

Aus der Neurologische Universitätsklinik Tübingen  
Abteilung für Neurologie mit Schwerpunkt neurovaskuläre  
Erkrankungen und Neuroonkologie  
Interdisziplinäre Sektion für Neuroonkologie

**Zytoplasmatische Sequestrierung von bHLH-  
Transkriptionsfaktoren in experimentellen Gliomen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Lennartz, Felix Nikolaus  
2020

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. G. Tabatabai

2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Huber

Tag der Disputation: 15.01.2020

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>8</b>
<b>1.1. GLIOBLASTOM (GB)</b>	<b>8</b>
1.1.1 DEFINITION, KLASSIFIKATION UND EIGENSCHAFTEN	8
1.1.2 SYMPTOMATIK UND DIAGNOSESTELLUNG	17
1.1.3 THERAPIE UND PROGNOSE	18
<b>1.2 BASIC HELIX-LOOP-HELIX (BHLH) PROTEINE</b>	<b>25</b>
1.2.1 ALLGEMEINE EIGENSCHAFTEN DER BHLH PROTEINE	25
1.2.2 KLASSE I BHLH TRANSKRIPTIONSFAKTOREN UND E-PROTEINE	27
1.2.3 KLASSE II BHLH TRANSKRIPTIONSFAKTOREN UND OLIG1/2	29
1.2.4 KLASSE V BHLH TRANSKRIPTIONSFAKTOREN UND ID-PROTEINE	31
<b>1.3 ZELLKERN IMPORT</b>	<b>32</b>
<b>1.4 DOMINANT NEGATIVES E47-PROTEIN (DNE47)</b>	<b>34</b>
<b>1.5 ZIELSETZUNG DER DOKTORARBEIT</b>	<b>35</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>36</b>
<b>2.1 MATERIALIEN</b>	<b>36</b>
2.1.1. CHEMIKALIEN UND PUFFER FÜR DIE ZELLKULTUR	37
2.1.2 ZELLKULTURMEDIEN	39
2.1.3 VERWENDETE ZELLLINIEN	40
2.1.4 BAKTERIEN FÜR DIE PLASMID VERVIELFÄLTIGUNG	41
2.1.5 MATERIALIEN FÜR WESTERN BLOT	41
2.1.6 VERWENDETE GELE FÜR WESTERN BLOT	42
2.1.7 ANTIKÖRPER	43
2.1.8 VERWENDETE PLASMIDE	43
2.1.9 KITS FÜR RNA-EXTRAKTION UND PLASMID VERVIELFÄLTIGUNG	44
2.1.10 VERBRAUCHSMATERIALIEN	44
2.1.11 GERÄTE	45
<b>2.2. METHODIK</b>	<b>46</b>
2.2.1. HERSTELLUNG DER ZELLEN	46
2.2.2. PLASMID VERVIELFÄLTIGUNG	47
2.2.3. LENTIVIRUS-PRODUKTION	48
2.2.4. ZELLKULTIVIERUNG UND PASSAGIEREN DER LN-229	49
2.2.5 IMMUNZYTOCHEMIE (ICC)	50
2.2.6 KLONOGENITÄTS ASSAY DER LN-229 ZELLLINIE	51
2.2.7 ZYTOTOXIZITÄTS ASSAY DER LN-229 ZELLLINIE	58
2.2.8 HERSTELLUNG VON FRAKTIONIERTEN LYSATEN AUS NUKLEUS UND ZYTOPLASMA	62
2.2.9 PROTEINBESTIMMUNG MITTELS BRADFORD ASSAY	63
2.2.10 SDS-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE	66
2.2.11 PROTEINDETEKTION MITTELS WESTERN BLOT	66
2.2.12 RNA-EXTRAKTION	67
2.2.13 CAP ANALYSIS GENE EXPRESSION (CAGE):	68
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>69</b>
<b>3.1. IMMUNZYTOCHEMIE (ICC) DER LN229 ZELLLINIE</b>	<b>69</b>
<b>3.2. WESTERN BLOT DER LN229 ZELLLINIE</b>	<b>71</b>
<b>3.3. EINZELTHERAPIEN KLONOGENITÄTS ASSAY DER LN229 ZELLLINIE</b>	<b>76</b>

<b>3.4. KOMBINATIONSTHERAPIE KLONOGENITÄTS ASSAY DER LN229 ZELLINIE</b>	<b>82</b>
<b>3.5. ZYTOTOXIZITÄTS ASSAY DER LN229 ZELLINIE</b>	<b>84</b>
<b>3.6. CAP ANALYSIS GENE EXPRESSION (CAGE) DER LN229 ZELLINIE</b>	<b>85</b>
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>87</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>94</b>
<b>6. ANHANG</b>	<b>95</b>
<b>6.1 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>95</b>
<b>6.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>115</b>
<b>6.3 TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>116</b>
<b>6.4 ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL</b>	<b>117</b>
<b>6.5 DANKSAGUNG</b>	<b>118</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Erklärung</b>
<b>ALA</b>	5-Aminolevulin Säure
<b>bHLH</b>	basic Helix-Loop-Helix
<b>BMP4</b>	Knochen morphogenes Protein 4
<b>BSA</b>	Rinderserumalbumin
<b>CDK</b>	Cyclin abhängige Kinase
<b>CT</b>	Chemotherapie
<b>DMEM</b>	Dulbecco´s Modifizierte Medien
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>dnE47</b>	Dominant negatives E47
<b>Dox</b>	Doxycyclin
<b>PBS</b>	Dulbecco´s Phosphatgepufferte Salzlösung
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>DUB</b>	Deubiquitylase
<b>ECL</b>	Verbesserte Chemilumineszenz
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>EGFR</b>	Epithelialer Wachstumsfaktor Rezeptor
<b>EGTA</b>	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- N,N,N,N´-tetraessigsäure
<b>FCS</b>	Fetales Kälberserum
<b>G-CSF</b>	Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor
<b>GB</b>	Glioblastom
<b>GFAP</b>	Saures Gliafaserprotein
<b>HCl</b>	Salzsäure
<b>HEPES</b>	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Hypoxie-induzierter Faktor 1 $\alpha$

<b>HLH</b>	Helix-Loop-Helix
<b>HPH</b>	Hypoxie-induzierter Faktor-Prolyl-Hydroxylase
<b>ICC</b>	Immunzytochemie
<b>ID</b>	Inhibitor der Differenzierung
<b>IDH</b>	Isocitratdehydrogenase
<b>IL</b>	Interleukin
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	Interferon- $\gamma$
<b>ITF-2</b>	Immunglobulin Transkriptionsfaktor 2
<b>KCl</b>	Kaliumchlorid
<b>MCP-3</b>	Monozyten chemotaktisches Protein-3
<b>MGMT</b>	O <sup>6</sup> -Methylguanin-Methyltransferase
<b>MMP-2</b>	Matrix Metalloprotease-2
<b>MMP-9</b>	Matrix Metalloprotease-9
<b>MRT</b>	Magnetresonanztomographie
<b>MTIC</b>	Monomethyl-Triazenoimidazole-Carboxamide
<b>MT1-MMP</b>	Membran Typ 1 Metalloprotease
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>NF1</b>	Neurofibromatose 1
<b>NLS</b>	Kernlokalisierungssignal
<b>NPC</b>	Nukleärer Poren Komplex
<b>OLIG2</b>	Oligodendrozyten Transkriptionsfaktor 2
<b>PBST</b>	Phosphat gepufferte Salzlösung mit Tween
<b>PD</b>	Programmierter Zell Tod Protein
<b>PD-L1</b>	Programmierter Zell Tod Protein Ligand 1
<b>PEI</b>	Polyethylenimin
<b>PET</b>	Positronenemissionstomographie

<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>PMSF</b>	Phenylmethylsulfonylfluorid
<b>PVDF</b>	Polyvinylidendifluorid
<b>Rb</b>	Retinoblastom
<b>RFP</b>	Rot fluoreszierendes Protein
<b>Rpm</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>RT</b>	Radiotherapie
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>TCF4</b>	Transkriptionsfaktor 4
<b>TEMED</b>	Tetramethylethyldiamin
<b>TERT</b>	Telomer Reverse Transkriptase
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transformierungs Wachstumsfaktor - $\beta$
<b>TMZ</b>	Temozolomid
<b>T<sub>reg</sub></b>	Regulatorische T-Zelle
<b>Trisbase</b>	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan Base
<b>VEGF</b>	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
<b>WHO</b>	Weltgesundheitsorganisation
<b>2-HG</b>	D-2-Hydroxyglutarat

# 1. Einleitung

## 1.1. Glioblastom (GB)

### 1.1.1 Definition, Klassifikation und Eigenschaften

Primäre Hirntumore sind Raumforderungen, die aus den residenten Zellen des zentralen Nervensystems entstehen [1,32]. Eine heterogene Untergruppe dieser Neoplasien sind die malignen Gliome [2]. Sie sind die häufigsten primären Hirntumore [1,3,32,33] und entstehen aus den sogenannten Gliazellen [32]. Aufgrund der Ursprungszellen und morphologischer, sowie histologischer und molekularpathologischer Kriterien werden verschiedene Entitäten von Gliomen unterschieden [2,52]. Eine dieser Entitäten ist das Glioblastom [13,52,82].

Das Glioblastom ist einer der aggressivsten, malignen Tumore, welcher von den Astrozyten und möglicherweise auch von ihren Vorläuferzellen ausgeht [4,5,6,7]. Astrozyten dienen im Gehirn auf verschiedenen Ebenen der Unterstützung und Versorgung der Neurone [8,9,10,11,12]. Unter den Gliomen stellt das GB den größten Anteil dar [3,49,52,15,32,33] und ist somit der häufigste primär maligne Hirntumor bei Erwachsenen [3,13,14,49,32,40,82]. Er wächst diffus und infiltrativ [15] und ist derzeit nicht kurativ therapierbar. Trotz multimodaler Therapie, bestehend aus Operation, Bestrahlung und Chemotherapie liegt die progressionsfreie Zeit nach Behandlung bei nur 5-6 Monaten und das Gesamtüberleben bei nur 19 Monaten [30].

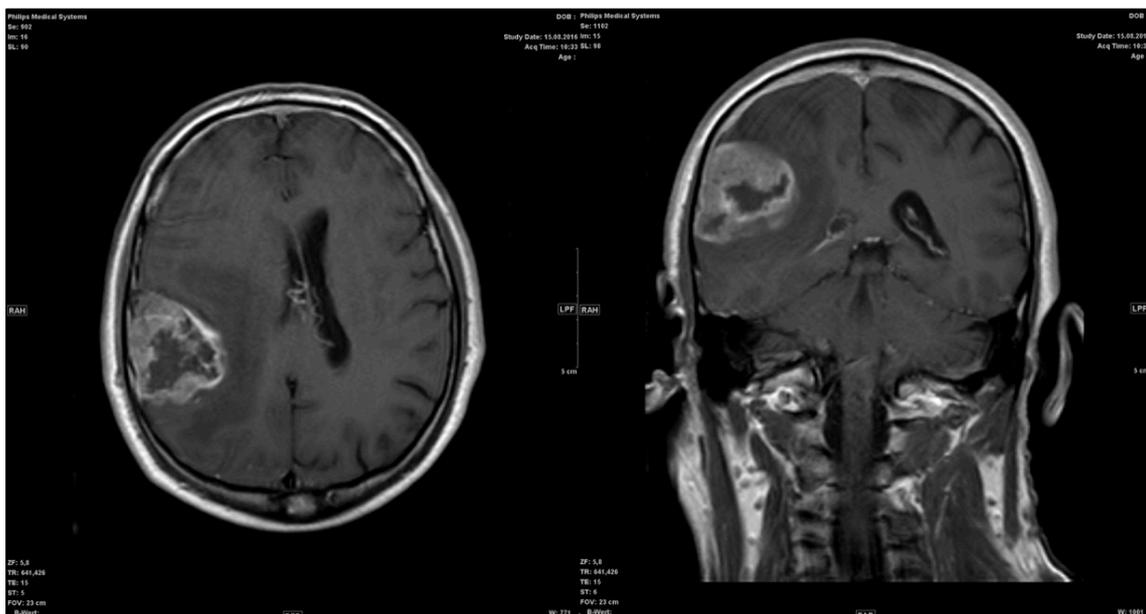
Als ein molekularer Marker bei der Therapie, beziehungsweise dem Therapieansprechen, dient eine Promotormethylierung der O<sup>6</sup>-Methylguanin Methyltransferase (MGMT) [31,16,17,18,25,26].

Die O<sup>6</sup>-Methylguanin Methyltransferase ist ein DNA-Reparaturenzym, welches durch alkylierende Substanzen, wie Temozolomid entstandene DNA-Schäden repariert. Dies geschieht durch die Entfernung der Methylgruppe an der O<sup>6</sup> oder N<sup>7</sup> Position des Guanins, sowie an der N<sup>3</sup> Position des Adenins, wobei ein MGMT Molekül immer nur eine Demethylierung durchführen kann, bevor es abgebaut wird [2,19,20,22].

Bei 25-40% der Glioblastome ist der Promotor der MGMT methyliert [21,22]. Dadurch kann das Gen nicht mehr transkribiert werden und es werden keine MGMT- Moleküle gebildet. So können DNA-Schäden nicht mehr repariert werden, was zu einem stärkeren Ansprechen auf eine alkylierende Chemotherapie mit Temozolomid (TMZ) führt [104,22,23,24,25,26,27], sodass Patienten mit einer MGMT-Promotormethylierung im Mittel 10 Monate länger leben [27].

So liegt das Gesamtüberleben bei methyliertem MGMT-Promotor bei 21 -23 Monaten mit einem progressionsfreien Überleben von 8,7-14 Monaten. Ohne MGMT-Promotormethylierung liegt das Gesamtüberleben hingegen bei 14-15 Monaten mit 5-8 Monaten progressionsfreiem Überleben [28,29,30,168].

Nur 5 % der GB-Patienten weisen eine Überlebensrate von fünf Jahren auf [3,32].



*Abbildung 1: MRT-Bild eines Patienten mit Glioblastom bei Diagnosestellung. Es zeigen sich eine große Raumforderung im rechten Temporallappen mit umgebendem Ödem und Mittellinienverschiebung zur linken Seite*

Die Inzidenz des Glioblastoms liegt in Industrienationen zwischen 2 und 4 Fällen pro 100.000 erwachsenen Einwohnern und Jahr [3,31,32,33,34]. Weltweit liegt die Inzidenz bei 2,10 Fällen pro 100.000 Einwohnern und Jahr [34]. Das mittlere Erkrankungsalter der Patienten mit Glioblastom liegt bei 63 Jahren und die Geschlechterverteilung von Mann zu Frau bei 1,45 zu 1 [34]. Es tritt somit häufiger bei Männern auf als bei Frauen [3,32,33,34].

95 % der Glioblastome treten sporadisch auf, jedoch sind für 5% der Glioblastome eine familiäre Form beschrieben [13,35,37]. Außerdem ist das Auftreten eines Glioblastoms im Rahmen verschiedener genetischer Erkrankungen möglich. Dazu zählen beispielsweise tuberöse Sklerose, das Turcot Syndrom, multiple Endokrine Neoplasie Typ IIA, sowie Neurofibromatose Type I (NFI) oder das Li-Fraumeni Syndrom [13,36,37,38,97]. Wie die meisten Tumorerkrankungen ist das Glioblastom eine Erkrankung des höheren Alters und tritt vermehrt über dem 50. Lebensjahr auf [15]. Die höchste Inzidenz liegt zwischen einem Alter von 75 und 84 Jahren [3,32]. Bei Kindern ist das Glioblastom eine seltenere, aber trotzdem tödliche Erkrankung [3,14,39,40]. Glioblastome weisen generell histologisch und genetisch eine große inter- und intratumorale Heterogenität auf [41,42,43,81].

Bei Hirntumoren wird statt des TNM-Klassifikationssystems, welches die Tumorausdehnung (T), den Lymphknotenbefall (N) und vorliegende Metastasen (M) beurteilt, die Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) angewandt. Diese unterteilt die Tumore nach histologischen und molekularen Charakteristika in vier Grade [44,45,46,73]. Zudem erfolgt eine laufende Aktualisierung der Entitäten durch ein internationales Forschungskonsortium, dem Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumor Taxonomy (cIMPACT-NOW). Da die offizielle WHO Klassifikation nur im Abstand von einigen Jahren aktualisiert wird, gibt cIMPACT-NOW anhand von neuesten Forschungsergebnissen Empfehlungen zu den verschiedenen Tumorentitäten heraus. Mit ihrer Hilfe soll dem wissenschaftlichen Fortschritt in der Zeit vor einer Aktualisierung der WHO Klassifikation Rechnung getragen werden [47]. Die Klassifizierung der verschiedenen Entitäten anhand von histologischen und molekularen Kriterien dient dazu, die Malignität und die Prognose der Patienten einzuschätzen [2].

Zu den histologischen Kriterien gehören Anaplasie, nukleäre Atypien, zelluläre Pleomorphismen, erhöhte Zelldichte, erhöhte Mitoserate, sowie mikrovaskuläre Proliferation, Gefäßthromben und Nekrose [40,48,49,50,51,73,97]. Von WHO

Grad I bis Grad IV steigern sich diese Kriterien, sodass Grad IV diejenigen Tumore beinhaltet, welche besonders aggressiv sind. Als ein solcher gilt das Glioblastom [52].

WHO Grad I Tumore haben ein geringes proliferatives Potential und wachsen meist wenig infiltrativ. Grad II Tumore sind infiltrativ und besitzen teilweise wie beim diffusen Astrozytom die Möglichkeit sich in maligne Tumore weiter zu entwickeln. WHO Grad III Tumore wie das anaplastische Astrozytom besitzen histologische Evidenz einer höheren Malignität wie beispielsweise nukleäre Atypien oder hohe mitotische Aktivität. Grad IV Tumore wie das Glioblastom zeigen die höchste mitotische Aktivität, Nekrosen und Zellatypien [53,80,82].

Histologisch besteht ein GB aus Tumorzellen, welche sich durch Polymorphismen, Anaplasie und deutliche Anisokaryose auszeichnen. Sie sind polygonal bis spindelförmig, haben ein azidophiles Zytoplasma und unregelmäßig geformte Zellgrenzen. Ihre Zellkerne sind oval oder verlängert und haben hyperchromatisches Chromatin mit multiplen, zentral oder perizentral gelagerten Nukleoli. Das Verhältnis von Kern zu Zytoplasma ist vergrößert und manche Zellen weisen intranukleäre Einschlüsse auf.

Durch die starke Zellproliferation kommt es zu Hypoxie und dadurch zu einem charakteristischen Merkmal des Glioblastoms, den Nekrosen [54,55,56,57,58]. Um die Nekrosen herum finden sich „Pseudopalisaden“: dicht gelagerte Zellenverbände, da die Zellen in oxygenierte Bereiche streben (Abbildung 2) [55,56,57,58,97].

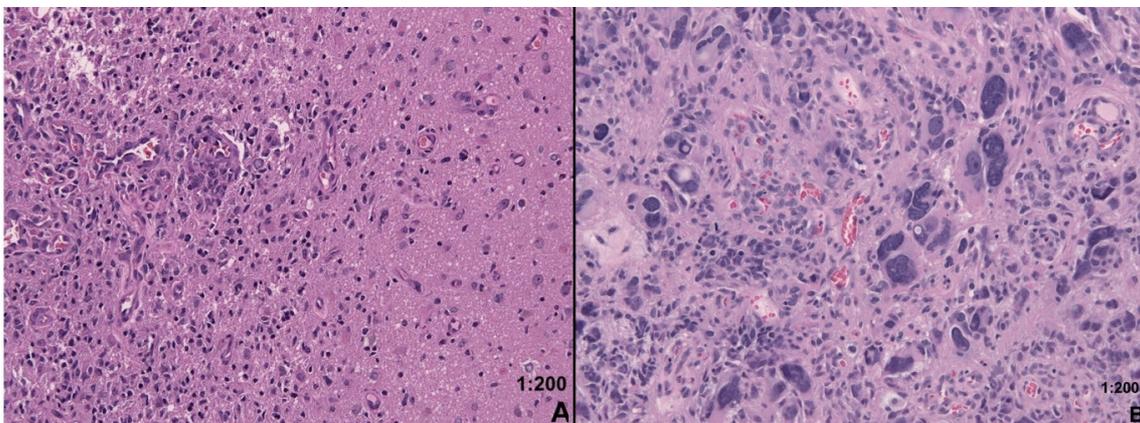


Abbildung 2: Histologische Präparate. A: Glioblastom in HE-Färbung mit Infiltration des normalen Hirngewebes im rechten Bildteil. B: Glioblastom in HE-Färbung mit Darstellung

atypischer Zellen. Beide Bilder mit freundlicher Genehmigung von Prof. Schittenhelm aus der Neuropathologie Tübingen.

Trotz der Nekrosen ist die Vaskularisation des Tumorgewebes sehr hoch (Abbildung 3). Diese wird beispielsweise durch den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) oder den Hypoxie-induzierter Faktor (HIF)-1 $\alpha$  vermittelt, welche von den hypoxischen Zellen ausgeschüttet werden [70,55,59,60,61]. In den neugebildeten Gefäßen können sich Thromben entwickeln, welche die Endothelzellen schädigen und sie zur Proliferation anregen [62]. Trotz der verstärkten Gefäßproliferation kommt es jedoch durch eine verringerte Funktion zu Blutungen und zu Perfusionsstörungen und somit zu Nekrosen [15].

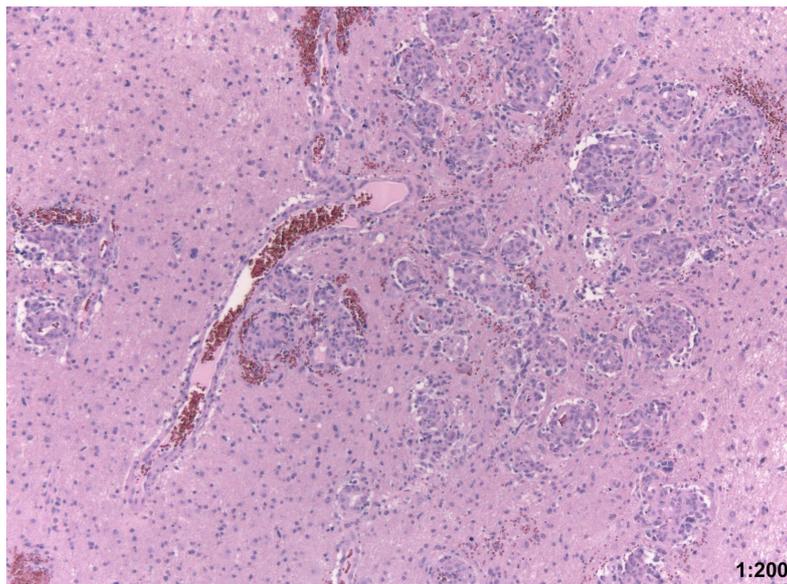


Abbildung 3: Glioblastomgewebe mit zahlreichen Gefäßen in HE-Färbung. Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Schittenhelm aus der Neuropathologie Tübingen

Außerdem werden diffuse Gliome über das Vorhandensein einer Isocitrat-Dehydrogenase (IDH) -Mutation klassifiziert. So unterteilt man das Glioblastom und andere Astrozytome in IDH-mutiert und IDH-wildtyp Tumore [63], welche sich deutlich in ihren Mutationen und ihrer Prognose unterscheiden [73].

Die IDH ist ein Enzym, welches im Rahmen des Citratzyklus eine wichtige Rolle spielt. So katalysiert es die Umwandlung von Isocitrat zu  $\alpha$ -Ketoglutarat ( $\alpha$ -KG),

wobei NADP<sup>+</sup> zu NADPH reduziert und CO<sub>2</sub> freigesetzt wird. Diese Reaktion ist eine der Hauptmechanismen zur Bereitstellung von NADPH, welches beispielsweise für die Reduktion von Glutathion essentiell ist. Glutathion dient der Abwehr von Sauerstoffradikalen (z.B. bei Bestrahlung) und wird dabei von diesen oxidiert. Um wieder funktionsfähig zu werden, muss es anschließend reduziert werden, was mithilfe von NADPH geschieht [64]. Das Vorliegen einer IDH-Mutation sorgt für eine verringerte Enzymaktivität [75] und führt so zu einer verringerten Produktion von NADPH, welches als Reduktionsmittel benötigt wird [74].

Es werden die Isocitrat-Dehydrogenase-1 und -2 unterschieden, wobei die IDH-1 vornehmlich im Zytoplasma, die IDH-2 in den Mitochondrien lokalisiert ist [104]. Die Mutationen der Isocitrat-Dehydrogenase-1 finden sich auf der ersten oder zweiten Base des Codon 132. Am häufigsten findet sich eine R132H Mutation, bei der ein Arginin durch ein Histidin ersetzt wird. Dadurch verändert sich die zweite Base (Guanin) in ein Adenin. Somit verändert sich das Codon von CGT zu CAT [75,81,65,66,67].

Seltener geschieht eine solche somatische Mutation auch im entsprechenden Codon von IDH2. Durch die IDH1-Mutation katalysiert die mutierte Isocitrat-Dehydrogenase die oxidative Dekarboxylierung von Isocitrat zu D-2-Hydroxyglutarat (2-HG), welches im Tumor akkumuliert und als kompetitiver Inhibitor der  $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenase fungiert, welche wiederum die Aktivität von Histon-Demethylasen und weiteren Molekülen verändert [2,68,69]. 2-HG erhöht zudem die Aktivität der Hypoxie-induzierter Faktor-Prolyl-Hydroxylase (HPH), welche den Hypoxie-induzierter Faktor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) für den proteasomalen Abbau markiert. Durch diesen erhöhten Abbau von HIF1 $\alpha$  werden geringere Mengen an proangiogenen Molekülen ausgeschüttet und das Gefäßwachstum im Tumor verringert (Abbildung 4) [70].

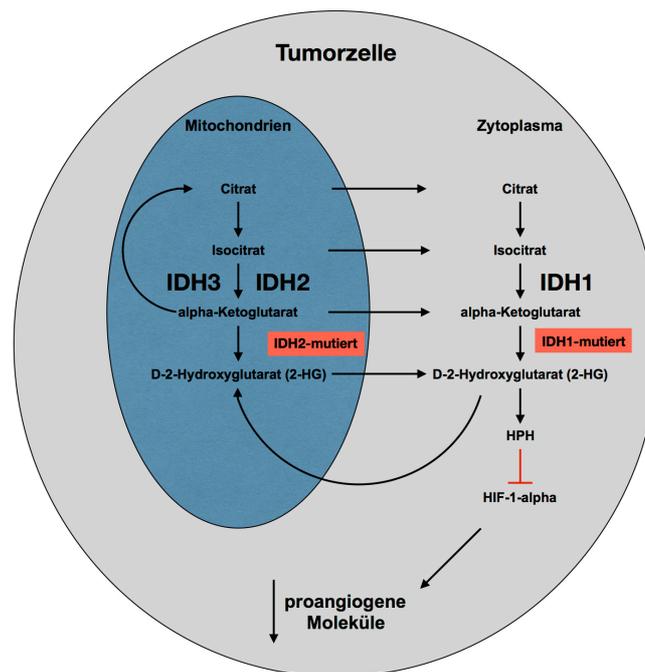


Abbildung 4: Darstellung der IDH Funktion bei IDH-Mutation. Die mutierte IDH1 katalysiert die Umwandlung von  $\alpha$ -KG zu 2-HG, welches im Tumor akkumuliert. Dieses bewirkt eine höhere enzymatische Aktivität von HPH, welches HIF-1 $\alpha$  für den proteasomalen Abbau markiert. Durch den erhöhten Abbau von HIF-1a werden weniger proangiogene Moleküle ausgeschüttet. Modifiziert nach Kickingeder et al. [70].

IDH-mutierte Glioblastome entstehen in der Regel durch Progression aus geringergradigen Astrozytomen, wie dem anaplastischen Astrozytom [63,77,81,71,72,73]. Sie machen 5-10 % der Glioblastome aus [78,79,73] und treten in einem mittleren Alter von 40-45 Jahren auf [78,79,80,81,82]. IDH-mutierte Glioblastome haben ein geringeres Wachstum als IDH-wildtyp Glioblastome und dadurch eine bessere Prognose mit einem verlängerten mittleren Überleben von zusätzlichen 16 Monaten [79,81,73,74,75,76]. So liegt das mittlere Überleben von Patienten mit IDH-mutiertem Glioblastom nach Standardtherapie, bestehend aus Operation, Bestrahlung und Chemotherapie bei 31 Monaten [73].

Männer sind leicht häufiger vom IDH-wildtyp Glioblastom betroffen als Frauen. Auf eine erkrankte Frau kommen 1,05-1,12 erkrankte Männer. Dies erklärt sich aus der Entwicklung der IDH-mutierten Glioblastome aus geringergradigen Astrozytomen. Diese weisen mit 1,17 erkrankten Männern auf eine erkrankte

Frau, ein ähnliches Geschlechterverhältnis auf [33,73,79,81]. Aufgrund der längeren Entwicklung aus weniger malignen Tumoren haben Patienten auch bereits eine Symptombdauer von über 15-16 Monaten [73,81].

Weiterhin zeichnen sich IDH-mutierte Glioblastome durch weitere genetische Veränderungen aus. Häufig mutierte Gene sind das p53-Gen (81%) und das ATRX-Gen (71%) [73], sowie ein Verlust des langen Arms von Chromosom 19 (54%) [78]. 26-28 % der IDH-mutierten Glioblastome besitzen eine Mutation des TERT-Gens [73,86,87,88], wohingegen sich eine PTEN-Mutation mit 4% nur sehr selten bei IDH-mutierten Glioblastomen findet [84,85].

IDH-wildtyp Glioblastome stellen mit 90-95 % die Mehrheit dar und treten vor allem in Patienten über dem 55 Lebensjahr auf [77,73,79,80,81]. So liegt das mittlere Alter bei Diagnose eines IDH-wildtyp GB bei 55-62 Jahren [78,79,80,81,82]. Aufgrund der Entstehung ohne Vorläufertumore haben Patienten mit einem IDH-wildtyp Glioblastom vor Diagnosestellung meistens nur eine kurze Symptombdauer von unter drei bis zu sechs Monaten [78,81]. IDH-wildtyp Glioblastome finden sich mit 1,4 betroffenen Männern auf eine betroffene Frau häufiger bei Männern [33,73,79,81].

IDH-wildtyp GB weisen in nur 27 % eine p53-Mutationen auf [73]. Dafür ist eine Überexpression des epithelialen Wachstumsfaktor Rezeptors (EGFR) bei 25-35 % der Tumoren zu finden [73,79,81,82,83]. Bei 17-32 % der IDH-wildtyp Glioblastome findet sich eine Mutation des Tumorsuppressor Gens PTEN [73,84,85]. Mit 72-80% der IDH-wildtyp Glioblastome weisen außerdem die Mehrheit eine aktivierende Mutation in der Promotorregion des Telomerase Reverse Transkriptase (TERT) Gens auf [73,86,87,88]. Eine inaktivierende Mutation des Alpha-Thalassämie-Geistige Retardierung-Syndrom (ATRX)-Genes findet sich bei 7 % der IDH-wildtyp Glioblastome [89,90]. Außerdem findet man in IDH-wildtyp Glioblastomen oft eine stark erhöhte Expression von VEGF [81,91].

Die Einteilung von IDH-wildtyp und IDH-mutiertem Glioblastom mit häufigen Mutationen werden in Abbildung 5 zusammengefasst.

IDH-wildtyp Glioblastome und IDH-mutierte Glioblastome zeigen trotz einer gleichen Tumormorphologie unterschiedliche molekulare Mutationen und eine stark unterschiedliche Gesamtprognose [49,73,92].

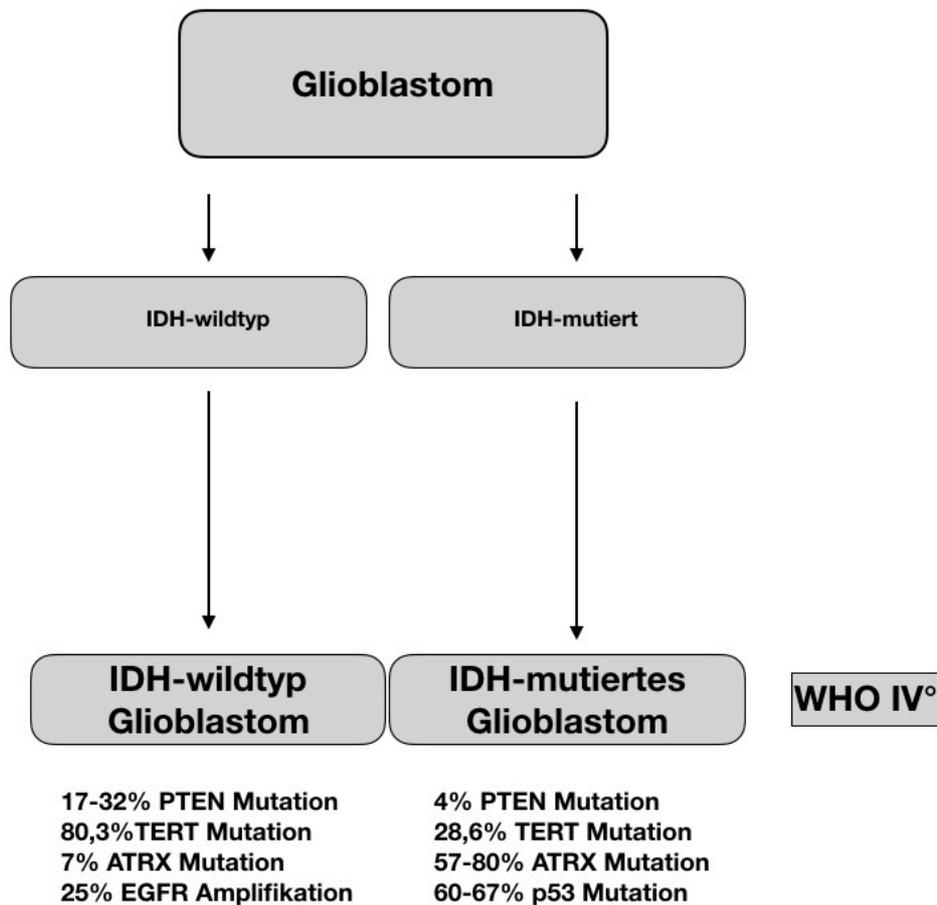


Abbildung 5: Einteilung des Glioblastoms in IDH-wildtyp und IDH-mutiertes Glioblastom mit jeweils häufigen Mutationen. Modifiziert nach Louis et al [73].

Glioblastome wachsen meist subkortikal, können aber auch im Kortex präsent sein. Sie sind in allen Hirnlappen zu finden, genauso wie im Corpus Callosum (Balken), Fornix oder Thalamus. So zeigt Abbildung 1 beispielweise ein subkortikal, im Temporallappen gelegenes Glioblastom. Eine Sonderform stellen Schmetterlingsgliome dar. Diese breiten sich vom Balken in die frontalen Marklager der Hemisphären aus [15]. Generell sind primäre Gliome vor allem supratentoriell beschrieben [73,81]. Für sekundäre Glioblastome mit IDH1-Mutation ist zudem eine starke Häufung im Frontallappen, insbesondere in der Region um die rostralen Erweiterungen der lateralen Ventrikel beschrieben

[81,93]. Hämatogene und lymphogene Metastasierung erfolgt beim Glioblastom nur selten [40,94,95,96].

### 1.1.2 Symptomatik und Diagnosestellung

Ausprägung und Art der klinischen Symptomatik eines Glioblastom sind abhängig von der Lage des Tumors und des durch ihn induzierten erhöhten intrakraniellen Drucks. So sind Kopfschmerzen, Ataxie, Schwindel, Synkopen, Sehstörungen oder Krampfanfälle häufig [49,15,97,98,99]. Des Weiteren können fokale neurologische Defizite, Persönlichkeitsveränderungen, Verwirrtheit, Gedächtnisverlust oder andere organische Psychosyndrome vorkommen [49,104].

Im Rahmen der Erkrankung kommt es oft zu einem Fatigue Syndrom und Depressionen, sowie zu Komplikationen der Therapie, wie einem Cushing Syndrom oder einer bakteriellen Infektion. Außerdem kommen im Verlauf der Krankheit Krampfanfälle, venöse Thromboembolien und kognitive Dysfunktion gehäuft vor [49,100].

Die Verdachtsdiagnose eines Glioblastoms wird meistens über die Magnetresonanztomographie (MRT) gestellt [49,15,187].

Glioblastome zeigen im MRT meist eine ausgedehnte Tumordinfiltration mit starker Kontrastmittelanreicherung, sowie unklarer Tumorbegrenzungen (siehe Abbildung 1) [15,101]. Zudem können Zysten, Blutungen und ausgedehnte Ödeme erkennbar sein [15]. Neben Ödemen sind außerdem zentrale Nekrosen für ein Glioblastom typisch [49,101]. Um bestmögliche Biopsieorte zu identifizieren, zur Festlegung der Intensität der Strahlentherapie, sowie um mögliche Strahlennekrosen von Tumorrediven zu unterscheiden, wird die Positronenemissionstomographie (PET) eingesetzt [15]. Zur weiteren präoperativen Diagnostik gehört außerdem die Liquorpunktion um eventuelle Differentialdiagnosen wie Abszesse oder eine Meningeosis gliomatosa auszuschließen [15].

Die Gewebeentnahme bei chirurgischer Intervention ist ein Schlüsselement in der Diagnostik des Glioblastoms. Auch bei nicht operablen Tumoren sollte eine

Biopsie durchgeführt werden um das molekulare Profil des Tumors zu untersuchen [101]. Danach kann neben der histologischen Klassifizierung und molekularen Feststellung von Mutationen zur Sicherung der Diagnose eine Untersuchung auf das saure Gliafaserprotein (GFAP) oder den Oligodendrozyten Transkriptionsfaktor 2 (OLIG2) durchgeführt werden [48,97].

### 1.1.3 Therapie und Prognose

Aufgrund des infiltrativen und hochproliferativen Wachstums des Tumors ist eine komplette chirurgische R0 Resektion und somit eine kurative Operation nicht möglich [15,97].

Die aus Endothelzellen, Perizyten und Astrozyten gebildete Blut-Hirn-Schranke erschwert eine Therapie zusätzlich, denn der dichte Zellverbund um die Gefäße behindert, wie in Abbildung 6 sichtbar, die Diffusion von im Blut gelösten Bestandteilen in das Hirnparenchym [102,103].

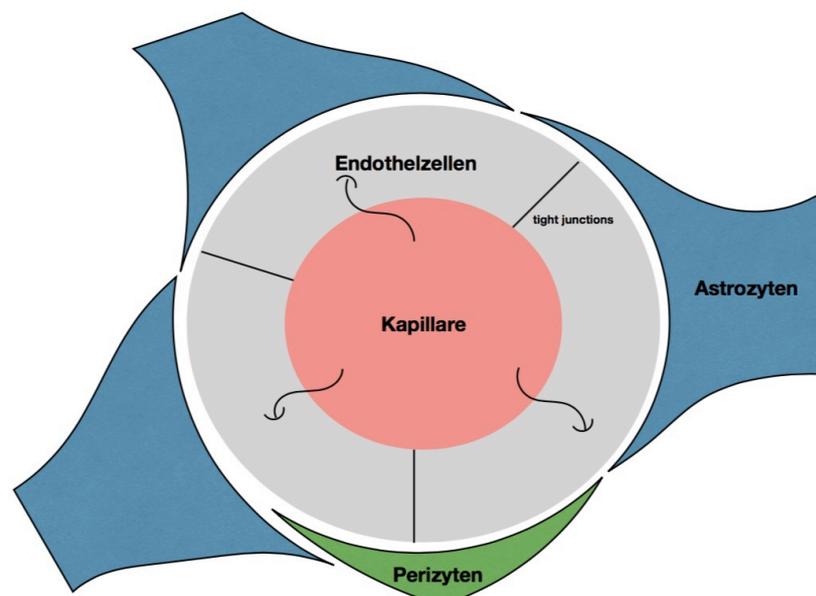


Abbildung 6: Darstellung der Blut-Hirn-Schranke. Kapillarendothelzellen sind durch Tight junctions eng verbunden. Sie bilden mit Perizyten und Astrozyten die Blut-Hirn-Schranke zwischen Blutgefäß und Hirnparenchym. Durch den engen Zellverbund wird die Diffusion von Blutbestandteilen in das Hirngewebe erschwert. Modifiziert nach Larsen et al. [102].

