudem zeigen sich drei angiomatöse Meningeome (ANGM), ein fibröses Meningeom (FM), vier meningothe-liale Meningeome (MM), zwei psammomatöse Meningeome (PM) und ein sekretorisches Meningeom (SM). In der Kategorie der Grad 2 Meningeome zeigen sich 14 atypische Meningeome (AM), ein

chordoides Meningeom (CM) und ein klarzelliges Meningeom (KM). Es gibt fünf anaplastische Meningeome (ANM) des WHO-Grades 3 im Patientenkollektiv.

Histologische Besonderheiten gibt es bei den Grad 1 Meningeomen in drei Fällen, wobei zweimal eine Durainfiltration und einmal eine ausgeprägte Bindegewebsinfiltration auffällt (vergleiche Tabelle 4). Insgesamt zeigen 3 der 16 Grad 2 Meningeome, also 18,8 % eine Hirninfiltration. Zwei weitere Fälle (Pat. Nr. 13, 32) zeigen histologisch eine Hirninfiltration und eine *TERT*-Mutation, sodass sie nach der neuen WHO Klassifikation als Grad 3 gewertet werden [64] (siehe Tabelle 4).

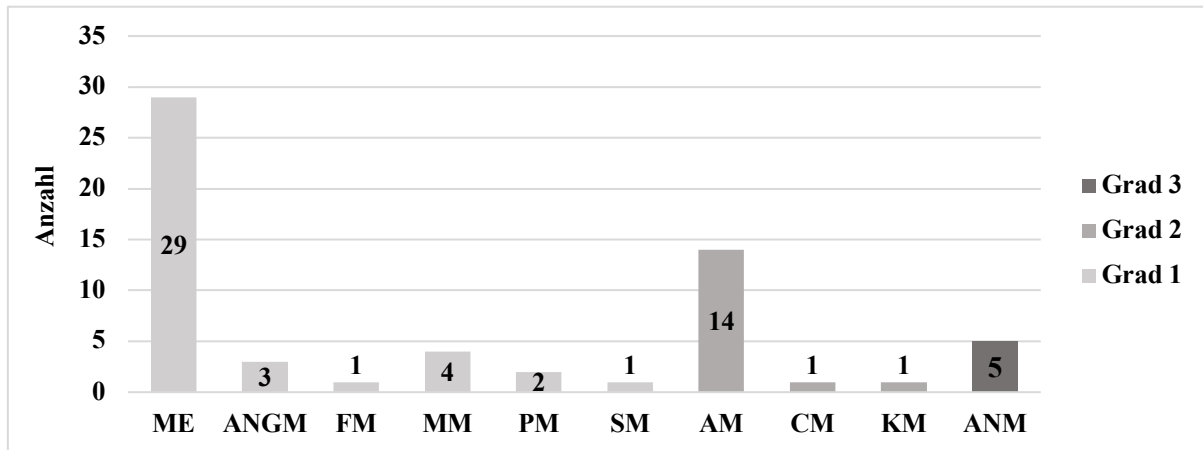


Abbildung 17. Verteilung der histologischen Subtypen im Patientenkollektiv.

Legende: Die angegebenen Zahlen geben absolute Werte wieder. WHO-Grad 1 (hellgrau): ME = Meningeom, nicht näher bezeichnet; ANGM = Angiomatöses Meningeom; FM = Fibröses Meningeom; MM = Meningotheliales Meningeom; PM = Psammomatöses Meningeom; SM = Sekretorisches Meningeom; WHO-Grad 2 (grau): AM = Atypisches Meningeom; CM = Chordoides Meningeom; KM = Klarzelliges Meningeom; WHO-Grad 3 (dunkelgrau): ANM = Anaplastisches Meningeom.

Rezidive

Neben den bisher genannten Kriterien werden die Tumore des Patientenkollektiv auch danach kategorisiert, ob sie operiert wurden als Rezidiv eines bereits resezierten Meningeoms oder als neu aufgetretenes Meningeom.

Es zeigen sich 14 Tumore (23 %), die als Rezidiv eines bisher bekannten Meningeoms aufgetreten sind (siehe Abbildung 18 B). Dabei liegt die mittlere Dauer bis zum Auftreten eines Rezidivs bei etwa 1287 Tagen (ca. 42 Monate und 8 Tage) und die mediane Dauer bei 1160 Tagen (ca. 38 Monate und 3 Tage). Minimal waren es 392 Tage (ca. 12 Monate und 26 Tage) und maximal 2216 Tage (72 Monate und 24 Tage). Dieser Berechnung unterliegen Daten von 11 der 14 Rezidivtumore, für die sowohl das erste Operations-Datum als auch das Datum der zweiten Operation vorlagen.

WHO-Grade

Aus den histologischen Subtypen und deren Gradierung nach der WHO-Klassifikation aus dem Jahr 2021 [64] sind in der vorliegenden Untersuchungskohorte 40 Grad 1 Meningeome (66 %), 16 Grad 2 Meningeome (26 %) und fünf anaplastische Grad 3 Meningeome (8 %) (siehe Abbildung 18A).

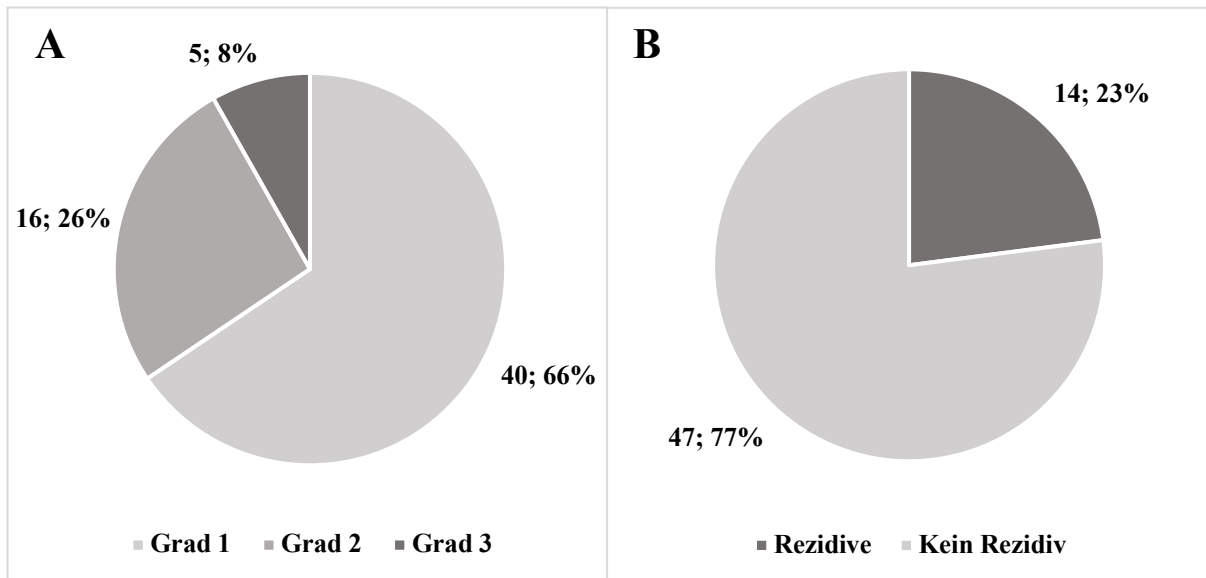


Abbildung 18. Verteilung der WHO-Grade (A) und Rezidive (B) im Patientenkollektiv.

Legende: Die erste angegebene Zahl gibt die absolute Anzahl der Patienten einer Gruppe an, wohingegen die zweite Zahl die relative Anzahl der Patienten in Prozent angibt. (A) Es werden WHO-Grad 1 (hellgrau) von 2 (grau) und 3 (dunkelgrau) unterschieden. (B) Es werden Rezidive (dunkelgrau) von Tumoren, die kein Rezidiv sind, differenziert (hellgrau).

5.4 ELISA-Messung der ARID1A-Konzentrationen

5.4.1 Vergleich von Meningeomen mit und ohne LOH des Chromosoms 1p

Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit besteht darin, ob der Verlust des Chromosoms 1p im Sinne eines loss of heterozygosity (LOH) (siehe Abschnitt 3.1.7) zu einer verminderten Proteinexpression von ARID1A führt. Das zugehörige Gen *ARID1A* ist auf Bande 1p36.11 gelegen und geht zumindest auf einem der beiden Allele verloren, wodurch unklar ist, ob dies eine Auswirkung auf die Proteinexpression hat. Die Primärdaten dieser Analyse sind in Tabelle 22 dargestellt.

Um dies herauszufinden, werden alle 61 Patientenproben mittels des „Subcellular Fractionation Kit for Tissues“ (Thermo Fisher Scientific, siehe 4.3.2) zubereitet. Anschließend erfolgt eine BCA-Messung zur Feststellung der Gesamtproteinkonzentration in den 1:26 verdünnten Lysaten. Wie in Abschnitt 5.2.5 bereits beschrieben, wird somit eine Proteinkonzentration von über 20 µg/ml gewährleistet. Sofern ein Lysat weniger als 20 µg/ml aufweist, wird ein geringer verdünntes Lysat hergestellt (1:10). Dies war für acht Tumorslysate der Patienten 2, 10, 17, 39, 48, 50, 55 und 61 nötig, in denen die Fraktionen Freinukleär und/oder Chromatin Konzentrationen weniger als 20 µg/ml Gesamtprotein zeigten. Die verdünnten Lysate werden anschließend nach dem Protokoll 11, Tabelle 10 in einem Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) analysiert. Hierfür erfolgt eine Messung in Duplikaten in den vier Fraktionen Zytosol, Membran, Freinukleär und Chromatin. Es zeigt sich in vier Patientenproben (Nr. 15, 33, 48 und 50) innerhalb der Fraktionen Zytosol und/oder Freinukleär eine Abweichung in der Präzision,

ermittelt anhand des Coefficient of variation (CV; siehe 4.3.5), von mehr als 25 %, sodass diese Messungen noch einmal wiederholt wurden und die neu ermittelten Werte verwendet werden.

Letztlich werden die Werte der beiden Fraktionen Frei nukleär und Chromatin zu einer Summe addiert, die im Folgenden Kern bezeichnet wird. Die Summe aus allen vier Fraktionen wird Gesamt bezeichnet. Der Hintergrund hierbei ist, dass ARID1A ein nukleozytoplasmatisches Protein ist [39], wobei insbesondere im Nukleus (lat. Kern, hier gemeint Zellkern) hohe Konzentrationen zu finden sind (siehe Abbildung 10 und Abbildung 11). Durch die Zusammenfassung beider Fraktionen werden Verschleppungsfehler, die während des Lysierens entstehen, möglicherweise besser ausgeglichen und das funktionelle Kompartiment des Zellkerns wird besser widerspiegelt als in beiden Fraktionen einzeln. Für die Summe Gesamt gilt der gleiche Hintergrund, nur dass diesmal Verschleppungsfehler in allen vier Fraktionen kompensiert werden können und somit möglicherweise validere Ergebnisse produziert werden können, die noch besser das gesamte ARID1A-Level in den Meningeomzellen berücksichtigen und somit in statistischen Analysen eine höhere Aussagekraft besitzen.

Wie schon in Abbildung 11 zu sehen, finden sich innerhalb der vier Lokalisationen (Zytosol, Membran, Frei nukleär und Chromatin) die höchsten Konzentrationen in der Fraktion Frei nukleär gefolgt von den Fraktionen Chromatin, Zytosol und Membran in absteigender Reihenfolge (siehe Abbildung 19).

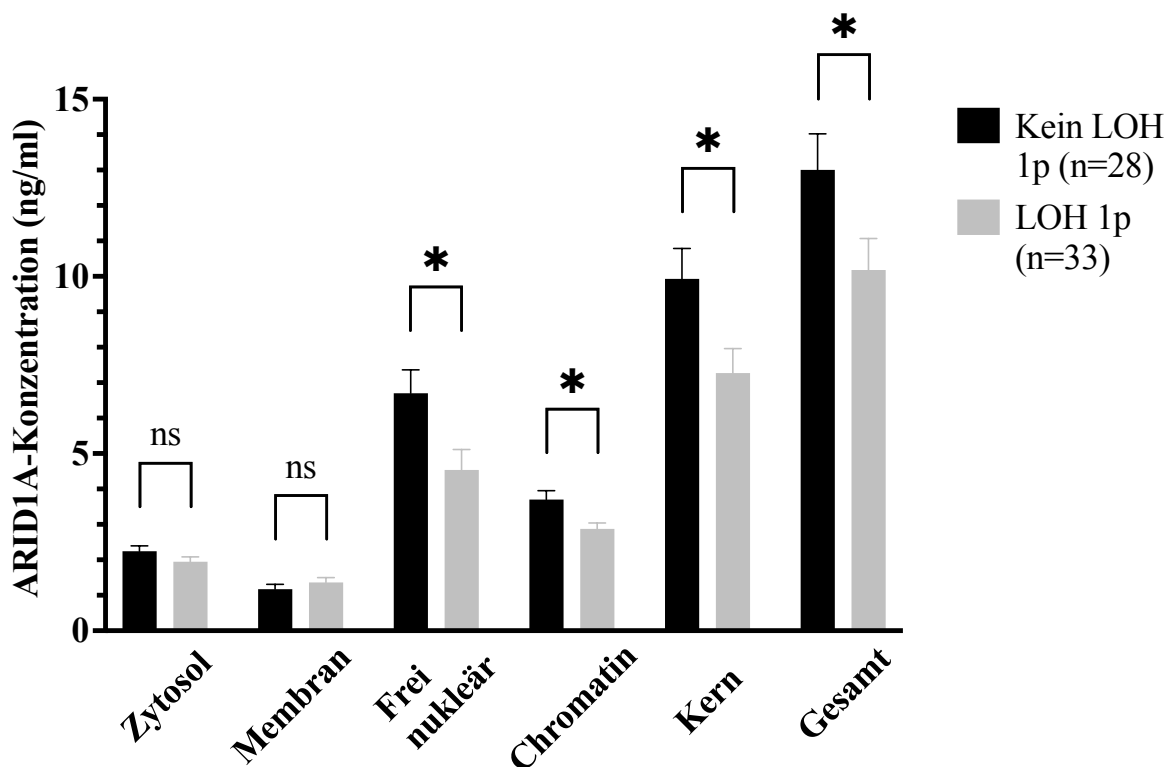


Abbildung 19. Vergleich der ARID1A-Konzentrationen in Tumoren mit und ohne loss of heterozygosity (LOH) des Chromosoms 1p in sechs verschiedenen Zellkompartimenten.

Legende: Dargestellt sind die Mittelwerte der zwei Gruppen „kein LOH 1p“ (schwarz) und „LOH 1p“ (grau), wobei „kein LOH 1p“ meint, dass das Chromosom 1p in diesen Tumoren vorhanden ist. Die Fehlerbalken über den Säulen geben den Standardfehler des Mittelwertes (SEM, englisch für standard error of the mean) an. „ns“ meint nicht signifikant ($p > 0,05$), wohingegen „*“ Signifikanz anzeigt ($0,01 < p < 0,05$).

In der Fraktion Zytosol zeigt sich ein relativer Unterschied von -13,0 %, was bedeutet, dass die Gruppe der Tumore, die einen LOH 1p aufweisen, 13,0 % weniger ARID1A exprimieren verglichen mit der Gruppe von Tumoren, die keinen LOH 1p zeigen (siehe Tabelle 12). Somit ergibt sich in diesem Zellkompartiment ein nicht signifikanter Unterschied ($p > 0,05$), trotz einer Reduktion der ARID1A-Level in der Gruppe der Meningeome mit LOH 1p.

Der Vergleich der Membran-Fraktionen zeigt zunächst, dass beide Gruppen keine Gauß'sche Normalverteilung besitzen, sodass der hier normalerweise verwendete parametrische t-Test für unabhängige Variablen nicht angewandt werden kann (¹, Tabelle 12). Stattdessen wird hier der Mann-Whitney-U-Test eingesetzt, der für nicht-parametrische Gruppen entwickelt wurde und bei dem insbesondere die Mediane beider Gruppen verglichen werden. Auch hier zeigt sich ein nicht signifikanter Unterschied ($p > 0,05$), wobei der Vergleich der beiden Gruppen „kein LOH 1p“ und „LOH 1p“ zeigt, dass 10,6 % mehr ARID1A in der Gruppe der Tumore vorhanden ist, die auch das Chromosom 1p verloren haben. Es ist hier allerdings zu beachten, dass die ARID1A-Konzentrationen nahe des LLOQ (lower limit of quantification, siehe Abschnitt 4.3.5 für die Definition und 5.2.1 für den Wert) liegen, sodass eine Interpretation des Ergebnisses diesen Fakt berücksichtigen muss.

Fraktion	Kein LOH 1p		LOH 1p		Absoluter Unterschied $\pm$ SEM (ng/ml)	Relativer Unterschied (%)	p-Wert
	Mittelwert (ng/ml)	Median (ng/ml)	Mittelwert (ng/ml)	Median (ng/ml)			
Zytosol	2,24	k.A.	1,95	k.A.	-0,29 $\pm$ 0,20	-13,0 %	0,1518
Membran₁	k.A.	1,02	k.A.	1,13	0,11	10,6 %	0,5999
Frei nukleär	6,7	k.A.	4,53	k.A.	-2,17 $\pm$ 0,88	-32,3 %	0,0172 (*)
Chromatin₁	k.A.	3,37	k.A.	2,81	-0,56	-16,5 %	0,0104 (*)
Kern	9,93	k.A.	7,27	k.A.	-2,66 $\pm$ 1,09	-26,8 %	0,0182 (*)
Gesamt	13,01	k.A.	10,18	k.A.	-2,83 $\pm$ 1,35	-21,8 %	0,04 (*)

Tabelle 12. Vergleich der ARID1A-Konzentrationen in Tumoren mit und ohne loss of heterozygosity (LOH) des Chromosoms 1p in sechs verschiedenen Zellkompartimenten.

Legende: Dargestellt sind die ARID1A-Konzentrationen, wobei in Spalte 1 und 2 jeweils die Mittelwerte angegeben sind. Spalte 4 enthält den absoluten Unterschied mit Angabe des Standardfehlers des Mittelwertes (SEM, englisch für standard error of the mean), da der Mittelwert statistisch gesehen als Punktschätzer der Grundgesamtheit aller Tumore mit und ohne LOH 1p angesehen wird. ¹ meint, dass die Gruppen keine Gauß'sche Normalverteilung besitzen, sodass der hier normalerweise verwendete parametrische t-Test für unabhängige Variablen nicht angewandt werden und durch den Mann-Whitney-U-Test ersetzt wird. „k.A.“ meint, dass in diesen Feldern keine Angabe gemacht werden kann.

Die genaue Analyse der Fraktionen, in denen statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen „kein LOH 1p“ und „LOH 1p“ zu finden sind – Frei nukleär, Chromatin, Gesamt und Kern – zeigt, dass Tumore mit LOH 1p relativ gesehen 32,3 %, 16,5 %, 26,8 % beziehungsweise 21,8 % weniger ARID1A exprimieren als solche, in denen das Chromosom 1p und somit auch das auf Bande

1p36.11 gelegene Gen *ARID1A* vorhanden ist. Eine detailliertere Analyse der Gruppen Frei nukleär und Gesamt zeigt zwei wesentliche Erkenntnisse: Es gibt zum einen Tumoren, die kein LOH 1p aufweisen und trotzdem sehr niedrige *ARID1A*-Expressionslevel aufweisen und zum anderen gibt es Tumore, die einen Verlust des Chromosoms 1p im Rahmen eines LOH besitzen, aber keine verminderte *ARID1A*-Konzentration besitzen (vgl. Abbildung 20). Letzteres betrifft in den beiden Gruppen Frei nukleär und Gesamt jeweils neun Tumore der Gruppe „Kein LOH 1p“ mit deutlich verminderter Expression verglichen zum Mittelwert der Gruppe (vgl. Abbildung 20).

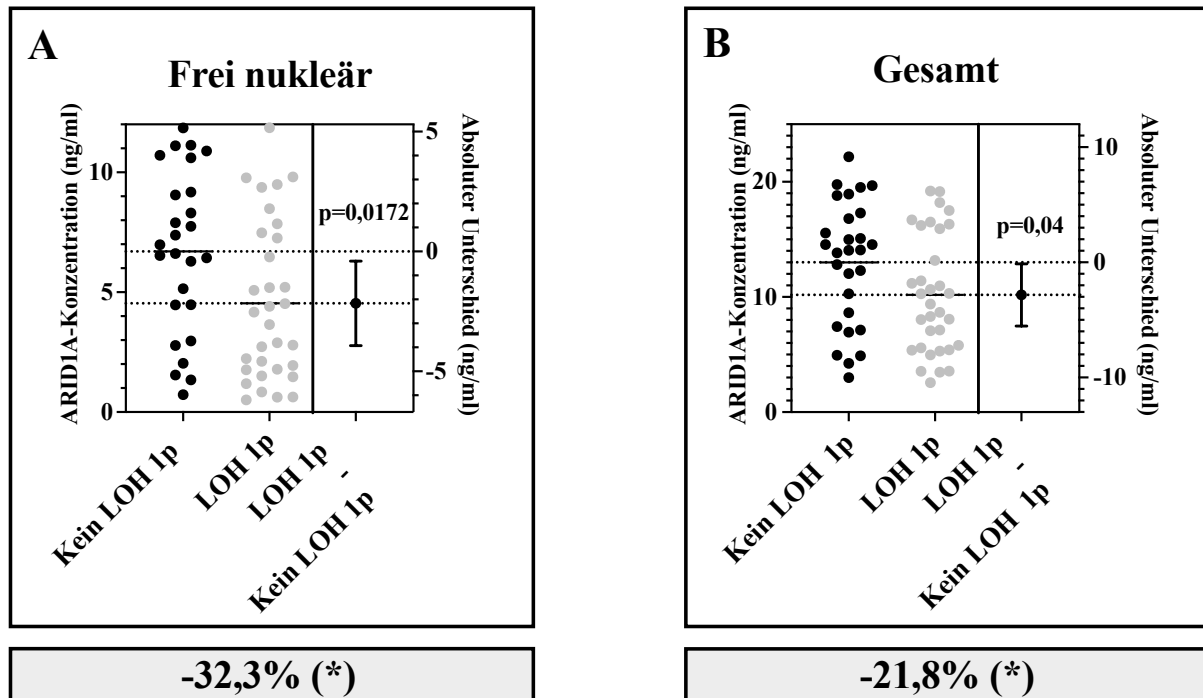


Abbildung 20. Vergleich der *ARID1A*-Konzentrationen in Tumoren mit und ohne loss of heterozygosity (LOH) des Chromosoms 1p in den beiden Gruppen Frei nukleär und Gesamt.

Legende: Beide Gruppen – (A) Frei nukleär und (B) Gesamt – weisen eine Gauß'sche Normalverteilung auf, sodass ein parametrischer t-Test für unabhängige Variablen angewendet wird. Diese werden graphisch als „Estimation Plot“ (engl. für Schätzungsdiagramm) dargestellt, wobei die Punktschätzer beider Gruppen (Mittelwerte) als horizontale schwarze Balken und die *ARID1A*-Konzentration jedes einzelnen Tumors als Punkte dargestellt sind. Es werden jeweils Tumore mit „LOH 1p“ (grau) von Meningeomen ohne LOH 1p („Kein LOH 1p“, schwarz) verglichen. Der absolute Unterschied (untere gestrichelte Linie) wird vom Nullwert (obere gestrichelte Linie) abgegrenzt. Auf der rechten Seite der drei Unterabbildungen wird der geschätzte absolute Unterschied und sein 95 % Konfidenzintervall gezeigt, bei dem ein Nicht-Überschneiden mit dem Nullwert statistische Signifikanz anzeigt.

Insgesamt scheint das Expressionslevel der Meningeomzellen sehr heterogen zu sein, sodass sich auch solche Außereißer nach oben feststellen lassen. Insgesamt zeigen sich in den Fraktionen folgende Messspannen: „Frei nukleär; LOH 1p“ von 0,511 bis 11,86 (Mittelwert 4,53), „Frei nukleär; Kein LOH 1p“ von 0,72 bis 11,86 (Mittelwert 6,7), „Gesamt; LOH 1p“ von 2,56 bis 19,2 (Mittelwert 13,01) und „Gesamt; Kein LOH 1p“ von 2,99 bis 22,18 (Mittelwert 10,18).

5.4.2 Vergleich der ARID1A-Level in den unterschiedlichen WHO-Graden

Im Zytosol werden folgende Mittelwerte festgestellt: WHO-Grad 1 (2,04 ng/ml), WHO-Grad 2 (2,3 ng/ml) und WHO-Grad 3 (1,8 ng/ml), wobei die statistische Analyse mittels des parametrischen t-Tests für unabhängige Stichproben und ANOVA keine signifikanten Unterschiede in den drei WHO-Graden zeigen. Für die Fraktion Membran ergeben die Mediane der WHO-Grade 1 (1,00 ng/ml), 2 (1,38 ng/ml) und 3 (1,02 ng/ml) ebenfalls keine signifikanten Unterschiede, ermittelt anhand des Mann-Whitney-U Tests und Kruskal-Wallis Tests für nicht-parametrisch verteilte Gruppen. Abbildung 21 vergleicht zusammenfassend die Mittelwerte der ARID1A-Konzentration der drei WHO-Grade 1, 2 und 3 in den sechs Gruppen Zytosol, Membran, Frei nukleär, Chromatin, Kern und Gesamt.

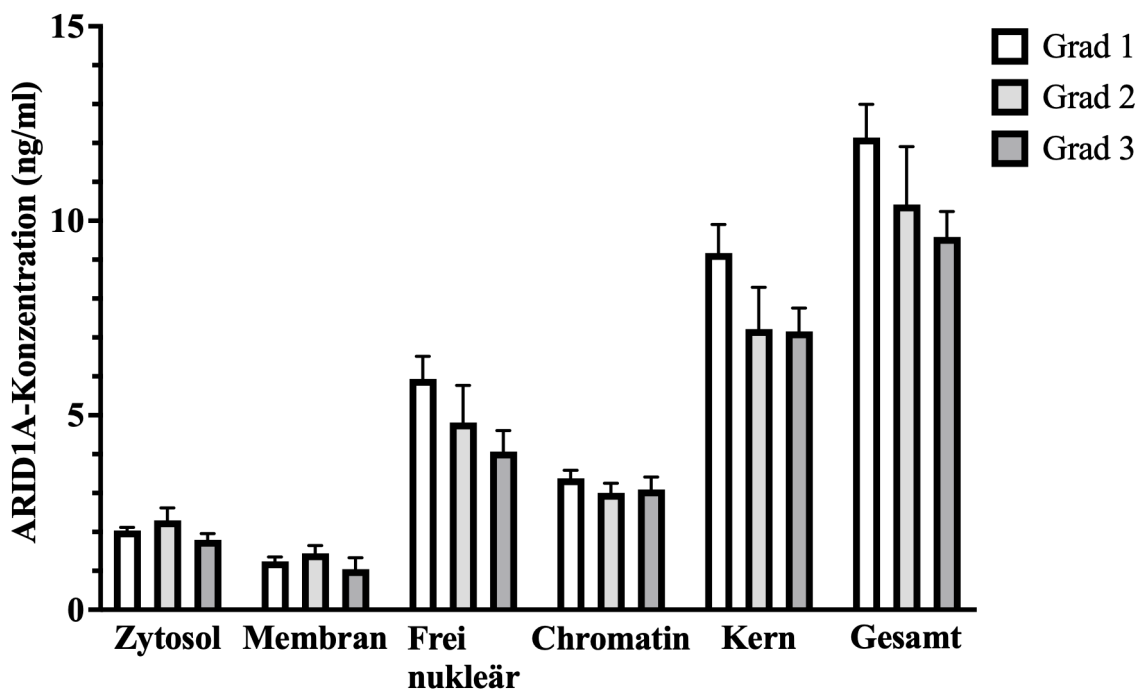


Abbildung 21. Vergleich der ARID1A-Konzentrationen von Tumoren mit unterschiedlicher WHO-Gradierung innerhalb von sechs Zellkompartimenten.

Legende: Die einzelnen Balken stellen die Mittelwerte der Fraktionen eines WHO-Grades dar, wobei WHO-Grad 1 (weiß) von 2 (hellgrau) und 3 (dunkelgrau) unterschieden werden. Fehlerbalken über den Säulen geben den Standardfehler des Mittelwertes (SEM, englisch für standard error of the mean) an.

In der Fraktion Frei nukleär zeigt sich eine Verminderung von WHO-Grad 1 (Median 6,53 ng/ml) zu WHO-Grad 2 (Median 4,1 ng/ml) von 37,2 %, die allerdings statistisch nicht signifikant ist ($p > 0,05$; Mann-Whitney-U Test). Zum WHO-Grad 3 (Median 4,52 ng/ml) sind ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede darstellbar ($p > 0,05$; Mann-Whitney-U Test sowie Kruskal-Wallis Test).

Im Chromatin lassen sich folgende Unterschiede festmachen: Der WHO-Grad 1 (Median 3,13 ng/ml) hat im Vergleich zum WHO-Grad 2 (Median 2,9 ng/ml) und WHO-Grad 3 (Median 3,00 ng/ml) zwar

die höchsten ARID1A-Level, doch auch hier bleibt die statistische Signifikanz aus ($p > 0,05$; Mann-Whitney-U Test sowie Kruskal-Wallis Test).

In der Fraktion Kern zeigt sich, dass im WHO-Grad 1 (Median 9,14 ng/ml) mehr ARID1A-Protein vorhanden ist als im WHO-Grad 2 (Mittelwert 7,1 ng/ml). Allerdings bleibt auch hier, trotz einer Reduktion um 22,3 % eine statistische Signifikanz aus ($p > 0,05$; Mann-Whitney-U Test). Auch im Vergleich mit dem WHO-Grad 3 (7,3 ng/ml) zeigen sich keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$; Mann-Whitney-U Test sowie Kruskal-Wallis Test). Der WHO-Grad 1 weist auch in der Fraktion Gesamt die höchsten ARID1A-Konzentrationen auf mit 12,56 ng/ml im Median, wobei signifikante Unterschiede im Vergleich zu WHO-Grad 2 (Median 9,5 ng/ml) und WHO-Grad 3 (Median 9,38 ng/ml) ausbleiben ($p > 0,05$; Mann-Whitney-U Test sowie Kruskal-Wallis Test). Trotzdem ist eine Reduktion von 24,6 % und 25,3 % des WHO-Grades 1 im Vergleich zu den WHO-Graden 2 und 3 festzuhalten.

