

Aus dem Institut für Neuropathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Guido Reifenberger

**Untersuchungen zur Rolle mutierter Isocitrat-Dehydrogenase 1 und des DNA-Reparaturenzyms ALKBH2 für das Ansprechen von Glioblastomzellen auf alkylierende Zytostatika**

Dissertation

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

vorgelegt von

Vanessa Sarah Scherbaum

2021

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Guido Reifenberger

Zweitgutachter: PD Dr. med. Marion Rapp

**Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet**

## Zusammenfassung

Die Hypothese der vorliegenden Arbeit war, dass der Onkometabolit D-2-Hydroxyglutarat (D-2-HG) zu einer kompetitiven Hemmung des  $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängigen Reparaturenzyms ALKB Homolog 2 (ALKBH2) in *IDH1*-R132H-mutierten Gliomzellen und hierdurch zur Reduktion der ALKBH2-vermittelten Resistenzbildung gegenüber DNA-Alkylationen führt. *IDH1*-Mutationen kommen in Oligodendrogliomen und diffusen astrozytären Gliomen einschließlich eines Teils der Glioblastome vor. Sie führen statt der Bildung von  $\alpha$ -Ketoglutarat ( $\alpha$ -KG) zur Bildung von D-2-Hydroxyglutarat (D-2-HG). Zur Untersuchung der o.g. Hypothese wurden die Glioblastomzelllinien A-172, LN-18, LN-229 und U-87 MG mit einem Plasmid, welches entweder das *IDH1*-Wildtyp (Wt) oder das *IDH1*-R132H mutierte Protein kodiert, stabil transfiziert. Die *IDH1*-Wt- oder *IDH1*-R132H-transfizierten Glioblastomzelllinien wurden mit den Zytostatika Doxorubizin, Lomustin (CCNU) oder den beiden monofunktionalen DNA-Alkylationen Methylmethansulfonat (MMS) und Temozolomid (TMZ) behandelt und die Sensitivität gegenüber diesen Zytostatika mittels Zytotoxizitätsassays bestimmt. Entsprechend der Hypothese einer Hemmung von ALKBH2 durch D-2-HG wurde ein stärkeres Ansprechen der *IDH1*-R132H-transfizierten Glioblastomzellen auf MMS nach 1-stündiger Behandlung im Konzentrationsbereich von 3-6 mM und nach anschließender 48-stündiger Kultivierung der Zellen gefunden. Im Gegensatz hierzu war bei der kontinuierlichen Behandlung der Zellen mit MMS bzw. TMZ über 10 Tage kein Unterschied zwischen den *IDH1*-Wt- und den *IDH1*-R132H-transfizierten Zellen vorhanden. Bei diskontinuierlicher wie auch bei kontinuierlicher Behandlung der Zellen mit MMS ließ sich weder bezüglich der relativen Protein- noch der relativen mRNA-Expression von ALKBH2 ein Unterschied zwischen *IDH1*-Wt- und *IDH1*-R132H-transfizierten Glioblastomzellen feststellen. Die für *IDH1*-R132H-transfizierte Glioblastomzellen beobachtete erhöhte Zytostatikaempfindlichkeit war in Zelllinien mit *TP53*-Mutation und/oder Expression des DNA-Reparaturenzyms O<sup>6</sup>-Methylguanin DNA-Methyltransferase (MGMT) nicht nachweisbar. Das Protein p53 ist an der Regulation der Expression des Enzyms ALKBH2 beteiligt. Der fehlende indirekte Nachweis einer Funktionsminderung von ALKBH2 in *IDH1*-R132H-transfizierten Glioblastomzellen mit *TP53*-Mutation spricht für eine durch die *TP53*-Mutation vermittelte Störung der Expressionsregulation von ALKBH2, welche unabhängig vom *IDH1*-Mutationsstatus ist. Die Beobachtung, dass nur MGMT-defiziente Glioblastomzellen mit *IDH1*-Mutation stärker auf MMS reagierten, weist auf die dominante Bedeutung von MGMT für die Resistenz von Gliomzellen gegenüber DNA-Alkylationen hin. Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten bedeuten, dass Patienten, deren Tumoren zusätzlich zu einem Verlust der MGMT-Expression durch Hypermethylierung des *MGMT*-Promotors eine Mutation von *TP53* und/oder *IDH1* aufweisen, stärker von einer Therapie mit Temozolomid profitieren als Patienten, deren Tumoren die entsprechenden Mutationen nicht aufweisen. Diese Hypothese passt zu der klinischen Beobachtung, dass *IDH1*-mutierte Gliome besser auf Chemotherapie ansprechen als *IDH1*-Wildtyp Gliome.

## Abstract

This dissertation proposes and tests the hypothesis that the oncometabolite D-2-hydroxyglutarate (D-2-HG) competitively inhibits the  $\alpha$ -ketoglutarate ( $\alpha$ -KG)-dependent repair enzyme AlkB homolog 2 (ALKBH2) in *IDHI*-R132-mutant cells and that this inhibition results in a reduced ALKBH2-mediated resistance towards monofunctional alkylating agents. *IDHI* mutations are common in oligodendrogliomas and in diffuse astrocytic gliomas including some glioblastomas. They lead to the production of D-2-HG instead of  $\alpha$ -KG. To test the proposed hypothesis, the glioblastoma cell lines A-172, LN-18, LN-229, and U-87 MG were transfected with plasmid DNA that encoded either the *IDHI*-R132H mutant or the *IDHI*-wildtype (*IDHI*-Wt) sequences. The *IDHI*-Wt- or *IDHI*-R132H-transfected glioblastoma cell lines were treated with the cytostatic substances doxorubicine, lomustine or the two monofunctional alkylating agents methylmethanesulfonate (MMS) and temozolomide (TMZ). The sensitivity of glioblastoma cells towards these agents was determined by cytotoxicity assays. In accordance with the hypothesis that ALKBH2 would inhibit D-2-HG, a 1-hour treatment of cells with MMS at concentrations of 3-6 mM and an ensuing cell culturing over 48 hours resulted in a stronger response of *IDHI*-R132H-transfected glioblastoma cells.

In contrast, continuous treatment of cells with MMS or TMZ over a period of 10 days did not show different responses in *IDHI*-Wt- compared to *IDHI*-R132H-transfected cells. Neither discontinuous nor continuous treatment of cells with MMS resulted in a different relative protein or mRNA expression of ALKBH2 in *IDHI*-Wt- and *IDHI*-R132H-transfected glioblastoma cells. In contrast to the results with *IDHI*-R132H-transfected glioblastoma cells, an increased sensitivity to cytostatic agents was not detected in glioblastoma cell lines with a *TP53* mutation and/or expression of the DNA repair enzyme O<sup>6</sup>-Methylguanine DNA-methyltransferase (MGMT). The protein p53 is involved in the regulation of the enzyme ALKBH2. The missing indirect evidence of an impaired function of ALKBH2 in *IDHI*-R132H-transfected glioblastoma cells with a *TP53* mutation suggests a disturbed regulation of the expression of ALKBH2 that is induced by the *TP53* mutation and is independent of the mutation status of *IDHI*. The observation that exclusively MGMT-deficient glioblastoma cells with an *IDHI*-R132H-mutation reacted stronger to MMS suggests that MGMT is of predominant importance for the resistance of glioma cells to DNA-alkylating agents. The results of these experiments may imply that patients with glioblastomas that not only have a loss of MGMT expression by hypermethylation of the *MGMT* promotor but also a mutant *TP53* and/or *IDHI* gene take more benefit from therapy with temozolomide than patients without such mutations. This hypothesis fits with the clinical observation that gliomas with *IDHI* mutations are more sensitive to chemotherapeutic agents than *IDHI*-wildtype gliomas.

## Verzeichnis der Abkürzungen

7AAD	7-Aminoactinomycin D
ABC-Transporter	ATP binding cassette-Transporter
$\alpha$ -KG	alpha-Ketoglutarat
ALKBH2	AlkB Homolog 2, alpha-Ketoglutarat-abhängige Dioxygenase
APC	Allophycocyanin
APE1	apurinische/apyrimidische Endonuklease 1
ATCC	American Type Culture Collection
BER	Basenexzisionsreparatur
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin (Rinderserum)
CCNU	Lomustin (Synonym: Chlorethyl-Cyclohexyl-Nitroso-Urea)
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CpG	Cytosin-Phosphatidyl-Guanin
DSB	Doppelstrangbruch
DBD	DNA-bindende Domäne
D-2-HG	D-2-Hydroxyglutarat
DMF	Dimethylformamid
DOX	Doxorubizin
DPBS	Dulbecco's Phosphatpuffersalzlösung
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
dsDNA	Doppelstrang DANN
E.coli	Escherichia coli
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FCS	Fötales Kälberserum
G41	Geneticin
pGB	Primäres Glioblastom
GC-MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GOF	Gain-of-Function
ICL	Interstrand crosslink
IDH1	Isocitrat-Dehydrogenase 1
IDH2	Isocitrat-Dehydrogenase 2
IRES	Internal ribosomal entry site

Kan	Kanamycin
Kb	Kilobase
kDa	Kilo-Dalton
Konz.	Konzentration
Ktr.	Kontrolle
LB-Medium	Lysogeny Broth Medium
M	Molar
MCS	Multiple Cloning Site
1-MeA	1-Methyladenin
3-MeC	3-Methylcytosin
MeOH	Methanol
MES	2-N-Morpholinoethansulfonsäure
MGMT	O <sup>6</sup> -Methylguanin DNA-Methyltransferase
MMR-Protein	Mismatch-Reparatur-Protein
MMS	Methylmethansulfonat
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
Mt	Mutation
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
Neo	Neomycin
NHEJ	Non-homologous end-joining
N <sup>3</sup> -MeA	N <sup>3</sup> -Methyladenin
N <sup>3</sup> -MeG	N <sup>3</sup> -Methylguanin
N <sup>7</sup> -MeG	N <sup>7</sup> -Methylguanin
O <sup>6</sup> -MeG	O <sup>6</sup> -Methylguanin
OD	Optical density
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium dodecyl sulfate
siRNA	Small-interfering Ribonukleinsäure
ssDNA	Einzelstrang-DNA
SSBs	Einzelstrang-DNA
SSC	Side Scatter

Strep	Streptomycin
TAE-Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	Thermus aquaticus
TBS-T	Tris-Bor-Puffersalzlösung mit Tween 20
TE	Tris-EDTA
TMZ	Temozolomid
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
WHO	Weltgesundheitsorganisation
Wt	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Epidemiologie und Klassifikation der Gliome	1
1.2	Charakteristische molekulargenetische Alterationsmuster in Gliomen	2
1.3	Relevante prognostische und prädiktive Marker bei Gliomen	3
1.3.1	Bedeutung der Hypermethylierung des <i>MGMT</i> -Promotors	3
1.3.2	Stellenwert der <i>IDH</i> -Mutation	4
1.3.3	2-Gen-Prädiktor aus <i>MGMT</i> -Promotor-Hypermethylierung und <i>IDH</i> -Mutation	6
1.4	Stellenwert verschiedener Chemotherapeutika bei der Behandlung des Glioblastoms	7
1.5	Durch Alkylanzien induzierte DNA-Schäden und deren Reparaturmechanismen	8
1.5.1	Reparatur von DNA-Schäden, die durch monofunktionale Alkylanzien induziert sind	9
1.5.2	Reparatur von DNA-Schäden, die durch bifunktionale Alkylanzien induziert sind	9
1.5.3	Basen-Exzisionsreparatur (BER)	10
1.5.4	O <sup>6</sup> -Methylguanin-DNA-Methyltransferase ( <i>MGMT</i> )	11
1.5.5	Reparaturenzyme <i>ALKBH2</i> und <i>ALKBH3</i>	12
1.5.6	Bedeutung des Proteins $\gamma$ -H2AX als Marker für DNA-Doppelstrangbrüche	13
1.6	Übersicht der verwendeten Zytostatika mit den jeweils dazugehörigen Reparaturmechanismen	13
1.7	Ziele der Arbeit	14
<b>2</b>	<b>Material</b>	<b>15</b>
2.1	Nährmedium für die Kultivierung von <i>E. coli</i>	15
2.2	Plasmid <i>pIRES2-EGFP</i>	16
2.3	Verwendete Labormaterialien	16
2.3.1	Zellkulturmaterialien	16
2.3.2	Glioblastomzelllinien	17
2.3.3	Reagenzien und Chemikalien	17
2.3.4	Lösungen und Puffer	18
2.3.5	Laborkits	20
2.3.6	Zytostatika	20
2.3.7	Antikörper	20
2.3.8	Oligonukleotide	21
2.3.9	Instrumente	22

<b>2.4</b>	<b>Software</b>	<b>23</b>
<b>2.5</b>	<b>cDNA aus Tumorgewebeproben von Patienten mit Gliomen</b>	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>24</b>
<b>3.1</b>	<b>Methoden der Kultivierung von Glioblastomzelllinien</b>	<b>24</b>
3.1.1	Kultivierung humaner Glioblastomzelllinien	24
3.1.2	Splitten und Einfrieren von Glioblastomzelllinien	24
3.1.3	Bestimmung der Zellzahl	25
<b>3.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>25</b>
3.2.1	Polymerase- Kettenreaktion (PCR)	25
3.2.2	Agarose-Gelelektrophorese	26
3.2.3	Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR)	26
3.2.4	Extraktion von RNA aus kultivierten Glioblastomzellen	27
3.2.5	Umwandlung der RNA in cDNA	28
<b>3.3</b>	<b>Western-Blot-Analysen</b>	<b>28</b>
3.3.1	Proteinextraktion aus kultivierten Glioblastomzellen	28
3.3.2	Proteinauftrennung mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	29
3.3.3	Detektion der aufgetrennten Proteine mittels Western-Blot-Analyse	29
<b>3.4</b>	<b>Klonierung von <i>IDH1</i>-Wildtyp und <i>IDH1</i>-R132H</b>	<b>30</b>
3.4.1	Amplifikation der Wildtyp- und der mutierten Sequenz von <i>IDH1</i>	30
3.4.2	Linearisierung des pIRES2-EGFP-Vektors	31
3.4.3	Ligation	32
3.4.4	Transformation der Ligationsansätze in kompetente <i>E. coli</i>	32
3.4.5	MiniPrep-Aufbereitung der Plasmid-DNA	32
3.4.6	Extraktion der Plasmid-DNA	33
3.4.7	Sequenzierung der Plasmid-DNA	33
3.4.8	Maxipräparation der Plasmid-DNA	33
3.4.9	Linearisierung der verschiedenen pIRES-EGFP- <i>IDH1</i> -Plasmide	34
3.4.10	Transfektion von Glioblastomzelllinien	34
3.4.11	Fluorescence-activated Cell Sorting (FACS) der transfizierten Glioblastomzellen	34
3.4.12	Bestimmung von 2-Hydroxyglutarat in den transfizierten Glioblastomzellen	35
3.4.13	Kontrolle der Transfektionseffizienz durch Mikroskopie und Durchflusszytometrie	35
<b>3.5</b>	<b>In vitro-Experimente mit Zytostatika</b>	<b>36</b>
3.5.1	Untersuchung der Proliferationsrate von <i>IDH1</i> -Wildtyp- bzw. <i>IDH1</i> -R132H-transfizierten und parentalen Glioblastomzellen	36
3.5.2	Untersuchungen zur Zytotoxizität der Zytostatika Doxorubizin, CCNU und MMS	36
3.5.3	Behandlung der Glioblastomzellen mit Zytostatika	37

3.5.4	Langzeitbehandlung der Glioblastomzellen mit Zytostatika	37
3.5.5	Messung der $\gamma$ -pH2AX Expression mittels Durchflusszytometrie	38
3.5.5.1	Vorbehandlung der verschiedenen Zelllinien mit MMS	38
3.5.5.2	Probenaufarbeitung und Durchflusszytometrie	38
3.5.6	Messung von $\gamma$ -H2AX in den transfizierten Glioblastomzelllinien nach Behandlung mit MMS	39
<b>3.6</b>	<b>Vitalitätsprüfung von Glioblastomzellen nach Zytostatika-Behandlung</b>	<b>40</b>
3.6.1	Kristallviolett-Färbung	40
3.6.2	MTT-Assay	40
3.6.2.1	MTT-Assay I	40
3.6.2.2	MTT-Assay II	41
<b>3.7</b>	<b>Bestimmung der <i>MGMT</i>-Promotor-Hypermethylierung in den transfizierten Glioblastomzelllinien</b>	<b>41</b>
3.7.1	DNA-Extraktion aus Glioblastomzellen	41
3.7.2	Natriumbisulfit-Behandlung der extrahierten DNA und methylierungsspezifische PCR	41
3.7.3	Analyse der <i>MGMT</i> -Promotormethylierung mittels Pyrosequenzierung	43
<b>3.8</b>	<b>Transfektion von Glioblastomzellen mit siRNA gegen <i>MGMT</i></b>	<b>45</b>
<b>3.9</b>	<b>Statistische Auswertung</b>	<b>47</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>48</b>
<b>4.1</b>	<b>Nachweis des Transfektionserfolges und der Transfektionseffizienz</b>	<b>48</b>
4.1.1	Anreicherung der transfizierten Glioblastomzellen mittels Durchflusszytometrie	48
4.1.1	Nachweis des Transfektionserfolges mittels Western-Blot Analyse	49
4.1.2	Nachweis der enzymatischen Funktionalität der <i>IDH1</i> -R132H-Mutation mittels Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (GC-MS)	49
4.1.3	Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels Durchflusszytometrie	50
<b>4.2</b>	<b>Zytostatikabehandlung der <i>IDH1</i>-Wildtyp- bzw. <i>IDH1</i>-R132H-transfizierten Glioblastomzellen</b>	<b>51</b>
4.2.1	Wachstumsrate der parentalen und transfizierten Glioblastomzellen	51
4.2.2	Empfindlichkeit der <i>IDH1</i> -Wildtyp- und <i>IDH1</i> -R132H-transfizierten Glioblastomzellen auf die Zytostatika MMS, CCNU und Doxorubizin	53
4.2.3	Empfindlichkeit der transfizierten Glioblastomzellen gegenüber hochdosiertem MMS	54
4.2.4	Vergleich der Sensibilität der <i>IDH1</i> -Wildtyp- oder <i>IDH1</i> -R132H-transfizierten Zellen der Zelllinie U-87 MG auf eine zehntägige Behandlung mit TMZ oder MMS	56
4.2.5	Vergleich der ALKBH2-mRNA und der ALKBH2-Protein Expression in <i>IDH1</i> -Wildtyp- oder <i>IDH1</i> -R132H-transfizierten Glioblastomzellen nach der Behandlung mit verschiedenen Zytostatika	56
4.2.6	Expression von $\gamma$ -H2AX und ALKBH2 nach Behandlung der <i>IDH1</i> -Wildtyp- bzw. <i>IDH1</i> -R132H-transfizierten Glioblastomzelllinien mit hochkonzentriertem Methylmethansulfonat	58

4.2.7	Phosphorylierung von $\gamma$ -H2AX nach Behandlung mit hochkonzentriertem MMS und verschiedenen Erholungszeiten in der transfizierten Zelllinie U-87 MG	60
4.2.8	Bestimmung der <i>MGMT</i> -Promotormethylierung in mit <i>IDH1</i> -Wildtyp- oder <i>IDH1</i> -R132H-transfizierten sowie parentalen Glioblastomzellen mittels methylierungsspezifischer PCR	61
4.2.9	Bestimmung der <i>MGMT</i> -Promotormethylierung von <i>IDH1</i> -Wildtyp- oder <i>IDH1</i> -R132H-transfizierten sowie parentalen Glioblastomzellen mittels Pyrosequenzierung	62
<b>4.3</b>	<b>Ansprechen der transfizierten Zelllinie LN-18 auf MMS-Behandlung in Abhängigkeit zur <i>MGMT</i>-Expression</b>	<b>64</b>
<b>4.4</b>	<b>Bestimmung der ALKBH2 und <i>MGMT</i> mRNA-Expression in diffusen Gliomen</b>	<b>65</b>
4.4.1	ALKBH2 mRNA-Expression in diffusen Gliomen	65
4.4.2	<i>MGMT</i> mRNA-Expression in diffusen Gliomen	66
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>67</b>
<b>5.1</b>	<b>Aktivität des Enzyms ALKBH2 in Glioblastomzellen mit <i>IDH1</i>-Mutation</b>	<b>67</b>
5.1.1	Regulatorischen Kompensationsmechanismen in Zellmodellen und Tumorgewebe	68
<b>5.2</b>	<b>Rolle der <i>MGMT</i>-Promotor-Hypermethylierung in Glioblastomzellen mit <i>IDH1</i>-R132H-Mutation</b>	<b>69</b>
<b>5.3</b>	<b>Rolle des <i>TP53</i>-Status für Regulierung der Expression von ALKBH2 in Glioblastomzellen</b>	<b>70</b>
<b>5.4</b>	<b>Mögliche klinische Bedeutungen</b>	<b>72</b>
5.4.1	Gestörte Regulation der ALKBH2-Expression durch Mutationen von <i>TP53</i> in Gliomen	72
5.4.2	Mögliche Relevanz von ALKBH2 in Oligodendrogliomen	72
5.4.3	Mögliche Therapieansätze für Glioblastome mit verminderter ALKBH2-Expression	73
5.4.3.1	Systemische und lokale Chemotherapie von Glioblastomen	73
5.4.3.2	Potenzielle Chemotherapeutika	74
<b>5.5</b>	<b>Schwachpunkte der vorliegenden Dissertationsarbeit</b>	<b>75</b>
<b>5.6</b>	<b>Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen der eigenen Dissertationsarbeit</b>	<b>76</b>
<b>6</b>	<b>Verzeichnisse</b>	<b>79</b>
<b>6.1</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>79</b>
<b>6.2</b>	<b>Verzeichnis der Abbildungen</b>	<b>84</b>
<b>6.3</b>	<b>Verzeichnis der Tabellen</b>	<b>88</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>90</b>
<b>7.1</b>	<b>Zusätzliche Abbildungen zu Abschnitt 4.1.3</b>	<b>90</b>

<b>7.2</b>	<b>Zusätzliche Abbildungen zu Abschnitt 4.2.2</b>	<b>92</b>
<b>7.3</b>	<b>Zusätzliche Abbildungen zu Abschnitt 4.2.8</b>	<b>96</b>
<b><i>Danksagung</i></b>		<b>1</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie und Klassifikation der Gliome

Das Glioblastom ist der häufigste bösartige hirneigene Tumor bei Erwachsenen. Der Tumor wurde mit einer Inzidenz von 3,19 Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohnern im Jahr 2007-2011 in den Vereinigten Staaten von Amerika diagnostiziert [1]. Die einzigen gesicherten ätiologischen Risikofaktoren für die Entstehung eines Glioblastoms sind die Exposition gegenüber ionisierenden Strahlen sowie seltene Erbkrankheiten wie das Li-Fraumeni-Syndrom und das Turcot-Syndrom [2]. Aufgrund des sehr aggressiven und infiltrativen Wachstumsmusters haben Patienten mit einem Glioblastom selbst bei optimaler Therapie eine ungünstige Prognose, d.h. das mediane Überleben der Patienten liegt im Bereich von lediglich 12 – 16 Monaten nach Diagnosestellung. Insgesamt überleben je nach Studie weniger als 5 % der Patienten mehr als 5 Jahre nach Diagnosestellung [3], [4].