Außerdem sind die zentralen Tumorzellen in den hypoxischen Arealen, trotz einer Vielzahl neuer Gefäße, resistent gegenüber Bestrahlung [97,104,105]. Des

Weiteren besteht nicht nur eine ausgeprägte Heterogenität zwischen den verschiedenen Glioblastomen, sondern auch eine starke intratumorale Heterogenität. Jeder Tumor weist viele Zellen mit unterschiedlichen Mutationen auf, was eine individuelle Therapie weiter erschwert [106,107,108,109].

Einen weiteren Teil der heterogenen Tumorzusammensetzung stellen die CD133 positiven Gliomstammzellen dar. Diese sind multipotent, besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung [110,111,112,113] und stehen in enger Verbindung zur sogenannten Mikroumgebung des Glioblastoms. Diese besteht unter anderem aus Endothelzellen, T-Lymphozyten und Mikroglia-Zellen. [114,115,119,124,125]. Durch eine vermehrte Expression von VEGF aktivieren die Gliomstammzellen in der Nähe befindliche Endothelzellen. Diese werden zur Proliferation und Migration angeregt, was die Angiogenese des Tumorgewebes in der Nähe des Tumorgewebes fördert [116,117,118].

Über die Ausschüttung von Monozyten chemotaktisches Protein-3 (MCP-3), Kolonie stimulierender Faktor 1, Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (G-CSF) oder Hepatozyten Wachstumsfaktor durch die Tumorzellen werden Mikroglia Zellen chemotaktisch zum Tumor gezogen und wandern in diesen ein [119].

Tumorzellen produzieren des Weiteren anti-inflammatorische Zytokine wie Interleukin (IL)-10, IL-4, IL-6, transformierungs-Wachstumsfaktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) oder Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). Insbesondere TGF- $\beta$  unterdrückt die Aktivierung und Proliferation von Mikroglia-Zellen. So sind die im Tumor vorkommenden Mikroglia-Zellen zwar aktiv, aber nicht in einem entzündungstypischen Phänotyp [119].

Mittels der Mikroglia wird die Invasivität des Tumors gesteigert [120]. Dies geschieht durch den verstärkten Abbau von extrazellulärer Matrix. So produzieren Mikroglia-Zellen, nach Stimulation durch die Tumorzellen verstärkt Membran Typ 1 Metalloprotease (MT1-MMP). Diese aktiviert die Matrix Metalloprotease 2 (MMP-2), welche von den Tumorzellen freigesetzt wird. Beide Proteasen degradieren die umliegende extrazelluläre Matrix [119]. Außerdem schütten Mikroglia-Zellen viel IL-1 aus, welches die Genexpression von TGF- $\beta$  verstärkt [121]. TGF- $\beta$  kann wiederum durch die Inhibition der lymphozytären

Proliferation, einer reduzierten Aktivierung von Immunzellen oder der Inhibition der Antigen-Präsentation die körpereigene Abwehrreaktion gegenüber dem Tumor reduzieren [122]. Außerdem wird mittels TGF- $\beta$ , über eine verstärkte VEGF-Expression die Angiogenese, über die EGFR-Expression die Proliferation und mittels der Induktion der Matrix Metalloprotease-9 (MMP-9) die Invasivität des Tumors gesteigert [123].

Neben der Infiltration von Mikroglia-Zellen kommt es außerdem zu einer Invasion von T-Zellen. Diese lassen sich unterteilen in CD8 positive zytotoxische T-Zellen und CD4 positive T-Helferzellen. Beide Zelltypen kommen in Glioblastomen vor [124,125]. Insbesondere die regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ ), eine Untergruppe der CD4 positiven T-Zellen [126] kommen in Glioblastomen vor [127] und haben eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit den Tumorzellen, welche die  $T_{reg}$ -Zellen mittels CCL2 und CCL22 chemotaktisch anlocken [128]. Aufgrund dessen kommen  $T_{reg}$ -Zellen verstärkt in Glioblastomen vor [129]. Diese Zellen sind CD4 und CD25 positiv und durch das Antigen FoxP3 gekennzeichnet und spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Immunantwort des Körpers [119,130,131,132]. Um eine Überaktivität des Immunsystems zu verhindern, sezernieren sie die Zytokine IL-10, IL-35 und TGF- $\beta$  und inhibieren mit ihnen die Funktion anderer Immunzellen. Durch diese Funktion limitieren sie aber auch die immunologische Abwehrreaktion gegenüber den Tumorzellen [126,133]. Mittels dem Anstieg von TGF- $\beta$  begünstigen  $T_{reg}$ -Zellen wie oben beschrieben eine Vielzahl der Tumorprozesse [119] und mittels der Exprimierung der Hämoxygenase-1 [130] steigern sie die Proliferation, Überleben und Angiogenese des Tumors [134].

Ein weiteres Beispiel für die Interaktion zwischen Mikroumgebung und Tumor ist die Expression von programmierter Zelltod Protein (PD)-1 Rezeptor Liganden (PD-L1) durch die Glioblastomzellen [135], welcher in der Mehrheit der Glioblastome exprimiert wird [136]. Dieser kann die Funktion von CD8+ T-Lymphozyten, welche den PD-1 Rezeptor tragen, unterdrücken und so ihre zytotoxische Aktivität unterbinden und die Apoptose der CD8+ T-Lymphozyten einleiten [137,138,139]. PD-L1 verringert dabei den Glukoseverbrauch, die Zytokinproduktion und die Proliferation von T-Lymphozyten [140]. Außerdem

verstärkt PD-L1 die Aktivität von T<sub>reg</sub>-Zellen, was die Immunantwort gegenüber dem Tumor verringert [169]. Die Expression von PD-L1 ist insbesondere an den Tumorrändern gesteigert, da es dort zu einer vermehrten Interaktion mit den T-Lymphozyten kommt [139,141]. Diese sezernieren nach Antigenkontakt vermehrt Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), welches in Tumorzellen die Expression von PD-L1 erhöht [135,139]. Auch die bei 25 % der primären Glioblastome vorkommende PTEN-Mutation [79] führt über eine Aktivierung der PI(3)K-Kaskade zu einer verstärkten PD-L1 Expression und dadurch zu einer verringerten Immunantwort gegenüber den Gliomzellen [142].

Zudem steigert die Hypoxie im Tumorareal die Expression von PD-L1. Die Hypoxie vermittelt eine verstärkte Aktivität von HIF-1 $\alpha$ , welche an eine Promotorregion von PD-L1 bindet und so die Expression des Liganden steigert [139,143]. Die Tumorzellen sezernieren außerdem IL-10, welches die umgebenden Mikroglia-Zellen zur PD-L1 Expression anregt, wodurch diese immunsuppressiv tätig werden [139,144,145].

All diese Interaktionen dienen dem Tumor dazu, das körpereigene Immunsystem zu supprimieren und eine immunologische Reaktion zu verhindern, sodass beispielsweise eine erhöhte PD-L1 Expression ein negativer prognostischer Faktor für das Überleben von Glioblastompatienten darstellt [146].

Angesichts der Tatsache, dass eine Heilung nicht möglich ist, ist das Ziel der Therapie des Glioblastoms das beschwerdefreie Überleben so lange wie möglich zu ermöglichen und das Tumorstadium zu reduzieren oder zumindest zu verlangsamen. Die Operation sollte möglichst makroskopisch vollständig sein, dabei aber die neurologischen Funktionen des Patienten erhalten [15]. Die Radikalität der Resektion ist einer der wichtigsten prognostischen Faktoren bei der Behandlung des Glioblastoms. Sie beeinflusst auch die Effizienz der adjuvanten Chemotherapie mit Temozolomid [105,147]. Während der Tumorsektion kann 5-Aminolevulin Säure (ALA), eine fluoreszierende Substanz, welche das Tumorgewebe anfärbt, eingesetzt werden, um das gesunde Hirngewebe vom tumorösen zu unterscheiden und so eine größere

Tumorresektion zu erreichen [101,148]. Eine damit erreichbare erweiterte Tumorresektion verlängert das Überleben der Patienten [148,149,150].

Um die Therapieziele zu erreichen gehören Chirurgie, Bestrahlung und Chemotherapie als die drei großen Säulen zur Standardtherapie des Glioblastoms [101]. Damit kann zunächst eine starke Besserung der Symptome erreicht werden. Das Auftreten von Rezidiven ist aber unvermeidbar [15].

Die Standardtherapie eines Glioblastoms bis zum 70. Lebensjahr besteht aus einer größtmöglichen chirurgischen Resektion, gefolgt von einer Bestrahlung des betroffenen Feldes und einer begleitenden Chemotherapie bestehend aus 6 aufeinander folgenden Zyklen Temozolomid. Daran schließt sich eine weitere adjuvante Chemotherapie mit Temozolomid (TMZ) an. [27,101,16].

Temozolomid ist ein alkylierendes Chemotherapeutikum, welches schnell und vollständig nach oraler Aufnahme absorbiert wird und die Blut-Hirn-Schranke überschreiten kann [151,154]. Mittels spontaner Hydrolyse wird es beim physiologischen pH-Wert in seinen aktiven Metaboliten Monomethyl-Triazenoimidazole-Carboxamide (MTIC) umgewandelt, welches anschließend mittels Methylierung der O<sup>6</sup> oder N<sup>7</sup>-Position des Guanins, sowie der N<sup>3</sup>-Position des Adenins in der DNA den gewünschten DNA-Schaden verursachen kann (siehe Abbildung 7). Seine maximale Plasmakonzentration nach oraler Einnahme wird nach 30-90 Minuten erreicht [152,153,160]. Temozolomid wird meistens gut vertragen [27,154,155] und beeinflusst die Lebensqualität im Vergleich zur reinen Bestrahlung nicht zusätzlich [27].

Mögliche Nebenwirkungen sind hämatologisch-toxische Effekte, Hautausschläge, erhöhte Leberenzyme, Asthenie, Fatigue, sowie gastrointestinale Nebenwirkungen [16,154].

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass Temozolomid die Wirkung der Strahlentherapie verstärkt, wenn die Therapie konkomitant erfolgt. So induziert TMZ einen Zellzyklusarrest in der G2/M Phase von Glioblastomzellen. Da diese Phase die Bestrahlungssensitivste ist, wird die Radiotherapie effektiver. Außerdem verstärkt TMZ auch die durch die Bestrahlung erzeugten DNA-Doppelstrangbrüche [27,156,157,158,159].

Mit dieser Therapie aus Operation, Bestrahlung und Temozolomid konnte das gemittelte Gesamtüberleben auf 14,6 Monate verlängert werden. Auch das 2-Jahresüberleben konnte auf 27,2 % erhöht werden. Nach 5 Jahren leben noch 9,8 % der so behandelten Patienten [31,16,17,18,25,26].

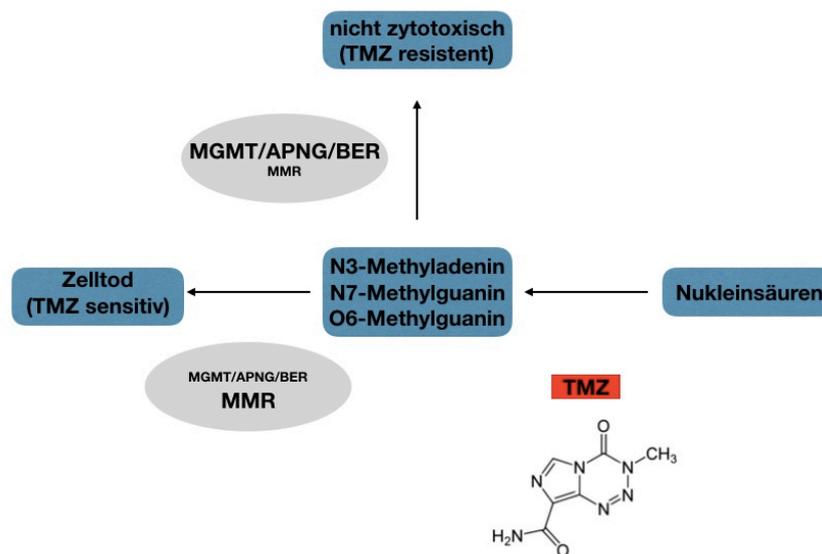


Abbildung 7: Darstellung der Wirkweise von Temozolomid und der möglichen Reparatur durch MGMT. Temozolomid bewirkt als alkylierendes Chemotherapeutikum eine Methylierung der O<sup>6</sup> oder N<sup>7</sup> Position des Guanins oder der N<sup>3</sup> Position des Adenins. Mittels DNA-Mismatch Reparatur (MMR) wird bei TMZ sensitiven Zellen die Apoptose eingeleitet. Sind jedoch die Alkylpurin-DNA-N-Glycosylase (APNG), die Basenexzisionsreparatur (BER) oder die MGMT als DNA-Reparaturenzyme aktiv, werden die DNA-Schäden repariert und die Zellen sind TMZ resistent. Modifiziert nach Lee [160].

Bei Patienten über 70 Lebensjahren sollte unbedingt der Status des MGMT-Promotors erfasst werden. Patienten ohne MGMT-Promotormethylierung sollten genauso wie Patienten mit unbekanntem MGMT-Status eine hypofraktionierte Bestrahlung zur Reduktion der Tumormasse erhalten. Patienten mit MGMT Promotormethylierung sollten entweder nur eine Chemotherapie mit Temozolomid oder aber eine Strahlentherapie mit konkomitanter Temozolomid-Gabe und anschließender adjuvanter TMZ-Therapie erhalten [16,101]. Eine Behandlung mit TMZ zeigt auch bei älteren Patienten nur eine geringe Toxizität und entspricht hinsichtlich der Wirksamkeit einer Bestrahlung [161,162].

Bei einem Rezidiv nach Primärtherapie mit TMZ kann nach einem TMZ freien Intervall von 2 Monaten wieder TMZ verabreicht werden. Dies sollte jedoch nur bei Patienten mit einem methyliertem MGMT-Promotor geschehen [31]. Bei Patienten ohne MGMT-Promotormethylierung wird im Rezidivfall der Nitrosoharnstoff Lomustin eingesetzt. Mit dieser Therapie kann bei 20-30 % der Patienten ein weiteres progressionsfreies Überleben von 6 Monaten erreicht werden [22,163,164,165].

Eine erneute Resektion des Tumoreals bei Rezidiv kann bei kompletter Resektion des Kontrastmittelaufnehmenden Gewebes die Situation der Patienten verbessern [166].

Als weitere Therapieoption steht der VEGF-Antikörper Bevacizumab zur Verfügung. Dieser verlängert das progressionsfreie Überleben um drei bis vier Monate, kann das Gesamtüberleben jedoch nicht positiv beeinflussen [167,168]. Aufgrund seines positiven Einflusses auf die Symptomatik und seiner antiödematösen Effekte wird er insbesondere bei progressiven Glioblastomen verwendet [101].

Neben der bisherigen Therapie scheint eine Immuntherapie ein vielversprechender Ansatz zu sein um mittels der verschiedenen molekularen Signalwege die Expression von Faktoren wie PD-L1 gezielt zu unterbinden [169,170,171,172] und so die immunologische Reaktion gegen den Tumor zu stärken [138].

Mit PD-1/PD-L1 Inhibitoren wie Nivolumab oder Pembrolizumab, die bei Melanomen oder Bronchialkarzinomen bereits Therapieerfolge aufweisen [173,174,175,176,177,178], konnten auch beim Glioblastom erste vielversprechende Ergebnisse erzielt werden [179,180,181]. So konnte mit einer Kombination aus PD-1-Blockade und Bestrahlung das Überleben von Mäusen mit Glioblastom signifikant verlängert werden. Im Mausmodell wurde zudem eine erhöhte Tumordinfiltration durch CD8+ zytotoxische T-Zellen und eine verringerte Anzahl von Treg-Zellen beobachtet [179]. Dieser Effekt wurde auch in anderen Tumorarten festgestellt [182].

Als Nebenwirkungen einer PD-1/PD-L1 Inhibitor Therapie können Ausschläge, Colitiden, Diarrhö, Fatigue auftreten. Aufgrund der generellen Aktivierung des Immunsystems bei Blockade von PD-L1 können jedoch auch vermehrt Autoimmunreaktionen wie eine Hypophysitis, Hepatitis, Pankreatitis, Iridozyklitis, Nephritis, Neuropathien oder Lymphadenopathien auftreten [183,184,185].

Die Prognose bei Diagnose eines Glioblastoms ist schlecht, unterscheidet sich aber je nach Lage und den molekularen Biomarkern des Tumors. Für die individuelle Prognose spielen das Vorliegen einer IDH Mutation, der MGMT-Promotorstatus, sowie die Lage des Tumors mit der damit verbundenen Resektionsmöglichkeit relevante Rollen [81,27,148].

Zusammengenommen überleben nur ein Viertel der Glioblastompatienten die ersten beiden Jahre [27,186] und nur 5% die fünf Jahre nach Diagnosestellung [3,32].

Da die Behandlung des Glioblastoms somit bisher an ihre Grenzen stößt und die Prognose für die betroffenen Patienten schlecht ist, ist es nötig, weitere Behandlungsstrategien zu entwickeln [187]. Viele unterschiedliche Therapieideen werden bereits verfolgt [188]. Eine dieser Ideen ist die Modifizierung der basic Helix-Loop-Helix Proteine wie bei Beyeler et al. [189] gezeigt.

## **1.2 basic Helix-Loop-Helix (bHLH) Proteine**

### **1.2.1 Allgemeine Eigenschaften der bHLH Proteine**

Basic Helix-Loop-Helix (bHLH) Proteine sind eine große Gruppe von Transkriptionsfaktoren, welche in den meisten Organismen vorhanden sind und wesentliche Funktionen in Entwicklungsprozessen haben. So haben sie beispielsweise Einfluss auf die Entwicklung der Blutzellen oder die Entwicklung von Neuronen und Muskulatur [190,196,191,192,193,194,201,223].

bHLH-Proteine bestehen aus zwei hochkonservierten und funktionell klaren Domänen, welche zusammen aus rund 60 Aminosäuren bestehen. Am Aminosäureende liegt die basische Domäne, welche den Transkriptionsfaktor an Hexanukleotide der DNA bindet [190,195,217,]. Diese Hexanukleotide werden E-Box genannt. Verschiedene Familien von bHLH-Transkriptionsfaktoren binden dabei an unterschiedliche E-Box Sequenzen. Am Carboxylende des Proteins befindet sich die Helix-Loop-Helix (HLH)-Domäne, welche eine Interaktion mit anderen Proteinen in Form einer Hetero- oder Homodimerisierung ermöglicht. [190,217].

Die hoch konservierten HLH-Domänen bestehen aus zwei amphipathischen Helices, welche von einem Loop getrennt werden. Die amphipathischen Helices weisen auf der einen Seite hydrophile Aminosäure-Reste und auf der anderen Seite hydrophobe Aminosäure-Reste auf. Über die Bildung von van der Waals Bindungen vermitteln die hydrophoben Reste die Homo- beziehungsweise Heterodimerisierung mit anderen Transkriptionsfaktoren und sind somit wichtiger Bestandteil der Aktivierungsdomäne der Transkriptionsfaktoren. Der bei der Dimerisierung entstehende Bund aus vier Helices ermöglicht es der benachbarten basischen Domäne an die DNA zu binden [197,201,210]. Die Bindung geschieht dabei bei bHLH-Proteinen an E-Boxen mit der Sequenz 5'-CAXXTG-3', wobei die beiden zentralen Basen (-XX-) für jedes Protein spezifisch sind [210].

Die HLH-Proteine werden auf Basis ihrer funktionellen Beziehungen und ihres Genexpressionsverhaltens in sieben Klassen eingeteilt [201]. Die Klassen unterscheiden sich unter anderem in Hinblick auf ihre E-Box Sequenzen und ihrer funktionellen Domänen [196,197,198,201]. Neben ihrer strukturellen beziehungsweise funktionellen Klassen werden die bHLH Transkriptionsfaktoren - auch im Hinblick auf ihre transkriptionelle Aktivität - in drei Untergruppen unterteilt: Aktivatoren (Klasse II), Inhibitoren (Klasse V) und Transaktivatoren (Klasse I) [199,200].

### 1.2.2 Klasse I bHLH Transkriptionsfaktoren und E-Proteine

Klasse I bHLH Transkriptionsfaktoren werden auch E-Proteine genannt und sind ubiquitär exprimiert. E12, E47, HEB und E2-2 sind Beispiele dieser Klasse [201,202,203]. Sie spielen eine große Rolle bei der Zelldifferenzierung, Zellabstammung und der Expression gewebespezifischer Gene. So wirken sie beispielsweise bei der Neurogenese, Myogenese, Hämatopoese oder der Entwicklung des Pankreas mit [201,204,205,206,207]. Sie kontrollieren ebenfalls die Differenzierung der neuronalen Stammzellen und beeinflussen das Zellzyklusverhalten der Stammzellnachkommen mittels der Transaktivierung von proneuronalen bHLH-Proteinen wie Achaete-scute Komplex Homolog 1 (Ascl1) [199]. Da sie jedoch ubiquitär exprimiert werden, müssen sie, um eine gewebespezifische Wirkung zu entfalten, mit spezifischen Bindungspartnern interagieren. Mittels ihrer HLH-Domäne bilden sie deswegen Heterodimere mit gewebespezifischen bHLH-Proteinen wie MyoD und NeuroD oder bilden Homodimere [202,208,209,218]. Hetero- sowie Homodimere der Klasse I bHLH Transkriptionsfaktoren binden an bestimmte E-Box Sequenzen der DNA. E-Box Elemente sind DNA-Elemente, welche die Zell-Typ spezifische Gentranskription vermitteln. Die E-Box Sequenz der Klasse I bHLH Transkriptionsfaktoren lautet -CANNTG- [201,202,209,210,218].

E-Proteine enthalten mindestens zwei Transaktivierungsdomänen, welche als AD1 und AD2 bekannt sind. Die AD1-Domäne reguliert die transkriptionelle Aktivität der E-Proteine durch die Rekrutierung des p300-Proteins oder Mitgliedern der Acht-Einundzwanzig (ETO)-Proteinfamilie. Die Histon-Acetyltransferase p300 aktiviert die Genexpression der E-Proteine, während die ETO-Proteine repressiv auf die transkriptionelle Aktivität wirken [211,212,213,214,215,216].

Die beiden Vertreter der Klasse I bHLH Transkriptionsfaktoren E12 und E47 sind zwei Produkte des E2A Genes. Durch alternatives Splicing beziehungsweise die Verwendung verschiedener Exons entstehen E12 und E47 [217,218]. Das E2A Gen ist auch als Transkriptionsfaktor 3 (TCF3) bekannt [219]. Bis auf das

jeweilige Exon sind die Proteine identisch [218,220]. E47 präferiert die Homo- vor der Heterodimerisierung [209].

E2A Proteine sind essentielle Regulatoren der B- und T-Lymphozyten Entwicklung [221,223,224] und wirken als Tumorsuppressoren. Zudem sind E2A-Proteine in der Regulation des Zellzyklus beteiligt [201,265]. So können sie Zellen in der G1-Phase halten und das Fortschreiten des Zellzyklus verhindern. Diese Wirkung wird über die transkriptionelle Aktivierung der Expression des Inhibitors Cyclin-abhängiger Kinasen (CDK1) (p21) vermittelt. Über diesen Weg inhibieren die E-Proteine möglicherweise auch die Zellproliferation [220]. E47 Mutationen verursachen Agammaglobulinämie [222]. Mäuse mit einem Ausfall der E2A Proteine E12 und E47 überleben nur selten die perinatale Lebensperiode und zeigen einen kompletten Block der B- Zellentwicklung in den frühen Phasen der Zelldifferenzierung [222,223,224]. Mäuse die diese perinatale Phase überleben, bilden sehr oft T-Zell-Lymphome [225] und ein Verlust des E2A Gen Locus wird oft bei einer Untergruppe der T-Zell-Lymphome, dem Sézary-Syndrom, beobachtet [226]. Aktivierende Mutationen des E47-Proteins wurden außerdem bei Patienten mit Burkitt-Lymphom beschrieben [227].

E47 wirkt durch direkte Bindung an seine Regulationsregionen als transkriptioneller Repressor einer Vielzahl von Astrozyten-spezifischer Gene wie GFAP oder SLC. Aufgrund dessen wird vermutet, dass E47 die Differenzierung von neuronalen Stammzellen in Astrozyten über diesen Mechanismus blockiert. [228].

Ein E47 Dimer besteht aus vier alpha Helices und bindet mittels der basischen DNA Bindungsregion an die DNA. Neben der basischen Region kommen auch andere Teile des Dimers noch in Kontakt mit der DNA. Das in der basischen Region des Dimers vorhandene Glutamat stellt die Verbindung mit dem Cytosin oder Adenin innerhalb der E-Box Sequenz her. Ein benachbartes Arginin stabilisiert dabei die Position des Glutamats durch direkte Interaktion mit den Nukleotiden und dem Phosphodiester-Rückgrat der DNA [196,201,210,217].

Die DNA-Bindungsaktivitäten von E12 und E47 werden durch Mitglieder der ID-Proteine reguliert. Mittels posttranslationaler Phosphorylierung wird die Proteinstabilität und Aktivität der E2A-Proteine beeinflusst [216]

Eine Wiederherstellung der Aktivität der E2A Genprodukte in Tumoren macht ihre wichtige Rolle im Zellzyklus und ihren starken Einfluss in Tumorzellen deutlich. So verringern E12 und E47 in leukämischen T-Zellen das Zellwachstum der Tumorzellen, induzieren ihren Zelltod und steigern so die Menge an apoptotischen Zellen [229].

Das ebenfalls zur Klasse I gehörige E2-2, auch als TCF4 (Transkriptionsfaktor 4) oder ITF-2 (Immunglobulin Transkriptionsfaktor 2) bekannt, kodiert für die beiden Isoformen E2-2A und E2-2B und spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Nervensystems [230].

### 1.2.3 Klasse II bHLH Transkriptionsfaktoren und OLIG1/2

Klasse II bHLH Faktoren wie OLIG, MyoD, Myogenin, Atonal oder NeuroD zeigen eine gewebespezifische und restriktive Expression [201,202,236]. So ist MyoD in die Entwicklung der Myogenese und NeuroD in die Neurogenese eingebunden [194,231,232]. Die meisten Klasse II bHLH Transkriptionsfaktoren sind nicht in der Lage Homodimere zu bilden, beziehungsweise als solche an die DNA zu binden und bilden daher bevorzugt Heterodimere mit den Klasse I bHLH Proteinen um ihre transkriptionelle Wirkung zu entfalten [201,202].

OLIG1 und OLIG2 sind bHLH Proteine, die für die Entwicklung von Oligodendrozyten notwendig sind. Sie gehören zur Klasse II bHLH Transkriptionsfaktoren und sind neben der Oligodendrogenese auch für die Entwicklung von spinalen Motoneuronen wichtig. Beide Proteine werden in Vorläuferzellen von Oligodendrozyten im zentralen Nervensystem von Wirbeltieren beziehungsweise Menschen exprimiert und interagieren mit den E2A Proteinen E47 und E12 [233,234,235,236]. OLIG2 ist für die Proliferation der neuronalen Vorläuferzellen, sowie für die Gliomenstehung in Mäusen

notwendig. Dabei wirkt OLIG2 durch die Unterdrückung der p21-Expression [237]. OLIG2 verhindert außerdem die Interaktion von p53 mit verschiedenen seiner Zielgene, was die Apoptose von Zellen im Rahmen von zellulärem Stress oder toxischem DNA-Schaden verhindern kann [238].

OLIG2 ist primär im Zellkern lokalisiert, wohin es mittels Heterodimerisierung gelangt und seine transkriptionelle Wirkung entfalten kann. Mittels einer Induktion der ID-Proteine, beispielsweise durch das Knochen morphogenetische Protein 4 (BMP4) kann die Wirkung der OLIG-Proteine verringert werden. BMP4 induziert die Bildung von ID2 und ID4, welche OLIG2 und die E2A-Proteine im Zytoplasma sequestrieren. ID2 und ID4 bilden im Zytoplasma Komplexe mit OLIG1 und OLIG2 und verhindern die Translokation der OLIG-Proteine in den Nukleus. Da die Wirkung der OLIG-Proteine durch Heterodimerisierung mit den E2A Proteinen E12 und E47 vermittelt wird, können die ID-Proteine auch über die E2A Proteine die Wirkung der OLIG-Proteine verhindern. E12 und E47 werden von den ID-Proteinen zytoplasmatisch gebunden und stehen somit nicht mehr zur Heterodimerisierung mit OLIG1/2 zur Verfügung. Somit können die OLIG-Proteine nicht mehr in den Nukleus gelangen und ihre Wirkung entfalten. Um eine Inhibition der OLIG-Proteine zu erreichen muss jedoch ein kritisches Level der ID-Proteine im Zytoplasma vorliegen [235]. Mittels dieses Mechanismus inhibiert BMP4 die oligodendrozytische Zellreihenentwicklung [239,240,241].

Es besteht also ein enger Zusammenhang zwischen den Klasse I bHLH, Klasse II bHLH und Klasse V bHLH Transkriptionsfaktoren.

OLIG1 und OLIG2 sind in ihrer bHLH Domäne bis auf eine Loop-Region identisch, unterscheiden sich jedoch außerhalb dieser Domäne [242]. OLIG2 ist ein ZNS spezifisches Protein und in allen diffusen Gliomen erhöht exprimiert. Es gilt als Marker für ein Gliom, da es in anderen ZNS-Tumoren nicht erhöht exprimiert wird [48,243].

#### 1.2.4 Klasse V bHLH Transkriptionsfaktoren und ID-Proteine

Klasse V bHLH Transkriptionsfaktoren wie die ID (Inhibitor der Differenzierung) - Proteine besitzen keine basische DNA Bindungsdomäne. Sie regulieren, über die Bildung von nichtfunktionellen heterodimeren Komplexen mit Klasse I und II bHLH Transkriptionsfaktoren deren Aktivität. Aufgrund ihrer fehlenden basischen Domäne können die, per direkter Protein-Protein Interaktion gebildeten, Heterodimere nicht an die DNA binden. Somit senken ID-Proteine die Aktivität von anderen bHLH-Transkriptionsfaktoren [201,204,235,244,245,246,247]. So wird beispielsweise die jeweilige Zellreihenentwicklung gestört [221].

Es sind vier ID-Proteine bekannt (ID1-4). Dabei teilen sich alle vier Transkriptionsfaktoren dieser Proteinfamilie eine homologe Helix-Loop-Helix (HLH) Domäne [246,248,249,250,251].

ID-Proteine sind kleine, kurzlebige Proteine mit einer Lebensdauer von 10-20 Minuten [252] und werden über den Ubiquitin-Proteasom Weg 26 abgebaut. Dabei wird die Proteasom vermittelte Proteindegradierung mittels der E3-Ubiquitin Ligase reguliert, welche eine Ubiquitinkette an das Zielsubstrat bindet. Die Ubiquitin-Ligase ist der Gegenspieler der Deubiquitylase (DUB), welche durch Entfernung der Ubiquitinketten die Stabilität der Substrate wieder erhöhen. Durch die Regulation des Abbaus bestimmen die E3-Ubiquitin Ligase und die DUB das Level der ID-Proteine im Zytoplasma [219,253,254,255,256,257].

Über die Sequestrierung von E47 und die Bindung an das Retinoblastom (Rb) - Protein bewirken die ID-Proteine ein Fortschreiten im Zellzyklus und eine verstärkte Proliferation [260,261,264]. E47 Homodimere binden mit hoher Affinität an die E-Box Sequenzen der Promotorregion des p16<sup>ink4a</sup> Proteins und fördern so die Transkription des zugehörigen Gens [265].

P16<sup>ink4a</sup> ist ein Tumorsuppressor, welcher in vielen humanen Tumoren inaktiviert ist. Er vermittelt seine zellulären Effekte durch die Inhibition der Cyclin-abhängigen Kinasen 4 (CDK4) und 6 (CDK6), welche im Zellzyklus durch die Phosphorylierung des Rb-Proteins, die Progression in die G1-Phase vermitteln [258,259,267].

Das Rb-Protein bindet unphosphoryliert an den Transkriptionsfaktor E2 (E2F), welcher zur Aktivierung von wachstumsspezifischen Genen benötigt wird. Wird

das Rb-Protein phosphoryliert kann es jedoch nicht mehr an E2F binden, sodass dieses frei wird und die Progression des Zellzyklus über die Aktivierung wachstumsspezifischer Gene induziert [260]. ID2 bindet an Rb und verhindert so dessen Bindung an E2F, was ebenfalls zur Aktivierung der S-Phase Gene durch E2F führt [261,262,263]. Mittels der direkten Bindung von ID2 an Rb, wird dieses abgebaut und die Zellproliferation gesteigert [260,261,264].

Binden die ID-Proteine nun an E47 und sequestrieren dieses, so kann der Promotor des p16<sup>ink4a</sup> Proteins nicht mehr aktiviert werden und dessen tumorsuppressive Wirkung entfällt [220,261,265,266,267]. Die Wirkung zeigt sich bei einer Überexpression von ID1, welche in einer verlängerten Lebensspanne von humanen Keratinozyten resultiert [268,269].

Ähnlich hemmt ID1 auch die Wirkung von p21. P21 ist ein Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen und somit essentiell für die Transmission zwischen den verschiedenen Zellteilungsphasen. Eine Überexpression von E47 steigert die p21-Genexpression, was wiederum durch die Sequestrierung von E47 mittels ID1 verhindert werden kann [261,270].

Ist p21 gehemmt, wird Rb inaktiviert, sodass die Progression der Zelle in die S-Phase eingeleitet wird [260]. Rb hat zudem eine repressive Wirkung auf den Promotor von p16<sup>ink4a</sup>, sodass erhöhte Level von p16<sup>ink4a</sup> aus einer Inaktivierung von Rb resultieren [271].

Aufgrund dieser Funktionen sind ID-Proteine während der normalen Zelldifferenzierung herunter reguliert, wohingegen sich in proliferierenden Zellen eine vermehrte Expression der ID-Proteine findet [204,246,261,272,273,274,275].

In vielen Tumoren ist die Expression von ID-Proteinen erhöht, so auch im Glioblastom [189,276,277]. ID1-3 wird als Tumorpromotor angesehen, wohingegen ID-4 als Onkogen oder Tumorsuppressor agieren kann [278,279,280,281,282,283,284].

### **1.3 Zellkern Import**

Zwischen Zytoplasma und Nukleus besteht ein kontinuierlicher Austausch von funktionellen Molekülen. Dieser geschieht mittels der Kernporen einem Proteinkomplex in der Kernhülle eukaryotischer Zellkerne. Kleine Moleküle und Ionen werden hauptsächlich mittels passiver Diffusion durch sie hindurch transportiert, wohingegen große Moleküle einen selektiven Transportmechanismus benötigen [285,286,287,288,289,290,298]. Die meisten dieser größeren Moleküle besitzen ein Kernlokalisierungssignal (NLS). Im Folgenden werden die zu transportierenden Proteine vereinfachend Frachtproteine genannt.

Im klassischen nukleären Importweg, wird das NLS des Frachtproteins durch das Adapterprotein Importin  $\alpha$  erkannt und bindet das Frachtprotein. Außerdem bildet Importin  $\alpha$  einen Heterodimer mit dem eigentlichen Transporter Protein Importin  $\beta$ . Der Importin  $\alpha/\beta$ -Transportprotein-Komplex mit dem gebundenen Frachtprotein dockt anschließend an den Kernporen an, um transloziert zu werden [291,292,298]. Neben diesem klassischen nukleären Importweg gibt es eine Vielzahl weiterer Möglichkeiten, in denen Importin  $\beta$  mit einem Frachtprotein interagiert und dessen nukleären Import vermittelt [293,298]. Ein weiteres wichtiges Protein für den Importprozess ist das Protein small GTPase Ran, welches die Transportrichtung kontrolliert [294,295,296,298]. Im Zytoplasma liegt Ran in der GDP-gebundenen Form vor, wohingegen es im Nukleus als GTP-gebundene Form vorliegt. Die GTP-gebundene Form vermittelt die Dissoziation des Importkomplexes im Zellkern, wodurch die Frachtproteine ihre Funktion im Zellkern ausüben können und die Importproteine zurück ins Zytoplasma transportiert werden [297,298].

E47 gelangt mittels eines Mitgliedes der Importin  $\beta$  Familie in den Nukleus. Für diesen Transport wird Ran im Zytoplasma als GDP-gebundene Version benötigt.

Es wird aber davon ausgegangen, dass mehrere, sich überlappende Mechanismen für den nukleären Import bestehen. Außerdem wird diskutiert, ob E47 eine Rolle beim nukleären Importprozess von anderen bHLH Transkriptionsfaktoren wie NeuroD1 spielt [298].

## 1.4 Dominant negatives E47-Protein (dnE47)

Da die bHLH-Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle in der Regulation von Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Zelltod spielen und in Tumorgewebe teilweise vermehrt beziehungsweise reduziert exprimiert werden, war es von Interesse, den Einfluss dieser Faktoren auf das Tumorgewebe genauer zu untersuchen.

Bei einigen Agammaglobulinämie Patienten wurde bereits eine Substitutionsmutation innerhalb des E47 spezifischen Exons beschrieben [222]. Bei Boisson et al. lag eine E555K Mutation vor, bei der eine Lysin-Aminosäure eine Glutamat-Aminosäure an Kodon 555 ersetzt hatte. Das bei dieser Mutation ersetzte Glutamat ist wichtig für die Bindung des Proteins an die E-Box Sequenz -CANNTG-. Deswegen führte die Mutation zu war zu einem stabilen Protein, dieses konnte jedoch nicht mehr an die DNA binden [222,299]. Das mutierte E-Protein bildete mit anderen bHLH-Proteinen Heterodimere, die ebenfalls nicht an die DNA binden konnten und deswegen abgebaut wurden. Die Autoren sahen darin eine eventuelle Möglichkeit, so die Gruppe der ID-Proteine zu sequestrieren [222].

Fischer et al. [199] nutzten eine mutierte Form des E2A Proteins E47 zur Sequestrierung seiner Bindungspartner. Das mutierte Protein besaß keine Nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) und konnte somit von den Transportproteinen für den Zellkernimport erkannt werden. Es bildete im Zytoplasma mit anderen bHLH-Transkriptionsfaktoren normale Heterodimere, welche jedoch auch gemeinsam nicht in den Kern gelangen konnten und im Zytoplasma gemeinsam abgebaut wurden. Über eine Überexpression dieses mutierten E47 und die damit verstärkte Sequestrierung der Bindungspartner konnte eine Blockade der Zelldifferenzierung erreicht werden [199].