5.4.3 Analyse der ARID1A-Konzentrationen in unterschiedlichen Lokalisationen

Neben den bisher analysierten Informationen über die Patientenproben wird auch die von den neurochirurgischen Kollegen angegebene Lokalisation des Meningeoms in die statistische Auswertung mit aufgenommen (siehe Abbildung 16) und deren unterschiedliche ARID1A-Konzentrationen genauer betrachtet (siehe Tabelle 13). Hierfür wird die Gruppe der Nicht-Schädelbasismeningeome (N, Konvexitätsmeningeome) von der Gruppe der Schädelbasismeningeome (SB), der Gruppe der spinalen Meningeome (S) und der multifokalen Meningeome (M) unterschieden (vergleiche Abschnitt 5.3.1), da es Hinweise auf Unterschiede in die molekularpathologisch involvierten Signalwege, das Wachstumsmuster und die Prognose gibt (vergleiche Abschnitt 3.1.4).

Wie in Abbildung 16 gezeigt, gehören der Gruppe der Nicht-Schädelbasismeningeome folgende Lokalisationen an: Falx, frontale Konvexität, temporale Konvexität, Okzipital- sowie Parietalpol. Zu der Schädelbasis (SB) gehören Keilbeinflügel-, Olfaktorius- und petroclivale Meningeome. Insgesamt kann man auch singular lokalisierte Meningeome (SI) von multifokalen Meningeomen unterscheiden.

Vergleicht man zunächst die Nicht-Schädelbasismeningeome mit den Schädelbasismeningeomen so fällt auf, dass sich lediglich in der Fraktion Zytosol eine signifikante veränderte ($0,01 \leq p < 0,05$; *) ARID1A-Konzentration finden lässt (vergleiche Tabelle 13). Der Vergleich der spinalen Meningeome mit den Nicht-Schädelbasismeningeomen ergibt keine signifikanten Unterschiede der beiden Gruppen. Allerdings zeigt der Vergleich der Nicht-Schädelbasismeningeome mit den multifokalen Meningeomen folgenden Unterschied: In den Fraktionen Kern und Gesamt zeigen sich signifikante Verminderungen ($0,001 \leq p < 0,01$; **) zu Lasten der multifokalen Meningeome. Die Unterschiede sind hierbei mit 56,9 % und 55,3 % als hoch zu werten. In der Fraktion Zytosol ist der Unterschied hoch signifikant ($0,0001 \leq p < 0,001$; ***) mit einer Verminderung von 43,7 % der ARID1A-Konzentration. Zudem zeigt die Fraktion Frei nukleär eine signifikante ($p < 0,05$) ARID1A-Verminderung von 51,6 % der multifokalen Meningeome verglichen mit den Nicht-Schädelbasismeningeomen. In der Membranfraktion lässt sich

ein Unterschied von 16,7 % in umgekehrter Richtung festhalten, wobei in der Interpretation berücksichtigt werden muss, dass hier kein signifikanter Unterschied vorliegt und die Messwerte der Fraktion Membran nahe des LLOQ (lower limit of quantification, siehe Abschnitt 4.3.5 für die Definition und 5.2.1 für den Wert) liegen. In der Fraktion Chromatin scheitert der t-Test für unabhängige Stichproben knapp an dem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ mit einem p-Wert von 0,0981. Dennoch zeigt sich eine Verminderung von 19,7 %. Der Vergleich der Schädelbasismeningeome mit den spinalen Meningeomen erbringt keine statistisch signifikanten Veränderungen in allen Fraktionen.

Das gleiche gilt auch für den Vergleich der Schädelbasismeningeome mit den multifokalen Meningeomen. Lediglich in den Gruppen Frei nukleär und Kern zeigen sich Unterschiede von 55,4 % beziehungsweise 54,3 % zu Lasten der multifokalen Meningeome, die allerdings das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ mit $p = 0,0601$ beziehungsweise $p = 0,0755$ knapp verfehlen. Die Fraktion Gesamt weist auch eine Reduktion von 52,3 % auf, wobei auch hier der p-Wert mit 0,0755 knapp an der statistischen Signifikanz scheitert. In der Lokalisation der spinalen Meningeome zeigt sich im Vergleich mit den multifokalen Meningeomen eine signifikante Reduktion ($p < 0,01$) in der Fraktion Chromatin von 35,7 %, sowie signifikante ($p < 0,05$) Verminderungen in den Fraktionen Zytosol und Frei nukleär mit 42,3 % beziehungsweise 68,7 % zu Lasten der multifokalen Meningeome. Vergleiche der beiden Lokalisationen in den Gruppen Kern und Gesamt ergeben starke Verminderungen von 65,3 % und 62 %, wobei beide Gruppen das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ verfehlen mit $p = 0,1535$ und $p = 0,2141$.

Fraktion	Zytosol	Membran	Frei nukleär	Chromatin	Kern	Gesamt
SB vs. N	-21,6 % (*)	14,0 %	8,6 %	2,5 % ¹	-5,7 % ¹	-3,4 %
S vs. N	2,5 %	14,5 %	54,7 %	25,0 %	24,5 % ¹	9,2 %
M vs. N	-43,7 % (***)	16,7 %	-51,6 % (*)	-19,7 % ²	-56,9 % (**) ¹	-55,3 % (**) ¹
S vs. SB	24,3 %	-25,0 %	42,4 %	25,9 % ¹	15,5 %	13,1 %
M vs. SB	-28,2 %	2,4 %	-55,4 % ²	-10,5 % ¹	-54,3 % ^{1;2}	-52,3 % ^{1;2}
M vs. S	-42,3 % (*)	36,5 %	-68,7 % (*)	-35,7 % (**)	-65,3 % ¹	-62,0 % ¹
M vs. SI	-40,0 % (**)	78,5 % ¹	-71,6 % (*) ¹	-10,5 % ^{1;2}	-57,3 % (*) ¹	-55,8 % (**) ¹

Tabelle 13. Analyse der ARID1A-Konzentrationen in unterschiedlichen Lokalisationen.

Legende: ¹ Diese Gruppen sind nicht normalverteilt, daher wird hier der nicht-parametrische Mann-Whitney-U Test angewendet und zur Berechnung der relativen Unterschiede werden die Mediane herangezogen. ² Die angegebenen Gruppen unterscheiden sich mit einem p-Wert von $< 0,10$ und verfehlen daher knapp das Signifikanzniveau von $p < 0,05$. SB = Schädelbasis, N = Nicht-Schädelbasis, S = Spinal, M = Multifokal, SI = singulärer Herd (alle singulären Meningeom Herde der Gruppen SB, N und S). „M vs. SI“ bedeutet, dass die Gruppe der Meningeome mit multifokalen Herden im Vergleich zur Gruppe der Meningeome mit singulären Herden in der Fraktion Frei nukleär 71,6 % weniger ARID1A-Expression mit einer Signifikanz von $0,01 \leq p < 0,05$ aufweist.

Da diese Vergleiche nahelegen, dass es statistisch relevante Unterschiede der singulären Herde (SI; alle singulären Meningeom Herde der Gruppen SB, N und S) verglichen mit den multifokalen Herden gibt,

werden diese in einer Gruppe zusammengefasst (siehe Tabelle 13). Hierbei zeigt sich, dass in den Gruppen Zytosol und Gesamt signifikante ($p < 0,01$) Verminderungen von 40,0 % und 55,8 % vorliegen zu Lasten der multifokalen Meningeome. Außerdem sind signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede in den Gruppen Frei nukleär mit 71,6 % Verminderung und Kern mit 57,3 % Reduktion zu Lasten der multifokalen Meningeome ersichtlich. Die Fraktion Chromatin weist eine Verminderung von 10,5 % auf, scheitert jedoch knapp am Signifikanzniveau mit einem p-Wert von 0,058. Lediglich in der Fraktion Membran zeigt sich ein statistisch nicht signifikanter Unterschied in umgekehrter Richtung, wobei auch hier – wie oben beschrieben – die niedrigen Konzentrationen in der Interpretation berücksichtigt werden müssen.

5.4.4 Analyse der ARID1A Konzentrationen in Rezidivtumoren

Ein weiterer Parameter, der für jede Tumorseite in die statistische Analyse mitaufgenommen wird, ist der Rezidivstatus (siehe Abschnitt 5.3.2 und Abbildung 18). Die 14 Rezidivtumore werden als eine Gruppe zusammengefasst, in der innerhalb einer der sechs Gruppen Zytosol, Membran, Frei nukleär, Chromatin, Kern und Gesamt ein Vergleich durchgeführt wird mit den 47 Nicht-Rezidivtumoren (siehe Tabelle 14).

Fraktion	Nicht-Rezidiv		Rezidiv		Absoluter Unterschied (ng/ml)	Relativer Unterschied (%)	p-Wert
	Mittelwert (ng/ml)	Median (ng/ml)	Mittelwert (ng/ml)	Median (ng/ml)			
Zytosol	2,14	k.A.	1,89	k.A.	-0,25 ± 0,25	-11,6 %	0,3331
Membran	1,30	k.A.	1,16	k.A.	-0,14 ± 0,28	-10,6 %	0,6292
Frei nukleär¹	k.A.	6,36	k.A.	2,45	-3,91	-61,4 %	0,0460 (*)
Chromatin¹	k.A.	3,24	k.A.	2,6	-0,64	-19,7 %	0,0107 (*)
Kern¹	k.A.	9,09	k.A.	5,58	-3,51	-38,7 %	0,0401 (*)
Gesamt¹	k.A.	12,30	k.A.	8,05	-4,25	-34,5 %	0,0455 (*)

Tabelle 14. Analyse der ARID1A-Konzentrationen in Nicht-Rezidiv- und Rezidivmeningeomen.

Legende: ¹ Diese Gruppen sind nicht normalverteilt, daher wird hier der nicht-parametrische Mann-Whitney-U Test angewendet und zur Berechnung der relativen Unterschiede werden die Mediane herangezogen. „k.A.“ meint, dass in diesen Feldern keine Angabe gemacht werden kann.

Für die Fraktionen Zytosol und Membran kommt hierbei der parametrische t-Test für unabhängige Variablen zur Anwendung, der zeigt, dass sich keine statistisch relevanten Differenzen in den beiden Gruppen finden ($p > 0,05$). Es bleiben jedoch Verminderungen von 11,6 % und 10,6 % zu Lasten der Rezidivtumore festzuhalten. Eine andere Situation zeigt sich in den Gruppen Frei nukleär, Chromatin, Kern und Gesamt, in denen sich statistisch signifikante Differenzen ($p < 0,05$) finden lassen (siehe Tabelle 14). Die relativen Unterschiede sind unterschiedlich ausgeprägt mit 61,4 % in der Fraktion Frei nukleär, 19,7 % in der Fraktion Chromatin, 38,7 % in der Gruppe Kern und 34,5 % in der Gruppe Gesamt, wobei diese Differenzen jeweils zu Lasten der Rezidivtumore ausgeprägt sind.

Somit lässt sich zusammenfassen, dass die Rezidivtumore in den vier Gruppen Frei nukleär, Chromatin, Kern und Gesamt statistisch signifikant weniger ARID1A-Protein besitzen und die Ausprägung zwischen 19,7 % bis 61,4 % Reduktion schwankt.

5.5 Histologische Auswertung ARID1A-Level

Das Protokoll der immunhistochemischen Färbung ist in Abschnitt 4.4 zu finden. In diesem Abschnitt soll näher erläutert werden, welche Ergebnisse in den 35 gefärbten Schnitten produziert wurden. Eine genaue Auflistung der einzelnen Patientennummern und deren histologische Interpretation der Färbeverhalten des ARID1A-Antikörpers ab182560 (Abcam, USA) ist in Tabelle 22 zu finden. Innerhalb der 35 analysierten Schnitte sind alle 33 Meningeome enthalten, in denen ein Verlust des Chromosoms 1p im Sinne einer LOH (loss of heterozygosity; siehe Abschnitt 3.1.7) verloren gegangen ist sowie zwei Tumore, in denen das Chromosom 1p vorhanden ist. In den beiden zuletzt genannten zeigen sich keine Ausfälle der ARID1A-Expression (siehe Tabelle 22).

5.5.1 Geringgradiger mosaikartiger Ausfall der ARID1A-Expression

In der Analyse der immunhistochemischen Färbungen der ARID1A-Level mit dem ab182560 (Abcam) Antikörper fällt zunächst auf, dass eine positive Reaktion des Antikörpers mit dem Epitop lediglich im Zellkern zustande kommt. So zeigt sich die rotbraune Färbung sehr distinkt auf den Zellkern begrenzt und weder Zellmembran, noch Zytosol oder andere Organellen können identifiziert als ARID1A-immunreaktiv identifiziert werden (vgl. Abbildung 22). Somit können ARID1A-negative Zellen in der Gegenfärbung mittels Mayer's Hämalaulösung erkannt werden, da die Zellkerne dieser Zellen eine dunkelblaue Farbe besitzen.

Betrachtet man die immunhistochemischen Färbungen der 33 Tumore mit einem LOH 1p, so zeigen sich insgesamt 13 Meningeome mit einem geringgradigen mosaikartigen Ausfall der ARID1A-Expression, wie er in Abbildung 22 exemplarisch dargestellt ist. Dieser hohe Anteil von 39 % steht im Gegensatz zu weiteren 15 Meningeomen, in denen keine Auffälligkeiten zu finden sind (46 %). Der Phänotyp des geringgradigen mosaikartigen Ausfalls ist gekennzeichnet durch Meningeomzellgruppen, die in einem umschriebenen Areal zu finden sind. Es scheint als wären diese Gruppen aus einem sich teilenden Zellklon entstanden, der sich in der immunhistochemischen Färbung ARID1A-negativ darstellt. Die dazugehörigen ARID1A-negativen Zellen lassen keine Unterschiede in ihrem Aussehen erkennen: Die Zellform erscheint rundlich bis oval, die Zellmembranen erscheinen glatt, das Chromatin ist locker aufgebaut und es lassen sich teilweise einzelne Nucleoli erkennen. Diese Zellpopulationen lassen sich mit einer HE-Färbung (Hämatoxylin-Eosin Färbung) nicht sicher von den immunhistochemisch ARID1A-positiven Zellen unterscheiden. Entscheidend für den geringgradigen mosaikartigen Phänotyp des ARID1A-Ausfalls ist, dass die ARID1A-negativen Zellen nicht mehr als 50 % der gesamten Zellpopulation ausmachen.

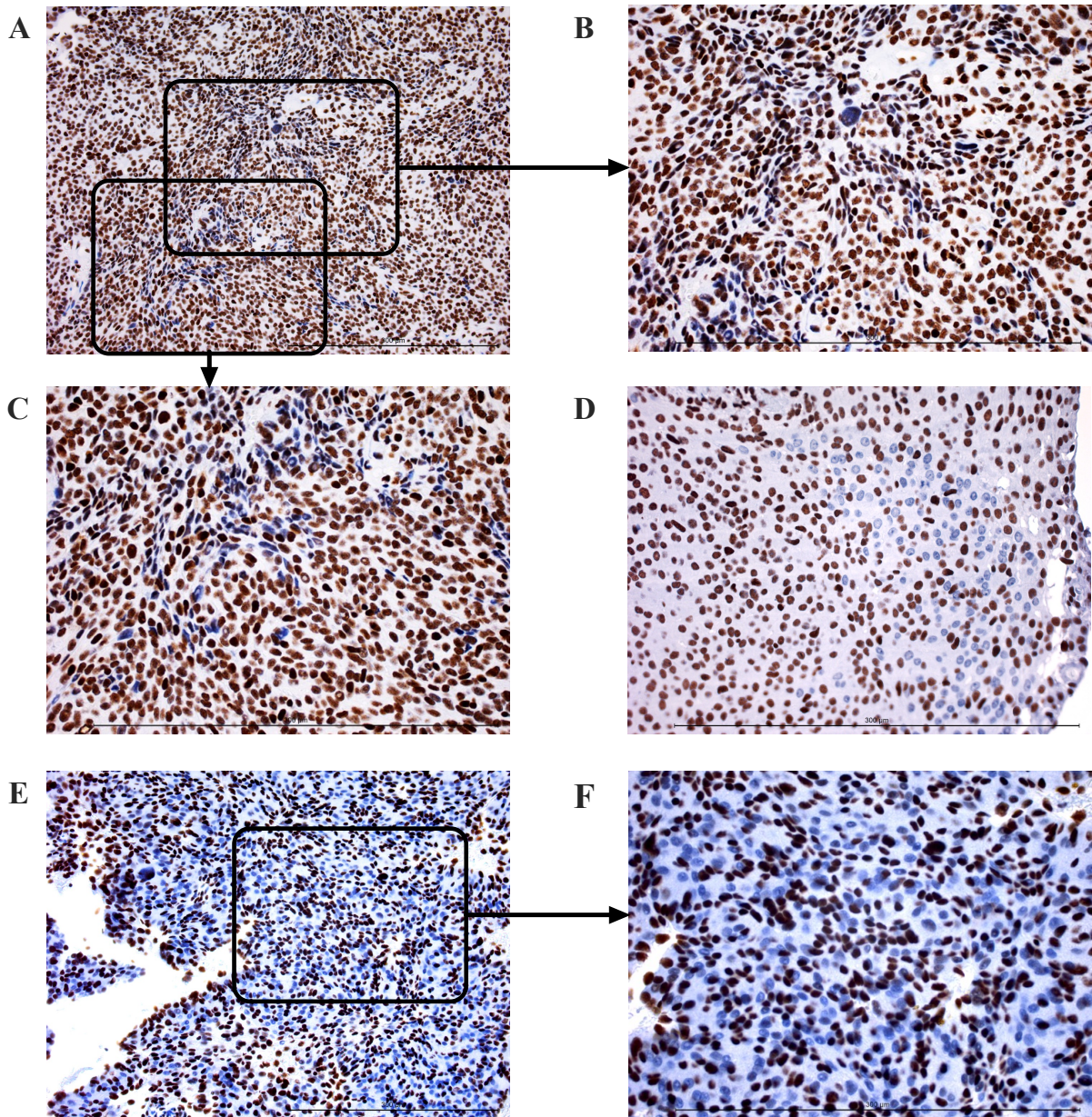


Abbildung 22. Immunhistochemischer Ausfall der ARID1A-Expression.

Legende: (A-C) Geringgradiger mosaikartiger Ausfall der ARID1A-Expression in der Immunhistochemie. Es zeigen sich ARID1A-positive Zellen (braun gefärbt) und ARID1A-negative Zellen (blau gefärbt) in den Patientenproben 26 und (D) Patientenprobe 1. (E-F) Hochgradiger mosaikartiger Ausfall der ARID1A-Expression. Es zeigen sich ARID1A-positive Zellen (braun gefärbt) und ARID1A-negative Zellen (blau gefärbt) in der Patientenprobe 9. Im unteren befindet sich jeweils ein Maßstab, der anzeigt wie groß 300 µm sind.

Beispielhaft zeigt Abbildung 22A einen Ausschnitt aus der Patientenprobe Nummer 26 mit kleiner Vergrößerung. Bei genauerer Betrachtung (Abbildung 22B, C) finden sich hier Areale, in denen eine mehrere ARID1A-negative Zellen (blau gefärbt) im Kontrast zu ARID1A-positiven Zellen (braun gefärbt) stehen, wobei ein totaler Anteil von weniger als 50 % erkennbar ist. Abbildung 22D zeigt Patientenprobe Nummer 1, in der ein Areal zu sehen ist, in dem ein kleiner ARID1A-negativer Zellhaufen umgeben ist von ARID1A-positiven Meningeomzellen. In Mitten des Zellhaufens finden sich einige wenige

ARID1A-kompetente Zellen, die unterstreichen, dass es kein Färbeartefakt oder Färbefehler ist, der dafür verantwortlich ist, dass manche Zellen nicht ARID1A-positiv reagieren. Außerhalb des Zellhaufens finden sich keine ARID1A-negativen Zellen, weshalb diese Patientenprobe dem geringgradigen mosaikartigen Phänotyp zugeschrieben wird.

5.5.2 Höhergradiger mosaikartiger Ausfall der ARID1A-Expression

Daneben gibt es fünf Meningeome, die einen Ausfall der ARID1A-Expression zeigen, der zwar nicht einem totalen Ausfall zuzuordnen ist, allerdings ist der ARID1A-Verlust in mehr als 50 % der Zellen zu erkennen (siehe Abbildung 22E, F). Die fünf Meningeomen machen insgesamt einen Anteil von 15 % der analysierten Tumore mit einem LOH 1p aus. Phänotypisch ausschlaggebend für die Klassifikation dieses Musters ist ein Nebeneinander von ARID1A-positiv und ARID1A-negativ gefärbten Meningeomzellen in mehr als der Hälfte der Meningeomzellen. Interessanterweise lassen sich hier keine scharf abgrenzbaren Areale mehr ausmachen, in denen eine Zellpopulation ARID1A-negativer Zellen zu finden ist. Diese sind diffus eingestreut in ARID1A-positive Zellen und weisen – wie auch die Meningeomzellen beim geringgradigen mosaikartigen Phänotyp – keine besonderen Merkmale in der HE-Färbung auf. Exemplarisch ist in Abbildung 22E gezeigt, dass bei kleiner Vergrößerung bereits ein höhergradiges mosaikartiges Muster zu erkennen ist, welches bei näherer Betrachtung (siehe Abbildung 22F) diffus viele ARID1A-positive und weniger ARID1A-negative Zellen zeigt.

5.5.3 Weitere Analyse der immunhistochemischen ARID1A-Level

Weitere Färbungen (HE-Färbung, Elastica van Gieson, Periodic Acid Shift und Gomori), wie sie routinemäßig zur Diagnostik im Institut für Neuropathologie durchgeführt werden, sind einer detaillierten Analyse unterzogen worden auf Korrelationen mit den immunhistochemischen ARID1A-Verlusten. Allerdings erbringt die Analyse keine neuen Erkenntnisse. Zusätzlich wird in einer multivariaten linearen Regression untersucht, ob eine der folgenden Variablen einen signifikanten Einfluss auf die immunhistochemische ARID1A-Expression hat: Geschlecht, mitotische Aktivität (histologisch oder über PHH3), Ki-67, Epitheliales Membran-Antigen, Progesteronrezeptor (PR) sowie Merkmale in der HE-Färbung wie „Small cell changes“, „Sheeting“ oder Nekrosen (siehe Begriffe: 3.1.6; Auswertung: Tabelle 24). Keines dieser Merkmale erweist sich in einer multivariaten Analyse als signifikanter Marker für eine verminderte ARID1A-Expression in einer der sechs subzellulären Fraktionen und Gruppen der Meningeome. Die ANOVA zeigt keine Unterschiede im Vergleich der ARID1A-Expression, gemessen mittels ELISA, von Tumoren mit normaler Expression, einem fokalen Verlust oder einem mosaikartigen Verlust ($p > 0,05$). Ein Vergleich mittels des t-Tests zeigt ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Aufgrund der fehlenden Korrelation von Immunhistochemie und ELISA wurde beschlossen, die immunhistochemischen Daten der Meningeome ohne LOH 1p nicht zu ergänzen.

5.6 Analyse des LOH von Chromosom 6q in Meningeomen

Eine detaillierte Analyse der vier PCR-Sonden ist in Tabelle 23 im Anhang zu finden. Im Folgenden soll auf die wesentlichen Ergebnisse dieser Tabelle eingegangen werden. Zur Analyse des losses of heterozygosity (LOH) des Chromosoms 6q werden die vier Sonden D6S281, D6S440, D6S473 und D6S1633 verwendet, deren genaue Lage in Tabelle 6 aufgelistet ist. Abschnitt 4.2 beschreibt die exakte Methodik der PCR und Auswertung der Mikrosatteliten.

5.6.1 Analyse der vier Sonden D6S281, D6S440, D6S473 und D6S1633

Zu Beginn der Analyse werden neben den hier beschriebenen vier Sonden vier weitere Sonden auf dem Chromosom 6q getestet. Davon liegen wiederum vier dieser Sonden innerhalb des *ARID1B*-Gens. Jedoch mussten bis auf die Sonden D6S281, D6S440, D6S473 und D6S1633 alle anderen verworfen werden aufgrund mangelnder Auswertbarkeit. Gründe hierfür sind beispielsweise ein unspezifisches PCR-Produkt, das nicht die gewünschte Länge besitzt und keine Rückschlüsse auf die Sonde zulässt, ein PCR-Produkt, das zwar die gewünschte Länge besitzt, allerdings nicht auf ein LOH analysiert werden kann mangels geringer Trennschärfe der Banden in der Gel-Elektrophorese oder ein PCR-Produkt, das trotz einer Optimierung der Anlagerungstemperatur in nicht ausreichender Quantität in der Gel-Elektrophorese nachweisbar ist.

Die Bande D6S281 ist am häufigsten mit 16 von 55 (= 29 %) auswertbaren Patientenproben von einem LOH betroffen (siehe Abbildung 23E). Analysiert man die Allelverluste genauer, so fällt auf, dass sie sich in der Gruppe der Tumore, die zusätzlich ein LOH des Chromosoms 1p besitzen, die Verluste der Sonde D6S281 statistisch gesehen viel häufiger finden lassen als in der Gruppe der Tumore, in denen das Chromosom 1p noch vorhanden ist (exakter Test nach Fisher; $p < 0,0001$). Die Sonde D6S440 ist in 10 der 41 (≈ 24 %) auswertbaren Patientenproben von einem LOH betroffen, wobei auch hier eine signifikante Häufung dieser Verluste zu finden ist, in der Gruppe der Tumore, die gleichzeitig ein LOH des Chromosoms 1p aufweisen (siehe Abbildung 23B). Die beiden Sonden D6S473 und D6S1633 sind in zwei der 51 (≈ 4 %) beziehungsweise fünf der 50 (≈ 10 %) auswertbaren Patientenproben von einem LOH betroffen. Allerdings findet sich bei beiden Sonden keine statistisch signifikante Häufung der Verluste in der Gruppe der Tumore mit einem LOH des Chromosoms 1p (siehe Abbildung 23C, D). Anzu-merken ist hierbei allerdings, dass der exakte Test nach Fisher das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ in der Analyse der Sonde D6S1633, welche nahe dem *ARID1B*-Gen liegt, nur ganz knapp verfehlt mit einem p-Wert von 0,054.

In Abbildung 23F ist eine abschließende Analyse aller Sonden des Chromosoms 6q dargestellt. Zusammengefasst findet sich in 23 der 59 (≈ 39 %) analysierten Patientenproben ein Verlust von mindestens einer der vier Sonden. In Patientenprobe Nr. 4 ist ein kompletter Verlust aller vier Sonden zu finden. Der Verlust mindestens einer der vier Sonden ist statistisch gesehen viel häufiger in den Tumoren zu finden, in denen auch ein LOH des Chromosoms 1p vorliegt im Vergleich zur Gruppe derer, die noch beide Allele des Chromosoms 1p besitzen (exakter Test nach Fisher; $p < 0,0001$). 20 von 31 (65 %) mit

einem LOH von 1p haben einen Verlust von mindestens einer der vier Sonden für das Chromosom 6q, im Vergleich zu 11 % der Fälle mit LOH 6q aber ohne einen gleichzeitigen Verlust von Anteilen des Chromosoms 1p (siehe Abbildung 23F).

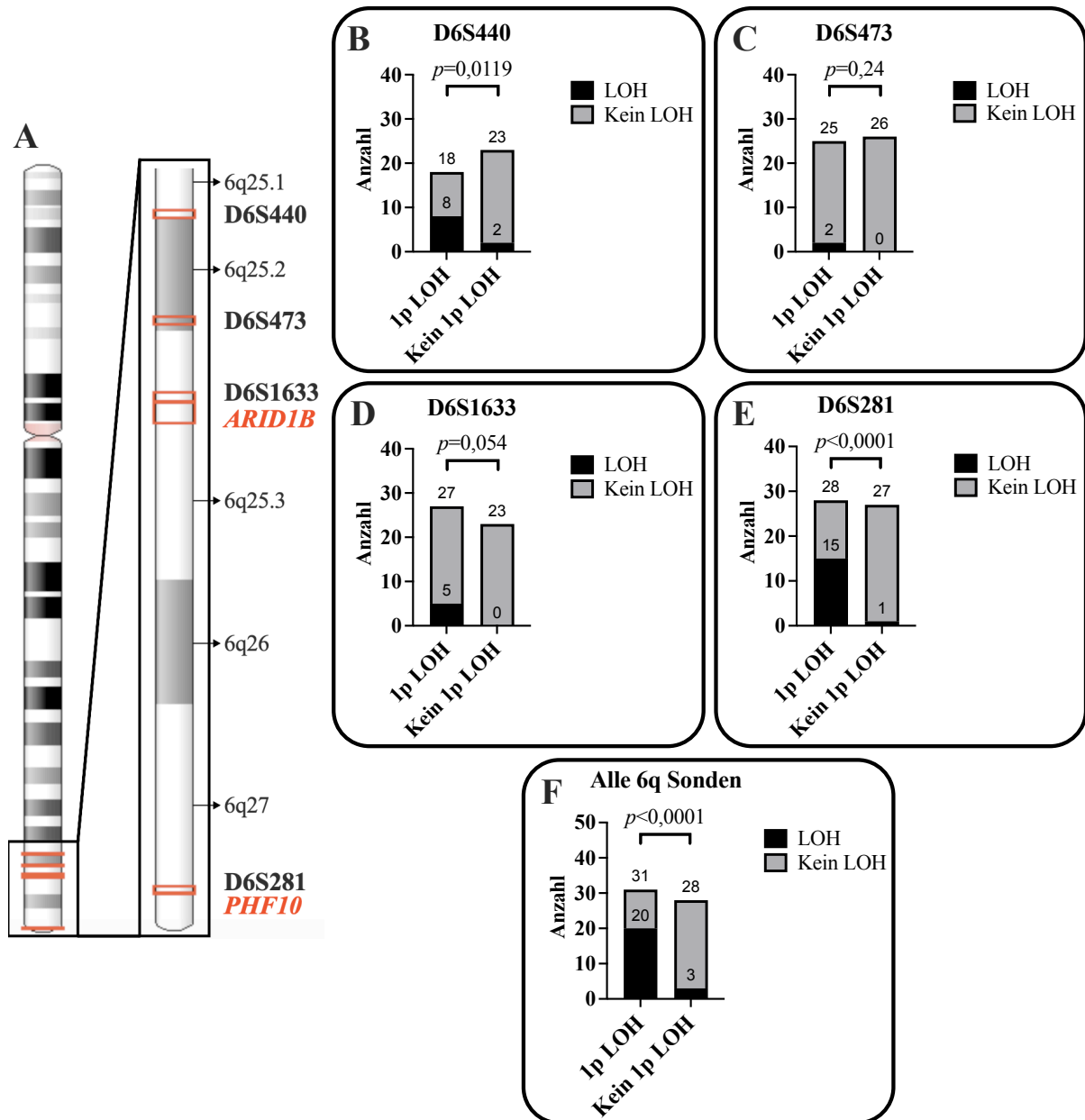


Abbildung 23. Detaillierte Auswertung der vier Sonden D6S281, D6S440, D6S473 und D6S1633.