Klinisch fallen Patienten mit einem Glioblastom durch verschiedene Symptome auf, darunter insbesondere Kopfschmerzen, neu auftretende epileptische Anfälle, fokale neurologische Ausfälle und/oder Persönlichkeitsveränderung [5]. Die Symptome sind abhängig von der Tumorlokalisation und der Ausprägung eines perifokalen Ödems, welches als Reaktion des umliegenden Gehirnparenchyms auf den Tumor entsteht und zu einer Kompression strukturell angrenzender Gewebe führen kann.

Glioblastome wurden lange Zeit in primäre und sekundäre Glioblastome unterteilt [6]. Primäre Glioblastome entwickeln sich *de novo* direkt aus neuroepithelialen Stamm- und/oder -Vorläuferzellen und treten meist im Alter zwischen 50 und 70 Jahren auf. Sekundäre Glioblastome entstehen aus diffusen astrozytären Gliomen von niedrigerem Malignitätsgrad durch progressive Malignisierung. Der Altersgipfel liegt bei ca. 40 Jahren. Bis 2016 wurden Gliome hauptsächlich nach ihrem histologischen Phänotyp in Astrozytome, Oligoastrozytome und Oligodendrogliome eingeteilt und es wird ein sogenanntes *Grading* durchgeführt. Diffuse Astrozytome (WHO-Grad II) zeigen eine erhöhte Zelldichte verglichen mit normalem zentralnervösem Gewebe. Bei anaplastischen Astrozytomen (WHO-Grad III) ist die Zelldichte weiter erhöht. Zusätzlich zeigen die Tumorzellen eine vermehrte Zell- und Kernpleomorphie, d.h. das Erscheinungsbild der Zellen ist heterogener. Auch ist die mitotische und proliferative Aktivität höher als bei diffusen Astrozytomen. Glioblastome, die grundsätzlich dem WHO-Grad IV entsprechen, zeigen zusätzlich zu diesen Veränderungen, die zudem stärker ausgeprägt sind als bei den WHO-Grad II- und WHO-Grad III-Tumoren, pathologische glomerulum- und girlandenförmige

Gefäßproliferate und Tumorgewebsnekrosen. Letztere können sowohl flächenhaft als auch strichförmig sein [7].

Durch neue Methoden zur Analyse epigenetischer sowie molekulargenetischer Alterationen von Gliomen, wie z.B. die Bestimmung der DNA-Methylierungsprofile sowie der *Next-Generation-Sequenzierung*, konnten neue molekulare Biomarker gefunden werden, durch deren Bestimmung die Klassifikation von Gliomen verbessert werden konnte und die deshalb Eingang in die aktuelle WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems gefunden haben [7] [8]. In der aktuellen WHO-Klassifikation werden Gliome daher sowohl nach ihrem Phänotyp als auch nach ihrem Genotyp eingeteilt, wobei sich abzeichnet, dass letzteres für die Prognose und Behandlung der Patienten von größerer Bedeutung ist [9] [10]. Oligodendrogliome zum Beispiel weisen genetisch eine *IDH1*- oder deutlich seltener eine *IDH2*-Mutation auf, außerdem einen durch eine unbalanzierte Translokation (t (1;19) (q10; p10)) entstehenden kombinierten Verlust des kurzen Armes von Chromosom 1 und des langen Armes von Chromosom 19. Diffuse Astrozytome weisen dagegen eine *IDH1*- oder *IDH2*-Mutation sowie einen Verlust der nukleären Expression von ATRX, aber keine Kodeletion von 1p und 19q auf und werden nach histologischen Kriterien in diffuse Astrozytome, *IDH*-mutiert (WHO-Grad II) und anaplastische Astrozytome, *IDH*-mutiert (WHO-Grad III) unterteilt [11].

Die Diagnose Oligoastrozytom sollte nach den aktuellen Kriterien insgesamt nur noch gestellt werden, wenn molekulargenetische Analysen nicht aufschlussreich waren und somit eine genaue Einteilung nicht möglich ist [12] [13]. Zudem kristallisieren sich bei der Analyse der Genotypen Mutationsmuster heraus, die Aufschluss über eine unterschiedliche Karzinogenese der verschiedenen Entitäten der Gliome geben [14].

## 1.2 Charakteristische molekulargenetische Alterationsmuster in Gliomen

Die Karzinogenese ist ein sehr komplexer und teilweise noch nicht verstandener Prozess. In der gängigsten Theorie der Karzinogenese wird angenommen, dass für die Entstehung einer Tumorzelle eine Akkumulation von Mutationen in Tumorsuppressorgenen und/oder Proto-Onkogenen notwendig ist [15]. Bei Tumorsuppressorgenen handelt es sich um Gene, welche einer Tumorentstehung entgegenwirken. Typischerweise sind Mutationen in beiden Allelen des Genes notwendig, um den Phänotyp zu beeinflussen [16]. Tumorsuppressorgene lassen sich nach ihrer Funktion in die drei verschiedenen Hauptgruppen *Caretaker*-Gene, *Gatekeeper*-Gene [17] [16] und *Landscape*-Gene [18] einteilen. *Caretaker*-Gene kodieren Proteine, welche bei der Stabilisierung des Genoms eine Rolle spielen. Wichtige Vertreter dieser Gruppe sind DNA-Reparatur-Enzyme (siehe Abschnitt 1.5). *Gatekeeper*-Gene kodieren Proteine, die für eine Balance von Zellproliferation und Zelltod sorgen und typischerweise gewebspezifisch sind. *Landscape*-Gene sind Tumorsuppressorgene, bei welchen

Mutationen zur Bildung einer sogenannten Tumor-Mikroumgebung führen. Die Tumor-Mikroumgebung fördert das Tumorstadium, z.B. durch Gefäßbildung. Einige Gene kodieren für multifunktionale Proteine und fungieren sowohl als *Gatekeeper*-Gene als auch als *Caretaker*-Gene. Hierzu zählt zum Beispiel das Tumorprotein p53 [19].

Das Gegenstück zu Tumorsuppressorgenen bilden Proto-Onkogene. Meist führt bereits eine einzige Mutation in diesen Genen zu einer Verstärkung der Aktivität der von ihnen kodierten Proteine. Diese wiederum fördern die Karzinogene, z.B. durch eine verstärkte Stimulation der Zellproliferation [20].

Bei der malignen Transformation und Progression von glialen Zellen sind multiple onkogene Signalwege identifiziert worden, welche ebenfalls einen Einfluss auf die Prognose und Therapie nehmen. Zu den klassischen Signalwegveränderungen in Gliomen, welche in Bezug auf die hier vorgelegten Experimente besonders relevant sind, zählen Mutationen in DNA-Reparaturenzymen (*Caretaker*-Gene) und Mutationen von *TP53* (*Caretaker*-Gene sowie *Gatekeeper*-Gene), wobei insbesondere die *Caretaker*-Funktion von *TP53* als Rekrutierer von Reparaturenzymen eine wesentliche Rolle spielt [21].

### **1.3 Relevante prognostische und prädiktive Marker bei Gliomen**

Patienten, die an einem Glioblastom erkrankt sind, erhalten wenn möglich eine multimodale Therapie, welche die neurochirurgische Tumoresektion und die adjuvante Radiochemotherapie umfassen. Eine vollständige Resektion des Tumorgewebes ist wegen eines sehr infiltrativen Tumorstadiums meistens nicht möglich. Aus diesem Grund hat die adjuvante Radiochemotherapie zur Verlängerung des rezidivfreien Intervalls und der absoluten Überlebenszeit einen besonderen Stellenwert [22]. Ein Hauptproblem der Radiochemotherapie ist die häufige Resistenzbildung der Tumorzellen während der Behandlung [23].

#### **1.3.1 Bedeutung der Hypermethylierung des *MGMT*-Promotors**

Die Standardtherapie für Patienten mit einem neu diagnostizierten Glioblastom erfolgt nach weitestmöglicher neurochirurgischer Resektion des Tumors entsprechend dem sogenannten Stupp-Protokoll [24]. Dieses Protokoll umfasst eine sechs Wochen dauernde Radiochemotherapie bestehend aus einer Strahlentherapie mit insgesamt 60 Gy (über 6 Wochen an 5 Tagen mit jeweils 2 Gy) und einer Chemotherapie mit Temozolomid (75 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche für 7 Tage pro Woche) während der gesamten Dauer der Strahlentherapie. Diese Radiochemotherapie wird dann von 6 Zyklen Chemotherapie mit Temozolomid gefolgt (150 bis 200 mg/ m<sup>2</sup> Körperoberfläche für fünf Tage alle 28 Tage). Bei Temozolomid handelt es sich um ein DNA-alkylierendes Chemotherapeutikum, welches hauptsächlich durch Methylierung von Guanin an Position O<sup>6</sup> und N<sup>7</sup> zelltoxisch wirkt [25].

Körperzellen werden vor der kanzerogenen Eigenschaft von Temozolomid durch das Enzym O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) geschützt. Hierbei handelt es sich um ein DNA-Reparaturenzym, das Alkyl-Gruppen von der O<sup>6</sup>-Position des Guanins entfernen kann. In Glioblastomzellen führt eine erhöhte Expression des Reparaturenzyms MGMT zu einer Resistenzbildung der Zellen gegenüber Temozolomid [26]. Bei vielen Tumorarten wurde eine Hypermethylierung der Promotorregion des *MGMT*-Gens gefunden [25]. Die Hypermethylierung der Promotorregion verändert die Chromatinstruktur, so dass die Bindungsfähigkeit von Transkriptionsfaktoren behindert wird und die Gentranskription nicht mehr oder nur vermindert erfolgen kann, ein Mechanismus der auch als *epigenetic gene silencing* bezeichnet wird [27], [28].

Beim Glioblastom besitzt die Hypermethylierung des *MGMT*-Promotors einen hohen Stellenwert als prognostischer und prädiktiver Marker und wird daher in der klinischen Praxis standardmäßig in den Tumorzellen bestimmt. Liegt eine Hypermethylierung des *MGMT*-Promotors in den Tumorzellen vor und erhält der Patient eine adjuvante Radiochemotherapie, lebt er durchschnittlich 6 Monate länger als ein Patient, der an einem Glioblastom ohne eine Hypermethylierung des *MGMT*-Promotors erkrankt ist [29]. Die Hypermethylierung des *MGMT*-Promotors spielt zudem eine wichtige Rolle als prädiktiver Marker bei der Therapiewahl von älteren Patienten mit einem Glioblastom. Bei dieser Patientengruppe profitieren nur solche von einer Chemotherapie bei denen die Tumorzellen eine Hypermethylierung des *MGMT*-Promotors aufweisen [30], [31]. In der aktuell publizierte NOA-09-Studie kristallisierte sich heraus, dass Glioblastompatienten, deren Tumoren eine *MGMT*-Promotor-Hypermethylierung aufweisen von einer intensivierten Chemotherapie mit der ebenfalls alkylierenden Substanz CCNU in Kombination mit Temozolomid profitieren [32].

### 1.3.2 Stellenwert der *IDH*-Mutation

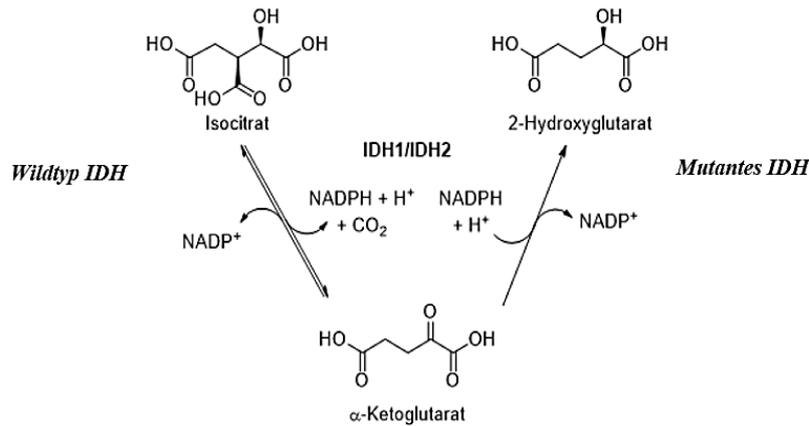
Im Rahmen einer genomweiten Mutationsanalyse in 22 Glioblastomen identifizierten Parsons und Kollegen [33] im Jahr 2008 in rund 12 % der Glioblastome somatische Mutationen in dem für die Isocitrat-Dehydrogenase 1 (*IDH1*) kodierenden Gen. Diese Mutationen in *IDH1* wurden in 83 % der sekundären Glioblastome nachgewiesen. Im Gegensatz dazu zeigten nur ca. 7 % der primären Glioblastome eine *IDH1*-Mutation. Patienten mit *IDH1*-mutierten Glioblastomen waren durchschnittlich jünger als Patienten, deren Tumoren keine *IDH1*-Mutation aufwiesen, und hatten zudem eine bessere Prognose (3,8 Jahre versus 1,1 Jahre Gesamtüberleben) [34]. Die Autoren konnten außerdem nachweisen, dass Mutationen in *IDH1* überzufällig häufig mit Mutationen in *TP53* assoziiert vorkommen. Da bekannt ist, dass Patienten mit einem Glioblastom mit einer Mutation in *TP53* ebenfalls eine bessere Prognose haben, wurden Patienten mit Glioblastom mit oder ohne Mutation in *TP53* separat analysiert und die Überlebenszeiten von Patienten mit Tumoren mit *IDH1*-Mutation verglichen. Dabei

zeigte sich, dass Patienten mit einer *IDH1*-Mutation ohne *TP53*-Mutation ebenfalls länger überlebten. Diese Daten legen nahe, dass die *IDH1*-Mutation einen unabhängigen Prognosefaktor darstellt [33].

In einer nachfolgenden Studie wurden 445 Tumoren des zentralen Nervensystems auf Mutationen in den *IDH1*- und *IDH2*-Genen untersucht [35]. Insgesamt zeigte sich, dass Mutationen in *IDH1* und dessen Homolog *IDH2* ausschließlich in diffusen Gliomen nachweisbar waren, und hier vor allem in den diffusen Gliomen der WHO-Grade II und III. Mutationen in *IDH1* (95% aller Mutationen) waren deutlich häufiger nachweisbar als Mutationen in *IDH2* (5% aller Mutationen) und die mit weitem Abstand häufigste Mutation in *IDH1* war ein Austausch der Base Guanin zu Adenin an Position c.395, was auf Proteinebene in einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Histidin resultiert (p.R132H). Eine weitere interessante Beobachtung ergab sich aus diesen Untersuchungen: die Mutationen waren immer heterozygot, d.h. es war in den mutanten Tumoren immer ein mutiertes sowie ein nicht-mutiertes (Wildtyp) Allel nachweisbar.

In humanen Zellen finden sich drei verschiedene Isozyme der Isocitratdehydrogenase: IDH1, IDH2 und IDH3. Bei den Enzymen IDH1 und IDH2 handelt es sich jeweils um NADP<sup>+</sup>-abhängige Homodimere, die Isocitrat in alpha-Ketoglutarat ( $\alpha$ -KG) umwandeln und dabei NADP<sup>+</sup> zu NADPH reduzieren [36]. IDH1 ist vor allem im Zytoplasma und in den Peroxisomen lokalisiert, während IDH2 in den Mitochondrien nachweisbar ist. Im Gegensatz zu IDH1 und IDH2 handelt es sich bei IDH3 um ein Schlüsselenzym des Zitratzyklus, welches als Heterotetramer in den Mitochondrien lokalisiert ist und zwar ebenfalls Isocitrat in  $\alpha$ -KG umwandelt, hierbei aber NAD<sup>+</sup> zu NADH reduziert [37].

Wie bereits ausgeführt, katalysieren IDH1 und IDH2 die NADP<sup>+</sup>-abhängige Umwandlung von Isocitrat in  $\alpha$ -KG. Hierbei kommt es zu der oxidativen Abspaltung von CO<sub>2</sub> von Isocitrat. Diese Reaktion ist prinzipiell reversibel. Für die R132H-Mutation in *IDH1* konnte gezeigt werden, dass es zu einer funktionellen Veränderung des aktiven Zentrums der IDH1 kommt, die sich durch eine höhere Affinität zu NADPH und eine schwächere Bindungsaffinität zu Isocitrat auszeichnet [38]. Insgesamt führt die Mutation zu einer signifikant verringerten oxidativen decarboxylierenden Enzymaktivität. Gleichzeitig führt die R132H-Reaktion dazu, dass die IDH1 eine partiell inverse Reaktion katalysiert, bei der  $\alpha$ -KG reduziert, aber nicht carboxyliert wird, so dass D-2-Hydroxyglutarat (D-2HG) entsteht [38]. Die Menge des akkumulierten D-2HG scheint mit der Gesamtüberlebenszeit der Patienten zu korrelieren [39].



**Abb. 1: Enzymatische Funktionen von Wildtyp-IDH1 und mutiertem IDH1 (modifiziert nach Hanumantha Rao Madala et al. [40]).**

Neben seiner Bedeutung im Zitratzyklus handelt es sich bei  $\alpha$ -KG um einen wichtigen Kofaktor von mehr als 70 Enzymen. Durch die Akkumulation von D-2HG in *IDH*-mutierten Zellen kommt es möglicherweise zur kompetitiven Inhibition dieser Enzyme, wodurch der Zellstoffwechsel verändert wird und es ggf. zu einer malignen Transformation kommt. Für *IDH*-mutierte Zellen konnte bereits bei einigen  $\alpha$ -KG-abhängigen Enzymen eine Dysfunktion nachgewiesen werden. Besondere Bedeutung wird der Inhibition der Enzyme TET-Hydroxylase und verschiedener Histondemethylasen durch D-2HG beigemessen [40]. So führt die Dysfunktion der TET2-Hydroxylase in vielen Loci des Tumorgenoms zu einer Hypermethylierung der DNA, wodurch das Genom der Zellen epigenetisch verändert wird und es zu einer aberranten Genexpression kommt. Die Inhibition multipler Histondemethylasen in *IDH*-mutanten Gliomen führt zu einer Hypermethylierung verschiedener Histone. Es konnte gezeigt werden, dass z.B. die Aktivität der H3K9-Demethylase reduziert wird, was wiederum zu einer Blockade der Zelldifferenzierung führt [41]. Insgesamt wird durch die Dysfunktion der oben genannten Enzyme bereits deutlich, dass *IDH*-Mutationen komplexe Auswirkungen auf Stoffwechsel und Epigenetik der mutierten Zellen haben.

### 1.3.3 2-Gen-Prädiktor aus *MGMT*-Promotor-Hypermethylierung und *IDH*-Mutation

Sekundäre Glioblastome weisen häufig sowohl eine *IDH*-Mutation als auch eine *MGMT*-Promotor-Hypermethylierung auf [42]. Molenaar und Kollegen haben die Frage untersucht, ob eine Kombination aus beiden Markern einen gesonderten prognostischen und therapeutischen Stellenwert hat. Die Autoren konnten in ihrer Studie zeigen, dass Patienten, die an einem Glioblastom erkrankt sind, das sowohl eine *IDH*-Mutation als auch eine *MGMT*-Promotor-Hypermethylierung aufweist, eine signifikant bessere Prognose haben, als Patienten mit einem Glioblastom, das nur einen der beiden Biomarker aufweist [43]. Die Autoren schlugen daher vor, die Kombination von *IDH1*-Mutation und *MGMT*-Promotor-

Hypermethylierung als 2-Gen-Prädiktor zu werten. Wie signifikant der Unterschied der einzelnen Prädiktoren im Vergleich zu der Kombination aus beiden ist, ist allerdings noch schwer zu sagen, weil die Patienten in dieser Studie nicht alle nach dem Standard-Protokoll nach Stupp und Kollegen [44] behandelt wurden. Außerdem haben andere Autoren nachgewiesen, dass eine *MGMT*-Promotor-Hypermethylierung in *IDH*-mutierten Gliomen zwar eine prognostische, jedoch keine prädiktive Bedeutung hinsichtlich des Ansprechens auf eine Chemotherapie mit Temozolomid besitzt [45].