Beyeler et al. nutzten einen ähnlichen Ansatz. Sie fusionierten E47 zunächst mit dem Rot fluoreszierendem Protein (RFP) und erzeugten eine dominant negativ mutierte Form des E47, die kein Kernlokalisierungssignal mehr aufweist. Dieses Protein wurde dnE47 genannt. Auch dieses Protein wurde mit RFP fusioniert.

Abbildung 8 zeigt die E47 und dnE47 Fusionsproteine. Wie bei Barde et al. [300] beschrieben, wurde DnE47 mithilfe eines Doxycyclin induzierbaren lentiviralen Gentransfers in die Zellen eingebracht. Doxycyclin induzierte anschließend eine verstärkte Transkription der eingebrachten Gene. Eine Überexpression von dnE47 konnte die proliferative Wirkung der OLIG- und ID-Proteine verhindern. Somit konnte ein antiproliferativer Effekt durch dnE47 in Glioblastomzellen nachgewiesen werden [189].

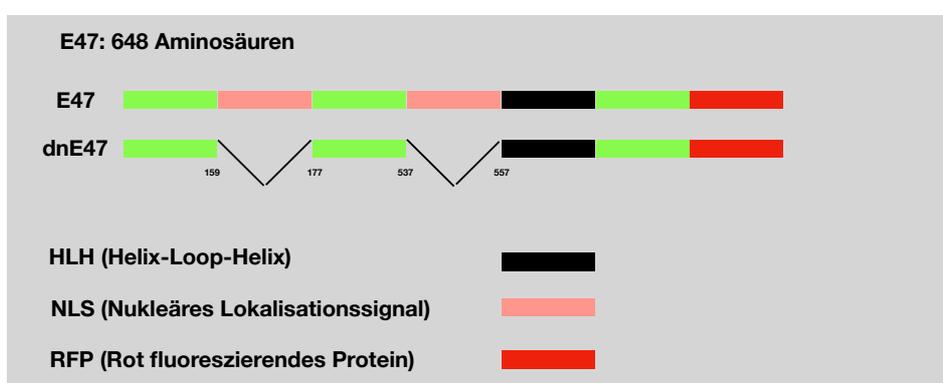


Abbildung 8: Darstellung des E47:RFP und dnE47:RFP Fusionsproteins

## 1.5 Zielsetzung der Doktorarbeit

Da Beyeler et al. zeigen konnten, dass dnE47 eine antiproliferative Wirkung auf Glioblastomzellen hat und die bisherige Standardtherapie des Glioblastoms, bestehend aus TMZ-Therapie und Bestrahlung, keine ausreichende Therapie darstellt, war es das Ziel dieser Arbeit, den bei Beyeler et al. gezeigten Ansatz genauer zu untersuchen. Da es bei Beyeler et al. zwischen verschiedenen Zelllinien unterschiedliche Ergebnisse gab sollte dazu der dnE47-Ansatz bei anderen Zelllinien getestet werden. Dabei sollte untersucht werden, ob er auf andere Gliomzelllinien übertragen werden kann, beziehungsweise ob der gezeigte Effekt generalisierbar ist. Da sich Gliomzelllinien hinsichtlich ihres Genotyps unterscheiden würde dies darauf hindeuten, dass der dnE47-Ansatz in Glioblastomzellen unabhängig von deren Genotyps eine antiproliferative Wirkung hat.

Weitergehend sollte ergründet werden, ob die bisherigen Therapieformen des Glioblastoms, genauer die Strahlen- und Chemotherapie, mit der Wirkung des dnE47 Ansatzes interagieren. Dazu sollte untersucht werden, ob sich die antiproliferativen Effekte des dnE47-Ansatzes durch eine begleitende Bestrahlung oder TMZ-Gabe verstärken lassen und somit synergistische oder immerhin additive Effekte zwischen den Therapieformen bestehen.

Eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit war es, die genauen Auswirkungen des dnE47-Ansatzes hinsichtlich des Zellwachstums und der Interaktion mit seinen Bindungspartnern genauer zu erfassen. Aufgrund der Interaktion der E-Proteine mit anderen bHLH-Transkriptionsfaktoren und deren Einfluss auf das Zellwachstum und das Fortschreiten im Zellzyklus sollte bei dieser Arbeit auch der Einfluss von dnE47 auf andere Moleküle untersucht werden. Dabei stand insbesondere der Einfluss auf andere bHLH-Transkriptionsfaktoren wie ID1 im Fokus. Neben der Frage nach den Interaktionen und dem Einfluss auf andere Moleküle sollte auch das molekulare Netzwerk nach dnE47 Aktivierung genauer untersucht werden. Es stellte sich die Frage, ob es neben möglichen direkten Interaktionen mit den Bindungspartnern auch molekulare Effekte hinsichtlich der Proteintranskription durch eine Aktivierung des dnE47 gibt. Um diese Fragestellungen zu beantworten, wurden die dnE47 und RFP LN229-Zellen zunächst mittels Virustransduktion erzeugt und vermehrt. Im Anschluss erfolgten die Phänotypisierung der Zellen mittels Immunzytochemie und Western Blot sowie die Therapietestungen mittels Klonogenitäts- und Zytotoxizitäts Assays. Als Letztes erfolgte die Untersuchung der molekularen Auswirkungen mittels des sogenannten CAGE.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Materialien**

## 2.1.1. Chemikalien und Puffer für die Zellkultur

Tabelle 1: Chemikalien und Puffer

<b>Chemikalie/Puffer</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Dulbecco´s Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)</b>	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
<b>Accutase</b>	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
<b>Dulbecco´s Modifizierte Medien (DMEM)</b>	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
<b>Fetales Kälberserum (FCS)</b>	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
<b>Gentamycin</b>	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
<b>Temozolomid</b>	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
<b>Dimethylsulfoxid (DMSO)</b>	Applichem, Darmstadt, Deutschland
<b>Doxycyclin</b>	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
<b>Kristallviolett</b>	VWR, Darmstadt, Deutschland
<b>CellTiterBlue</b>	Promega, Mannheim, Deutschland
<b>Paraformaldehyd (PFA)</b>	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>Rinderserumalbumin (BSA)</b>	Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Salzsäure (HCL)</b>	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>Trypan-Blau 0,4%</b>	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
<b>Methanol</b>	VWR Chemicals, Bruchsal, Deutschland
<b>L-Glutamin (200mM)</b>	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland

<b>cOmplete mini, Protease Inhibitor</b>	Roche, Mannheim Deutschland
<b>Tris(hydroxymethyl-)aminomethan Base (TRIS-Base)</b>	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
<b>Glycin</b>	Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Natriumdodecylsulfat (SDS)</b>	Applichem, Darmstadt, Deutschland
<b>β-Mercaptoethanol</b>	Honeywell, Offenbach, Deutschland
<b>Tetramethylethyldiamin (TEMED)</b>	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
<b>Acrylamide/bis-acrylamide 30%</b>	Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>APS</b>	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
<b>Spectra-BR Protein Ladder</b>	Thermo-Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
<b>Ponceau-S</b>	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
<b>Magermilchpulver</b>	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
<b>Tween</b>	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
<b>ECL-Lösung</b>	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
<b>2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)</b>	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
<b>Kaliumchlorid (KCL)</b>	Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)</b>	Applichem, Darmstadt, Deutschland
<b>Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)</b>	Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Dithiothreitol (DTT)</b>	Roth, Karlsruhe, Deutschland

<b>Tris gepufferte Salzlösung (TBS)</b>	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
<b>DAPI Hardstain Vectashield</b>	Biozol, Eching, Deutschland
<b>Phalloidin-FITC</b>	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
<b>TritonX100</b>	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
<b>Pferdeserum</b>	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
<b>Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)</b>	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
<b>Bakto Agar</b>	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
<b>Ampicillin (100mg/1ml)</b>	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
<b>Trypton</b>	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
<b>Pilzextrakt</b>	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
<b>Natriumchlorid (NaCl)</b>	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
<b>Polyethylenimin (PEI)</b>	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
<b>Opti-MEM</b>	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland

## 2.1.2 Zellkulturmedien

Tabelle 2: Medien in der Zellkultur, ICC, Plasmid Herstellung und Virusproduktion

<b>Medium</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>DMEM vollständig</b>	10% fetales Kälberserum,

	2% L-Glutamin 0,1 % Gentamycin
<b>TBS+</b>	TBS 0,4 % TritonX100 10% Pferdeserum
<b>LB</b>	950 ml H <sub>2</sub> O 10g Trypton 10g NaCL 5g Pilzextrakt mit H <sub>2</sub> O auf 1000ml auffüllen

### 2.1.3 Verwendete Zelllinien

Tabelle 3: Verwendete Zelllinien

<b>Zelllinie</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Zellinformation</b>
<b>LN-229</b>	ATCC, Wesel, Deutschland	Zellen eines primären Glioblastoms einer 60-jährigen Frau. Tumorlokalisierung in der rechten fronto-parieto-okzipital Region [301].
<b>293T</b>	ATCC, Wesel, Deutschland	Embryonale, epitheliale Zellen aus der Niere eines Menschen

## 2.1.4 Bakterien für die Plasmid Vervielfältigung

Tabelle 4: Verwendete Bakterien für Plasmid Herstellung

Bakterien	Hersteller
<b>Escheria coli Top 10</b>	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland

## 2.1.5 Materialien für Western Blot

Tabelle 5: Verwendete Puffer und Lösungen für Western Blot

Puffer	Zusammensetzung
<b>1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)</b>	45,4 g Tris-HCl 250 ml H <sub>2</sub> O
<b>1 M Tris-HCl (pH 6,8)</b>	12,21 g Tris-HCl 100 ml H <sub>2</sub> O ml
<b>Lauf-Puffer (10x)</b>	30 g Tris-Base (25mM) 144 g Glycin (192mM) 10 g SDS (0,1%) 1000 ml H <sub>2</sub> O
<b>Transfer-Puffer (10x)</b>	24 g Tris-Base (20mM) 112,6 g Glycin (150mM) 1000 ml H <sub>2</sub> O
<b>Lämmli-Puffer</b>	5,6 ml 1M Tris-HCl (pH 6,8) 2 ml 10% SDS 1 ml Glycerin Bromphenolblau
<b>Puffer A</b>	0,4776g Hepes pH 7,9 (10mM) 0,1941g KC (10mM) 0,00584g EDTA (0,1mM) 0,0076g EGTA (0,1mM) 0,03086g DTT (0,5mM)

	0,01742g PMSF	(0,5mM)
<b>Puffer C</b>	0,9532g Hepes pH 7,9	(20mM)
	5,964g KCl	(0,4mM)
	0,05844g EDTA	(1mM)
	0,07608g EGTA	(1mM)
	0,03086g DTT	(1mM)
	0,03484g PMSF	(1mM)

Je 10 ml von Puffer A und C erhielten eine Tablette cOmplete mini Protease Inhibitor

## 2.1.6 Verwendete Gele für Western Blot

Tabelle 6: Gele für Western Blot

<b>Gel</b>	<b>Bestandteile</b>
<b>10% Trenngel</b>	4 ml H <sub>2</sub> O 2,5 ml 1,5M Tris-HCl (pH 8,8) 3,3 ml 30% Acrylamide/bis-acrylamide 10 µl 10 % SDS 80 µl 10 % APS 10 µl TEMED
<b>12% Trenngel</b>	3,3 ml H <sub>2</sub> O 2,5 ml 1,5M Tris-HCl (pH 8,8) 4 ml 30% Acrylamide/bis-acrylamide 100 µl 10 % SDS 80 µl 10 % APS 10 µl TEMED
<b>Sammelgel</b>	3,4 ml H <sub>2</sub> O 0,625 ml 1M Tris-HCL (pH 6,8) 0,85 ml 30% Acrylamide/bis-acrylamide 50 µl 10 % SDS

50 µl 10 % APS

5 µl TEMED

## 2.1.7 Antikörper

Tabelle 7: Verwendete Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Anti-mouse/human ID1, Kaninchen, monoklonal</b>	1:2500	Biocheck, Foster City, USA
<b>Anti-mouse/human IκB-α, Kaninchen, polyklonal</b>	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
<b>Anti-human RFP pAb, Kaninchen, polyklonal</b>	1:1000	MBL, Des Plaines, USA
<b>Anti-Rabbit IgG-HRP, Ziege, polyklonal</b>	1:5000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
<b>Anti-β-Tubulin, Kaninchen IgG, monoklonal</b>	1:200	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main, Deutschland
<b>Alexa Fluor 647, Anti Rabbit IgG, polyklonal</b>	1:500	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland

## 2.1.8 Verwendete Plasmide

Tabelle 8: Verwendete Plasmide

<b>Plasmid</b>	<b>Herkunft</b>
<b>pRFP</b>	Labor Didier Trono, Lausanne, Schweiz
<b>pdnE47</b>	
<b>pCMVR8.74</b>	
<b>pMD2G</b>	

## 2.1.9 Kits für RNA-Extraktion und Plasmid Vervielfältigung

Tabelle 9: Kits für die RNA-Extraktion und Plasmid Vervielfältigung

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
<b>RNeasy Mini Kit</b>	QIAGEN, Hilden, Deutschland
<b>PureYield™ Plasmid Midiprep System</b>	Promega, München, Deutschland

## 2.1.10 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 10: Verwendetes Plastikmaterial und Zubehör

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Neubauer-Zählkammer</b>	Hecht, Sondheim vor der Rhön, Deutschland
<b>Pipetten (2,5; 5; 10; 25; 50 ml)</b>	Corning, Kaiserslautern, Deutschland
<b>Pipettenspitzen (100 und 1250 µl)</b>	Nerbe plus, Winsen, Deutschland
<b>Pipettenspitzen (2,5; 100; 200 µl)</b>	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
<b>Zellkulturflaschen (T25, T75, T175)</b>	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
<b>Falcon-Röhrchen (15 und 50 ml)</b>	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
<b>Eppendorf Gefäß (1,5 ml)</b>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<b>Parafilm</b>	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
<b>6-Lochplatten</b>	TPP, Trasadingen, Schweiz
<b>96-Lochplatten</b>	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
<b>G26 Kanüle</b>	B Braun, Melsungen, Deutschland
<b>1ml Spritze</b>	BD, Heidelberg, Deutschland
<b>2 ml Spritze</b>	B Braun, Melsungen, Deutschland

<b>Polyvinylidene difluoride (PVDF) Membran</b>	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
<b>Western Blot Filter</b>	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
<b>XCell II™ Blot Module</b>	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
<b>Novex Bolt Empty Cassettes</b>	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
<b>Bolt Mini Gel Tank</b>	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
<b>Petrischalen</b>	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
<b>Erlenmeyer Kolben (500ml)</b>	Duran Group, Wertheim, Deutschland
<b>0,22µm Filter</b>	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland

## 2.1.11 Geräte

Tabelle 11: Verwendete Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Vortexer RS-VA-110</b>	Phoenix Instrument, Garbsen, Deutschland
<b>Thermomixer comfort 1,5 ml u. 2 ml</b>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<b>Centrifuge 5417R</b>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<b>GloMax Explorer</b>	Promega, Mannheim, Deutschland
<b>Multifuge 3 S-R</b>	Heraeus, Hanau, Deutschland
<b>Multifuge 1 S-R</b>	Heraeus, Hanau, Deutschland
<b>Biofuge pico</b>	Heraeus, Hanau, Deutschland
<b>Schüttelwasserbad 1083</b>	GFL, Burgwedel, Deutschland

<b>Mikroskop Eclipse TS100</b>	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
<b>Magnetrührer RH basic 2</b>	IKA, Staufen, Deutschland
<b>Elektronikrührer Monotherm</b>	VarioMag, Port Orange, USA
<b>pH/Temperatur Meter HI991001</b>	Hanna Instruments, Vöhringen, Deutschland
<b>Präzisionswaage EMB 600-2</b>	Kern, Balingen, Deutschland
<b>Analysewaage ABJ</b>	Kern, Balingen, Deutschland
<b>Plattformschüttler</b>	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
<b>Gammacell 40 Exicator</b>	Theratronics, Ontario, Kanada
<b>Chemidoc MP Imaging System</b>	BioRad, München, Deutschland
<b>Power Ease 500</b>	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
<b>Inkubationshaube Certomat HK</b>	Sartorius, Göttingen, Deutschland
<b>Tischrüttler Certomat Mo II</b>	Sartorius, Göttingen, Deutschland
<b>Spectrophotometer NanoDrop ND-1000</b>	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland

## 2.2. Methodik

### 2.2.1. Herstellung der Zellen

Die Konstruktion der E47:RFP und dnE47:RFP Zellen wurde bereits bei [298] beschrieben. Im Folgenden werden die E47:RFP Zellen nur noch als RFP Zellen und die dnE47:RFP Zellen nur noch als dnE47 Zellen bezeichnet.

Die LN-229 dnE47 und RFP Zellen wurden entsprechend wie in Beyeler et. al [189] beschrieben hergestellt und anschließend kultiviert und für die Zellversuche verwendet.

Der dafür benötigte Lentivirus wurde wie in [302] beschrieben und unter 2.2.3 aufgeführt hergestellt. Die benötigten Plasmide wurden wie in 2.2.2 beschrieben vervielfältigt. Wie bei Barde et al. beschrieben [300] wurde ein Doxycyclin

induzierbarer Lentivirus verwendet. Eine Doxycyclin-Gabe bewirkte anschließend eine verstärkte Transkription der eingebrachten Gene [300].

### 2.2.2. Plasmid Vervielfältigung

Die Plasmid Vervielfältigung diente dazu die benötigten Plasmide in ausreichender Menge für die Lentivirus vorzubereiten.

Vor dem Ausplattieren der Escheria coli Bakterien wurden diesen unterschiedliche Plasmide übertragen. Als Verpackungsplasmide wurden pMD2G und pCMVR8.74 verwendet. Als weitere Plasmide wurden zudem RFP und dnE47 genutzt. Die E. coli Bakterien mit den Plasmiden wurden bis zur Ausplattierung in Glycerin tiefgefroren gelagert.

Zur Ausplattierung der Bakterien wurden Ampicillin-haltige Agar Platten mit LB-Medium verwendet, da die mit den Plasmiden versetzten E. coli Stämme Ampicillin resistent sind und somit eine Kontamination mit anderen Bakterien verhindert wird. Die Bakterien wurden zur Ausplattierung auf die Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 Grad Celsius inkubiert.

Am nächsten Tag wird jeweils eine Bakterienkolonie in 2,5 ml LB-Medium mit Ampicillin (1:1000) versetzt und bei 37 Grad Celsius auf einem Tischrüttler für mehrere Stunden inkubiert.

Nun werden 200ml LB-Medium mit Ampicillin (1:1000) in einen Erlenmeyer-Kolben gegeben und 500 µl der zuvor inkubierten Bakterienkultur in diesen Erlenmeyer-Kolben gegeben. Nun werden die Bakterien für weitere 16 Stunden bei 37 Grad Celsius auf einem Tischrüttler inkubiert.

Nun werden die E. coli Bakterien in Falcons überführt und bei 3000 x g 25 Minuten zentrifugiert, sodass sich ein deutliches Zellpellet bildet. Der dabei entstehende Überstand wird verworfen. Das Zellpellet wird nun mit 3 ml der Promega Resuspensionslösung versetzt und mittels Vortexen gelöst. Zur Lysierung der Bakterien wird nun jeweils 3 ml Promega Zell Lysierungslösung hinzugeben und vermischt und die Lösung für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Neutralisation der Lysierungsenzyme wird den Falcons nun jeweils

5 ml Promega Neutralisationslösung hinzugefügt, die Lösung vorsichtig vermischt und das Lysat aufrecht für 3 Minuten gelagert, sodass sich weiße Flocken bilden können.

Nun wird jeweils eine PureYield™ Reinigungs-Filtersäule in ein 50ml Falcon gegeben und das Lysat in die Filtersäule gegossen. Es folgt eine zweiminütige Inkubation bei Raumtemperatur, gefolgt von einer fünfminütigen Zentrifugation bei 1500 x g. Hierbei wird das Zelllysate gereinigt und Zellrückstände bleiben in der Filtersäule zurück, während das DNA-enthaltende Zelllysate im Falcon zurückbleibt. Die Zellrückstände werden verworfen. Nun wird eine PureYield™ Sammel-Filtersäule in ein neues Falcon gegeben und das Zelllysate in die Filtersäule gegeben. Zur weiteren Auftrennung des Zelllysats folgt eine dreiminütige Zentrifugation bei 1500 x g, sodass DNA Bestandteile in der Reinigungs-Filtersäule zurückbleiben. Nach der Zentrifugation werden die DNA-Bestandteile im Filter weiter aufgereinigt. Hierzu wird der Durchfluss verworfen und zunächst 5ml der Endotoxin Waschlösung mit Isopropanol in die Sammel-Filtersäule gegeben. Nach einer weiteren dreiminütigen Zentrifugation bei 1500 x g wird der Durchfluss wieder verworfen und nun 20 ml der Säulen-Waschlösung mit Ethanol in die Sammel-Filtersäule gegeben. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 1500 x g für 3 Minuten wird der Durchfluss wieder verworfen und die Proben erneut für 10 Minuten bei 1500 x g zentrifugiert. Nun sollte die reine aufgereinigte DNA im Filter verblieben sein. Der Durchfluss wird wieder verworfen. Während des Versuches wird Wasser auf 65 Grad Celsius erhitzt. Hiervon werden nun 50 µl gleichmäßig auf den DNA-enthaltenden Filter gegeben, eine Minute darauf bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für fünf Minuten bei 1500 x g zentrifugiert. Anschließend wird die nun im Wasser gelöste DNA in eine Eppendorfgefäß überführt und die Konzentration mittels Spectrophotometer gemessen.

### 2.2.3. Lentivirus-Produktion

Die Lentivirus-Produktion diente dazu ein Doxycyclin-induzierbaren Lentivirus herzustellen um die vervielfältigen Plasmide in die LN229-Zellen einzubringen.

Zur Vorbereitung des Lentivirus wurden 293T Zellen in T-175 Zellkulturflaschen ausgesät und mit DMEN (vollständig) für 24 Stunden inkubiert. Die 293T Zellen wurden analog zu den LN-229 Zellen kultiviert und passagiert.

Nun werden 50ml Falcon-Röhrchen mit Opti-MEM vorbereitet. Diesen Falcon-Röhrchen wird 12,5µl einer 10mM Polyethylenimin (PEI) zugesetzt und die Lösung durch einen 0,22µm Filter in eine T-175 Zellkulturflasche filtriert. Nun werden 16µg von RFP oder dnE47, sowie 4µg pMD2.G und 12µg pCMVR8,74 in ein weiteres 50ml Falcon-Röhrchen mit Opti-MEM gegeben und auch dies durch einen 0,22µm Filter in die gleiche Zellkulturflasche filtriert. Die Zellkulturflaschen mit der Vektor-DNA und dem PEI werden vorsichtig gemischt und anschließend für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Bei 80-90% Konfluenz der Zellen wird das Medium von den Zellen entfernt und 10 ml Opti-MEM Medium, sowie 10 ml der PEI-DNA-Lösung zur Transfektion zu den Zellen gegeben. Nun werden die Zellen mit dem neuen Medium, dem PEI und der Vektor-DNA für 4 Stunden bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 Grad Celsius inkubiert, bevor das Medium durch DMEN (vollständig) ersetzt wird. 48 Stunden nach Transfektion wird das Medium entfernt und durch 16 ml DMEN (vollständig) ersetzt.

Zur Ernte des Virus wurde das Medium von den Zellen entfernt und durch neues Medium ersetzt. Das Virus-enhaltende Medium wurde nun bei 4000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend durch einen 0,22µm Filter gefiltert. Anschließend wurde das Virus-enhaltende Medium bei 4 Grad Celsius für 2 Stunden bei 23.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und 30µl von DMEN (vollständig) zum Virus hinzugegeben, vermischt, mit Parafilm verschlossen und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Als letzten Schritt wurde das Medium mit dem Virus nochmals vermischt und in jeweils in 30µl Aliquots bei -80 Grad Celsius tiefgefroren.

#### 2.2.4. Zellkultivierung und Passagieren der LN-229

Die für Klonogenitäts Assay und Zytotoxizitäts Assay verwendete Zelllinie LN-229 wächst adhärent. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in T75 Zellkulturflaschen. Als Medium wurde DMEM (vollständig) verwendet. Die

Kultivierung erfolgte unter Standardbedingungen im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Es wurde täglich eine mikroskopische Kontrolle der Zellen und des Mediums vorgenommen. Beim Vorfinden eines konfluenten Zellrasens auf dem Flaschenboden wurden die Zellen passagiert.

Vor Passagierung wurde das zu benutzende DMEM, PBS und die Accutase im Wasserbad erwärmt. Das Zellmedium wurde mittels Glaspipette unter sterilen Bedingungen abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, um abgelöste und abgestorbene Zellen zu entfernen. Zum Ablösen der Zellen von der Zellkulturflasche wurden 5 ml Accutase beigefügt und die Zellkulturflasche fünf Minuten im Inkubator unter Standardbedingungen inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation wurden zum Abstoppen der Accutase 7 ml DMEM (vollständig) in die Zellkulturflasche gegeben, die Zellen durch mehrmaliges Pipettieren vom Boden gelöst und anschließend die gesamte Suspension in ein steriles 15 ml Falcon gegeben. Dieses wurde fünf Minuten bei 20°C und 1200 rpm zentrifugiert. Der so entstandene Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml DMEM (vollständig) resuspendiert und wieder in die Zellkulturflasche gegeben. Zur Zählung der Zellen 10 µl der Zellen mit Trypanblau angefärbt und mittels Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt und die gesamte Zellzahl ausgerechnet.

### 2.2.5 Immunzytochemie (ICC)

Die Immunzytochemie dient der Lokalisation und Sichtbarmachung von Proteinen innerhalb des Nukleus und des Cytoplasmas einer Zelle. Nach der Fixierung und Permeabilisation werden mittels Antikörpern bestimmte Antigene in einer einzelnen Zelle angefärbt und anschließend sichtbar gemacht.

Zunächst wird jeweils ein Deckglas in ein Loch einer 6-Well Platte gelegt und anschließend 500.000 Zellen pro Loch ausgesät, mit Doxycyclin behandelt und inkubiert.

Nach 48 Stunden wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 4 % PFA 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurde das PFA entfernt und Zellen dreimalig für jeweils 10 Minuten mit TBS gewaschen. Es folgte die

Blockung der unspezifischen Bindungsstellen mithilfe des Block Puffers TBS+ für 30 Minuten bei Raumtemperatur.

Die primären Antikörper gegen ID1 und RFP wurden in TBS+ gelöst, auf ein Stück Parafilm gegeben und die Deckgläser mit den Zellen kopfüber auf diese gelegt, sodass die Zellen in Kontakt mit der Antikörperlösung kamen. Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für eine Stunde. Neben ID1 und RFP wurde außerdem noch Phalloidin-FTIC mit den Zellen inkubiert.

Nach dieser Stunde wurden die Zellen dreimal für 5 Minuten mit TBS gereinigt. Anschließend erfolgte die Gabe des sekundären Antikörpers Alexa Fluor 647. Dazu wurde dieser in TBS+ gelöst, auf die Zellen gegeben und für 60 Minuten in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert.

Nun wurde 10 Minuten lang in Dunkelheit mit TBS gereinigt. Während dieser Zeit wurde DAPI im Verhältnis 1:20.000 in TBS gelöst und die Zellen für eine nukleäre Anfärbung damit nach der Reinigung für 5 Minuten bei Dunkelheit inkubiert. Es folgte eine abermalige dreifache Reinigung für jeweils 10 Minuten mit TBS bei Dunkelheit. Anschließend wurden die Deckgläser unter dem Mikroskop aufgenommen.

### 2.2.6 Klonogenitäts Assay der LN-229 Zelllinie

Mittels Klonogenitäts Assay sollte das Wachstum der LN-229 Zellen bei den verschiedenen Therapieformen untersucht werden. Das Prinzip beruht darauf, dass einzelne Zellen die Fähigkeit besitzen Zellkolonien zu bilden. Jede Zellkolonie besteht aus mindestens 50 Zellen und ist mittels Kristallviolett anfärbbar. Durch Unterschiede in der Koloniezahl lassen sich anschließend Aussagen über die Wirksamkeit der Therapieformen treffen.

Zunächst wurden einzeln die Bestrahlung (RT) mit 1 Gy und 2 Gy, eine alkylierende Chemotherapie (CT) mit 1 $\mu$ M und 2 $\mu$ M Temozolomid und die Doxycyclin (Dox) - Induktion (10mM) als Einzeltherapien verglichen.

Nach Aussaat von jeweils 1000 Zellen pro Loch einer 6 Lochplatte erfolgte in jeweils 24 Stunden Abstand die jeweilige Behandlung, dazwischen folgte eine Inkubation unter Standardbedingungen. Am Tag 10 wurden die Versuche

abgestoppt, die Platten angefärbt und die Kolonien nach Trocknung ausgezählt. Das Protokoll ist angelehnt an das bei Franken et al. 2006 [303] beschriebene Verfahren.

Die 6 Lochplatten wurden wie in Tabelle 12 und Tabelle 13 angegeben, ausgesät. Den Zellen zunächst 24 Stunden zum Wachstum gegeben. Nach 24 Stunden erfolgte die Therapie mit TMZ oder Bestrahlung oder die Doxycyclin-Induktion. Bei Kombination mit Doxycyclin-Induktion erfolgte die Doxycyclin-Gabe 24 Stunde später. So konnte die Strahlen-/Chemotherapie vor der Doxycyclin-Induktion ihre Wirkung entfalten.

Tabelle 12: Behandlungsplan der Kontrollplatten der Einzeltherapien der Klonogenitäts Assays. Jeweilige Plattenbeschriftung mit Therapie nach 24 und 48 Stunden. Bei Kombination von Chemo-/Strahlentherapie mit Doxycyclin-Induktion erfolgte die Doxycyclin-Gabe 24 Stunden nach Chemo-/Strahlentherapie. Grün markiert sind die Gaben von Medium mit FCS. Gelb markiert sind Bestrahlungen. Lila markiert sind Gabe von TMZ. Rot markiert sind Doxycyclin-Gaben.

	0h	24h	48h
<b>+Dox</b>	Aussaat	-FCS <b>+Dox</b>	-FCS -Dox
<b>- Dox</b>	( <b>+FCS</b> )	-FCS -Dox	-FCS -Dox
<b>0Gy</b>		-FCS -Dox	-FCS -Dox
<b>1Gy</b>		-FCS <b>+RT</b> -Dox	-FCS -Dox
<b>2Gy</b>		-FCS <b>+RT</b> -Dox	-FCS -Dox
<b>DMSO</b>		-FCS +DMSO -Dox	-FCS -Dox
<b>0µM TMZ</b>		-FCS -Dox	-FCS -Dox
<b>1µM TMZ</b>		-FCS <b>+TMZ</b> -Dox	-FCS -Dox
<b>2µM TMZ</b>		-FCS <b>+TMZ</b> -Dox	-FCS -Dox

Tabelle 13: Behandlungsplan der Einzeltherapien der Klonogenitäts Assays. Jeweilige Plattenbeschriftung mit Therapie nach 24 und 48 Stunden. Bei Kombination von Chemo-/Strahlentherapie mit Doxycyclin-Induktion erfolgte die Doxycyclin-Gabe 24 Stunden nach Chemo-/Strahlentherapie. Grün markiert sind die Gaben von Medium mit FCS. Gelb markiert sind Bestrahlungen. Lila markiert sind Gabe von TMZ. Rot markiert sind Doxycyclin-Gaben.

**0h                      24h    48h**

<b>0Gy –Dox</b>	Aussaat	-FCS -Dox	-FCS -Dox
<b>1Gy – Dox</b>	(+FCS)	-FCS +RT -Dox	-FCS -Dox
<b>2Gy - Dox</b>		-FCS +RT -Dox	-FCS -Dox
<b>0Gy + Dox</b>		-FCS - Dox	-FCS +Dox
<b>1Gy + Dox</b>		-FCS +RT -Dox	-FCS +Dox
<b>2Gy + Dox</b>		-FCS +RT -Dox	-FCS +Dox
<b>0µM TMZ -Dox</b>		-FCS -Dox	-FCS -Dox
<b>1µM TMZ -Dox</b>		-FCS +TMZ -Dox	-FCS -Dox
<b>2µM TMZ - Dox</b>		-FCS +TMZ -Dox	-FCS -Dox
<b>0µM TMZ + Dox</b>		-FCS -Dox	-FCS +Dox
<b>1µM TMZ + Dox</b>		-FCS +TMZ -Dox	-FCS +Dox
<b>2µM TMZ + Dox</b>		-FCS +TMZ -Dox	-FCS +Dox

Nach Zellpassagierung wurden jeweils 1000 Zellen mit 2 ml DMEN (vollständig) in jedes Loch einer 6-Well Platte gegeben und für 24 Stunden zum Wachstum inkubiert.

Nach dieser Zeit erfolgte die erste Behandlung.

Dazu wurden aus allen Löchern das Medium entfernt und durch 2ml DMEN (serumfrei) ersetzt. Bei den Platten 1Gy, 2Gy –Dox, 1Gy +Dox, 2Gy, 2Gy –Dox und 2Gy + Dox erfolgte anschließend die jeweilige Bestrahlung mit 1 oder 2 Gy. Bei den Platten 1µM TMZ, 1µM TMZ –Dox, 1µM TMZ +Dox, 2µM TMZ, 2µM TMZ –Dox und 2µM TMZ +Dox wurde dem DMEN (serumfrei) zuvor 1 bzw. 2 µM TMZ hinzugegeben. Die Platte DMSO erhielt 2µM DMSO enthaltendes DMEN (serumfrei). Da bei der TMZ-Therapie in DMSO gelöstes TMZ verwendet wurde, war es notwendig zu prüfen, ob DMSO einen Einfluss auf das Zellwachstum hat und ob dies eventuelle Effekte der TMZ-Therapie verfälschen.

Für die Platte +Dox wurde Doxycyclin im Verhältnis 1:500 mit DMEN (serumfrei) vermischt und 2 ml hiervon in jedes Loch der Platte gegeben.

Nach weiteren 24 Stunden erfolgte die zweite Behandlung. Wieder wurde das Medium entfernt und durch 2 ml DMEN (serumfrei) ersetzt. Für die Platten 0Gy +Dox, 1Gy +Dox, 2Gy +Dox, 0 $\mu$ M TMZ +Dox, 1 $\mu$ M TMZ +Dox und 2 $\mu$ M TMZ +Dox wurde Doxycyclin im Verhältnis 1:500 mit DMEN (serumfrei) gemischt und jeweils 2 ml in jedes Loch gegeben.

Anschließend erfolgte eine Inkubation der Platten bis Tag 10 nach Aussaat, an dem das Abstoppen der Platten erfolgte. Hierfür wurde das Medium aus den Löchern entfernt und die Löcher mit 1 ml PBS von Mediumrückständen gereinigt. Das PBS wurde ebenfalls aus den Löchern entfernt und durch 1 ml 4 % PFA zur Fixierung der Zellen ersetzt, womit die Platten 20 Minuten bei 20°C inkubiert wurden. Nach dieser Inkubation wurde das PFA verworfen und die Löcher mittels 1 ml PBS von den Rückständen gereinigt und das PBS wieder aus den Löchern entfernt.

Anschließend erfolgte die Anfärbung der Zellkolonien mittels Kristallvioletts. Hierzu wurde jeweils 1 ml 0,05% Kristallvioletts in die Löcher gegeben und die Platten 30 Minuten bei 20 °C inkubiert. Nach dieser Zeit wurde das Kristallviolett entfernt, die Platten vorsichtig mittels VE-Wasser von den Resten gereinigt und die Platten getrocknet. Die getrockneten Platten wurden unter Zuhilfenahme des Mikroskops ausgezählt.

Nach Abschluss der Einzeltherapien wurden Kombinationsbehandlungen entsprechend folgender Therapieregime durchgeführt:

- Dox-RT/CT (24h & 48h & 72h Dox – 48 h RT und CT simultan)

- RT/CT-Dox (24h RT und CT simultan – 48h & 72h Dox)

Die Doxycyclin-Gabe wurde bei den Kombinationstherapien aufgrund der 10-22 stündigen Halbwertszeit von Doxycyclin nach der ersten Gabe wiederholt. Beim Therapieregime RT/CT-Dox erfolgte die Doxycyclin-Induktion erst 24 Stunden nach Therapie mit Chemo- und/oder Strahlentherapie. Dies ist äquivalent zur den Einzeltherapietestungen.

Nach Zellpassagierung wurden jeweils 2500 Zellen mit 2 ml DMEN (vollständig) in jedes Loch einer 6-Well Platte gegeben und für 24 Stunden zum Wachstum inkubiert.

### Einzeltherapien zur Kontrolle

Tabelle 14: Einzeltherapiekontrollen für die Kombinationstherapien des Klonogenitäts Assays. Plattenbeschriftung mit jeweiliger Behandlung nach 24, 48 und 72 Stunden. Grün markiert sind die Gaben von Medium mit FCS. Gelb markiert sind Bestrahlungen. Lila markiert sind Gabe von TMZ. Rot markiert sind Doxycyclin-Gaben.

	0h	24h	48h	72h
<b>+dox</b>	Aussaat	-FCS <b>+dox</b>	-FCS <b>+dox</b>	<b>+FCS +dox</b>
<b>-dox</b>	( <b>+FCS</b> )	-FCS -dox	-FCS -dox	<b>+FCS -dox</b>
<b>0Gy</b>		-FCS -dox	-FCS -dox	<b>+FCS -dox</b>
<b>2Gy</b>		-FCS <b>+RT</b> -dox	-FCS -dox	<b>+FCS -dox</b>
<b>0µM TMZ</b>		-FCS -dox	-FCS -dox	<b>+FCS -dox</b>
<b>2µM TMZ</b>		-FCS <b>+TMZ</b> -dox	-FCS -dox	<b>+FCS -dox</b>

Nach 24 Stunden wurde ein Mediumwechsel mit 2 ml DMEN (serumfrei) durchgeführt. Für die Platte +Dox wurde Doxycyclin im Verhältnis 1:500 mit DMEN (serumfrei) gemischt und 2 ml in jedes Well gegeben. Die Platte 2Gy wurde nach dem Mediumwechsel mit 2 Gy bestrahlt. Die Platte 2µM TMZ erhielt 2µM TMZ.

Nach weiteren 24 Stunden wurde ein weiterer Mediumwechsel mit DMEN (serumfrei) durchgeführt und bei der Platte +Dox das Vorgehen vom letzten Tag wiederholt.

72 Stunden nach Aussaat wurde ein Mediumwechsel mit DMEN (vollständig) durchgeführt. Für die Platte +Dox wurde Doxycyclin im Verhältnis 1:500 mit DMEN (vollständig) vermischt und 2 ml in jedes Loch gegeben. Es folgte eine Inkubation bis zum Tag 10 nach Aussaat.

### Kombinationstherapie Dox-RT/CT

Tabelle 15: Kombinationstherapie Dox-RT/CT der Klonogenitäts Assays.

Plattenbeschriftung mit jeweiliger Behandlung nach 24,48 und 72 Stunden. Grün markiert sind die Gaben von Medium mit FCS. Gelb markiert sind Bestrahlungen. Lila markiert sind Gabe von TMZ. Rot markiert sind Doxycyclin-Gaben.