Legende: (A) Das Ideogramm auf der NCBI Genome Decoration Page [101] zeigt die Lage der Banden, der Sonden D6S440, D6S473, D6S1633 und D6S281 sowie der beiden Untereinheiten des SWI/SNF-Komplexes *ARID1B* und *PHF10*. (B-E) Die Analyse der Sonden D6S440, D6S473, D6S1633 und D6S281 ist in mehreren Kästen dargestellt. Ein LOH der entsprechenden Sonde (schwarz) und eine in der PCR erhaltene Sonde (grau, „Kein LOH“) sind jeweils dargestellt. Die sich daraus ergebenden p-Werte sind oberhalb der Balken angegeben. (F) Der zusammenfassende Verlust einer der vier Sonden wird als „LOH“ (schwarz) bezeichnet, während kein Verlust einer Sonde als „Kein LOH“ (grau) bezeichnet wird. Abschnitt 4.2 beschreibt die genaue Methodik der PCR und Mikrosatellitenauswertung.

6 Diskussion

ARID1A ist Teil des Chromatin Remodeling Komplexes, der durch seine universale Funktionsweise, die Transkriptionsrate von sehr vielen Genen beeinflussen kann und innerhalb dieses Komplexes in Tumoren am häufigsten mutiert ist [50]. Seine besondere Rolle in Meningeomen wurde bereits in der Einleitung geschildert und es wurde die Hypothese aufgestellt, dass das Gen *ARID1A* im Sinne eines loss of heterozygosity (LOH) in Meningeomen verloren gehen kann und nachfolgend eine Haploinsuffizienz mit korrespondierendem Proteinverlust entsteht. Dieser Verlust soll einen malignisierenden Effekt auf das Verhalten der Tumorzelle zur Folge haben, womit letztlich der bereits bewiesene Effekt des negativen Einflusses eines Chromosom 1p Verlustes auf das Patientenüberleben erklärt werden könnte. Daneben gibt es die zweite Hypothese, dass der Verlust des Chromosom 6q eine wichtige Rolle in höhergradigen Meningeomen innehat und *ARID1B* ein weiteres potentiell Treibergen auf Chromosom 6q27 in Meningeomen darstellt (Abbildung 6).

Im Folgenden wird Stellung zu den Ausgangsfragen (vgl. 3.5) bezogen und es werden die Ergebnisse dieser Arbeit kritisch hinterfragt. Die sich daran anschließende Einordnung der Ergebnisse in den Gesamtkontext des Themas soll weitere Facetten der biochemischen und molekularbiologischen Untersuchung der Proteine ARID1A und ARID1B in Meningeomen beleuchten. Zuletzt erfolgt die Darstellung einiger Ausblicke, die sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit ergeben.

6.1 Etablierung eines ELISAs

Zunächst ist es wichtig zu erwähnen, dass der ELISA im Rahmen dieser Arbeit neu entwickelt wurde. Somit ist dies keine Methode, die einer mehrfachen Validierung unterzogen wurde, weshalb lediglich die in dieser Versuchsreihe erarbeiteten Validierungsparameter einer Messgenauigkeitsanalyse unterzogen werden konnten. Es liegen keine Referenzmessungen oder ähnliche externe Kontrollen vor, die zusätzlich die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen könnten. Dennoch zeigt eine detaillierte Betrachtung der Abschnitte 5.1 und 5.2 eindrucklich, dass sich dieser ELISA sehr gut eignet ARID1A-Konzentrationen in Tumorlysaten von Meningeomen zu messen.

6.1.1 Generelle Vor- und Nachteile von ELISAs

Möchte man einen ELISA designen für ein Protein, stehen einem mehrere Möglichkeiten zur Verfügung [9]. So kann man wählen zwischen einem direkten ELISA, einem indirekten ELISA oder einem Sandwich ELISA. Der direkte ELISA ist am wenigsten sensitiv und wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Ein Protokoll für einen Sandwich ELISA wird in dieser Arbeit nicht dargestellt, da alle Versuche einen Sandwich ELISA für ARID1A mit dem ARID1A-Fragment als Standard (ABN-H00008289-Q01, Abnova) gescheitert sind. Es war nicht möglich die ELISA Platte (Nunc Maxi Sorp, VWR) mit dem C-7 Antikörper (Santa Cruz) zu beschichten und anschließend mit dem Antikörper ab182560 (Abcam) das

ARID1A-Fragment (Abnova) zu detektieren und zu quantifizieren. Tauscht man beide primären Antikörper miteinander, liefert der Versuch auch keine quantifizierbaren Ergebnisse, weshalb dieser Ansatz verworfen wurde. Es wird der indirekte ELISA verwendet, der das auf der Platte gebundene Protein mit einem primären Antikörper detektiert und anschließend von einem sekundären Enzym-beladenen Antikörper gebunden wird, bevor eine biochemische Umsetzung des Farbstoffs beginnt. Diese Methode weist eine hohe Sensitivität auf, wodurch auch niedrige Mengen der Zielstruktur detektiert werden können. Als Nachteil wird eine Immobilisation unspezifischer Proteine auf der Plattenoberfläche angegeben. Im Gegensatz zum direkten ELISA ergeben sich dadurch jedoch deutlich seltener falsch-positive Signale und eine höhere Sensitivität in der Quantifikation der Zielstruktur. Ein Sandwich-ELISA besitzt ebenso wie ein indirekter ELISA eine ausreichend hohe Sensitivität nach Aydin et al. (2015), allerdings ist die Kombination der Antikörperpaare, die die Zielstruktur erkennen sollen, eine große Hürde, wie auch in dieser Arbeit zu erkennen war [9].

6.1.2 Möglichkeiten und Grenzen des neu entwickelten ELISAs

Standardkurve

Um die Korrektheit des Modells zu überprüfen, werden die R^2 -Werte herangezogen (vergleiche 4.3.5). Das AE-Modell (all experiments model, 4.3.5), welches die Standardkurven aller 11 ELISA-Platten zusammenfasst, weist einen R^2 -Wert von über 0,99 auf (Abbildung 10), genauso wie 9 der 11 Standardkurven im EP-Modell (each plate model, siehe Abschnitt 5.2.1). Das bedeutet, dass die Standardkurve sehr gut geeignet ist, die gemessenen Absorptionswerte in ARID1A-Konzentrationen umzurechnen. Diese Aussage lässt sich auch durch die inter-assay Präzision von 4,53 % CV und eine inter-assay Richtigkeit von 90,26 % im AE-Modell bekräftigen (siehe Tabelle 11). Die aus den Absorptionswerten zurückgerechneten Standardkonzentrationen einer Standardkurve repräsentieren somit sehr genau die vorhergesagten Konzentrationen – vergleiche Richtigkeit (siehe 4.3.5, Formel 1 und Abbildung 9) – und die Duplikate einer Standardkonzentration weisen eine geringe Abweichung zueinander auf – vergleiche Präzision (siehe 4.3.5, Formel 4 und Abbildung 9).

Ein weiterer Aspekt der EMA- und FDA-Kriterien ist, dass die umgewandelten Konzentrationen innerhalb der Messspanne des Assays liegen (Abbildung 10, rote Dreiecke). Dies wird durch eine deutliche Erhöhung der Sensitivität erreicht, indem die Substratentwicklung maximiert wurde (siehe 5.1.1). So zeigte beispielsweise eine Änderung des Substrats von DAB+ zu OPD und gleichzeitiger HRP-Stoppreaktion mit Hilfe von 2,5 molarer Schwefelsäure eine 30-fach Steigerung der Sensitivität. Erst durch diese Änderung ist es möglich ARID1A-Level in Tumorslysaten zu messen, die etwa zwischen 1 und 10 ng/ml liegen (siehe Abbildung 10 rote Dreiecke). Somit ist die erzielte Messspanne von 0,78 bis 50 ng/ml optimal, um ARID1A-Konzentrationen zu messen. Eine weitere Erhöhung der Sensitivität scheint daher nicht nötig. Dennoch wurde mit einer niedrigeren Verdünnung der Antikörper experimentiert, was keinen Erfolg erzielte (siehe Abschnitt 5.1.3).

Andere Hersteller haben in den letzten Jahren auch käufliche ELISA-Produkte auf den Markt gebracht, wie in Tabelle 15 dargestellt ist. Diese Produkte sind alle Sandwich-ELISAs, die mit zwei primären Antikörpern arbeiten, wovon einer bereits auf der Plattenoberfläche immobilisiert ist. Wie eingangs beschrieben sollte die Sensitivität vergleichbar mit der eines indirekten ELISAs sein (Tabelle 15). Im Detail fällt auf, dass der Hersteller Abcam als einziger von insgesamt 11 Anbietern eine bessere Sensitivität angibt als der in dieser Arbeit erarbeitete ELISA. Allerdings ist bei diesem Produkt eine objektive Messung erst in den Bereichen von 1,71 - 110 ng/ml ARID1A möglich, verglichen mit einer Messspanne von 0,78 - 50 ng/ml des in dieser Arbeit neu entwickelten ELISAs (siehe Abbildung 10). Der in dieser Arbeit entwickelte ELISA ist außerdem besser in den Punkten der Messspanne und intra-assay Präzision (4,1 % vs. 7,4 %) sowie der inter-assay Präzision (4,5 % vs. 8 %), wodurch die gute Performance des indirekten ELISAs unterstrichen wird. Außerdem ist der hier vorgestellte ELISA deutlich billiger als alle anderen verfügbaren Kits, weshalb eine breitere Verwendung auch unter ökonomischen Gesichtspunkten sinnvoll ist (siehe Tabelle 15) [44].

Firma, Kata-log-Nr.	Me-thode	Proben	Preis/96 Wells	Sen-siti-vität	Mess-spanne	Präzi-sion – Intra-assay	Präzision – Inter-assay	Refe-ren-zen
Hins-berger et al. 2023	Indi-rekt	Zellkul-turextrakte, Gewebekomoge-nate, Rekombinante Standards	18,6 € ¹ oder 188.6 € + 16.5 € ² pro Lysat	0,39 ng/ml	0,78 – 50 ng/ml	4,1 % 7 Pro-ben (n=4)	Standards: 4,5 % 8 Proben (n=2) auf 11 Platten; 'gleiches Ly-sat': 10,6 % 18 Proben (n=2)	-
Abcam, ab 302760	Sand-wich	Zellkulturex-trakte	670 €	0,041 ng/ml	1,71 – 110 ng/ml	7,4 % 1 Probe (n=8)	8 % 1 Probe (n=3)	Keine
Abb-exa, abx 358515	Sand-wich	Gewebekomoge-nate, Zelllysate, andere biologische Medien	587,50 €	0,47 ng/ml	0,78 – 50 ng/ml	<10 % 3 Pro-ben (n=20)	<10 % 3 Proben (n=8) auf 3 Platten	Keine
MyBio-Source³, MBS 2540332	Sand-wich	Serum, Plasma und andere biologische Medien	540 US \$	0,47 ng/ml	0,78 – 50 ng/ml	3 Pro-ben (n=20)	3 Proben (n=8) auf 3 Platten	Keine
LSBio, LS-F65695	Sand-wich	Gewebekomoge-nate, Zelllysate und andere biologische Medien	980 US \$	Noch aus-ste-hend	Noch aus-ste-hend	k.A.	k.A.	Keine
BT Lab, E3933 Hu	Sand-wich	Serum, Plasma, Zellkulturüber-stände	458 US \$	6,61 ng/L	12,5 – 800 ng/L	5 % 3 Pro-ben, (n=18)	k.A.	Keine

BT Lab, E6528 Hu	Sandwich	Serum, Plasma, Zellkulturüberstände	458 US \$	7,89 ng/L	15 – 3000 ng/L	<6 % 3 Samples, (n=18)	k.A.	Keine
Biorbyt⁴, orb 1209952	Sandwich	Serum, Plasma, Zellkulturüberstände	655,40 €	6,61 ng/L	12,5 – 800 ng/L	k.A.	k.A.	Keine
Biorbyt⁴, orb 1209286	Sandwich	Serum, Plasma, Zellkulturüberstände	655,40 €	7,89 ng/L	15 – 3000 ng/L	k.A.	k.A.	Keine
Krishgen, KBH 3933	k.A.	Serum, Plasma, Zellkulturüberstände	~300 € (France)	Unter Revalidierung	Unter Revalidierung	k.A.	k.A.	Keine
Krishgen, KBH 6528	Sandwich	Serum, Plasma, Zellkulturüberstände	~300 € (Frankreich)	7,89 ng/L	15 ng/l – 3000 ng/l	CV < 8 %	CV < 10 %	Keine

Tabelle 15. Vergleich verschiedener kommerzieller ELISA-Kits für ARID1A mit dem neu entwickelten ELISA.

Legende: 11 Spalten zeigen die verschiedenen Merkmale von 11 kommerziellen ELISA-Kits, die online erhältlich sind. Um sie mit dem in dieser Arbeit verwendeten ELISA zu vergleichen, haben wir den Preis des hier verwendeten Assays berechnet, indem wir die Kosten für jede Komponente addiert und verschiedene Validierungsparameter aufgeführt haben. Dennoch gibt es einige Zellen, für die keine Informationen verfügbar waren („k.A.“ für keine Angabe). Datum der Erstellung: 20.7.2023.

¹ Kosten für den in dieser Arbeit verwendeten ELISA: Platte (750-0083, VWR, Deutschland): 100 € (60x) -> 1x = 2 €; Fragment (ABN-H00008289-Q01, Abnova, Taiwan): 520 € (25 µg, 0,2 µg/µl – 125 µl) - 1:4000 bzw. 0,5 µl -> 2 €; Prim. AK (ab182560, Abcam, UK): 580 € (100 µl) -> 10 µl = 58 €; Sek. AK (K4003, Dako): 2369 € (110 ml) -> 5 ml = 107,7 €; Casein (34006, Thermo Fisher Scientific, USA): 110 € (30 g) -> 0,1 g = 0,4 €; OPD: 200 € (50x) -> 1x = 4 €; Stable Peroxide (34062, Thermo Fisher Scientific, USA): 83,25 € (100 ml) -> 1 ml = 8,3 €; H₂SO₄ (258105, Sigma-Aldrich, USA): 40 € (100 ml) -> 1,5 ml = 0,6 €; Waschlösung (VWR, A9177.0100): 372 € (100x, 100*200 ml) -> 300 ml = 5,6 €;

² Kosten für jedes Lysat: Fraktionierung (87790, Thermo Fisher Scientific, USA): 608 € (50x) -> 1x = 12,16 €; Precellys (10144-496, VWR, Deutschland): 217 € (50x) -> 1x = 4,34 €;

³ Vermutlich der gleiche ELISA wie abbexa; ⁴ Vermutlich der gleiche ELISA wie BT Lab.

Die Standardkurve des indirekten ELISAs ist mit Hilfe eines ARID1A Proteinfragments (Abnova) erstellt worden. Das in vivo vorzufindende Volllängenprotein wurde nicht in den Standards eingesetzt, allerdings liegt dieses in den Tumorlysaten und somit auch in den Proben der Patientenkohorte vor. Der Grund für die Wahl eines Proteinfragments liegt darin, dass auf dem Markt aktuell kein Volllängenprotein kaufbar ist und eine eigene Herstellung von hoch aufgereinigtem ARID1A mit den technischen Möglichkeiten des Labors nicht zu bewerkstelligen ist. Somit ist das Fragment (Aminosäuren 1216 bis 1325) aktuell die beste Möglichkeit einen einfach handhabbaren ELISA zu designen, der schnell sowie akkurat und präzise ARID1A misst. Biochemisch gesehen gibt es eine gute Überlappung mit dem Epitop des primären Antiköpers ab182560 (Abcam), der innerhalb der Aminosäuren 1200 bis 1350 bindet

(siehe Abbildung 25). Außerdem werden Fragmente regelrecht in ELISA Anwendungen verwendet und führen dort zu sehr guten Resultaten in der Proteinbestimmung wie beispielsweise die Studie von Grebenchtchikov et al. (2004) zeigt [38].

Mit den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen kann formal nicht ausgeschlossen werden, dass der primäre Antikörper ein anderes Bindeverhalten mit dem Fragment zeigt als mit dem Volllängenprotein zu erwarten wäre, daher erfolgt eine kritische Betrachtung dieses Aspekts.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen eindrücklich dar, dass die Wahl, ein Proteinfragment zur Erstellung der Standardkurve des ELISAs zu verwenden, positiv beeinflusst hat. Dennoch ist kritisch anzumerken, dass die Spike recovery niedrig ist (0-18 %, Abbildung 13A) und es gelingt der Nachweis des Abbaus von in Carbonatpuffer gelöstem ARID1A-Fragment sowohl im ELISA (Abbildung 13B) als auch im Western blot (Abbildung 13D). Eine mögliche Erklärung für diese Degradation des ARID1A-Fragments, die ohne stattgehabten Gewebekontakt auftritt, ist die, dass noch eine Restaktivität der Proteasen aus den Puffern (8.2) vorhanden ist, welche dann den Fragmentabbau beschleunigt und die Interpretation der Ergebnisse erschwert. Dieser Erklärungsversuch findet sich auch so bereits in der Literatur [93]. Aufgrund dessen ist die Aussagekraft der Experimente zur Spike recovery mit dem ARID1A-Fragment nur eingeschränkt auswertbar. In einer theoretischen Betrachtung des Einflusses der Degradation auf die Standardkurve durch Verdünnung des ARID1A-Fragments wird klar, dass dieser Degradationseffekt aufgrund des kurzen Zeitintervalls zwischen der Herstellung mehrerer Röhrchen und dem Pipettieren auf die Platte, äußerst unwahrscheinlich ist. Zudem legen die hohe Übereinstimmung der Standardkurven im AE-Modell diese Aussage sehr nahe (siehe Abbildung 10). Eine experimentelle Überprüfung der Spike recovery in den vier Puffern zeigt eindrücklich, dass die prinzipielle Messung von ARID1A-Signalen in den Puffern ohne Einschränkungen möglich ist (Abbildung 13D). Weiterhin erreicht der ELISA beispielsweise in der „Erneuten Analyse der Proben“ (Tabelle 11) sehr gute Werte in der Inter-assay Präzision, wenn gleiche Lysate mehrfach analysiert werden (%CV: 10,6 %, Tabelle 11) und der Test auf Parallelismus (5.2.6) zeigt einen hohen Grad an Übereinstimmung an (siehe Abbildung 14B). Beide Tests werden in der Gewebematrix durchgeführt und insbesondere die Parallelität der beiden Kurven in Abbildung 14B verdeutlicht ein gleiches Bindeverhalten der Antikörperpaare mit ARID1A-Fragment und ARID1A-Volllängenprotein. Der Parallelismus beweist, dass die Absorptionssignale der Standardkurve in gleichem Maß abnehmen wie die der Gewebelysate, sodass die Standardkurve richtigerweise als Umrechnungsmodell für die Absorptionswerte der Gewebelysate in die Einheit der ARID1A-Konzentrationen genutzt werden kann [5].

Die Synthese eines ARID1A-Volllängenproteins, z. B. in *E. coli*, würde in der Zukunft dennoch eine Optimierung des ELISA-Protokolls darstellen, mit welchem dann formal eine vollständige Validierung gezeigt werden könnte.

Ein weiterer Aspekt der Standardkurve die Überlegenheit des EP-Modells gegenüber dem AE-Modell, wenn man die Werte für die Genauigkeit betrachtet (siehe Tabelle 3). Dies lässt sich möglicherweise

durch eine weniger stark schwankende Standardkurve im EP-Modell erklären, da geringe Unterschiede, z. B. bei der Temperatur, der Pufferqualität oder der Luftfeuchtigkeit, besser dargestellt werden.

ELISA-Analyse von ARID1A-Konzentrationen in Tumorlysaten

Mit einer inter-assay Präzision von 21,31 % CV aller wiederholter Messungen der unterschiedlichen Lysate ist das, im Rahmen der EMA- und FDA-Kriterien [31,122], aufgestellte Ziel von weniger als 30 % Schwankung erreicht (siehe Abschnitt 4.3.5). Dennoch ist dieser Wert höher als bei der Analyse der Proben aus gleichen Lysaten (10,61 % CV, siehe Tabelle 11) und das Protokoll der Lysatherstellung könnte dabei eine entscheidende Rolle spielen (siehe Abschnitt 4.3.2). Ein Grund für die höhere Schwankung der ARID1A-Level ist möglicherweise der Fakt, dass die ARID1A-Level in unterschiedlichen Lokalisationen eines Tumors nicht exakt identisch sind und der Fehler somit nicht an dem Versuchsaufbau per se liegt. Im Rahmen der Arbeit fiel auf, dass beim Abwiegen von 100 mg Gewebe neben reinen Tumoranteilen auch primär nicht zum Tumor gehörige Gewebe wie etwa Dura, Knochenfragmente, Fibrin oder Meningen an verschiedenen Lokalisationen innerhalb des Tumorgewebes unterschiedlich stark repräsentiert sind, was sich dann in einer höheren Variabilität der ARID1A-Konzentration niederschlagen kann. Da im Prozess des Aufreinigens mit dem Tissue strainer (Abschnitt 4.3.2, Schritt 5 des Protokolls) in allen 61 Meningeomen überschüssiges Gewebe – welches vorher mit eingewogen wurde – extrahiert worden ist, stellt eine Schwankung von etwa 21 % einen akzeptablen Wert dar [23,24]. Dennoch ergibt sich daraus, dass ein standardisiertes Protokoll notwendig ist, wie es in 4.3 aufgeführt ist.

Die Versuche zur minimal benötigten Konzentration des Tumorlysats zeigen anschaulich, dass bei Konzentrationen über 20 µg/ml keine Verzerrungen zu erwarten sind (siehe Abbildung 14A). Somit kann standardisiert für jedes Lysat, das zunächst 1:26 verdünnt wird, die Gesamtproteinkonzentration gemessen werden, welche einen Mindestwert von 20 µg/ml nicht unterschreiten darf, sodass die Bindungsoberfläche gesättigt wird. Da der Tissue strainer etwaige Reste wie Knochenfragmente oder Bindegebe eliminiert (siehe Abbildung 7), sind die höchstmöglich aufgereinigten Tumorlysate den resultierenden Verzerrungen in der Gesamtproteinmenge unterlegen, weshalb eine Messung mittels des BCA-Assays wie oben beschrieben sinnvoll erscheint und routinemäßig erfolgt.

Die Ergebnisse des Vergleichs von *ARID1A*-Wildtyp und *ARID1A*-Knockout HEK-293T Zellen zeigen eindrücklich, dass das verwendete Antikörperpaar – bestehend aus primärem und sekundärem Antikörper – ARID1A spezifisch detektieren kann (Abbildung 11). Weitere Analysen der Kohorte aus 61 Meningeomen profitieren beispielsweise von Summationsgruppen, wie Kern (Frei nukleär plus Chromatin) und Gesamt (Zytosol, Membran, Frei nukleär und Chromatin). Diese Summation erlaubt einerseits während der Fraktionierung fälschlicherweise verschlepptes ARID1A im Gesamtkontext mit zu bewerten und andererseits wird die Interpretation durch diese Werte verbessert (5.4).

Betrachtet man deskriptiv zunächst die ARID1A-Verteilung über alle vier verschiedenen Zellkompartimente, so zeigt sich, dass etwa 60,7 % des Signals aus der Frei nukleären Fraktion stammt, 23,3 % aus

dem Zytosol, 13,5 % aus dem Chromatin und 2,5 % aus der Membran (siehe Abbildung 11). Diese Beobachtung bestätigt das nukleozytoplasmatische Verteilungsmuster, welches bereits durch Guan et al. (2012) beschrieben wurde [39]. Die niedrigen ARID1A-Werte in der Membran sind möglicherweise eine falsch-negative Schlussfolgerung, da es Hinweise darauf gibt, dass die niedrige Spike recovery im Membranextraktionspuffer (MEB) Ausdruck einer fehlenden Bindung des Antikörperpaars in dieser Fraktion ist (Abbildung 13C).

Man könnte auch erwarten, dass im Chromatin höhere ARID1A-Level zu finden sind als in Frei nukleär [127], da ARID1A als Teil des Chromatinumbaukomplexes an der Verbindung von BAF-Komplexen mit DNA-Regionen beteiligt ist [92]. Eine mögliche Erklärung dieses Verteilungsmusters ist, dass an DNA-gebundene ARID1A Proteine mit dem „Nuclear Extraction Buffer“ (NEB) ausgewaschen werden und somit bereits in Frei nukleär gemessen werden und nicht erst in der Chromatin Fraktion, wo sie möglicherweise in vivo zu finden wären. Um dieser Frage nachzugehen werden Analysen mit einem Histon H3 Antikörper (ab1791, 1:1000, Abcam, UK) in einem ELISA Verfahren, das dem Protokoll des ARID1A ELISAs entspricht (4.3.4), durchgeführt. Hiermit soll die tatsächliche DNA-Verteilung durch das Distributionsmuster von Histon H3 abgeschätzt werden. Es zeigen sich wie erwartet die höchsten Signale im Chromatin gefolgt von Frei nukleär, Zytosol und Membran (siehe Abbildung 24). Insbesondere das vergleichbar hohe Signal in Frei nukleär spiegelt die neue Erkenntnis wider. Denn die somit vermutlich relativ hohe Konzentration von Histon H3 – und konsekutiv auch DNA – in der Frei nukleären Fraktion lassen vermuten, dass das ARID1A-Verteilungsmuster in Abbildung 11 von der DNA-Verteilung beeinflusst wird. Letztlich kann diese Frage aber mit den bisherigen Daten nicht sicher beantwortet werden.

Ein weiteres wichtiges Argument in diesem Kontext ergibt sich aus der immunhistochemischen Färbung. Diese zeigt mit dem Antikörper ab182560 (Abcam) eine ARID1A-Immunreaktivität, die eindeutig auf den Zellkern beschränkt ist (Abbildung 22). Weitere subzelluläre Lokalisationen wie die Zellmembran, das Zytosol sowie darin befindliche Zellorganellen werden durch den Antikörper nicht angefärbt. Da die Immunhistochemie semi-quantitativ ist [118,124], darf aus diesem Ergebnis geschlossen werden, dass im Zellkern – analog zu denen im ELISA verwendeten Fraktionen Frei nukleär und Chromatin – die höchsten Konzentrationen vorliegen. Die Immunhistochemie kann allerdings nicht zweifelsfrei zwischen Frei nukleär und Chromatin differenzieren.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass Frei nukleäres ARID1A die höchste ELISA-Konzentration in den untersuchten Meningeomen aufweist und dieses Verteilungsmuster möglicherweise sogar von funktioneller Bedeutung ist. Ein potentieller Erklärungsansatz wäre, dass in der Fraktion Frei nukleär überwiegend ungebundenes ARID1A vorhanden ist, welches einen homöostatischen Zustand zwischen DNA- und Nicht-DNA gebundenem ARID1A sowie den BAF-Komplexen darstellt, der bisher noch nicht beschrieben ist [127].

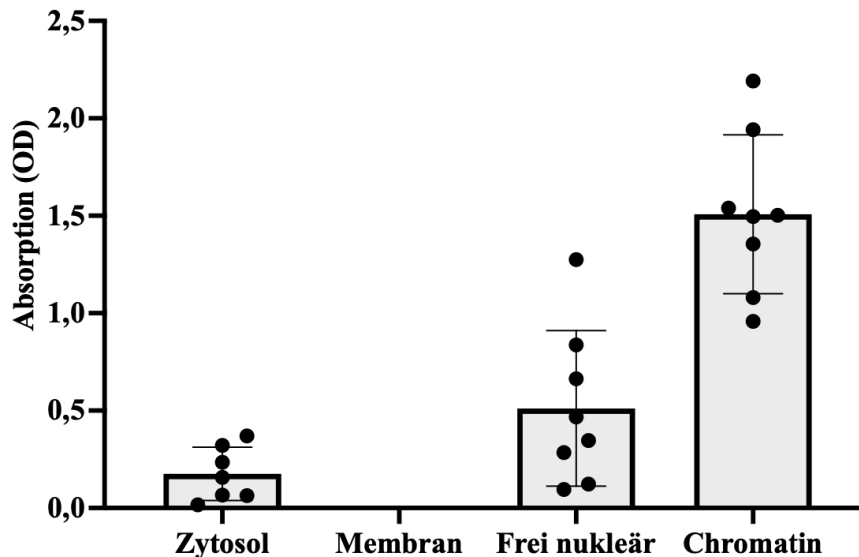


Abbildung 24. Histon H3 Verteilung über vier Zellkompartimente in acht Meningeomen.