#### **1.4 Stellenwert verschiedener Chemotherapeutika bei der Behandlung des Glioblastoms**

Bei der Behandlung von Glioblastomen spielen insbesondere die Chemotherapie und die Strahlentherapie eine Rolle, da eine kurative Resektion des Tumors trotz neuer Methoden, wie z.B. der Neuronavigation sowie fluoreszenzgestützter Operationstechniken, nicht möglich ist [2], [46]. Der Grund hierfür ist zum einen das invasive Wachstum der Tumoren entlang präformierter, neuroanatomischer Strukturen und zum anderen ein eingeschränktes Resektionsausmaß durch Aussparung von eloquenten Hirnregionen, deren Schädigung zum Tod oder zu starken Behinderungen führen würde. Ein wichtiger Ansatz zur Verbesserung der therapeutischen Effizienz bei der Behandlung von Glioblastomen ist daher eine Optimierung der Chemotherapie, welche unter anderem durch eine Überwindung von Zytostatikaresistenzen erreicht werden kann. Die Resistenzbildung von Tumorzellen gegen Chemotherapeutika ist ein komplexer Prozess, welcher durch sehr unterschiedliche Zelleigenschaften gefördert werden kann. Beispiele hierfür sind zum einen die Beeinflussung der intrazelluläre Zytostatika-Konzentration durch eine vermehrte Expression von Effluxpumpen (z.B. ABC-Transporter) oder eine verminderte Expression von Influxpumpen, zum anderen können in den Tumorzellen Signalwege alteriert sein, die zu einer Verstärkung anti-apoptotischer Signalwege und somit zur Resistenzbildung beitragen [47]. In der vorliegenden Dissertationsarbeit wird eine weitere Möglichkeit der Beeinflussung der Resistenzbildung basierend auf der Hochregulierung von DNA-Reparaturenzymen, wie zum Beispiel der O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase, untersucht. Über diesen Mechanismus werden durch Zytostatika induzierte DNA-Schäden effizienter beseitigt und die zytotoxische Wirkung der Therapie wird gesenkt [48].

Als Standardtherapie des Glioblastoms wird adjuvant zur Radiotherapie das monofunktionale alkylierende Zytostatikum Temozolomid (TMZ) verabreicht. TMZ ist ein Vorläufermedikament, das oral eingenommen und spontan hydrolytisch zu MTIC (= 5-(3-N-Methyltriazin-1-yl) -Imidazol-4-Carboxamid) gespalten wird. MTIC ist ein instabiles Zwischenprodukt, welches in die Substrate AIC (= 5(4) -Aminoimidazol-4(5) -Carboxamid) und Methylhydrazin zerfällt. Methylhydrazin ist der

eigentliche zelltoxische Wirkstoff und führt zur Alkylierung von DNA-Basen [49]. Unter der Behandlung mit TMZ kann es zu einer Thrombozytopenie und Neutropenie kommen, so dass während der Therapie das Blutbild regelmäßig kontrolliert werden muss. Selten wurde als Nebenwirkung auch das Auftreten von Leberschäden bis hin zum Leberversagen beobachtet, so dass die Therapiemöglichkeiten bei erhöhten Leberwerten oder vorgeschädigter Leber eingeschränkt sind.

Als weitere Substanzen für die Chemotherapie von malignen glialen Tumoren können der Nitrosoharnstoff Chlorethyl-Cyclohexyl-Nitroso-Urea (CCNU) und die Kombinationstherapie von Procarbacin, CCNU und Vincristin als sog. PCV-Kombinationstherapie genutzt werden. Die PCV-Kombination wird insbesondere für die Behandlung von *IDH*-mutierten und 1p/19q-kodeletierten anaplastischen Oligodendrogliomen empfohlen, spielt in der Therapie des Glioblastoms aber keine Rolle [50]. Die Gabe von CCNU zusätzlich zu Temozolamid hat zu einer Verlängerung des Überlebens von Patienten mit *MGMT*-Promotor-methylierten Glioblastomen geführt [32].

## **1.5 Durch Alkylanzien induzierte DNA-Schäden und deren Reparaturmechanismen**

Die DNA eines Menschen wird allein durch endogene Ursachen täglich ca. 20.000-mal pro Zelle geschädigt. Diese enorme Zahl macht deutlich, welchen Beitrag DNA-Reparaturmechanismen für die Prävention von Krebsentstehung und die Entwicklung von Anomalitäten sowie die Vorbeugung einer frühzeitigen Zellalterung leisten. Alkylierende Substanzen gehören zu den wichtigsten Ursachen einer DNA-Schädigung. Sie können in niedrigen Konzentrationen während verschiedener metabolischer Prozesse endogen entstehen und sie finden sich auch in Umweltfaktoren wie Nahrung, Luft und Wasser. Deutlich höhere Konzentrationen von alkylierenden Agenzien werden für die Therapie von Tumoren in Form von Zytostatika genutzt [51].

Grundsätzlich bewirken alkylierende Zytostatika, dass die N- oder O-Atome der DNA-Basen durch nukleophile Angriffe der reaktiven Substanzen alkyliert werden. Ca. 80 % der Alkylierungen finden an den N-Atomen der DNA-Basen statt, wobei die Stabilität und Toxizität je nach Position des N-Atoms sehr unterschiedlich ist. Obgleich Alkylierungen von O-Atomen prozentual deutlich seltener auftreten als N-Alkylierungen, spielen sie eine signifikante Rolle bei der Induktion von DNA-Schäden, da sie besonders mutagen und genotoxisch wirken. Hierbei ist insbesondere eine Methylierung der DNA-Base Guanin am O<sup>6</sup>-Atom (O<sup>6</sup>-MeG) schädlich. Insbesondere in Tumoren, die eine Hypermethylierung des *MGMT*-Promotors und somit keine oder eine verringerte Expression des Enzyms *MGMT* aufweisen, können diese Schäden nicht unmittelbar repariert werden. Methylierungen an den N- und O-Atomen der DNA-Basen werden durch unterschiedliche Mechanismen repariert [25].

Alkylierende Zytostatika werden je nachdem, ob sie ausschließlich eine alkylierende Gruppe oder mehrere alkylierende Gruppen transferieren können, in monofunktionale (MMS, Dacarbazin und Temozolomid) oder bifunktionale Alkylanzien (Chlorambuzil, CCNU) eingeteilt [52]. Während die durch monofunktionale Alkylanzien induzierten DNA-Schäden hauptsächlich durch Basenexzisionsreparatur (BER) und durch Reparaturenzyme repariert werden (ausführlichere Beschreibung in Abschnitt 1.5.1), erzeugen polyalkylierende Substanzen Quervernetzungen zwischen DNA-Basen und Proteinen oder zwischen zwei DNA-Basen [51]. Die Reparatur der Quervernetzungen und der daraus resultierenden Schäden ist insgesamt sehr komplex und fehlerträchtig (ausführlichere Beschreibung in Abschnitt 1.5.2).

### **1.5.1 Reparatur von DNA-Schäden, die durch monofunktionale Alkylanzien induziert sind**

Die Reparatur einer monofunktionalen Methylierung an N-Atomen findet hauptsächlich durch die Basenexzisionsreparatur (BER) oder durch Reparaturenzyme statt, welche zu der Familie der sog. "human alkylation repair homologs" (ALKBH) zählen. Eine detaillierte Darstellung der Funktionsweise der Reparaturenzyme ALKBH2 und ALKBH3 findet sich in Abschnitt 1.5.5. Die Entfernung der Methylierung am O<sup>6</sup>-MeG wird vor allem durch das Suizid-Enzym MGMT erreicht. Der genaue Reparaturmechanismus von MGMT wird in Abschnitt 1.5.4 erläutert. Unrepariertes O<sup>6</sup>-MeG kann bei einer Replikation des DNA-Stranges zu einer Fehlpaarung der komplementären Basen führen und durch die DNA-Polymerase und die Mismatch-Reparaturenzym-Proteine (MMR-Proteine) erkannt werden, so dass die falsche Base herausgeschnitten werden kann [53]. Falls O<sup>6</sup>-MeG auch bei der Replikation persistiert, kommt es zum Doppelstrangbruch (DSB), wodurch Doppelstrangbruch-Reparaturwege eingeleitet werden. Letztere können grob in homologe und nicht-homologe Reparatur unterteilt werden. Als Backup-Reparatursystem der N- und O-Methylierungen kann die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) angesehen werden. Hierbei werden sog. "bulky lesions", also Stellen, bei denen die Helixstruktur der DNA gestört ist, erkannt. Anschließend wird an dieser Stelle ein 25-30 Basen langer DNA-Abschnitt herausgeschnitten und neu synthetisiert [54].

### **1.5.2 Reparatur von DNA-Schäden, die durch bifunktionale Alkylanzien induziert sind**

Die Reparaturmechanismen, die bei durch bifunktionale Alkylanzien induzierten DNA-Schäden eingeleitet werden, können entsprechend einer Übersichtsarbeit von Räschle und Kollegen [55] wie folgt kurz beschrieben werden: Bifunktionale Alkylanzien wie Nitrosoharnstoffe (z.B. CCNU) besitzen zwei oder mehr funktionelle Gruppen. Diese Substanzengruppe erzeugt Quervernetzungen zwischen DNA-Basen und Proteinen oder zwischen zwei DNA-Basen. Die DNA-Basen können hierbei entweder innerhalb desselben, die sog. *intrastrand cross-links*, oder innerhalb des komplementären DNA-Stranges, sog. *interstrand crosslinks* (ICLs) vernetzt werden. Während *intrastrand crosslinks* teilweise von DNA-Polymerasen behoben werden können, sind ICLs irreversibel. ICLs haben zur Folge, dass

eine Separation der DNA-Stränge nicht mehr möglich ist, wodurch essenzielle Vorgänge wie die Transkription und Replikation nicht mehr stattfinden können. ICLs sind aus diesem Grund äußerst zelltoxisch. Die Reparaturmechanismen für *Crosslinks* sind sehr komplex und im Vergleich zur Beseitigung von anderen DNA-Schäden noch wenig erforscht. Die Reparatur der ICLs beginnt mit der Markierung der an die ICLs angrenzenden DNA durch ubiquitinierte Proteine. Anschließend kommt es zur Rekrutierung von Nukleasen. Es wird angenommen, dass diese Nukleasen die DNA an den durch Proteine markierten Bereichen spalten. Durch eine Blockade des Replisoms durch die ICLs kann die DNA-Polymerase III den Folgestrang nicht weiter synthetisieren. Diese Aufgabe übernimmt stattdessen die DNA-Polymerase IV, die ein Teil der Translesionssynthese ist und bei Schadentoleranzmechanismen eine Rolle spielt. Die Reparatur des Doppelstrangbruchs erfolgt mittels homologer Reparatur [55].

Eine weitere Möglichkeit der Reparatur von Doppelstrangbrüchen ist das sog. non-homologous end-joining (NHEJ). Hierbei bildet sich ein Komplex aus den Proteinen Ku70 und Ku80, welcher an die freien Enden des DSB bindet und dadurch die DNA vor dem Abbau durch Exonukleasen schützt. Anschließend findet die Reparatur des Bruchs durch den XRCC4-DNA-Ligase IV-Komplex statt. Eine Reparatur durch NHEJ ist deutlich fehleranfälliger als die homologe Reparatur, so dass es zu kleinen Deletionen oder Insertionen kommen kann [56], [57].

### 1.5.3 Basen-Exzisionsreparatur (BER)

Bei der Basenexzisionsreparatur werden desaminierende, oxidierende und alkylierende Schäden an einzelnen Basen der DNA behoben. Es gibt zwei unterschiedliche Basenexzisionsmechanismen, die *short-patch*-BER, welche deutlich häufiger abläuft, und die *long-patch*-BER [58]. Das Grundprinzip beider Mechanismen ist die Erkennung und Entfernung von fehlerhaften Basen durch spezifische DNA-Glykosylasen, wodurch ein abasischer DNA-Abschnitt entsteht. An dem abasischen DNA-Abschnitt wird durch die apurinische/apyrimidische Endonuklease 1 (APE1) ein Einzelstrangbruch im Zucker-Phosphat-Gerüst erzeugt. Beim *short-patch*-BER synthetisiert die DNA-Polymerase  $\beta$  die passende Base, indem sie den komplementären fehlerfreien DNA-Strang als Matrize nimmt. Für diese Prozesse benötigt die DNA-Polymerase ein freies 5-Phosphatende, welches sie selbst durch die Entfernung des 5-Desoxyribosephosphat-Restes (5'-dRP) am abasischen DNA-Abschnitt erzeugt. Kann die Polymerase kein freies 5-Phosphatende auf Grund z.B. einer Oxidierung der 5'-dRP-Gruppe erzeugen, wird der *long-patch*-BER-Mechanismus eingeleitet. Beim *long-patch*-BER-Mechanismus sind deutlich mehr Proteine involviert. Im Prinzip synthetisiert eine Polymerase (entweder  $\beta$ ,  $\delta$  oder  $\epsilon$ ) einen um 2-20 Nukleotide längeren DNA-Strang, der zur Verdrängung des alten Stranges führt. Durch eine Endonuklease wird der verdrängte DNA-Strang abgeschnitten. Anschließend erfolgt bei beiden BER-Mechanismen der Verschluss des Einzelstrangbruchs durch eine Ligase.

In der vorliegenden Arbeit wird insbesondere die spezifische Rolle der BER bezogen auf durch Zytostatika induzierte alkylierende DNA-Schäden beleuchtet. Bei alkylierenden DNA-Addukten werden Schäden am N<sup>7</sup>-MeG, N<sup>3</sup>-MeA und N<sup>3</sup>-MeG durch die BER repariert (siehe Tabelle 1). N<sup>7</sup>-MeG ist unter diesen Addukten das stabilste und besitzt eine Halbwertszeit von 40-80 h [59].

#### **1.5.4 O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)**

Das Enzym MGMT ist von außerordentlicher Relevanz für die Prognose und Therapie von Patienten mit Glioblastom (siehe Abschnitt 1.3.1). MGMT entfernt die O<sup>6</sup>-Methylierung am Guanin (O<sup>6</sup>-MeG) oder die seltener vorkommende O<sup>4</sup>-Methylierung am Thymin, indem es die Alkylgruppe vom Sauerstoffatom der DNA auf die Aminosäure Cystein im aktiven Zentrum des Enzyms irreversibel transferiert [60]. MGMT kann auch DNA-Schäden beheben, welche durch chloroethylierende Substanzen wie CCNU verursacht sind [61]. Da MGMT nach dem Transfer der Alkylgruppe enzymatisch inaktiviert ist, und nicht wieder in den nicht-alkylierten Zustand überführt werden kann, ist es ein Suizidenzym. Entsprechend ist die Möglichkeit einer Zelle, die Methylierung an O<sup>6</sup>-MeG zu entfernen, abhängig von der Gesamtmenge an MGMT-Enzym und der Geschwindigkeit, dieses neu zu synthetisieren. Erfolgt keine Reparatur des O<sup>6</sup>-MeG durch MGMT, so kommt es bei der Replikation der DNA zum Einbau der nicht komplementären Base Thymin, was als Mismatch bezeichnet wird. Daraufhin wird die Reparatur der Mismatchbasen über Mismatch-Reparaturproteine eingeleitet. Die Mismatch-Reparatur (MMR) führt letztlich zu Doppelstrangbrüchen, was eine Apoptose der Zelle oder Genschäden zur Folge hat.

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass eine MGMT-Dysfunktion die Tumorentstehung in unterschiedlichen Geweben, wie z.B. Pankreas, Leber, Gehirn und Ovar, fördert [62]. Beim Glioblastom führt typischerweise eine Hypermethylierung des Promotors zu einer verminderten Expression des Proteins und damit zu einer verminderten Reparaturaktivität (siehe Abschnitt 1.3.1).

In anderen Studien wurde untersucht, inwieweit der prozentuale Anteil an CpG-Methylierungen im *MGMT*-Promotor mit der Expression des Gens korreliert. Es wurde festgestellt, dass es nicht möglich ist, eine konkrete Aussage zu treffen, ab welchem prozentualen Anteil an CpG-Methylierungen eine MGMT-Expression nicht mehr stattfindet. Grund hierfür ist wahrscheinlich, dass bestimmte CpG-Methylierungen eine stärkere Auswirkung auf die Expression des *MGMT*-Gens haben als andere [28]. Dennoch wird bei zunehmender CpG-Methylierung des Promotors eine Reduktion der MGMT-Expression wahrscheinlicher.

In einer retrospektiven Studie von Radke und Kollegen wurde gezeigt, dass Patienten mit einer starken Hypermethylierung des *MGMT*-Promotors in *IDH1*-Wildtyp Glioblastomen circa 1 Jahr länger leben als Patienten mit einem geringeren Methylierungsstatus [63].

### 1.5.5 Reparaturenzyme ALKBH2 und ALKBH3

Die Enzyme ALKBH2 und ALKBH3 reparieren durch oxidative Demethylierung die DNA-Schäden 1-Methyladenin (1-MeA) und 3-Methylcytosin (3-MeC), die z.B. durch alkylierende Substanzen wie Temozolomid verursacht werden [64]. ALKBH2 und ALKBH3 fungieren hierbei als  $\alpha$ -Ketoglutarat- und F(II)-abhängige Dioxygenasen und oxidieren die relevanten Methylgruppen der DNA-Basen, so dass die Methylgruppen als Formaldehyd freigesetzt werden [65]. Die beiden Reparaturenzyme ALKBH2 und ALKBH3 unterscheiden sich in mehreren Aspekten. ALKBH2 repariert bevorzugt Schäden an Doppelstrang-DNA (dsDNA) während der S-Phase von proliferierenden Zellen. Zusätzlich repariert das Enzym Schäden an Einzelstrang-DNA (ssDNA). ALKBH3 repariert Schäden an ssDNA, bevorzugt während der Replikation und entfernt zusätzlich 1-MeA- und 1-MeC-Schäden an RNA [66],[67]. In einer Studie von Cetica et al. [68] wurde gezeigt, dass bei pädiatrischen Glioblastomen und Medulloblastomen während der Zytostatikatherapie eine Hochregulation insbesondere von ALKBH2, aber auch von ALKBH3 stattfindet. In diesen pädiatrischen Hirntumoren wurden auch mehrere Mutationen in *ALKBH2* und *ALKBH3* entdeckt und analysiert. In einer experimentellen Studie von Johannessen et al. [69] wurde gezeigt, dass bei Glioblastomzellen, die eine Hypermethylierung des *MGMT*-Promotors aufweisen, eine Herunterregulierung des Enzyms ALKBH2 durch siRNA zu einer höheren Sensibilität gegenüber den alkylierenden Zytostatika MMS und TMZ führt.

Li et al. [70] berichteten 2013, dass ein *Knockdown* des Enzyms ALKBH2 zur gehäuften Bildung von Einzelstrangbrüchen (SSBs) und Doppelstrangbrüchen (DSBs) führt. Durch das Fehlen von ALKBH2 werden die DNA-Schäden vermehrt von alternativen Reparaturmechanismen, insbesondere der BER, behoben. Als Maßstab für den Anteil an DSBs diente in der Arbeit von Li et al. [70], wie auch in der vorliegenden Dissertationsarbeit, die Expression des Proteins  $\gamma$ -H2AX (siehe Abschnitt 1.5.6).

ALKBH2 ist, anders als ALKBH3 als prognostischer Marke in Nierenzellkarzinom, Brustkrebs und Urothelkarzinom bereits etabliert [71], [72] und es wurde nachgewiesen, dass ALKBH2 primär die oxidativen DNA-Schäden 1meA und 3meC repariert [70], [73]. In Gehirngewebe ist ALKBH2 höher exprimiert als ALKBH3 [74] und seine Rolle für die Resistenzentwicklung von Hirntumoren gegenüber alkylierenden Zytostatika ist besser untersucht [69]. Aus diesen Gründen konzentriert sich die vorliegende Dissertationsarbeit auf die detaillierte Untersuchung der Funktionalität des Enzyms ALKBH2 in *IDH1*-mutierten Zellen. Interessant für die vorliegende Dissertationsarbeit waren zudem die Erkenntnisse einer Arbeit von Tsujikawa et al. [75], in der zwei verschiedene mRNA-Varianten des

Enzyms ALKBH2 neu beschrieben wurden. Bei der ALKBH2-mRNA mit einer Länge von 852 Nukleotiden (nt) handelt es sich um ein Transkript aller Exone des *ALKBH2*-Genes, welches entsprechend den Daten aus der “*Universal protein database*“ (UniProt) für ein Protein mit 261 Aminosäuren kodiert, das eine Masse von 29,322 Da besitzt ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org); RefSeq Zugangsnummer: XP\_003832559; 261 Aminosäuren; 29,322 Da). Im Gegensatz hierzu liegt bei der ALKBH2-mRNA mit einer Länge von 577 nt ein Verlust des Exons 3 vor, weswegen diese Isoform nur für ein Protein mit 157 Aminosäuren kodiert, das eine Masse von 17,064 Da aufweist ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org); RefSeq Zugangsnummer: [XP\\_008956192.1](http://www.uniprot.org) und [XM\\_008957944.1](http://www.uniprot.org); 157 aa Aminosäuren, 17,064 Da). Im Exon 3 befindet sich unter anderem die 2-Oxoglutarat-abhängige Oxygenase-Domäne. Die ALKBH2-mRNA mit 852 nt Länge wurde nachfolgend als ALKBH2-mRNA-Variante I und die mit 577 nt Länge als ALKBH2-mRNA-Variante II bezeichnet.