	0h	24h	48h	72h
<b>2<math>\mu</math>M2Gy+dox</b>	Aussaat (+FCS)	-FCS +dox	-FCS +RT +TMZ +dox	+FCS +dox
<b>2<math>\mu</math>M2Gy-dox</b>		-FCS -dox	-FCS +RT +TMZ -dox	+FCS -dox
<b>0<math>\mu</math>M2Gy+dox</b>		-FCS +dox	-FCS +RT +dox	+FCS +dox
<b>0<math>\mu</math>M2Gy-dox</b>		-FCS -dox	-FCS +RT -dox	+FCS -dox
<b>2<math>\mu</math>M0Gy+dox</b>		-FCS +dox	-FCS +TMZ +dox	+FCS +dox
<b>2<math>\mu</math>M0Gy-dox</b>		-FCS -dox	-FCS +TMZ -dox	+FCS -dox
<b>0<math>\mu</math>M0Gy+dox</b>		-FCS +dox	-FCS +dox	+FCS +dox
<b>0<math>\mu</math>M0Gy-dox</b>		-FCS -dox	-FCS -dox	+FCS -dox

Beim Therapieregime Dox-RT/CT erfolgte 24 Stunden nach Aussaat ein Mediumwechsel mit DMEN (serumfrei), wobei die Platten 2 $\mu$ M2Gy+Dox, 0 $\mu$ M2Gy+Dox, 2 $\mu$ M0Gy+Dox und 0 $\mu$ M0Gy+Dox DMEN (serumfrei) mit Doxycyclin im Verhältnis 1:500 erhielten. Nach weiteren 24 Stunden erfolgte ein weiterer Mediumwechsel mit DMEN (serumfrei) sowie die Therapie mit Bestrahlung und TMZ-Gabe.

Die Platten 2 $\mu$ M2Gy+Dox, 2 $\mu$ M2Gy-Dox, 0 $\mu$ M2Gy+Dox und 0 $\mu$ M2Gy-Dox wurden nach dem Mediumwechsel bestrahlt. Die Platten 2 $\mu$ M2Gy+Dox, 2 $\mu$ M2Gy-Dox, 2 $\mu$ M0Gy+Dox und 2 $\mu$ M0Gy-Dox erhielten 2 $\mu$ M TMZ und die Platten 2 $\mu$ M2Gy+Dox, 0 $\mu$ M0Gy+Dox, 2 $\mu$ M0Gy+Dox und 0 $\mu$ M0Gy+Dox erhielten Doxycyclin im Verhältnis 1:500 mit DMEN (serumfrei) gemischt. Am Tag 3 nach Aussaat erfolgte ein Mediumwechsel mit DMEN (vollständig), wobei die Platten 2 $\mu$ M2Gy+Dox, 0 $\mu$ M2Gy+Dox, 2 $\mu$ M0Gy+Dox und 0 $\mu$ M0Gy+Dox ebenfalls zum wiederholten Male Doxycyclin verabreicht bekommen haben. Es folgte eine Inkubation bis zu Tag 10 nach Aussaat.

## Kombinationstherapie RT/CT-Dox

Tabelle 16: Kombinationstherapie RT/CT-Dox der Klonogenitäts Assays.

Plattenbeschriftung mit jeweiliger Behandlung nach 24,48 und 72 Stunden. Grün markiert sind die Gaben von Medium mit FCS. Gelb markiert sind Bestrahlungen. Lila markiert sind Gabe von TMZ. Rot markiert sind Doxycyclin-Gaben.

	0h	24h	48h	72h
<b>2µM2Gy+dox</b>	Aussaat (+FCS)	-FCS +RT +TMZ - Dox	-FCS +dox	+FCS +dox
<b>2µM2Gy-dox</b>		-FCS +RT +TMZ - Dox	-FCS - dox	+FCS -dox
<b>0µM2Gy+dox</b>		-FCS +RT -Dox	-FCS +dox	+FCS +dox
<b>0µM2Gy-dox</b>		-FCS +RT -Dox	-FCS - dox	+FCS -dox
<b>2µM0Gy+dox</b>		-FCS +TMZ -Dox	-FCS +dox	+FCS +dox
<b>2µM0Gy-dox</b>		-FCS +TMZ -Dox	-FCS - dox	+FCS -dox
<b>0µM0Gy+dox</b>		-FCS -Dox	-FCS +dox	+FCS +dox
<b>0µM0Gy-dox</b>		-FCS -Dox	-FCS - dox	+FCS -dox

Beim Therapieregime RT/CT-Dox erfolgte nach 24 Stunden eine Mediumwechsel mit DMEN (serumfrei), sowie die Bestrahlung mit 2 Gy und die TMZ-Gabe. Hierzu wurden die Platten 2µM2Gy+Dox, 2µM2Gy-Dox, 0µM2Gy+Dox und 0µM2Gy-Dox nach dem Mediumwechsel mit 2 Gy bestrahlt. Die Platten 2µM2Gy+Dox, 2µM2Gy-Dox, 2µM0Gy+Dox und 2µM0Gy-Dox erhielten 2µM TMZ beim Mediumwechsel.

An Tag 2 nach Aussaat erfolgte ein Mediumwechsel mit DMEN (serumfrei), sowie die Doxycyclin-Induktion bei den Platten 2µM2Gy+Dox, 0µM2Gy+Dox,

2µM0Gy+Dox und 0µM0Gy+Dox. Hierzu wurden Doxycyclin im Verhältnis 1:500 mit DMEN (serumfrei) vermischt und jeweils 2 ml in jedes Loch gegeben. 72 Stunden nach Aussaat erfolgte ein Mediumwechsel mit DMEN (vollständig), sowie eine wiederholte Doxycyclin-Gabe bei den Platten 2µM2Gy+Dox, 0µM2Gy+Dox, 2µM0Gy+Dox und 0µM0Gy+Dox wie am vorherigen Tag. Es folgte eine Inkubation bis zum Tag 10 nach Aussaat.

An Tag 10 erfolgte analog zu den Einzeltherapien das Abstoppen der Klonogenitäts Assays.

### 2.2.7 Zytotoxizitäts Assay der LN-229 Zelllinie

Wie auch der Klonogenitäts Assay dient auch der Zytotoxizitäts Assay dem Effektivitätsvergleich verschiedener Therapien. Es wurden 5000 Zellen pro Loch in eine 96 Lochplatte eingebracht und in 24 Stundenabstand mit Radio-, Chemotherapie behandelt und mittels Doxycyclin-Induktion die dnE47 Genexpression gesteigert. An Tag 10 erfolgte das Abstoppen der Platten und die Auswertung und Quantifizierung der Zellzahl mittels photometrischer Analyse. Um herauszufinden, ob die Reihenfolge der Therapieformen eine Rolle auf das Zellwachstum und Effekte zwischen den Therapieformen hat wurden zwei Therapieregime getestet:

1. Dox-RT/CT (24h Dox – 48h: 24h RT & CT)
2. RT/CT-Dox (24 h RT & CT - 48 h Dox)

Einzeltherapien zur Kontrolle:

Tabelle 17: Einzeltherapiekontrollen für die Kombinationstherapien des Zytotoxizitäts Assays. Plattenbeschriftung mit jeweiliger Behandlung nach 24, 48 und 72 Stunden. Grün markiert sind die Gaben von Medium mit FCS. Gelb markiert sind Bestrahlungen. Lila markiert sind Gabe von TMZ. Rot markiert sind Doxycyclin-Gaben.

	0h	24h	48h	72h
+dox	Aussaat	-FCS +dox	-FCS +dox	+FCS +dox
-dox	(+FCS)	-FCS -dox	-FCS -dox	+FCS -dox

<b>0Gy</b>	-FCS -dox	-FCS -dox	<b>+FCS</b> -dox
<b>2Gy</b>	-FCS <b>+RT</b> -dox	-FCS-dox	<b>+FCS</b> -dox
<b>0µM TMZ</b>	-FCS -dox	-FCS -dox	<b>+FCS</b> -dox
<b>45µM TMZ</b>	-FCS <b>+TMZ</b> -dox	-FCS-dox	<b>+FCS</b> -dox

Nach 24 Stunden wurde ein Mediumwechsel mit 100 µl DMEN (serumfrei) durchgeführt. Für die Platte +Dox wurde Doxycyclin im Verhältnis 1:500 mit DMEN (serumfrei) gemischt und 100µl in jedes Well gegeben. Die Platte 2Gy wurde nach dem Mediumwechsel mit 2 Gy bestrahlt. Die Platte 2µM TMZ erhielt 2µM TMZ.

Nach weiteren 24 Stunden wurde ein weiterer Mediumwechsel mit DMEN (serumfrei) durchgeführt und bei der Platte +Dox das Vorgehen vom letzten Tag wiederholt.

72 Stunden nach Aussaat wurde ein Mediumwechsel mit DMEN (vollständig) durchgeführt. Für die Platte +Dox wurde Doxycyclin im Verhältnis 1:500 mit DMEN (vollständig) vermischt und 100µl in jedes Loch gegeben. Es folgte eine Inkubation bis zum Tag 10 nach Aussaat.

Tabelle 18: Kombinationstherapie Dox-RT/CT der Zytotoxizitäts Assays.

Plattenbeschriftung mit jeweiliger Behandlung nach 24,48 und 72 Stunden. Grün markiert sind die Gaben von Medium mit FCS. Gelb markiert sind Bestrahlungen. Lila markiert sind Gabe von TMZ. Rot markiert sind Doxycyclin-Gaben.

	<b>0h</b>	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>
<b>45µM2Gy+dox</b>	Aussaat ( <b>+FCS</b> )	-FCS <b>+dox</b>	-FCS <b>+RT</b> <b>+TMZ +dox</b>	<b>+FCS +dox</b>
<b>45µM2Gy-dox</b>		-FCS -dox	-FCS <b>+RT</b> <b>+TMZ -dox</b>	<b>+FCS -dox</b>
<b>0µM2Gy+dox</b>		-FCS <b>+dox</b>	-FCS <b>+RT +dox</b>	<b>+FCS +dox</b>
<b>0µM2Gy-dox</b>		-FCS -dox	-FCS <b>+RT -dox</b>	<b>+FCS -dox</b>

<b>45μM0Gy+dox</b>	-FCS +dox	-FCS +TMZ +dox	+FCS +dox
<b>45μM0Gy-dox</b>	-FCS -dox	-FCS +TMZ - dox	+FCS -dox
<b>0μM0Gy+dox</b>	-FCS +dox	-FCS +dox	+FCS +dox
<b>0μM0Gy-dox</b>	-FCS -dox	-FCS -dox	+FCS -dox

Beim Therapieregime Dox-RT/CT erfolgte 24 Stunden nach Aussaat ein Mediumwechsel mit 100 μl DMEN (serumfrei), wobei die Platten 45μM2Gy+Dox, 0μM2Gy+Dox, 45μM0Gy+Dox und 0μM0Gy+Dox DMEN (serumfrei) mit Doxycyclin im Verhältnis 1:500 erhielten. Nach weiteren 24 Stunden erfolgte ein weiterer Mediumwechsel mit DMEN (serumfrei) sowie die Therapie mit Bestrahlung und TMZ-Gabe.

Die Platten 45μM2Gy+Dox, 45μM2Gy-Dox, 0μM2Gy+Dox und 0μM2Gy-Dox wurden nach dem Mediumwechsel bestrahlt. Die Platten 45μM2Gy+Dox, 45μM2Gy-Dox, 45μM0Gy+Dox und 45μM0Gy-Dox erhielten 45μM TMZ und die Platten 45μM2Gy+Dox, 0μM0Gy+Dox, 45μM0Gy+Dox und 0μM0Gy+Dox erhielten Doxycyclin im Verhältnis 1:500 mit DMEN (serumfrei) gemischt. Am Tag 3 nach Aussaat erfolgte ein Mediumwechsel mit DMEN (vollständig), wobei die Platten 45μM2Gy+Dox, 0μM2Gy+Dox, 45μM0Gy+Dox und 0μM0Gy+Dox ebenfalls zum wiederholten Male Doxycyclin verabreicht bekommen haben. Es folgte eine Inkubation bis zu Tag 10 nach Aussaat.

Tabelle 19: Kombinationstherapie RT/CT-Dox der Zytotoxizitäts Assays.

Plattenbeschriftung mit jeweiliger Behandlung nach 24,48 und 72 Stunden. Grün markiert sind die Gaben von Medium mit FCS. Gelb markiert sind Bestrahlungen. Lila markiert sind Gaben von TMZ. Rot markiert sind Doxycyclin-Gaben.

**0h**                      **24h**                      **48h**                      **72h**

<b>45µM2Gy+dox</b>	Aussaat (+FCS)	-FCS +RT +TMZ -Dox	-FCS +dox	+FCS +dox
<b>45µM2Gy-dox</b>		-FCS +RT +TMZ -Dox	-FCS - dox	+FCS -dox
<b>0µM2Gy+dox</b>		-FCS +RT -Dox	-FCS +dox	+FCS +dox
<b>0µM2Gy-dox</b>		-FCS +RT -Dox	-FCS - dox	+FCS -dox
<b>45µM0Gy+dox</b>		-FCS +TMZ -Dox	-FCS +dox	+FCS +dox
<b>45µM0Gy-dox</b>		-FCS +TMZ -Dox	-FCS - dox	+FCS -dox
<b>0µM0Gy+dox</b>		-FCS -Dox	-FCS +dox	+FCS +dox
<b>0µM0Gy-dox</b>		-FCS -Dox	-FCS - dox	+FCS -dox

Beim Therapieregime RT/CT-Dox erfolgte nach 24 Stunden ein Mediumwechsel mit 100µl DMEN (serumfrei), sowie die Bestrahlung mit 2 Gy und die TMZ-Gabe. Hierzu wurden die Platten 45µM2Gy+Dox, 45µM2Gy-Dox, 0µM2Gy+Dox und 0µM2Gy-Dox nach dem Mediumwechsel mit 2 Gy bestrahlt. Die Platten 45µM2Gy+Dox, 45µM2Gy-Dox, 45µM0Gy+Dox und 45µM0Gy-Dox erhielten 45µM TMZ beim Mediumwechsel.

An Tag 2 nach Aussaat erfolgte ein Mediumwechsel mit DMEN (serumfrei), sowie die Doxycyclin-Induktion bei den Platten 45µM2Gy+Dox, 0µM2Gy+Dox, 45µM0Gy+Dox und 0µM0Gy+Dox. Hierzu wurden Doxycyclin im Verhältnis 1:500 mit DMEN (serumfrei) vermischt und jeweils 100 µl in jedes Loch gegeben. 72 Stunden nach Aussaat erfolgte ein Mediumwechsel mit DMEN (vollständig), sowie eine wiederholte Doxycyclin-Gabe bei den Platten 45µM2Gy+Dox, 0µM2Gy+Dox, 45µM0Gy+Dox und 0µM0Gy+Dox wie am vorherigen Tag. Es folgte eine Inkubation bis zum Tag 10 nach Aussaat.

An Tag 10 wurden alle Platten abgestoppt. Hierzu wurde das alte Medium aus den Löchern entfernt und im Anschluss CellTiter-Blue im Verhältnis 1:5 mit DMEN (vollständig) gemischt und jeweils 120 µl in jedes Loch gegeben. Weitere 120 µl vom DMEN-haltigen CellTiter-Blue wurden in ein neues Loch gegeben und dienten als Kontrollloch. Es folgte die Inkubation der Platten unter Standardbedingungen bis ein Farbumschlag der Zellen-enthaltenden Löcher gegenüber den neu angelegten Kontrolllöchern zu sehen war. Die Zellen reduzieren das im CellTiter-Blue befindliche Resazurin zu Resorufurin, was als Farbumschlag sichtbar wird. Da in den Kontrolllöchern keine Zellen enthalten waren, war ein Farbumschlag in diesen Löchern nicht möglich. Nach beobachtetem Farbumschlag wurden die Platten im Photometer (Anregung: 520 nm, Emission: 580-646 nm) gemessen.

### 2.2.8 Herstellung von fraktionierten Lysaten aus Nukleus und Zytoplasma

Mittels der Herstellung der fraktionierten Lysate sollen die Proteine aus Nukleus und Zytoplasma getrennt werden, sodass die Verteilung von Proteinen wie RFP oder ID1 im Anschluss mittels Western Blot dargestellt werden können. Hierzu wurden die Zellen mechanisch und chemisch lysiert.

Um die nukleären und zytoplasmatischen Proteine zu isolieren, wurden fraktionierte Lysate hergestellt. Es wurden fraktionierte Lysate zu den Zeitpunkten 0, 24, 48 und 72 Stunden nach Doxycyclin-Induktion angefertigt.

$5 \times 10^6$  LN229 Zellen wurden in 3 ml DMEN (vollständig) aufgenommen und in T25 Zellkulturflaschen überführt. Ihnen wurde, wenn vorgesehen, im Verhältnis 1:500 10mM Doxycyclin zugefügt. Die Flaschen der Zeitpunkte 24, 48 und 72 Stunden wurden nun liegend im Inkubator bei Standardbedingungen inkubiert. Alle Versuchsschritte erfolgten auf Eis. Alle Zentrifugierungen erfolgten bei 4°C.

Zunächst wurden die Zellen vom Medium getrennt. Dazu wurden Medium und Zellen in ein 15 ml Falcon übertragen. Die adhären Zellen wurden mittels Accutase gelöst, in DMEN Medium aufgenommen und ebenfalls in das gleichen

Falcon übertragen. Es folgte eine Zentrifugierung bei 1500 rpm für fünf Minuten. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 500 µl PBS gelöst. Der Inhalt des Falcons wurde nun in ein Eppendorfgefäß überführt und 10 Sekunden bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet mit 100µl Puffer A lysiert.

Die Proben wurden kurzzeitig bei 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde wiederholt in 200 µl Puffer A gelöst und 15 Minuten auf Eis inkubiert.

Zur mechanischen Lyse wurde die Probe nun 10-mal durch eine 26 G Kanüle gezogen, um eine zusätzliche Lyse zu erhalten. Im Anschluss wurden die zytoplasmatischen Proteine durch eine zweiminütige Zentrifugation bei 8.000 rpm von nukleären Proteinen getrennt. Der gewonnene Überstand enthält somit die zytoplasmatische Fraktion und das Pellet die nukleäre Fraktion. Die zytoplasmatische Fraktion wurde 15 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand abschließend in eine neues Eppendorfgefäß überführt. Dieser enthielt nun das gereinigte Zytoplasma.

Um auch die nukleären Proteine zu isolieren, wurde 100 µl Puffer A zum Nukleus-Pellet gegeben und ordentlich resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension 20 Sekunden bei 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde nun zur weiteren chemischen Lyse in 30 µl Puffer C gelöst und über 45 Minuten, bei 2000 rpm im Thermomixer inkubiert.

Zum Reinigen der Probe wurde das Pellet 5 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Dieser enthielt nun die isolierte nukleäre Fraktion.

Der proteolytische Abbau der frei werdenden Proteine wurde durch die Protease-Inhibitoren in Puffer A und C verhindert.

### 2.2.9 Proteinbestimmung mittels Bradford Assay

Der Bradford Assay ist eine photometrische Methode um die Proteinkonzentration von Proben zu ermitteln [304]. Hierfür wurde zunächst eine Standardkurve angefertigt. Dazu wurden wie in Abbildung 9 zu erkennen eine Standardverdünnung vorbereitet. Jedes Gefäß erhielt zunächst 20 µl DNase

freies H<sub>2</sub>O. Anschließend wurde in das erste 20 µl 2 mg/ml BSA gegeben und das Eppendorfgefäß kurz gevortext. Nun wurden 20 µl dieser Probe in den zweiten Eppendorfgefäß gegeben. So wurden Konzentrationen von 2mg/ml bis 0,0625mg/ml BSA hergestellt. Als Blank wurde Wasser verwendet. Auf einer 96-Lochplatte wurden jedem Eppendorfgefäß drei Löcher zugeordnet. Sowohl der Standard, als auch die Proben wurden Triplikaten angesetzt. Die Proben wurden zur genaueren Messung 1:10 verdünnt. Zu allen Proben wurde 200 µl Bradford-Reagenz zugefügt und für 10 min im Dunkeln inkubiert.

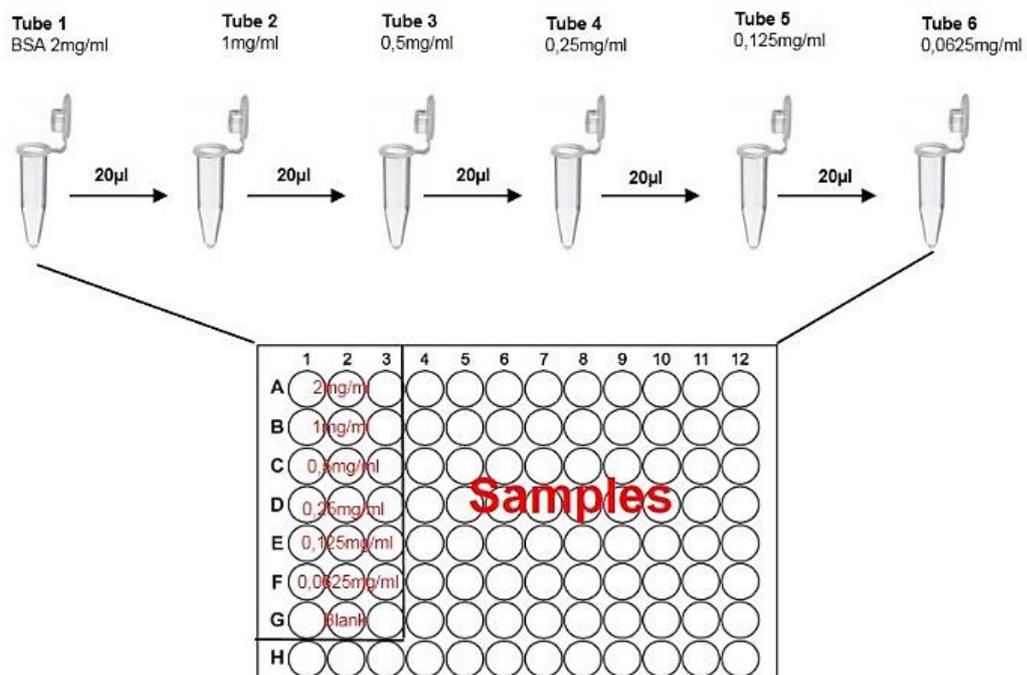


Abbildung 9: Verdünnungs- und Pipettierschema des Bradford Assays.

Nach der Inkubation wurde die Platte in das Photometer eingelegt und die Extinktion bei 592 nm gemessen. Anhand der erhaltenen Werte wurde dann die Proteinkonzentrationen berechnet. Der Regressionswert  $R^2$  beschreibt dabei die Variationen der Variablen Y dar, die mittels der linearen Regression erklärt werden können. Bei einem Regressionswert von 0 besteht kein linearer Zusammenhang. Bei einem Regressionswert von 1 besteht ein perfekter linearer

Zusammenhang. Für die Proteinbestimmung wurden nur jene Bradford Assays, mit einem Regressionswertes von mindestens 0,99 benutzt.

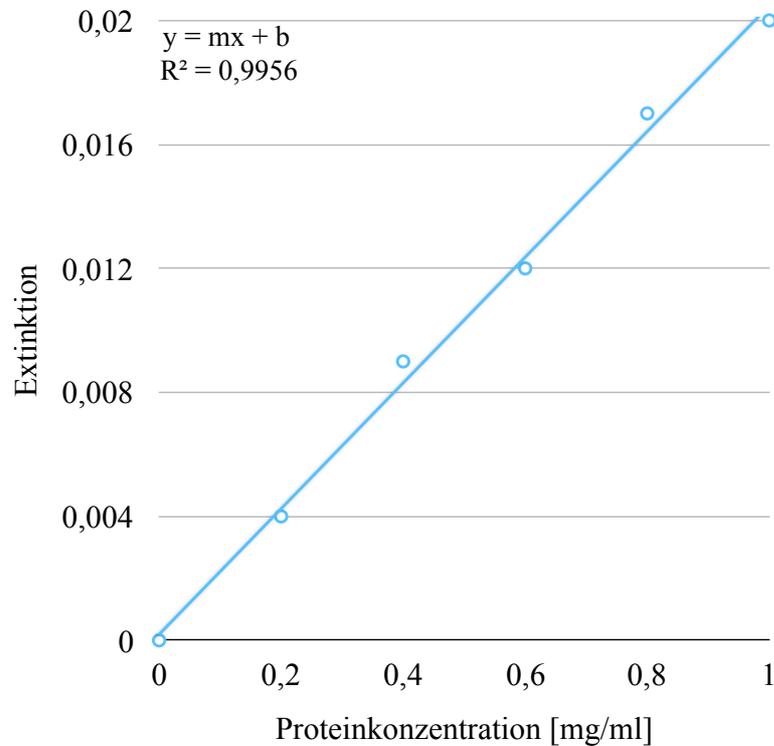


Abbildung 10: Standardkurve für die Proteinbestimmung. Mittels der Formel  $y = mx + b$  lässt sich die Proteinkonzentration  $x$  berechnen. Hierbei ist  $y$  die Extinktion,  $m$  die Steigung der Kurve und  $b$  der Achsenabschnitt.  $R^2$  stellt die Variationen der Variablen  $Y$  dar, welche mittels linearer Regression erklärt werden. Bei  $R^2=0$  besteht kein linearer Zusammenhang. Bei  $R^2=1$  hingegen besteht ein perfekter linearer Zusammenhang. Um den linearen Zusammenhang richtig interpretieren zu können, sollte  $R^2$  somit nahe bei 1 liegen.

## 2.2.10 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Mittels SDS-Gelelektrophorese ist es möglich geladene Proteine anhand einer Gelmatrix der Größe nach aufzutrennen. Große Proteine verbleiben auf der Gelmatrix weiter oben, wohingegen kleinere Proteine weiter entfernt von ihrem Auftragungsort zu finden sind. SDS dient hierbei dazu die Proteine negativ zu laden und so die Trennung zu ermöglichen.

Die Proben wurden mit Lämmli-Puffer versetzt und die nativen Proteine bei 95°C für 10 min denaturiert und im Anschluss auf das Gel aufgetragen. Die SDS-PAGE wurde dann für 30 min bei 90V und danach 1h bei 120V laufen gelassen, bis sich eine vollständige Auftrennung der Proteine ergab.

## 2.2.11 Proteindetektion mittels Western Blot

Der Western Blot dient dazu die aufgetrennten Proteine sichtbar zu machen. Nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE, wurden die im Gel befindlichen Proteine mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Vor dem Transfer wurde die Membran durch Methanol aktiviert, um die Bindung der Proteine zu ermöglichen. Nach Aktivierung der Membran wurde der Blot wie in Abbildung 14 vorbereitet und der Proteintransfer gestartet. Der Transfer erfolgte bei 25 V und 0,75 A (konstant) für zwei Stunden im Transferpuffer.

Um den Blot auf effizienten Proteintransfer zu überprüfen, wurde die Membran kurz in PBST gewaschen und anschließend für 2 min in 0,1 %-iger Ponceaus-S gefärbt und anschließend mit dH<sub>2</sub>O gewaschen, sodass die Proteinbanden sichtbar wurden. Bei erfolgreichem Transfervorgang wurden die Membranen für eine Stunde in 5% Magermilch mit PBST gelegt um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den primären Antikörpern gegen RFP, ID1 und I $\kappa$ B- $\alpha$ . Anti-RFP wurde dabei 1:1000 in Magermilch verdünnt, Anti-Id1 im Verhältnis 1:2500 und Anti-I $\kappa$ B- $\alpha$  im Verhältnis von 1:200 in Magermilch verdünnt.

Die Membran wurde über Nacht bei 4°C auf einem Plattformschüttler mit den primären Antikörpern inkubiert.

Um Reste der Primärantikörper zu entfernen folgte am nächsten Tag ein dreimaliges 10-minütiges Waschen der Membran mit PBST. Im Anschluss daran

wurde die Membran für eine Stunde mit dem sekundären Antikörper auf einem Plattformschüttler inkubiert und danach 3 x 10 min gewaschen.

Die Darstellung der Proben erfolgte mittels verbesserter Chemolumineszenz-Lösung (ECL). Hierzu wurde die ECL-Lösung 1:1 verdünnt und anschließend ein ml von ihr auf die Membran gegeben. Im Dunklen wurde die Membran nun eine Minute inkubiert. Anschließend wurden an verschiedenen Zeitpunkten mittels des Chemidox MP Imaging System Bilder aufgenommen.

### 2.2.12 RNA-Extraktion

Zur Durchführung einer CAGE wird die RNA der Zellen benötigt, weswegen diese zunächst extrahiert werden musste. Dazu werden die Zellen zunächst lysiert und homogenisiert, wonach die RNA extrahiert werden kann. Die RNA-Extraktion erfolgte mithilfe des RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen.

Hierzu wurden  $10^6$  Zellen in ein Falcon gegeben, für 5 Minuten bei 300 rpm zentrifugiert und anschließend der Überstand abgesaugt. Nun wurde ihnen 350  $\mu$ l Puffer RLT zugesetzt und vermischt. Zur weiteren Lysierung wurden die Zellen nun mindestens 5-mal durch eine G20 Kanüle gezogen. Anschließend erfolgte die Homogenisierung der Lysate mittels Zugabe von 70%igem Ethanol. Hiermit wurde das Zellpellet gut gemischt, jedoch nicht zentrifugiert. 700  $\mu$ l der Probe wurden in ein RNeasy Drehsäule überführt, welches in einem 2 ml Sammelröhrchen platziert wurde.

Nun wurde die RNA gebunden. Hierzu folgte eine Zentrifugation für 15 Sekunden bei 10.000 rpm. Der entstandene Durchfluss wurde entfernt. Anschließend wurden 700  $\mu$ l des Puffers RW1 dem RNeasy Drehsäule hinzugegeben und dieses für weitere 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert. Nun wurde der eine Menge des Puffers RPE mit der vierfachen Menge von Ethanol vermischt und von diesem verdünnten Puffer 500 $\mu$ l der RNeasy Drehsäule beigemischt. Die Probe wurde nun für 2 Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert. Im letzten Schritt wurde die RNeasy Drehsäule in ein neues 1,5 ml Sammelröhrchen platziert und 50 $\mu$ l RNase freies Wasser direkt auf die Drehsäulen-Membran gegeben und anschließend für eine Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert um die RNA auszuwaschen.

### 2.2.13 Cap analysis gene expression (CAGE):

CAGE ist eine Methode um die 5'-Enden einer mRNA aus einer Probe zu analysieren und mit ihrer Hilfe ein Rückschluss auf die Genexpression zu erlangen. Dazu werden diese 5'-mRNA Enden aus einer Probe extrahiert, mittels reverser Transkriptase in cDNA umgesetzt, durch PCR amplifiziert und anschließend sequenziert.

So werden kurze Nukleotidsequenzen gewonnen die anschließend mit einem Referenzgenom abgeglichen werden, sodass ein Rückschluss auf die originale mRNA und damit auf die abgelesenen Gene möglich ist.

Die Abfolge der wichtigsten Schritte ist bei Kodzius et al. ausführlich beschrieben [305].

Zunächst wird aus einer mRNA mittels reverser Transkriptase ein erster Strang cDNA hergestellt, welcher im Anschluss mit Proteinase K behandelt wird um Proteine in der Probe aufzulösen. Nun wird der cDNA Strang von Polysacchariden und anderen Abbauprodukten der Proteinolyse gereinigt. Anschließend werden die Diol-Gruppen der RNA oxidiert um diese für die Reaktion mit Biotin-Hydrazin vorzubereiten. Die Biotinylation dient dem Abschluss der cDNA Enden. Anschließend erfolgt mittels RNase I eine Spaltung von Einzelstrang RNA, nicht jedoch der Doppelstrang RNA-cDNA Stränge. Der RNA-cDNA Hybridstrang wird nun gereinigt und die Einzelstrang cDNA von der RNA gelöst, an einen CAGE Linker gebunden und anschließend der zweite DNA Strang synthetisiert. Mittels der Restriktionsendonuklease Mmel erfolgt nun eine Spaltung des DNA-Doppelstranges. Der so erhalten bleibende Rest der dsDNA wird nun mithilfe eines zweiten Linkers abgeschlossen und anschließend mittels Chromatographie und RNase I Behandlung aufgereinigt. Nun folgt die Polymerasekettenreaktion (PCR) und Aufreinigung der so entstehenden kurzen DNA Fragmente, der so genannten CAGE Tags. Diese werden zuletzt miteinander verbunden und anschließend mithilfe eines Vergleichsgenoms analysiert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Immunzytochemie (ICC) der LN229 Zelllinie

Mittels Immunzytochemie sollte zunächst die Wirksamkeit der Virustransduktion erfasst werden und anschließend die Auswirkungen der Doxycyclin-Induktion auf die Proteinverteilung zwischen Zytoplasma und Nukleus der verschiedenen Proteine untersucht werden.

48 Stunden nach Doxycyclin-Induktion wurden die Zellen angefärbt. Mittels DAPI wurden die DNA-Bestandteile sichtbar gemacht. Sichtbar in Abbildung 11 in Bild B. Dies zeigt eine starke Fluoreszenz in den klar begrenzten Zellkernen und keinerlei Anfärbung im Zytoplasma. In Bild D sichtbar ist die Färbung mit Phalloidin, welche Aktinfilamente zeigt. Diese zeigen die einzelnen Zellen mit ihrer Zellstruktur und sind in Nukleus und Zytoplasma zu finden. In Bild C der Abbildung 11 wurde ID1 angefärbt. Dieses findet sich ebenfalls in Zytoplasma und Nukleus, jedoch deutlich vermehrt im Zellkern, wo es an die DNA bindet. Bild E zeigt die Anfärbung von RFP, welches mit dem Transkriptionsfaktor E47 zur Sichtbarmachung desselben fusioniert wurde. RFP zeigt sich leicht im Zytoplasma, jedoch primär im Zellkern. In Bild A wird die Überlagerung aller Anfärbungen gezeigt.

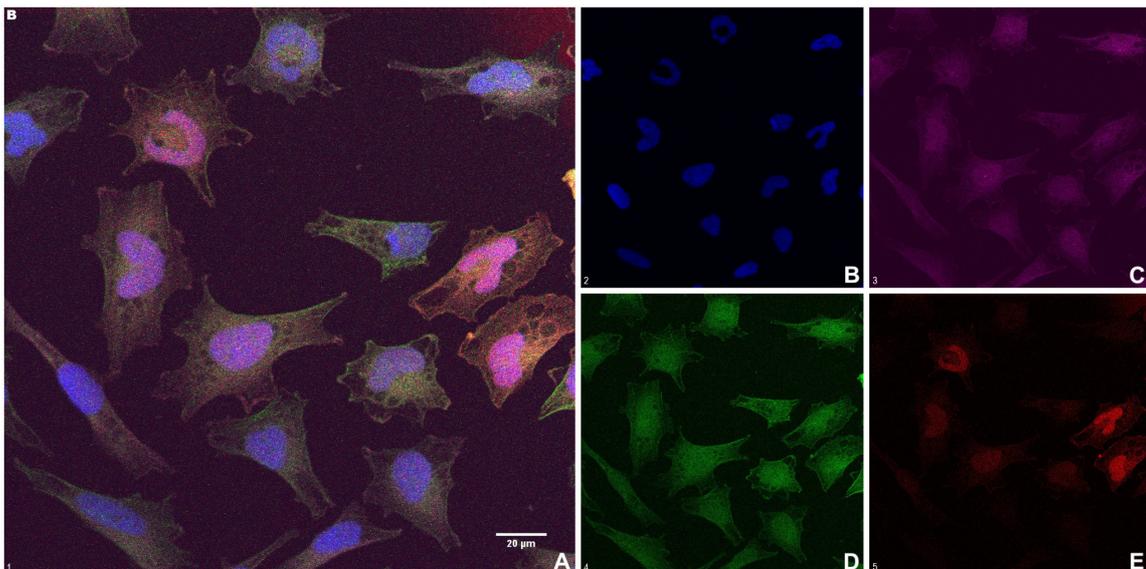


Abbildung 11: Immunzytochemie Bild der LN229 RFP-Zellen 48 Stunden nach Doxycyclin Gabe. A: Zusammenfassendes Bild aller Färbungen. B: Blaue DAPI Färbung zeigt DNA

Lokalisation im Zellkern. C: ID1 Färbung (violett) zeigt eine schwache Expression im Zytoplasma und eine deutlich stärkere Expression im Nukleus. D: Grüne Phalloidin Färbung von Aktinfilamenten zeigt Verteilung in der gesamten Zelle. E: Rote RFP Färbung zeigt starke Expression im Zellkern und schwache Expression im Zytoplasma.

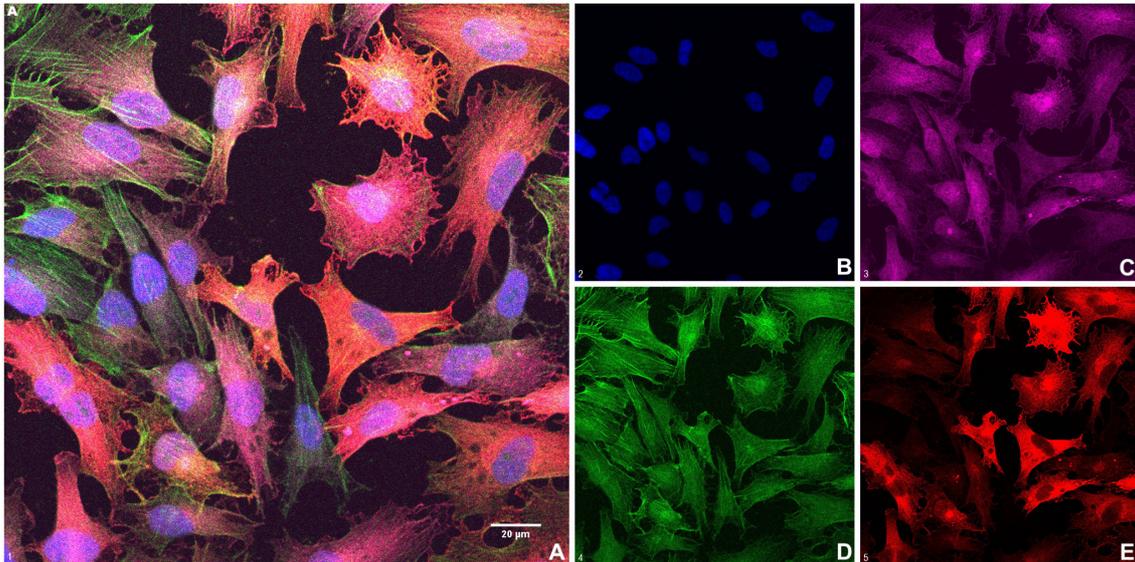


Abbildung 12: Immunzytochemie Bild der LN229 dnE47-Zellen 48 Stunden nach Doxycyclin Gabe. A: Zusammenfassendes Bild aller Färbungen. B: Blaue DAPI Färbung zeigt die angefärbte DNA im Zellkern. C: Violette ID1 Färbung zeigt verstärkte Expression im Zellkern, sowie Expression im Zytoplasma. D: Grüne Phalloidin Färbung zeigt Aktinfilamente in den gesamten Zellen. E: Rote RFP Färbung zeigt extranukleäres Vorkommen.