Legende: Tumorlysate (schwarze Punkte, $n = 8$) werden auf die NUNC-Platte aufgetragen und das ELISA Protokoll angewendet, wie in 4.3.4 beschrieben, mit folgender Änderung: Der Histon H3-Antikörper ab1791 (Abcam, UK) wird 1:1000 verdünnt aufgetragen statt dem ARID1A-Antikörper. Die resultierenden Absorptionssignale, ausgedrückt als OD (optische Dichte), werden gegen die vier zellulären Kompartimente aufgetragen. Die Membran Fraktion erzeugt negative Signale, daher werden die Absorptionssignale gleich null gesetzt. Die schwarzen Balken geben die Standardabweichungen an.

Analyse der primären und sekundären Antikörper

Der primäre Antikörper ab182560 (Abcam) zeigt die beste Performance in der Analyse des indirekten ARID1A ELISAs im Vergleich zu dem C-7 ARID1A-Antikörper (sc-373784, Verdünnung 1:30 bis 1:3000, Santa Cruz, USA) und dem PSG-3 Antikörper (sc-32761, 1:30 bis 1:3000, Santa Cruz, USA). Insbesondere die Verdünnung 1:1000 erweist sich als besonders sensitiv und spezifisch (siehe 5.1.3). Wie bereits im ersten Unterpunkt dieses Kapitels beschrieben ist das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte ELISA-Protokoll äußerst gut geeignet ARID1A zu quantifizieren, wobei dort insbesondere auf die Sensitivität eingegangen wird. Eine eingehende Analyse der Spezifität ergibt, dass ARID1A mit einer hohen Genauigkeit gemessen werden kann (siehe Abbildung 11), sowohl im ELISA (Abbildung 11A) als auch im Western blot (Abbildung 11B-E). Die im ELISA sichtbaren signifikanten Verminderungen der ARID1A-Level mit über 90 % in Zytosol und Frei Nukleär im Vergleich der HEK-293T *ARID1A*-Wildtyp- und Knockout-Zelllinien belegen eindrucklich die Spezifität (Abbildung 11A). Diese Veränderungen werden im Zellpellet ab278824 (Abcam) analysiert, welche in der Knockout Variante aus einer HEK-293T Zelllinie entstammen, die mittels CRISPR/Cas9 eine 11 Basenpaare lange homozygote Deletion in Exon1 des *ARID1A*-Gens aufweist. Es ist bei den Ergebnissen dieser Arbeit im Folgenden insbesondere zu diskutieren, ob in Tumoren die positiven Reaktionen des primären Antikörpers von einer Kreuzreaktivität falsch-positiv beeinflusst sein könnten.

Beispielsweise wäre es aufgrund der großen Variabilität der genetischen Veränderungen in Tumoren denkbar, dass nicht alle *ARID1A*-Mutanten als negativ detektiert werden. In diesem Fall würden insbesondere *ARID1A*-Punktmutationen die korrekte Interpretation der Messergebnisse beeinträchtigen [50,103]. Laut Literatur sind dabei am häufigsten die Missense-Mutationen von *ARID1A*, die zu einem Austausch der Aminosäure Glycin an Position 2087 zu Valin, Arginin oder Glutaminsäure (G2087V, G2087R, G2087E) führen [69]. Eine weitere häufige Missense-Mutation Y2254* führt zu einer 31 Aminosäuren umfassenden Deletion des C-Terminus von ARID1A. Mashtalir et al. (2018) fanden in diesem Zusammenhang heraus, dass die G2087R-Mutation über einen verstärkten Proteasom-vermittelten Abbau zu einer geringeren ARID1A-Expression in HEK-293T-Zellen führen kann, während die trunkierende Mutation Y2254* zu einem Funktionsverlust von ARID1A führt [69]. Der Austausch an Position 2078 sollte den in dieser Arbeit verwendeten Antikörper nicht beeinträchtigen, aber Y2254* könnte falsch-positive Signale erzeugen, die nicht mit einem funktionellen Protein korrelieren. Bei der Extrapolation von ELISA-Ergebnissen auf Tumorproben zu diagnostischen Zwecken wäre in dieser Situation nur eine eingeschränkte Aussagekraft des ELISA-Ergebnisses möglich. Im Gegensatz dazu sollte die häufigere Mutation G2087R von *ARID1A* mit dem Antikörperpaar bestehend aus ab 182560 (Abcam) und K4003 (Dako) im Hinblick auf den Expressionsverlust nachweisbar sein und somit für diagnostische Zwecke hilfreich sein, was sich in einem ARID1A-Verlust widerspiegelt. Neben Mutationen kann der loss of heterozygosity (LOH) sehr gut identifiziert werden, da das gesamte Protein minder exprimiert wird und eine richtig-negative Zuordnung folglich korrekt ist [96].

Weiterhin ist AT-rich interacting domain protein 1B (ARID1B) ein Protein, das eine Sequenzidentität von fast 60 % mit ARID1A aufweist. Was die Funktionalität betrifft sind die beiden Paraloge ARID1A und ARID1B am Aufbau des cBAF-Komplexes beteiligt (siehe Abbildung 3). Die cBAF-Komplexe bestehen entweder aus ARID1A oder ARID1B, sodass ein Vorhandensein beider Proteine in einem Komplex ausgeschlossen ist [69,126]. Welches Protein vorhanden ist, beeinflusst entscheidend die nachfolgenden Veränderungen im DNA-Bindungsverhalten des Chromatin Remodeling Komplexes [91]. Auf funktioneller Ebene ist es möglich, dass ARID1B zumindest in gewissem Umfang ARID1A ersetzt bei dessen Fehlen [43]. Daher ist es von Bedeutung, ausschließlich ARID1A zu messen. In einigen früheren Arbeiten wurde bereits analysiert, dass moderne Antikörper Proteinsequenzen binden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit für ARID1A spezifisch sind, wodurch eine Unterscheidung zwischen diesen beiden Paralogen ermöglicht wird [126]. Bei der detaillierten Untersuchung der Aminosäuresequenz, auf die der Antikörper ab182560 abzielt (Aminosäuren 1200-1350), lässt sich feststellen, dass ARID1A und ARID1B 43,7 % unterschiedliche, 39,1 % biochemisch identische, 8,6 % stark ähnliche und 8,6 % schwach ähnliche Aminosäuren aufweisen, wenn man beide Proteine mit dem Multiple Sequence Alignment Tool 'Clustal Omega' von EMBL-EBI vergleicht [66]. Das Bindungsepitop des Antikörpers enthält eine 47 Aminosäuren lange Sequenz (Aminosäuren 1289-1335), in der ARID1A und ARID1B keine identische Aminosäure teilen, was die Spezifität unterstreicht. Dennoch könnte man gut argumentieren, dass eine Interaktion in der vorhergehenden Bindungsregion (Aminosäuren 1200-1288)

noch möglich ist. Da ein ELISA eine sehr sensitive Methode ist, wurde diese Kreuzreaktivität in Betracht gezogen.

Dagegen spricht zunächst, dass sowohl im ELISA als auch im Western blot eindeutige Reduktionen in den vier Zellkompartimenten im Vergleich von *ARID1A*-Wildtyp zum *ARID1A*-Knockout sichtbar sind. Im Western blot konnte auch in zwei unterschiedlichen Zellmedien (ab278824, Abbildung 11B, C; und ab257250, Abbildung 11D, E) der Unterschied gezeigt werden – beide mit dem Ergebnis einer exzellenten Spezifität des Antikörperpaars (siehe Abbildung 11). Da ARID1B in beiden Kompartimenten vorhanden sein sollte [43], ist biochemisch betrachtet von einer Spezifität auszugehen. Auch der Parallelismus belegt diese Erkenntnis eindrucklich (siehe Abbildung 14B).

Ein analoger Vergleich des Bindungsepitops des Antikörpers mit der Proteinsequenz der AT-reichen Interaktionsdomäne 2 (ARID2) im Clustal-Omega-Tool führt zu folgenden Ergebnissen: ARID1A und ARID2 haben 53,6 % unterschiedliche, 15,2 % biochemisch identische, 18,5 % stark ähnliche und 12,6 % schwach ähnliche Aminosäuren in der Sequenz 1200-1350 von ARID1A gemeinsam [66]. Darüber hinaus hat ARID2 innerhalb der vergleichbaren Sequenzen mit ARID1A 116 zusätzliche Aminosäuren, die das Epitop von 151 auf 267 Aminosäuren verlängern. Diese Zahlen können visualisiert werden, wenn man ein Multiple Sequence Alignment von ARID1A, ARID1B und ARID2 zusammen mit Jalview durchführt (Abbildung 25) [128]. Die mit einem roten Kasten hervorgehobene Epitop Region des Antikörpers ab182560 (Abcam; Aminosäuren 1200-1350) zeigt eindrucklich, dass dieser Aminosäureabschnitt kaum Übereinstimmung mit ARID2 besitzt. Außerdem ist die in den ersten 50 Aminosäuren höhere Sequenzähnlichkeit zwischen ARID1A und ARID1B zu erkennen, die allerdings zum Ende des Epitops hin deutlich geringer wird (siehe Abbildung 25).

Daher ist insgesamt keine Wechselwirkung des Antikörpers 182560 mit ARID2 zu erwarten, sodass weder ARID1B noch ARID2 die Qualität des ARID1A-ELISAs beeinträchtigen.

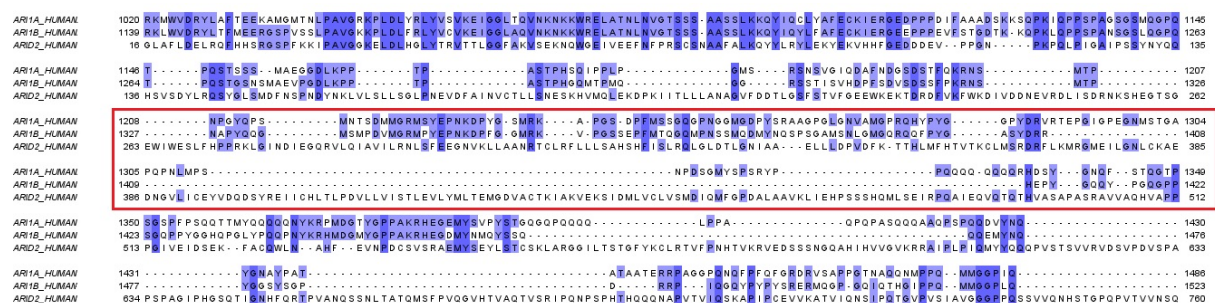


Abbildung 25. Mehrfache Sequenzausrichtung um das Antikörper-Epitop von ARID1A, ARID1B und ARID2.

Legende: Die von Uniprot [13] abgerufenen Vollängen-Proteinsequenzen von ARID1A (Entry ID O14497), ARID1B (Entry ID Q8NFD5) und ARID2 (Entry ID Q68CP9) werden mit Clustal Omega mit Standardeinstellungen [66] im Programm Jalview [128] dargestellt. Die Blautöne zeigen den Prozentsatz der Proteinidentität an: weiß (nicht ähnlich) bis dunkelblau (identisches Protein). Der rote Kasten hebt das angegebene Epitop der Sequenz hervor, die zur Herstellung des ARID1A-Antikörpers ARID1A (ab182560, Abcam, UK) verwendet wurde. ARID1A_HUMAN, menschliche ARID1A-Proteinsequenz; ARID1B_HUMAN, menschliche ARID1B-Proteinsequenz; ARID2_HUMAN, menschliche ARID2-Proteinsequenz.

Ein weiteres Detail des Vergleichs von *ARID1A*-Wildtyp und -Knockout Zelllysaten ist, dass die Chromatinfraction einen relativ hohen Hintergrund im ELISA besitzt (vgl. Abbildung 11A), der in der optischen Dichtemessung des Western blots nicht zu sehen ist (vgl. Abbildung 11B, C). Um Erklärungsansätze zu finden, konnte eine weitergehende Analyse zeigen, dass diese Kreuzreaktionen auf den sekundären Antikörper zurückzuführen sind (5.1.2). Sowohl Western blot als auch ELISA Analysen deuten darauf hin, dass die 16,8 kDa schwere Micrococcal Nuclease (MNase) für dieses Hintergrundsignal verantwortlich ist (vgl. Abbildung 11F), die dem NEB-Puffer vor der Vorbereitung der Chromatinfraction zugesetzt wird. Im Gegensatz dazu erhält die Freinukleäre Fraktion lediglich das NEB Puffer ohne MNase, sodass Unterschiede zwischen beiden Gruppen einzig durch die Zugabe der MNase erklärbar sind.

In der Literatur wird dieser Effekt der Kreuzreaktivitäten von monoklonalen Antikörpern ebenfalls beschrieben [32]. Da die Chromatin Fraktion für die ARID1A-Analyse unerlässlich ist, wird ein erweitertes Modell für diese Fraktion getestet. Initial wurde, wie in 5.1.2 beschrieben, untersucht welchen Anteil der sekundäre Antikörper am Gesamtsignal ausmacht, gemessen anhand der optischen Dichte (OD). Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine Verdünnung von 1:2 des sekundären Antikörpers in Casein 0,2 % in PBST 0,05 % bereits eine Optimierung darstellt im Vergleich zu einer 1:1 unverdünnten Lösung des sekundären Antikörpers. Nach dieser Optimierung bestehen weiterhin circa 19% Hintergrundsignal im Chromatin, statt initial über knapp 45 % (vgl. Tabelle 10).

In zwölf Tumoren werden daher die Chromatinfractionen getestet und das OD-Signal, das nur durch den sekundären Antikörper K4003 (Dako) zustande kommt, gemessen. Dies spiegelt die unspezifische Bindung in der Tumorgewebmatrix wider (Abbildung 26B). Es zeigt sich ein stabiles Hintergrundsignal mit annähernd gleichen Absorptionswerten in allen zwölf Tumoren, ausgedrückt als optische Dichte (OD), mit nur zwei Ausreißern unter den zwölf analysierten Tumoren. Die mittlere OD beträgt 0,0315 (95 % Konfidenzintervall: 0,0208-0,04216).

Anschließend werden die *ARID1A*-Knockout- (KO) und Wildtyp- (WT) Lysate erneut analysiert und es zeigt sich, dass das Knockout-Signal (OD: 0,027) in der Chromatinfraction vollständig fehlt, sofern der Hintergrundwert von 0,0315 abgezogen wird (Abbildung 26C). Das bedeutet, dass die Messung von ARID1A-Proteinkonzentrationen spezifischer wird, da ein Zelllysate ohne darin enthaltenes ARID1A sich als „negativ“ klassifizieren lässt durch den in dieser Arbeit entwickelten ELISA.

Die Wildtyp-Signale sind in diesem „angepassten Modell“ kaum betroffen, da die ARID1A-Spiegel nur um 22,2 % abnehmen, was verglichen mit den Werten des „normalen Modells“ nicht signifikant ist ($p > 0,05$). Daraus folgt eine etwas verminderte Sensitivität. Zur Analyse der ARID1A-Konzentrationen wurde der Beschluss gefasst das „normale Modell“ zu verwenden, aufgrund der sehr guten Performance in der Spezifitätsanalyse (vgl. Abbildung 11) und der einfacheren Handhabbarkeit mit den Daten aus den ELISA-Ergebnissen, da eine zu komplexe Analyse das Modell verschlechtern kann [10].

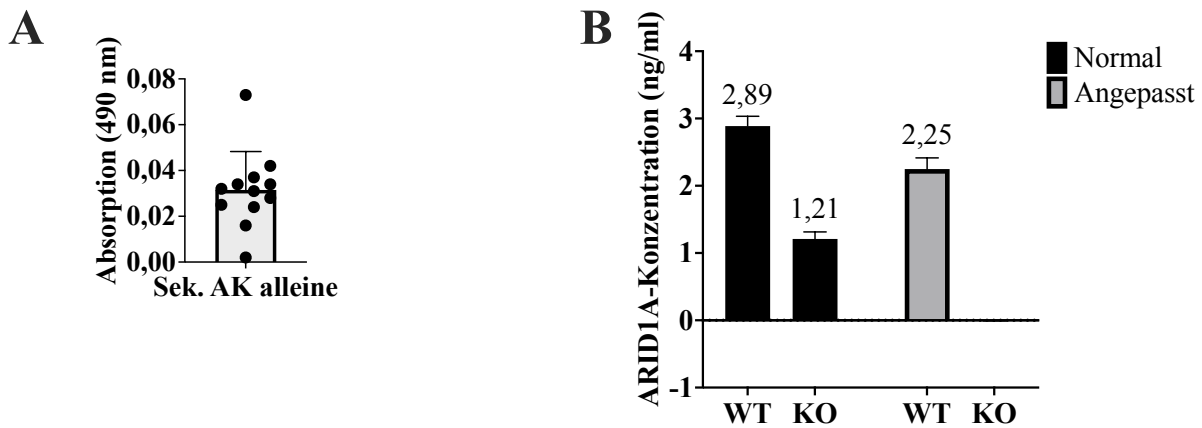


Abbildung 26. Quantifizierung des Hintergrundsignals des sekundären Antikörpers in Chromatinfractionen im Tumorgewebe von zwölf Meningeomen mit nachfolgender Re-Analyse in *ARID1A*-Wildtyp- (WT) und Knockout- (KO) Zellpellets ab278824 (Abcam).

Legende: (A) Tumorlysate (schwarze Punkte, $n = 12$) aus der Fraktion Chromatin werden hergestellt und auf die NUNC-Platte aufgetragen, wie in 4.3.4 beschrieben, mit der folgenden Änderung: nur der sekundäre Antikörper K4003 (1:2 verdünnt, Dako) wurde in die Wells gegeben, nicht aber der primäre Antikörper ab182560 (Abcam, = „Sek. AK alleine“, siehe Tabelle 10, Protokoll 12). Das Absorptionssignal, ausgedrückt als optische Dichte (OD), sowie Mittelwert und Standardabweichung werden dargestellt; (B) Re-Analyse von Chromatinfractionen in *ARID1A*-Wildtyp- (WT) und Knockout- (KO) Zellpellets ab278824 (Abcam) unter Verwendung einer angepassten Hintergrundsubtraktion. Das normale und etablierte ELISA-Protokoll (schwarz) korrigiert nur den Blank, der als Nullkalibrator in den mit Carbonatpuffer gefüllten Wells gemessen wird. Wie im Text erläutert, gibt es Hinweise auf eine Interaktion des sekundären Antikörpers mit Pufferbestandteilen in der Chromatinfraction. Daher wird der Mittelwert des zuvor analysierten Hintergrundsignals (0,0315) von den Blank-korrigierten OD-Werten abgezogen. Dieser zusätzliche Blank führt zu einer vollständigen Signalauslöschung in *ARID1A*-Knockout (KO) HEK-293T- Zellen im Vergleich zu Wildtyp (WT) Zellen (ab278824, Abcam, UK) in dem angepassten Modell (grau), während nur moderate Veränderungen im Wildtyp erkennbar sind (siehe Text). Die Mittelwerte sind über dem Balken und dem Fehlerbalken angegeben.

6.2 Analyse der ARID1A-Expression mit dem neu entwickelten ELISA in 61 Meningeomen

Um die ARID1A-Konzentrationen in den 61 Meningeomen detailliert analysieren zu können, wird zunächst die Patientenkohorte auf potentielle Verzerrungen untersucht, da dies Einfluss auf die ermittelten Ergebnisse und deren Interpretation haben kann.

6.2.1 Einschränkungen der Patientenkohorte

Hollecze et al. (2019) präsentierten Daten von 992 Patienten mit Meningeomen aus dem Bundesland Saarland, dem auch diese Patientenkohorte entstammt [45]. Die epidemiologischen Daten deuten darauf hin, dass die in dieser Arbeit untersuchte Kohorte einen aggressiveren Verlauf zu haben scheint als die Population in der besagten Studie, da die Rezidivrate in der Kohorte bei 23 % liegt (im Vergleich zu 6,1 % bei Hollecze et al. (2019)). Zudem liegt das in Tabelle 1 beschriebene von Frauen-zu-Männer Verhältnis in dieser Arbeit bei 1,65:1 (2,53:1), was einen höheren Anteil an Männern zur Folge hat

(Tabelle 4). Außerdem ist ein hoher Anteil an multifokalen Meningeomen mit 13 % ersichtlich (Tabelle 4). Bezüglich des Alters der in dieser Arbeit untersuchten Kohorte zeigen sich vergleichbare Werte mit Hollecze et al. (2019), da das Durchschnittsalter $65,5 \pm 13,9$ Jahre (im Vergleich zu 63) beträgt, sowie auch die Verteilung über die WHO-Grade mit einer Häufigkeit von 66 % Grad 1 (70 %), 31 % Grad 2 (28 %) und 3 % Grad 3 (3 %) vergleichbar sind (siehe Tabelle 4, [45]). Die Unterschiede hin zu einer aggressiveren Kohorte lassen sich am ehesten durch eine Fokussierung bei der Rekrutierung zu dieser Studie erklären, wobei ein hoher Anteil von Meningeomen mit einem loss of heterozygosity (LOH) auf Chromosom 1p angestrebt und erzielt wurde. Driver et al. (2022) geben eine normale Häufigkeit des Verlusts von Chromosom 1p in 36 % an [27] und in dieser Kohorte beträgt der Wert 54 % (siehe Tabelle 4). Der LOH auf Chromosom 1p ist nach Ketter et al. (2007) ein wesentlicher Malignitätsfaktor [53]. Linsler et al. (2014) konnten insbesondere den Verlust von 1p36 als einen unabhängigen Risikofaktor für Meningeomrezidiv und -progression identifizieren, sodass dies eine sinnvolle Erklärung sowie auch Bestätigung der Erkenntnisse ist [62].

Die Verteilung der 61 Meningeome auf verschiedene Lokalisationen zeigt 28 % Schädelbasismeningeome (im Vergleich zu 24 % bei Maiuri et al. (2019)), 64 % Konvexitätsmeningeome (54 %) und 8 % spinale Meningeome (9 %), was im Wesentlichen die Verteilung der von Maiuri et al. (2019) untersuchten Meningeome ($n = 300$) widerspiegelt [67]. Allerdings stellen acht multifokalen Meningeome, die in den vorherigen Werten nicht enthalten sind, eine aggressivere Kohorte dar.

6.2.2 Vergleich der ARID1A-Konzentrationen in Meningeomen mit und ohne LOH auf Chromosom 1p

Wie in Abschnitt 5.4.1 beschrieben, zeigt der Vergleich von 33 Tumoren mit einem LOH auf Chromosom 1p – und somit auch dem Verlust eines Allels des *ARID1A*-Gens auf 1p36.11 [121] – und 28 Tumoren ohne einen solchen Chromosomenverlust, dass Meningeome mit LOH 1p signifikant weniger ARID1A enthalten (vgl. Abbildung 19). Da es sich bei ARID1A um ein nukleozytoplasmatisches, teilweise DNA-gebundenes Protein handelt [21,39], erscheint es sinnvoll den Fokus der Analyse auf die Fraktionen Frei nukleär und Chromatin zu setzen, statt auf das Zytosol oder die Membran. Ansonsten würden sich Schwierigkeiten ergeben, wenn einige Gruppen signifikante Veränderungen aufweisen und andere nicht (vgl. Abbildung 19). Die beiden Gruppen „Kern“ (Frei nukleär + Chromatin) und „Gesamt“ (Zytosol + Membran + Frei nukleär + Chromatin) sollen daher im Folgenden mit dem größten Interesse betrachtet werden, da durch die Summation ein repräsentativerer Wert der Auswirkungen auf Zellebene gegeben wird. So überwiegen beispielsweise die signifikanten Abnahmen in den vier Gruppen Frei nukleär, Chromatin, Kern und Gesamt die nicht signifikanten Unterschiede in den Fraktionen Zytosol und Membran, wobei letztere im Allgemeinen auch niedrigere ARID1A-Werte aufweisen (vgl. Abbildung 19 und Tabelle 12).

Außerdem ist neben dem statistisch signifikanten Unterschied der funktionell relevante Unterschied zu differenzieren. Letzterer meint, dass die mathematische Signifikanz nicht zwangsläufig etwas darüber

aussagt, ob es auf Proteinebene einen Unterschied gibt, der begründet, dass die signifikant niedrigere Konzentration von ARID1A relevante Folgen für die Tumorzelle hat [96]. Da in der Fraktion Frei nukleär 32,3 % und in der Fraktion Chromatin 16,5 % weniger ARID1A vorhanden sind, ist insbesondere aufgrund der Fraktion Frei nukleär von einer funktionellen Relevanz auszugehen (vgl. Abbildung 19, Abbildung 20). Im Kern und Gesamt zeigen sich Unterschiede von 26,8 % beziehungsweise 21,8 %, woraus sich ableiten lässt, dass eine Auswirkung auf den Proteinstoffwechsel sehr wahrscheinlich ist, zumal es sich jeweils um statistisch signifikante Reduktionen handelt. Eine übersichtliche Darstellung der Unterschiede zwischen Meningeomen mit und ohne LOH 1p erfolgt in Abbildung 27. Hier wird veranschaulicht, dass Meningeome mit LOH 1p in der Gruppe Gesamt – welche sehr aussagekräftige Ergebnisse liefert – weniger ARID1A aufweisen als solche mit erhaltenem Chromosom 1p, was die funktionelle Relevanz deutlich unterstreicht.

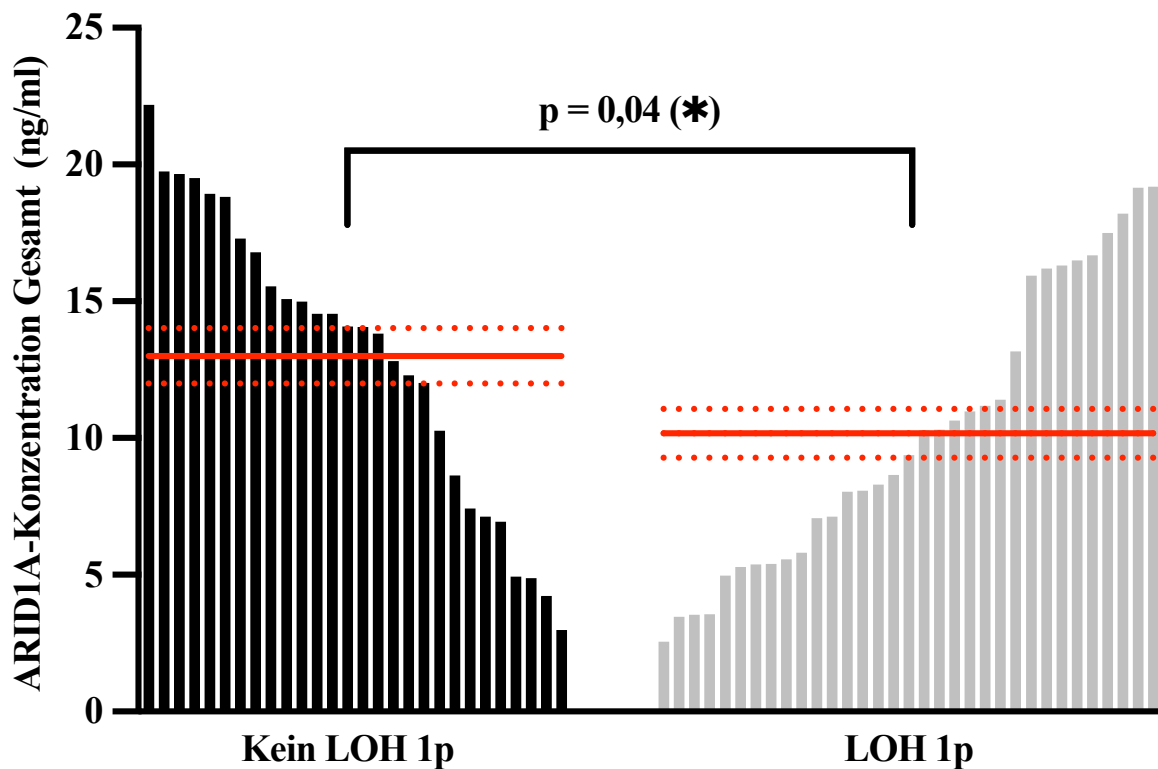


Abbildung 27. Vergleich der ARID1A-Konzentration in der Gruppe Gesamt zwischen Meningeomen mit und ohne LOH 1p.

Legende: In der Gruppe Gesamt werden die ARID1A-Konzentrationen (Balken) sortiert nach „Kein LOH 1p“ (schwarz) und „LOH 1p“ (grau) angegeben. Der p-Wert wird oberhalb der Balken dargestellt. Daneben sind Mittelwerte (rote durchgezogene Linie) $\pm$ SEM (rote gepunktete Linie) angegeben.

Betrachtet man die Methode für ein angepasstes Modell im Chromatin, in dem das Hintergrundsignal dieser Fraktion mathematisch reduziert wird, wie in 6.1.2 beschrieben, für die ARID1A-Konzentrationsunterschiede zwischen *ARID1A*-Wildtyp und Knockout, so ergeben sich nur geringfügige Änderungen und die Trends bleiben gleich. Somit sind keine Verzerrungen aufgrund laborchemischer Messfehler des neu entwickelten Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) ersichtlich.

Daher unterstützen diese Daten die Feststellung, dass *ARID1A* als Treiber betrachtet werden sollte [1,16,20,35,133], da die Expression von ARID1A bei Vorliegen eines LOH 1p signifikant reduziert ist – ein Zustand, der eng mit der Rezidivhäufigkeit und Malignität verbunden ist [62].

Mechanismus der ARID1A-Inaktivierung

Der Verlust der Heterozygotie (LOH) ist eine häufige Form der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, wobei eine Haploinsuffizienz mit konsekutiv verminderter Proteinexpression als Erklärungsansatz herangezogen wird [96]. Dieser Mechanismus für *ARID1A* konnte beispielsweise in Pankreastumoren gezeigt werden [102]. Als weiterer Erklärungsansatz können Mutationen dienen. In Meningeomen wurden *ARID1A*-Mutationen zunächst in Fallberichten [1,16] und anschließend in größeren Studien untersucht, welche Mutationsfrequenzen von 5,4 % [133] bis 17,3 % [35] zeigen. Gill et al. (2021) legen beispielsweise dar, dass eine *ARID1A*-Mutation mit einem 7,42-fach erhöhten Sterberisiko einhergeht, wobei sich eine p.Gln1327del in-frame Deletion in 68,2 % zeigt [35]. Außerdem illustriert die gleiche Arbeitsgruppe im Jahr 2022, dass *ARID1A*-Mutationen signifikant häufiger in rezidierten Meningeomen zu finden und somit prognoserelevant sind [20]. Der Einfluss dieser Mutationen auf die ARID1A-Expression wurde bisher noch nicht abschließend in Meningeomen untersucht, wobei ein potentieller Einfluss auf die Inaktivierung möglich wäre [96]. Als dritter Mechanismus ist denkbar, dass die Hypermethylierung des *ARID1A*-Promotors über H3K27Me3 die ARID1A-Expression beeinflusst [142].