### **1.5.6 Bedeutung des Proteins $\gamma$ -H2AX als Marker für DNA-Doppelstrangbrüche**

$\gamma$ -H2AX ist ein wichtiger Marker für DNA-Doppelstrangbrüche und korreliert mit deren Anzahl [76], [77]. Eine der ersten Zellantworten auf einen Doppelstrangbruch der DNA besteht unter anderem in der Bildung von mehreren hundert bis tausend  $\gamma$ -H2AX-Molekülen durch Phosphorylierung der Histone H2AX an Ser139 [61], [78]. Die H2AX Proteine akkumulieren zu sog.  $\gamma$ -H2AX-Foci, welche wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Reparaturfaktoren spielen [78]. ALKBH2 repariert Doppelstrangbrüche. In der Arbeit von Pishun Li und Kollegen konnte gezeigt werden, dass ein Knockdown von ALKBH2 zu einem signifikanten Anstieg der DSB nach Behandlung mit MMS führt [70]. Dementsprechend lässt sich anhand des Anstieges von  $\gamma$ -H2AX als Marker für DSB indirekt auf die Aktivität und Funktionalität von ALKBH2 schließen.

## **1.6 Übersicht der verwendeten Zytostatika mit den jeweils dazugehörigen Reparaturmechanismen**

In Tabelle 1 werden die in der vorliegenden Dissertationsarbeit verwendeten Zytostatika aufgelistet. Zudem wurde in einer Literaturrecherche analysiert, welche DNA-Schäden durch die jeweiligen Zytostatika induziert werden und welche Reparaturmechanismen zur Behebung der DNA-Schäden beitragen. ALKBH2 und ALKBH3 spielen als Reparaturenzyme bei DNA-Schäden, welche durch TMZ oder MMS induziert werden, eine Rolle [64].

**Tabelle 1:** Auflistung der verwendeten Zytostatika mit induzierten DNA-Schäden und dazugehörigen Reparaturmechanismen

Zytostatikum	DNA-Schäden	Reparaturmechanismen	Referenzen
Lomustin (CCNU)	<i>Interstrand Crosslinks</i> <i>Intrastrand Crosslinks</i>	MGMT (am häufigsten) <i>Homologous end joining</i> <i>Non-homologous end-joining</i> (selten)	[79], [80], [81]
Doxorubizin (DOX)	Interkalation in die DNA Hemmung der Topoisomerase II. Doppelstrangbrüche	Nukleotid-Exzisionsreparatur <i>Homologous end joining</i>	[82], [83]
Methylmethansulfonat (MMS)	1.N <sup>7</sup> -MeG (82 %) 2.N <sup>3</sup> -MeA (11 %). 3.N <sup>1</sup> -MeA/N <sup>3</sup> -MeC (<5 %) 4.O <sup>6</sup> -MeG (0,3 %)	1. Basen-Exzisionsreparatur 2. Basen-Exzisionsreparatur 3. ALKBH2/ALKBH3 4. MGMT	[84], [85], [84, 86]
Temozolomid (TMZ)	1.N <sup>7</sup> -MeG (70 %) 2.N <sup>3</sup> -MeA (10 %) 3.O <sup>6</sup> -MeG (5-7 %) 4.N <sup>1</sup> -MeA (2,8 %) 5.N <sup>3</sup> -MeC (2,3 %)	1. Basen-Exzisionsreparatur 2. Basen-Exzisionsreparatur 3. MGMT 4. ALKBH2/ALKBH3 5. ALKBH2/ALKBH3	[64], [87]

## 1.7 Ziele der Arbeit

Patienten, die an einem Glioblastom erkranken, haben eine durchschnittliche Überlebenszeit von nur 12-16 Monaten. Ein Grund dafür ist u.a. das nur vorübergehende Ansprechen der Tumoren auf Strahlentherapie und Chemotherapie, letzteres unter anderem aufgrund einer raschen Resistenzbildung der Tumorzellen gegen die verwendeten Chemotherapeutika. Für neue therapeutische Ansätze erscheint ein besseres Verständnis der Faktoren der Resistenzbildung und der Escape-Mechanismen der Tumorzellen unerlässlich. Ein wesentliches Charakteristikum von diffusen Gliomen einschließlich eines Teils der Glioblastome sind *Missense*-Mutation in den Isocitrat-Dehydrogenasen 1 oder 2 (IDH1 oder IDH2). In der vorliegenden Dissertationsarbeit sollten daher die Auswirkungen der Expression von mutiertem *IDH1* (*IDH1*-Mt) auf die Resistenz von Glioblastomzellen gegenüber verschiedenen Zytostatika sowie die Möglichkeiten einer Modifikation der Resistenzbildung untersucht werden. Dazu sollten in verschiedenen Glioblastomzelllinien die Auswirkungen einer stabilen Transfektion von *IDH1*-R132H im Vergleich zu *IDH1*-Wildtyp erfasst werden. Dies erscheint notwendig, weil sich in der Onkologie immer deutlicher abzeichnet, dass für eine adäquate Therapie die spezifischen genetischen Alterationen in den Tumorzellen zu berücksichtigen sind, da diese einen Einfluss auf das Ansprechen des Tumors auf die Therapie haben können. Eine weitere Zielsetzung der Dissertationsarbeit ist die Untersuchung der Aktivität des Reparaturenzyms ALKBH2 in *IDH1*-R132H- im Vergleich zu *IDH1*-Wildtyp-transfizierten Glioblastomzellen. ALKBH2 entfernt  $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängig 1-Methyladenin- und 3-Methylcytosin-Schäden der DNA, welche insbesondere durch die Zytostatika Temozolomid und

Methylmethansulfonat entstehen. Daher sollte untersucht werden, ob der in *IDH1*-R132H-transfizierten Glioblastomzellen gebildete Metabolit 2-Hydroxyglutarat zu einer kompetitiven Hemmung des  $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängigen Reparaturenzyms ALKBH2 führt und somit zu einer geringeren Resistenzbildung der Glioblastomzellen gegenüber Zytostatika beiträgt.

Des Weiteren sollte die Hypothese geprüft werden, ob eine kompetitive Hemmung des Reparaturenzyms ALKBH2 zu einer kompensatorischen Hochregulation von ALKBH2 führt. Hierfür wurde die Transkription und Proteinexpression von ALKBH2 mittels mRNA- und Western-Blot in *IDH1*-R132H- und *IDH1*-Wt-transfizierten Glioblastomzellen nach der Behandlung mit MMS bestimmt und miteinander verglichen.

Alkylierende Zytostatika führen zu multiplen Schäden, so dass mehrere Reparaturmechanismen bei der Behebung der Schäden beteiligt sind und teilweise dadurch auch gleiche Schäden unterschiedlich repariert werden können. In der vorliegenden Dissertationsarbeit sollte daher auch geklärt werden, inwieweit sich die Reparaturenzyme MGMT und ALKBH2 wechselseitig hinsichtlich des Ansprechens von Glioblastomzellen auf DNA-Alkylanzien beeinflussen.

## 2 Material

### 2.1 Nährmedium für die Kultivierung von *E. coli*

Für die Transformation wurden DH5 $\alpha$ -kompetente *E. coli* der Firma Invitrogen verwendet. Für die Herstellung von Agarplatten für die Bakterien wurden 15 g Agar in 1 Liter LB-Medium (siehe Abschnitt 2.3.4) gelöst und anschließend autoklaviert oder aber das LB-Medium wurde für Flüssigkulturen ohne Agar autoklaviert. In das handwarme Nährmedium wurde Kanamycin pipettiert. Für die Kanamycin-Stocklösung wurde Kanamycin in H<sub>2</sub>O in einer Konzentration von 50 mg/ml gelöst und die Stocklösung anschließend durch einen 0,22  $\mu$ m-Filter sterilfiltriert und aliquotiert. Diese Stocklösung wurde für die Experimente 1:1000 in autoklaviertem LB-Medium oder in autoklaviertem LB-Medium mit Agar verdünnt. Für die Agarplatten wurde das so hergestellte Medium sodann auf Petrischalen verteilt, um dort auszuhärten.

## 2.2 Plasmid pIRES2-EGFP

Zur Transfektion humaner Glioblastomzelllinien mit Wildtyp-*IDH1* bzw. mit R132H-mutiertem *IDH1* wurde der pIRES2-EGFP Vektor der Firma Clontech™, USA, benutzt. Beim pIRES2-EGFP-Plasmid wird die gesamte kodierende Sequenz des Proteins, welches man exprimieren möchte, nach Restriktionsenzymverdau mittels Ligation in die Multiple Cloning Site (MCS) eingefügt. Das Plasmid besitzt des Weiteren die komplette interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) des Cytomegalovirus (CMV), welche sich zwischen MCS und der Sequenz für das *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP) befindet und dazu führt, dass sowohl das Insertionsgen als auch EGFP transkribiert werden. Durch die EGFP-Region an Position 1254-1973 ist es möglich, die Transfektionseffizienz mittels Durchflusszytometrie zu bestimmen und die Zellen durch ihre Fluoreszenz-Aktivität zu sortieren. Daneben beinhaltet das Plasmid an Position 3204-3998 eine Kan-/Neo-Kassette, wodurch eine Selektion in Bakterien- und Säugerzellen ermöglicht wird.

## 2.3 Verwendete Labormaterialien

### 2.3.1 Zellkulturmaterialien

Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die verwendeten Materialien für die Zellkultur. Schüttler, Pipetten, Falcon-Röhrchen, Zellkulturplatten und -flaschen sowie weitere nicht in Tabelle 2 gelistete Instrumente und Plastikwaren, waren den wissenschaftlichen Anforderungen entsprechender Laborstandard.

**Tabelle 2:** Zellkulturmaterialien.

Zellkulturmaterial	Bestellnummer	Hersteller
DMEM, high glucose, no glutamine	41965-039	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
DPBS, magnesium	14190169	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
DPBS, no calcium, no magnesium	14190-094	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
DMSO	D5879	Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA
Fetal bovine serum, dialyzed	12346086	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Gibco® Opti-MEM™ Media	31985047	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Lipofectamine® 2000	11668019	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Pen/Strep (10.000 U/ml)	15140-122	<u>Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA</u>
Trypsin-EDTA (0,05 %), phenol red	25300054	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

### 2.3.2 Glioblastomzelllinien

In dieser Arbeit wurden die humanen Glioblastomzelllinien A-172, LN-18, LN-229, T98G, U-87 MG und TP365MG verwendet. Die Zelllinien A-172, T98G und U-87 MG wurden von der Firma “American Type Culture Collection” (ATCC, Manassas, VA, USA) käuflich erworben. Die Zelllinien LN-18 und LN-229 wurden freundlicherweise von Frau Dr. Monika Hegi, Universität Lausanne (Schweiz) und die Zelllinie TP365MG von Herrn Professor V. Peter Collins, Universität Cambridge (UK) zur Verfügung gestellt.

### 2.3.3 Reagenzien und Chemikalien

Die für die eigenen Arbeiten verwendeten Reagenzien und Chemikalien sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

**Tabelle 3:** Reagenzien und Chemikalien.

Reagenz/Chemikalie	Bestellnummer	Hersteller
7-AAD	559925	BD Pharmingen, San Jose, California, USA
Albumin Fraction V	8076.3	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose standard	3810.3	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Benzonase® Nuclease	E1014-25KU	Sigma-Aldrich®, St-Louis, Missouri, USA
β-Mercaptoethanol	M3148-100ML	Sigma-Aldrich®, St-Louis, Missouri, USA
100 bp DNA-Leiter	85-2000-250	Biobudget
3cOmplete ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free, EASYpac	11836170001	Roche GmbH, Grenzach-Wyhlen
CutSmart® Buffer	B7204S	New England BioLabs, Ipswich, MA, USA
DH5α™ Competent Cells	18265017	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
dNTP (2'-desoxynucleotide-5'-triphosphate) Mix	80-85011000	Bio-Budget GmbH, Krefeld
DraIII Restriktionsenzym	R3510S	New England BioLabs, Ipswich, MA, USA
EcoRI Restriktionsenzym	FD0274	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Geneticin®	10131-027	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Hot Star Taq DNA Polymerase	20260	QIAGEN GmbH, Hilden
Isopropanol	6752.5	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
1 kb DNA-Leiter	85-1000-250	Biobudget
Magnesiumchlorid	10005482	QIAGEN GmbH, Hilden
Methanol	CP43,4	Merck KGaA, Darmstadt
Midori Green Advanced DNA Farbstoff	MG04	Nippon Genetics Europe GmbH, Düren
Milchpulver	T145.3	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

MTT	M5655	Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA
NuPage Novex 4-12 % Bis-Tris Protein Gels, 15-Well	NP0336	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
NuPAGE Novex 4-12 % Bis-Tris Protein Gels, 12-Well	NP0335	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
NuPAGE Novex 4-12 % Bis-Tris Protein Gels, 10-Well	NP0322	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PageRuler Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDA	26616	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PhosSTOP™	04906837001	Roche GmbH, Grenach-Wyhlen
pIRES-EGFP Vector	6029-1	Clontech, Kusatsu, Japan
Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix	11744100	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PstI Restriktionsenzym	R0140L	New England BioLabs, Ipswich, MA, USA
PyroMark Gold Q24 Reagents 5x24	970802	QIAGEN GmbH, Hilden
PyroMark Q24 CpG Line-1 4x24	970042	QIAGEN GmbH, Hilden
PyroMark Q24 Vaccum Prep Tool Filter Probes	56404	QIAGEN GmbH, Hilden
PyroMark Annealing Buffer	979009	QIAGEN GmbH, Hilden
PyroMark Binding Buffer	979006	QIAGEN GmbH, Hilden
PyroMark Wash Buffer	979008	QIAGEN GmbH, Hilden
PyroMark Denaturation Solution	979007	QIAGEN GmbH, Hilden
Ribitol	A5502	Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA
Rnase-freies Wasser	AM9937	Applied Biosystems
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	D6750-100G	Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA
SuperScript® II Reverse Transkriptase	18064014	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
TaqMAN MasterMix; 5 ml	4369016	Applied Biosystems
T4 DNA Ligase	EL0014	Fermentas
TRIS (2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol)	9090.3	Carl Roth GmbH, Karlsruhe,
TritonX-100	3051.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
TRIzol™ Reagent	1559-6018	Invitrogen, Carlsbad, California, USA
Tween® 20	9127.2	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Whatman Chromatography Paper, 3 mm Chr	3030-861	GE healthcare, Little Chalfont, UK
XhoI Restriktionsenzym	R0146S	Cell Signaling/NEB

#### 2.3.4 Lösungen und Puffer

Die für die eigenen Arbeiten verwendeten Lösungen und Puffer sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

**Tabelle 4:** Lösungen und Puffer.

Puffer	Zusammensetzung	Menge
Agarose-Gel-Laufpuffer 1x	Agarose Pulver TAE	0,8 -3g (je nach Gelhärte) 100ml
Blotpuffer (1 Liter) 1x	25 mM TRIS 0,2 M Glycine 20 % MeOH	3,03 g 15,01 g 0,2 l
0,1%iger Kristallviolett-Lösung	Cristal violet 37 % Formalin Methanol 10x PBS	Mit dH <sub>2</sub> O auf 1000ml auffüllen 1g 109 ml 40 ml 141 ml
Laemmli-Puffer (wird in aufzutragenden Proben auf das Vierfache verdünnt)	100 mM TRIS 6 % SDS 40 % Glycerol 4 % 2-Mercaptoethanol Bromphenolblau H <sub>2</sub> O	0,6 g 15 ml aus 20 % SDS Lösung 20 ml 2 ml Spatelspitze 50 ml
LB-Medium	Bacto-Trypton Yeast-Extract NaCl H <sub>2</sub> O	10 g 5 g 10 g Auf 1 Liter auffüllen und anschließend autoklavieren
MES-Laufpuffer 20x (MES 1 Liter)	MES Tris Base SDS EDTA H <sub>2</sub> O	195,2 g 121,2 g 20 g 30 g Auf 1 Liter auffüllen
MTT-Lösung (5mg/ml): Aufbewahrung bei -20°C	MTT DPBS (pH 7,5)	5 mg 1 ml
MTT-Assay I: Solubilisierungs -Lösung (Sorensens Puffer)	Glycin (MR 75,07) NaCl (MR 58,44) pH (mit NaOH)	7,507 g 5,844 g 10,5
MTT- Assay II Solubilisierungs -Lösung	40 %igem DMF (in H <sub>2</sub> O) 4 %iger AcOH (in H <sub>2</sub> O) 16 %igem SDS (in H <sub>2</sub> O)	100 ml 100 ml pH-Wert - Anpassung: 4,7 Aufbewahrung bei RT
RIPA-Puffer	50 mM Tris HCl pH 8 150 mM NaCl 1 % NP-40 0,5 % Natriumdeoxycholot 0,1 % SDS	
TBS 10x	10 mM Tris 150 mM NaCl	500 ml (dH <sub>2</sub> O) 15,76 g 40 g
TBS-T	TBS 10x Tween20	200 ml 2,00 ml ad 2 l (dH <sub>2</sub> O)

### 2.3.5 Laborkits

Die für die eigenen Arbeiten verwendeten Kits sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Falls nicht anders beschrieben, wurden die Protokolle entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

**Tabelle 5:** Laborkits.

Laborkits	Bestellnummern	Hersteller
EZ DNA Methylation-Gold Kit	D5006	Zymo Research Europa GmbH, Freiburg
HotStar HiFidelity Polymerase Kit.	202602	QIAGEN GmbH, Hilden
JetQuick™ DNA Purification Spin Kit	450250	Genomed GmbH, Löhne
JetQuick™ Gel Extraction Spin Kit	420050	Genomed GmbH, Löhne
JetQuick™ PCR Purification Spin Kit	410250	Genomed GmbH, Löhne
PeqGOLD Plasmid Mini Prep Kit	12-6942-029	PeqLab GmbH, Erlangen
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	23225	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Plasmid Maxi Kit	12163	Qiagen GmbH, Hilden
Plasmid Miniprep Kit I	12-6942-02	PeqLab GmbH, Erlangen
Q5® High-Fidelity PCR Kit	M0491S	New England BioLabs, Ipswich, MA, USA

### 2.3.6 Zytostatika

Die für die eigenen Arbeiten verwendeten Zytostatika sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Alle Zytostatika wurden von Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim erworben.

**Tabelle 6:** Zytostatika.

Zytostatikum	Verdünnungskonzentration und -medium	Bestellnummer
Doxorubicin hydrochlorid (10 mg)	2,5 mM in DMSO	D1515
Hydroxyurea (1 g)	500 µM in H <sub>2</sub> O, steril filtriert	H8781
Lomustin (100mg)	250 mM in 100 %igem Ethanol	L5918
Methymethansulfonat (5 g)	1 M in 100%igem Ethanol	M4016
Temozolomide (100 mg)	50 mM in DMSO	T2577

### 2.3.7 Antikörper

Die für die eigenen Arbeiten verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Alle verwendeten Antikörper wurden in dem Puffer TBS-T mit 5 % BSA verdünnt.

**Tabelle 7:** Primär- und Sekundärantikörper.

Primärantikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti- ABH2 Rb (#ab154859)	1:1000	Abcam Inc., Cambridge, MA, USA
Anti-β-Aktin Rb (#ab8227)	1:2000	Abcam Inc., Cambridge, MA, USA
<b>Anti-IDH1 (D2H1) Rb (#8137S)</b>	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
<b>Anti-IDH1-R132H Ms (DIA-H09)</b>	1:500	Dianova GmbH, Hamburg,
Anti-MGMT Ms (ab39253)	1:500	Abcam Inc., Cambridge, MA, USA
<b>Anti-P-Histone H2A.X Rb (#9718)</b>	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Vinculin Antibody rabbit (EPR8185)	1:2000	Abcam Inc., Cambridge, MA, USA
Sekundärantikörper		
<b>IRDye 800 CN anti-Mouse IgG (#926-32350)</b>	1:10 000	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg von der Höhe
<b>IRDye 800 CN anti-Rabbit IgG (H+L) (#926-32211)</b>	1:10 000	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg von der Höhe
FACS-Antikörper		
Gamma-pH2AX	1:10 in PBS	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA

### 2.3.8 Oligonukleotide

Die für die Real-time PCR-Untersuchungen verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Die Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon, Inc. erworben, in TE entsprechend einer Stocklösung von 100 µM gelöst und für die Arbeitslösung 1:10 in H<sub>2</sub>O verdünnt.