Abbildung 12 zeigt die immunzytochemischen Anfärbungen 48 Stunden nach Doxycyclin Induktion bei dnE47 Zellen der LN229 Zelllinie. Bild A zeigt das fusionierte Bild der einzelnen Färbungen. Bild B zeigt die Färbung mit DAPI, zur Sichtbarmachung von DNA. Es zeigt sich eine starke Färbung in den Zellkernen ohne eine Fluoreszenz innerhalb des Zytoplasma. Bild D zeigt die Anfärbung mit Phalloidin und somit der Aktinfilamente. Diese zeigen sich innerhalb der gesamten Zelle. Bild C zeigt die Anfärbung von ID, welches sich im Zytoplasma und Nukleus befindet. Im Vergleich zu Abbildung 11 zeigt sich eine deutlich stärkere Anfärbung im Zytoplasma. Dies resultiert aus der Heterodimerisierung von ID1 mit dnE47. DnE47 kann aufgrund des fehlenden NLS nicht in den Kern gelangen, weswegen auch die gebildeten Heterodimere nicht in den Zellkern gelangen können. Aufgrund zeigt sich eine stärkere ID1-Expression im

Zytoplasma als dies in Abbildung 11 der Fall ist. In Bild E wurde RFP angefärbt. Dieses wurde mit dnE47 fusioniert und zeigt eine starke Expression im Zytoplasma, jedoch nicht in den Zellkernen, da dnE47 aufgrund des fehlenden NLS nicht in den Zellkern gelangen kann.

Im Vergleich von Abbildung 12 zu Abbildung 11 zeigt sich somit bei den dnE47 Zellen nach Doxycyclin-Induktion ein Verbleiben des Fusionsproteins dnE47:RFP im Zytoplasma. Das Fehlen des NLS bewirkt, dass ein Transport des Proteins in den Nukleus nicht möglich ist. Die stärkere Expression von ID1 bei den dnE47 Zellen nach Doxycyclin-Induktion zeigt, dass auch die Bindungspartner von dnE47 von diesem Effekt betroffen sind. Die mit dnE47 gebildeten Heterodimere können aufgrund des fehlenden NLS von dnE47 nicht in den Zellkern gelangen und akkumulieren im Zytoplasma. Die Darstellung der DNA und der Aktinfilamente diente als Kontrolle. Beides bleibt bei Doxycyclin-Induktion bei RFP und dnE47 Zellen unverändert. Insgesamt zeigt sich bei den dnE47 Zellen nach Doxycyclin-Induktion im Vergleich zu den RFP Zellen ein veränderter Zellphänotyp.

### **3.2. Western Blot der LN229 Zelllinie**

Mithilfe des Western Blots sollten die Zellen weiter phänotypisiert werden. So sollte die Proteinverteilung von dnE47 und dessen Bindungspartnern nach Doxycyclin-Induktion untersucht werden. Als Vergleich diente hierbei das normale E47 Molekül in den RFP Zellen, sowie  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  als zytoplasmatische Kontrolle.

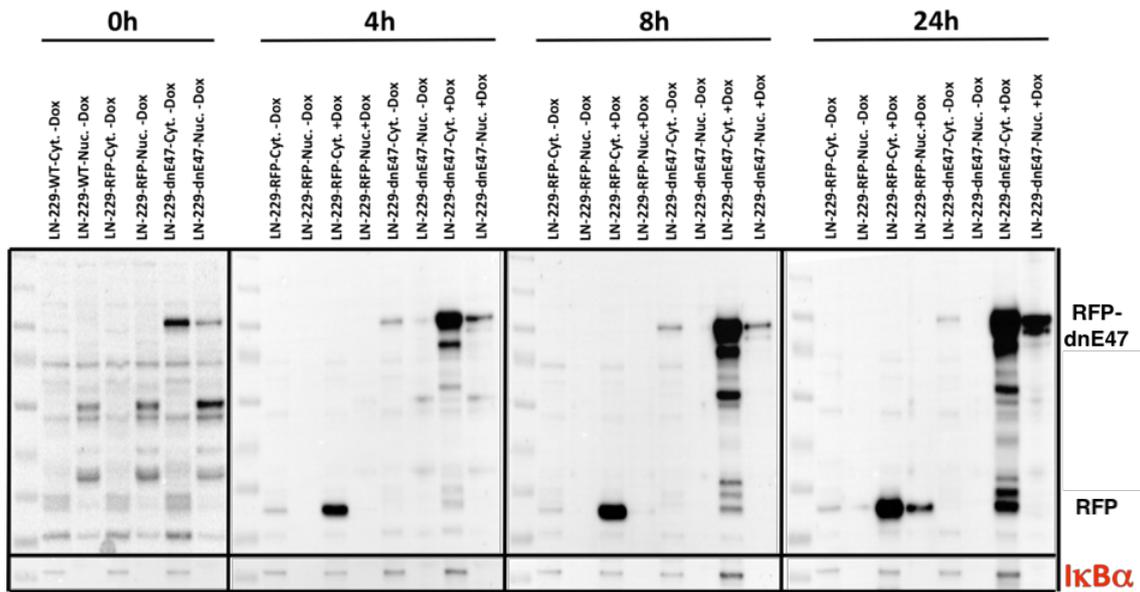


Abbildung 13: Western Blot der LN299 dnE47 und LN299 RFP Zellen 0, 4, 8 und 24 Stunden nach Doxycyclin-Induktion. Auftrennung der Zellen nach nukleärem und zytoplasmatischem Lysat. Darstellung von RFP (27kD) und IκBα (35-41 kD) als zytoplasmatische Kontrolle. Das Molekulargewicht von RFP im fusionierten Zustand mit dnE47 beträgt 80-100 kD. Es zeigt sich, dass IκBα sich nur bei den zytoplasmatischen Lysaten darstellt. RFP wird nach Doxycyclin-Induktion bei den dnE47 Zellen deutlich stärker im Zytoplasma als im Nukleus gefunden. Ohne Doxycyclin-Induktion findet es sich weder im Zytoplasma, noch im Nukleus. Mit zunehmender Zeit wird die Expression im Nukleus stärker.

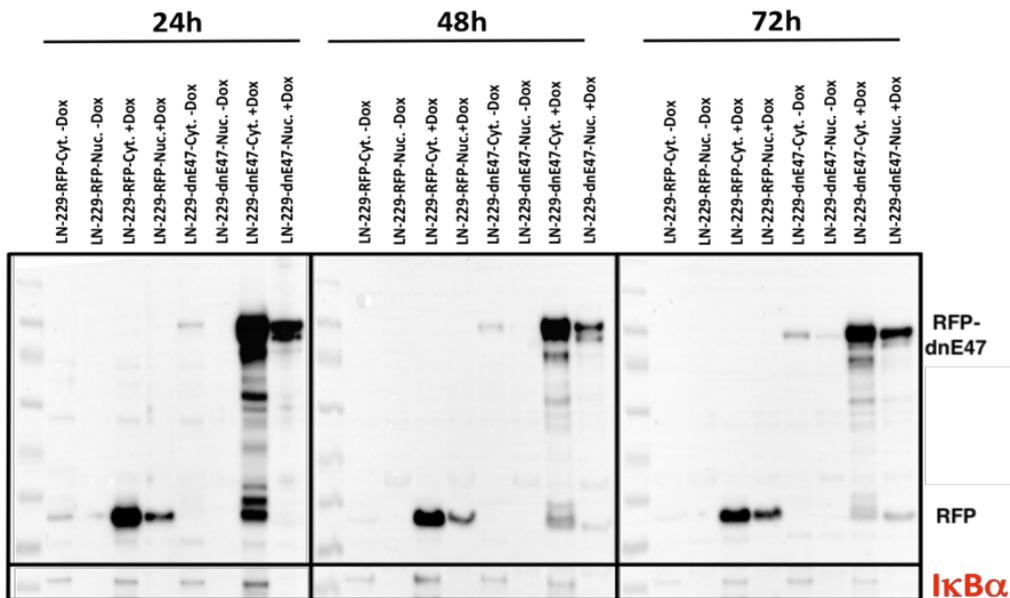


Abbildung 14: Western Blot der LN229 dnE47 und LN229 RFP Zellen 24, 48, und 72 Stunden nach Doxycyclin-Induktion. Auftrennung der dnE47 und RFP Zellen nach nukleärem und zytoplasmatischem Lysat. Darstellung von RFP (27kD) und  $I\kappa B\alpha$  (35-41 kD) als zytoplasmatische Kontrolle. Das Molekulargewicht von RFP im fusionierten Zustand mit dnE47 beträgt 80-100 kD. Es zeigt sich, dass  $I\kappa B\alpha$  sich nur bei den zytoplasmatischen Lysaten darstellt. RFP wird nach Doxycyclin-Induktion bei den dnE47 Zellen deutlich stärker im Zytoplasma als im Nukleus gefunden. Ohne Doxycyclin-Induktion findet es sich im Zytoplasma und im Nukleus in nur geringer Konzentration. Mit zunehmender Zeit wird die Expression im Nukleus stärker.

In Abbildung 13 und Abbildung 14 stellt sich der Western Blot der LN229 dnE47 und RFP Zellen 0,4,8,24,48 und 72 Stunden nach Doxycyclin-Induktion dar. Angefärbt wurden RFP und  $I\kappa B\alpha$ .  $I\kappa B\alpha$  dient als Protein des Zytosol als zytoplasmatische Kontrolle. Direkt nach Doxycyclin-Induktion zeigt sich RFP im Nukleus und Zytoplasma. Mit zunehmender Zeit steigt bei den dnE47 Zellen die RFP-Konzentration im Zytoplasma, während sie bei den RFP Zellen unverändert bleibt. Nach 72 Stunden scheint der Effekt bei den dnE47 Zellen am stärksten zu sein. Ohne Doxycyclin-Induktion zeigt sich weder bei den RFP noch bei dnE47 Zellen eine Veränderung.

Nach Darstellung des Einflusses der Doxycyclin-Induktion auf die veränderte Lokalisation von E47:RFP und dnE47:RFP in LN229 dnE47 und RFP Zellen, sollten die Folgen der veränderten Proteinlokalisierung auf die Bindungspartner

von E47/dnE47 genauer untersucht werden. Dazu wurde die Lokalisation von ID1 als Heterodimerisierungspartner von E47 und dnE47 in einem Western Blot untersucht. Es sollte untersucht werden, ob die primär zytoplasmatische Lokalisation von dnE47 nach Doxycyclin-Induktion auch bei dessen potenziellen Bindungspartnern eine verstärkte Lokalisation im Zytoplasma bewirkt.

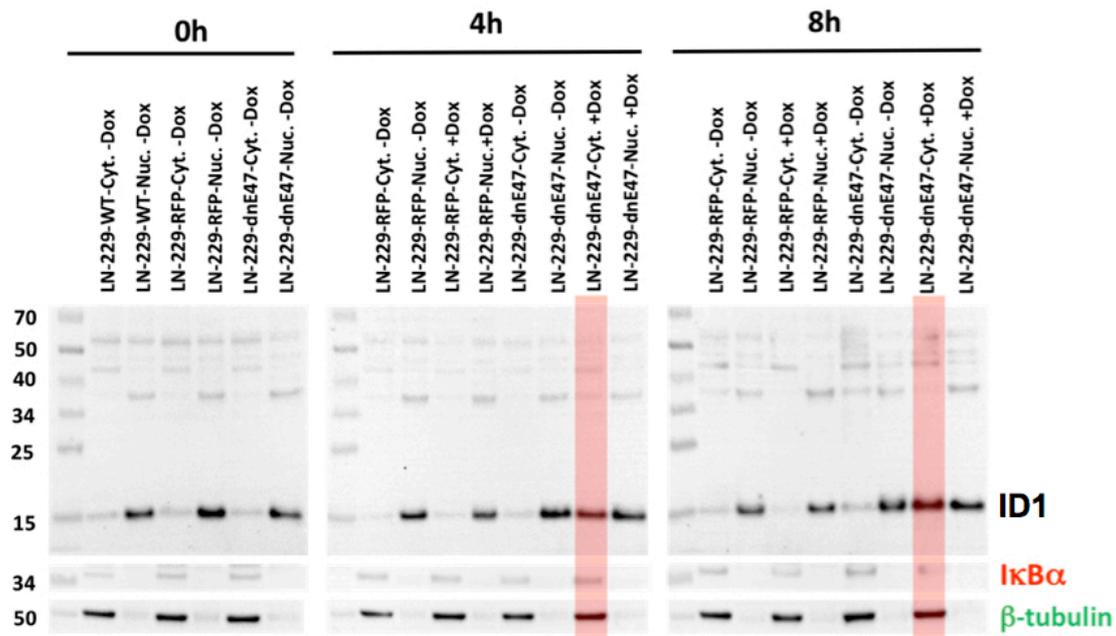


Abbildung 15: Western Blot der LN229 dnE47 und LN299 RFP Zellen 0, 4 und 8 Stunden nach Doxycyclin-Induktion. Direkt nach Doxycyclin-Induktion zeigt sich die erwartbare Expression von ID-1 (15-22 kD) im Nukleus aller Zellen. Bereits nach 4 Stunden zeigt sich bei den dnE47 Zellen eine starke Expression von ID-1 im Zytoplasma. Diese Expression nimmt nach 8 Stunden zu. I $\kappa$ B $\alpha$  (35-41 kD) und  $\beta$ -Tubulin (55 kD) dienen als Kontrolle und zeigen ihre normale Expression im Zytoplasma, nicht jedoch im Nukleus. Diese Verteilung ändert sich bei einer Doxycyclin-Induktion nicht.

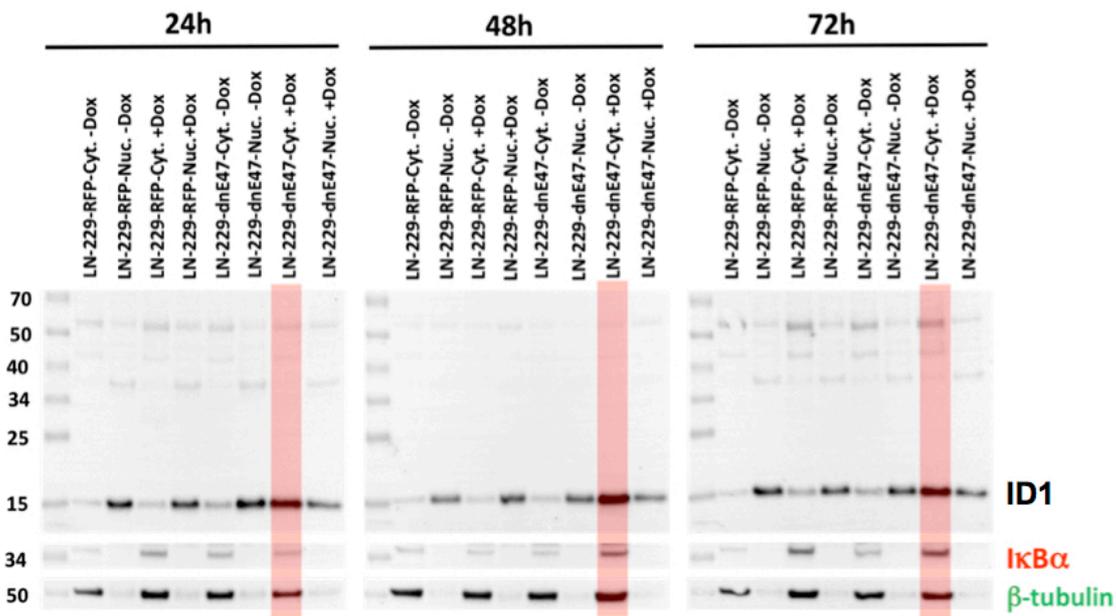


Abbildung 16: Western Blot der LN299 dnE47 und LN229 RFP Zellen 24, 48 und 72 Stunden nach Doxycyclin-Induktion. Mit zunehmender Zeit zeigt sich bei den dnE47 Zellen eine stärkere Expression von ID-1 (15-22 kD) im Cytoplasma und eine schwächere Expression im Nukleus. Ohne Doxycyclin-Induktion oder bei RFP Zellen zeigt sich diese Verteilung nicht. I $\kappa$ B $\alpha$  (35-41 kD) und  $\beta$ -Tubulin (55 kD) dienen als Kontrolle und zeigen ihre normale Expression im Zytoplasma, nicht jedoch im Nukleus. Diese Verteilung ändert sich bei einer Doxycyclin-Induktion nicht.

In Abbildung 15 und Abbildung 16 zeigt sich der Western Blot der LN229 dnE47 und RFP Zellen 0,4,8,24,48 und 72 Stunden nach Doxycyclin-Induktion mit Darstellung von ID1 (15-22 kD), I $\kappa$ B $\alpha$  (35-41 kD) und  $\beta$ -Tubulin (55 kD). I $\kappa$ B $\alpha$  und  $\beta$ -Tubulin dienen als zytoplasmatische Kontrolle. Direkt nach Doxycyclin-Induktion ist ID1 primär im Nukleus lokalisiert. Ab 4 Stunden nach Doxycyclin-Induktion zeigt sich (rot markiert) bei den dnE47 Zellen eine Expression von ID-1 im Zytoplasma. Diese zeigt sich mit zunehmender Zeit stärker als die Expression von ID-1 im Nukleus. Der Effekt in den dnE47 Zellen zeigt sich nach 72 Stunden am stärksten ausgeprägt. Bei den RFP Zellen zeigt sich nur eine sehr geringe Expression von ID-1 im Zytoplasma. I $\kappa$ B $\alpha$  und  $\beta$ -Tubulin bleiben bei allen Zellen nur im Zytoplasma exprimiert. Ohne Doxycyclin-Induktion zeigt sich weder bei den RFP noch bei dnE47 Zellen eine Veränderung mit der Zeit.

Mithilfe der Western Blots konnten die dnE47 Zellen weiter phänotypisiert werden. So zeigte sich bei den dnE47 Zellen im Vergleich zu den RFP Zellen,

wie auch in der Immunzytochemie, deutliche Unterschiede in der Proteinverteilung. RFP:dnE47 kann aufgrund des fehlenden NLS nicht in den Kern gelangen und akkumuliert deswegen mit der Zeit im Zytoplasma der dnE47 Zellen nach Doxycyclin-Induktion. Sein Bindungspartner ID1 bildet mit dnE47 Heterodimere, welche aufgrund des fehlenden NLS von dnE47 jedoch ebenfalls nicht in den Nukleus gelangen können. Dies bewirkt neben einer Akkumulation von dnE47, auch eine Akkumulation von ID1 im Zytoplasma. Damit kann ID1 nicht an seinen Wirkort im Zellkern gelangen.

### **3.3. Einzeltherapien Klonogenitäts Assay der LN229**

#### **Zelllinie**

Mithilfe der Einzeltherapietestung in den Klonogenitäts Assays sollte die Wirkung des dnE47 Ansatzes auf das Zellwachstum getestet werden. Zum Vergleich sollte zudem der Einfluss von Chemo- und Strahlentherapie auf das Zellwachstum untersucht werden. Mithilfe von Kombinationen des dnE47 Ansatzes mit Strahlen- oder Chemotherapie sollten zudem eventuell vorliegende synergistische oder additive Effekte getestet werden.

Die Auswertung erfolgte mittels Graphpad 6 der Firma Prism. Für jeden Versuch wurden drei biologische und drei technische Replikate erstellt.

#### **3.3.1 Klonogenitäts Assay mit Bestrahlung und Doxycyclin-Induktion**

Abbildung 17 und Abbildung 18 zeigen die Klonogenitäts Assays mit erfolgter Bestrahlung mit 1 und 2 Gy +/- Doxycyclin-Induktion. Bei den Kontrollen erfolgte 24 Stunden nach Aussaat die Behandlung mittels Bestrahlung oder die Doxycyclin-Induktion. Bei den Kombinationen von Bestrahlung und Doxycyclin-Induktion erfolgte die Doxycyclin-Induktion 24 Stunden nach Bestrahlung.

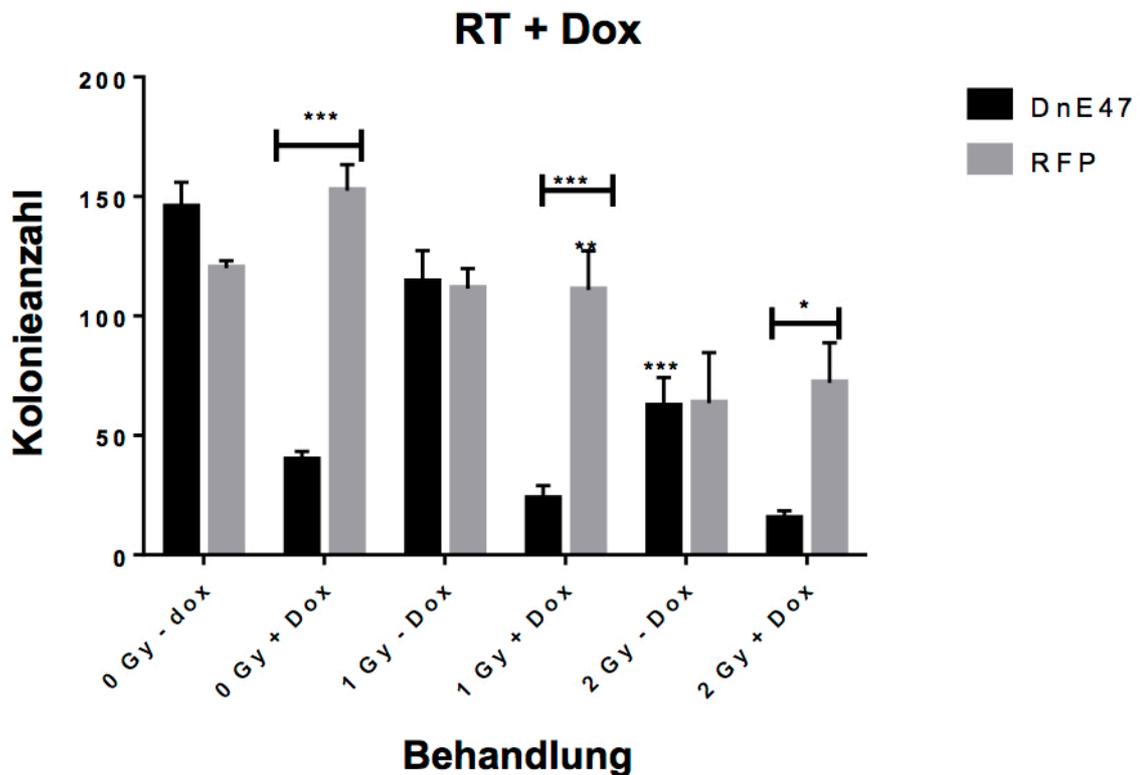


Abbildung 17: Klonogenitäts Assay der LN229 Zellen nach Radiotherapie und Doxycyclin Gabe. Es zeigt sich eine deutliche Abnahme der Koloniezahl der dnE47 Zellen nach Doxycyclin Gabe. Außerdem zeigt sich eine Wachstumsreduktion von RFP und dnE47 Zellen bei Bestrahlung mit 2 Gy. Eine Behandlung mit 1 Gy zeigt keine signifikante Reduzierung der Koloniezahl. Die Sterne geben die Signifikanzniveaus an. Ein Stern steht für ein, mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 5 %, signifikantes Ergebnis. Zwei Sterne geben ein, mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner 1 %, sehr signifikantes Ergebnis an. Drei Sterne zeigen ein, mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner 0,1%, höchst signifikantes Ergebnis an. Mittelwerte +/- SD mit n=9 aus drei unabhängigen Experimenten. Statistische Testung mittels ANOVA.

Beim Vergleich der RFP und dnE47 Zellen bei Behandlung mit Radiotherapie und +/- Doxycyclin zeigt sich eine erhebliche Wachstumsreduktion der dnE47 Zellen nach Doxycyclin-Induktion im Vergleich zu den RFP Zellen. Fehlt die Doxycyclin-Induktion zeigen beide Zellarten eine vergleichbare Koloniezahl. Bei den Therapieformen 0 Gy + Dox, 1 Gy + Dox und 2 Gy + Dox zeigt sich jeweils ein signifikanter Unterschied der Koloniezahlen zwischen dnE47 und RFP. Die dnE47 Zellen reagieren auf Doxycyclin mit einem stark reduzierten

Zellwachstum, wohingegen die RFP Zellen ein ähnliches Wachstum zu der jeweiligen Therapieform ohne Doxycyclin zeigen. Zudem zeigt sich mit steigender Intensität der Strahlentherapie eine zunehmende Wachstumsrestriktion bei beiden Zelllinien.

Insgesamt zeigt sich somit eine Wachstumsreduktion durch die Behandlung mit 2 Gy, sowie eine sehr starke Koloniezahlfürderung bei dnE47 durch die Doxycyclin-Induktion.

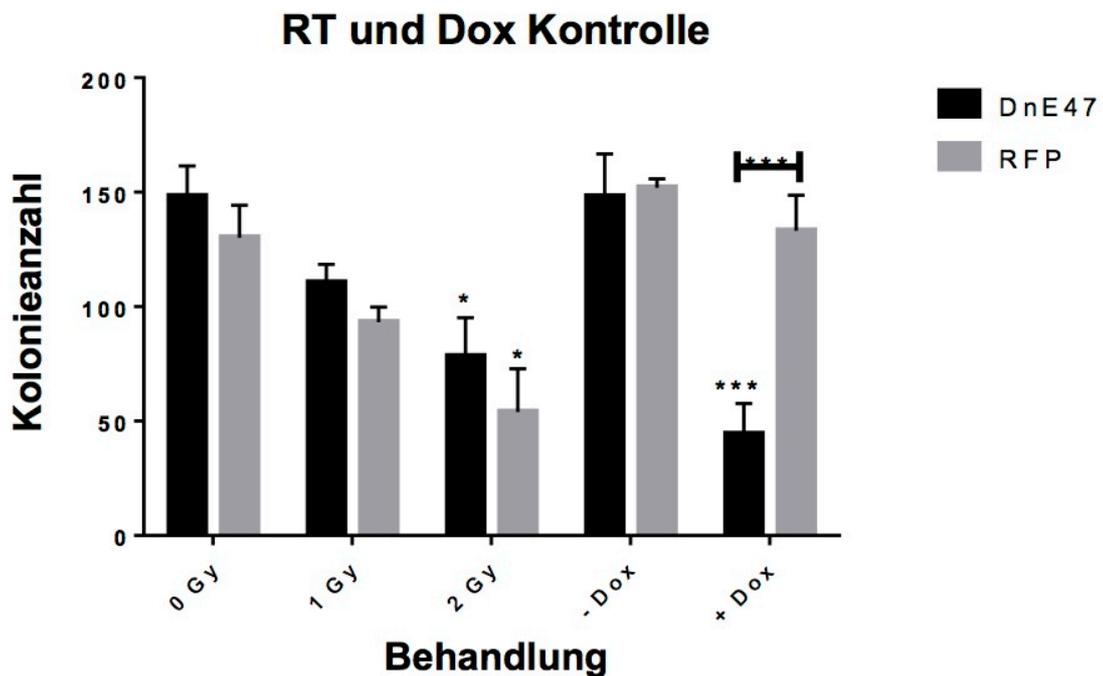


Abbildung 18: Klonogenitäts Assay mit singulärer Radiotherapie und Doxycyclin Gabe zur internen Kontrolle. Es zeigt sich bei RFP und dnE47 Zellen eine Koloniezahlfürderung mit zunehmender Stärke der Bestrahlung. Außerdem zeigt sich bei den dnE47 Zellen unter Doxycyclin Gabe eine deutliche Reduzierung der Koloniezahl. Die Sterne geben die Signifikanzniveaus an. Ein Stern steht für ein, mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 5 %, signifikantes Ergebnis. Zwei Sterne geben ein, mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner 1 %, sehr signifikantes Ergebnis an. Drei Sterne zeigen ein, mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner 0,1%, höchst signifikantes Ergebnis an. Mittelwerte +/- SD mit n=9 aus drei unabhängigen Experimenten. Statistische Testung mittels ANOVA.

Zur Kontrolle wurden die beiden Zelllinien unter einer jeweilig singulären Therapie mit Radiotherapie und Doxycyclin verglichen. Es zeigte sich bei beiden Zellarten eine Reduktion der Koloniezahl bei Bestrahlung, sowie bei

dnE47 eine deutliche Wachstumsreduktion bei Doxycyclin-Induktion. Es zeigt sich vor allem ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Zelllinien bei Therapieinduktion mit Doxycyclin. So zeigen die dnE47 Zellen eine starke Reduzierung ihres Wachstums, wohingegen die RFP Zellen eine ähnliche Kolonieanzahl wie ohne Doxycyclin-Induktion zeigen.

### 3.3.2 Klonogenitäts Assay mit Chemotherapie und Doxycyclin-Induktion

Abbildung 19 und Abbildung 20 zeigen die Klonogenitäts Assays mit Chemotherapie +/- Doxycyclin-Induktion. Bei den Kontrollen erfolgte 24 Stunden nach Aussaat die Behandlung mittels TMZ-Gabe oder die Doxycyclin-Induktion. Bei den Kombinationen von Chemotherapie und Doxycyclin-Induktion erfolgte die Doxycyclin-Induktion 24 Stunden nach Bestrahlung. Da TMZ in DMSO gelöst verabreicht wurde, erfolgte eine DMSO Kontrolle um einen wachstumsreduzierenden Effekt durch DMSO auszuschließen.

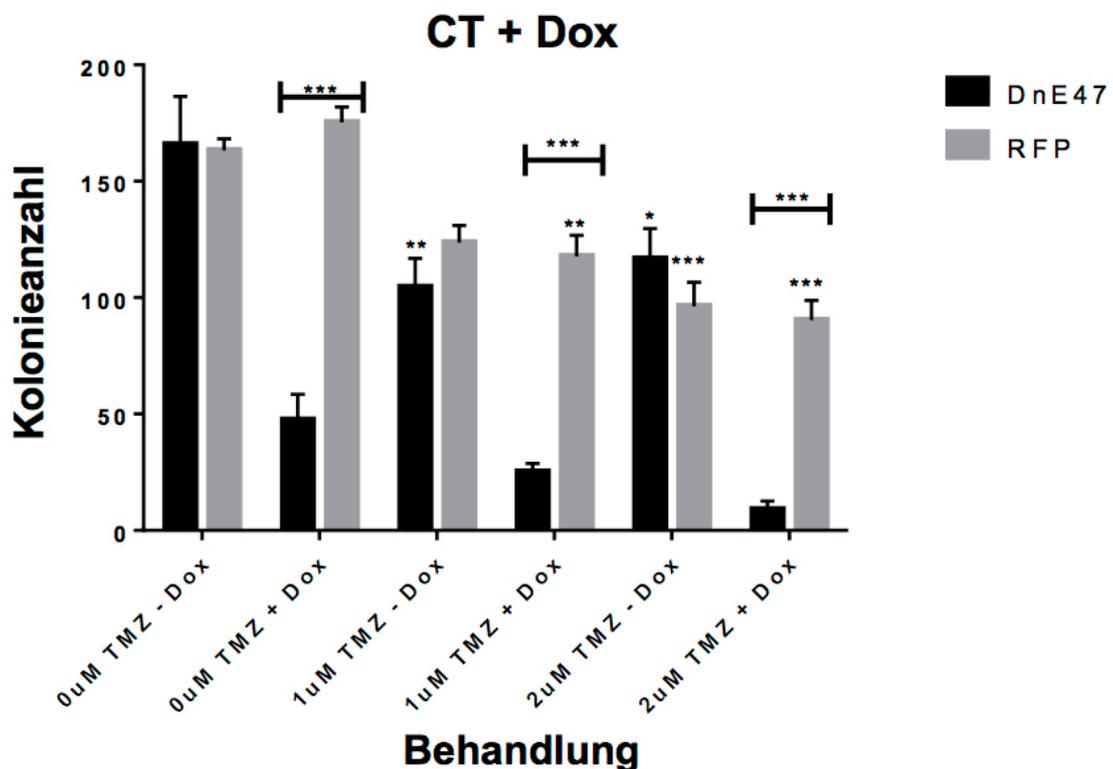


Abbildung 19: Klonogenitäts Assay mit Kombination aus TMZ und Doxycyclin Gabe. Es zeigt sich jeweils bei Doxycyclin Gabe eine deutliche Wachstumsreduktion der dnE47

Zellen, nicht aber der RFP Zellen. Des Weiteren zeigt sich eine leichte Reduktion der Koloniezahl unter Chemotherapie bei beiden Zelltypen. Die Sterne geben die Signifikanzniveaus an. Ein Stern steht für ein, mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 5 %, signifikantes Ergebnis. Zwei Sterne geben ein, mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner 1 %, sehr signifikantes Ergebnis an. Drei Sterne zeigen ein, mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner 0,1%, höchst signifikantes Ergebnis an. Mittelwerte +/- SD mit n=9 aus drei unabhängigen Experimenten. Statistische Testung mittels ANOVA.

Unter Therapie mit TMZ und +/- Doxycyclin zeigte sich wie bei der Radiotherapie eine deutliche Wirkung der Doxycyclin-Induktion auf die dnE47, nicht aber auf die RFP Zellen. Außerdem zeigt sich eine leichte Wachstumsrestriktion beider Zelllinien unter TMZ Behandlung, es zeigt sich jedoch kein deutlicher Unterschied zwischen 1 und 2  $\mu$ M TMZ.

Die drei signifikanten Wachstumsreduktionen zeigen sich unter der Therapieinduktion mit Doxycyclin beim Vergleich von dnE47 und RFP Zellen. So zeigt sich bei 0 $\mu$ M TMZ + Dox eine deutliche Wachstumsverringering bei den dnE47 Zellen, jedoch nicht bei den RFP Zellen. Ohne Therapie (0 $\mu$ M TMZ – Dox) zeigen beide Zelllinien ein ähnliches Wachstum.

Auch bei der Kombination von 1 $\mu$ M TMZ + Dox zeigt sich eine signifikante Wachstumsreduktion bei den dnE47 Zellen im Vergleich zu den RFP Zellen. Bei einer reinen Chemotherapie mit 1  $\mu$ M TMZ – Dox zeigen beide Zelllinien wieder ein ähnliches Wachstum. Auch bei der Kombination von 2  $\mu$ M TMZ +Dox zeigt sich eine signifikante Wachstumsreduzierung bei den dnE47 Zellen im Vergleich zu den RFP Zellen. Bei einer Therapie mit 2  $\mu$ M TMZ – Dox zeigt sich wieder ein ähnliches Koloniewachstum. Es zeigt sich somit bei allen Versuchen mit Doxycyclin eine starke Wachstumsrestriktion der dnE47 Zellen, nicht jedoch bei den RFP Zellen. Ohne Doxycyclin weisen beide Zelllinien ein ähnliches Wachstum auf. Zudem zeigen beide Zelllinien unter einer zunehmenden Chemotherapie ein verringertes Wachstum.

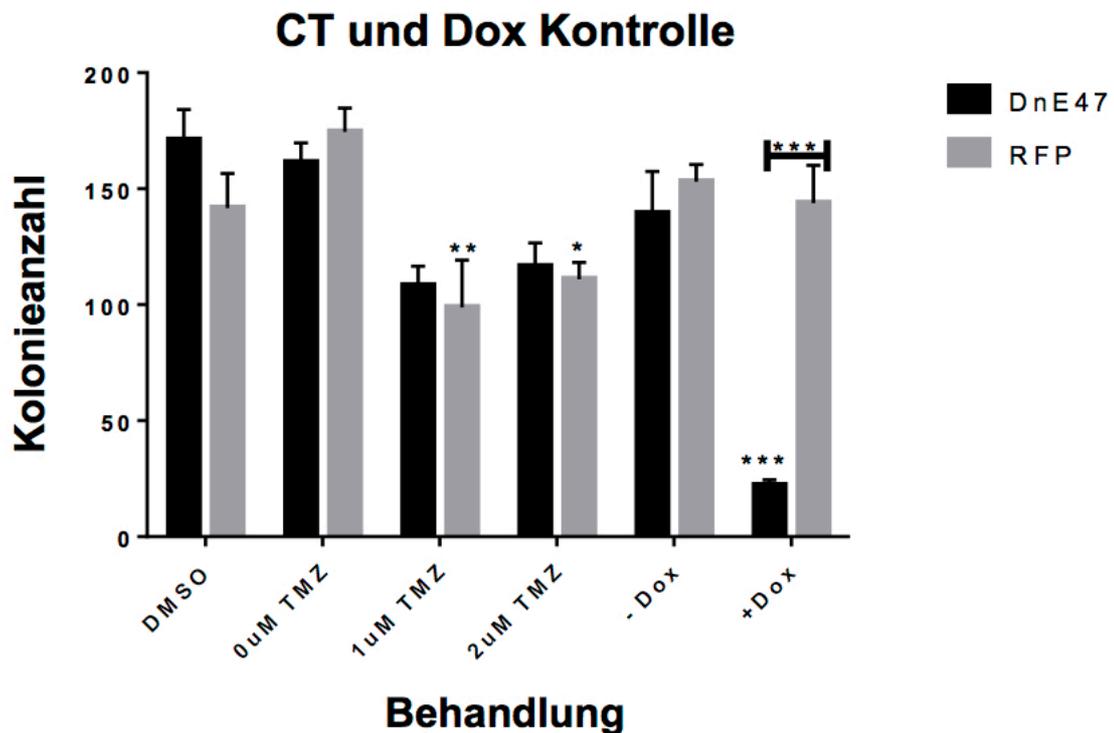


Abbildung 20: Klonogenitäts Assay mit singularärer TMZ und Doxycyclin Gabe zur internen Kontrolle. TMZ wird in DMSO gelöst, wodurch die Zytotoxizität von DMSO getestet werden muss. Es zeigt sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen DMSO und dem reinen Zellwachstum ohne TMZ Gabe (0µ TMZ). Es zeigt sich weiter eine Koloniezahlreduktion unter TMZ Therapie, wodurch kein deutlicher Unterschied zwischen 1 und 2 µM TMZ Gabe deutlich wird. Eine Doxycyclin Gabe führt bei dnE47 Zellen zu einer signifikanten Wachstumsreduzierung, nicht jedoch bei RFP Zellen. Die Sterne geben die Signifikanzniveaus an. Ein Stern steht für ein, mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 5 %, signifikantes Ergebnis. Zwei Sterne geben ein, mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner 1 %, sehr signifikantes Ergebnis an. Drei Sterne zeigen ein, mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner 0,1%, höchst signifikantes Ergebnis an. Mittelwerte +/- SD mit n=9 aus drei unabhängigen Experimenten. Statistische Testung mittels ANOVA.

Innerhalb der Kontrolle der beiden Zelllinien zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der DMSO und der 0 µM TMZ Therapie. Es zeigte sich weiterhin eine leichte Zellzahlreduktion unter Temozolomidtherapie, wobei sich kein signifikanter Unterschied zwischen 1 und 2 µM TMZ offenbarte. Des Weiteren zeigte sich der gleiche signifikante Effekt der Doxycyclin-Induktion auf dnE47.

Da Temozolomid in DMSO gelöst wird, musste die Wirkung von DMSO auf die Zellen ebenfalls untersucht werden um eine eventuelle Zytotoxizität auszuschließen

Insgesamt zeigt sich in den Klonogenitäts Assays also eine deutliche Reduzierung des Zellwachstums von dnE47 unter Doxycyclin Gabe, wohingegen RFP keine solche Reaktion zeigt. Die Reaktion von dnE47 und RFP auf eine Bestrahlung und eine zytotoxische Chemotherapie mit TMZ ist vergleichbar. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Zellzahlreduktion unter TMZ Gabe nicht auf das Lösungsmittel DMSO zurückzuführen ist. Somit konnten die Einzeltherapietestungen mittels Klonogenitäts Assay zeigen, dass der dnE47 Ansatz einen sehr starken Einfluss auf das Zellwachstum hat. Dieser Effekt scheint stärker zu sein, als der Effekt von Strahlen- oder Chemotherapie. Bei der Kombination von dnE47 Ansatz und den beiden bisherigen Therapieformen zeigte sich keine synergistischen Effekte.

### **3.4. Kombinationstherapie Klonogenitäts Assay der LN229 Zelllinie**

Mithilfe der Kombinationstherapietestung in Klonogenitäts Assays sollte die Frage nach möglichen synergistischen oder additiven Effekten zwischen Chemo-/Strahlentherapie und dnE47 Ansatz genauer untersucht werden.