Beide letzteren Mechanismen – die Mutation oder Hypermethylierung – könnten zusätzliche Erkenntnisse liefern, warum manche Tumore ohne LOH 1p niedrige ARID1A-Level im Kern aufweisen oder warum Tumore mit LOH 1p noch normal hohe ARID1A-Expressionen haben (siehe Abbildung 20). Diese Fragen können mit dieser Arbeit nicht beantwortet werden, so bieten sie allerdings eine große Chance für zukünftige Untersuchungen. Festzuhalten bleibt dennoch, dass die Abnahme der ARID1A-Konzentration im Kern um etwa 27 % bei Meningeomen mit LOH 1p verglichen mit solchen ohne einen LOH 1p (vgl. Tabelle 12) auf eine funktionelle Bedeutung in dieser Serie von 61 Meningeomen hindeutet, was letztlich den ersten Mechanismus – die Haploinsuffizienz des *ARID1A*-Gens – unterstreicht (vgl. Abbildung 19, Abbildung 20). Insbesondere wenn man den Verlust der *ARID1A*-Sonde als einen Teil von sechs möglichen Chromosom-1p-Sonden (vgl. Tabelle 5) betrachtet, wird ersichtlich, dass der LOH des *ARID1A*-Mikrosatelliten [12] als einziger in Kern und Gesamt eine signifikante Reduktion der ARID1A-Level aufweist, mit jeweils 27 % und 23 %. Im Gegensatz dazu zeigt sich, dass weder der LOH des Mikrosatelliten D1S1608 (Bande 1p36.32) noch der LOH von D1S1161 (Bande 1p35.2) in irgendeiner Fraktion zu signifikanten Veränderungen der ARID1A-Expressionswerte führen ($p > 0,05$), obwohl beide sehr nah zum *ARID1A*-Gen (1p36.11) gelegen sind. Dies unterstreicht die Bedeutung des *ARID1A*-Gens und dessen durch LOH induzierte Haploinsuffizienz.

WHO-Grad, Multifokale Meningeome und Rezidive

Aspekte die das Tumorzellwachstum beeinflussen und unter dem Aspekt der Malignisierung zusammengefasst werden können, sollen im Folgenden ausführlich analysiert werden.

Betrachtet man zunächst den wichtigsten Parameter der Meningeom-Klassifikation – den WHO-Grad (siehe Abschnitt 3.1.6) – so zeigen sich zwar Verminderungen der ARID1A-Level in höhergradigen Meningeomen, allerdings sind diese nicht statistisch signifikant (siehe Abbildung 21, Abschnitt 5.4.2). Dennoch bleibt festzuhalten, dass es eine sukzessive Abnahme der ARID1A-Level von Grad 1 zu den WHO-Graden 2 und 3 gibt. Eine möglicherweise zu niedrige Anzahl an WHO-Grad 3 Meningeomen ($n = 5$) könnte eine Erklärung für die fehlende Signifikanz sein, da doch Unterschiede von bis zu 25 % von Grad 1 bis 3 in den Medianen der Gruppe Gesamt erkennbar sind. Die Analysen multifokaler und rezidivierender Meningeome deuten darauf hin, dass die Verringerung des nukleozytoplasmatischen Proteins ARID1A von großer Bedeutung für die Prognose der Patienten ist (vgl. Tabelle 13, Tabelle 14). Die Ergebnisse des ELISAs zeigen eindrucklich, dass multifokale Tumore in der Gruppe Gesamt 56 % weniger ARID1A aufweisen als singuläre Läsionen, was nicht nur statistisch signifikant ist ($p < 0,05$), sondern auch von funktioneller Bedeutung sein dürfte (siehe Tabelle 13). Da multifokale Meningeome in der Literatur mit einer gleichwertigen Prognose wie solitäre Meningeome beschrieben werden, ist es interessant, dass in dieser Analyse fünf von acht multifokalen Meningeomen Rezidive sind (siehe Tabelle 4). Daher schließt der Begriff des „multiplen Meningeoms“ in dieser Serie eher Rezidive ein, welche in 63 % multifokal aufgetreten sind und diesen formalen Unterschied erklären [7].

Dennoch handelt es sich bei dieser Subgruppe der Tumore um solche mit sehr niedrigen ARID1A-Konzentrationen, die für das Verständnis der Rolle von ARID1A in Meningeomen von großem Interesse sind. Da in der Gruppe Gesamt rezidivierende Meningeome im Vergleich zu nicht rezidivierenden 35 % weniger ARID1A aufweisen ($p < 0,05$), ist von einer funktionellen Auswirkung auszugehen, welche konsekutiv das Outcome der Patienten beeinflussen kann. Dies wäre eine wichtige neue Erkenntnis, die auch die jüngsten Forschungen über *ARID1A*-Mutationen [1,16,20,35,133] und den LOH auf Chromosom 1p unterstützen würde [27,49,53,62,88,130]. Allerdings ist davon auszugehen, dass die drastischen ARID1A-Verringerungen in multifokalen als auch in rezidivierenden Meningeomen, kausal betrachtet wesentlich durch den LOH 1p beeinflusst werden können. Um dies zu testen, wird mittels einer multivariaten Analyse unter Berücksichtigung von Geschlecht und WHO-Grad (beides nicht signifikante Parameter in der univariaten Analyse) sowie des Rezidivstatus und der Lokalisation (beides signifikante Parameter in der univariaten Analyse) der Einfluss des LOH 1p auf die ARID1A-Expression untersucht. Dabei erweist sich keiner dieser Parameter als signifikant ($p > 0,05$), auch nicht der LOH 1p (vgl. Tabelle 16). Somit kann nicht sicher differenziert werden, ob multifokale und rezidivierende Meningeome aufgrund eines höheren Anteils an LOH 1p Verlusten oder für sich genommene Tumore mit niedrigen ARID1A-Konzentrationen sind. Ein weiterer zu diskutierender Aspekt ist der Rezidivstatus, wobei anzumerken ist, dass dieser anhand dessen kategorisiert wurde, ob der Tumor als Rezidiv eines Primärtumors operiert worden ist. Es erfolgte keine kontrollierte Nachbeobachtung der Nicht-Rezidive im Rahmen dieser Arbeit. Dennoch sind die bis dato aufgetretenen Rezidive als wichtiger Parameter dieser Analyse zu betrachten und die wertvollen Daten scheinen sinnvoll zur Auswertung, sodass dies bezüglich von keinen Einschränkungen ausgegangen wird.

Fraktion	Variable	Schät- zer	Standard- fehler	95 % Konfiden- zintervall	T- Score	p-Wert
Zytosol	Geschlecht [M]	0,340	0,198	-0,0564 bis 0,737	1,72	0,0912
	WHO-Grad [2]	0,269	0,223	-0,178 bis 0,715	1,21	0,2333
	WHO-Grad [3]	-0,148	0,374	-0,898 bis 0,602	0,396	0,6938
	Rezidiv [R]	0,0951	0,254	-0,414 bis 0,605	0,374	0,7096
	Lokalisation [Mu]	-0,858	0,306	-1,47 bis -0,245	2,81	0,0070 (**)
	LOH 1p [LOH]	-0,151	0,205	-0,562 bis 0,259	0,740	0,4628
Mem- bran	Geschlecht [M]	0,0496	0,214	-0,385 bis 0,484	0,231	0,8183
	WHO-Grad [2]	0,184	0,250	-0,323 bis 0,692	0,737	0,4660
	WHO-Grad [3]	-0,343	0,442	-1,24 bis 0,553	0,776	0,4426
	Rezidiv [R]	-0,034	0,290	-0,622 bis 0,553	0,118	0,9066
	Lokalisation [Mu]	0,162	0,439	-0,728 bis 1,05	0,369	0,7140
	LOH 1p [LOH]	0,225	0,214	-0,210 bis 0,660	1,05	0,3008
Frei nukleär	Geschlecht [M]	0,345	0,929	-1,52 bis 2,21	0,372	0,7117
	WHO-Grad [2]	-0,813	1,08	-2,98 bis 1,35	0,754	0,4542
	WHO-Grad [3]	-0,549	1,72	-3,99 bis 2,89	0,320	0,7500
	Rezidiv [R]	-0,705	1,20	-3,12 bis 1,71	0,586	0,5604
	Lokalisation [Mu]	-2,17	1,51	-5,20 bis 0,860	1,44	0,1567
	LOH 1p [LOH]	-1,60	0,954	-3,52 bis 0,315	1,68	0,0996
Chroma- tin	Geschlecht [M]	0,0378	0,310	-0,583 bis 0,658	0,122	0,9032
	WHO-Grad [2]	-0,206	0,349	-0,905 bis 0,493	0,591	0,5569
	WHO-Grad [3]	0,325	0,586	-0,849 bis 1,50	0,555	0,5813
	Rezidiv [R]	-0,451	0,398	-1,25 bis 0,346	1,13	0,2616
	Lokalisation [Mu]	-0,429	0,478	-1,39 bis 0,530	0,897	0,3738
	LOH 1p [LOH]	-0,701	0,320	-1,34 bis -0,0591	2,19	0,0329 (*)
Chroma- tin ver- bessert	Geschlecht [M]	0,304	0,341	-0,381 bis 0,988	0,891	0,3771
	WHO-Grad [2]	-0,466	0,381	-1,23 bis 0,298	1,22	0,2262
	WHO-Grad [3]	0,442	0,635	-0,831 bis 1,72	0,697	0,4891
	Rezidiv [R]	-0,741	0,442	-1,63 bis 0,145	1,68	0,0995
	Lokalisation [Mu]	-0,169	0,558	-1,29 bis 0,949	0,303	0,7629
	LOH 1p [LOH]	-0,464	0,348	-1,16 bis 0,234	1,33	0,1881
Kern	Geschlecht [M]	0,368	1,14	-1,92 bis 2,65	0,323	0,7479
	WHO-Grad [2]	-1,47	1,28	-4,04 bis 1,11	1,14	0,2584
	WHO-Grad [3]	-0,409	2,16	-4,73 bis 3,91	0,190	0,8504
	Rezidiv [R]	-0,774	1,46	-3,71 bis 2,16	0,529	0,5993
	Lokalisation [Mu]	-2,90	1,76	-6,43 bis 0,628	1,65	0,1051
	LOH 1p [LOH]	-1,89	1,18	-4,25 bis 0,475	1,60	0,1150
Gesamt	Geschlecht [M]	0,882	1,40	-1,92 bis 3,69	0,630	0,5312
	WHO-Grad [2]	-1,21	1,58	-4,38 bis 1,95	0,771	0,4443
	WHO-Grad [3]	-0,910	2,65	-6,22 bis 4,40	0,344	0,7325
	Rezidiv [R]	-0,819	1,80	-4,43 bis 2,79	0,455	0,6506
	Lokalisation [Mu]	-4,22	2,16	-8,56 bis 0,118	1,95	0,0563
	LOH 1p [LOH]	-1,77	1,45	-4,67 bis 1,14	1,22	0,2275

Tabelle 16. Multivariate Analyse des Einflusses auf die ARID1A-Level in 61 Meningeomen.

Legende: Der Einfluss von fünf Variablen (Geschlecht, WHO-Grad, Rezidiv, Lokalisation, LOH 1p Status) auf das ARID1A-Level wird in mehreren subzellulären Lokalisationen analysiert. „Chromatin verbessert“ = das in Abbildung 26C beschriebene Modell dient der ARID1A-Berechnung. Variablen: „Weiblich“ als Referenz, „Männlich“ [M] als Einflussparameter; WHO-Grad 1 als Referenz, WHO-Grad 2 [2] und WHO-Grad 3 [3] als Einflussparameter; Kein Rezidiv als Referenz, Rezidiv [R] als Einflussparameter; Singulär als Referenz, Multifokal [Mu] als Einflussparameter; Kein LOH 1p als Referenz, LOH 1p [LOH] als Einflussparameter. Schätzer, Standard-Fehler, 95 % Konfidenzintervall, T-Score, p-Wert beschreiben die statistische Signifikanz der Parameter, wobei $p < 0,05$ signifikant (**fett**).

Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung von ARID1A in Meningeomzellen mit LOH 1p zeigt sowohl fokale Verluste als auch mosaikartige Muster. Ein Verlust von fokalem oder mosaikartigem Muster findet sich insgesamt in 18 der 33 analysierten Meningeome mit LOH 1p (vgl. 5.5). Im Kontrast dazu stehen 15 Meningeome mit immunhistochemisch normal erhaltener ARID1A-Expression. Es besteht kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem immunhistochemischen Verlust der ARID1A-Expression, weder dem fokalen Verlust noch dem mosaikartigen Muster, und den mit dem ARID1A-ELISA gemessenen niedrigeren ARID1A-Konzentrationen (multiple lineare Regression; $p > 0,05$). Weitergehende Analysen zeigen, dass weder WHO-Grad 2 oder 3 noch Rezidive oder Mehrfachlokalisationen in Meningeomen mit immunhistochemisch nachgewiesenen ARID1A-Expressionsverlusten signifikant vermehrt auftreten (exakter Test nach Fisher; $p > 0,05$).

Außerdem kann gezeigt werden, dass keines der histologischen Merkmale (Mitosen, Ki-67, Progesteronrezeptor-Expression, Small cell change, Sheeting oder Nekrose; vgl. 3.1.6) einen signifikanten Einfluss auf die ARID1A-Expression hat. Es ist allerdings wichtig bei der Interpretation dieser Ergebnisse zu beachten, dass es sich bei der Immunhistochemie um eine semiquantitative Methode handelt, im Gegensatz zum quantitativen ELISA. Letzterer verwendet Kontrollparameter auf jeder analysierten Platte sowie einen definierten dynamischen Bereich und Quantifizierungsgrenzen, die eine objektive Messung ermöglichen [118].

Ein weiterer Aspekt ist, dass der Kontext einer immunhistochemischen Analyse der ARID1A-Expression in der Patientenkohorte aus deskriptivem Interesse durchgeführt worden ist. Im Vordergrund steht zunächst allgemeine Muster in Meningeomen mit einem LOH auf Chromosom 1p zu finden, weshalb die in 5.5 gezeigten Ergebnisse wertvolle Erkenntnisse darstellen. Die Diskrepanz zwischen immunhistochemischem Verlust und verminderter ARID1A-Expression im ELISA sind prinzipiell auf die mangelnde Genauigkeit und Präzision der Immunhistochemie im Vergleich zum ELISA zurückzuführen und unterstreichen die Wichtigkeit einer quantitativen Messung [118,124]. Darüber hinaus ist davon auszugehen, dass der LOH 1p zu kleinen Unterschieden in der ARID1A-Proteinexpression führt, die im ELISA besser zu beurteilen sind als in der Immunhistochemie, da letztere weniger präzise misst und die Sensitivität geringer ist [118,124].

Im Einklang mit anderen Studien kann kein vollständiger Verlust der ARID1A-Expression festgestellt werden [1,16]. So fanden Abedalthagafi et al. (2015) beispielsweise fokale Verluste der ARID1A-Expression in Bereichen eines intraventrikulären Meningeoms, das sowohl einen Single-Copy-Verlust von Chromosom 1p als auch eine *ARID1A*-Frameshift-Mutation aufwies. In Bereichen des Tumors ohne diese Veränderungen blieben die immunhistochemischen ARID1A-Signale erhalten [1]. Die Analyse eines rezidivierenden Meningeoms durch Bujko et al. (2017) ergibt, dass der Primärtumor sowie das in der Arbeit analysierte Rezidiv 2 deutlich reduzierte ARID1A-Signale in der Immunhistochemie aufwei-

sen und in den Rezidiven 1 und 3 nennenswerte Anteile von Zellen mit positiver Kernfärbung mit einigen negativen Zellen gemischt sind. Ein Muster, was dem in dieser Arbeit beschriebenen mosaikartigen Ausfall (vgl. 5.5) entsprechen könnte [16].

Man könnte auch argumentieren, dass die Wahl des primären Antikörpers und seines Zielepitops das Ergebnis der Immunhistochemie stark beeinflusst, da der Antikörper ab182560 (Abcam), Klon EPR13501, möglicherweise ARID1A-positive oder -negative Zellen falsch klassifiziert. Dies wurde in einer kürzlich veröffentlichten Studie analysiert, wobei die Autoren den in dieser Arbeit verwendeten Antikörper als spezifisch bestätigen [54]. Auch die Daten dieser Arbeit unterstützen diese Aussage (vgl. 5.2.2).

Um die Ergebnisse in den weiteren Forschungskontext einzuordnen, ist die Arbeit von Urbschat et al. (2011) zu erläutern, wobei die Autoren in Meningeomen viele verschiedene Zellklone mit jeweils unterschiedlichen molekularen Eigenschaften und unterschiedlicher Relevanz für die Prognose der Patienten differenzieren konnten. Die dabei beschriebene Diversität könnte die in dieser Arbeit beschriebenen fokalen oder mosaikartigen Ausfallsmuster erklären [123].

6.3 Der Einfluss von *ARID1B* als ein weiteres potentiell Treibergen auf Chromosom 6q27 in Meningeomen

ARID1A ist ein Mitglied des SWI/SNF-Komplexes, und Kadoch et al. (2013) konnten zeigen, dass mehrere Untereinheiten von einem Verlust in einem einzigen Tumor betroffen sein können, eine Kombination, die bis zu 50 % aller Patientenproben in einer Tumorentität betreffen kann [50]. Zudem gibt es die Beschreibung eines Modells von Raab et al. (2015), in dem funktionell die Einzelbetrachtungen von ARID1A überwiegend aktivierend, ARID1B überwiegend repressiv und ARID2 etwas häufiger aktivierend auf die Transkriptionsrate bestimmter Gene wirken. Die Autoren beschreiben auch, dass mehrere ARID Proteine Einfluss auf Gene ausüben und daher sowohl kooperativ als auch kompetitiv wirken können [91].

In Meningeomen konnten Weber et al. (1997) erstmals Hinweise für die Häufung eines LOH auf Chromosom 1p in höhergradigen Meningeomen liefern [130]. Ketter et al. (2007) lieferten in der Folge den Nachweis, dass der LOH 1p ein früher Mechanismus in der Malignisierung der Meningeom Zellen ist und ein erhöhtes Rezidivrisiko des Tumors impliziert [53]. Der chronologisch frühe LOH 22q wird gefolgt von 1p und interessanterweise von einem LOH des Chromosoms 6 (vgl. Abbildung 2). Daher ist die Erkenntnis einer signifikant verminderten ARID1A-Expression (vgl. Abbildung 19 und Tabelle 12) in der Gruppe der Meningeome mit LOH 1p ein besonderer Fortschritt durch diese Arbeit. Auch die hohe Korrelation mit dem LOH 6q stellt eine Bestätigung der vorher angeführten Publikationen dar [53,130]. Insgesamt gibt es dadurch gute Hinweise, dass eine Analyse der beiden Gene *ARID1A* – 1p36.11 [121] – und *ARID1B* – 6q25.3 [121] – mögliche neue Zusammenhänge in Meningeomen mit aggressivem Wachstum aufdeckt.

Der Verlust von Teilen des Chromosoms 6q scheint auch in den Daten dieser Arbeit chronologisch gesehen erst nach dem LOH des Chromosoms 1p aufzutreten, da Patientenproben mit keinem LOH 1p nur 1 von 27 Proben einen LOH 6q aufweisen (siehe Abbildung 23E; [53,130]). Allerdings zeigt der gemeinsame LOH 1p und 6q keine Assoziationen zu höheren WHO-Graden 2 oder 3 im Vergleich zu Meningeomen ohne beide Merkmale (exakter Test nach Fisher; $p = 0,4026$). Außerdem ist eine Häufung des LOH 6q in Rezidiven mit den Daten dieser Arbeit nicht zu erkennen (exakter Test nach Fisher; $p = 0,7618$). Weiterhin kann eine Erhöhung der Chromosom 6q Verluste in multifokal auftretenden Meningeomen verglichen mit singulären Herden nicht bestätigt werden (exakter Test nach Fisher; $p > 0,9999$). Dennoch geben die Verluste von Teilen des Chromosoms 6q, insbesondere nahe der Sonde D6S281, Anlass dazu die exakte Rolle dieser fehlenden DNA-Abschnitte näher zu charakterisieren (vgl. Abbildung 23).

Betrachtet man den Verlust eines der vier Primer auf Chromosom 6q (D6S281, D6S440, D6S473 und D6S1633), so zeigt der exakte Test nach Fisher, dass dieser Verlust hoch mit dem LOH 1p korreliert ist ($p < 0,0001$, Abbildung 23F). Der einzelne Verlust der Mikrosatelliten D6S440 oder D6S281 zeigt sich als signifikant vermehrt in Meningeomen mit zusätzlichem LOH 1p (siehe Abb. Abbildung 23B, E). D6S281 befindet sich in unmittelbarer Nähe des *PHF10*-Gens, eines Tumorsuppressorgens und einer weiteren Untereinheit des SWI/SNF-Komplexes [4]. Da die vier Primer im *ARID1B*-Gen in der PCR keine verwertbaren Ergebnisse liefern, wird die Sonde D6S1633 zur Analyse herangezogen. Diese zeichnet sich durch ihre Nähe zum *ARID1B*-Gen aus. Diese Sonde verfehlt interessanterweise mit einem p-Wert von 0,054 sehr knapp das Signifikanzniveau von $p < 0,05$, wenn man eine erhöhte Korrelation zwischen der LOH von D6S1633 und der LOH 1p analysiert (exakter Test nach Fisher; Abbildung 23D). Abschließend kann daher *ARID1B* als potentiell Treiber in Meningeomen mit diesen Daten weder bestätigt noch ausgeschlossen werden.

6.4 Ausblick

ARID1A wurde bereits von Linsler et al. (2014) und Katrin Bartelmei (2021) als Tumorsuppressorgen vorgestellt, das im Rahmen eines LOH des Chromosoms 1p inaktiviert werden könnte [12,62]. Mit dieser Arbeit kann die zu Beginn aufgestellte Hypothese bestätigt werden (vgl. Abbildung 6) und es sollte in folgenden Studien evaluiert werden, ob neben weiteren diagnostischen Möglichkeiten auch therapeutische Ansatzpunkte mit diesem Wissen eingeleitet werden können.

Insgesamt weisen 20,8 % der untersuchten Meningeome ($n = 255$) in einer Studie von Gill et al. (2021) Veränderungen in Genen des Chromatin Remodeling Komplexes auf [35]. Da sowohl die *TERT*-Promotor-Mutation als auch die homozygote Deletion von *CDKN2A/B* in die Meningeom-Klassifikation integriert wurden [64] und Mitglieder des SWI/SNF-Komplexes bei einigen Meningeom-Subtypen wie *SMARCA4* (intraventrikuläre Meningeome des WHO-Grades 2 [49]), *SMARCE1* (klarzelliger Subtyp, macht 0,2-0,8 % aller Meningeome aus und es wurde gezeigt, dass *SMARCE1* Mutationen oder ein LOH des Allels pathognomonisch sind [111]), *BAP1* (rhabdoider Subtyp [104]), *PBRM1* (papillärer

Subtyp [134]) und *SMARCB1* (NF2-mutierter Subtyp [64]) eine hohe Mutationshäufigkeit aufweisen, ist zu diskutieren, dass der LOH auf Chromosom 1p, einschließlich des *ARID1A*-Gens, und/oder eine *ARID1A*-Mutation mit nachfolgend verringerten ARID1A-Spiegeln im Mittelpunkt weiterer Forschung stehen sollten. Außerdem ist aufgrund der dargestellten Zusammenhänge eine Integration des LOH 1p als zentraler Bestandteil einer neuen WHO-Klassifikation von Meningeomen zu erwägen.

Die *ARID1A*-Mutationen stellen beispielsweise einen weiteren Inaktivierungsweg für *ARID1A* dar, so beschreiben etwa Gill et al. (2021) ein 7,4-fach erhöhtes Risiko für den Tod bei einer Mutation im Meningeom eines Patienten [35], weshalb der genaue Interaktionsweg zwischen Mutation und LOH zukünftig ein großes Forschungspotential birgt. Insbesondere da *ARID1A*-Mutationen bei primären Meningeomen ein 7,3-fach erhöhtes Rezidivrisiko besitzen [20].

In der Interaktion mit anderen Signalwegen (Tabelle 3) ergeben sich auch weitere Forschungsprojekte der Zukunft. So wurde etwa ein schnell wachsendes kraniales Meningeom mit einem Verlust von den Untereinheiten des SWI/SNF Komplexes, *ARID1A* und *SMARCE1*, und einen Gewinn von *SUZ12* und *EZH1*, Komponenten des Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2), beschrieben, das die vielfältigen Auswirkungen eines ARID1A-Expressionsverlustes darlegt [87]. Harmancy et al. (2017) konnten zeigen, dass atypische Meningeome häufiger einen hypermethylierten Phänotyp und erhöhte H3K27Me-Werte aufweisen, die durch einen hochregulierten PRC2 und dessen katalytische Untereinheit EZH2 erklärt werden [41], was sich etwa durch eine ARID1A-Inaktivierung erklären ließe (siehe Tabelle 3). Da ARID1A an anderen Signalwegen wie AKT, DNA-Reparatur, TERT, HDAC, PD-L1 und der Zellzyklusregulation beteiligt ist [71], wäre es interessant zu sehen, ob es Wechselwirkungen mit der gestörten ARID1A-Signalübertragung bei Meningeomen gibt und wie sie das Tumorstadium beeinflussen, insbesondere bei höhergradigen Tumoren (vgl. Tabelle 3).

ARID1B scheint, sowie auch das *PHF10* Gen, aus funktioneller Sichtweise ein interessantes Forschungsfeld in der Zukunft zu sein, da beide Proteine Untereinheiten des Chromatin Remodeling Komplexes sind (siehe Abschnitt 3.3.4 und 3.3.5). Aufgrund der Erkenntnisse von Pérez-Magán et al. (2010) über Meningeome, dass sich die meisten der unterschiedlich exprimierten Gene in ihrer Serie (n = 104) auf den Chromosomen 1p, 6q und 14q befanden und zusätzlich in Rezidiven unterexprimiert sind [88], hat die Kombination von LOH sowie Mutation von *ARID1A* und/oder *ARID1B* und/oder zusätzlichen Mitgliedern des SWI/SNF-Komplexes (d. h. *PHF10* auf 6q, *DPF3* auf 14q) das Potenzial, das derzeitige Verständnis der Meningeom-Entstehung drastisch zu erweitern [25]. Eine größere Kohorte könnte daher neue Aufschlüsse liefern und es sollten in Zukunft vermehrt unterschiedliche Mitglieder des SWI/SNF-Komplexes in LOH- oder Mutationsanalysen einbezogen werden, um die Fehlfunktion des Chromatin Remodeling Komplexes in Meningeomen detaillierter beurteilen zu können [50,92,103,127].

Zhang et al. (2014) haben in zwei von neun (22 %) anaplastischen Meningeomen *ARID1B*-Mutationen gefunden, denen sie eine mögliche Relevanz für die Prognose zuschreiben: p.R1977Q und p.A1720T [143]. Außerdem wurden in 32 WHO-Grad 1 Meningeomen *ARID1B* Mutationen mit einer Frequenz von 3 % gefunden [37]. Weitere Daten zu *ARID1B*-Mutationen in Meningeomen fehlen.

Der weiterhin starke Hinweis durch Wang et al. (2020) auf das maligne Potenzial bei der Tumorentstehung durch den doppelten Knockout von *ARID1A* und *ARID1B* gibt außerdem Anlass diese spezielle Verknüpfung genauer zu untersuchen [127]. Die Erkenntnis, dass der LOH 6q am häufigsten in der Sonde D6S281 zu finden ist, könnte sehr hilfreich zur Detektion weiterer Treibergene in Meningeomen neben *ARID1A* sein [1,16,20,35,133]. Da sich im *ARID1B*-Gen Mutationen in der in BAF250_C Region häufen [108], die bekannt ist für die Vernetzung von ARID1A oder ARID1B mit anderen Signalwegen (siehe Abbildung 5, vgl. 3.3.1), könnten sich auch hier – analog zu ARID1A – neue Verknüpfungen mit anderen SWI/SNF Komplex Untereinheiten ergeben, die sicherlich ein spannendes Forschungsfeld bieten und in Meningeomen einen großen Einfluss haben können.

7 Literaturverzeichnis

Literatur gemäß Vorgaben der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar.