**Tabelle 8:** Oligonukleotide.

Primer	Primersequenz 5'-3'
ALBH2-Hs-F2	CTGCAGTTACACAGTCCTGTT
ALKBH2-Hs-F3	CGAAGGAGACAGAGGCAATG
ALKBH2-Hs-R3	GTGACTGGACAGACCTTCAAC
ALKBH2-Hs-R4	CACAGCCATCTTTATACCTGTAAAAT
ARF-F1	GACCACGATCCTCTACAAGC
ARF-R3	TCCCACACAGTGAAGCTGATG
CMV-pIRES2-EGFP-F	TGGGAGTTTGTGTTTGGCACC
IDH1-Hs-RT-F2	CCTATCATCATAGGTCGTCATG
IDH1-Hs-RT-R2	CGTCACTTGGTGTGTAGGTTA
IRES-seq-R	CAAAAGACGGCAATATGGTGG
MGMT-Taq-F3	CGAAATAAAGCTCCTGGGCA
MGMT-Taq-R3	GAACTCTTCGATAGCCTCGGG

Die als Primer für die Methylierungs-spezifischen PCR-Untersuchungen verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 9 zusammengefasst. Tabelle 10 gibt einen Überblick über die verwendeten siRNAs.

**Tabelle 9:** Primer für die methylierungs-spezifische PCR

Primer Bisulfidbehandlung	Primersequenz 5'-3'
MGMT-M/F2	GTTTTTAGAACGTTTTGCGTTTCGAC
MGMT-M/R2	CACCGTCCCGAAAAACTCCG
MGMT-U/F2	TGTGTTTTTAGAATGTTTTGTGTTTTGAT
MGMT-U/R2	CTACCACCATCCCAAAAAAAAAAACTCCA

Die verwendeten siRNAs wurden von der Firma QIAGEN erworben und mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O verdünnt.

**Tabelle 10:** siRNAs.

siRNA	Menge	Zielsequenz
<b>Negative Control</b> - siRNA	20 nmol	AATTCTCCGAACGTGTCACGT
Hs_MGMT 1	10 nmol	CACCAGACAGGTATGGAA
Hs_MGMT 2	10 nmol	GACAAGGATTGTGAAATGAAA
Hs_MGMT 3	10 nmol	AAGCTGCTGAAGGTTGTGAAA
Hs_MGMT 6	10 nmol	CCGGCTCTCACCATCCCGTT

### 2.3.9 Instrumente

Tabelle 11 gibt eine Übersicht über die verwendeten Laborgeräte.

**Tabelle 11:** Laborgeräte.

Laborgeräte	Hersteller
Autoklaviergerät VX-150	System, Münster
Digitale Waage ALC	Sartorius Ag, Göttingen
Gefrierschrank -80 ° C	Hettich GmbH, Tuttlingen
Gel Kammern für Agarose Gele	PeqLab GmbH, Erlangen
Invitrogen NuPage® Novex® Gel System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Kühlzentrifuge EBA 12 R	Hettich GmbH, Tuttlingen
Multi-Mode Validation Plate	Molecular Devices, Silicon Valley, CA, USA
Novex Tris-Glycine gels	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PCR Thermocycler T3	Biometra GmbH, Göttingen
Photometer NanoDrop ND-1000	PeqLab GmbH, Erlangen
PyroMark Q24	QIAGEN GmbH, Hilden
QUANTUM ST5	Vilber, Eberhardzelle
Real-time PCR StepOnePlus™	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Schüttler 3013	GFL GmbH, Burgwedel
Stromversorgung für Gelkammer PowerPac 3000	BioRad GmbH, München
Thermoblock TD	Falc, Treviglio, Italy
Tischzentrifuge 5417	Eppendorf AG, Hamburg

VI-CELL XR	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Wasserbad	GFL GmbH, Burgwedel
Zentrifuge 46 R	Hettich GmbH, Tuttlingen
Zentrifuge 5424	Eppendorf AG, Hamburg

## 2.4 Software

Der Text und die Tabellen der Dissertationsschrift sowie Abbildung 3 wurden mit Microsoft Office Word 2019 erstellt. Als Literaturverwaltungsprogramm für die Onlinesuche in Datenbanken und die Anlage sowie das Zitieren von Literaturdatenbanken wurde EndNote X9 benutzt. Für die statistischen Analysen und die Erstellung von Graphiken wurde Graphpad Prism 9 verwendet. Die Auswertung der Real-Time-PCR-Versuche erfolgte mit der Software StepOne™ Software v2.0. Die Beurteilung der Western-Blots erfolgte durch die Messung des Fluoreszenzsignals der Sekundärantikörper mit Hilfe des Odyssey Infrared Imaging Systems. Die Analyse der Pyrosequenzierungen wurde mit der PyroMark Q24 Software durchgeführt. Die Sangersequenzierungen wurden mit FinchTV ausgewertet. Die photometrischen Messungen des MTT-Assays und der Kristallviolett-Färbung wurde mit der Multimode Analysis Software durchgeführt. Für die Erstellung von Abbildung 1 wurde das Programm ChemDraw benutzt. Eine Übersicht der verwendeten Software bietet Tabelle 12.

**Tabelle 12:** Software.

Software	Hersteller
ChemDraw	Cambridgesoft Corp., Cambridge, MA, USA
EndNote X9	Clarivate Analytics LLC, Philadelphia, USA
FinchTV 1.4.0	Geospiza Inc, Seattle, WA, USA
Graphpad Prism 9	Graphpad Software Inc., La Jolla, CA, USA
Microsoft Office Word 2019	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Multimode Analysis Software 3.3.0.9	Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA
<b>Odyssey Infrared Imaging System Application Software 3.0.30</b>	Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE, USA
PyroMark Q24 Software	QIAGEN GmbH, Hilden, DE
StepOne™ Software v2.0	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

## 2.5 cDNA aus Tumorgewebeproben von Patienten mit Gliomen

Die aus kryoasservierten Tumorgeweben gewonnenen RNA-Proben werden in der ZNS-Tumorgewebekbank des Instituts für Neuropathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

katalogisiert und aufbewahrt (Studiennummer: 3005). Zur Gewinnung der RNA-Proben wurden Teile des resezierten Tumorgewebes direkt nach der Operation in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert. Die Tumorproben wurden nach den Kriterien der Weltgesundheitsorganisation (WHO) entsprechend der aktuellen Klassifizierung der Tumoren des Nervensystems eingestuft [7]. Die RNA-Extraktion und anschließende Umwandlung in cDNA wurde von Mitarbeitern des Instituts für Neuropathologie der Heinrich-Heine-Universität durchgeführt, wobei ausschließlich Tumorgewebe mit einem Gehalt von mindestens 80 % Tumorzellen benutzt wurde. Für die Untersuchung der cDNA aus Gewebeproben der ZNS-Tumorbank im Rahmen dieser Dissertation liegt ein positives Votum der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität vor (Studiennummer: 5576).

## **3 Methoden**

### **3.1 Methoden der Kultivierung von Glioblastomzelllinien**

#### **3.1.1 Kultivierung humaner Glioblastomzelllinien**

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sicherheitswerkbank Typ I mit sterilen, pyrogenfreien Materialien und Medien durchgeführt, um Kontaminationen zu vermeiden. Die verwendeten Glioblastomzelllinien wurden in 10 cm-Zellkulturschalen in DMEM mit 10 % FCS und 1 % PS (DMEM++) in einem Zellinkubator bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

#### **3.1.2 Splitten und Einfrieren von Glioblastomzelllinien**

Zum Splitten der adhärennten Zellen wurde das Medium von den Platten abgesaugt und die Zellen wurden mit PBS<sup>-/-</sup> (ohne Magnesium und Calcium) gewaschen. Danach wurde auf 10 cm-Platten 1 ml und auf 6 cm-Platten 0,5 ml Trypsin-EDTA (0,05 %) aufgetragen und die jeweilige Platte für ca. 5 min im Zellinkubator inkubiert. Die Proteasewirkung des Trypsins wurde nach 5 min durch Hinzufügen von DMEM++ im Verhältnis zu Trypsin von 4:1 beendet. Je nach gewünschter Zellzahl in der Anzucht wurden in einem bestimmten Verhältnis die im Medium suspendierten Zellen abgesaugt und durch neues Medium ersetzt. Zum Wegfrieren der Zellen wurde das abgesaugte Medium nicht verworfen, sondern in Falcon-Röhrchen gefüllt und bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Medium entfernt, so dass nur das Zellpellet im Falcon-Röhrchen zurückblieb. Das Pellet wurde in 900 µl FCS und 100 µl DMSO suspendiert und in einem Nunc-Röhrchen zunächst bei -80 °C und dann in flüssigem Stickstoff gelagert.

### 3.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Um die Zellzahl und Vitalität der Glioblastomzellen zu ermitteln, wurden diese nach der Trypsinierung in DMEM++ resuspendiert und mindestens 500 µl der Suspension in Vi-CELL-Tubes überführt. Die Zellen wurden anschließend durch die Trypanblau-Methode im Vi-CELL-Zellzähler- und -Zellvitalitäts-Analysegerät analysiert.

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 Polymerase- Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR ist es möglich, durch spezifische Primer gewünschte DNA-Abschnitte zu amplifizieren. Das Gesamtvolumen der PCR-Proben war in dieser Arbeit stets 20 µl. Der Standard-Reaktionsmix für PCR-Reaktionen ist in Tabelle 13 aufgelistet. Zu 17 µl Reaktionsmix wurden jeweils 3 µl cDNA pro Reaktionsgefäß hinzugefügt, wobei von jeder cDNA-Probe ein Triplet erstellt wurde. Bei jeder PCR wurden zum Ausschluss einer Kontamination des Reaktionsmixes mit cDNA eine Negativkontrolle (Reaktionsmix ohne cDNA) zusätzlich zu den cDNA-Proben erstellt, bei der 3 µl H<sub>2</sub>O anstelle von cDNA eingesetzt wurde.

**Tabelle 13:** Reaktionsmix für eine konventionelle PCR.

Komponenten	1x Reaktionsmix
10x PCR Buffer	2,0 µl
2 mM dNTP	0,5 µl
MgCl <sub>2</sub>	0,5 µl
Primer Forward (PF)	0,5 µl
Primer Reward (PR)	0,5 µl
HotStar Taq-Polymerase	0,1 µl
MilliQ H <sub>2</sub> O	12,9 µl

Der PCR-Ansatz wurde für die Amplifikation der DNA-Abschnitte im Thermocycler mit den in Tabelle 14 angegebenen Einstellungen durchgeführt. Hierbei war die Anzahl der Zyklen bestehend aus Denaturierung, Annealing und Elongation von der gewünschten Ausbeute der DNA-Abschnitte abhängig und variierte in einem Bereich zwischen 30 und 40 Zyklen.

**Tabelle 14:** Einstellungen des Thermocyclers für die Standard-PCR.

Stadien	Temperatur	Zeit	Zyklen
Anfangsdenaturierung	95 °C	15 min	1
Denaturierung	95 °C	20 s	

Annealing	56 °C	20 s	30-40
Elongation	72 °C	20 s	
Auffüllphase	72 °C	5 min	1
Lagerungstemperatur bis zur Weiterverarbeitung	4 °C	∞	

### 3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Nach der PCR wurden die DNA-Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und sichtbar gemacht. Zur Herstellung eines Agarose-Gels wurden je nach Größe des amplifizierten DNA-Fragments 1-3 g Agarose in 100 ml 1 x TAE-Puffer suspendiert und durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Danach wurden 3,5 µl des DNA-Farbstoffes Midori Green zu der Agarose-Lösung hinzugefügt und gut durchmischt. Anschließend wurde die Lösung auf einen Gelträger gegossen und die Kämme, deren Aussparungen später die Geltaschen bilden, wurden eingesetzt. Nach Erstarren des Gels wurde es in eine Elektrophoresekammer eingebracht. Als Laufpuffer diente 1x TAE, mit welchem die Elektrophoresekammer gefüllt war und das Gel komplett bedeckte. Je nach Größe des amplifizierten DNA-Fragments wurde entweder ein 100 bp-DNA-Leiter oder eine 1 kb-DNA-Leiter als Größenstandard verwendet und in die erste Geltasche pipettiert. Vor der Beladung der Geltaschen mit den PCR-Produkten wurde jede PCR-Reaktion mit 5 µl 6x Ladepuffer (0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 40 % Glycerin) versetzt. Zur Auftrennung der DNA-Fragmente wurde eine elektrische Spannung von 180 V für 20 min angelegt. Die Darstellung der DNA-Banden und die Dokumentation des entsprechenden Gels wurden mit dem Quantum ST4-Gerät von Vilber durchgeführt.

### 3.2.3 Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR erlaubt es, semiquantitative Aussagen über die Expression von Genen zu treffen. Das Prinzip der qRT-PCR besteht darin, dass während der PCR fluoreszierende Farbstoffe (in dieser Arbeit SYBR Green I) in die DNA interkalieren. Bei jedem Zyklus der PCR nimmt die vervielfältigte Ziel-DNA und somit auch die Fluoreszenz zu, so dass die Messung der Fluoreszenz Rückschlüsse über die Konzentration der Ziel-DNA erlaubt. In dieser Arbeit wurde die Expression der mRNAs von ALKBH2 und MGMT mittels qRT-PCR untersucht. Für ALKBH2 wurden zwei unterschiedliche mRNA-Sequenzen untersucht (siehe Abschnitt 1.5.5). Die Primer ALKBH2-Hs-F3 und ALKBH2-Hs-R3 wurden für die Analyse der mRNA-Variante I und die Primer ALKBH2-Hs-F2 und ALKBH2-Hs-R4 wurden für die Analyse der mRNA-Variante II verwendet. Zur semiquantitativen Analyse der unterschiedlichen mRNA-Varianten von *ALKBH2* sowie von *MGMT* wurde für jede Probe die mRNA von *ARF1* als Referenz-mRNA untersucht.

Für die Analyse der Real-time-PCR-Daten wurde der *Cycle threshold* ( $C_T$ ) für ALKBH2 bzw. MGMT auf die  $C_T$ -Werte der Referenz-mRNA *ARF1* normalisiert. Anschließend wurde das Expressionsniveau

der untersuchten Zellen auf das Expressionsniveau der Human Reference cDNA Probe bezogen und so eine relative Expression berechnet.

Der Reaktionsmix für ein Well der PCR-Platte bestand bei den Primern für ALKBH2 und ARF1 aus 10 µl SYBR®Green Master Mix, 5 µl MilliQ H<sub>2</sub>O und 1 µl Forward Primer sowie 1 µl Reverse Primer (jeweils 10 µM). Bei den Analysen der MGMT-mRNA setzte sich der Reaktionsmix ebenfalls aus 10 µl SYBR®Green Master Mix zusammen, jedoch wurden nur 0,75 µl Forward Primer sowie Reverse Primer (jeweils 10 µM) und 5,5 µl H<sub>2</sub>O verwendet. In jedes Well der Platte wurden 17 µl des Reaktionsmixes pipettiert und anschließend 3 µl cDNA pro Well hinzugefügt, wobei von jeder cDNA-Probe ein Triplet erstellt wurde. Um eine Kontamination des Reaktionsmixes mit cDNA auszuschließen, wurde pro TaqMan-Platte von jedem Reaktionsmix eine Negativkontrolle ohne cDNA erstellt. Die PCR wurde mit dem Gerät StepOnePlus™ qRT-PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt und mit der Quantifizierungsmethode „comperative CT ( $\Delta\Delta CT$ )“ ausgewertet. Die Analyse der gewonnenen Daten erfolgte mit der Software StepOne v2.3. Das Programm für die qRT-PCR ist in Tabelle 15 angegeben.

**Tabelle 15:** Programm für die qRT-PCR Reaktion.

Temperatur	Zeit	Zyklen
95 °C	10 min	1
95 °C	15 s	40
60 °C	1 min	
4 °C	∞	∞

### 3.2.4 Extraktion von RNA aus kultivierten Glioblastomzellen

Die bei der RNA-Extraktion beschriebenen Schritte wurden alle unter einem Abzug durchgeführt. Die Kultur der Glioblastomzellen für die RNA-Extraktion erfolgte auf 6-Well-Platten. Nach erfolgter Behandlung wurde das Medium von den Zellen abgenommen und unter dem Abzug pro Well 1 ml TRIzol®-Reagent hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von ca. 7 min bei RT wurde der TRIzol®-Reagent-mRNA-Mix von den Platten in Eppendorf-Röhrchen transferiert und in jedes Eppendorf-Röhrchen 200 µl Chloroform hinzugefügt (200 µl Chloroform/1 ml TRIzol®-Reagent). Die Eppendorf-Röhrchen wurden anschließend ca. 20 s kräftig geschüttelt und für weitere 10 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Eppendorf-Röhrchen für 10 min bei 12.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation ließen sich zwei Phasen des Chloroform-TRIzol®-Gemischs erkennen. Die obere Phase war wässrig und beinhaltete die RNA, während die untere Phase lipophil war und die DNA enthielt. Für die Extraktion der RNA wurde die obere Phase vorsichtig entfernt und in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt. Die lipophile Phase wurde verworfen, da keine DNA extrahiert wurde. Zu jedem Eppendorf-

Röhrchen mit der mRNA in der wässrigen Phase wurden 500 µl 100 %iges Isopropylalcohol gegeben und der Inhalt der Eppendorf-Röhrchen wurde anschließend durch mehrmaliges Invertieren gut gemischt. Es erfolgte erneut eine 15 min Inkubation bei RT, gefolgt von einer 15 min Zentrifugation der Proben bei 12.000 x g und 4 °C. Der Überstand wurde danach entfernt und die Proben wurden mit jeweils 1 ml 75 %igem Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt, diesmal bei 2.000 x g über 5 min bei 4 °C, wurde der Überstand entnommen und die Eppendorf- Röhrchen wurden für ca. 10 min bei RT zum Abdampfen des Ethanols offen aufgestellt. Die RNA-Proben wurden danach in 30-50 µl MilliQ H<sub>2</sub>O gelöst und bei -80 °C gelagert.

### 3.2.5 Umwandlung der RNA in cDNA

Jeweils 1 µg der aus Glioblastomzellen isolierten RNA wurde in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurde die RNA auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde die RNA-Konzentration der Proben durch das Nano-Drop Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt und die Absorption mit dem Faktor 40 µg/ml multipliziert. Danach wurde 1 µg RNA zusammen mit dem in Tabelle 16 gelisteten Komponenten des iScript Advanced cDNA Synthesis Kit II in einem PCR-Reaktionsgefäß gemischt.

**Tabelle 16:** Reaktionsmix für die Transkription von RNA in cDNA.

Komponenten	1x Ansatz
5x iScript advanced reaction mix	5 µl
iScript advanced reverse transcriptase	1 µl
MilliQ H <sub>2</sub> O	14 µl-µl für 1 µg RNA
1 µg RNA	Variabel

Die cDNA-Synthesereaktion wurde im Thermocycler für 30 min bei 42 °C inkubiert und anschließend wurde die Reverse Transkriptase für 5 min bei 85 °C inaktiviert. Ein Teil der cDNA wurde in einem Verhältnis von 1:50 in MilliQ H<sub>2</sub>O verdünnt und bei 4 °C gelagert. Die unverdünnte cDNA wurde bei -20 °C aufbewahrt. Der Erfolg der Umwandlung wurde mit einem Standard-PCR-Protokoll für ARF1 (siehe Tabelle 13 und 14) und anschließender Gelelektrophorese der PCR-Produkte überprüft.

## 3.3 Western-Blot-Analysen

### 3.3.1 Proteinextraktion aus kultivierten Glioblastomzellen

Um die Proteine aus kultivierten Glioblastomzellen zu extrahieren, wurden die Zellen zunächst auf 6-Well-Platten ausplattiert und entsprechend den weiter unten beschriebenen Experimenten behandelt. Vor Beginn der Proteinextraktion wurde der Lyse-Puffer vorbereitet. Hierfür wurde in 10 ml RIPA-

Lösung (siehe Abschnitt 2.3.4) eine Tablette EDTA-free complete und eine Tablette PhosSTOP (RIPA-P-P-Lösung) gelöst.

Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Zellen wurden mit 1 ml eiskaltem PBS <sup>++</sup> (enthält Magnesium und Calcium) gewaschen. Das PBS <sup>++</sup> wurde sodann abgenommen und die Zellen wurden mit 100 µl RIPA-P-P-Lösung sowie 1µl Benzonase<sup>®</sup> Nuclease pro Well lysiert. Die Zellen wurden in dem Lyse-Puffer für 5-10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die verbliebenen adhärenen Zellreste mittels eines Zellschabers abgelöst und das Lysat wurde in 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt. Zum Durchmischen der Zellsuspension wurden die Eppendorf-Röhrchen für 5-10 min im Kühlraum auf ein Zellrad gestellt. Zur Entfernung von DNA- und RNA-Fragmenten wurde das Zellysate bei 4 °C, 14.000 rpm für 10 min zentrifugiert und die Suspension ohne Lösen des Pellets in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt. Die Proteinmenge wurde mittels des Pierce BCA Protein Assay von der Firma Thermo Fisher Scientific bestimmt. Bis zur weiteren Aufarbeitung der Proteine wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

### **3.3.2 Proteinauftrennung mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE erfolgt durch eine elektrophoretische Trennung von Proteinen nach ihrer Masse und als Vorbereitung eines Western-Blots. Nach Quantifizierung der Proteinexpression in den Proben (siehe Abschnitt 3.3.1) wurden 10 bis 20 µg Protein mit 10 µl 4x Lämmli-Ladepuffer gemischt und für 5 min bei 80 °C erhitzt. Währenddessen wurde die Gelkammer mit 1xMES-Laufpuffer zur Hälfte gefüllt und die käuflich erworbenen NuPage Novex 4-12 % Bis-Tris Protein Gele (je nach Experiment mit 10, 12 oder 15 Geltaschen) eingefügt. Hiernach wurde der innere Teil der Gelkammer komplett mit 1xMES-Laufpuffer gefüllt. Die Gel Spacer wurden aus den Gelen entfernt und die Geltaschen mit Laufpuffer durchgespült. Anschließend wurde die erste Geltasche mit 3 µl Pageruler als Standard beladen. Die folgenden Geltaschen wurden mit den zu analysierenden Proben beladen. Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch Anlage einer elektrischen Spannung von 160 V für 60 min. Die Detektion der Proteine wurde mittels Western-Blot durchgeführt.