Abbildung 21 zeigt den Klonogenitäts Assay der Kombinationen von Strahlen- und Chemotherapie mit Doxycyclin-Induktion. Beim Therapieregime Dox-RT/CT erfolgte 24 Stunden nach Aussaat die Doxycyclin-Induktion. 48 Stunden nach Aussaat erfolgte die Behandlung mit Bestrahlung und TMZ, sowie eine weitere Doxycyclin-Induktion. Nach 72 Stunden erfolgte eine letzte Doxycyclin-Induktion mit dem Mediumwechsel.

Beim Therapieregime RT/CT-Dox erfolgte 24 Stunden nach Aussaat die Behandlung mit Bestrahlung und Chemotherapie. Nach 48 und 72 Stunden erfolgte die Doxycyclin-Induktion.

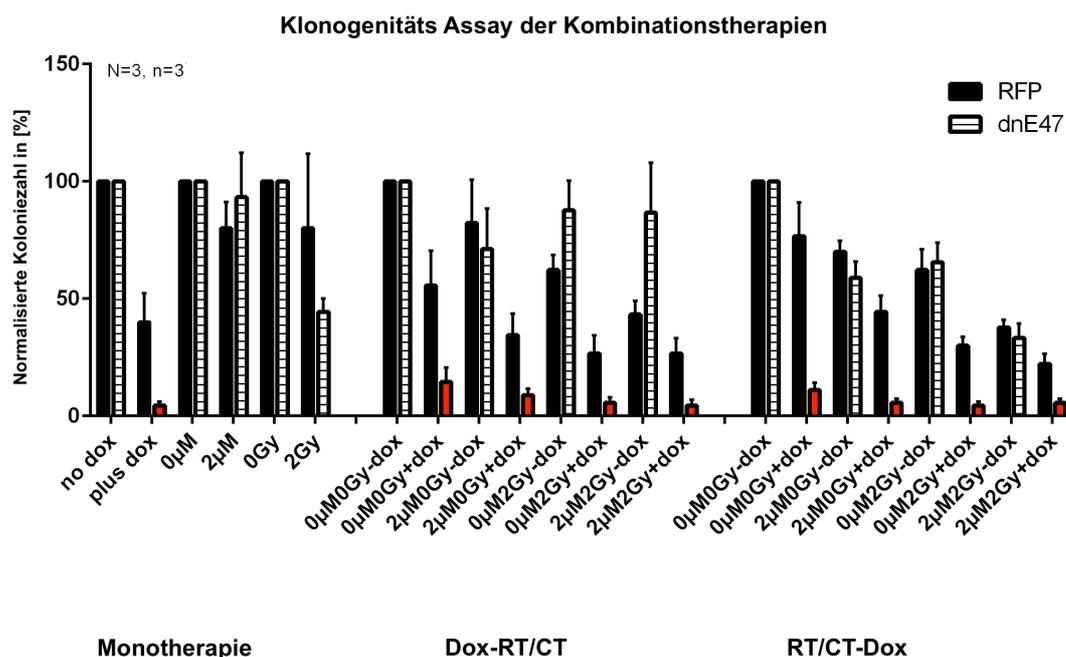


Abbildung 21: Kombinationstherapien beim Klonogenitäts Assay. Bei Doxycyclin-Induktion zeigt sich unabhängig von der Therapieabfolge eine starke Wachstumsrestriktion (rot markiert). Chemo- und Radiotherapie zeigen zusammen oder einzeln eine geringere Wachstumsrestriktion. Mittelwerte +/- SD mit n=9 aus drei unabhängigen Experimenten. Statistische Testung mittels ANOVA.

Bei der Kombination von Doxycyclin-Induktion mit Bestrahlung und Chemotherapie zeigte sich bei den Schemata Dox-RT/CT und RT/CT-Dox eine ähnlich starke Wachstumsrestriktion. Insbesondere zeigt sich bei beiden Therapieabfolgen die gleiche starke Wachstumsrestriktion wie bei den zur Kontrolle durchgeführten Monotherapien. Wie in Abbildung 21 rot markiert zeigen die dnE47 Zellen nach Doxycyclin-Induktion ein, im Vergleich zu den RFP Zellen, stark verringertes Wachstum. Nach Doxycyclin-Induktion zeigen die dnE47 Zellen auch bei Strahlen- oder/und Chemotherapie ein ähnliches Wachstum. Es zeigte sich somit ein sehr starker Effekt auf das Zellwachstum durch die dnE47 Induktion, jedoch kein additiver oder synergistischer Effekt.

### 3.5. Zytotoxizitäts Assay der LN229 Zelllinie

Da die Kombinationstherapieprüfung mittels Klonogenitäts Assay keinen Hinweis auf synergistische oder additive Effekte zwischen dnE47 Ansatz und Strahlenbeziehungsweise Chemotherapie zeigte, sollte dieser Frage mittels Zytotoxizitäts Assay nochmals nachgegangen werden.

Abbildung 22 zeigt den Zytotoxizitäts Assay der Kombinationen von Strahlen- und Chemotherapie mit Doxycyclin-Induktion. Beim Therapieregime Dox-RT/CT erfolgte 24 Stunden nach Aussaat die Doxycyclin-Induktion. 48 Stunden nach Aussaat erfolgte die Behandlung mit Bestrahlung und TMZ, sowie eine weitere Doxycyclin-Induktion. Nach 72 Stunden erfolgte eine letzte Doxycyclin-Induktion mit dem Mediumwechsel.

Beim Therapieregime RT/CT-Dox erfolgte 24 Stunden nach Aussaat die Behandlung mit Bestrahlung und Chemotherapie. Nach 48 und 72 Stunden erfolgte die Doxycyclin-Induktion.

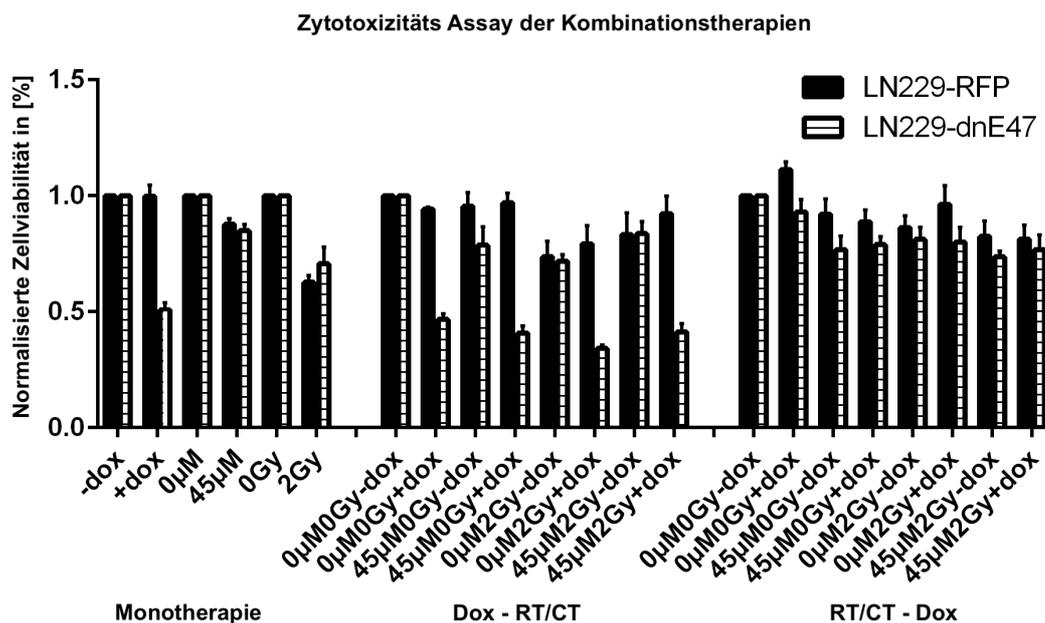


Abbildung 22: Kombinationstherapien der Zytotoxizitäts Assays. Nach Doxycyclin-Induktion zeigen sich in der Monotherapie und bei den Kombinationstherapien bei den dnE47 Zellen ein deutlich geringeres Wachstum. Dieses ist jedoch bei Kombination mit Strahlen- oder/und Chemotherapie beim Therapieregime Dox-RT/CT nahezu unverändert. Beim

Therapieregime RT/CT-Dox lässt sich die starke Wachstumsrestriktion durch Doxycyclin-Induktion bei den dnE47 Zellen nicht reproduzieren. Mittelwerte +/- SD mit n=9 aus drei unabhängigen Experimenten. Statistische Testung mittels ANOVA.

In den zur Kontrolle durchgeführten Monotherapien zeigt sich bei Doxycyclin-Induktion bei den dnE47 Zellen eine starke Wachstumsrestriktion. Diese lässt sich auch bei der Therapieabfolge Dox-RT/CT reproduzieren, wobei die Kombination mit Strahlen- und/oder Chemotherapie diese Wachstumsrestriktion nur leichtgradig verstärkt. Bei der Therapieabfolge RT/CT-Dox hingegen zeigt sich keine Wachstumsrestriktion nach Doxycyclin-Induktion bei den dnE47 Zellen. In den Zytotoxizitäts Assays zeigte sich somit in den Einzeltherapien und auch in der Therapieabfolge Dox-RT/CT ein deutlicher Effekt bei dnE47 Induktion, jedoch keine synergistischen oder additiven Effekte. Dies bestätigt die Ergebnisse der Klonogenitäts Assays. Das Ergebnis der Therapieabfolge RT/CT-Dox zeigt jedoch widersprüchliche Daten ohne einen starken Effekt durch dnE47 Induktion.

### **3.6. Cap Analysis Gene Expression (CAGE) der LN229 Zelllinie**

Um die Auswirkungen des dnE47 Ansatzes nach Doxycyclin genauer zu untersuchen wurde eine sogenannte CAGE durchgeführt. Diese diente dazu, die molekularen Veränderungen nach Doxycyclin-Induktion zu quantifizieren.

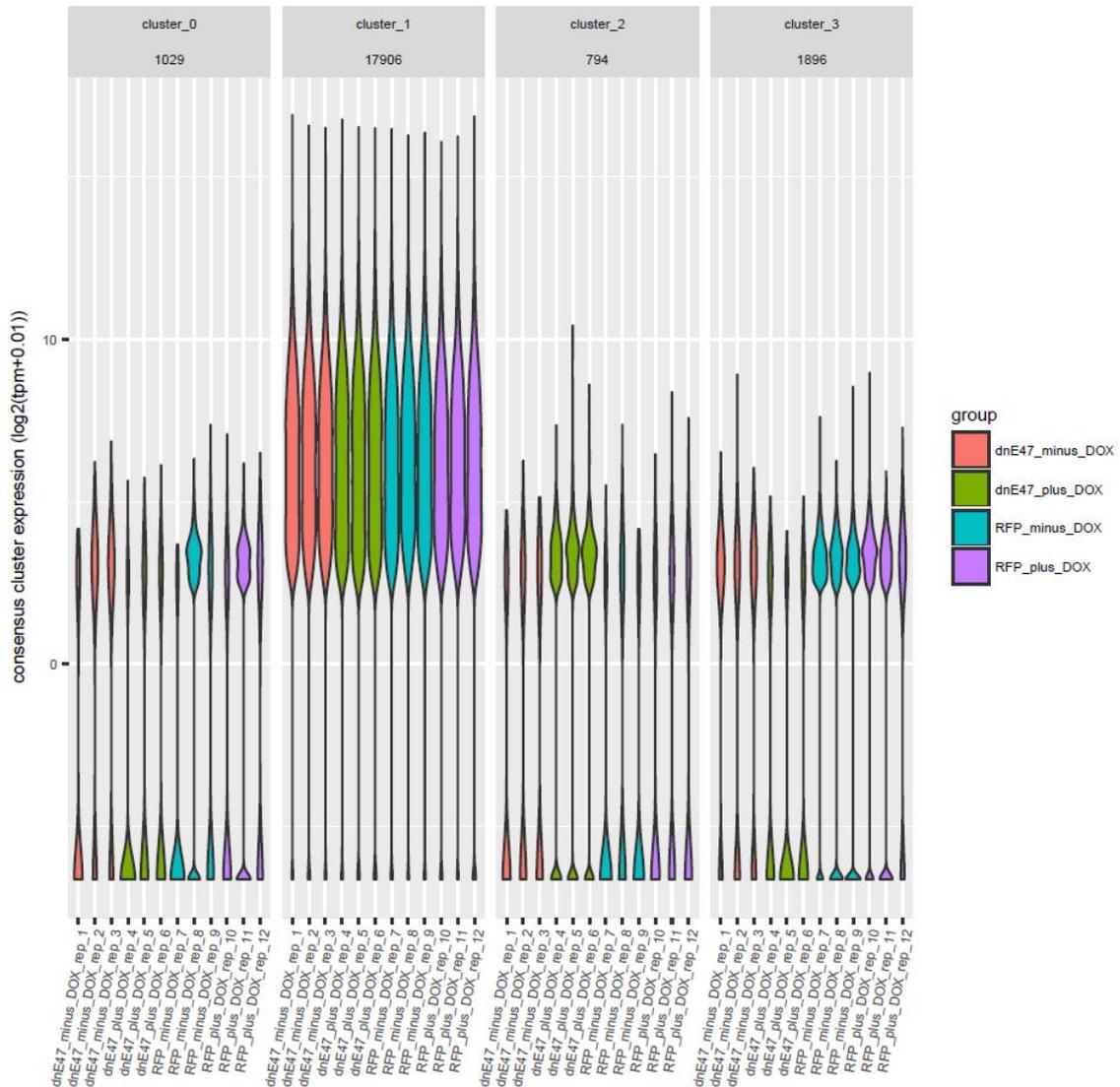


Abbildung 23: CAGE Expressionsprofil der Promotor Stellen 24 Stunden nach Doxycyclin-Induktion. Die untere X-Achse zeigt den Zelltyp und Behandlungsform. Die obere X-Achse zeigt die in 4 Cluster eingeteilten Promotoren. Die Cluster beinhalten dabei jene Promotoren mit einem ähnlichen Expressionsprofil. Die Y-Achse zeigt die Expression der als Cluster zusammengefassten Transkriptionsstartpunkte (TSS). Nach Gabe von Doxycyclin zeigen die dnE47 Zellen eine verminderte Expression der Cluster 0 und 3 und eine verstärkte Expression der Cluster 2 Transkriptionsstartpunkte. Es zeigt sich somit eine veränderte Genexpression nach Doxycyclin-Induktion bei dnE47 Zellen.

Mittels der sogenannten Cap analysis gene expression (CAGE) konnten die dnE47 und RFP Zellen auf die Aktivität ihrer Transkriptionsstartpunkte untersucht werden. Wie in Abbildung 23 dargestellt, zeigten sich Unterschiede zwischen den dnE47 Zellen unter Doxycyclin Gabe und den RFP Zellen, aber auch den dnE47

Zellen ohne Doxycyclin Gabe. So zeigten dnE47 Zellen 24 Stunden nach Doxycyclin Gabe eine erhöhte transkriptionelle Aktivität der Cluster 2, jedoch eine verringerte Transkription der Transkriptionsstartpunkte die in Cluster 0 und 3 zusammengefasst wurden.

Die deutlichen Unterschiede in den Transkriptionsstartpunkten spricht für eine veränderte Genexpression nach Doxycyclin-Induktion bei den dnE47 Zellen. Somit zeigt sich, dass der dnE47 Ansatz nicht nur Auswirkungen auf die Proteinverteilung in den Zellen, sondern ebenfalls auf molekularer Ebene deutliche Veränderungen bewirkt.

## **4. Diskussion**

Aufgrund der beschränkten mittleren Überlebenszeit von knapp 18-19 Monaten unter der konventionellen Behandlung mit Operation, Temozolomid und Bestrahlung ist es beim Glioblastom nötig, neue Ansätze zu finden, um dieses zu therapieren. Zunächst vielversprechende Ansätze, die beispielsweise einen überexprimierten Wachstumsfaktor wie EGFR fokussieren, zeigten sich im Verlauf oft enttäuschend [30,306]. Ziel dieser Arbeit war es, mittels der E-Proteine einen neuen molekularen Ansatz bei der Therapie des Glioblastoms aufzuzeigen.

Es konnte unter anderem bei verschiedenen Lymphomarten gezeigt werden, dass mutierte E-Proteine eine Rolle bei der Tumorgenese spielen [225,227]. Eine Wiederherstellung der E-Proteinfunktion konnte das Wachstum von Leukämiezellen reduzieren und ihre Apoptoserate steigern [229]. Dass Klasse I bHLH-Transkriptionsfaktoren wie die E-Proteine zur Heterodimerisierung mit den Klassen der anderen bHLH Transkriptionsfaktoren wie ID1 und OLIG2 vonnöten sind, konnte ausreichend gezeigt werden [201,202,244,245,246].

Beide Proteine sind beim Glioblastom in erhöhtem Maße exprimiert [48,189,243,276,277] und müssen für einen anti-tumoralen Effekt gemeinsam ausgeschaltet werden [189]. Da die E-Proteine auf OLIG2 und ID1 wirken, bieten sie eine gute Möglichkeit, nicht nur mittels Antikörper ein einzelnes Protein zu fokussieren, sondern stattdessen ein größeres Netzwerk zu beeinflussen.

Beyeler et al. [189] konnten bereits bei vergleichenden Arbeiten mit den Zelllinien LNT-229 und LN308 zeigen, dass der bHLH Transkriptionsfaktor OLIG2 die Zellproliferation der Tumorzellen und ihr Überleben stark beeinflusst und eine Überexpression von OLIG2 die Tumorpheriferation verstärkte. Wie in Abbildung 24 sichtbar, kann das von ihnen dafür erzeugte Fusionsprotein dnE47:RFP durch das fehlende NLS nicht in den Nukleus gelangen und akkumulierte somit im Zytoplasma, wo es seine Dimerisierungspartner wie ID1 und OLIG2 bindet und mit diesen sequestriert wird.

So führte eine Überexpression von dnE47 bei LNT-229 Zellen zu einem vermehrten Zelltod und im Vergleich zu einer Überexpression von E47 zu einer deutlich erhöhten Apoptoserate, was bei Tierexperimenten zu einer deutlichen Verzögerung der klinischen Tumorsymptomatik führte. Eine Überexpression von dnE47 zeigte sich außerdem in einer deutlichen Geninduktion der am Zellzyklus und an der Apoptose beteiligten Gene.

Somit konnten Beyeler et al. zeigen, dass die Neutralisation von Klasse II und V bHLH Transkriptionsfaktoren durch mutierte Klasse I bHLH Transkriptionsfaktoren wie dnE47 möglich ist und starke Auswirkungen auf die Zellproliferation der Zellen hat, sodass dieser Ansatz eventuell neue Therapieoptionen aufwerfen könnte [189].

Wie Beyeler et al. konnten auch Fischer et al. mithilfe einer mutierten E47 Form ohne NLS bereits zeigen, dass dies nach einer Überexpression zu einer Sequestrierung der E47-Bindungspartner und einer Blockade der Zelldifferenzierung führt [199]. Im Gegensatz dazu zeigte sich jedoch bei Beyeler et al. nur ein geringer Einfluss auf die Differenzierung der Zellen [189].

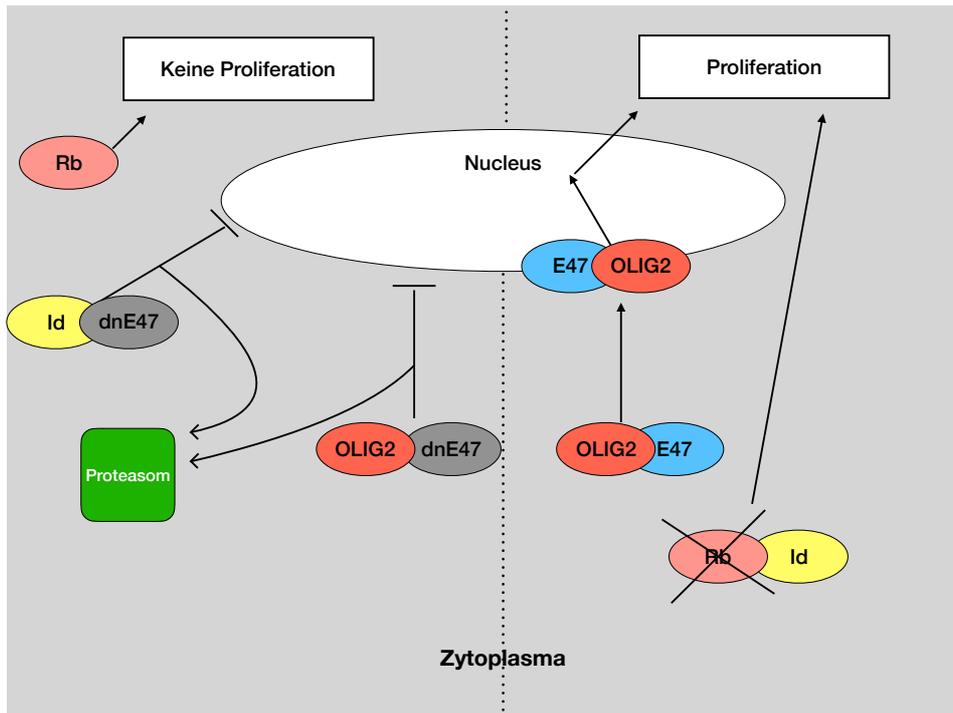


Abbildung 24: Darstellung der verschiedenen Abläufe bei Vorliegen von E47 und dnE47. Bei Vorliegen von E47 bindet OLIG2 an E47, gelangt so in den Nucleus und kann seine proliferative Wirkung entfalten. Außerdem bindet ID an Rb und verhindert so dessen Wirkung als Tumorsuppressor. Bei Vorliegen von dnE47 bindet OLIG2 an dieses, kann dadurch jedoch nicht in den Nucleus gelangen und wird im Proteasom abgebaut. dnE47 bindet außerdem an ID und sorgt ebenfalls für dessen Sequestrierung. So ist Rb ungebunden und kann seine Wirkung als Tumorsuppressor entfalten.

Mithilfe der Immunzytochemie und der Western Blots konnte die LN229 Zelllinie charakterisiert und phänotypisiert werden. Abbildung 24 zeigt die theoretischen Vorgänge in den RFP und dnE47 Zellen, welche sich in Abbildung 11 und Abbildung 12 in den ICC Versuchen gezeigt haben.

So zeigte sich bei den E47:RFP Zellen eine deutliche Akkumulation des Proteins im Nucleus, was der normalen Proteinverteilung entspricht, da das Protein nach Dimerisierung mittels NLS in den Kern gelangen kann. Bei dnE47:RFP fehlt diese Möglichkeit, sodass es nur im Zytoplasma sichtbar sein sollte. Genau dies zeigt sich bei den dnE47:RFP Zellen 48 Stunden nach Doxycyclin-Induktion. Es zeigt sich eine deutliche rote Färbung im gesamten Zytoplasma mit klarer Aussparung der Zellnukleoli. Außerdem zeigt sich bei diesen Zellen im Vergleich zu E47:RFP Zellen eine stärkere ID1-Färbung im gesamten Zytoplasma. Somit zeigt sich

zunächst, dass die Virustransduktion funktioniert hat und die Wirkweise von dnE47 derjenigen aus der Theorie entspricht. Es kann somit durch das fehlende NLS nicht mehr in den Kern gelangen und akkumuliert mit seinen Dimerisierungspartnern im Zytoplasma.

Wie in Abbildung 13, Abbildung 14, Abbildung 15 und Abbildung 16 sichtbar zeigen die Western Blots, dass mit zunehmender Zeit nach Doxycyclin-Induktion RFP und ID1 in den dnE47 Zellen im Zytoplasma an Konzentration zunimmt. In den RFP Zellen bleibt die Verteilung von ID1 und RFP unverändert.

Somit konnte mithilfe der Western Blot und ICC Versuche gezeigt werden, dass die in der Theorie vermuteten Vorgänge und Effekte zutreffen und sich die Verteilung von ID1 und RFP durch ein Eingreifen in das bHLH-Transkriptionsfaktorsystem verändern lässt. Offen bleibt weiterhin die Frage nach dem Einfluss auf die Zelldifferenzierung, welche bei Beyeler und Fisher et al. unterschiedliche Ergebnisse erbrachte.

Mittels der Klonogenitäts Assays wurde nun der Einfluss dieser veränderten Proteinlokalisierung auf das Zellwachstum untersucht. Aufgrund der Arbeiten von Beyeler et al. [189] und den theoretischen Überlegungen sollte das Zellwachstum nach Doxycyclin-Induktion beim Ausfall von E47 als Dimerisierungspartner von ID1 und OLIG2 reduziert werden. Wie in Abbildung 17, Abbildung 18, Abbildung 19 und Abbildung 20 ersichtlich, zeigte sich bereits in den Einzeltherapien ein deutlich reduziertes Wachstum der dnE47 Zellen nach Doxycyclin-Induktion. Dies fiel deutlich stärker aus, als die Wachstumsrestriktion durch die bisherige Standardtherapie des Glioblastoms, welche seit Stupp et al. [27] aus TMZ und Bestrahlung besteht.

Um die Wirkung der Behandlung weiter zu untersuchen, sollte mithilfe der Kombinationstherapien untersucht werden, ob es zwischen der Standardtherapie und dem dnE47 Ansatz synergistische oder additive Effekte beim Einfluss auf das Zellwachstum gibt. Außerdem stellte sich die Frage, ob die Reihenfolge der Therapieformen eine Auswirkung auf das Zellwachstum hat. Hierzu wurden die Therapieregime Dox-RT/CT und RT/CT-Dox in Klonogenitäts und Zytotoxizitäts Assays untersucht.

Abbildung 21 zeigt, wie in den Einzeltherapien, dass die Doxycyclin-Induktion bei den dnE47 Zellen einen sehr großen Effekt auf das Zellwachstum hat. Dieser Effekt ist bei beiden Therapieregimen gleich stark ausgeprägt. Eine unterschiedliche Abfolge der Therapien scheint somit keine Rolle zu spielen. Bei einer Reduzierung des Zellwachstums fast auf 0 durch die Doxycyclin-Induktion bei den dnE47 Zellen und einer fast gleichbleibenden Wachstumsreduzierung bei Kombination mit Strahlen- und/oder Chemotherapie scheinen keine additiven oder synergistischen Effekte zwischen den verschiedenen Therapieformen vorzuliegen.

Wie in Abbildung 22 dargestellt, zeigen auch die Zytotoxizitäts Assays denselben starken Effekt der Doxycyclin-Induktion bei dnE47 Zellen. Dieser erscheint jedoch weniger stark als bei den Klonogenitäts Assays und zeigt sich nur bei der Therapieabfolge Dox-RT/CT. Beim Therapieregime RT/CT-Dox zeigt sich bei den Zytotoxizitäts Assays im Gegensatz zu den Klonogenitäts Assays keine deutliche Wachstumsreduktion durch die Doxycyclin-Induktion bei den dnE47 Zellen. Dieser Unterschied verbleibt unklar. Ebenfalls unklar bleibt die Frage, wieso der Effekt durch Doxycyclin auf die dnE47 Zellen bei den Klonogenitäts Assays deutlich stärker ausgeprägt ist als bei den Zytotoxizitäts Assays. Wie oben beschrieben zeigte sich in den Western Blots der stärkste Effekt der Doxycyclin-Induktion nach 72 Stunden, was eine zeitliche Komponente bei der Wachstumsreduzierung impliziert. Da die Zytotoxizitäts Platten jedoch auch nach der Doxycyclin-Induktion bis Tag 10 noch mehr als 72 Stunden Wirkungszeit hatten, ist dies als Grund für den fehlenden Effekt unwahrscheinlich. Wenn es ein rein zeitlich bedingter Effekt ist, müsste die Wachstumsreduzierung bei den Klonogenitäts Assays beim Therapieregime RT/CT-Dox außerdem ebenfalls geringer ausfallen, was nicht der Fall ist. Möglich sind menschliche Fehler während der Versuchsdurchführung, wobei die geringe Fehlerbreite bei den Ergebnissen gegen Fehler menschlicher Art spricht. Somit bleibt der ausbleibende Doxycyclin Effekt bei den dnE47 Zellen im Therapieregime RT/CT-Dox bei den Zytotoxizitäts Assays unklar.

Durch die Ergebnisse der Klonogenitäts- und Zytotoxizitäts Assays kann somit davon ausgegangen werden, dass es zwischen der bisherigen Standardtherapie

des Glioblastoms, bestehend aus Bestrahlung und Temozolomid-Chemotherapie und dem dnE47 Ansatz keine additiven oder synergistischen Effekte gibt. Die Versuche zeigen jedoch eine sehr starke Wachstumsreduzierung durch die Doxycyclin-Induktion bei den dnE47 Zellen. Die Frage nach der Therapiereihenfolge kann durch die unterschiedlichen Ergebnisse beim Therapieregime RT/CT-Dox nicht eindeutig beantwortet werden. Sicher ist jedoch, dass die Therapieabfolge mit einer beginnenden Doxycyclin-Induktion und darauffolgender Bestrahlung und/oder Chemotherapie in den Klonogenitäts- und Zytotoxizitäts Assays einen sehr starken Effekt durch die Doxycyclin-Induktion zeigte. Mit der Therapieabfolge Dox-RT/CT scheint somit ein wachstumsreduzierender Effekt sicher zu sein.

Es zeigt sich somit, dass das Vorliegen von dnE47 nicht nur in einer veränderten Lokalisation bestimmter Proteine resultiert, sondern dass dieser Effekt auch deutlichen Einfluss auf das Wachstum der Tumorzellen hat. Dies bestätigt, dass die bHLH Transkriptionsfaktoren der Klasse II und V einen starken Einfluss auf die Tumorpheriferation haben und dass es möglich ist, diese mit mutierten Klasse I bHLH Transkriptionsfaktoren zu reduzieren.

Mithilfe dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass der dnE47 Ansatz auf andere Gliomzelllinien übertragbar ist und auch in diesen Zellen einen deutlichen wachstumsreduzierenden Effekt hat. Theoretisch denkbare Interaktionen zwischen dnE47 Ansatz und den bisherigen Standardtherapien des Glioblastoms, Temozolomid-Gabe und Bestrahlung, im Rahmen von additiven oder synergistischen Effekten konnten nicht gezeigt werden. Die Frage der Therapieabfolge bei der Kombination dieser verschiedenen Therapieformen kann aufgrund der Ergebnisse der Zytotoxizitäts Assays nicht abschließend beantwortet werden. Die Therapieabfolge Dox-RT/CT scheint jedoch vielversprechend zu sein.

Beyeler et al. zeigten bereits, dass eine dnE47 Überexpression zu einer veränderten Gentranskription führt. So waren bei ihnen eine erhöhte Transkription der Apoptose- und Zellzyklusgene gezeigt worden [189].

Um die genetischen Veränderungen bei dnE47 Zellen zu untersuchen wurde ihre RNA extrahiert und mittels CAGE untersucht. Es zeigten sich im Vergleich zu

E47:RFP und dnE47:RFP ohne Doxycyclin-Induktion eine verringerte Transkription der als Cluster zusammengefassten Transkriptionsfaktoren Initiationsorte 0 und 3, sowie eine verstärkte Transkription der Cluster 2 bei dnE47:RFP Zellen nach Doxycyclin-Induktion. Dies zeigt, dass die zellulären Veränderungen durch das fehlende NLS auch zu epigenetischen Veränderungen in den Zellen führen. Um die Auswirkungen des dnE47 Ansatzes und eventuelle Ausweich-Mechanismen des Tumors aufzudecken und zu verstehen, bedarf es hierbei einer genaueren Untersuchung der Transkriptionscluster mit den an ihnen beteiligten Genen. Hierzu würden sich beispielsweise RNA-Sequenzierung und Protein-Profiling als Methoden anbieten.

Die Prognose von Glioblastompatienten ist beschränkt und die Ergebnisse bei neuen Therapien sind oft enttäuschend [30,306]. Die Versuche dieser Arbeit zeigen jedoch, dass neue Therapieansätze zumindest auf zellulärer Ebene signifikante Ergebnisse erbringen können. Bis diese jedoch bei den Patienten ankommen wird viel Zeit vergehen. Ausweichmechanismen, wie sie bei anderen Tumoren und Therapieformen beobachtet werden [307,308], müssen zunächst untersucht werden. Damit einhergehend, müssen die langfristigen Folgen einer Manipulation der für viele Prozesse [201,204,205,206,207] wichtigen Klasse I bHLH Transkriptionsfaktoren untersucht werden. Mittels CAGE konnte gezeigt werden, dass eine Manipulation mittels dnE47 molekulare Effekte in den Zellen hat. Um diese Veränderungen und damit einhergehenden Auswirkungen weiter zu untersuchen sollten weitere Untersuchungen der molekularen Folgen durchgeführt werden. Dies ist ebenfalls nötig, um die langfristigen Effekte dieses Therapieansatzes besser einschätzen und verstehen zu können.

Die Versuche dieser Arbeit zeigen deutliche Effekte auf die zelluläre Verteilung von verschiedenen Proteinen wie RFP oder ID1, eine starke Wachstumsreduzierung und eine veränderte DNA-Transkription nach Doxycyclin-Induktion bei dnE47 Zellen. Offen bleibt die Umsetzung in die klinische Routine und die Anwendungsmöglichkeit an den Patienten.

## 5. Zusammenfassung

Mithilfe der Versuche konnte gezeigt werden, dass es möglich ist einen Zellphänotyp zu erschaffen, bei dem der Transkriptionsfaktor E47 durch eine mutierte Form ohne nukleäres Lokalisationssignal ersetzt wird. Dieser Eingriff in das System der bHLH Transkriptionsfaktoren resultierte in einer veränderten zellulären Verteilung des mutierten E47 Proteins sowie seiner Bindungspartner, beispielsweise ID1. Diese veränderte zelluläre Verteilung, die dazu führte, dass weder E47 noch seine Bindungspartner in den Zellkern gelangen konnten und im Zytoplasma akkumulierten, zeigte in Versuchen ein deutlich reduziertes Zellwachstum, jedoch leider keine Synergismen mit weiteren Therapieformen wie Chemo- oder Strahlentherapie. Mittels CAGE konnte zudem festgestellt werden, dass es beim vorliegenden Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp zu einer veränderten Genexpression kommt, die in weitergehenden Versuchen genauer differenziert und untersucht werden sollte.