1. Abedalthagafi MS, Bi WL, Merrill PH, Gibson WJ, Rose MF, Du Z, Francis JM, Du R, Dunn IF, Ligon AH, Beroukhir R, Santagata S (2015) ARID1A and TERT promoter mutations in dedifferentiated meningioma. *Cancer Genet* 208:345–350
2. Al-Mefty O, Topsyakal C, Pravdenkova S, Sawyer JR, Harrison MJ (2004) Radiation-induced meningiomas: clinical, pathological, cytogenetic, and cytogenetic characteristics. *J Neurosurg* 100:1002–1013
3. Alver BH, Kim KH, Lu P, Wang X, Manchester HE, Wang W, Haswell JR, Park PJ, Roberts CWM (2017) The SWI/SNF chromatin remodelling complex is required for maintenance of lineage specific enhancers. *Nat Commun* 2017 8:1–10
4. Anbunathan H, Verstraten R, Singh AD, William Harbour J, Bowcock AM (2019) Integrative copy number analysis of uveal melanoma reveals novel candidate genes involved in tumorigenesis including a tumor suppressor role for PHF10/BAF45A. *Clin Cancer Res* 25:5156–5166
5. Andreasson U, Perret-Liaudet A, van Waalwijk van Doorn LJC, Blennow K, Chiasserini D, Engelborghs S, Fladby T, Genc S, Kruse N, Kuiperij HB, Kulic L, Lewczuk P, Mollenhauer B, Mroczko B, Parnetti L, Vanmechelen E, Verbeek MM, Winblad B, Zetterberg H, Koel-Simmelink M, Teunissen CE (2015) A practical guide to immunoassay method validation. *Front Neurol* 6:1–8
6. Apra C, Peyre M, Kalamarides M (2018) Current treatment options for meningioma. *Expert Rev Neurother* 18:241–249
7. Araújo Pereira BJ, Nogueira de Almeida A, Pires de Aguiar PH, Paiva WS, Teixeira MJ, Nagahashi Marie SK (2019) Multiple Intracranial Meningiomas: A Case Series and Review of the Literature. *World Neurosurg* 122:e1536–e1541
8. Armbruster DA, Pry T (2008) Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation. *Clin Biochem Rev* 29:S49
9. Aydin S (2015) A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides* 72:4–15
10. Azadeh M, Gorovits B, Kamerud J, MacMannis S, Safavi A, Sailstad J, Sondag P (2018) Calibration Curves in Quantitative Ligand Binding Assays: Recommendations and Best Practices for Preparation, Design, and Editing of Calibration Curves. *AAPS J* 20:1–16
11. Barrios-Llerena ME, Chong PK, Gan CS, Snijders APL, Reardon KF, Wright PC (2006) Shotgun proteomics of cyanobacteria--applications of experimental and data-mining techniques. *Brief Funct Genomic Proteomic* 5:121–132
12. Bartelmei K (2021) Analyse der Loss of Heterozygosity des Chromosoms 1p sowie der Untereinheiten BAF47, BAF45c und BAF250a des ATP-abhängigen Chromatin-Remodeling-Komplexes SWI/SNF in Meningeomen.
13. Bateman A, Martin MJ, Orchard S, Magrane M, Agivetova R, Ahmad S, Alpi E, Bowler-Barnett EH, Britto R, Bursteinas B, Bye-A-Jee H, Coetzee R, Cukura A, da Silva A, Denny P, Dogan T, Ebenezer TG, Fan J, Castro LG, Garmiri P, Georgiou G, Gonzales L, Hatton-Ellis E, Hussein A, Ignatchenko A, Insana G, Ishtiaq R, Jokinen P, Joshi V, Jyothi D, Lock A, Lopez R, Luciani A, Luo J, Lussi Y, MacDougall A, Madeira F, Mahmoudy M, Menchi M, Mishra A, Moulang K, Nightingale A, Oliveira CS, Pundir S, Qi G, Raj S, Rice D, Lopez MR, Saidi R, Sampson J, Sawford T, Speretta E, Turner E, Tyagi N, Vasudev P, Volynkin V, Warner K, Watkins X, Zaru R, Zellner H, Bridge A, Poux S, Redaschi N, Aimo L, Argoud-Puy G, Auchincloss A, Axelsen K, Bansal P, Baratin D, Blatter MC, Bolleman J, Boutet E, Breuza L, Casals-Casas C, de Castro E, Echioukh KC, Coudert E, Cuhe B, Doche M, Dornevil D, Estreicher A, Famiglietti ML, Feuermann M, Gasteiger E, Gehant S, Gerritsen V, Gos A, Gruaz-Gumowski N, Hinz U, Hulo C, Hyka-Nouspikel N, Jungo F, Keller G, Kerhornou A, Lara V, Le Mercier P, Lieberherr D, Lombardot T, Martin X, Masson P, Morgat A, Neto TB, Paesano S, Pedruzzi I, Pilbout S, Pourcel L, Pozzato M, Pruess M, Rivoire C, Sigrist C, Sonesson K, Stutz A, Sundaram S, Tognolli M, Verbregue L, Wu CH, Arighi CN, Arminski L,

- Chen C, Chen Y, Garavelli JS, Huang H, Laiho K, McGarvey P, Natale DA, Ross K, Vinayaka CR, Wang Q, Wang Y, Yeh LS, Zhang J, Ruch P, Teodoro D (2021) UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res* 49:D480–D489
14. Bateman NW, Shoji Y, Conrads KA, Stroop KD, Hamilton CA, Darcy KM, Maxwell GL, Risinger JI, Conrads TP (2016) Identification and functional characterization of a novel bipartite nuclear localization sequence in ARID1A. *Biochem Biophys Res Commun* 469:114–119
15. Beauchamp RL, James MF, DeSouza PA, Wagh V, Zhao WN, Jordan JT, Stemmer-Rachamimov A, Plotkin SR, Gusella JF, Haggarty SJ, Ramesh V (2015) A high-throughput kinome screen reveals serum/glucocorticoid-regulated kinase 1 as a therapeutic target for NF2-deficient meningiomas. *Oncotarget* 6:16981
16. Bujko M, Machnicki MM, Grecka E, Rusetska N, Matyja E, Kober P, Mandat T, Rydzanicz M, Płoski R, Krajewski R, Bonicki W, Stokłosa T, Siedlecki JA (2017) Mutational Analysis of Recurrent Meningioma Progressing From Atypical to Rhabdoid Subtype. *World Neurosurg* 97:754.e1-754.e6
17. Camp RL, Chung GG, Rimm DL (2002) Automated subcellular localization and quantification of protein expression in tissue microarrays. *Nat Med* 2002 8:1323–1328
18. Caumanns JJ, Wisman GBA, Berns K, van der Zee AGJ, de Jong S (2018) ARID1A mutant ovarian clear cell carcinoma: A clear target for synthetic lethal strategies. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* 1870:176–184
19. Centore R, Sandoval G, Soares L, Kadoch C, Chan H (2020) Mammalian SWI/SNF Chromatin Remodeling Complexes: Emerging Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Trends Genet* 36:936–950
20. Chaluts D, Dullea JT, Ali M, Vasani V, Devarajan A, Rutland JW, Gill CM, Ellis E, Kinoshita Y, McBride RB, Bederson J, Donovan M, Sebra R, Umphlett M, Shrivastava RK (2022) ARID1A mutation associated with recurrence and shorter progression-free survival in atypical meningiomas. *J Cancer Res Clin Oncol*
21. Clapier CR, Iwasa J, Cairns BR, Peterson CL (2017) Mechanisms of action and regulation of ATP-dependent chromatin-remodelling complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017 18:407–422
22. Clark VE, Erson-Omay EZ, Serin A, Yin J, Cotney J, Özduman K, Avşar T, Li J, Murray PB, Henegariu O, Yilmaz S, Günel JM, Carrión-Grant G, Yilmaz B, Grady C, Tanrikulu B, Bakircioğlu M, Kaymakçalan H, Caglayan AO, Sencar L, Ceyhan E, Atik AF, Bayri Y, Bai H, Kolb LE, Hebert RM, Omay SB, Mishra-Gorur K, Choi M, Overton JD, Holland EC, Mane S, State MW, Bilgüvar K, Baehring JM, Gutin PH, Piepmeyer JM, Vortmeyer A, Brennan CW, Pamir MN, Kiliç T, Lifton RP, Noonan JP, Yasuno K, Günel M (2013) Genomic analysis of non-NF2 meningiomas reveals mutations in TRAF7, KLF4, AKT1, and SMO. *Science* (80-) 339:1077–1080
23. Cleary JM, Aguirre AJ, Shapiro GI, D'Andrea AD (2020) Biomarker-Guided Development of DNA Repair Inhibitors. *Mol Cell* 78:1070–1085
24. Collins TJ (2007) ImageJ for microscopy. *Biotechniques* 43:S25–S30
25. Collord G, Tarpey P, Kurbatova N, Martincorena I, Moran S, Castro M, Nagy T, Bignell G, Maura F, Young MD, Berna J, Tubio JMC, McMurrin CE, Young AMH, Sanders M, Noorani I, Price SJ, Watts C, Leinertz E, Kirsch M, Schackert G, Pearson D, Devadass A, Ram Z, Collins VP, Allinson K, Jenkinson MD, Zakaria R, Syed K, Hanemann CO, Dunn J, McDermott MW, Kirolos RW, Vassiliou GS, Esteller M, Behjati S, Brazma A, Santarius T, McDermott U (2018) An integrated genomic analysis of anaplastic meningioma identifies prognostic molecular signatures. *Sci Reports* 2018 8:1–13
26. Cushing H (1922) The meningiomas (dural endotheliomas): Their source, and favoured seats of origin. *Brain* 45:282–316
27. Driver J, Hoffman SE, Tavakoli S, Woodward E, Maury EA, Bhawe V, Greenwald NF, Nassiri F, Aldape K, Zadeh G, Choudhury A, Vasudevan HN, Magill ST, Raleigh DR, Abedalthagafi M, Aizer AA, Alexander BM, Ligon KL, Reardon DA, Wen PY, Al-Mefty O, Ligon AH, Dubuc AM, Beroukhi R, Claus EB, Dunn IF, Santagata S, Linda Bi W (2022) A molecularly integrated grade for meningioma. *Neuro Oncol* 24:796–808
28. Durand A, Labrousse F, Jouvett A, Bauchet L, Kalamaridès M, Menei P, Deruty R, Moreau JJ,

- Fèvre-Montange M, Guyotat J (2009) WHO grade II and III meningiomas: A study of prognostic factors. *J Neurooncol* 95:367–375
29. Duvaud S, Gabella C, Lisacek F, Stockinger H, Ioannidis V, Durinx C (2021) Expasy, the Swiss Bioinformatics Resource Portal, as designed by its users. *Nucleic Acids Res* 49:W216–W227
30. Dziuk TW, Woo S, Butler EB, Thornby J, Grossman R, Dennis WS, Lu H, Carpenter LS, Chiu JK (1998) Malignant meningioma: an indication for initial aggressive surgery and adjuvant radiotherapy. *J Neurooncol* 37:177–188
31. European Medicines Agency (2019) ICH Guideline M10 on Bioanalytical Method Validation. *Sci Med Heal* 44:57
32. Fotsing SF, Margoliash J, Wang C, Saini S, Yanicky R, Shleizer-Burko S, Goren A, Gymrek M (2019) The impact of short tandem repeat variation on gene expression. *Nat Genet* 51:1652
33. Gao F, Li P, Kong X, Song T, Han Q, Zhou S (2021) ARID1A-mutated cervical cancer depends on the activation of YAP signaling. *Front Biosci - Landmark* 26:1411–1421
34. Gao X, Tate P, Hu P, Tjian R, Skarnes WC, Wang Z (2008) ES cell pluripotency and germ-layer formation require the SWI/SNF chromatin remodeling component BAF250a. *Proc Natl Acad Sci* 105:6656–6661
35. Gill CM, Loewenstern J, Rutland JW, Arib H, Pain M, Umphlett M, Kinoshita Y, McBride RB, Bederson J, Donovan M, Sebra R, Fowkes M, Shrivastava RK (2021) SWI/SNF chromatin remodeling complex alterations in meningioma. *J Cancer Res Clin Oncol*
36. Giri M, Maulik A, Singh M (2020) Signatures of Specific DNA Binding by the AT-Rich Interaction Domain of BAF250a. *Biochemistry* 59:100–113
37. González-Tablas M, Prieto C, Arandia D, Jara-Acevedo M, Otero Á, Pascual D, Ruíz L, Álvarez-Twose I, García-Montero AC, Orfao A, Tabernero MD (2021) Whole-Exome Sequencing Reveals Recurrent but Heterogeneous Mutational Profiles in Sporadic WHO Grade 1 Meningiomas. *Front Oncol* 11:4781
38. Grebenchtchikov N, Brinkman A, Van Broekhoven SPI, De Jong D, Geurts-Moespot A, Span PN, Peters HA, Portengen H, Foekens JA, Sweep CGJ, Dorssers LCJ (2004) Development of an ELISA for Measurement of BCAR1 Protein in Human Breast Cancer Tissue. *Clin Chem* 50:1356–1363
39. Guan B, Gao M, Wu C-H, Wang T-L, Shih I-M (2012) Functional Analysis of In-frame Indel ARID1A Mutations Reveals New Regulatory Mechanisms of Its Tumor Suppressor Functions. *Neoplasia* 14:986
40. Han SJ, Reis G, Kohanbash G, Shrivastav S, Magill ST, Molinaro AM, McDermott MW, Theodosopoulos P V., Aghi MK, Berger MS, Butowski NA, Barani I, Phillips JJ, Perry A, Okada H (2016) Expression and prognostic impact of immune modulatory molecule PD-L1 in meningioma. *J Neurooncol* 130:543–552
41. Harmancl AS, Youngblood MW, Clark VE, CoÅ Kun S, Henegariu O, Duran D, Erson-Omay EZ, Kaulen LD, Lee TI, Abraham BJ, Simon M, Kirschek B, Timmer M, Goldbrunner R, Omay SB, Baranoski J, Baran B, Carrión-Grant G, Bai H, Mishra-Gorur K, Schramm J, Moliterno J, Vortmeyer AO, Bilgüvar K, Yasuno K, Young RA, Günel M (2017) Integrated genomic analyses of de novo pathways underlying atypical meningiomas. *Nat Commun* 2017 8:1–14
42. Hartmann C, Mueller W, Lass U, Kamel-Reid S, Von Deimling A (2005) Molecular Genetic Analysis of Oligodendroglial Tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:10–14
43. Helming KC, Wang X, Wilson BG, Vazquez F, Haswell JR, Manchester HE, Kim Y, Kryukov G V., Ghandi M, Aguirre AJ, Jagani Z, Wang Z, Garraway LA, Hahn WC, Roberts CWM (2014) ARID1B is a specific vulnerability in ARID1A-mutant cancers. *Nat Med* 20:251–254
44. Hinsberger M, Becker-Kettern J, Jürgens-Wemheuer WM, Oertel J, Schulz-Schaeffer WJ (2023) Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Quantification of ARID1A in Tissue Lysates. *Cancers (Basel)* 15:4096
45. Hollecsek B, Zampella D, Urbschat S, Sahm F, von Deimling A, Oertel J, Ketter R (2019) Incidence, mortality and outcome of meningiomas: A population-based study from Germany. *Cancer Epidemiol* 62:
46. Ji Y, Rankin C, Grunberg S, Sherrod AE, Ahmadi J, Townsend JJ, Feun LG, Fredericks RK, Russell CA, Kabbinar FF, Stelzer KJ, Schott A, Verschraegen C (2015) Double-blind phase

- III randomized trial of the antiprogesterin agent mifepristone in the treatment of unresectable meningioma: SWOG s9005. *J Clin Oncol* 33:4093–4098
47. Johnson MD, Abu-Farsakh S (2019) Clinicopathologic features of incidental meningiomas: A review of the literature and the University of Rochester autopsy experience. *Clin Neuropathol* 38:118–121
48. Jones S, Wang TL, Shih IM, Mao TL, Nakayama K, Roden R, Glas R, Slamon D, Diaz LA, Vogelstein B, Kinzler KW, Velculescu VE, Papadopoulos N (2010) Frequent mutations of chromatin remodeling gene ARID1A in ovarian clear cell carcinoma. *Science* (80-) 330:228–231
49. Jungwirth G, Warta R, Beynon C, Sahm F, von Deimling A, Unterberg A, Herold-Mende C, Jungk C (2019) Intraventricular meningiomas frequently harbor NF2 mutations but lack common genetic alterations in TRAF7, AKT1, SMO, KLF4, PIK3CA, and TERT. *Acta Neuropathol Commun* 7:
50. Kadoch C, Hargreaves DC, Hodges C, Elias L, Ho L, Ranish J, Crabtree GR (2013) Proteomic and bioinformatic analysis of mammalian SWI/SNF complexes identifies extensive roles in human malignancy. *Nat Genet* 2013 45:592–601
51. Kalamarides M, Stemmer-Rachamimov AO, Niwa-Kawakita M, Chareyre F, Taranchon E, Han ZY, Martinelli C, Lusi EA, Hegedus B, Gutmann DH, Giovannini M (2011) Identification of a progenitor cell of origin capable of generating diverse meningioma histological subtypes. *Oncogene* 30:2333–2344
52. Kelley M, Stevenson L, Golob M, Devanarayan V, Pedras-Vasconcelos J, Staack RF, Jenkins R, Booth B, Wakshull E, Bowsher R, Rock M, Dudal S, DeSilva B (2015) Workshop Report: AAPS Workshop on Method Development, Validation, and Troubleshooting of Ligand-Binding Assays in the Regulated Environment. *AAPS J* 17:1019–1024
53. Ketter R, Urbschat S, Henn W, Feiden W, Beerenwinkel N, Lengauer T, Steudel WI, Zang KD, Rahnenführer J (2007) Application of oncogenetic trees mixtures as a biostatistical model of the clonal cytogenetic evolution of meningiomas. *Int J Cancer* 121:1473–1480
54. Khalique S, Naidoo K, Attygalle AD, Kriplani D, Daley F, Lowe A, Campbell J, Jones T, Hubank M, Fenwick K, Matthews N, Rust AG, Lord CJ, Banerjee S, Natrajan R (2018) Optimised ARID1A immunohistochemistry is an accurate predictor of ARID1A mutational status in gynaecological cancers. *J Pathol Clin Res* 4:154–166
55. Khavari PA, Peterson CL, Tamkun JW, Mendel DB, Crabtree GR (1993) BRG1 contains a conserved domain of the SWI2/SNF2 family necessary for normal mitotic growth and transcription. *Nat* 1993 366:170–174
56. Knudson AG (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68:820–823
57. Knudson AG (1996) Hereditary cancer: two hits revisited. *J Cancer Res Clin Oncol* 122:135–140
58. Korhonen K, Salminen T, Raitanen J, Auvinen A, Isola J, Haapasalo H (2006) Female predominance in meningiomas can not be explained by differences in progesterone, estrogen, or androgen receptor expression. *J Neuro-Oncology* 2006 80:1–7
59. Kyte J, Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157:105–132
60. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
61. Lequin RM (2005) Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chem* 51:2415–2418
62. Linsler S, Kraemer D, Driess C, Oertel J, Kammers K, Rahnenführer J, Ketter R, Urbschat S (2014) Molecular Biological Determinations of Meningioma Progression and Recurrence. *PLoS One* 9:e94987
63. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, editors (2016) WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. 4th edition. International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon
64. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, Hawkins C, Ng HK, Pfister SM, Reifenberger G, Soffietti R, Von Deimling A, Ellison DW (2021) The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol* 23:1231–

- 1251
65. Luchini C, Veronese N, Solmi M, Cho H, Kim JH, Chou A, Gill AJ, Faraj SF, Chaux A, Netto GJ, Nakayama K, Kyo S, Lee SY, Kim DW, Yousef GM, Scorilas A, Nelson GS, Köbel M, Kalloger SE, Schaeffer DF, Yan HB, Liu F, Yokoyama Y, Zhang X, Pang D, Lichner Z, Sergi G, Manzato E, Capelli P, Wood LD, Scarpa A, Correll CU (2015) Prognostic role and implications of mutation status of tumor suppressor gene ARID1A in cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 6:39088
66. Madeira F, Pearce M, Tivey ARN, Basutkar P, Lee J, Edbali O, Madhusoodanan N, Kolesnikov A, Lopez R (2022) Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. *Nucleic Acids Res* 50: gkac240–gkac240
67. Maiuri F, Mariniello G, Guadagno E, Barbato M, Corvino S, Del Basso De Caro M (2019) WHO grade, proliferation index, and progesterone receptor expression are different according to the location of meningioma. *Acta Neurochir (Wien)* 161:2553–2561
68. Mandal J, Mandal P, Wang T-L, Shih I-M (2022) Treating ARID1A mutated cancers by harnessing synthetic lethality and DNA damage response. *J Biomed Sci* 2022 291 29:1–15
69. Mashtalir N, D’Avino A, Michel B, Luo J, Pan J, Otto J, Zullo H, McKenzie Z, Kubiak R, St Pierre R, Valencia A, Poynter S, Cassel S, Ranish J, Kadoch C (2018) Modular Organization and Assembly of SWI/SNF Family Chromatin Remodeling Complexes. *Cell* 175:1272–1288.e20
70. Mathur R, Alver BH, San Roman AK, Wilson BG, Wang X, Agoston AT, Park PJ, Shivdasani RA, Roberts CWM (2016) ARID1A loss impairs enhancer-mediated gene regulation and drives colon cancer in mice. *Nat Genet* 2016 492 49:296–302
71. Mathur R (2018) ARID1A loss in cancer: Towards a mechanistic understanding. *Pharmacol Ther* 190:15–23
72. McCabe A, Dolled-Filhart M, Camp RL, Rimm DL (2005) Automated Quantitative Analysis (AQUA) of In Situ Protein Expression, Antibody Concentration, and Prognosis. *JNCI J Natl Cancer Inst* 97:1808–1815
73. Minic R, Zivkovic I (2020) Optimization, Validation and Standardization of ELISA. *Norovirus*
74. Mirian C, Duun-Henriksen AK, Juratli T, Sahm F, Spiegl-Kreinecker S, Peyre M, Biczok A, Tonn JC, Goutagny S, Bertero L, Maier AD, Møller Pedersen M, Law I, Broholm H, Cahill DP, Brastianos P, Poulsen L, Fugleholm K, Ziebell M, Munch T, Mathiesen T (2020) Poor prognosis associated with TERT gene alterations in meningioma is independent of the WHO classification: an individual patient data meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 91:378–387
75. Mittal P, Roberts CWM (2020) The SWI/SNF complex in cancer — biology, biomarkers and therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2020 177 17:435–448
76. Nagl NG, Wang X, Patsialou A, Van Scoy M, Moran E (2007) Distinct mammalian SWI/SNF chromatin remodeling complexes with opposing roles in cell-cycle control. *EMBO J* 26:752–763
77. Nakasu S, Hirano A, Shimura T, Llena JF (1987) Incidental meningiomas in autopsy study. *Surg Neurol* 27:319–322
78. Nanda A, Bir SC, Maiti TK, Konar SK, Missios S, Guthikonda B (2017) Relevance of Simpson grading system and recurrence-free survival after surgery for World Health Organization Grade I meningioma. *J Neurosurg* 126:201–211
79. Natarajan S, Remick DG (2008) The ELISA Standard Save: Calculation of sample concentrations in assays with a failed standard curve. *J Immunol Methods* 336:242–245
80. Neigeborn L, Carlson M (1984) Genes affecting the regulation of SUC2 gene expression by glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 108:845–858
81. Nowak J, Watala C, Boncler M (2014) Antibody binding, platelet adhesion, and protein adsorption on various polymer surfaces. *Blood Coagul Fibrinolysis* 25:52–60
82. Ohnishi YI, Iwatsuki K, Morii E, Kobayashi M, Hori Y, Moriwaki T, Ishihara M, Yoshimura K, Umegaki M, Yoshimine T (2011) Histopathological study of spinal meningioma originating from the arachnoid villi. *Brain Tumor Pathol* 28:77–81
83. Ostrom QT, Price M, Neff C, Cioffi G, Waite KA, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS (2023) CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2016-2020. *Neuro Oncol* 25:iv1–iv99

84. Pascal JM (2018) The comings and goings of PARP-1 in response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)* 71:177
85. Patsialou A, Wilsker D, Moran E (2005) DNA-binding properties of ARID family proteins. *Nucleic Acids Res* 33:66
86. Paysan-Lafosse T, Blum M, Chuguransky S, Grego T, Pinto BL, Salazar GA, Bileschi ML, Bork P, Bridge A, Colwell L, Gough J, Haft DH, Letunić I, Marchler-Bauer A, Mi H, Natale DA, Orengo CA, Pandurangan AP, Rivoire C, Sigrist CJA, Sillitoe I, Thanki N, Thomas PD, Tosatto SCE, Wu CH, Bateman A (2023) InterPro in 2022. *Nucleic Acids Res* 51:
87. Pemov A, Dewan R, Hansen NF, Chandrasekharappa SC, Ray-Chaudhury A, Jones K, Luo W, Heiss JD, Mullikin JC, Chittiboina P, Stewart DR, Asthagiri AR (2020) Comparative clinical and genomic analysis of neurofibromatosis type 2-associated cranial and spinal meningiomas. *Sci Reports* 2020 10:1–10
88. Pérez-Magán E, De Lope ÁR, Ribalta T, Ruano Y, Campos-Martín Y, Pérez-Bautista G, García JF, García-Claver A, Fiaño C, Hernández-Moneo JL, Mollejo M, Meléndez B (2010) Differential expression profiling analyses identifies downregulation of 1p, 6q, and 14q genes and overexpression of 6p histone cluster 1 genes as markers of recurrence in meningiomas. *Neuro Oncol* 12:1278–1290
89. Pettrilli AM, Fernández-Valle C (2015) Role of Merlin/NF2 inactivation in tumor biology. *Oncogene* 2016 355 35:537–548
90. Prabhu VC, Melian E, Germanwala A V., Solanki AA, Borys E, Barton K, Anderson DE (2018) Cranial Base Meningiomas. *World Neurosurg* 109:258–262
91. Raab JR, Resnick S, Magnuson T (2015) Genome-Wide Transcriptional Regulation Mediated by Biochemically Distinct SWI/SNF Complexes The SWI/SNF chromatin remodeling complex is made of multiple subunits, and the inclusion of different mutually exclusive subunits allows potentially many biochemically.
92. Raab JR, Resnick S, Magnuson T (2015) Genome-Wide Transcriptional Regulation Mediated by Biochemically Distinct SWI/SNF Complexes. *PLOS Genet* 11:e1005748
93. Rodgers KJ, Dean RT (2003) Assessment of proteasome activity in cell lysates and tissue homogenates using peptide substrates. *Int J Biochem Cell Biol* 35:716–727
94. Rogers L, Barani I, Chamberlain M, Kaley TJ, McDermott M, Raizer J, Schiff D, Weber DC, Wen PY, Vogelbaum MA (2015) Meningiomas: knowledge base, treatment outcomes, and uncertainties. A RANO review. *J Neurosurg* 122:4–23
95. Rouleau GA, Merel P, Lutchman M, Sanson M, Zucman J, Marineau C, Hoang-Xuan K, Demczuk S, Desmaze C, Plougastel B, Pulst SM, Lenoir G, Bijlsma E, Fashold R, Dumanski J, Jong P De, Parry D, Eldrige R, Aurias A, Delattre O, Thomas G (1993) Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neuro-fibromatosis type 2. *Nat* 1993 3636429 363:515–521
96. Ryland GL, Doyle MA, Goode D, Boyle SE, Choong DYH, Rowley SM, Li J, Bowtell DD, Tothill RW, Campbell IG, Gorringer KL (2015) Loss of heterozygosity: what is it good for? *BMC Med Genomics* 8:
97. Sadetzki S, Chetrit A, Freedman L, Stovall M, Modan B, Novikov I (2005) Long-Term Follow-up for Brain Tumor Development after Childhood Exposure to Ionizing Radiation for Tinea Capitis. <https://doi.org/10.1667/RR3329> 163:424–432
98. Sahm F, Schrimpf D, Stichel D, Jones DTW, Hielscher T, Schefzyk S, Okonechnikov K, Koelsche C, Reuss DE, Capper D, Sturm D, Wirsching HG, Berghoff AS, Baumgarten P, Kratz A, Huang K, Wefers AK, Hovestadt V, Sill M, Ellis HP, Kurian KM, Okuducu AF, Jungk C, Drueschler K, Schick M, Bewerunge-Hudler M, Mawrin C, Seiz-Rosenhagen M, Ketter R, Simon M, Westphal M, Lamszus K, Becker A, Koch A, Schittenhelm J, Rushing EJ, Collins VP, Brehmer S, Chavez L, Platten M, Hänggi D, Unterberg A, Paulus W, Wick W, Pfister SM, Mittelbronn M, Preusser M, Herold-Mende C, Weller M, von Deimling A (2017) DNA methylation-based classification and grading system for meningioma: a multicentre, retrospective analysis. *Lancet Oncol* 18:682–694
99. Sandhya S, Maulik A, Giri M, Singh M (2018) Domain architecture of BAF250a reveals the ARID and ARM-repeat domains with implication in function and assembly of the BAF remodeling complex. *PLoS One* 13:e0205267
100. Santen GWE, Aten E, Sun Y, Almomani R, Gilissen C, Nielsen M, Kant SG, Snoeck IN,