### **3.3.3 Detektion der aufgetrennten Proteine mittels Western-Blot-Analyse**

Um die aufgetrennten Proteine der SDS-PAGE sichtbar zu machen, wurden die Proteine nach dem Prinzip von Towbin und Kollegen [88] auf eine der Größe des Gels entsprechende Nitrocellulose Blotting-Membran transferiert. Zuerst wurde der Transfer-Sandwich in der Transferlösung aufgebaut. Dazu wurden auf die Kathodenseite der Kammer ein dünner Schwamm sowie zwei Whatman-Papierstücke gelegt. Danach wurde die SDS-PAGE vorsichtig über die Whatman-Papierstücke platziert und von der Blotting-Membran überdeckt. Um bei dem Transfer Einschlüsse von Luftblasen zu verhindern, wurde die Membran vollständig in den Blotpuffer eingetaucht und noch vorhandene

Luftblasen mit einer Glaspipette glattgestrichen. Anschließend wurden, ohne den Sandwich aus der Flüssigkeit zu entfernen, zwei Whatman-Papierstücke und ein weiterer Schwamm auf die Anodenseite der Kammer gelegt und die Sandwichhalterung wurde verschlossen. Für den Transfer der Proteine von dem Gel auf die Membran wurde eine elektrische Stromstärke von 200 mA für 2½ h angelegt. Nach dem Transfer der Proteine wurde die Membran für 1 h bei RT in 15 ml TBS-T mit 5 % Magermilchpulver geblockt. Anschließend wurde die Flüssigkeit entfernt und die Membran dreimal für je 5 min mit TBS-T gewaschen. Zum Nachweis der Proteine wurden die entsprechenden Antikörper in TBS-T mit 5 % BSA verdünnt. Die Membran wurde dann in 5 ml dieser Lösung über Nacht im Kühlraum inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran nach Entfernung der Antikörperlösung erneut dreimal für 5 min in TBS-T gewaschen. Dann erfolgte unter Schwenken die Inkubation der Membranen mit einem Zweitantikörper für 1 h bei RT. Der Zweitantikörper wurde 1:10.000 in TBS-T mit 5% BSA verdünnt. Bei dem Zweitantikörper war zu beachten, dass er gegen die Antikörper-Spezies des Primärantikörpers gerichtet ist. Die im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendeten Sekundärantikörper waren an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Bei diesen Fluoreszenzgekoppelten Antikörpern ist zu berücksichtigen, dass sie lichtempfindlich sind, und die Inkubation und alle Folgeschritte entsprechend in einer abgedunkelten Schale stattfinden mussten. Nach einem weiteren wie bereits oben beschrieben Waschschritt wurde das Fluoreszenzsignal des Sekundärantikörpers durch das Odyssey Infrared Imaging System detektiert.

### **3.4 Klonierung von *IDH1*-Wildtyp und *IDH1*-R132H**

Die Klonierung von Genen ist eine gängige Methode der Forschung, um bestimmte DNA-Abschnitte bzw. Gene in Zellen einzubringen und zu vervielfältigen. Die Klonierung kann in die Teilabschnitte DNA-Gewinnung, Insertion des DNA-Abschnitts in einen Vektor, Transformation und somit Vervielfältigung des generierten Vektors in kompetente Bakterien und letztlich Transfektion der Zielzellen mit dem generierten Vektor unterteilt werden.

#### **3.4.1 Amplifikation der Wildtyp- und der mutierten Sequenz von *IDH1***

Die Isolierung und Amplifikation der kodierenden Sequenz des Wildtyp-*IDH1* Gens und des *IDH1*-R132H-mutierten Gens erfolgte aus der cDNA eines anaplastischen Oligodendroglioms mit heterozygotem *IDH1*-Status. Hierfür wurde die *IDH1* cDNA mit Hilfe einer Polymerase mit erhöhter Proof-Reading-Aktivität mittels PCR amplifiziert (HotStar HiFidelity Polymerase, QIAGEN). Der Reaktionsmix setzte sich wie in Tabelle 17 beschrieben zusammen. Die *High-Fidelity*-PCR wurde wie in Tabelle 18 beschrieben durchgeführt.

**Tabelle 17:** Pipettierschema des HotStar HiFidelity Polymerase Reaktionsansatzes.

Komponenten der Reaktionsmises	
<b>5x HotStar HiFidelity PCR Buffer (inkl. dNTPs)</b>	10 µl
IDH1-Hs-RT-F2 (10 µM)	2 µl
IDH1-Hs-RT-R2 (10 µM)	2 µl
HotStar HiFidelity DNA Polymerase	1 µl
MilliQ H <sub>2</sub> O	29 µl
25mM MgSO <sub>4</sub>	2 µl
cDNA No.16 aus der Tumorbank	4 µl

**Tabelle 18:** PCR-Schema der HotStar HiFidelity Polymerase PCR-Reaktion.

Stadien	Temperatur	Zeit	Zyklen
Anfangsdenaturierung	94 °C	2 min	1
Denaturierung	94 °C	4 min	40
Anealing	60 °C	30 s	
Elongation	68 °C	1 min	
Auffüllreaktion	68 °C	5 min	1

Zur Gewinnung des Klonierungsinserts wurde das PCR-Produkt in einem 2 %igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und bei einer Markerhöhe von 1,2 kb DNA-Fragment mittels eines Skalpell unter UV-Licht exzidiert. Anschließend wurde das DNA-Fragment aus dem TAE-Agarosegel mittels des JetQuick™ Gel Extraction Spin Kit extrahiert und in 100 µl MilliQ H<sub>2</sub>O eluiert.

### 3.4.2 Linearisierung des pIRES2-EGFP-Vektors

Das Plasmid pIRES2-EGFP und das PCR-Produkt wurden durch die Restriktionsenzyme XhoI und EcoRI in einem Wärmeschrank für 4 h bei 37 °C inkubiert. Der Restriktionsenzymverdau wurde entsprechend Tabelle 19 angesetzt.

**Tabelle 19:** Ansätze für den Verdau des Plasmids pIRES2-EGFP- und des PCR-Produktes durch die Restriktionsenzyme XhoI und EcoRI.

	Plasmid	PCR-Produkt
10x CutSmart® Buffer	2,0 µl	10,0 µl
<b>XhoI</b>	0,5 µl	1,0 µl
<b>EcoR I</b>	0,5 µl	1,0 µl
MilliQ H <sub>2</sub> O	15,0 µl	X
Plasmid/PCR-Produkt	2,0 µl	88,0 µl

Die beiden mittels Restriktionsenzymen verdauten Ansätze wurden mit Hilfe des JetQuick™ DNA Purification Spin Kit der Firma Genomed aufgereinigt und jeweils in 25 µl MilliQ H<sub>2</sub>O eluiert.

### 3.4.3 Ligation

Für die Ligation wurden drei verschiedene Ansätze mit jeweils verschiedenen Verhältnissen von PCR-Produkten und linearisiertem Plasmid hergestellt (siehe Tabelle 20). Die drei Ligationsansätze wurden für 2 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert.

**Tabelle 20:** Pipettierschema für drei verschiedene Infusionsansätze.

	1. Ansatz	2. Ansatz	3. Ansatz
Plasmid	1,0 µl	0,5 µl	0,2 µl
Insert	7,0 µl	7,5 µl	7,8 µl
DNA-Dilution Buffer	2,0 µl	2,0 µl	2,0 µl
DNA- Ligation-Buffer	10,0 µl	10,0 µl	10,0 µl
T4-DNA-Ligase	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl

### 3.4.4 Transformation der Ligationsansätze in kompetente *E. coli*

Mit Hilfe der Transformation können Plasmide in kompetente *E. coli* eingebracht und durch das Bakterienwachstum kloniert und/oder vervielfältigt werden. Für die Transformation wurden kompetente DH5α- *E. coli* sowie die drei verschiedenen Ligationsansätze auf Eis aufgetaut. Entsprechend wurden drei verschiedene Transformationsansätze hergestellt. Dabei wurden pro Ansatz 2 µl Ligationsansatz in 50 µl kompetente *E. coli* in Eppendorf-Röhrchen pipettiert, vorsichtig vermischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die drei Ansätze für 40 s bei 42 °C hitzegeschockt. Danach wurden 100 µl LB-Medium pro Eppendorf-Röhrchen hinzugefügt und die Ansätze 60 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Pro Ansatz wurden 50 µl der flüssigen Bakterienkultur auf eine LB-Kanamycin-Agar-Platte (siehe Abschnitt 2.1) mit einem sterilen Drigalskispatel ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Zellinkubator angezüchtet. Die Agarplatten wurden anschließend bis zur Fortsetzung der Klonierung bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

### 3.4.5 MiniPrep-Aufbereitung der Plasmid-DNA

Für die Isolierung und Analyse der Plasmide aus den Bakterien wurden von jeder LB-Kanamycin-Agar-Platte 10 Bakterienkolonien mit Hilfe von sterilen Pipettenspitzen gepickt und in je 5 ml LB-Medium sowie 10 µl Kanamycin in 15 ml Falcon-Röhrchen bei 37 °C unter Schütteln im Zellinkubator für 16 h angezüchtet. Die 30 Bakterienkulturen wurden am nächsten Tag mittels einer PCR auf das Vorhandensein der korrekten Plasmid-DNA hin untersucht. Für den Reaktionsmix wurden die in Tabelle 21 gelisteten Substanzen zusammengemischt. Zu 19 µl des Reaktionsmixes wurde 1 µl der jeweiligen Bakterienkultur hinzugefügt. Die PCR wurde unter den in Tabelle 21 angegebenen Bedingungen mit 36

Zyklen durchgeführt. Durch das Inkubieren des PCR-Ansatzes bei 95 °C für 15 min kam es zu einem Aufschluss der Bakterienzellen und somit zu einer Freisetzung der Plasmid-DNA, so dass diese dann für die PCR-Reaktion zur Verfügung stand.

**Tabelle 21:** Pipettierschema der PCR zum Nachweis der Plasmid-DNA in Minisäulen.

Komponenten	Reaktionsmix (1x)	Reaktionsmix (32x)
10x PCR Buffer	2,0 µl	64,0 µl
dNTPs	0,5 µl	16,0 µl
MgCl <sub>2</sub>	0,5 µl	16,0 µl
CMV Forward	0,5 µl	16,0 µl
IRES-Rev	0,5 µl	16,0 µl
HotStarTaq-Polymerase	0,1 µl	3,2 µl
MilliQ H <sub>2</sub> O	14,9 µl	476,8 µl

### 3.4.6 Extraktion der Plasmid-DNA

Die mittels PCR als Plasmid-DNA - positiv erkannten Bakterienkolonien wurden für 20 min bei 5.000 x g zentrifugiert. Nach der Entfernung des Überstandes wurde aus dem verbliebenen Pellet die DNA mit Hilfe des peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I isoliert und dadurch aufgereinigt. Die korrekte Insertion von Wildtyp-*IDHI* oder R132H-mutierten *IDHI* in die isolierten Plasmid-DNAs wurde anschließend mittels Sanger-Sequenzierung untersucht (siehe Abschnitt 3.4.7).

### 3.4.7 Sequenzierung der Plasmid-DNA

Für die Sequenzierung der Plasmid-DNA wurde die DNA-Konzentration der Proben mit dem Mikrovolumen-Spektrophotometer NanoDrop bestimmt. Danach wurden ca. 500 ng Plasmid-DNA mit entweder 1 µl CMV-Forward Primer oder 1 µl IRES-Rev Primer gemischt und mit MilliQ H<sub>2</sub>O auf 7 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Sanger-Sequenzierung der Plasmid-DNA wurde extern von der Firma StarSeq (Mainz) durchgeführt. Die Sequenzierung der Plasmid-DNA ergab, dass die Plasmide aus der 4ten Bakterienkolonie, die vom Insertionsansatz I stammte (bezeichnet als 1.4), die *IDHI*-R132H-Mutation enthielten. *IDHI*-Wildtyp konnte in den Plasmiden aus der ersten Bakterienkolonie des zweiten Insertionsansatzes nachgewiesen werden (bezeichnet als 2.1).

### 3.4.8 Maxipräparation der Plasmid-DNA

Für die erneute Vervielfältigung der Plasmid-DNA mit der *IDHI*-R132H-Mutation oder der *IDHI*-Wildtyp Sequenz wurden die als 1.4 und als 2.1 bezeichneten Plasmid-DNAs erneut mittels Transformation in kompetenten *E. coli* vermehrt. (Abschnitt 3.4.4). Nach dem Schütteln über 60 min bei 37 °C wurden die transformierten Bakterien in 100 ml LB-Medium und 0,5 ml Kanamycin für 20 h in einem Glaskolben bei 37 °C unter Schütteln kultiviert. Um die Plasmid-DNA aus diesem größeren Volumen zu isolieren, wurde das Maxiprep Kit der Firma QIAGEN verwendet. Die durch das Kit aus

den Bakterien gewonnenen DNA-Pellets wurden in 500 bis 1000 µl 1x TE aufgenommen und die DNA-Konzentration wurde mit dem Mikrovolumen-Spektrophotometer NanoDrop bestimmt.

### **3.4.9 Linearisierung der verschiedenen pIRES-EGFP-IDHI-Plasmide**

Für die Transfektion der primären Glioblastomzellen mit Vektoren wurden die Plasmide durch den Verdau mit dem Restriktionsenzym *BsaI* linearisiert. Hierfür wurden zu 10µg Plasmid 2,5µl *BsaI* und 10 µl CutSmart®-Puffer hinzugegeben und die Lösung wurde mit MilliQ H<sub>2</sub>O auf 100 µl aufgefüllt. Die Proben wurden für 2 h bei 37 °C verdaut. Für die Aufreinigung der linearisierten Plasmid-DNA wurde das JetQuick™ PCR Purification Spin Kit verwendet, wobei hier statt der sonst üblichen 400 µl der Lösung H1 500 µl benutzt wurden. Zum Schluss wurde die DNA in 100 µl H<sub>2</sub>O eluiert.

### **3.4.10 Transfektion von Glioblastomzelllinien**

Die Glioblastomzelllinien A-172, LN-18, LN-229 und U-87 MG wurden für die Transfektion mit den *IDHI*-Wildtyp- oder den *IDHI*-R132H-mutierten Plasmiden auf 6-Well-Platten mit einer Zelldichte von 250.000 Zellen pro Well ausgesät und für 2 Tage im Zellinkubator angezchtet. Danach erfolgte die Transfektion der Zellen. Hierfür wurden je Transfektionsansatz zwei Eppendorf-Röhrchen mit je 250 µl Gibco® Opti-MEM™ Medium auf Eis vorbereitet. Zu jedem Ansatz wurden 1.000 ng der Plasmid-DNA hinzugefügt und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Zu dem anderen Reagenzglas wurden 5 µl Lipofectamine® 2000 hinzugefügt und vorsichtig durch Schwenken gemischt. Da Lipofectamine® 2000 instabil gegenüber Plastik ist, wurde damit der Kontakt mit Plastik reduziert. Die beiden Proben wurden für 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Inhalt des einen Eppendorf-Hütchens in den des anderen Eppendorf-Hütchens überführt und die Probe erneut durch vorsichtiges Schwenken gemischt. Während die Lipofectaminplasmid-Lösung für weitere 5-10 min auf Eis gelagert wurde, wurde das Medium der 6-Well-Platten mit 1,5 ml Gibco® Opti-MEM™ Media ausgewechselt. Danach wurden tröpfchenweise 500 µl der Lipofectaminplasmid-Lösung in jedes Well pipettiert. Die transfizierten Zellen wurden für 24 h im Zellinkubator bei 37 °C inkubiert. Hiernach wurde das Opti-MEM™ Medium durch DMEM, welches mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin versetzt war, ersetzt. Um die transfizierten Zellen von den parentalen Zellen zu selektionieren, wurde Geneticin® (G418) verwendet. Das Plasmid pIRES-ERFP-*IDHI* enthält eine Resistenzkassette gegen das Antibiotikum G418. G418 wurde in einem Verhältnis von 1:100 zu DMEM++ hinzugefügt. Die Zellen wurden mindestens 2 Wochen selektioniert und die überlebenden Zellen in der Kultur vermehrt, um sie anschließend mittels FACS aufzureinigen (siehe Abschnitt 3.4.11).

### **3.4.11 Fluorescence-activated Cell Sorting (FACS) der transfizierten Glioblastomzellen**

FACS (*fluorescence activated cell sorting*) ist eine Methode, um Einzelzellsuspensionen fluoreszenzmarkierter Zellen durch die quantitative Detektion der Fluoreszenz zu sortieren. Für das

Sortieren der transfizierten A-172, LN-18, LN-229 und U-87 MG Zellen wurden in DMEM++ suspendierte Zellen nach dem Splitten in 15 ml-Falcon-Röhrchen gefüllt und für 5 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Das Medium wurde anschließend aus den Röhrchen entfernt, die Pellets wurden in 300 µl PBS resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Die Proben wurden dann auf Eis in das FACS Labor des Instituts für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (ITZ) gebracht. Das *Sorting* erfolgte mit Hilfe des im Plasmid enthaltenen Fluorochromes EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*), welches durch den Halbleiter- oder Argonlaser bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt wird und Licht emittiert. Das Sortieren der Zellen findet durch die Analyse des sog. Emissionsspektrums statt. Hierbei gibt das Vorwärtsstreulicht (FSC, *Forward Scatter*) Auskunft über die Zellgröße, während das Seitenstreulicht (SSC, Side (90°) Scatter) die Zellkomplexität und Zellgranularität widerspiegelt. Zur Abgrenzung von nicht transfizierten Zellen wurde vor der Analyse der transfizierten Zellen eine Negativ-Probe mit den jeweiligen parentalen Zelllinien durchgeführt. Die EGFP-positiven Zellen wurden in ein Falcon-Röhrchen mit 1 ml DMEM++ überführt. Danach wurden die *gesorteten* Zellen in jeweils einem Well einer 6-Well-Platte ausplattiert und unter G418-Selektion kultiviert und vermehrt.

#### **3.4.12 Bestimmung von 2-Hydroxyglutarat in den transfizierten Glioblastomzellen**

Um den Transfektionserfolg zu prüfen und gleichzeitig nachzuweisen, dass die mittels Plasmid eingefügte *IDHI*-R132H-Mutation auch in den Zellen ihre enzymatische Funktion erfüllt, wurde die Konzentration von D-2-Hydroxyglutarat in den parentalen, in den *IDHI*-Wildtyp- und in den *IDHI*-R132H-transfizierten Glioblastomzellen mittels Gas-Chromatographie-Massenspektrometrie gemessen. Diese Messungen wurden am Institut für Biochemie der Pflanzen der Heinrich-Heine-Universität durchgeführt. Für die Messung wurden nach Kultivierung der Glioblastomzellen die Zellen mittels Trypsinierung in eine Einzelzellsuspension überführt und in 15 ml-Falcon-Röhrchen für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellpellets in 10 ml eiskaltem PBS resuspendiert, um sie zu waschen. Die Zellen wurden wieder abzentrifugiert, das Zellpellet sodann in 5ml eiskaltem PBS resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und anschließend 1 Million Zellen in einem Eppendorf-Röhrchen bei 4 °C und 2000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, und das Zellpellet in 1000 µl eiskaltem mit 50 µM Ribitolösung versetztem Chloroform-Methanol-H<sub>2</sub>O-Gemisch (1: 2,5: 1) gelöst. Die Eppendorf-Röhrchen wurden für 10 min im Kühlraum auf einem Rotationsschüttler gemischt. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der flüssige Überstand wurde dann aus den Eppendorf-Röhrchen in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt und die Probe bis zur Messung bei -80 °C aufbewahrt.

#### **3.4.13 Kontrolle der Transfektionseffizienz durch Mikroskopie und Durchflusszytometrie**

Durch die EGFP-Region des Plasmids pIRES2 konnte die Transfektionseffizienz und Transfektionspersistenz in den Glioblastomzellen überprüft werden. Das Protein EGFP fluoresziert bei

Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht grün. Unter dem Mikroskop konnte so regelmäßig kontrolliert werden, wie viele Zellen nach Beleuchten mit blauem Licht grün fluoreszieren. Außerdem wurde der Anteil an transfizierten Zellen in Abständen von 2 Monaten per Durchflusszytometrie-Analyse der Zellen bestimmt. Hierfür wurden die Zellen, wie in Abschnitt 3.4.11 beschrieben, gesplittet und 1 ml der in DMEM++ resuspendierten Zellen in FACS-Röhrchen gefüllt. Bis zur Durchflusszytometrie-Analyse wurden die Röhrchen bei 4 °C aufbewahrt.