## 6. Anhang

### 6.1 Literaturverzeichnis

- 
- [1] Germano I, Swiss V, Casaccia P. Primary brain tumors, neural stem cell, and brain tumor cancer cells: where is the link? *Neuropharmacology* 2010;58:903-910
  - [2] Tabatabai G, Hegi M, Stupp R, Weller M. Clinical Implications of Molecular Neuropathology and Biomarkers for Malignant Glioma. *Current Neurology and Neuroscience Report* 2012;12:302-307
  - [3] Ostrom Q, Gittleman H, Liao P, Rouse C, Chen Y, Dowling J, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan J. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2007-2011. *Neuro-Oncology* 2014;16:iv1-iv63
  - [4] Uhrbom L, Dai C, Celestino J, Rosenblum M, Fuller G, Holland E. Ink4a-Arf Cooperates with KRas Activation in Astrocytes and Neural Progenitors to Generate Glioblastomas of Various Morphologies Depending on Activated Akt. *Cancer Research* 2002;62:5551-5558
  - [5] Bachoo R, Maher E, Ligon K, Sharpless N, Chan S, You M, DeFrances J, Stover E, Weissleder R, Rowitch D, Louis D, DePinho R. Epidermal growth factor receptor and Ink4a/Arf: Convergent mechanism governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis. *Cancer Cell* 2002;1:269-277
  - [6] Holland E. Gliomagenesis: Genetic Alterations and Mouse Models. *Nature Reviews Genetics*;2:120-129
  - [7] O'Brien C, Kreso A, Jamieson C. Cancer Stem Cells and Self-renewal. *Clinical Cancer Research* 2010;16:3113-3120
  - [8] Becerra-Calixto A, Cardona-Gómez G P. The Role of Astrocytes in Neuroprotection after Brain Stroke: Potential in Cell Therapy. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 2017;10:88
  - [9] Zeng XN, Sun XL, Gao L, Fan Y, Ding JH, Hu G. Aquaporin-4 deficiency down-regulates glutamate uptake and GLT-1 expression in astrocytes. *Molecular and Cellular Neuroscience* 2007;34:34-39
  - [10] Walz W. Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochemistry International* 2000;36:291-300
  - [11] Kazor P, Rakus D, Mozrzymas J. Neuron-astrocyte interaction enhance GABAergic synaptic transmission in a manner dependent on key metabolic enzymes. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2015;9:120
  - [12] Abbott J, Rönnebeck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience* 2006;7:41-53
  - [13] Backes C, Harz C, Fischer U, Schmitt J, Ludwig N, Petersen B-S, Mueller SC, Kim Y-J, Wolf NM, Katus HA, Meder B, Furtwängler R, Franke A, Bohle R, Henn W, Graf N, Keller A, Meese E. New insights into the genetics of glioblastoma multiforme by familial exome sequencing. *Oncotarget* 2014;6:5918-5931
  - [14] Zhu Y, Parada L. The Molecular and Genetic Basis of Neurological Tumours. *Nature* 2002;2:616-626
  - [15] Hacke, W [Hrsg.]; Poeck, K [Begr.]; Wick, W. *Neurologie*. 14. Auflage, Springer, 2016. Seite 336-337

- 
- [16] Wick W, Platten M, Meisner C, Felsberg J, Tabatabai G, Simon M, Nikkhah G, Papsdorf K, Steinbach J, Sabel M, Combs S, Vesper J, Braun C, Meixenberger J, Ketter R, Mayer-Steinacker R, Reifenberger G, Weller M. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncology* 2012;13:707-715
- [17] Wick W, Hartmann C, Engel C, Stoffels M, Felsberg J, Stockhammer F, Sabel M, Koeppen S, Ketter R, Meyermann R, Rapp M, Meisner C, Kortmann R, Pietsch T, Wiestler O, Ernemann U, Bamberg M, Reifenberger G, von Deimling A, Weller M. NOA-04 Randomized Phase III Trial of Sequential Radiochemotherapy of Anaplastic Glioma with Procarbazine, Lomustine, and Vincristine or Temozolomide. *Journal of Clinical Oncology* 2009;27:5874-5880
- [18] Tabatabai G, Stupp R, van den Bent MJ, Hegi ME, Tonn JC, Wick W, Weller M. Molecular diagnostic of gliomas: the clinical perspective. *Acta Neuropathol* 2010;120:585-592
- [19] Pegg A. Properties of mammalian O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA transferases. *Mutation Research* 1990;233:165-175
- [20] Pegg A, Dolan E, Moschel R. Structure, Function, and Inhibition of O<sup>6</sup>-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 1995;51:167-223
- [21] Esteller M, Hamilton S, Burger P, Baylin S, Herman J. Inactivation of the DNA Repair Gene O<sup>6</sup>-Methylguanine-DNA Methyltransferase by Promoter Hypermethylation is a Common Event in Primary Human Neoplasia. *Cancer Research* 1999;59:793-797
- [22] Tabatabai G, Hattingen E, Schlegel J, Stummer W, Schlegel U. Interdisziplinäre Neuroonkologie. Teil 2: Systemtherapie primärer Gehirntumore. *Nervenarzt* 2014;85:976-981
- [23] Qian X, Brent T. Methylation Hot Spots in the 5' Flanking Region Denote Silencing of the O<sup>6</sup>-Methylguanine-DNA Methyltransferase Gene. *Cancer Research* 1997;57:3672-3677
- [24] Watts G, Pieper R, Costello J, Peng YM, Dalton W, Futscher B. Methylation of Discrete Regions of the O<sup>6</sup>-Methylguanine DNA Methyltransferase (MGMT) CpG Island Is Associated with Heterochromatinization of the MGMT Transcription Start Site and Silencing of the Gene. *Molecular and Cellular Biology* 1997;17:5612-5619
- [25] Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros J, Hainfellner J, Mason W, Mariani L, Bromberg J, Hau P, Mirimanoff R, Cairncross G, Janzer R, Stupp R. MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *The New England Journal of Medicine* 2005;352:997-1003
- [26] Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman S, Hidalgo O, Vanaclocha V, Baylin S, Herman J. Inactivation of the DNA-Repair Gene MGMT and the Clinical Response of Gliomas to Alkylating Agents. *The New England Journal of Medicine* 2000;343:1350-1354
- [27] Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJB, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht CJ, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross JG, Mirimanoff R-O. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomized phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncology* 2009;10:459-466
- [28] Gilbert M, Wang M, Aldape K, Stupp R, Hegi M, Jaeckle K, Armstrong T, Wefel J, Won M, Blumenthal D, Mahajan, Schultz C, Erridge S, Baumert B, Hopkins K, Tzuk-Shina T, Brown P, Chakravarti A, Curran W, Mehta M. Dose-Dense

- 
- Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma: A Randomized Phase III Clinical Trial. *Journal of Clinical Oncology* 2013;31:4085-4091
- [29] Stupp R, Mason W, van den Bent M, Weller M, Fisher B, Taphoorn M, Belanger U, Brandes A, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer R, Ludwin S, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross G, Eisenhauer E, Mirimanoff R. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *The New England Journal of Medicine* 2005;352:987-996
- [30] Westphal M, Heese O, Steinbach J, Schnell, Schackert G, Mehdorn M, Schulz D, Simon M, Schlegel U, Senft C, Geletneky K, Braun C, Hartung J, Reuter D, Warmuth Metz M, Bach F, Pietsch T. A randomised, open label phase III trial with nimotuzumab, an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in the treatment of newly diagnosed adult glioblastoma. *European Journal of Cancer* 2015;51:522-532
- [31] Weller M, Tabatabai G, Kästner B, Felsberg J, Steinbach JP, Wick A, Schnell O, Hau P, Herrlinger U, Sabel MC, Wirsching H-G, Ketter R, Bähr O, Platten M, Tonn JC, Schlegel U, Marosi C, Goldbrunner R, Stupp R, Homicsko K, Pichler J, Nikkhah G, Meixensberger J, Vajkoczy P, Kollias S, Hüsing J, Reifenberger G, Wick W. *MGMT* Promoter Methylation Is a Strong Prognostic Biomarker for Benefit from Dose-Intensified Temozolomide Rechallenge in Progressive Glioblastoma: The DIRECTOR Trial. *Clinical Cancer Research* 2015;2:2057-2064
- [32] Dolecek T, Propp J, Stroup N, Kruchko C. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro-Oncology* 2012;14:v1-v49
- [33] Wöhrer A, Waldhör T, Heinzl H, Hackl M, Feichtinger J, Gruber-Mösenbacher U, Kiefer A, Maier H, Motz R, Reiner-Concin A, Richling B, Idiceanu C, Scarpatetti M, Sedivy R, Bankl HC, Stiglbauer W, Preusser W, Rössler K, Hainfellner J. The Austrian Brain Tumour Registry: a cooperative way to establish a population-based brain tumour registry. *Journal of Neurooncology* 2009;95:401-411
- [34] Darlix A, Zouaoui S, Rigau V, Bessaoud F, Figarella-Branger D, Mathieu-Daudé H, Trétarre B, Bauchet F, Duffau H, Taillandier L, Bauchet L. Epidemiology for primary brain tumors: a nationwide population-based study. *J Neurooncol* 2017;131:525-546
- [35] Malmer B, Iselius L, Holmberg E, Collins A, Henriksson R, Grönberg H. Genetic epidemiology of glioma. *British Journal of Cancer* 2001;84:429-434
- [36] Farrel C, Plotkin S. Genetic Causes of Brain Tumors: Neurofibromatosis, Tuberous Sclerosis, von Hippel-Lindau, and Other Syndromes. *Neurologic Clinics* 2007;25:925-946
- [37] Blumenthal D, Cannon-Albright L. Familiality in brain tumors. *Neurology* 2008;71:1015-1020
- [38] Louis D, von Deimling A. Hereditary Tumor Syndromes of the Nervous System: Overview and Rare Syndromes. *Brain Pathology* 1995;5:145-151
- [39] Packer P. Primary Central Nervous System Tumors in Children. *Current Treatment Options in Neurology* 1999;1:395-408
- [40] Maher E, Furnari F, Bachoo R, Rowitch D, Louis D, Cavaneer, DePinho R. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes & Development* 2001;15:1311-1333
- [41] Little S, Popov S, Jury A, Bax D, Doey L, Al-Sarraj S, Jurgensmeier J, Jones C. Receptor Tyrosine Kinase Genes Amplified in Glioblastoma Exhibit a Mutual Exclusivity in Variable Proportions Reflective of Individual Tumor Heterogeneity. *Cancer Research* 2012;72:1614-1620
- [42] Szerlip N, Pedraza A, Chakravarty D, Azim M, McGuire J, Fang Y, Ozawa T, Holland E, Huse J, Jhanwar S, Leversha M, Mikkelsen T, Brennan C. Intratumoral

- 
- heterogeneity of receptor tyrosine kinases EGFR and PDGFRA amplification in glioblastoma defines subpopulations with distinct growth factor response. *Proceedings of the National Academy of Science* 2012;109:3041-3046
- [43] Homma T, Fukushima T, Vaccarella S, Yonekawa Y, Luigi P, Franseschi S, Ohgaki H. Correlation Among Pathology, Genotype, and Patient Outcomes in Glioblastoma. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 2006;65:846-854
- [44] Louis D, Perry A, Burger P, Ellison D, Reifenberger G, von Deimling A, Aldape K, Brat D, Collings P, Eberhart C, Figarella-Branger D, Fuller G, Giangaspero F, Giannini C, Hawkins C, Kleinhues P, Korshunov A, Kros J, Lopes B, Ng HK, Ohgaki H, Paulus W, Pietsch T, Rosenblum M, Rushing E, Soylemezoglu F, Wiestler O, Wesseling P. International Society of Neuropathology-Haarlem Guidelines for Nervous System Tumor Classification and Grading. *Brain Pathology* 2014;24:429-435
- [45] Komori T. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System: The Major Points of Revision. *Neurologia medico-chirurgica* 2017;57:301-311
- [46] Louis D, Ohgaki H, Wiestler O, Cavanee W. WHO classification of tumours of the central nervous system. IARC Press 2016;4. Edition
- [47] Louis D, Aldape K, Brat D, Capper D, Ellison D, Hawkins C, Paulus W, Perry A, Reifenberger G, Figarella-Branger D, Wesseling P, Batchelor T, Cairncross G, Pfister S, Rutkowski S, Weller M, Wick W, von Deimling A. Announcing cIMPACT-NOW: the Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumor Taxonomy. *Acta Neuropathologica* 2017;133:1-3
- [48] Furnari F, Fenton T, Bachoo R, Mukasa A, Stommel J, Stegh A, Hahn W, Ligon K, Louis D, Brennan C, Chin L, DePinho R, Cavanee W. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes & Development* 2007;21:2683-2710
- [49] Wen P, Kesari S. Malignant Gliomas in Adults. *The New England Journal of Medicine*. 2008;359:492-507
- [50] Malzkorn B, Reifenberger G. Practical implications of integrated glioma classification according to the World Health Organization classification of tumors of the central nervous system 2016. *Curr Opin Oncol*. 2016;28(6):494-501
- [51] Louis D, Ohgaki H, Wiestler O, Cavanee W, editors. WHO classification of tumours of the central nervous system. Lyon: IARC;2007. Seite 1-309
- [52] Louis D N, Ohgaki H, Wiestler O D, Cavanee W K, Burger P C, Jouvet A, Scheithauer B W, Kleinhues P. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol* 2007;114:97-109
- [53] Dumas-Duport C, Scheithauer B, O'Fallon J, Kelly P. Grading of Astrocytomas: A Simple and Reproducible Method. *Cancer* 1988;62:2152-2165
- [54] Barker F, Davis R, Chang S, Prados M. Necrosis as a Prognostic Factor in Glioblastoma Multiforme. *Cancer* 1996;77:1161-1166
- [55] Brat D, Castellano-Sanchez A, Kaur B, Van Meier E. Genetic and Biologic Progression Astrocytomas and Their Relation to Angiogenic Dysregulation. *Advances in Anatomic Pathology* 2002;9:24-36
- [56] Burger P, Vollmer R. Histological Factors of Prognostic Significance in the Glioblastoma Multiforme. *Cancer* 1980;46:1179-1186
- [57] Brat D, Castellano-Sanchez A, Hunter S, Pecot M, Cohen C, Hammond E, Devi S, Kaur B, Van Meier E. Pseudopalisaded in Glioblastoma Are Hypoxic, Express Extracellular Matrix Proteases, and Are Formed by an Actively Migrating Cell Population. *Cancer Research* 2004;64:920-927

- 
- [58] Schultz S, Pinsky G, Wu N, Chamberlain M, Rodrigo S, Martin S. Fine needle aspiration diagnosis of extracranial glioblastoma multiforme: Case report and review of the literature. *CytoJournal* 2005;2:19
- [59] Norden A, Drappatz J, Wen P. Antiangiogenic therapies for high-grade glioma. *Nature Reviews Neurology* 2009;5:610-620
- [60] Schmidt N, Westphal M, Hagel C, Ergün S, Stavrou D, Rosen E, Lamszus K. Levels of vascular endothelial growth factor, hepatocyte growth factor/scatter factor and basic fibroblast growth factor in human gliomas and their relation to angiogenesis. *International Journal of Cancer* 1999;84:10-18
- [61] Plate K, Breier G, Weich H, Risau W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumours angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* 1992;359:845-848
- [62] Aamir S, Ul-Haque A. Morphological Spectrum of Vascular Changes in Glioblastoma Multiforme. *International Journal of Pathology* 2006;4:1-5
- [63] DeWitt J, Mock A, Louis D. The 2016 WHO classification of central nervous system tumors: what neurologists need to know. *Current Opinion in Neurology* 2017;30:643-649
- [64] Cairns R, Mak T. Oncogenic Isocitrate Dehydrogenase Mutations: Mechanisms, Models, and Clinical Opportunities. *Cancer Discovery* 2013;3:730-741
- [65] Sanson M, Marie Y, Paris S, Idbaih A, Laffaire J, Ducray F, El Hallani S, Boisselier B, Mokhtari K, Hoang-Xuan K, Delattre JY. Isocitrate Dehydrogenase 1 Codon 132 Mutation Is an Important Prognostic Biomarker in Gliomas. *Journal of Clinical Oncology* 2009;27:4150-4154
- [66] Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 Mutations Are Early Events in the Development of Astrocytomas and Oligodendrogliomas. *The American Journal of Pathology* 2009;174:1149-1153
- [67] Balss J, Meyer J, Mueller W, Korhunov A, Hartmann C, von Deimling A. Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathologica* 2008;116:597-602
- [68] Yan H, Bigner D, Velculescu V, Parsons W. Mutant Metabolic Enzymes Are at the Origin of Gliomas. *Cancer Research* 2009;69:9157-9159
- [69] Dang L, White D, Gross S, Bennett B, Bittinger M, Driggers E, Fantin V, Jang H, Jin Shengfang, Keenan M, Marks K, Prins R, Ward P, Yen K, Liao L, Rabinowitz J, Cantley L, Thompson C, Vander Heiden M, Su S. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 2009;462:739-744
- [70] Kickingeder P, Sahm F, Radbruch A, Wick W, Heiland S, von Deimling A, Bendszus M, Wiestler B. IDH mutation status is associated with a distinct hypoxia/angiogenesis transcriptome signature which is non-invasively predictable with rCBV imaging in human glioma. *Scientific Reports* 2015;5:16238
- [71] Scherer H. Cerebral Astrocytomas and their Derivates. *American Journal of Cancer* 1940;40:159-198
- [72] Ichimura K, Pearson D, Kocialkowski S, Bäcklund M, Chan R, Jones D, Collins P. IDH1 Mutations are present in the Majority of Common Adult Gliomas but rare in Primary Glioblastomas. *Neuro-Oncology* 2009;11:341-347
- [73] Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavanee W, Ohgaki H, Wiestler O, Kleihues P, Ellison D. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica* 2016;131:803-820
- [74] Bleeker F, Atai N, Lambda S, Jonker A, Rijkeboer D, Bosch K, Tigchelaar W, Troost D, Vandertrop P, Bardelli A, Van Noorden C. The prognostic IDH1<sup>R132</sup> mutation is associated with reduced NADP<sup>+</sup>-dependent IDH activity in glioblastoma. *Acta Neuropathologica* 2010;119:487-494

- 
- [75] Yan H, Parsons W, Jin G, McLendon R, Rasheed A, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins G, Friedman H, Friedman A, Reardon D, Herndon J, Kinzler K, Velculescu V, Vogelstein B, Bigner D. IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *New England Journal of Medicine* 2009;360:765-773
- [76] Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 Mutations as Molecular Signature and Predictive Factor of Secondary Glioblastomas. *Clinical Cancer Research* 2009;15:6002-6007
- [77] Dropcho E, Soong SJ. The prognostic impact of prior low grade histology in patients with anaplastic gliomas: A case-control study. *Neurology* 1996;47:684-690
- [78] Ohgaki H, Kleihues P. Genetic Pathways to Primary and Secondary Glioblastoma. *The American Journal of Pathology* 2007;170:1445-1453
- [79] Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, Burkhard C, Schüler D, Probst-Hensch N, Maiorka P, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, Yasargil G, Lütolf U, Kleihues P. Genetic Pathways to Glioblastoma: A Population-Based Study. *Cancer Research* 2004;64:6892-6899
- [80] Ohgaki H, Kleihues P. Population-Based Studies on Incidence, Survival Rates, and Genetic Alterations in Astrocytic and Oligodendroglial Gliomas. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 2005;64:479-489
- [81] Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res* 2013 19:764-772
- [82] Kleihues P, Louis D, Scheithauer B, Rorke C, Reifenberger G, Burger P, Cavenee W. The WHO Classification of Tumors of the Nervous System. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 2002;61:215-225
- [83] Watanabe K, Tachibana O, Sato K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Overexpression of the EGF Receptor and p53 Mutations are Mutually Exclusive in the Evolution of Primary and Secondary Glioblastomas. *Brain Pathology* 1996;6:217-224
- [84] Tohma Y, Gratas C, Biernat W, Peraud A, Fukuda M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. PTEN (MMAC1) Mutations Are Frequent in Primary Glioblastomas (de novo) but not in Secondary Glioblastomas. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 1998;57:684-689
- [85] Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang S, Puc J, Miliaresis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner S, Giovanella B, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler M, Parson R. PTEN, a Putative Protein Tyrosine Phosphatase Gene Mutated in Human Brain, Breast, and Prostate Cancer. *Science* 1997;275:1943-1947
- [86] Simon M, Hosen I, Gousias K, Rachakonda S, Heidenreich B, Gessi M, Schramm J, Hemminki K, Waha A, Kumar R. TERT promoter mutations: a novel independent prognostic factor in primary glioblastomas. *Neuro-Oncology* 2015;17:45-52
- [87] Nonoguchi N, Ohta T, Oh JE, Kim YH, Kleihues P, Ohgaki H. TERT promoter mutations in primary and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathologica* 2013;126:931-937
- [88] Arita H, Narita Y, Fukushima S, Tateishi K, Matsuhita Y, Yoshida A, Miyakita Y, Ohno M, Collins P, Kawahara N, Shibui S, Ichimura K. Upregulating mutations in the TERT promoter commonly occur in adult malignant gliomas and are strongly associated with total 1p19q loss. *Acta Neuropathologica* 2013;126:267-276
- [89] Jiao Y, Killela P, Reitman Z, Rasheed A, Heaphy C, de Wilde R, Rodriguez F, Rosenberg S, Oba-Shinjo SM, Nagashi Marie SK, Bettegowda C, Agrawal N, Lipp E, Pirozzi C, Lopez G, He Y, Friedman H, Friedman A, Riggins G, Holdhoff M, Burger P, McLendon R, Bigner D, Vogelstein B, Meeker A, Kinzler K, Papadopoulos N, Diaz L, Yan H. Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1

- 
- mutations refine the classification of malignant gliomas. *Oncotarget* 2012;3:710-722
- [90] Liu XY, Gerges N, Korshunov A, Sabha N, Khuong-Quang DA, Fontebasso A, Fleming A, Hadjadj D, Schwartzenuber J, Majewski J, Dong Z, Siegel P, Albrecht S, Croul S, Jones D, Kool M, Tonjes M, Reifenberger G, Faury D, Zadeh G, Pfister S, Jabado N. Frequent ATRX mutations and loss of expression in adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations. *Acta Neuropathologica* 2012;124:615-625
- [91] Godard S, Getz G, Delorenzi M, Farmer P, Kobayashi H, Desbaillets I, Nozaki M, Diserens AC, Hamou MF, Dietrich PY, Regli L, Janzer R, Bucher P, Stupp R, de Tribolet N, Domany E, Hegi M. Classification of Human Astrocytic Gliomas on the Basis of Gene Expression: A correlated Group of Genes with Angiogenic Activity Emerges As a Strong Predictor of Subtypes. *Cancer Research* 2003;63:6613-6625
- [92] Hartmann C, Hentschel B, Wick W, Capper D, Felsberg J, Simon M, Westphal M, Schackert G, Mexermann R, Pietsch T, Reifenberger G, Weller M, Loeffler M, von Deimling A. Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas. *Acta Neuropathologica* 2010;120:707-718
- [93] Lai A, Kharbada S, Pope W, Tran A, Solis O, Peale F, Forrest W, Pujara K, Carrillo J, Pandita A, Ellingson B, Bowers C, Soriano R, Schmidt N, Mohan S, Yong W, Seshagiri S, Modrusan Z, Jiang Z, Aldape K, Mischel P, Liao L, Escovedo C, Chen W, Nghiemphu P, James D, Prados M, Westphal M, Lamszus K, Cloughesy T, Phillips H. Evidence for Sequenced Molecular Evolution of IDH1 Mutant Glioblastoma From a Distinct Cell of Origin. *Journal of Clinical Oncology* 2010;29:4482-4490
- [94] Lun M, Lok E, Gautam S, Wu E, Wong E. The Natural history of extracranial metastasis from glioblastoma multiforme. *The Journal of Neurooncology* 2011;105:261-274
- [95] Birbilis T, Matis G, Eleftheriadis S, Theodoropoulou E, Sivridis E. Spinal Metastasis of Glioblastoma Multiforme: An Uncommon Suspect? *SPINE* 2010;35:264-269
- [96] Pasquier B, Pasquier D, N'Golet A, Panh M, Couderc P. Extraneural Metastases of Astrocytomas and Glioblastomas: Clinicopathological Study of Two Cases and Review of Literature. *Cancer* 1980;45:112-125
- [97] Urbanska K, Sokolowska J, Szmidt M, Sysa P. Glioblastoma multiforme – an overview. *Contemporary Oncology* 2014;18:307-312
- [98] Demir M, Hakan T, Akinci O, Berkman Z. Primary cerebellar glioblastoma multiforme. *Diagnostic and Interventional Radiology* 2005;11:83-86
- [99] Lakhan S, Harle L. Difficult diagnosis of brainstem glioblastoma multiforme in a woman: a case report and review of the literature. *Journal of Medical Case Reports* 2009;3:87
- [100] Wen P, Schiff D, Kesari S, Drappatz J, Gigas D, Doherty L. Medical management of patients with brain tumors. *Journal of Neuro-Oncology* 2006;80:313-332
- [101] Weller M, van den Bent M, Hopkins K, Tonn JC, Stupp R, Falini A, Cohen-Jonathan-Moyal E, Frappaz D, Henriksson R, Balana C, Chinot O, Ram Z, Reifenberger G, Soffinetti R, Wick W. EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma. *Lancet Oncol* 2014;15:395-403
- [102] Larsen J, Martin D, Byrne M. Recent Advances in Delivery Through the Blood-Brain Barrier. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2014;14:1148-1160
- [103] Daneman R, Prat A. The Blood-Brain Barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015;7:a020412

- 
- [104] Tabatabai G, Hattingen E, Schlegel J, Stummer W, Schlegel U. Interdisziplinäre Neuroonkologie. Teil 1: Diagnostik und operative Therapie primärer Gehirntumore. *Nervenarzt* 2014;85:965-975
- [105] Stummer W, van den Bent M, Westphal M. Cytoreductive surgery of glioblastoma as the key to successful adjuvant therapies: new arguments in an old discussion. *Acta Neuropathologica* 2011;153:1211-1218
- [106] Vartanian A, Singh S, Agnihotri S, Jalali S, Burrell K, Aldape K, Zadeh G. GBM's multifaceted landscape: highlighting regional and microenvironmental heterogeneity. *Neuro-Oncology* 2014;16:1167-1175
- [107] Nicholas K, Lukas R, Chmura S, Yamini B, Lesniak M, Pytel P. Molecular Heterogeneity in Glioblastoma: Therapeutic Opportunities and Challenges. *Seminars in Oncology* 2011;38:243-253
- [108] Shapiro J, Yung WK, Shapiro W. Isolation, Karyotype, and Clonal Growth of Heterogeneous Subpopulations of Human Malignant Gliomas. *Cancer Research* 1981;41:2349-2359
- [109] Wikstrand C, Bigner S, Bigner D. Demonstration of Complex Antigenic Heterogeneity in a Human Glioma Cell Line and Eight Derived Clones by Specific Monoclonal Antibodies. *Cancer Research* 1983;43:3327-3343
- [110] Galli R, Binda E, Organelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A. Isolation and Characterization of Tumorigenic, Stem-like Neural Precursors from Human Glioblastoma. *Cancer Research* 2004;64:7011-7021
- [111] Singh S, Hawkins C, Clarke I, Squire J, Bayani J, Hide T, Henkelmann M, Cusimano M, Dirks P. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004;432:396-401
- [112] Singh S, Clarke I, Terasaki M, Bonn V, Hawkins C, Squire J, Dirks P. Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors. *Cancer Research* 2003;63:5821-5828
- [113] Tabatabai G, Weller M. Glioblastoma stem cells. *Cell and Tissue Research* 2011;343:459-465
- [114] Hussain F, Yang D, Suki D, Aldape K, Grimm E, Heimberger A. The role of human glioma-infiltrating microglia/macrophages in mediating antitumor immune responses. *Neuro-Oncology* 2006;8:261-279
- [115] Hussain F, Yang D, Suki D, Grimm E, Heimberger A. Innate immune functions of microglia isolated from human glioma patients. *Journal of Translational Medicine* 2006;4:15
- [116] Yan GN, Lv YF, Yang L, Yao XH, Cui YH, Guo DY. Glioma stem cells enhance endothelial cell migration and proliferation via the Hedgehog pathway. *Oncology Letters* 2013;6:1524-1530
- [117] Bao S, Wu Q, Sathornsumetee S, Hao Y, Li Z, Hjelmeland A, Shi Q, McLendon R, Bigner D, Rich J. Stem Cell-like Glioma Cells Promote Tumor Angiogenesis through Vascular Endothelial Growth Factor. *Cancer Research* 2006;66:7843-7848
- [118] Salmaggi A, Boiardi A, Gelati M, Russo A, Calatozzolo C, Ciusani E, Sciacca F, Ottolina A, Parati E, La Porta C, Alessandri G, Marras C, Croci D, De Rossi M. Glioblastoma-Derived Tumorspheres Identify a Population of Tumor Stem-Like Cells with Angiogenic Potential and Enhanced Multidrug Resistance Phenotype. *Glia* 2006;54:850-860
- [119] Charles N, Holland E, Gilbertson R, Glass R, Kettenmann H. The Brain Tumor Microenvironment. *Glia* 2011;59:1169-1180
- [120] Marcovic D, Glass R, Synowitz M, van Rooijen N, Kettenmann H. Microglia Stimulate the Invasiveness of Glioma Cells by Increasing the Activity of

- 
- Metalloprotease-2. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 2005;64:754-762
- [121] Naganuma H, Sasaki A, Satoh E, Nagasaka M, Nakano S, Isoe S, Nukui H. Modulation of Transforming Growth Factor- $\beta$  Secretion from Malignant Glioma Cells by Interleukin-1 $\beta$ . *Neurologia Medico-Chirurgica* 1996;36:145-150
- [122] Letterio J, Roberts A. Regulation of Immune Responses by TGF- $\beta$ . *Annual Review of Immunology* 1998;16:137-161
- [123] Watters J, Schartner J, Badie B. Microglia Function in Brain Tumors. *Journal of Neuroscience Research* 2005;81:447-455
- [124] Dunn G, Dunn I, Curry W. Focus on TILs: Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human glioma. *Cancer Immunity* 2007;7:12
- [125] Farmer JP, Antel J, Freedman M, Cashman N, Rode H, Villemure JG. Characterization of lymphoid cells isolated from human gliomas. *Journal of Neurosurgery* 1989;71:528-533
- [126] Beissert S, Schwarz A, Schwarz T. Regulatory T Cells. *Journal of Investigative Dermatology* 2006;126:15-24
- [127] Heimberger A, Abou-Ghazal M, Reina-Ortiz C, Yang D, Sun W, Qiao W, Hiraoka N, Fuller G. Incidence and Prognostic Impact of FoxP3<sup>+</sup> Regulatory T Cells in Human Gliomas. *Clinical Cancer Research* 2008;14:5166-5172
- [128] Jordan J, Sun W, Hussain F, DeAngulo G, Prabhu S, Heimberger A. Preferential migration of regulatory T cells mediated by glioma-secreted chemokines can be blocked with chemotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2008;57:123-131
- [129] El Andaloussi A, Lesniak M. An increase in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T Cells in tumor-infiltrating lymphocytes of human glioblastoma multiforme. *Neuro-Oncology* 2006;8:234-243
- [130] El Andaloussi A, Lesniak M. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T-cell infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with tumor grade in human gliomas. *Journal of Neurooncology* 2007;83:145-152
- [131] Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *TRENDS in Molecular Medicine* 2007;13:108-116
- [132] Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell* 2008;133:775-787
- [133] Vignali D, Collison L, Workman C. How regulatory T cells work. *Nature Reviews Immunology* 2008;8:523-532
- [134] Chau LY, Heme oxygenase-1: emerging target of cancer therapy. *Journal of Biomedical Science* 2015;22:22
- [135] Wintterle S, Schreiner B, Mitsdoerffler M, Schneider D, Chen L, Meyermann R, Weller M, Wiendl H. Expression of the B7-Related Molecule B7-H1 by Glioma Cells: A Potential Mechanism of Immune Paralysis. *Cancer Research* 2003;63:7462-7467
- [136] Berghoff A, Kiesel B, Widhalm G, Rajky O, Ricken G, Wöhrer A, Dieckmann K, Filpits M, Brandstetter A, Weller M, Kurscheid S, Hegi M, Zielinski C, Marosi C, Hainfellner J, Preusser M, Wick W. Programmed death-ligand 1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes in glioblastoma. *Neuro-Oncology* 2015;17:1064-1075
- [137] Köhnke T, Krupka C, Tischer J, Knösel T, Subklewe M. Increase of PD-L1 expressing B-precursor ALL cells in a patient resistant to the CD19/CD3-bispecific T cell engager antibody blinatumomab. *Journal of Hematology & Oncology* 2015;5:111
- [138] Hirano F, Kaneko K, Tamura H, Dong H, Wang S, Ichikawa M, Rietz C, Flies D, Lau J, Zhu G, Tamada K, Chen L. Blockade of B7-H1 and PD-1 by Monoclonal

- 
- Antibodies Potentiates Cancer Therapeutic Immunity. *Cancer Research* 2005;65:1089-1096
- [139] Xue S, Hu M, Iyer V, Yu J. Blocking the PD-1/PD-L1 pathway in glioma: a potential new treatment strategy. *Journal of Hematology & Oncology* 2017;10:81
- [140] Keir M, Butte M, Freeman G, Sharpe A. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *The Annual Review of Immunology* 2008;26:677-704
- [141] Yao Y, Tao R, Wang X, Wang Y, Mao Y, Zhou L. B7-H1 is correlated with malignancy-grade gliomas but is not expressed exclusively on tumor stem-like cells. *Neuro-Oncology* 2009;11:757-766
- [142] Parsa A, Waldron J, Panner A, Crane C, Parney I, Barry J, Cachola K, Murray J, Tihan T, Jensen M, Mischel P, Stokoe D, Pieper R. Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nature Medicine* 2007;13:84-88
- [143] Noman M, Desantis G, Janji B, Hasmim M, Karray S, Dessen P, Bronte V, Chouaib S. PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 $\alpha$ , and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. *Journal of Experimental Medicine* 2014;211:781-790
- [144] Rodrigues J, Gonzalez G, Zhang L, Ibrahim G, Kelly J, Gustafson M, Lin Y, Dietz A, Forsyth P, Yong W, Parney I. Normal human monocytes exposed to glioma cells acquire myeloid-derived suppressor cell-like properties. *Neuro-Oncology* 2010;12:351-365
- [145] Bloch O, Crane C, Kaur R, Safaee M, Rutkowski M, Parsa A. Gliomas promote immunosuppression through induction of B7-H1 expression in tumor-associated Macrophages. *Clinical Cancer Research* 2013;19:3165-3175
- [146] Nduom E, Wie J, Yaghi N, Huang N, Kong LY, Gabrusiewicz K, Ling X, Zhou S, Ivan C, Qing Chen J, Burks J, Fuller G, Calin G, Conrad C, Creasy C, Ritthipichai K, Radvanyi L, Heimberger A. PD-L1 expression and prognostic impact in glioblastoma. *Neuro-Oncology* 2016;18:195-205
- [147] Brzozowska A, Torun A, Mazurkiewicz M. The Impact of Surgery on the Efficacy of Adjuvant Therapy in Glioblastoma Multiforme. *Adv Clin Exp Med* 2015;24;2:279-278
- [148] Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler O, Zanella F, Reulen HJ. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *The Lancet Oncology* 2006;7:392-401
- [149] Senft C, Bink A, Franz K, Vatter H, Gasser T, Seifert V. Intraoperative MRI guidance and extent of resection in glioma surgery: a randomised, controlled trial. *Lancet Oncology* 2011;12:997-1003
- [150] Vuorinen V, Hinkka S, Färkkilä M, Jääskeläinen J. Debulking or biopsy of malignant glioma in elderly people – a randomised study. *Acta Neurochirurgica* 2003;145:5-10
- [151] Ostermann S, Csajka C, Buclin T, Leyvraz S, Lejeune F, Decosterd L, Stupp R. Plasma and Cerebrospinal Fluid Population Pharmacokinetics of Temozolomide in Malignant Glioma Patients. *Clinical Cancer Research* 2004;10:3728-3736
- [152] Stupp R, van den Bent M, Hegi M. Optimal Role of Temozolomide in the Treatment of Malignant Gliomas. *Current Neurology and Neuroscience Reports* 2005;5:198-206
- [153] Brada M, Judson I, Beale P, Moore S, Reidenberg P, Statkevich P, Dugan M, Batra V, Cutler D. Phase I dose-escalation and pharmacokinetic study of temozolomide (SCH 52365) for refractory or relapsing malignancies. *British Journal of Cancer* 1999;81:1022-1030

- 
- [154] Newlands E, Backledge G, Slack J, Rustin G, Smith D, Stuart N, Quarterman C, Hoffman R, Stevens M, Brampton M, Gibson A. Phase I trial of temozolomide. *British Journal of Cancer* 1992;65:287-291
- [155] Gilbert M, Friedman H, Kuttesch J, Prados M, Olson J, Reaman G, Zaknoen S. A phase II study of temozolomide in patients with newly diagnosed supratentorial malignant glioma before radiation therapy. *Neuro-Oncology* 2002;4:261-267
- [156] Chakravarti A, Erkkinen M, Nestler U, Stupp R, Mehta M, Aldape K, Gilbert M, Black P, Loeffler J. Temozolomide-Mediated Radiation Enhancement in Glioblastoma: A Report on underlying Mechanisms. *Clinical Cancer Research* 2006;12:4738-4746
- [157] Barazzuol L, Jena R, Burnet N, Jeynes J, Merchant M, Kirkby K, Kirkby N. In Vitro Evaluation of Combined Temozolomide and Radiotherapy Using X Rays and High-Linear Energy Transfer Radiation for Glioblastoma. *Radiation Research* 2012;177:651-662
- [158] Hirose Y, Berger M, Pieper R. p53 Effects Both the Duration of G<sub>2</sub>/M Arrest and the Fate of Temozolomide-treated Human Glioblastoma Cells. *Cancer Research* 2001;61:1957-1963
- [159] van Rijn J, Heimans J, van den Berg J, van der Valk P, Slotman B. *International Journal of Radiation Oncology – Biology – Physics* 2000;47:779-784
- [160] Lee S. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes & Diseases* 2016;3:198-210
- [161] Keime-Guibert F, Chinot O, Taillandier L, Cartalat-Carel S, Frenay M, Kantor G, Guillamo JS, Jadaud E, Coling P, Bondiau PY, Menei P, Loiseau H, Bernier V, Honnorat J, Barrié M, Moktari K, Mazon JJ, Bissery A, Delattre JY. Radiotherapy for Glioblastoma in the Elderly. *The New England Journal of Medicine* 2007;356:1527-1535
- [162] Glantz M, Chamberlain M, Liu Q, Litowsky S, Recht L. Temozolomide as an Alternative to Irradiation for Elderly Patients with Newly Diagnosed Malignant Gliomas. *Cancer* 2003;97:2262-2266
- [163] Wirsching HG, Tritschler I, Palla A, Renner C, Weller M, Tabatabai G. The management of lomustine overdose in malignant glioma patients. *Neuro-Oncology Practice* 2014;1:178-183
- [164] Wick W, Puduvalli V, Chamberlain M, van den Bent M, Carpentier A, Cher L, Mason W, Weller M, Hong S, Musib L, Liepa A, Thornton D, Fine H. Phase III Study of Enzastaurin Compared with Lomustine in the Treatment of Recurrent Intracranial Glioblastoma. *Journal of Clinical Oncology* 2010;28:1168-1174
- [165] Batchelor T, Mulholland P, Neyns B, Nabors B, Campone M, Wick A, Mason W, Mikkelsen T, Phuphanich S, Ashby L, DeGroot J, Gattamaneni R, Cher L, Rosenthal M, Payer F, Jürgensmeier J, Jain R, Sorensen G, Xu J, Liu Q, van den Bent M. Phase III Randomized Trial Comparing the Efficacy of Cediranib As Monotherapy, and in Combination with Lomustine, Versus Lomustine Alone in Patients with Recurrent Glioblastoma. *Journal of Clinical Oncology* 2013;31:3212-3218
- [166] Suchorska B, Weller M, Tabatabai G, Senft C, Hau P, Sabel MC, Herrlinger U, Ketter R, Schlegel U, Marosi C, Reifenberger G, Wick W, Tonn JC, Wirsching H-G. Complete resection of contrast-enhancing tumor volume is associated with improved survival in recurrent glioblastoma - results from the DIRECTOR trial. *Neuro-Oncology* 2016;18:549-556
- [167] Chinot O, Wick W, Mason W, Henriksson R, Saran F, Nishikawa R, Carpentier A, Hoang-Xuan K, Kavan P, Cernea D, Brandes A, Hilton M, Abrey L, Cloughesy T. Bevacizumab plus Radiotherapy-Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma. *The New England Journal of Medicine* 2014;370:709-722

- 
- [168] Gilbert M, Dignam J, Armstrong T, Wefel J, Blumenthal D, Vogelbaum M, Colman H, Chakravarti A, Pugh S, Won M, Jeray R, Brown P, Jaeckle K, Schiff D, Stieber V, Brachmann D, Werner-Wasik M, Tremont-Lukats I, Sulman E, Aldape K, Curran W, Mehta M. A Randomized Trial of Bevacizumab for Newly Diagnosed Glioblastoma. *The New England Journal of Medicine* 2014;370:699-708
- [169] Weiss T, Weller M, Roth P. Immunotherapy for Glioblastoma: concepts and challenges. *Current Opinion in Neurology* 2015;28:639-646
- [170] Razavi SM, Lee K, Jin B, Aujla P, Gholamin S, Li G. Immune Evasion Strategies of Glioblastoma. *Frontiers in Surgery* 2016;3:11
- [171] Reardon D, Freeman G, Wu C, Chiocca A, Wucherpennig K, Wen P, Fritsch E, Curry Jr. W, Sampson J, Dranoff G. Immunotherapy advances for glioblastoma. *Neuro-Oncology* 2014;16:1441-1458
- [172] Huang J, Liu F, Liu Z, Tang H, Wu H, Gong Q, Chen J. Immune Checkpoint in Glioblastoma: Promising and Challenging. *Frontiers in Pharmacology* 2017;8:242
- [173] Lipson E, Forde P, Hammers HJ, Emens L, Taube J, Topalian S. Antagonists of PD-1 and PD-L1 in Cancer Treatment. *Seminars in Oncology* 2015;42:587-600
- [174] Antonia S, López-Martin J, Bendell J, Ott P, Tayler M, Eder J, Jäger D, Pietanza C, Le D, de Braud F, Morse M, Ascierto P, Horn L, Amin A, Pillai R, Evans J, Chau I, Bono P, Atmaca A, Sharma P, Harbison C, Lin CS, Christensen O, Calvo E.
- [175] Robert C, Ribas A, Wolchok J, Hodi S, Hamid O, Kefford R, Weber J, Joshua A, Hwu WJ, Gangadhar T, Patnaik A, Dronca R, Zarour H, Joseph R, Boasberg P, Chmielowski B, Mateus C, Pastow M, Gergich K, Elassaiss-Schaap J, Li X, Iannone R, Ebbinghaus S, Kang P, Daud A. Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. *The Lancet* 2014;384:1109-1117
- [176] Hodi S, O'Day S, McDermott D, Weber R, Sosman J, Haanen J, Gonzales R, Robert C, Schadendorf D, Hassel J, Akerley W, van den Eertwegh A, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel J, Linette G, Hogg D, Ottensmeier C, Lebbé C, Peschel C, Quirt I, Clark J, Wolchok J, Weber J, Tian J, Yellin M, Nichol G, Hoos A, Urba W. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *The New England Journal of Medicine* 2010;363:711-723
- [177] Robert C, Long G, Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, Hassel J, Rutkowski P, McNeil C, Kalinka-Warzocho E, Savage K, Hernberg M, Lebbé C, Charles J, Mihalciou C, Chiarion-Sileni V, Mauch C, Cognetti F, Arance A, Schmidt H, Schadendorf D, Gogas H, Lundgren-Eriksson L, Horak C, Sharkey B, Waxman I, Atkinson V, Ascierto P. Nivolumab in Previously Untreated Melanoma without BRAF Mutation. *The New England Journal of Medicine* 2015;372:320-330
- [178] Robert C, Schachter J, Long G, Arance A, Grob J, Mortier L, Daud A, Carlino M, McNeil C, Lotem M, Larkin J, Lorigan P, Neyns B, Blank C, Hamid O, Mateus C, Shapira-Frommer R, Kosh M, Zhou H, Ibrahim N, Ebbinghaus S, Ribad A. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *The New England Journal of Medicine* 2015;372:2521-2532
- [179] Zheng J, See A, Phallen J, Jackson C, Belcaid Z, Ruzevick J, Durham N, Meyer C, Harris T, Albesiano E, Pradilla G, Ford E, Wong J, Hammers HJ, Mathios D, Tyler B, Brem H, Tran P, Pardoll D, Drake C, Lim M. Anti-PD-1 Blockade and Stereotactic Radiation Produce Long-Term Survival in Mice with Intracranial Gliomas. *International Journal of Radiation Oncology-Biology-Physics* 2013;86:343-349
- [180] Tang X, Li Q, Zhu Y, Zheng D, Dai J, Ni W, Wei J, Xue Y, Hou W, Zhang C, Feng X, Liang Y. The advantages of PD1 activating chimeric receptor (PD1-ACR)