- Peeters EAJ, Hilhorst-Hofstee Y, Wessels MW, Den Hollander NS, Ruivenkamp CAL, Van Ommen GJB, Breuning MH, Den Dunnen JT, Van Haeringen A, Kriek M (2012) Mutations in SWI/SNF chromatin remodeling complex gene ARID1B cause Coffin-Siris syndrome. *Nat Genet* 44:379–380
101. Sayers EW, Bolton EE, Brister JR, Canese K, Chan J, Comeau DC, Connor R, Funk K, Kelly C, Kim S, Madej T, Marchler-Bauer A, Lanczycki C, Lathrop S, Lu Z, Thibaud-Nissen F, Murphy T, Phan L, Skripchenko Y, Tse T, Wang J, Williams R, Trawick BW, Pruitt KD, Sherry ST (2022) Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Res* 50:D20–D26
 102. Shain AH, Giacomini CP, Matsukuma K, Karikari CA, Bashyam MD, Hidalgo M, Maitra A, Pollack JR (2012) Convergent structural alterations define SWItch/Sucrose NonFermentable (SWI/SNF) chromatin remodeler as a central tumor suppressive complex in pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:E252–E259
 103. Shain AH, Pollack JR (2013) The Spectrum of SWI/SNF Mutations, Ubiquitous in Human Cancers. *PLoS One* 8:e55119
 104. Shankar GM, Abedalthagafi M, Vaubel RA, Merrill PH, Nayyar N, Gill CM, Brewster R, Bi WL, Agarwalla PK, Thorner AR, Reardon DA, Al-Mefty O, Wen PY, Alexander BM, Van Hummelen P, Batchelor TT, Ligon KL, Ligon AH, Meyerson M, Dunn IF, Beroukheim R, Louis DN, Perry A, Carter SL, Giannini C, Curry WT, Cahill DP, Barker FG, Brastianos PK, Santagata S (2017) Germline and somatic BAP1 mutations in high-grade rhabdoid meningiomas. *Neuro Oncol* 19:535–545
 105. Shen J, Peng Y, Wei L, Zhang W, Yang L, Lan L, Kapoor P, Ju Z, Mo Q, Shih IM, Uray IP, Wu X, Brown PH, Shen X, Mills GB, Peng G (2015) ARID1A Deficiency Impairs the DNA Damage Checkpoint and Sensitizes Cells to PARP Inhibitors. *Cancer Discov* 5:752–767
 106. Shih KC, Chowdhary S, Rosenblatt P, Weir AB, Shepard GC, Williams JT, Shastri M, Burris HA, Hainsworth JD (2016) A phase II trial of bevacizumab and everolimus as treatment for patients with refractory, progressive intracranial meningioma. *J Neurooncol* 129:281–288
 107. Sievers P, Hielscher T, Schrimpf D, Stichel D, Reuss DE, Berghoff AS, Neidert MC, Wirsching HG, Mawrin C, Ketter R, Paulus W, Reifenberger G, Lamszus K, Westphal M, Etminan N, Ratliff M, Herold-Mende C, Pfister SM, Jones DTW, Weller M, Harter PN, Wick W, Preusser M, von Deimling A, Sahm F (2020) CDKN2A/B homozygous deletion is associated with early recurrence in meningiomas. *Acta Neuropathol* 140:409–413
 108. Sim JCH, White SM, Lockhart PJ (2015) ARID1B-mediated disorders: Mutations and possible mechanisms. *Intractable rare Dis Res* 4:17–23
 109. SIMPSON D (1957) The recurrence of intracranial meningiomas after surgical treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20:22–39
 110. Smith CL, Horowitz-Scherer R, Flanagan JF, Woodcock CL, Peterson CL (2003) Structural analysis of the yeast SWI/SNF chromatin remodeling complex. *Nat Struct Biol* 2003 102 10:141–145
 111. Smith MJ, Ahn S, Lee J Il, Bulman M, Plessis D du, Suh YL (2017) SMARCE1 mutation screening in classification of clear cell meningiomas. *Histopathology* 70:814–820
 112. Stern M, Jensen R, Herskowitz I (1984) Five SWI genes are required for expression of the HO gene in yeast. *J Mol Biol* 178:853–868
 113. Strojan P, Popović M, Jereb B (2000) Secondary intracranial meningiomas after high-dose cranial irradiation: Report of five cases and review of the literature. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 48:65–73
 114. Su K, Gao S, Ying J, Zou S, He J (2018) Sequencing a super multiple synchronous lung cancer reveals a novel variant in driver gene ARID1B. *J Thorac Cardiovasc Surg* 155:e185–e191
 115. Sundaramoorthy R, Owen-Hughes T (2020) Chromatin remodelling comes into focus. *F1000Research* 9:
 116. Tamkun JW, Dearing R, Scott MP, Kissinger M, Pattatucci AM, Kaufman TC, Kennison JA (1992) brahma: a regulator of Drosophila homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell* 68:561–572
 117. Tarcha PJ, Chu VP, Whittern D (1987) 2,3-Diaminophenazine is the product from the horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of o-phenylenediamine. *Anal Biochem* 165:230–233

118. Taylor CR, Levenson RM (2006) Quantification of immunohistochemistry - Issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. *Histopathology* 49:411–424
119. Trofatter JA, MacCollin MM, Rutter JL, Murrell JR, Duyao MP, Parry DM, Eldridge R, Kley N, Menon AG, Pulaski K, Haase VH, Ambrose CM, Munroe D, Bove C, Haines JL, Martuza RL, MacDonald ME, Seizinger BR, Short MP, Buckler AJ, Gusella JF (1993) A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Cell* 72:791–800
120. Tsuda M, Fukuda A, Kawai M, Araki O, Seno H (2021) The role of the SWI/SNF chromatin remodeling complex in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Sci* 112:490–497
121. Tweedie S, Braschi B, Gray K, Jones TEM, Seal RL, Yates B, Bruford EA (2021) Genenames.org: The HGNC and VGNC resources in 2021. *Nucleic Acids Res* 49:D939–D946
122. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (2018) Bioanalytical method validation guidance for industry. US Dep Heal Hum Serv Food Drug Adm 1–41
123. Urbschat S, Rahnenführer J, Henn W, Feiden W, Wemmert S, Linsler S, Zang KD, Oertel J, Ketter R (2011) Clonal cytogenetic progression within intratumorally heterogeneous meningiomas predicts tumor recurrence. *Int J Oncol* 39:1601–1608
124. Walker RA (2006) Quantification of immunohistochemistry - Issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment I. *Histopathology* 49:406–410
125. Wang LH, Wu CF, Rajasekaran N, Shin YK (2018) Loss of Tumor Suppressor Gene Function in Human Cancer: An Overview. *Cell Physiol Biochem* 51:2647–2693
126. Wang X, Nagl NG, Wilsker D, Van Scoy M, Pacchione S, Yaciuk P, Dallas PB, Moran E (2004) Two related ARID family proteins are alternative subunits of human SWI/SNF complexes. *Biochem J* 383:319–325
127. Wang Z, Chen K, Jia Y, Chuang J-C, Sun X, Lin Y-H, Celen C, Li L, Huang F, Liu X, Castrillon DH, Wang T, Zhu H (2020) Dual ARID1A/ARID1B loss leads to rapid carcinogenesis and disruptive redistribution of BAF complexes. *Nat cancer* 1:909
128. Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M, Barton GJ (2009) Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25:1189–1191
129. Waters DLE, Shapter FM (2014) The polymerase chain reaction (PCR): general methods. *Methods Mol Biol* 1099:65–75
130. Weber RG, Boström J, Wolter M, Baudis M, Collins VP, Reifenberger G, Lichter P (1997) Analysis of genomic alterations in benign, atypical, and anaplastic meningiomas: toward a genetic model of meningioma progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:14719–14724
131. WHO Classification of Tumours Editorial Board (2021) World Health Organization Classification of Tumours of the Central Nervous System. 5th edition. International Agency for Research on Cancer, Lyon (France)
132. Wiegand KC, Shah SP, Al-Agha OM, Zhao Y, Tse K, Zeng T, Senz J, McConechy MK, Anglesio MS, Kalloger SE, Yang W, Heravi-Moussavi A, Giuliany R, Chow C, Fee J, Zayed A, Prentice L, Melnyk N, Turashvili G, Delaney AD, Madore J, Yip S, McPherson AW, Ha G, Bell L, Fereday S, Tam A, Galletta L, Tonin PN, Provencher D, Miller D, Jones SJM, Moore RA, Morin GB, Oloumi A, Boyd N, Aparicio SA, Shih I-M, Mes-Masson A-M, Bowtell DD, Hirst M, Gilks B, Marra MA, Huntsman DG (2010) ARID1A Mutations in Endometriosis-Associated Ovarian Carcinomas. *N Engl J Med* 363:1532–1543
133. Williams EA, Santagata S, Wakimoto H, Shankar GM, Barker FG, Sharaf R, Reddy A, Spear P, Alexander BM, Ross JS, Brastianos PK, Cahill DP, Ramkissoon SH, Juratli TA (2020) Distinct genomic subclasses of high-grade/progressive meningiomas: NF2-associated, NF2-exclusive, and NF2-agnostic. *Acta Neuropathol Commun* 8:
134. Williams EA, Wakimoto H, Shankar GM, Barker FG, Brastianos PK, Santagata S, Sokol ES, Pavlick DC, Shah N, Reddy A, Venstrom JM, Alexander BM, Ross JS, Cahill DP, Ramkissoon SH, Juratli TA (2020) Frequent inactivating mutations of the PBAF complex gene PBRM1 in meningioma with papillary features. *Acta Neuropathol* 140:89–93
135. Williamson CT, Miller R, Pemberton HN, Jones SE, Campbell J, Konde A, Badham N, Rafiq R, Brough R, Gulati A, Ryan CJ, Francis J, Vermulen PB, Reynolds AR, Reaper PM, Pollard JR, Ashworth A, Lord CJ (2016) ATR inhibitors as a synthetic lethal therapy for tumours deficient in ARID1A. *Nat Commun* 2016 71 7:1–13

136. Wilson BG, Roberts CWM (2011) SWI/SNF nucleosome remodellers and cancer. *Nat Rev Cancer* 11:481–492
137. Wu J, Roberts C (2013) ARID1A mutations in cancer: another epigenetic tumor suppressor? *Cancer Discov* 3:35–43
138. Xu S, Tang C (2021) The Role of ARID1A in Tumors: Tumor Initiation or Tumor Suppression? *Front Oncol* 11:3891
139. Yan Z, Wang Z, Sharova L, Sharov AA, Ling C, Piao Y, Aiba K, Matoba R, Wang W, Ko MSH (2008) BAF250B-associated SWI/SNF chromatin-remodeling complex is required to maintain undifferentiated mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 26:1155–1165
140. Yang L, Yang G, Ding Y, Huang Y, Liu S, Zhou L, Wei W, Wang J, Hu G (2018) Combined treatment with PI3K inhibitor BKM120 and PARP inhibitor olaparib is effective in inhibiting the gastric cancer cells with ARID1A deficiency. *Oncol Rep* 40:479–487
141. Yoshimoto T, Matsubara D, Nakano T, Tamura T, Endo S, Sugiyama Y, Niki T (2015) Frequent loss of the expression of multiple subunits of the SWI/SNF complex in large cell carcinoma and pleomorphic carcinoma of the lung. *Pathol Int* 65:595–602
142. Zhang X, Sun Q, Shan M, Niu M, Liu T, Xia B, Liang X, Wei W, Sun S, Zhang Y, Liu XS, Song Q, Yang Y, Ma Y, Liu Y, Yang L, Ren Y, Zhang G, Pang D (2013) Promoter hypermethylation of ARID1A gene is responsible for its low mRNA expression in many invasive breast cancers. *PLoS One* 8:
143. Zhang X, Jia H, Lu Y, Dong C, Hou J, Wang Z, Wang F, Zhong H, Wang L, Wang K (2014) Exome Sequencing on Malignant Meningiomas Identified Mutations in Neurofibromatosis Type 2 (NF2) and Meningioma 1 (MN1) Genes. *Discov Med* 18:301
144. Zhao XS, Zhou J, Dong L, Zhang H, Ye YJ (2019) Durable response to olaparib in pancreatic duct adenocarcinoma with deleterious ARID1A mutation. *Chin Med J (Engl)* 132:3012–3014
145. Zhu G, Shi R, Li Y, Zhang Z, Xu S, Chen C, Cao P, Zhang H, Liu M, Pan Z, Liu H, Chen J (2021) ARID1A, ARID1B, and ARID2 Mutations Serve as Potential Biomarkers for Immune Checkpoint Blockade in Patients With Non-Small Cell Lung Cancer. *Front Immunol* 12:
146. Zhu Y, Yan C, Wang X, Xu Z, Lv J, Xu X, Yu W, Zhou M, Yue L (2022) Pan-cancer analysis of ARID family members as novel biomarkers for immune checkpoint inhibitor therapy. *Cancer Biol Ther* 23:104–111
147. Phase II Trial of Pembrolizumab in Recurrent or Residual High Grade Meningioma - Full Text View - ClinicalTrials.gov. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03279692>
148. Immune Checkpoint Inhibitor Nivolumab in People With Recurrent Select Rare CNS Cancers - Full Text View - ClinicalTrials.gov. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03173950>
149. Phase II Study of Tazemetostat in Solid Tumors Harboring an ARID1A Mutation - Full Text View - ClinicalTrials.gov. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05023655>
150. Nivolumab for the Treatment of Metastatic or Unresectable Solid Tumors With ARID1A Mutation and CXCL13 Expression - Full Text View - ClinicalTrials.gov. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04957615>

8 Anhang

8.1 Materialienliste

Lösung, Chemikalie	Artikelnummer, Firma
Amersham ECL Hyperfilms	28-9068-37, VWR, Darmstadt, Germany
Amersham™ ECL Select™ Western blotting detection reagent	RPN2235, VWR, Germany
AnykD-SDS-PAGE gels TRIS-glycine buffer system	4569033, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Bromophenolblau	ACRO403150250, VWR, Germany
β-Mercaptoethanol	A1108,0100, PanReac by AppliChem, Darmstadt, Germany
Coverplates	Shandon Coverplate, 72110017, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
DAB Puffer, DAB Substrat	Dako REAL EnVision Detection System, K5007, Agilent/ Dako, Santa Clara, CA, USA
Dako REAL Antibody Diluent	S2011, Agilent/ Dako, USA
Deckgläser	Glasdicke 0,13 – 0,16 mm, R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Germany
Destaining solution (Entfärbelösung)	3037.01, SERVA, Heidelberg, Germany
Entellan	Merck, Darmstadt, Germany
Ethanol (99 %)	K928.4, Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Filterpapier/ Whatman Gel Blot Paper	GB003, 10426892, GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK
Filterspitzen in 10, 100, 200, 1000 µl Fassungsvermögen	
FlashGel DNA Kassette, 1.2 % Agarose, 16+1, zweizeilig	857029, Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Germany
Glasobjektträger	SuperFrost Plus, 030060, R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Germany
Glycin	3790.2, Carl Roth, Germany
Größenmarker DNA-Gelelektrophorese (Flash Gel)	FlashGel™DNA marker 50 bp –1.5 kB, 57033, Lonza Rockland, Rockland, ME, USA
Größenmarker DNA-Gelelektrophorese (Spreadex-Gel)	GelPilot 100 bp Ladder (100), Qiagen, Hilden, Germany
Größenmarker Elektrophorese Western blot	161-0394, Bio-Rad Laboratories, USA
HotStarTaq Master Mix	203445, Qiagen, Germany
H ₂ SO ₄ Schwefelsäure	258105, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
LDS Sample Buffer (4x)	NP0007, Thermo Fisher Scientific, USA
Mayer's Hämalunlösung	Merck, Germany
Methanol	Merck, Germany
Mikroreaktionsgefäße in 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml und 5 ml Volumen	
Na ₂ CO ₃	106386, Merck, Germany
NaHCO ₃	106323, Merck, Germany
Nitrocellulosemembran, 0,2 µm	1620112, Bio-Rad Laboratories, USA
NUNC MaxiSorp	750-0083, VWR, Germany
OPD (o-Phenylendiamin)	34006, Thermo Fisher Scientific, USA
Paraplast Plus	502004, McCormicks Scientific, St. Louis, USA
Phosphate-buffered saline pH 7,4 (PBS)	A9177.0100, VWR, Germany
Pierce bicinchoninic acid (BCA) assay kit	23225, Thermo Fisher Scientific, USA
Precellys Ceramic tubes	10144-496, VWR, Germany

Probenpuffer LOH	Sample Loading Buffer (5x), 30 34, abc biopply, Solothurn, Switzerland
RNase-free Water	129112, Qiagen, Germany
Röntgen-Fixierlösung	65282194, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Germany
Röntgen-Entwicklungslösung	65282259, Heraeus Kulzer, Germany
Salzsäure 25 %	X897.2, Carl Roth, Germany
Spreadex EL 800 Wide Mini S-2x25	191002, AL-Diagnostic, Amstetten, Austria
Stable Peroxide Substrate Buffer	34062, Thermo Fisher Scientific, USA
Subcellular Protein Fractionation Kit for Tissues	87790, Thermo Fisher Scientific, USA
SYBR Gold nucleic acid gel stain	S11494, Thermo Fischer Scientific, USA
TAE-Puffer	42548.01, SERVA, Germany
Target Retrieval Solution, pH 6,1	S1699, Agilent/ Dako, Santa Clara, USA
Trichloressigsäure	1.00807.1000, Merck, Germany
Trispuffer, TRIZMA Base	T1503, Sigma-Aldrich, USA
Tropix I-Block/ Casein	I-Block, T2015, Thermo Fisher Scientific, USA
Tween-20, Polysorbatum 20	43316534, Caesar & Loretz, Hilden, Germany
Wasserstoffperoxid	Otto Fischar, Saarbrücken, Germany
Xylol	Otto Fischar, Germany
Zentrifugenröhrchen in 10 ml und 15 ml Volumen	

Tabelle 17. Materialienliste.

8.2 Puffer und Lösungen

BSA 5 % in TBS

- Pro 100 ml Aqua dest. 5 g BSA (5 %), 20 mg (NaN₃) (0,2 mg/ml), 1,21 g TRIS pH 7,8 (100 mM) und 0,87 g NaCl (150mM) abwiegen und unter Rühren bei 50 °C lösen

Coating Puffer – Carbonat Puffer 50 mmol/l pH 9,0

- 0,37 g Na₂CO₃ und 0,75 g NaHCO₃ in 250 ml Aqua dest. lösen
- Einstellung des pH-Wertes mit Hilfe des pH-Meters

Casein 0,2 % PBST 0,0 5% – Blocking Puffer

- Eine Tablette PBS pH 7,4 (A9177.0100, VWR) wird unter ständigem Rühren in 200 ml Aqua dest. gelöst
- 400 mg I-Block (Casein) dazu und unter Rühren bei 50 °C lösen
- Pro 200 ml werden 100 µl (0,05 %) Tween-20 pipettiert

H₂SO₄ 2,5m

- 1404 µl H₂SO₄ (Reinheit: 95-98 %) werden mit Aqua dest. auf 10 ml aufgefüllt

Hot-Star MasterMix (12 Ansätze)

- 150 µl Hot-Star-Taq Master Mix (2X)
- 122,4 µl RNase-freies Wasser

3X Laemmli-Probenpuffer

- 150 mM Tris, 30 % glycin (v/v), 15 % β-mercaptoethanol (v/v), 0,03 % Bromphenolblau (w/v), 6 % SDS (w/v), pH 6,8

Laufpuffer

- 25 mM Tris, 192 mM glycin, 1 % SDS (w/v), pH 8,4

OPD (5mg/10ml)

- 9 ml Aqua dest. mit 1 ml Stable Peroxide Substrate Buffer (Thermo Scientific) mischen
- 1 Tablette (5 mg) OPD (O-phenylenediamin dihydrochlorid) dazu

PBS (pH 7,4)

- Eine Tablette PBS pH 7,4 (VWR) wird unter ständigem Rühren in 200 ml Aqua dest. gelöst

PBST 0,1 %

- Eine Tablette PBS pH 7,4 (VWR) wird unter ständigem Rühren in 200 ml Aqua dest. gelöst

- Anschließend 200 µl (0,1 %) Tween-20 dazu pipettieren

10x TBST

- 50 ml 1M Tris HCl, pH 7,8 mit 100 ml 5M NaCl
- 2,5 ml 100 % Tween 20 und auffüllen der Lösung auf 500 ml mit Aqua dest.

Inhalte des „Subcellular Protein Fractionation Kit for Tissues“ (Thermo Fisher Scientific)

- Cytoplasmic Extraction Buffer (CEB) for Tissues
- Membrane Extraction Buffer (MEB) for Tissues
- Nuclear Extraction Buffer (NEB) for Tissues
- Micrococcal Nuclease (MNase), ≥ 100 units/µl
- Calcium Chloride (CaCl₂), 100 mM
- Halt Protease Inhibitor Cocktail, 100X
- Pierce Tissue strainer, 250 µm

8.3 Geräte und Software

Gerät	Firma, Artikelnummer
Dampfgarer	HD9140/91, Koninklijke Philips N.V, Amsterdam, Netherlands
Durchlichtmikroskop	BH-2, Olympus, Japan
Einbettautomat	68910051, Shandon, Runcorn, UK
Elektrophoresekammer Western blot	Mini-Protean Tetra System, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
EOS Utility 2	Canon Inc., Tokio, Japan
Externe Lichtquelle für IHC	LED-DC Regelnetzgerät, BW-Optik, Aschendorf, Germany
FlashGel Camera Pack, FlashGel Doc + Kamera	857065, Biozym Scientific
FLUOstar Omega Microplate Reader	BMG LABTECH, Ortenberg, Germany
GraphPad Prism (version 10.2.0 for Mac)	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
Kühlplatte „Blue Cooler“	RWW Medizintechnik, Hallerndorf, Germany
Laufkammer LOH	Elchrom Scientific AG, Zug, Switzerland
Leica Application Suite (LAS) Version 3.8	Leica Microsystems, Wetzlar, Germany
Manual Mikrotom RM2035	12190861, Leica Microsystems, Germany
MARS Data Analysis Software	BMG LABTECH, Ortenberg, Germany
Mastercycler MC nexus X2	6337FR013445, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH
Microsoft Excel 2021	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Minilys Homogenisator	432-0274, VWR, Germany
pH-Meter	pH 1100 L, VWR, Germany
Präzisionswaage	ENTRIS6202-1S, Sartorius Corporate Administration GmbH, Göttingen, Germany
Schüttler	Duomax 1030, Heidolph Instruments
ThermoMixer C	Katalog-Nr. 5382000015, Eppendorf AG, Hamburg, Germany
UV-Licht-Kammer	DIAS-III, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany
Wärmeschrank 56 °C	T 6, Heraeus Instruments, Hanau, Germany
Wärmeschrank 80 °C	T 12, Heraeus Instruments, Germany
Wet Blot	Mini-Protean Tetra System, Bio-Rad Laboratories, USA
Zentrifuge Eppendorf, ungekühlt	Centrifuge MiniSpin, Katalog-Nr. 5452000010, Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Zentrifuge	Hettich 8S

Tabelle 18. Geräte und Software.

8.4 Supplementäre Bilder

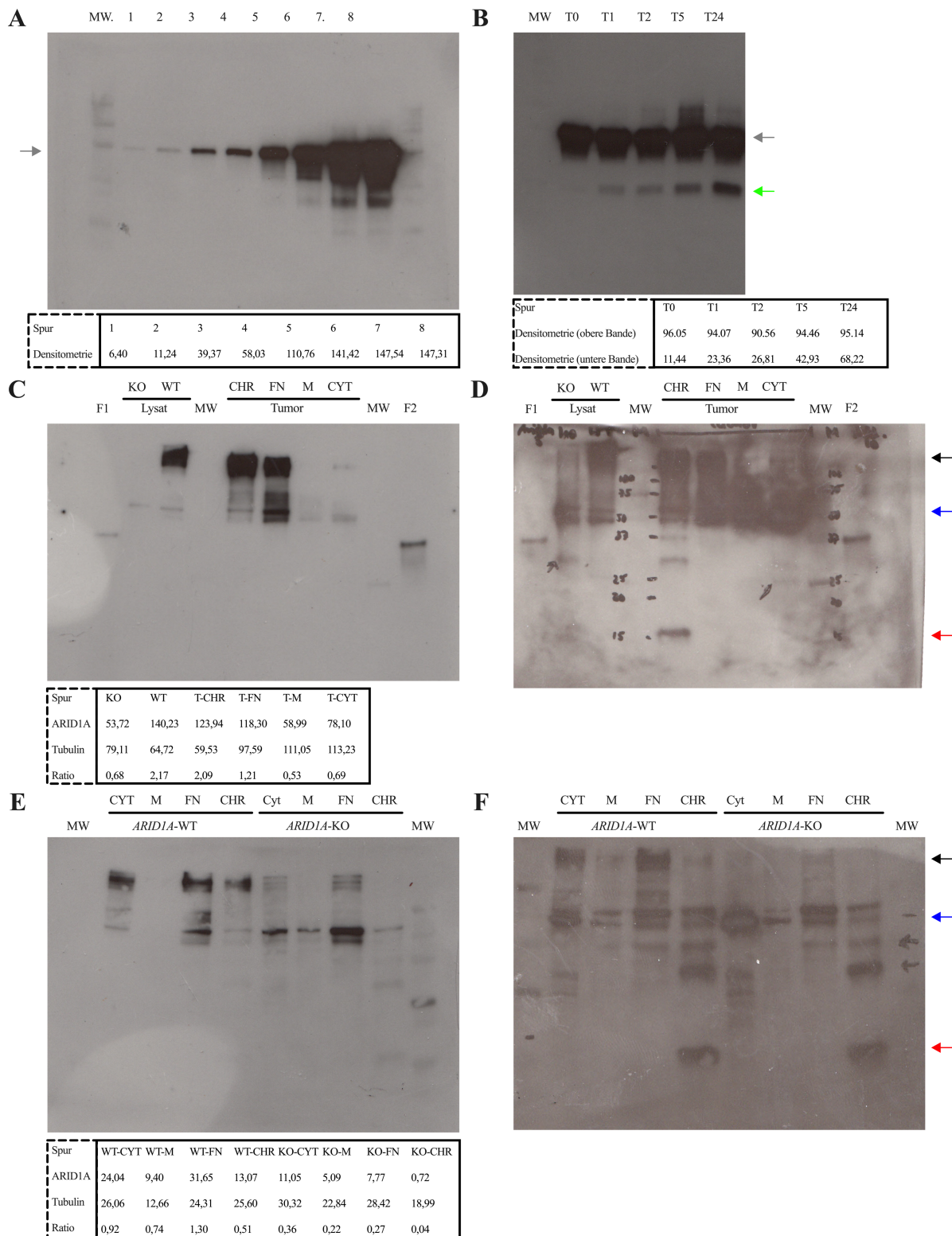


Abbildung 28. Originale, nicht beschnittene und nicht angepasste Western blot Membranen mit Densitometermesswerten/Intensitätsverhältnis jeder Bande.

Legende: Die Western blot Analyse wurde wie in 4.5 beschrieben durchgeführt. Ein Molekulargewichtsmarker (MW) wurde verwendet, um die resultierenden Bandenhöhen zu schätzen. Die densitometrische Analyse wurde mit ImageJ durchgeführt, und die Daten sind in der Tabelle unter jedem Bild aufgeführt

[24]; (A) Originalbild der in Abbildung 10B gezeigten Membran. Die densitometrische Analyse wurde bei etwa 37 kDa (grauer Pfeil) durchgeführt, wo das ARID1A-Fragment (37,84 kDa) erwartet wird. Es ist eine sigmoidale Kurve zu erwarten, da die Spuren 1-8 zunehmende ARID1A-Mengen enthalten, wie in Abbildung 10B gezeigt. (B) Originalbild der in Abbildung 13C gezeigten Membran. Die densitometrische Analyse wurde bei etwa 37 kDa (grauer Pfeil) und 18 kDa (grüner Pfeil) durchgeführt. Die Inkubation des ARID1A-Fragments für 0 h, 1 h, 2 h, 5 h und 24 h bei 4 °C ist durch T0, T1, T2, T5 bzw. T24 gekennzeichnet; (C) Originalbild der in Abbildung 11D (linke Seite dieses Bildes) und Abbildung 10C (rechte Seite dieses Bildes) gezeigten Membran. Für die Analyse von *ARID1A*-Knockout (KO) und Wildtyp (WT) wurde ab257250 (Abcam, UK) verwendet. F1 ist ein ARID1A-Fragment, das auf eine Konzentration von 5 ng/ml verdünnt wurde, während F2 10 ng/ml beherbergt. In diesem Bild wurde nur ab182560 als primärer Antikörper verwendet; (D) Membran wie in (C), allerdings alpha-Tubulin Nachweis für Densitometrie ergänzt. Die Densitometrie-Analyse wurde bei etwa 242 kDa (schwarzer Pfeil), wo ARID1A in voller Länge erwartet wird, und 50 kDa (blauer Pfeil), wo alpha-Tubulin erwartet wird, durchgeführt. Als primäre Antikörper wurden ab182560 (Abcam, UK) gegen ARID1A und ab7291 (Abcam, UK) gegen alpha-Tubulin verwendet. Das Intensitätsverhältnis wurde durch die densitometrische Analyse von ARID1A dividiert durch die densitometrische Analyse von alpha-Tubulin berechnet; (E) Originalbild der in Abbildung 11B und Abbildung 11F gezeigten Membran. Für die Analyse von *ARID1A*-Knockout (KO) und Wildtyp (WT) wurde ab278824 verwendet. In diesem Bild wurde nur ab182560 als primärer Antikörper verwendet. Eine Bande bei fast 16,8 kDa im Vergleich zu einem Molekulargewichtsmarker (rechte Spur), die dem vorhergesagten Gewicht von MNase entspricht, ist nur in den Chromatinfractionen vorhanden und auch in (D) und (F) zu sehen (roter Pfeil); (F) Wie oben in (D) beschrieben, wurden auf dieser Membran im Gegensatz zu (E) primäre Antikörper gegen ARID1A sowie alpha-Tubulin verwendet, um eine densitometrische Analyse durchzuführen.

8.5 Probenmaterial/Ergebnistabellen

	1		2		3		4		5	
R ²	0,989		0,999		0,994		0,992		0,994	
Modell	5PL (1/Y ²); Top = 3,5		5PL (1/Y ²); Top = 3,5		5PL (1/Y ²); Top = frei		5PL (1/Y ²); Top = 3,5		5PL (1/Y ²); Top = 3,5	
50	3,089	3,137	3,388	k.A.	3,252	k.A.	3,328	3,198	3,234	3,237
25	1,724	1,855	1,576	1,703	2,554	2,545	2,404	2,379	2,264	2,334
12,5	0,868	0,822	0,712	0,731	0,97	1,023	0,858	0,833	0,838	0,813
6,25	0,221	0,227	0,251	0,247	0,338	0,325	0,299	0,275	0,304	0,274
3,13	0,114	0,109	0,108	0,089	0,163	0,162	0,147	0,144	0,153	0,141
1,56	0,045	0,04	0,039	0,029	0,069	0,053	0,063	0,049	0,045	0,044
0,78	0,012	0,011	k.A.	0,009	0,012	0,012	0,016	0,012	0,008	0,005
0,39	0,004	0,003	k.A.	k.A.	0,006	0,006	0,005	0,009	0,002	0,002

Tabelle 19. Standards 1-5.

Legende: Angegeben sind die Blank-korrigierten Einzelmesswerte in der Einheit der optischen Dichte (OD) der Standards des ARID1A-Fragments (Abnova). Die Messung erfolgt in Duplikaten. Die Konzentrationen der Standards sind in der ersten Spalte angegeben, wobei der Übersicht halber in der Tabelle auf die Angabe der Konzentrationseinheit verzichtet wird: 50 ng/ml, 25 ng/ml, 12,5 ng/ml, 6,25 ng/ml, 3,13 ng/ml, 1,56 ng/ml, 0,78 ng/ml, 0,39 ng/ml. Der R²-Wert wird für das EP-Modell angegeben. Das Modell beschreibt die angewendete Berechnungsmethode im EP-Modell, wobei immer eine 5-paramater logistic (5PL) zur Anwendung kommt. Näheres kann Kapitel 4.3.5 entnommen werden. Werte außerhalb der Messspanne werden mit „k.A.“ angegeben.