### **3.5 In vitro-Experimente mit Zytostatika**

#### **3.5.1 Untersuchung der Proliferationsrate von *IDH1*-Wildtyp- bzw. *IDH1*-R132H-transfizierten und parentalen Glioblastomzellen**

Die Proliferationsraten von parentalen, *IDH1*-Wildtyp- und *IDH1*-R132H-transfizierten Glioblastomzellen wurden für die Zelllinien A-172, LN-18, LN-229 und U-87 MG verglichen. Hierfür wurden die parentalen (nicht transfizierten), die *IDH1*-Wildtyp-transfizierten und die *IDH1*-R132H-transfizierten Glioblastomzellen auf je einer 6-Well-Platte ausplattiert. Die langsam wachsenden Glioblastomzelllinien A-172 und U-87 MG wurden mit einer Zelldichte von  $3 \times 10^5$  Zellen/Well für 72 h angezüchtet, während die schnell wachsenden Glioblastomzelllinien LN-18 und LN-229 mit einer Zelldichte von  $2 \times 10^5$  Zellen/Well für 48 h kultiviert wurden. Danach wurde die Zellzahl, wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben, ermittelt. Die Zellen wurden wie oben beschrieben ausplattiert. Die Experimente wurden sechsmal wiederholt. Die Proliferationsrate der Zellen wurde dadurch bestimmt, dass die Zellzahl vor dem erneuten Aussähen durch die Anfangszellzahl geteilt wurde.

#### **3.5.2 Untersuchungen zur Zytotoxizität der Zytostatika Doxorubizin, CCNU und MMS**

Zur Zytotoxizitätsbestimmung der Zytostatika wurden die transfizierten, schneller wachsenden Zelllinien LN-229 und LN-18 mit einer Dichte von  $6 \times 10^3$  Zellen in 100 µl Medium/Well und die transfizierten Zelllinien A-172 und U-87 MG mit einer Dichte von  $8 \times 10^3$  Zellen in 100 µl Medium/Well auf 96-Well-Platten ausplattiert und für 24 h im Zellinkubator bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde aus den Stocklösungen der verschiedenen Zytostatika durch Verdünnung mit DMEM++ in je 20 µl pro Well eine Anfangskonzentration für eine Konzentrationsreihe für die jeweiligen Dosis-Wirkungskurven hergestellt, die dem 6-fachen der Endkonzentration entsprach, entsprechend 900 µM für CCNU, 9,6 mM für MMS und 30µM für Doxorubizin als jeweils höchste Konzentration. Aus der ursprünglichen Anfangslösung wurden 8 Verdünnungen generiert. Hierfür wurden für die Zytostatika Doxorubizin und MMS jeweils sequenzielle 1:2-Verdünnungen und für das Zytostatikum CCNU sequenzielle 1:3-Verdünnungen gewählt. Danach wurden 20 µl der Zytostatikalösung/Well hinzugefügt, so dass die tatsächlichen Konzentrationen in jedem Well  $\frac{1}{6}$  der hinzugefügten Zytostatika- Konzentration

entsprachen. Für die Kontrolle wurden statt der 20 µl Zytostatikallösung 20 µl DMEM++ hinzugefügt. Die Platten wurden für 72 h im Zellinkubator bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte eine Vitalitätsanalyse der Glioblastomzellen mit Hilfe der Kristallviolett -Färbung (siehe Abschnitt 3.6.1).

### 3.5.3 Behandlung der Glioblastomzellen mit Zytostatika

Um die Funktionalität des Reparaturenzyms ALKBH2 in *IDHI*-R132H- versus *IDHI*-Wildtyp-transfizierten Glioblastomzellen zu prüfen, wurden die transfizierten Glioblastomzelllinien A-172, LN-18, LN-229 und U-87 MG je nach experimenteller Intention mit verschiedenen Zytostatika-Konzentrationen behandelt. Die Proben wurden anschließend unterschiedlich weiterverarbeitet. Vor der mRNA-Extraktion bzw. Proteinextraktion wurden die *IDHI*-Wildtyp- bzw. *IDHI*-R132H-transfizierten Zellen der Zelllinie U-87 MG mit zwei unterschiedlichen Konzentration Doxorubizin, Lomustin bzw. Methylmethansulfonat behandelt. Es wurde bei dem Zytostatikum MMS zum einen eine Konzentration (1,6 mM) verwendet, bei der nach einstündiger Behandlung (siehe Abschnitt 4.2.3) kein Unterschied bezüglich des Ansprechens der Zellen auf das Zytostatikum mittels MTT-Assay festzustellen war. Zum anderen wurde die doppelte Konzentration (3,2 mM) verwendet, bei der in den mutanten Zellen eine höhere Zytotoxizität gegenüber MMS nachgewiesen wurde. Um die verschiedenen Zytostatika besser vergleichen zu können, wurden für die Quantifizierung der ALKBH2 mRNA und des ALKBH2 Proteins die Zytostatika-Konzentrationen verwendet, bei denen in den im Abschnitt 3.5.2 beschriebenen Experimenten ca. 10 % bzw. 30 % der OD<sub>590</sub> der Kontrolle gemessen wurden. In Tabelle 22 sind die Konzentrationen der in den verschiedenen Experimenten verwendeten Zytostatika aufgelistet.

**Tabelle 22:** Verwendete Zytostatika-Endkonzentration in den verschiedenen Experimenten.

Zytostatika	DOX	CCNU	MMS
MTT-Assay	nicht verwendet	nicht verwendet	6mM; 5mM; 4mM; 3 mM; 2mM
mRNA Extraktion	1µM; 0,63µM	165µM; 85µM	3,2mM; 1,6mM
Proteinextraktion	1µM; 0,63µM	165µM; 85µM	3,2mM; 1,6mM

### 3.5.4 Langzeitbehandlung der Glioblastomzellen mit Zytostatika

Die mit *IDHI*-Wildtyp- und die mit *IDHI*-R132H-Mutation transfizierten Zellen der Zelllinie U-87 MG wurden für 10 Tage mit den Zytostatika TMZ oder MMS behandelt. In einer 6 cm-Zellkulturschale wurden die Zellen mit einer Zelldichte von  $3 \times 10^3$  ausplattiert und für 24 h im Zellinkubator bei 37 °C inkubiert. Von jeder Zelllinie wurden 12 Zellkulturschalen mit je 6 Zellkulturschalen *IDHI*-Wildtyp - und mit 6 Zellkulturschalen *IDHI*-R132H-transfizierten Zellen ausgesät. Von den 6 Zellkulturschalen wurden 2 mit 400 µM bzw. mit 800 µM MMS, 2 mit 50 µM bzw. mit 25 µM TMZ, 1 als Negativkontrolle gar nicht behandelt und eine als Negativkontrolle der TMZ-Behandlung mit DMSO

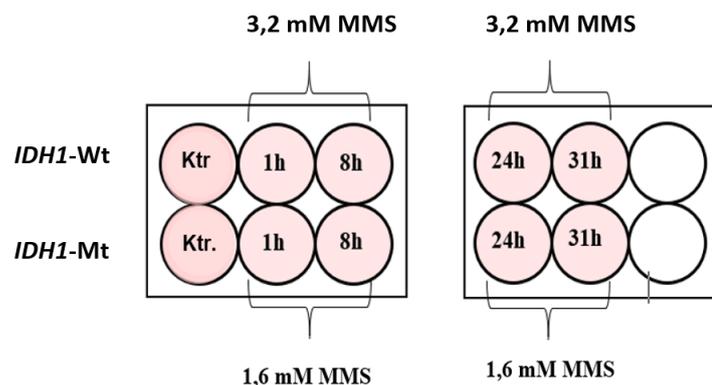
behandelt. Jeweils nach 72 h wurde das Medium von den Platten entfernt und durch frisches Zytostatika-haltiges Medium ersetzt. Nach 10 Tagen wurden die vitalen Zellen mit Hilfe des MTT-Assay I (siehe Abschnitt 3.6.2.1) gemessen.

### 3.5.5 Messung der $\gamma$ -pH2AX Expression mittels Durchflusszytometrie

#### 3.5.5.1 Vorbehandlung der verschiedenen Zelllinien mit MMS

Die stabil mit *IDH1*-Wildtyp- und *IDH1*-R132H-transfizierten Zellen der Zelllinie U-87 MG wurden mit einer Zelldichte von  $5 \times 10^5$  Zellen/Well in 2 ml DMEM++ auf 6-Well-Platten ausgesät und über Nacht im Zellinkubator kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte die Behandlung der Zellen mit MMS. Für die Kontrolle wurde bei jeweils einem Well mit *IDH1*-Wildtyp-transfizierten Zellen und einem Well mit *IDH1*-R132H-transfizierten Zellen ausschließlich ein Mediumwechsel vorgenommen. Die restlichen Wells, die die *IDH1*-Wildtyp- bzw. die *IDH1*-R132H-transfizierten Zellen enthielten, wurden jeweils mit 3,2 mM MMS für 1 h behandelt, wobei jedoch verschiedene Zeitintervalle zwischen der Beendigung der Zytostatika-Behandlung und der Probenentnahme gewählt wurden, die im Folgenden als Erholungszeiten bezeichnet werden.

In einer Arbeit von Staszewski et al. [89] wurde die Kinetik der Expression von  $\gamma$ -H2AX in CHOP-9 Zellen untersucht. Hierbei wurden als Erholungszeiten nach MMS-Behandlung 1 h, 4 h, 9 h, 14 h, 19 h und 24 h gewählt. Basierend auf den Ergebnissen dieser Publikation erfolgte in der vorliegenden Dissertationsarbeit die Probenanalyse nach den Erholungszeiten 1 h, 8 h, 24 h und 31 h.



**Abb. 2: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus der  $\gamma$ -pH2AX-Messung.**

In den oberen Wells der 6-Well-Platten wurden *IDH1*-Wildtyp-Zellen (*IDH1*-Wt), in die unteren Wells der 6-Well-Platten *IDH1*-R132H-mutierte Zellen (*IDH1*-Mt) der Zelllinie U-87 MG pipettiert. Die Stundenangabe in den Wells zeigt die Erholungszeit nach der Behandlung mit MMS an. Die unbehandelten Zellen wurden als Kontrolle (Ktr.) bezeichnet.

#### 3.5.5.2 Probenaufarbeitung und Durchflusszytometrie

Das Medium wurde aus den Wells entnommen und in FACS-Röhrchen gefüllt. Anschließend wurden die Wells mit 1 ml PBS (-/-) gewaschen und das PBS wurde dem FACS-Röhrchen zugeführt, in dem

sich bereits das Medium befand. Die Zellen wurden durch Zugabe von Trypsin von den Platten gelöst (wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben). Danach wurde das in den FACS-Röhrchen befindliche Medium in die Wells pipettiert und die Zellsuspension in die FACS-Röhrchen gefüllt. Um möglichst alle Zellen zu ernten, wurden die Wells mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend wurde das PBS in die gleichen FACS-Röhrchen pipettiert. Die Zellsuspension in den FACS-Röhrchen wurde bei 1.300 rpm für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der flüssige Überstand aus den FACS-Röhrchen entfernt, so dass nur das Zellpellet zurückblieb. Das Zellpellet wurde in 100 µl 3,7 %igem Formaldehyd (37 %iges Formaldehyd verdünnt in PBS) resuspendiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde in jedes FACS-Röhrchen 1 ml PBS hinzugefügt und die Röhrchen wurden dann bei 1.300 rpm für 5 min zentrifugiert. Danach wurde der flüssige Überstand aus den Röhrchen entfernt, so dass nur das Zellpellet zurückblieb. Da sich dieser Arbeitsschritt bestehend aus Hinzufügen von PBS in die FACS-Röhrchen, Zentrifugation und Entfernen des flüssigen Überstandes noch häufiger wiederholen wird, wird im Folgenden nur noch vom Waschschrift des Pellets gesprochen. Das Zellpellet wurde in 100 µl 3 % FCS (verdünnt in PBS) resuspendiert und bis zur Weiterverarbeitung bei 4 °C gelagert. Die Weiterverarbeitung erfolgte durch einen Waschschrift des Pellets. Anschließend wurde das Pellet in 100 µl 0,1 % Triton X-100 gelöst und für 5 min bei RT inkubiert. Nach einem Waschschrift des Pellets wurde das Pellet in 50 µl der FACS-Antikörperlösung bestehend aus 1:10 anti- $\gamma$ -pH2AX-Antikörper (verdünnt in PBS) resuspendiert und für 60 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Danach wurden die ungebundenen Antikörper durch einen Waschschrift des Pellets ausgewaschen und das Pellet wurde in 20 µl 7AAD und 200 µl PBS resuspendiert. Die Messung von  $\gamma$ -H2AX erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie durch die Quantifizierung des an den anti- $\gamma$ -H2AX gebundenen Antikörper, welcher mit dem fluoreszierenden Fluorophore APC gekoppelt war. Bis zur Messung des gebundenen  $\gamma$ -pH2AX wurden die in den FACS-Röhrchen befindlichen Zellen im Dunkeln bei 4 °C gelagert.

### **3.5.6 Messung von $\gamma$ -H2AX in den transfizierten Glioblastomzelllinien nach Behandlung mit MMS**

Die mit *IDHI*-Wildtyp bzw. mit der *IDHI*-R132H-Mutation transfizierten Zelllinien A-172, LN-18, LN-229 und U-87 MG wurden mit 3,2 mM MMS behandelt und anschließend 48 h im Zellinkubator kultiviert (sog. Erholungszeit). Hiernach erfolgte eine Messung des Proteins  $\gamma$ -H2AX mit Hilfe der Western-Blot-Methode (siehe Abschnitt 3.3).

## **3.6 Vitalitätsprüfung von Glioblastomzellen nach Zytostatika-Behandlung**

### **3.6.1 Kristallviolett-Färbung**

Mit der Kristallviolett-Färbung können spektralphotometrisch durch das Anfärben der DNA adhärenter Zellen Rückschlüsse auf die Zellzahl gezogen werden. Für diese Methode wurden die Glioblastomzellen auf 96-Well-Platten ausplattiert, für 24 h im Zellinkubator kultiviert und hiernach für 72 Stunden mit den Zytostatika (siehe Abschnitt 3.5.2) behandelt. Danach wurde zu jedem Well in einem Verhältnis 1:1 zum Medium Kristallviolett-Lösung (siehe Abschnitt 2.3.4) hinzugefügt und die Platten wurden zum Anfärben und Fixieren der Zellen für mindestens 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Platten mehrmals mit Wasser ausgespült, so dass nur die durch Kristallviolett gefärbten und fixierten Zellen in den Platten verblieben. Durch das Hinzufügen von 100 µl 10 %iger Essigsäure wurde das Kristallviolett in Lösung gebracht. Anschließend wurde die Absorption photometrisch bei 590 nm bestimmt, da diese Wellenlänge dem Absorptions-Maximum des Farbstoffes entsprach.

### **3.6.2 MTT-Assay**

Der MTT-Assay diente in den hier durchgeführten Experimenten zum Nachweis lebender Zellen nach der Behandlung mit Zytostatika. Die Methode beruht darauf, dass der gelbe Farbstoff des Tetrazoliums Salzes MTT (3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid) in Zellen insbesondere durch Enzyme des endoplasmatischen Retikulums mit Hilfe der Reduktionsäquivalente NADH und NADPH zu dem wasserunlöslichen blau-violetten Farbstoff Formazan reduziert wird. Nach der Anfärbung der Zellen, wurden die Platten gewaschen, Medium wurde gewechselt und somit das noch im Medium vorhandene und nicht in Formazan umgewandelte MTT entfernt. Eine anschließende Lyse der adhärenter Zellen führte zur Freisetzung und Lösung des Farbstoffes Formazan. Hiernach erfolgte die Messung der optischen Dichte bei 570 nm, was dem Peak des Farbstoffes Formazan entspricht und sich proportional zur Zellzahl verhält.

In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurden zwei verschiedene MTT-Assays verwendet, welche hier als MTT-Assay I und MTT-Assay II benannt werden. Für die Bestimmung der Vitalität der Glioblastomzellen nach der 10-tägigen Behandlung mit den Zytostatika MMS und TMZ wurde der MTT-Assay I durchgeführt. Für die Bestimmung der Vitalität von Glioblastomzellen nach 1 h Behandlung mit hoch konzentriertem MMS sowie nach der 48-stündigen Kultivierung wurde der MTT-Assay II verwendet.

#### **3.6.2.1 MTT-Assay I**

Nach der Langzeitbehandlung der Glioblastomzellen mit TMZ oder MMS wurde zu jeder Zellkulturschale MTT-Lösung (siehe Abschnitt 2.3.4) in einem Verhältnis zu DMEM++ von 1:4

hinzugefügt und das Gemisch für 4 h bei 37 °C im Zellinkubator inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit von den Zellkulturschalen entfernt und es wurden auf jede Zellkulturschale 3 ml DMSO und 375 µl Sorenson's Glycerol buffer pipettiert. Das Zelllysate wurde in 15 ml-Falcon-Röhrchen überführt und von jedem Lysat wurde ein Triplikate mit je 100 µl auf 96-Well-Platten aufgetragen. Anschließend erfolgte die Absorption der Proben mittels photometrischer Messung bei einer Wellenlänge von 570 nm sowie bei einer Referenzwellenlänge von 630 nm.

### **3.6.2.2 MTT-Assay II**

Die Glioblastomzellen wurden für 1 h mit Zytostatika behandelt. Danach wurde das Medium gegen 100 µl pro Well DMEM++ ausgetauscht. Die Zellen wurden für 48 h im Zellinkubator bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Vitalitätsanalyse der Zellen mit Hilfe der MTT-Analyse. Hierfür wurde zu jedem Well der 96-Well-Platte 10 µl MTT-Lösung (siehe Abschnitt 2.3.4) hinzugefügt und das Gemisch für 1 h im Zellinkubator bei 37 °C inkubiert. Danach wurden auf jedes Well 100 µl MTT-Assay II-Solubilisator (siehe Abschnitt 2.3.4) pipettiert. Die Zellen wurden über Nacht in Dunkelheit im Solubilisator lysiert, wodurch das Formazan gelöst wurde. Am nächsten Tag wurde die optische Dichte bei 570 nm sowie bei 650 nm photometrisch gemessen. Für die Analyse der Zellvitalität wurde der bei 650 nm gemessene Wert als Hintergrund, von dem bei 570 nm gemessenen Wert subtrahiert.

## **3.7 Bestimmung der MGMT-Promotor-Hypermethylierung in den transfizierten Glioblastomzelllinien**

### **3.7.1 DNA-Extraktion aus Glioblastomzellen**

Eine DNA-Extraktion wurde von den parentalen, *IDH1*-Wildtyp- und *IDH1*-R132H-transfizierten Glioblastomzellen der Zelllinien A-172, LN-18, LN-229 und U-87 MG durchgeführt. Hierfür wurde ein Zellpellet aus 2-4 Millionen Zellen nach der Kultur auf 10 cm-Platten in Eppendorf-Röhrchen in 200 µl PBS aufgenommen. Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit der Firma QIAGEN. Die DNA-Extraktion wurde, wie im Handbuch des Herstellers in dem Abschnitt "Purifying gDNA from Mammalian Cells" nach den Angaben zu Mini-Säulen beschrieben, durchgeführt. Die DNA wurde bei 4 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

### **3.7.2 Natriumbisulfit-Behandlung der extrahierten DNA und methylierungsspezifische PCR**

Um den *MGMT*-Promotormethylierungsstatus der verwendeten Zelllinien festzustellen, wurde eine methylierungsspezifische PCR durchgeführt. Hierbei wurde untersucht, ob sich der *MGMT*-Promotormethylierungsstatus nach der Transfektion mit dem *IDH1*-Wildtyp-bzw. mit dem *IDH1*-R132H-Mutation kodierenden Plasmid verändert hat. Hierfür wurden insgesamt 15 DNA-Proben auf

ihren *MGMT*-Promotormethylierungsstatus hin untersucht. Bei 12 der 15 Proben handelte es sich um DNA der untersuchten Zelllinien A-172, LN-18, LN-229 und U-87 MG. Hierbei wurden von jeder Zelllinie DNA-Proben von parentalen sowie von *IDH1*-Wildtyp- bzw. *IDH1*-R132H-transfizierten Zellen gewonnen. Bei den restlichen 3 der 15 DNA-Proben handelte es sich um Kontrollen. Zwei Proben enthielten DNA, welche im Institut für Neuropathologie der Heinrich-Heine-Universität standardmäßig für die Analyse der *MGMT*-Promotormethylierung bei Glioblastompatienten als Kontrollen verwendet werden. Als Kontrolle eines unmethylierten *MGMT*-Promotors diente hierbei DNA, die aus Blutzellen gewonnen wurde und als Kontrolle eines methylierten *MGMT*-Promotors wurde DNA benutzt, die von der Zelllinie A-172 stammte. Die 15te Probe war eine Negativkontrolle, welche keine DNA enthielt.