- 
- engineered lymphocytes for PDL1<sup>+</sup> cancer therapy. *American Journal of Translational Research* 2015;7:460-473
- [181] Wainwright D, Chang A, Dey M, Balyasnikova I, Kim C, Tobias A, Cheng Y, Kim J, Qiao J, Zhang L, Han Y, Lesniak M. Durable Therapeutic Efficacy Utilizing Combinatorial Blockade against IDO, CTLA-4, and PD-L1 in Mice with Brain Tumors. *Clinical Cancer Research* 2014;20:5290-5301
- [182] Duraiswamy J, Kaluza K, Freeman G, Coukos G. Dual Blockade of PD-1 and CTLA-4 Combined with Tumor Vaccine Effectively Restores T Cell Rejection Function in Tumors. *Cancer Research* 2013;73:3591-3603
- [183] Hamid O, Robert C, Daud A, Hodi S, Hwu WJ, Kefford R, Wolchok J, Hersey P, Joseph R, Weber J, Dronca R, Gangadhar T, Patnaik A, Zarour H, Joshua A, Gergich K, Ellassaiss-Schaap J, Algazi A, Mateus C, Boasberg P, Tumei P, Chmielowski B, Ebbinghaus S, Li X, Kang P, Ribas A. Safety and Tumor Responses with Lambrolizumab (Anti-PD-1) in Melanoma. *The New England Journal of Medicine* 2013;369:134-144
- [184] Michot J, Bigenwald C, Champiat S, Collins M, Charbonnel F, Postel-Vinay S, Berdelou A, Varga A, Bahleda R, Hollebecque A, Massard C, Fuerea A, Ribrag V, Gazzah A, Armand J, Amellal N, Angevin E, Noel N, Boutros C, Mateus C, Robert C, Soria J, Marabelle A, Lambotte O. Immune-related adverse events with immune checkpoint blockade: a comprehensive review. *European Journal of Cancer* 2016;54:139-148
- [185] Weber J, Kähler K, Hauschild A. Management of Immune-Related Adverse Events and Kinetics of Response With Ipilimumab. *Journal of Clinical Oncology* 2012;30:2691-2697
- [186] Gilbert MR, Wang M, Aldape KD, Stupp R, Hegi MR, Jaeckle KA, Armstrong TS, Wefel JS, Won M, Blumenthal DT, Mahajan A, Schultz CJ, Erridge S, Baumert B, Hopkins KI, Tzuk-Shina T, Brown PD, Chakravati A, Curran WJ, Mehta MP. Dose-Dense Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma: A Randomized Phase III Clinical Trial. *Journal of Clinical Oncology* 2013;31:4085-4091
- [187] Kesari S. Understanding Glioblastoma Tumor Biology: The Potential to Improve Current Diagnosis and Treatments. *Seminars in Oncology* 2011;38:S2-S10
- [188] Auffinger B, Thaci B, Nigam P, Rincon E, Cheng Y, Lesniak M. New therapeutic approaches for malignant glioma: in search of the Rosetta stone. *F1000 Medicine Reports* 2012;4:18
- [189] Beyeler S, Joly S, Fries M, Obermair F-J, Burn F, Mehmood R, Tabatabai G, Raineteau O. Targeting the bHLH Transcriptional Networks by Mutated E Proteins in Experimental Gliomas. *Stem Cells* 2014;32:2583-2595
- [190] Jones S. An overview of the basic helix-loop-helix proteins. *Genome Biology* 2004;5:226
- [191] Hoshizaki D, Hill J, Henry S. The *Saccharomyces cerevisiae* INO4 Gene Encodes a Small, Highly Basic Protein Required for Derepression of Phospholipid Biosynthetic Enzymes. *The Journal of Biological Chemistry* 1990;265:4736-4745
- [192] The Yeast Regulatory Gene PHO4 Encodes a Helix-Loop-Helix Motif. *Yeast* 1990;6:451-454
- [193] Porcher C, Swat W, Rockwell K, Fujiwara Y, Alt F, Orkin S. The T Cell Leukemia Oncoprotein SCL/tal-1 is Essential for Development of All Hematopoietic Lineages. *Cell* 1996;86:47-57
- [194] Lee J, Hollenberg S, Snider L, Turner D, Lipnick N, Weintraub H. Conversion of *Xenopus* Ectoderm into Neurons by NeuroD, a Basic Helix-Loop-Helix Protein. *Science* 1995;268:836-844
- [195] Tapscott S, Davis R, Thayer M, Cheng PF, Weintraub H, Lassar A. MyoD1: A Nuclear Phosphoprotein Requiring a Myc Homology Region to Convert Fibroblasts to Myoblasts. *Science* 1988;242:405-411

- 
- [196] Atchley W, Fitch W. A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1997;94:5172-5176
- [197] Murre C, Bain G, van Dijk M, Engel I, Furnari B, Massari M, Matthews J, Quong M, Rivera R, Stuver M. Structure and function of the helix-loop-helix proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1994;1218:129-135
- [198] Ledent V, Paquet O, Vervoort M. Phylogenetic analysis of the human basic helix-loop-helix proteins. *Genome Biology* 2002;3:research0030.18-0030.18
- [199] Fischer B, Azim K, Hurtado-Chong A, Ramelli S, Fernández M, Raineteau O. E-proteins orchestrate the progression of neural stem cell differentiation in the postnatal forebrain. *Neural Development* 2014;9:23
- [200] Ross S, Greenberg M, Stiles C. Basic Helix-Loop-Helix Factors in Cortical Development. *Neuron* 2003;39:13-25
- [201] Massari M E, Murre C. Helix-Loop-Helix Proteins: Regulators of Transcription in Eucaryotic Organism. *Molecular and Cellular Biology* 2000;20:429-440
- [202] Murre C, Schonleber McCaw P, Vaessin H, Caudy M, Jan L, Jan Y, Cabrera C, Buskin J, Hauschka S, Lassar A, Weintraub H, Baltimore D. Interactions between Heterologous Helix-Loop-Helix Proteins Generate Complexes That Bind Specifically to a Common DNA Sequence. *Cell* 1989;58:537-544
- [203] Henthorn P, Kiledjian M, Kadesch T. Two Distinct Transcription Factors That Bind the Immunoglobulin Enhancer  $\mu$ E5/ $\kappa$ E2 Motif. *Science* 1990;247:467-470
- [204] Sun X-H, Copeland N G, Jenkins N A, Baltimore D. Id Proteins Id1 and Id2 Selectively Inhibit DNA Binding by One Class of Helix-Loop-Helix Proteins. *Molecular and Cellular Biology* 1991;11:5603-5611
- [205] Nelson C, Shen LP, Meister A, Fodor E, Rutter W. Pan: a transcriptional regulator that binds chymotrypsin, insulin, and AP-4 enhancer motifs. *Genes & Development* 1990;4:1035-1043
- [206] Jacobs Y, Vierra C, Nelson C. E2A Expression, Nuclear Localization, and In Vivo Formation of DNA- and Non-DNA-Binding Species during B-Cell Development. *Molecular and Cellular Biology* 1993;13:7321-7333
- [207] Bain G, Gruenwald S, Murre C. E2A and E2-2 Are Subunits of B-Cell-Specific E2 Box DNA-Binding Proteins. *Molecular and Cellular Biology* 1993;13:3522-3529
- [208] Wendt H, Thomas R, Ellenberger T. DNA-mediated Folding and Assembly of MyoD-E47 Heterodimers. *The Journal of Biological Chemistry* 1998;273:5735-5743
- [209] Shen CP, Kadesch T. B-Cell-Specific DNA Binding by an E47 Homodimer. *Molecular and Cellular Biology* 1995;15:4518-4524
- [210] Ellenberger T, Fass D, Arnaud M, Harrison S C. Crystal structure of transcription factor E47: E-box recognition by a basic region helix-loop-helix dimer. *Genes & Development* 1994;8:970-980
- [211] Davis N, McGhee L, Meyers S. The ETO (MTG8) gene family. *Gene* 2003;303:1-10
- [212] Bradney C, Hjelmeland M, Komatsu Y, Yoshida M, Yao TP, Zhuang Y. Regulation of E2A Activities by Histone Acetyltransferases in B Lymphocyte Development. *The Journal of Biological Chemistry* 2003;278:2370-2376
- [213] Lin Y, Jhunjhunwala S, Benner C, Heinz S, Welinder E, Mansson R, Sigvardsson M, Hagman J, Espinoza C, Dutkowski J, Ideker T, Glass C, Murre C. A global Network of transcription factors, involving E2A, EBF-1 and Foxo1, that orchestrates the B cell fate. *Nature Immunology* 2010;11:635-643
- [214] Qiu Y, Sharma A, Stein R. p300 Mediates Transcriptional Stimulation by the Basic Helix-Loop-Helix Activators of the Insulin Gene. *Molecular and Cellular Biology* 1998;18:2957-2964

- 
- [215] Zhang J, Kalkum M, Yamamura S, Chait B, Roeder R. E Protein Silencing by the Leukemogenic AML1-ETO Fusion Protein. *Science* 2004;305:1286-1289
- [216] Teachenor R, Beck K, Wright L Y T, Shen Z, Briggs S P, Murre C. Biochemical and Phosphoproteomic Analysis of the Helix-Loop-Helix Protein E47. *Molecular and Cellular Biology* 2012;32: 1671-1682
- [217] Murre C, Schonleber McCaw P, Baltimore D. A New DNA Binding and Dimerization Motif in Immunoglobulin Enhancer Binding, daughterless, MyoD, and myc Proteins. *Cell* 1989;56:777-783
- [218] Sun XH, Baltimore D. An Inhibitory Domain of E12 Transcription Factor Prevents DNA Binding in E12 Homodimers but Not in E12 Heterodimers. *Cell* 1991;64:459-470
- [219] Lasorella A, Benezra R, Lavarone A. The ID proteins: master regulators of cancer stem cells and tumour aggressiveness. *Nature Review Cancer* 2014;14:77-91
- [220] Zheng W, Wang H, Xue L, Zhang Z, Tong T. Regulation of Cellular Senescence and p16<sup>ink4a</sup> Expression by ID1 and E47 Proteins in Human Diploid Fibroblast. *The Journal of Biological Chemistry* 2004;279:31524-31532
- [221] Sun XH. Constitutive Expression of the Id1 Gene Impairs Mouse B Cell Development. *Cell* 1994;79:893-900
- [222] Boisson B, Wang Y, Bosompem A, Ma C S, Lim A, Kochetkov T, Tangye S G, Casanova J-L, Conley M E. A recurrent dominant negative E47 mutation causes agammaglobulinemia and BCR- B-cells. *J Clin Invest* 2013;123:4781-4785
- [223] Bain G, Maandag E, Izon D, Amsen D, Kruisbeek A, Weintraub B, Krop I, Schlissel M, Feeney A, van Roon M, van der Valk M, Riele H, Berns A, Murre C. E2A Proteins Are Required for Proper B Cell Development and Initiation of Immunoglobulin Gene Rearrangements. *Cell* 1994;79:885-892
- [224] Zhuang Y, Soriano P, Weintraub H. The Helix-Loop-Helix Gene E2A Is Required for B Cell Formation. *Cell* 1994;79:875-884
- [225] Bain G, Engel I, Maandag R, Riele H, Volland J, Sharp L, Chun J, Huey B, Pinkel D, Murre C. E2A Deficiency Leads to Abnormalities in  $\alpha\beta$  T-Cell Development and to Rapid Development of T-Cell Lymphomas. *Molecular and Cellular Biology* 1997;17:4782-4791
- [226] Steininger A, Möbs M, Ullmann R, Köchert K, Kreher S, Lamprecht B, Anagnostopoulos I, Hummel M, Richter J, Beyer M, Janz M, Klemke C, Stein H, Dörken B, Sterry W, Schrock E, Mathas S, Assaf C. Genomic loss of the putative tumor suppressor gene E2A in human lymphoma. *The Journal of Experimental Medicine* 2011;208:1585-1593
- [227] Schmitz R, Young R, Ceribelli M, Jhavar S, Xiao W, Zhang M, Wright G, Shaffer A, Hodson D, Buras E, Liu X, Powell J, Yang Y, Xu W, Zhao H, Kohlhammer H, Rosenwald A, Kluin P, Müller-Hermelink H, Ott G, Gascoyne R, Connors J, Rimsza L, Campo E, Jaffe E, Delabie J, Smeland E, Olgwang M, Reynolds S, Fisher R, Braziel R, Tubbs R, Cook J, Weisenburger D, Chan W, Pittaluga S, Wilson W, Waldmann T, Rowe M, Mbulaiteye S, Rickinson A, Staudt L. Burkitt Lymphoma Pathogenesis and Therapeutic Targets from Structural and Functional Genomics. *Nature* 2012;490:116-120
- [228] Bohrer C, Pfurr S, Mammadzada K, Schildge S, Plappert L, Hils M, Pous L, Rauch K S, Dumit V I, Pfeifer D, Dengjel J, Kirsch M, Schachtrup K, Schachtrup C. The balance of Id3 and E47 determines neural stem/precursor cell differentiation into astrocytes. *The EMBO Journal* 2015;34:2804-2819
- [229] Park S, Nolan G, Sun XH. Growth Inhibition and Apoptosis Due to Restoration of E2A Activity in T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Cells. *The Journal of Experimental Medicine* 1999;3:501-508

- 
- [230] Teng Y, Li X. The roles of HLH transcription factors in epithelial mesenchymal transition and multiple molecular mechanisms. *Clinical & Experimental Metastasis* 2014;31:367-377
- [231] Davis R, Weintraub H, Lassar A. Expression of a Single Transfected cDNA Converts Fibroblasts to Myoblasts. *Cell* 1987;51:987-1000
- [232] Blackwell K, Weintraub H. Differences and Similarities in DNA-binding Preferences of MyoD and E2A Protein Complexes Revealed by Binding Site Location. *Science* 1990;250:1104-1110
- [233] Lu Q, Yuk D, Alberta J, Zhu Z, Pawlitzky I, Chan J, McMahon A, Stiles C, Rowitch D. Sonic Hedgehog-Regulated Oligodendrocyte Lineage Genes Encoding bHLH Proteins in the Mammalian Central Nervous System. *Neuron* 2000;25:317-329
- [234] Wegner M. Expression of Transcription Factors during Oligodendroglial Development. *Microscopy Research and Technique* 2001;52:746-752
- [235] Samanta J, Kessler J A. Interaction between ID and OLIG proteins mediate the inhibitory effects of BMP4 on oligodendroglial differentiation. *Development* 2004;131: 4131-4142
- [236] Zhou Q, Wang S, Anderson D J. Identification of a Novel Family of Oligodendrocyte Lineage-Specific Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factors. *Neuron* 2000;25:331-343
- [237] Ligon K, Huillard E, Mehta S, Kesari S, Liu H, Alberta J, Bachoo R, Kane M, Louis D, DePinho R, Anderson D, Stiles C, Rowitch D. Olig2-regulated lineage-restricted pathway controls replication competence in neural stem cells and malignant glioma. *Neuron* 2007;53:503-517
- [238] Mehta S, Huillard E, Kesari S, Maire C, Golebiowski D, Harrington E, Alberta J, Kane M, Theisen M, Ligon K, Rowitch D, Stiles C. The central nervous system restricted transcription factor Olig2 opposes p53 response to genotoxic damage in neural progenitors and malignant glioma. *Cancer Cell* 2011;19:359-371
- [239] Zhu G, Mehler M, Mabie P, Kessler J. Developmental Changes in Progenitor Cell Responsiveness to Cytokines. *Journal of Neuroscience Research* 1999;56:131-145
- [240] Mehler M, Marmur R, Gross R, Mabie P, Zang Z, Papavasiliou A, Kessler J. Cytokines Regulate the Cellular Phenotype of Developing Neural Lineage Species. *International Journal of Developmental Neuroscience* 13:213-240
- [241] Gross R, Mehler M, Mabie P, Zang Z, Santschie L, Kessler J. Bone Morphogenetic Proteins Promote Astroglial Lineage Commitment by Mammalian Subventricular Zone Progenitor Cells. *Neuron* 1996;17:595-606
- [242] Zhou Q, Wang S, Anderson D J. Identification of a Novel Family of Oligodendrocyte Lineage-Specific Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factors. *Neuron* 2000;25:331-343
- [243] Ligon K, Alberta J, Kho A, Weiss J, Kwaan M, Nutt C, Louis D, Stiles C, Rowitch D. The Oligodendroglial Lineage Marker OLIG2 Is Universally Expressed in Diffuse Gliomas. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 2004;63:499-509
- [244] Garrel J, Modolell J. The *Drosophila* extramacrochaetae Locus, an Antagonist of Proneural Genes That, Like These Genes, Encodes a Helix-Loop-Helix Protein. *Cell* 1990;61:39-48
- [245] Ellis H, Spann D, Posakony J. extramacrochaetae, a Negative Regulator of Sensory Organ Development in *Drosophila*, Defines a New Class of Helix-Loop-Helix Proteins. *Cell* 1990;61:27-38
- [246] Benezra R, Davis R L, Lockshon D, Turner D L, Weintraub H. The Protein Id: A Negative Regulator of Helix-Loop-Helix DNA Binding Proteins. *Cell* 1990;61:49-59

- 
- [247] Wilson R, Kiledjian M, Shen CP, Benezra R, Zwollo P, Dymecki S, Desiderio S, Kadesch T. Repression of Immunoglobulin Enhancers by the Helix-Loop-Helix Protein Id: Implications for B-Lymphoid-Cell Development. *Molecular and Cellular Biology* 1991;11:6185-6191
- [248] Christy B, Sanders L, Lau L, Copeland N, Jenkins N, Nathans D. An Id-related helix-loop-helix protein encoded by a growth factor-inducible gene. *Proceedings of the National Academy of Science* 1991;88:1815-1819
- [249] Biggs J, Murphy E, Israel M. A Human Id-like helix-loop-helix protein expressed during early development. *Proceedings of the National Academy of Science* 1992;89:1512-1516
- [250] Riechmann V, van Crüchten I, Sablitzky F. The expression pattern of Id4, a novel dominant negative helix-loop-helix protein, is distinct from Id1, Id2 and Id3. *Nucleic Acids Research* 1994;22:749-755
- [251] Ellmeier W, Aguzzi A, Kleiner E, Kurzbauer R, Weith A. Mutually exclusive expression of a helix-loop-helix gene and N-myc in human neuroblastomas and in normal development. *The EMBO Journal* 1992;11:2563-2571
- [252] Qi J, Su Y, Sun R, Zhang F, Luo X, Yang Z, Luo X. CASK inhibits ECV304 cell growth and interacts with Id1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005;328:517-521
- [253] Bounpheng M, Dimas J, Dodds S, Cristiy B. Degradation of Id proteins by the ubiquitin-proteasome pathway. *The FASEB Journal* 2017;13:2257-2264
- [254] Lingbeck J, Trausch-Azar J, Ciechanover A, Schwartz A. E12 and E47 modulate cellular localization and proteasome-mediated degradation of MyoD and Id1. *Oncogene* 2005;24:6376-6384
- [255] Trausch-Azar J, Lingbeck J, Ciechanover A, Schwartz A. Ubiquitin-Proteasome-mediated Degradation of Id1 Is modulated by MyoD. *The Journal of Biological Chemistry* 2004;279:32614-32619
- [256] Nakayama K, Nakayama K. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nature Reviews Cancer* 2006;6:369-381
- [257] Amerik A, Hochstrasser M. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta* 2004;1695:189-207
- [258] Ruas M, Peters G. The p16<sup>INK4a</sup>/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochimica et Biophysica Acta* 1998;1378:115-177
- [259] Sherr C, Roberts J. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G<sub>1</sub>-phase progression. *Genes & Development* 1999;13:1501-1512
- [260] Norton J. ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. *Journal of Cell Science* 2000;113:3897-3905
- [261] Sijkder H, Devlin M, Dunlap S, Ryu B, Alani R. Id proteins in cell growth and tumorigenesis. *Cancer Cell* 2003;3:525-530
- [262] Iavarone A, Garg P, Lasorella A, Hsu J, Israel M. The Helix-loop-helix protein Id-2 enhances cell proliferation and binds to the retinoblastoma protein. *Genes & Development* 1994;8:1270-1284
- [263] Lasorella A, Iavarone A, Israel M. Id2 Specifically Alters Regulation of the Cell Cycle by Tumor Suppressor Proteins. *Molecular and Cellular Biology* 1996;16:2570-2578
- [264] Qin XQ, Chittenden T, Livingston D, Kaelin W. Identification of a growth suppression domain within the retinoblastoma gene product. *Genes & Development* 1992;6:953-964
- [265] Pagliuca A, Gallo P, De Luca P, Lania L. Class A Helix-Loop-Helix Proteins Are Positive Regulators of Several Cyclin-dependent Kinase Inhibitors' Promoter Activity and Negatively Affect Cell Growth. *Cancer Research* 2000;60:1376-1382

- 
- [266] Alani R M, Young A Z, Shifflett C B. Id1 regulation of cellular senescence through transcriptional repression of p16 /Ink4a. *Proceedings of the National Academy of Science* 2001;98:7812-7816
- [267] Ohtani N, Zebedee Z, Guot T, Stinson J, Sugimoto M, Ohashi Y, Sharrocks A, Peters G, Hara E. Opposing effects of Ets and Id proteins on p16<sup>INK4a</sup> expression during cellular senescence. *Nature* 2001;409:1067-1070
- [268] Alani R, Hasskarl J, Grace M, Hernandez MC, Israel M, Münger K. Immortalization of primary human keratinocytes by the helix-loop-helix protein, Id-1. *Proceedings of the National Academy of Science* 1999;96:9637-9641
- [269] Nickoloff B, Chaturvedi V, Bacon P, Qin JZ, Denning M, Diaz M. Id-1 Delays Senescence But Does Not immortalize Keratinocytes. *Journal of Biological Chemistry* 2000;275:27501-27504
- [270] Prabhu S, Ignatova A, Park S, Sun XH. Regulation of the Expression of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p21 by E2A and Id Proteins. *Molecular and Cellular Biology* 1997;17:5888-5896
- [271] Hara E, Smith R, Parry D, Tahara H, Stone S, Peters G. Regulation of p16CDKN2 Expression and Its Implications for Cell Immortalization and Senescence. *Molecular and Cellular Biology* 1996;16:859-867
- [272] Norton J, Deed R, Craggs G, Sablitzky F. Id helix-loop-helix proteins in cell growth and differentiation. *Trends in Cell Biology* 1998;8:58-65
- [273] Einarson M, Chao M. Regulation of Id1 and Its Association with Basic Helix-Loop-Helix Proteins during Nerve Growth Factor-Induced Differentiation of PC12 Cells. *Molecular and Cellular Biology* 1995;15:4175-4183
- [274] Le Jossic C, Ilyin G, Loyer P, Glaise D, Cariou S, Guguen-Guilouzo C. Expression of Helix-Loop-Helix Factor Id-1 Is Dependent on the Hepatocyte Proliferation and Differentiation Status in Rat Liver and in Primary Culture. *Cancer Research* 1994;54:6065-6068
- [275] Kreider B, Benezra R, Rovera G, Kadesch T. Inhibition of Myeloid Differentiation by the Helix-Loop-Helix Protein Id. *Science* 1992;255:1700-1702
- [276] Hasskarl J, Münger K. Id Proteins—Tumor Markers or Oncogenes? *Cancer Biology & Therapy* 2002;1:91-96
- [277] Vandeputte D, Troost D, Leenstra S, Ijlst-Keizers H, Ramkema M, Bosch A, Baas F, Das N, Aronica E. Expression and Distribution of Id Helix-Loop-Helix Proteins in Human Astrocytic Tumors. *GLIA* 2002;38:329-338
- [278] Slovak M, Bedell V, Hsu YH, Estrine D, Nowak N, Delioukina M, Weiss L, Smith D, Forman S. Molecular Karyotypes of Hodgkin and Reed-Sternberg Cells at Disease Onset Reveal Distinct Copy Number Alterations in Chemosensitive versus Refractory Hodgkin Lymphoma. *Clinical Cancer Research* 2011;17:3443-3454
- [279] de Candia P, Akram M, Benezra R, Brogi E. Id4 messenger RNA and estrogen receptor expression: inversion correlation in human normal breast epithelium and carcinoma. *Human Pathology* 2006;37:1032-1041
- [280] Noetzel E, Veeck J, Niederacher D, Galm O, Horn F, Hartmann A, Knüchel R, Dahl E. Promoter methylation-associated loss of ID4 expression is a marker of tumour recurrence in human breast cancer. *BMC Cancer* 2008;8:154
- [281] Umetani N, Takeuchi H, Fujimoto A, Shinozaki M, Bilchik A, Hoon D. Epigenetic Inactivation of ID4 in Colorectal Carcinomas Correlates with Poor Differentiation and Unfavorable Prognosis. *Clinical Cancer Research* 2004;10:7475-7483
- [282] Yu L, Liu C, Vandeusen J, Becknell B, Dai Z, Wu YZ, Raval A, Liu TH, Ding W, Mao C, Smith L, Lee S, Rassenti L, Marcucci G, Bryd J, Caliguri M, Plass C. Global assessment of promoter methylation in a mouse model of cancer identifies ID4 as a putative tumor-suppressor gene in human leukemia. *Nature Genetics* 2005;37:265-274

- 
- [283] Castro M, Grau L, Puerta P, Gilmenez L, Venditti J, Quadrelli S, Sánchez-Carbayo M. Multiplexed methylation profiles of tumor suppressor genes and clinical outcome in lung cancer. *Journal of Translational Medicine* 2010;8:86
- [284] Sharma P, Chinaranagari S, Chaudhary J. Inhibitor of Differentiation (ID4) Acts as an Inhibitor of ID-1, -2 and -3 and Promotes basic Helix Loop Helix (bHLH) E47 DNA Binding and Transcriptional Activity. *Biochimie* 2015;112:139-150
- [285] Bonner W. Protein migration into nuclei. I. Frog oocyte Nuclei in vivo accumulate microinjected histones, allow entry to small proteins, and exclude large proteins. *The Journal of Cell Biology* 1975;64:421-430
- [286] Naim B, Brumfeld V, Kapon R, Kiss V, Nevo R, Reich Z. Passive and Facilitated transport in nuclear pore complexes is largely uncoupled. *The Journal of Biological Chemistry* 2007;282:3881-3888
- [287] Macara I. Transport into and out of the nucleus. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2001;65:570-594
- [288] Chook Y, Blobel G. Karyopherins and nuclear import. *Current Opinion in Structural Biology* 2001;11:703-715
- [289] Stewart M. Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nature Reviews* 2007;8:195-208
- [290] Wentz S, Rout M. The nuclear pore complex and nuclear transport. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2010;2:a000562
- [291] Imamoto N, Shimamoto T, Takao T, Tachibana T, Kose S, Matsubae M, Sekimoto T, Shimonishi Y, Yoneda Y. In vivo evidence for involvement of a 58 kDa component of nuclear pore-targeting complex in nuclear protein import. *The EMBO Journal* 1995;14:3617-3626
- [292] Görlich D, Kutay U. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annual Reviews* 1999;15:607-660
- [293] Fried H, Kutay U. Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2003;60:1659-1688
- [294] Rout M, Aitchison J. The nuclear pore complex as a transport machine. *The Journal of Biological Chemistry* 2001;276:16593-16596
- [295] Melchior F, Paschal B, Evans J, Gerace L. Inhibition of nuclear protein import by nonhydrolyzable analogues of GTP and Identification of the small GTPase Ran/TC4 as an essential transport factor. *The Journal of Cell Biology* 1993;123:1649-1659
- [296] Moore M, Blobel G. The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature* 1993;365:661-663
- [297] Kuersten S, Ohno M, Mattaj J. Nucleocytoplasmic transport: Ran, beta and beyond. *TRENDS in Cell Biology* 2001;11:497-503
- [298] Mehmood R, Yasuhara N, Oe S, Nagai M, Yoneda Y. Synergistic nuclear import of NeuroD1 and its partner transcription factor, E47, via heterodimerization. *Experimental Cell Research* 2009;315:1639-1652
- [299] Maerkl S, Quake S. Experimental determination of the evolvability of a transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Science*;106:18650-18655
- [300] Barde I, Zanta-Boussif MA, Paisant S, Leboeuf M, Rameau P, Delenda C, Danos O. Efficient control of gene expression in the hematopoietic system using a single Tet-on inducible lentiviral vector. *Molecular Therapy* 2006;13:382-390
- [301] Ishii N, Maier D, Merlo A, Mitsushiro T, Sawamura Y, Diserens AC, Van Meir E. Frequent Co-Alterations of TP53, p16/CDKN2A, P14<sup>ARF</sup>, PTEN Tumor Suppressor Genes in Human Glioma Cell Lines. *Brain Pathology* 1999;9:469-479
- [302] Barde I, Salmon P, Trono D. Production and Titration of Lentiviral Vectors. *Current Protocols in Neuroscience* 2010; Kapitel 4, Einheit 4.21.

- 
- [303] Franken N, Rodermond H, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols* 2006;1:2315-2319
- [304] Bradford M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 1976;72:248-254
- [305] Kodzius R, Kojima M, Nishiyori H, Nakamura M, Fukuda S, Tagami M, Sasaki D, Imamura K, Kai C, Harbers M, Hayashizaki Y, Carnici P. CAGE: cap analysis of gene expression. *Nature Methods* 2006;3:211-222
- [306] Weller M, Butowski N, Tran D, Recht L, Lim M, Hirte H, Ashby L, Mechtler L, Goldlust S, Iwamoto F, Drappatz J, O'Rourke D, Wong M, Hamilton M, Finocchiaro G, Perry J, Wick W, Green J, He Y, Turner C, Yellin M, Keler T, Davis T, Stupp R, Sampson J. Rindopepimut with temozolomide for patients with newly diagnosed, EGFRvIII-expressing glioblastoma (ACT IV): a randomised, double-blind, international phase 3 trial. *Lancet Oncology* 2017;18:1373-1385
- [307] Roth P, Weller M. Challenges to targeting epidermal growth factor receptor in glioblastoma: escape mechanisms and combinatorial treatment strategies. *Neuro-Oncology* 2014;16:viii14-viii19
- [308] Steinert G, Schölch S, Niemiets T, Iwata N, Garcia S, Behrens B, Voigt A, Kloor M, Benner A, Bork U, Rahban N, Büchler M, Stoecklein N, Weitz J, Koch M. Immune Escape and Survival Mechanisms in Circulating Tumor Cells of Colorectal Cancer. *Cancer Research* 2014;74:1694-1704

## 6.2 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: MRT-BILD EINES PATIENTEN MIT GLIOBLASTOM BEI DIAGNOSESTELLUNG ....	9
ABBILDUNG 2: HISTOLOGISCHE PRÄPARATE .....	11
ABBILDUNG 3: GLIOBLASTOMGEWEBE MIT ZAHLREICHEN GEFÄßEN IN HE-FÄRBUNG.....	12
ABBILDUNG 4: DARSTELLUNG DER IDH FUNKTION BEI IDH-MUTATION .....	14
ABBILDUNG 5: EINTEILUNG DES GLIOBLASTOMS .....	16
ABBILDUNG 6: DARSTELLUNG DER BLUT-HIRN-SCHRANKE.....	18
ABBILDUNG 7: DARSTELLUNG DER WIRKWEISE VON TEMOZOLOMID .....	23
ABBILDUNG 8: DARSTELLUNG DES E47:RFP UND DNE47:RFP FUSIONSPROTEINS.....	35
ABBILDUNG 9: VERDÜNNUNGS- UND PIPETTIERSCHEMA DES BRADFORD ASSAYS .....	64
ABBILDUNG 10: STANDARDKURVE FÜR DIE PROTEINBESTIMMUNG .....	65
ABBILDUNG 11: IMMUNZYTOCHEMIE BILD DER LN229 RFP-ZELLEN .....	69
ABBILDUNG 12: IMMUNZYTOCHEMIE BILD DER LN229 DNE47-ZELLEN.....	70
ABBILDUNG 13: WESTERN BLOT DER LN299 DNE47 UND LN299 RFP ZELLEN 0, 4, 8 UND 24 STUNDEN NACH DOXYCYCLIN-INDUKTION .....	72
ABBILDUNG 14: WESTERN BLOT DER LN229 DNE47 UND LN229 RFP ZELLEN 24, 48, UND 72 STUNDEN NACH DOXYCYCLIN-INDUKTION .....	73
ABBILDUNG 15: WESTERN BLOT DER LN229 DNE47 UND LN299 RFP ZELLEN 0, 4 UND 8 STUNDEN NACH DOXYCYCLIN-INDUKTION .....	74
ABBILDUNG 16: WESTERN BLOT DER LN299 DNE47 UND LN229 RFP ZELLEN 24, 48 UND 72 STUNDEN NACH DOXYCYCLIN-INDUKTION .....	75
ABBILDUNG 17: KLONOGENITÄTS ASSAY DER LN229 ZELLEN NACH RADIOTHERAPIE UND DOXYCYCLIN GABE.....	77
ABBILDUNG 18: KLONOGENITÄTS ASSAY MIT SINGULÄRER RADIOTHERAPIE UND DOXYCYCLIN GABE ZUR INTERNEN KONTROLLE .....	78
ABBILDUNG 19: KLONOGENITÄTS ASSAY MIT KOMBINATION AUS TMZ UND DOXYCYCLIN GABE .....	79
ABBILDUNG 20: KLONOGENITÄTS ASSAY MIT SINGULÄRER TMZ UND DOXYCYCLIN GABE ZUR INTERNEN KONTROLLE.....	81
ABBILDUNG 21: KOMBINATIONSTHERAPIEN BEIM KLONOGENITÄTS ASSAY .....	83
ABBILDUNG 22: KOMBINATIONSTHERAPIEN DER ZYTOTOXIZITÄTS ASSAYS .....	84
ABBILDUNG 23: CAGE EXPRESSIONSPROFIL DER PROMOTOR STELLEN 24 STUNDEN NACH DOXYCYCLIN-INDUKTION.....	86
ABBILDUNG 24: DARSTELLUNG DER VERSCHIEDENEN ABLÄUFE BEI VORLIEGEN VON E47 UND DNE47 .....	89

## 6.3 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: CHEMIKALIEN UND PUFFER .....	37
TABELLE 2: MEDIEN IN DER ZELLKULTUR, ICC, PLASMID HERSTELLUNG UND VIRUSPRODUKTION.....	39
TABELLE 3: VERWENDETE ZELLINIEN.....	40
TABELLE 4: VERWENDETE BAKTERIEN FÜR PLASMID HERSTELLUNG .....	41
TABELLE 5: VERWENDETE PUFFER UND LÖSUNGEN FÜR WESTERN BLOT .....	41
TABELLE 6: GELE FÜR WESTERN BLOT .....	42
TABELLE 7: VERWENDETE ANTIKÖRPER.....	43
TABELLE 8: VERWENDETE PLASMIDE .....	43
TABELLE 9: KITS FÜR DIE RNA-EXTRAKTION UND PLASMID VERVIELFÄLTIGUNG .....	44
TABELLE 10: VERWENDETES PLASTIKMATERIAL UND ZUBEHÖR.....	44
TABELLE 11: VERWENDETE GERÄTE .....	45
TABELLE 12: BEHANDLUNGSPLAN DER KONTROLLPLATTEN DER EINZELTHERAPIEN DER KLONOGENITÄTS ASSAYS .....	52
TABELLE 13: BEHANDLUNGSPLAN DER EINZELTHERAPIEN DER KLONOGENITÄTS ASSAYS.	52
TABELLE 14: EINZELTHERAPIEKONTROLLEN FÜR DIE KOMBINATIONSTHERAPIEN DES KLONOGENITÄTS ASSAYS .....	55
TABELLE 15: KOMBINATIONSTHERAPIE DOX-RT/CT DER KLONOGENITÄTS ASSAYS .....	56
TABELLE 16: KOMBINATIONSTHERAPIE RT/CT-DOX DER KLONOGENITÄTS ASSAYS .....	57
TABELLE 17: EINZELTHERAPIEKONTROLLEN FÜR DIE KOMBINATIONSTHERAPIEN DES ZYTOTOXIZITÄTS ASSAYS .....	58
TABELLE 18: KOMBINATIONSTHERAPIE DOX-RT/CT DER ZYTOTOXIZITÄTS ASSAYS .....	59
TABELLE 19: KOMBINATIONSTHERAPIE RT/CT-DOX DER ZYTOTOXIZITÄTS ASSAYS .....	60

## 6.4 Erklärung zum Eigenanteil

Diese Arbeit wurde im Hertie-Institut für klinische Hirnforschung in der Forschungsgruppe von Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Ghazaleh Tabatabai durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Ghazaleh Tabatabai in ihrer Funktion als Leiterin der Interdisziplinären Sektion für Neuroonkologie am Hertie-Institut für klinische Hirnforschung und des Zentrums für Neuroonkologie am Universitäts-Klinikum Tübingen.

Sämtliche Versuche wurden durch den Promovenden durchgeführt, nach entsprechender Einarbeitung durch die Labormitglieder Dr. med. Marilin Koch, Sarah Hendel (MTA) und Dr. rer. nat. Srinath Rajaraman.

Die Ergebnisse des Kapitel 3.3 und die Abbildungen 17-20 wurden vollkommen eigenständig angefertigt. Die Ergebnisse der Kapitel 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 und 3.5 mit den dazugehörigen Abbildungen 11-16 und 21-23 wurden mit Unterstützung von Sarah Hendel und Dr. med. Marilin Koch erbracht.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch den Kandidaten.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig, nach Anleitung durch Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Ghazaleh Tabatabai und Frau Dr. rer. nat. Susanne Beck, verfasst zu haben und keine weiteren, als die von mir angegebenen, Quellen verwendet zu haben.

Stuttgart, den

## 6.5 Danksagung

Mein Dank gilt Dr. rer. nat. Srinath Rajaraman, Denis Canjuga, Sarah Koch, Heike Pfrommer und insbesondere Dr. med. Marilin Koch für die Einarbeitung in die Methoden und die vielen Hilfestellungen im Labor.

Außerdem geht mein Dank an Dr. med. Benjamin Bender aus der Abteilung für Diagnostische und Interventionelle Neuroradiologie des UKT für die Bereitstellung der MRT-Bilder und an Prof. Dr. med. Jens Schittenhelm aus der Abteilung für Neuropathologie des UKT für die Bereitstellung der histologischen Glioblastom-Bilder.

Für die vielfältige Hilfe bei der schriftlichen Ausarbeitung dieser Arbeit möchte ich herzlichst Dr. rer. nat. Susanne Beck danken.

Besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Ghazaleh Tabatabai für die warmherzige Betreuung und die vielen fachlichen Hilfestellungen in den letzten drei Jahren.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern, meinem Bruder und meiner Freundin für ihre ausdauernde Hilfe und die vielen Aufmunterungen bei dem Verfassen dieser Arbeit bedanken.