	6		7		8		9		10		11	
R²	0,985		0,999		0,996		0,992		0,994		0,995	
Modell	5PL (1/Y ²); Top = frei		5PL (1/Y ²); Top = frei		5PL (1/Y ²); Top = frei		5PL (1/Y ²); Top = frei		5PL (1/Y ²); Top = frei		5PL (1/Y ²); Top = frei	
50							3,342	3,303	3,233	3,174	3,256	3,272
25	1,942	2,079	2,008	2,063	1,991	2,011	2,38	2,459	2,255	2,242	2,318	2,069
15	1,308	1,152	1,158	1,128	1,186	1,081	1,316	1,345	1,144	1,177	1,135	1,097
9	0,636	0,616	0,585	0,603	0,569	0,487	0,484	0,571	0,472	0,422	0,467	0,444
5,4	0,23	0,239	0,261	0,255	0,236	0,201	0,234	0,244	0,212	0,218	0,216	0,19
2,7	0,082	0,079	0,075	0,091	0,088	0,082	0,112	0,115	0,093	0,096	0,099	0,087
1,62	0,042	0,031	0,04	0,033	0,04	0,037	0,034	0,036	0,034	0,036	0,035	0,031
0,81	0,015	k.A.	0,013	0,01	0,011	0,009	0,015	0,014	0,011	0,018	0,013	0,011
0,405	0,003	k.A.	0,004	0,002	0,004	0,01						

Tabelle 20. Standards 6-11.

Legende: Angegeben sind die Blank-korrigierten Einzelmesswerte in der Einheit der optischen Dichte (OD) der Standards des ARID1A-Fragments (Abnova). Die Messung erfolgt in Duplikaten. Die Konzentrationen der Standards sind in der ersten Spalte angegeben, wobei der Übersicht halber in der Tabelle auf die Angabe der Konzentrationseinheit verzichtet wird: 50 ng/ml, 25 ng/ml, 15 ng/ml, 9 ng/ml, 5,4 ng/ml, 2,7 ng/ml, 1,62 ng/ml, 0,81 ng/ml, 0,405 ng/ml. Der R²-Wert wird für das EP-Modell angegeben. Das Modell beschreibt die angewendete Berechnungsmethode im EP-Modell, wobei immer eine 5-paramater logistic (5PL) zur Anwendung kommt. Näheres kann Kapitel 4.3.5 entnommen werden. Es wurde versucht möglichst viele unterschiedliche Standards zu testen, sodass die Robustheit des AE-Modells steigt. Werte außerhalb der Messspanne werden mit „k.A.“ angegeben. Leere Felder bedeuten, dass in diesem Versuch keine Standards in dieser Konzentration analysiert wurden.

Nr.	Zytosol (ng/ml)	Membran (ng/ml)	Frei nukleär (ng/ml)	Chromatin (ng/ml)	Bemerkung
1	3,56	0,938	9,81	4,841	G
	2,692		10,636	3,114	
	2,489		10,085	3,06	
	2,827		11,162	3,362	
	2,026		7,357	3,06	
2	0,473	1,835	0,415	3,41	G
			k.A.	2,666	
3	2,977	2,456	9,772	2,998	A
	2,678	3,511	8,055	2,631	
5	1,557	k.A.	1,182	0,828	A
	1,343	0,852	1,225	1,92	
8	2,896	1,377	8,805	4,689	G
	2,571	1,377	10,711	4,155	
10	2,289	2,229	1,765	2,41	G
				2,375	
17	1,193	k.A.	1,506	3,104	G
			1,095	2,655	
22	1,477	k.A.	0,623	1,448	G
	1,394		0,623	1,448	
32	1,821	k.A.	4,524	3,038	A
	1,904	k.A.	2,279	2,518	
33	0,293	k.A.	0,773	1,535	G
	0,511		0,511		

37	2,13	0,976	11,855	7,218	G
	1,669		11,248	5,602	
	1,641		11,47	5,474	
	1,566		11,941	5,62	
	1,723		8,771	4,979	
39	1,599	k.A.	k.A.	3,463	G
	0,717		0,431	1,733	
	0,527		k.A.	3,342	
40	2,404	1,006	11,112	5,234	G
	1,854		7,837	4,127	
	1,842		8,247	4,073	
	1,866		8,668	4,292	
	2,026		7,136	3,711	
44	2,193	2,624	10,892	3,954	G
	1,848	2,624	12,812	3,862	
45	1,778	0,972	7,749	2,74	G
	1,778	0,972	7,749	3,557	
46	2,064	1,031	9,176	6,659	G
	2,298	1,031	9,328	6,137	
48	0,876	k.A.	0,405	2,499	G
			k.A.	2,114	
50	1,775	k.A.	6,778	3,043	G
	k.A.	k.A.	7,319		
	2,346	1,028	10,606	2,82	
51	2,41	1,057	7,378	4,702	A
	1,258	k.A.	2,49	2,699	
55	1,365	k.A.	1,292	2,766	G
	1,365		0,723	2,8	
56	2,022	0,484	6,527	5,519	A
	2,728	1,496	8,526	4,222	
61	1,642	k.A.	8,356	3,815	G
			8,303	4,137	
X1	3,951	3,335	14,062	9,864	G
	3,289		23,151	6,572	

Tabelle 21. Validierung ELISA.

Legende: „G“ = Gleiches Lysat; „A“ = Anderes Lysat; „X1“ = Tumor, der nicht in die Patientenko-horte aufgenommen wurde, aber in der Validierung mitanalysiert wurde. Werte außerhalb der Mess-spanne werden mit „k.A.“ angegeben. Leere Felder bedeuten, dass in diesem Versuch keine Standards in dieser Konzentration analysiert wurden.

Nr.	Zytosol (ng/ml)	Membran (ng/ml)	Frei nukleär (ng/ml)	Chromatin (ng/ml)	Kern (ng/ml)	Gesamt (ng/ml)
1	3,56	0,938	9,81	4,841	14,651	19,149
2	0,473	1,835	k.A.	2,666	2,666	4,974
3	2,977	2,456	9,772	2,998	12,77	18,203
4	1,054	1	2,893	2,117	5,01	7,064
5	1,557	k.A.	1,182	0,828	2,01	3,567
6	2,532	1,238	7,259	5,289	12,548	16,318
7	0,926	k.A.	0,628	1,995	2,623	3,549
8	2,571	1,377	10,711	4,155	14,866	18,814
9	1,825	k.A.	1,941	1,81	3,751	5,576
10	2,289	2,229	1,765	2,375	4,14	8,658

Anhang

11	1,838	2,559	11,862	2,94	14,802	19,199
12	2,104	1,567	5,194	2,103	7,297	10,968
13	1,738	1,028	2,729	2,813	5,542	8,308
14	1,33	k.A.	2,779	2,826	5,605	6,935
15	1,282	k.A.	1,787	2,224	4,011	5,293
16	2,73	0,483	2,113	2,747	4,86	8,073
17	1,193	k.A.	1,506	3,104	4,61	5,803
18	2,261	1,955	9,494	2,794	12,288	16,504
19	1,602	1,308	5,209	3,282	8,491	11,401
20	1,21	0,53	2,795	3,497	6,292	8,032
21	2,712	2,347	7,475	3,673	11,148	16,207
22	2,208	0,972	3,651	3,472	7,123	10,303
23	1,886	0,832	2,226	2,184	4,41	7,128
24	2,31	0,912	4,411	3,014	7,425	10,647
25	1,766	k.A.	1,473	2,162	3,635	5,401
26	1,394	k.A.	0,623	1,448	2,071	3,465
27	1,425	0,411	0,835	2,702	3,537	5,373
28	1,862	0,798	4,169	3,451	7,62	10,28
29	2,226	0,861	8,482	4,365	12,847	15,934
30	3,092	1,992	9,375	3,05	12,425	17,509
31	2,992	1,997	7,857	3,844	11,701	16,69
32	1,821	k.A.	4,524	3,038	7,562	9,383
33	0,511	k.A.	0,511	1,535	2,046	2,557
34	2,108	k.A.	5,079	3,999	9,078	11,186
35	3,126	1,125	6,47	2,451	8,921	13,172
36	1,524	k.A.	1,342	1,367	2,709	4,233
37	2,13	0,976	11,855	7,218	19,073	22,179
38	2,306	0,856	1,545	2,716	4,261	7,423
39	1,599	k.A.	k.A.	3,342	3,342	4,941
40	2,404	1,006	11,112	5,234	16,346	19,756
41	1,593	0,973	4,47	3,238	7,708	10,274
42	1,328	k.A.	2,964	4,337	7,301	8,629
43	1,845	k.A.	2,032	3,251	5,283	7,128
44	2,193	2,624	10,892	3,954	14,846	19,663
45	1,778	0,972	7,749	3,557	11,306	14,056
46	2,064	1,031	9,176	6,659	15,835	18,93
47	2,73	1,001	9,053	4,51	13,563	17,294
48	0,876	k.A.	k.A.	2,114	2,114	2,99
49	4,144	2,686	4,48	2,518	6,998	13,828
50	2,346	1,028	10,606	2,82	13,426	16,8
51	2,41	1,057	7,378	4,702	12,08	15,547
52	2,311	0,522	6,289	2,901	9,19	12,023
53	1,989	0,445	6,984	3,398	10,382	12,816
54	3,742	1,476	5,146	4,725	9,871	15,089
55	1,365	k.A.	0,723	2,8	3,523	4,888
56	2,022	0,484	6,527	5,519	12,046	14,552
57	3,478	1,104	6,429	3,541	9,97	14,552
58	3,972	1,707	11,131	2,705	13,836	19,515
59	2,76	1,288	7,896	3,048	10,944	14,992
60	2,329	0,88	6,612	2,478	9,09	12,299
61	1,642	k.A.	8,303	4,137	12,44	14,082

Tabelle 22. Patientenliste ARID1A-Level ELISA.

Legende: Werte außerhalb der Messspanne werden mit „k.A.“ angegeben.

Nr.	D6S473	D6S440	D6S281	D6S1633
1	/	/	/	/
2	/	/	/	/
3	-	LOH	LOH	NA
4	LOH	LOH	LOH	LOH
5	-	-	-	-
6	NA	NA	NA	LOH
7	-	NA	-	NA
8	NA	NA	LOH	NA
9	LOH	-	LOH	NA
10	-	-	NA	-
11	-	-	-	-
12	-	LOH	-	-
13	NA	LOH	NA	NA
14	-	-	-	-
15	-	-	-	-
16	-	LOH	LOH	-
17	-	NA	LOH	-
18	NA	NA	-	-
19	NA	NA	LOH	-
20	-	LOH	LOH	LOH
21	-	-	LOH	-
22	-	NA	LOH	-
23	NA	NA	LOH	-
24	-	-	LOH	-
25	-	NA	LOH	-
26	-	-	-	LOH
27	-	NA	-	-
28	NA	LOH	-	LOH
29	-	NA	-	-
30	-	LOH	LOH	-
31	-	NA	LOH	-
32	-	-	-	-
33	-	NA	-	-
34	-	-	LOH	-
35	-	NA	-	-
36	-	NA	-	NA
37	-	-	-	-
38	-	-	-	-
39	-	-	-	-
40	-	NA	-	NA
41	-	LOH	-	-
42	-	-	-	-
43	-	-	-	-
44	-	-	-	-
45	-	LOH	-	-
46	-	-	-	-
47	-	-	-	-
48	-	-	-	-
49	-	-	-	-
50	NA	NA	-	NA
51	-	-	-	-
52	-	-	NA	NA

53	-	-	-	-
54	-	-	-	-
55	-	-	-	-
56	-	-	-	-
57	-	-	-	-
58	-	-	-	-
59	-	-	-	-
60	-	-	-	-
61	-	NA	-	-

Tabelle 23. Patientenliste LOH 6q Sonden-Auswertung.

Legende: „NA“ = nicht auswertbar, aufgrund von bspw. Homozygotie, Problemen mit Vervielfältigung der Proben in der PCR, verschwommene Banden oder PCR-Produkte mit inkorrektter Länge; „LOH“ = loss of heterozygosity, „-“ = kein Ausfall der Sonde, kein LOH; „/“ = wurde aufgrund fehlenden Materials nicht analysiert.

Nr.	IHC	Mitosen	Ki-67	PR	SCC	Sheeting	Nekrosen
1	G	2	10	0	-	+	+
2	G	1	1	12	-	-	-
3	G	2	5	9	+	+	-
4	G	1	/	/	-	-	-
5	-	0	3	9	-	-	-
6	-	0	/	/	+	-	-
7	-	1	2	9	+	+	-
8	-	0	4	6	-	+	-
9	H	0	4	12	-	+	-
10	-	0	5	6	-	-	-
11	-	1	/	/	+	-	-
12	-	20	15	2	+	+	+
13	G	0	/	0	+	+	+
14	-	0	4	6	-	-	-
15	G	7	9	4	+	+	-
16	-	8	9	3	-	+	-
17	G	12	15	9	-	-	-
18	G	0	19	2	-	-	-
19	-	1	5	6	-	+	-
20	-	21	18	0	-	+	+
21	-	1	6	/	-	-	-
22	-	2	15	3	-	+	-
23	-	1	5	12	-	+	-
24	-	1	3	9	-	-	-
25	G	1	10	6	-	-	-
26	G	6	13	6	+	+	-
27	-	0	3	12	-	-	-
28	H	0	9	/	+	+	-
29	H	1	5	6	-	-	-
30	-	19	20	6	-	+	-
31	H	1	5	9	-	-	-
32	G	2	10	0	-	-	+
33	G	7	15	0	+	+	-
34	H	6	15	/	-	+	-
35	G	1	9	12	+	+	-
36	/	/	/	/	-	-	-
37	/	/	3	12	+	-	-

38	/	/	8	2	-	-	-
39	/	0	2	4	-	-	-
40	/	1	2	90	-	-	-
41	/	2	8	2	-	+	-
42	/	0	3	6	-	-	-
43	/	0	3	0	-	-	-
44	/	0	3	9	-	-	-
45	/	1	5	12	-	-	-
46	/	1	3	9	+	-	+
47	/	0	4	9	+	-	-
48	/	1	3	9	-	-	-
49	/	5	15	4	+	-	-
50	/	0	3	12	-	-	-
51	/	1	3	4	-	-	-
52	/	1	3	9	-	+	-
53	/	1	4	6	-	-	-
54	/	1	7	6	-	-	-
55	/	0	3	12	-	-	-
56	/	0	3	2	+	-	-
57	/	5	6	12	+	+	-
58	/	7	13	4	+	+	-
59	/	5	6	4	+	+	-
60	/	2	15	6	+	-	-
61	/	3	/	9	-	-	-

Tabelle 24. Patientenliste Immunhistochemie (IHC) Auswertung.

Legende: Dargestellt sind für alle 61 Patienten die immunhistochemischen Parameter: Fokaler Ausfall (F), Mosaikartiger Ausfall (M); Mitosen mittels PHH3 oder in HE Färbung; Ki-67 Mitoseindex; Progesteronrezeptor (PR) mittels immunreaktivem Score (IRS): Multiplikation von Farbindensität der Zellkern-Färbung (0: keine Reaktion; 1: schwache Reaktion; 2: mäßige Reaktion; 3: starke Reaktion) und Anteil positiver Zellen (0: keine; 1: <10 %; 2: 11-50 %; 3: 51-80 %; 4: >80 %) mit einer Gesamt-Skala: 0-2: negativ; 3-4 schwach positiv; 5-8: mäßig positiv; 9-12: stark positiv; Small cell change (SCC) und Sheeting (für beide siehe 3.1.6). „-“ meint negativ. „/“ meint nicht ausgewertet. „+“ das Merkmal ist vorhanden.

8.6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Einteilung der Meningeome nach WHO-Klassifikation aus dem Jahr 2021 [131].	6
Abbildung 2. LOH nach Ketter et al. (2007) [27].	9
Abbildung 3. Aufbau des BAF und PBAF Komplexes nach Mashtalir et al. (2018) [69].	13
Abbildung 4. Funktionelle Zusammenfassung des SWI/SNF Komplexes.	14
Abbildung 5. Schematische Darstellung des Proteins ARID1A und seinen Domänen.	15
Abbildung 6. Hypothetisches Modell der Malignisierung in Meningeomen.	22
Abbildung 7. Lysatherstellung.	31
Abbildung 8. Schematische Darstellung des ELISA Protokolls.	33
Abbildung 9. Schematische Darstellung von Richtigkeit und Präzision.	36
Abbildung 10. Standardkurve des ARID1A-ELISA mit Messspanne und Einzelmessungen in vier Fraktionen eines Gewebelysates im AE-Modell.	48

Abbildung 11. Der Vergleich von <i>ARID1A</i> -Wildtyp und -Knockout Lysaten im ELISA und Western blot.	51
Abbildung 12. Hintergrundsignale des sekundären Antikörpers in verschiedenen Lysat-Puffern.....	52
Abbildung 13. Spike recovery Analyse des ARID1A-Fragments in vier subzellulären Fraktionen und Tests zur Fragment Stabilität/Degradation über mehrere Inkubationszeiträume.....	55
Abbildung 14. Minimal benötigte Konzentration und Parallelismus.....	57
Abbildung 15. Alters- (A) und Geschlechtsverteilung (B) im Patientenkollektiv.....	58
Abbildung 16. Verteilung der Lokalisationen im Patientenkollektiv.	59
Abbildung 17. Verteilung der histologischen Subtypen im Patientenkollektiv.....	60
Abbildung 18. Verteilung der WHO-Grade (A) und Rezidive (B) im Patientenkollektiv.	61
Abbildung 19. Vergleich der ARID1A-Konzentrationen in Tumoren mit und ohne loss of heterozygosity (LOH) des Chromosoms 1p in sechs verschiedenen Zellkompartimenten.	62
Abbildung 20. Vergleich der ARID1A-Konzentrationen in Tumoren mit und ohne loss of heterozygosity (LOH) des Chromosoms 1p in den beiden Gruppen Frei nukleär und Gesamt.	64
Abbildung 21. Vergleich der ARID1A-Konzentrationen von Tumoren mit unterschiedlicher WHO-Gradierung innerhalb von sechs Zellkompartimenten.	65
Abbildung 22. Immunhistochemischer Ausfall der ARID1A-Expression.	70
Abbildung 23. Detaillierte Auswertung der vier Sonden D6S281, D6S440, D6S473 und D6S1633... 73	
Abbildung 24. Histon H3 Verteilung über vier Zellkompartimente in acht Meningeomen.....	81
Abbildung 25. Mehrfache Sequenzausrichtung um das Antikörper-Epitop von ARID1A, ARID1B und ARID2.....	83
Abbildung 26. Quantifizierung des Hintergrundsignals des sekundären Antikörpers in Chromatinfraktionen im Tumorgewebe von zwölf Meningeomen mit nachfolgender Re-Analyse in <i>ARID1A</i> -Wildtyp- (WT) und Knockout- (KO) Zellpellets ab278824 (Abcam).	85
Abbildung 27. Vergleich der ARID1A-Konzentration in der Gruppe Gesamt zwischen Meningeomen mit und ohne LOH 1p.	87
Abbildung 28. Originale, nicht beschnittene und nicht angepasste Western blot Membranen mit Densitometermesswerten/Intensitätsverhältnis jeder Bande.....	108

8.7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Tabellarische Zusammenfassung epidemiologischer Daten zu Meningeomen nach Holleccek et al. (2019) [45].	5
Tabelle 2. Die Synonyme der Komponenten des SWI/SNF Komplexes sowie deren durchschnittlichen Mutationsraten in verschiedenen Tumorentitäten.....	12
Tabelle 3. Wichtige Signalwege, die durch den SWI/SNF-Komplex und speziell ARID1A beeinflusst werden und eine Rolle in der Pathogenese und Therapie von <i>ARID1A</i> -depletierten Tumoren spielen. 17	

Tabelle 4. Patientenproben.....	24
Tabelle 5. Mikrosatelliten und Sonden für Chromosom 1p [12].	25
Tabelle 6. Mikrosatelliten und Sonden für Chromosom 6q.....	25
Tabelle 7. Polymerase-Kettenreaktion.....	27
Tabelle 8. Verwendete ARID1A-spezifische Materialien.	32
Tabelle 9. Antikörper.	38
Tabelle 10. Darstellung unterschiedlicher Protokolle und deren Einfluss auf das Ergebnis.	45
Tabelle 11. Richtigkeit und Präzision des ARID1A-ELISAs.....	53
Tabelle 12. Vergleich der ARID1A-Konzentrationen in Tumoren mit und ohne loss of heterozygosity (LOH) des Chromosoms 1p in sechs verschiedenen Zellkompartimenten.....	63
Tabelle 13. Analyse der ARID1A-Konzentrationen in unterschiedlichen Lokalisationen.....	67
Tabelle 14. Analyse der ARID1A-Konzentrationen in Nicht-Rezidiv- und Rezidivmeningeomen.....	68
Tabelle 15. Vergleich verschiedener kommerzieller ELISA-Kits für ARID1A mit dem neu entwickelten ELISA.....	77
Tabelle 16. Multivariate Analyse des Einflusses auf die ARID1A-Level in 61 Meningeomen.....	90
Tabelle 17. Materialienliste.....	106
Tabelle 18. Geräte und Software.....	107
Tabelle 19. Standards 1-5.....	109
Tabelle 20. Standards 6-11.....	110
Tabelle 21. Validierung ELISA.	111
Tabelle 22. Patientenliste ARID1A-Level ELISA.....	112
Tabelle 23. Patientenliste LOH 6q Sonden-Auswertung.	114
Tabelle 24. Patientenliste Immunhistochemie (IHC) Auswertung.	115

8.8 Formelverzeichnis

Formel 1. Der ELISA-Validierungsparameter Richtigkeit.	35
Formel 2. Der ELISA-Validierungsparameter Intra-assay Richtigkeit.	35
Formel 3. Der ELISA-Validierungsparameter Inter-assay Richtigkeit.	35
Formel 4. Der ELISA-Validierungsparameter Präzision.....	35
Formel 5. Der ELISA-Validierungsparameter Spike recovery.....	38

9 Publikation / Danksagung

9.1 Publikation

Eine erste Publikation wurde bereits veröffentlicht und ist wie folgt zu zitieren:

Hinsberger M, Becker-Kettern J, Jürgens-Wemheuer WM, Oertel J, Schulz-Schaeffer WJ (2023) Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Quantification of ARID1A in Tissue Lysates. *Cancers* 2023, Vol 15, Page 4096 15:4096

Die Veröffentlichung einer zweiten Publikation erfolgt zeitnah unter dem Titel:

„Chromosome 1p and 6q Loss of Heterozygosity in Meningioma: Comprehensive Analysis of the two Chromatin Remodeling Complex Subunits ARID1A and ARID1B”

mit den Autoren: Hinsberger, Manuel; Becker-Kettern, Julia; Jürgens-Wemheuer, Wiebke M.; Bartelmei, Katrin; Ketter, Ralf; Oertel, Joachim and Schulz-Schaeffer, Walter J.

9.2 Danksagung

Besonders möchte ich mich bei meinen beiden Betreuerinnen dieser Arbeit bedanken, Julia und Wiebke. Es hat wirklich enorm viel Spaß gemacht mit euch beiden zusammen zu arbeiten und ihr wart eine klasse Betreuung sowie Unterstützung. Wann immer ich Fragen hatte, konnte ich euch um Rat bitten und ihr habt mir ausnahmslos weiterhelfen können. Sei es die Planung von ELISA Versuchen, das Design oder das Protokoll von PCRs oder alles andere, was mir im sonst noch etwas fremden Labor-Alltag an Routine gefehlt hat. Wirklich hervorzuheben ist die tolle Unterstützung von Julia bei meiner ersten Publikation gewesen. Zu jeder Tageszeit und an jedem Wochentag haben wir uns Aufgaben gegenseitig zugeteilt und nach Vervollständigung anschließend über Teams besprochen. Ich bin euch sehr dankbar, dass ich Teil eures Teams sein durfte und weiß sehr zu schätzen, dass all die Ergebnisse dieser Arbeit nicht ohne euch zustande gekommen wären. Vielen Dank!

Herrn Prof. Dr. med. Schulz-Schaeffer möchte ich auch herzlich danken, dass er mir dieses Thema meiner Promotion anvertraut hat und mich dabei so tatkräftig unterstützt hat. Ohne seine aufmunternden Worte, seine Inspirationen und seine freundliche Art und Weise wäre meine Arbeit nicht so schön gewesen wie sie es war. Es hat mir jeden Tag Freude bereitet im Labor der Neuropathologie arbeiten zu dürfen, meine Ergebnisse präsentieren zu können und ihre Analyse dazu einzuholen. Sie haben nicht nur das Projekt finanziell und ideell begleitet, sondern waren mir stets ein Mentor für alle Belange der Forschung, auch abseits der Neuropathologie. Ich möchte mich daher für alle Lebensweisheiten und Tipps bedanken, die Sie mir mit auf meinen Weg gegeben haben, Danke!

Ein weiterer Dank geht an das gesamte Team des Neuropathologie-Labors: Sonja Hoffmann, Julia Weber, Irina Schaumburg, Dalia Krauceviciene, und Tatjana Pfander. Ihr habt mir alle ganz toll geholfen das neuropathologische Labor kennenzulernen, wobei insbesondere die Immuno-Färbungen oder die

DNA-Aufbereitung sowie alle Bestellungen meiner Experimente durch euch unterstützt wurden. Vielen Dank auch an Dr. med. Arne Wrede, der mir jederzeit freundlicherweise die WHO-Klassifikation der ZNS-Tumore ausgeliehen hat und mich in den immunhistochemischen Auswertungen meiner Färbungen immer unterstützt hat. Vielen Dank euch allen, ohne euch wäre all das nicht möglich gewesen!

Bedanken möchte ich mich auch bei der Universität des Saarlandes sowie des Universitätsklinikums des Saarlandes, die die Rahmenbedingungen dieser Arbeit überhaupt erst möglich gemacht haben durch ihre stetige finanzielle Investition und allumfassende Unterstützung.

Letztlich geht ein ganz großes Dankeschön an meine ganze Familie. Ohne meine beiden Omas und Opas hätte ich es längst nicht so weit geschafft. Danke Papa, Mama und Annika für eure tatkräftige Unterstützung in all meinen Aktivitäten und insbesondere dafür, dass ihr in jeder Situation für mich ein offenes Ohr hattet, sodass ich euch all meine neuen Ergebnisse dieser Arbeit zu jeder Uhrzeit begeisterungsvoll mitteilen konnte. In all den Jahren wart ihr immer an meiner Seite, sodass euch ein wesentlicher Teil dieser Arbeit gebührt, vielen Dank für alles!

10 Eidesstattliche Versicherung

Erklärung gemäß § 7 Abs. 1 Nr. 2

„Ich, Manuel Hinsberger, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Thema „Biochemische und molekularbiologische Untersuchung der Proteine ARID1A und ARID1B in Meningeomen mit einem Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)“ ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir **die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Art und Weise unentgeltlich geholfen:**

	Name/Tätigkeit	Art der Hilfestellung
1.	Prof. Dr. med. Walter J. Schulz-Schaeffer	Bereitstellung des Themas, Ratschläge bei wissenschaftlichen Fragestellungen, Betreuung der Doktorarbeit
2.	Dr. rer. nat. Julia Becker-Kettern	Durchführung LOH 1p, LOH 6q, ELISA, Western blot
3.	Dr. med. vet. Wiebke M. Jürgens-Wemheuer	Hilfestellung bei Analyse LOH 1p, LOH 6q, ELISA
4.	Dr. med. Katrin Bartelmei	Durchführung LOH 1p
5.	Julia Weber, Irina Schaumburg, Dalia Krauceviciene, Tatjana Pfander, Sonja Hoffmann	Durchführung Immunhistochemie, Technische Assistenz

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberaterinnen/Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Außer den angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Ergebnissen (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir beantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation sind in 9.1 angegeben, wobei für beide Veröffentlichungen die alleinige Erstautorenschaft beansprucht wird. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Grundsätze der Universität des Saarlandes zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder in ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Die Bedeutung der eidesstattlichen Erklärung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Erklärung sind mir bekannt.“

Homburg, 11.02.2026

Ort, Datum



Unterschrift des Promovierenden

Eidesstattliche Versicherung

Belehrung

Die Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes verlangt eine Eidesstattliche Versicherung über die Eigenständigkeit der erbrachten wissenschaftlichen Leistungen. Weil der Gesetzgeber der Eidesstattlichen Versicherung eine besondere Bedeutung beimisst und sie erhebliche Folgen haben kann, hat der Gesetzgeber die Abgabe einer falschen eidesstattlichen Versicherung unter Strafe gestellt. Bei vorsätzlicher (also wissentlicher) Abgabe einer falschen Erklärung droht eine Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder eine Geldstrafe. Eine fahrlässige Abgabe (also Abgabe, obwohl Sie hätten erkennen müssen, dass die Erklärung nicht den Tatsachen entspricht) kann eine Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder eine Geldstrafe nach sich ziehen. Die entsprechenden Strafvorschriften sind in § 156 StGB (falsche Versicherungen an Eides Statt) und in § 161 StGB (fahrlässiger Falscheid, fahrlässige falsche Versicherung an Eides Statt) wiedergegeben.

§ 156 StGB: Falsche Versicherung an Eides Statt

Wer vor einer zur Abnahme einer Versicherung an Eides Statt zuständigen Behörde eine solche Versicherung falsch abgibt oder unter Berufung auf eine solche Versicherung falsch aussagt, wird mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft.

§ 161 StGB: Fahrlässiger Falscheid, fahrlässige falsche Versicherung an Eides Statt:

- (1) Wenn eine der in den § 154 bis 156 bezeichneten Handlungen aus Fahrlässigkeit begangen worden ist, so tritt Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder Geldstrafe ein.
- (2) Straflosigkeit tritt ein, wenn der Täter die falsche Angabe rechtzeitig berichtigt. Die Vorschriften des § 158 Abs. 2 und 3 gelten entsprechend.

11 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.