Für die Analyse des *MGMT*-Promotormethylierungsstatus erfolgte eine Behandlung der DNA mit Natriumbisulfit, wodurch unmethyliertes Cytosin in Uracil umgewandelt wird, während methyliertes Cytosin unverändert bleibt. In einer nachfolgenden methylierungsspezifischen PCR wird das Uracil als Thymin abgelesen, wohingegen das methylierte Cytosin weiterhin als Cytosin erkannt wird und von dem unmethylierten Cytosin unterschieden werden kann [72]. Für die Vorbereitung und Behandlung der DNA mit Natriumbisulfit wurde der EZ DNA Methylation Gold Kit von der Firma Zymo Research verwendet und es wurden die im Kurzprotokoll des Herstellers beschriebenen Schritte durchgeführt. Für die methylierungsspezifische PCR der modifizierten DNA wurde der in Tabelle 23 aufgelistete Reaktionsmix für 15 Proben zusammengestellt und es wurden zu 1 µl Bisulfit-behandelter DNA 19 µl des Reaktionsmixes in PCR-Platten hinzupipettiert. Um herauszufinden, ob die Proben und somit die Zellen einen gemischten *MGMT*-Promotormethylierungsstatus haben oder nicht, wurde auch eine PCR mit Primern für die unmethylierten *MGMT*-Promotorabschnitte durchgeführt. Die Zusammenstellung des Reaktionsmixes ist in Tabelle 24 aufgelistet. Bei dieser PCR wurde ebenfalls zu 19 µl des Reaktionsmixes 1 µl Bisulfit-behandelte DNA in PCR-Platten pipettiert. Die PCR wurde wie in Tabelle 25 beschrieben durchgeführt.

**Tabelle 23:** Reaktionsmix für die methylierungsspezifische PCR mit Primern für methylierte Templates.

Komponenten	Reaktionsmix (1x)	Reaktionsmix (15x)
dNTP	2,500 µl	40 µl
10x PCR Buffer	1,500 µl	40 µl
DMSO 100 %	1,250 µl	20 µl
MGMT-M/F2	1,500 µl	24 µl
MGMT-M/R2	1,500 µl	24 µl
HotStarTaq-Polymerase	0,125 µl	2 µl
MilliQ H <sub>2</sub> O	14,625 µl	234 µl

**Tabelle 24:** Reaktionsmix für die methylierungsspezifische PCR mit Primern für unmethylierte Templates.

Komponenten	Reaktionsmix (1x)	Reaktionsmix (16x)
dNTP	2,500 µl	40 µl
10x PCR Buffer	1,500 µl	40 µl
MGMT-U/F2	1,500 µl	24 µl
MGMT-U/R2	1,500 µl	24 µl
HotStarTaq-Polymerase	0,125 µl	2 µl
MilliQ H <sub>2</sub> O	15,875 µl	254 µl

**Tabelle 25:** Einstellung des Thermocyclers für die methylierungs-spezifische PCR.

	Methylierte PCR	Unmethylierte PCR
Zyklen	36	38
Anfangsdenaturierung	95 °C für 15 min	95 °C für 15 min
Denaturierung	95 °C für 30 s	95 °C für 30 s
Anealing	54 °C für 30 s	56 °C für 30 s
Elongation	72 °C für 30 s	72 °C für 30 s
Auffüllphase	72 °C für 5 min	72 °C für 5 min
Lagerungstemperatur bis zur Weiterverarbeitung	4 °C	4 °C

### 3.7.3 Analyse der *MGMT*-Promotormethylierung mittels Pyrosequenzierung

Die DNA-Methylierungsanalyse mittels Pyrosequenzierung von Bisulfit-behandelter DNA ermöglicht präzise quantitative Bestimmungen sowie Messungen der DNA-Methylierungsmuster innerhalb des untersuchten DNA-Abschnitts. Die DNA-Methylierungsanalyse des *MGMT*-Promotors diente dazu, zusätzlich zur generellen Bestimmung eines methylierten *MGMT*-Promotors herauszufinden, ob in *IDHI*-R132H-mutanten transfizierten Zellen eine quantitative Zunahme der Methylierung des *MGMT*-Promotors zu beobachten ist. Letzteres wäre ggf. durch eine Inhibition verschiedener in epigenetische Modifikationen der DNA involvierter Enzyme zu erklären (siehe Abschnitt 1.3.2).

Die Pyrosequenzierung basiert auf dem Prinzip des *Sequencing-by-Synthesis* [90]. Nach der Amplifikation des zu untersuchenden DNA-Abschnittes erfolgt die Neusynthese des Folgestrangs durch den Einbau von Nukleotiden durch eine DNA-Polymerase. Wird ein komplementäres Nukleotid in den Folgestrang eingebaut, führt dies zur Freisetzung von Pyrophosphat, welches durch die in Abbildung 3 beschriebene Reaktion und unter Beteiligung einer Luciferase zur Freisetzung von Licht führt. Durch eine CCD-Kamera wird das Lichtsignal detektiert und durch eine Software als Peak visualisiert, wobei sich die Anzahl der eingebauten Nukleotide proportional zur Höhe des Peaks verhält [91].



DNA. Hierfür wurden die Kartuschen des PyroMark-Gerätes mit Milli-Q H<sub>2</sub>O aufgefüllt und mit Enzym, Substrat und Nukleotiden beladen (siehe Tabelle 27). Dann wurden die Sequenzierplatte und die Kartusche ins PyroMark-Gerät gestellt und es erfolgte die Pyrosequenzierung mit den in Tabelle 28 beschriebenen Einstellungen.

**Tabelle 27:** Reaktionmix für die Pyrosequenzierungs-PCR.

Komponenten	Reaktionsmix (1x)	Reaktionsmix (16x)
10x PCR Buffer	2,5 µl	45,0 µl
2 mM dNTPs	2,5 µl	45,0 µl
MD_MGMT_PSQ_F1	1,0 µl	18,0 µl
MD_MGMT_PSQ_R1bio	1,0 µl	18,0 µl
<b>HotStar Taq DNA Polymerase</b>	0,2 µl	3,6 µl
MilliQ H <sub>2</sub> O	16,8 µl	302,4 µl

**Tabelle 28:** Einstellung des Thermocyclers für die Synthese des PCR-Produktes für die Pyrosequenzierung.

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Anfangsdenaturierung	95 °C	15 min	1
Denaturierung	95 °C	30 s	45
Anealing	52 °C	30 s	
Elongation	72 °C	30 s	
Auffüllphase	72 °C	5 min	1
Lagerungstemperatur bis zur Weiterverarbeitung	8 °C	∞	1

Die prozentuale Bestimmung der CpG-Alkylierung der *MGMT*-Promotorregion erfolgte mit der Software PyroMark Q24 1.0.10.

### 3.8 Transfektion von Glioblastomzellen mit siRNA gegen MGMT

#### 3.8.1 Transfektion der MGMT-siRNA oder Negative Control siRNA

In 4 Wells einer 24-Well-Platte wurden  $2 \times 10^4$  Zellen/Well der *IDH1*-Wildtyp-Zellen bzw. der *IDH1*-R132H-transfizierten Zellen der Zelllinie LN-18 ausplattiert. Die Zellen wurden für 24 h im Zellinkubator kultiviert. Danach wurde das Medium von den Platten entfernt und in jedes Well wurden 400 µl DMEM mit 10 % FCS hinzugefügt. Anschließend erfolgte in 2 Wells mit *IDH1*-Wildtyp-Zellen und in 2 Wells mit *IDH1*-R132H-transfizierten Zellen die Transfektion mit 25 nmol MGMT-siRNA pro

Well. Zusätzlich wurden in weiteren 2 Wells mit *IDHI*-Wildtyp-Zellen und in 2 Wells mit *IDHI*-R132H-transfizierten Zellen die Transfektion durch 50 nmol *Negative Control*-siRNA pro Well durchgeführt. Für die Transfektion mit MGMT-siRNA wurde in einem Eppendorf-Röhrchen der in Tabelle 29 beschriebene Reaktionsmix hergestellt. In einem weiteren Eppendorf-Röhrchen wurde der Reaktionsmix wie in Tabelle 30 angegeben für die Transfektion mit *Negative Control*-siRNA vorbereitet. Als Transfektionsreagenz für die beiden Transfektionen diente Lipofectamine®2000. Lipofectamine®2000 wurde in einem weiteren Eppendorf-Röhrchen in Opti-MEM™ (siehe Tabelle 31) verdünnt. Beide Ansätze wurden vorsichtig invertiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Lipofectamin-Ansatz dem siRNA-Ansatz hinzugefügt und nach Auf- und Abpipettieren für weitere 20 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden 100 µl des siRNA-Lipofectamin-Gemisches bzw. des *Negative Control*-siRNA-Lipofectamin-Gemisches zu jedem Well hinzugefügt und für 6 h im Zellinkubator inkubiert. Danach wurde das Medium entfernt und in jedes Well wurde 1 ml DMEM++ pipettiert. Die transfizierten Zellen wurden für 24 h im Zellinkubator kultiviert.

**Tabelle 29:** Reaktionsmix für die Transfektion von MGMT-siRNA.

	Reaktionsmix (1x)	Reaktionsmix (5x)
Opti-MEM™	7,5 µl	37,5 µl
MGMT-siRNA I	2,5 µl	12,5 µl

**Tabelle 30:** Reaktionsmix für die Transfektion von *Negative Control*-siRNA.

	Reaktionsmix (1x)	Reaktionsmix (5x)
Opti-MEM™	45 µl	225 µl
<i>Negative Control</i> – siRNA	5 µl	25 µl

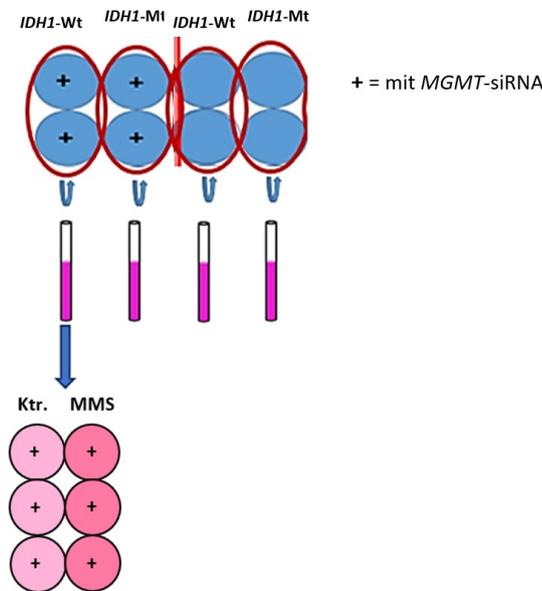
**Tabelle 31:** Reaktionsmix der Vektorlösung.

	Reaktionsmix (1x)	Reaktionsmix (10x)
Opti-MEM™	49,2 µl	492 µl
Lipofectamine®2000	0,8 µl	8 µl

### 3.8.2 Behandlung der siRNA-transfizierten Glioblastomzellen mit MMS

Nach der siRNA-Transfektion beinhalteten 4 Wells der 24-Well-Platte *IDHI*-Wildtyp-Zellen und 4 weitere Wells *IDHI*-R132H-mutanten Zellen. Jeweils die Hälfte der Wells war mit MGMT-siRNA und die andere Hälfte mit *Negative Control*-siRNA transfiziert worden (siehe Abbildung 4). Für die Behandlung der transfizierten Zellen mit MMS wurden die Zellen mittels Trypsins gelöst und in DMEM++ verdünnt. Die jeweils zwei gleichen Proben wurden vereint und dann auf 6 Wells einer 96-

Well-Platte aufgeteilt. Nach 4 h im Zellinkubator wurden von jeder Probe 3 der 6 Wells mit je 2 mM bzw. 4 mM MMS behandelt. Die anderen 3 Wells dienten als Kontrolle und wurden ausschließlich mit DMEM++ behandelt. Nach 1 h wurde das Medium entfernt und durch 100  $\mu$ l DMEM++ ersetzt. Die Zellen wurden für weitere 48 h im Inkubator kultiviert. Anschließend wurde ein MTT-Assay (siehe Abschnitt 3.6.2.2) durchgeführt.



**Abb. 4:** Schematische Darstellung der siRNA-Transfektion und anschließender Methylmethansulfonat-Behandlung von *IDH1*-Wildtyp- und *IDH1*-R132H-mutierten Zellen der Glioblastomzelllinie LN-18.

### 3.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Software Graphpad Prism 9. Für den Vergleich zwischen den gewonnenen Daten von *IDH1*-Wildtyp- und von *IDH1*-R132H-transfizierten Glioblastomzellen wurde die zweifaktorielle Varianzanalyse (two-way *ANOVA*) kombiniert mit der Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Für die Datenanalyse von 3 oder mehr Gruppen, wie es z.B bei dem Vergleich der Daten zwischen den verschiedenen Zelllinien der Fall war, wurde der nonparametrische Kruskal-Wallis-Test mit dem *Dunn's Multiple Comparison*-Test kombiniert. Die Berechnung von Mittelwerten und Standardabweichungen wurde mit der Funktion *Column Statistics* der Software Graphpad Prism durchgeführt. Das Signifikanzniveau  $\alpha$  wurde bei p-Werten kleiner 0,05 angesetzt. Die p-Werte <0,05 sind mit \*, p-Werte < 0,01 mit \*\* und p-Werte < 0,001 mit \*\*\* markiert.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Nachweis des Transfektionserfolges und der Transfektionseffizienz

In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurde die Sensibilität von mit *IDHI*-Wildtyp- und *IDHI*-R132H-mutierten Genen transfizierten Glioblastomzellen gegenüber Zytostatika untersucht. Als Grundvoraussetzung für die Versuche und die daraus resultierenden Ergebnisse wurden verschiedene etablierte Glioblastomzelllinien mit dem Plasmid pIRES2-EGFP transfiziert, das entweder das *IDHI*-Wildtyp-Gen oder das *IDHI*-R132H-mutierte Gen kodiert.

#### 4.1.1 Anreicherung der transfizierten Glioblastomzellen mittels Durchflusszytometrie

Zur Trennung der erfolgreich transfizierten Zellen von den nicht-transfizierten Zellen wurde die FACS-Methode angewandt. In Abbildung 5 sind beispielhaft die Ergebnisse der Durchflusszytometrie von U-87 MG-Zellen nach stabiler Transfektion mit dem für mutantes *IDHI* kodierenden Plasmid pIRES-EGFP-*IDHI*(R132H) dargestellt.

Insgesamt wurden von dem FACS-Gerät  $1,6 \times 10^6$  Ereignisse aufgezeichnet. Die Zellpopulation wurde zunächst basierend auf der Zellgröße und Zellgranularität *gated* (R1). In *gate 2* (R2) erfolgte eine Beschränkung auf Einzelzellen mittels der SSC-Width and SSC-Height, um mögliche Zellcluster auszugrenzen. In einem dritten *Gatingschritt* (R3) erfolgte sodann eine Beschränkung auf die GFP-positiven Zellen. Die Zellen, die sich in R3 befanden, wurden mittels *Cell Sorting* aus dem ursprünglichen Zellpool herausgefiltert, aufgefangen und wieder in Kultur gebracht. In dem abgebildeten Beispiel der U-87 MG-Zellen, die mit dem für mutantes *IDHI*-kodierenden Plasmid transfiziert waren, befanden sich  $8 \times 10^4$  Zellen in dem R3-*Gate* und wurden entsprechend *gesortet* und anschließend weiterkultiviert (Abbildung 5).

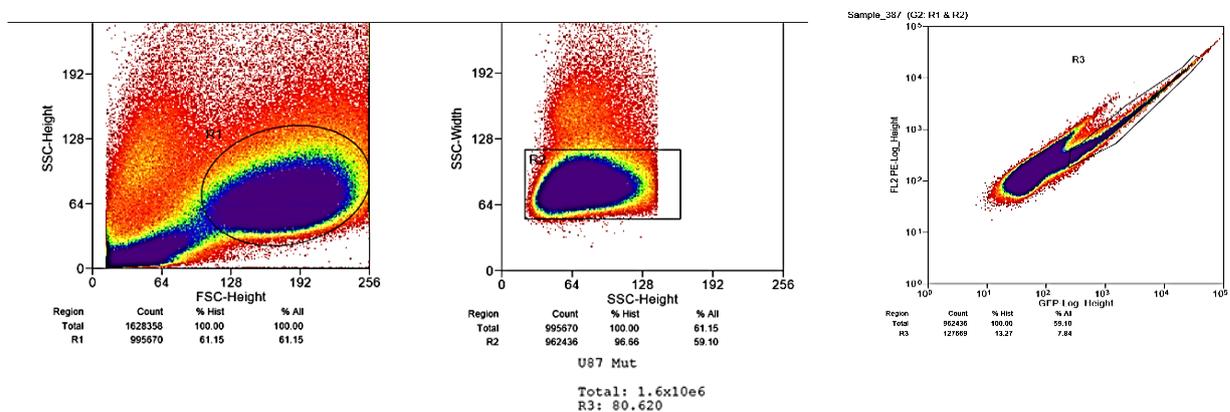


Abb. 5: Repräsentative Darstellung der FACS-Einstellung zum Cell Sorting der transfizierten Zellen am Beispiel der *IDHI*-R132H-mutanten Zellen der Zelllinie U-87 MG.

#### 4.1.1 Nachweis des Transfektionserfolges mittels Western-Blot Analyse

Zur Überprüfung der erfolgreichen Transfektion und des erfolgreichen *Cell Sortings* der verschiedenen Zelllinien wurde das IDH1-Wildtyp-Protein (Abbildung 6A) oder das IDH1-R132H-mutierte Protein (Abbildung 6B) durch die Western-Blot-Methode in den transfizierten Zellen nachgewiesen. Als Referenzprotein diente Vinculin. Das IDH1-Wildtyp-Protein war in allen transfizierten Zellen nachweisbar (Abbildung 6A), während die Expression des IDH1-R132H-mutierten Proteins ausschließlich in den mit dem *IDH1*-R132H-Plasmid transfizierten Zellen detektierbar war (Abbildung 6B).

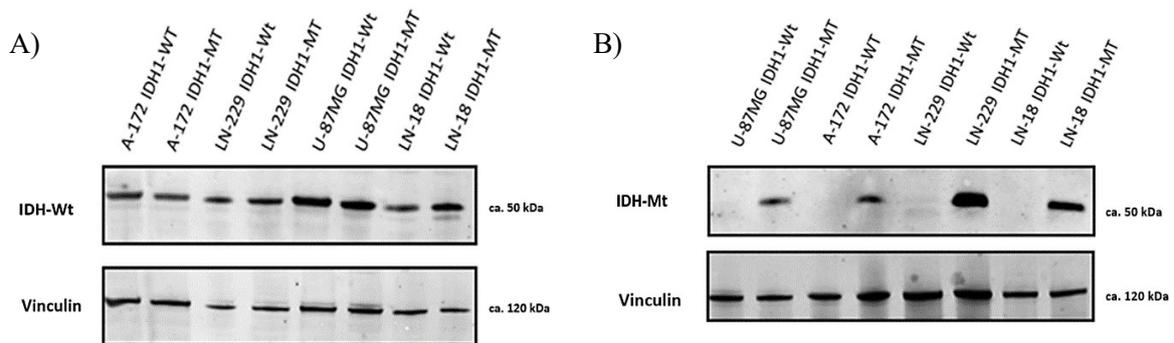


Abb. 6: Nachweis des IDH1-Wildtyp Proteins (A) bzw. des *IDH1*-R132H-mutierten Proteins (B) in den transfizierten Glioblastomzellen mit Hilfe der Western-Blot Methode.

#### 4.1.2 Nachweis der enzymatischen Funktionalität der *IDH1*-R132H-Mutation mittels Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (GC-MS)

Die Funktionalität des in Glioblastomzellen transfizierten IDH1-Wt-Enzyms und des IDH1-R132H-mutierten Enzyms wurde durch Quantifizierung des Oncometaboliten D-2-HG mittels GC-MS in Zusammenarbeit mit Katrin Weber und Tabea Mettler-Altmann am Institut für Biochemie der Pflanzen ermittelt. In allen *IDH1*-R132H-transfizierten Glioblastomzelllinien ließ sich eine höhere Konzentration des Metaboliten D-2-HG im Vergleich zu den parentalen und den *IDH1*-Wt-transfizierten Glioblastomzellen nachweisen (Abbildung 7). Die Ergebnisse weisen auf eine intakte enzymatische Funktion des *IDH1*-R132H-mutierten Proteins in den transfizierten Zellen hin.

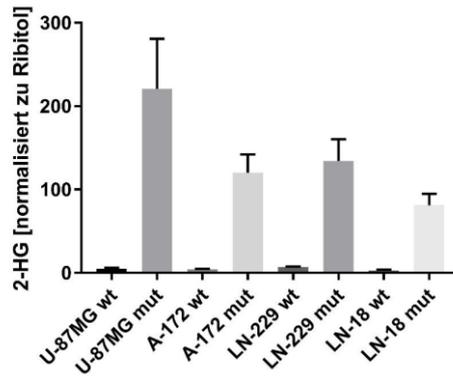


Abb. 7: Konzentration von 2-HG (2-Hydroxyglutarat) in *IDH1*-Wildtyp und *IDH1*-R132H transfizierten Glioblastomzellen.

#### 4.1.3 Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels Durchflusszytometrie

Die EGFP-Intensität der mit Wildtyp-*IDH1* oder mit *IDH1*-R132H transfizierten Glioblastomzellen wurde regelmäßig mittels Durchflusszytometrie kontrolliert. Das Gen GFP diente als sog. Reporter gen, was bedeutet, dass die Translation des GFP-Gens an die Translation der transfizierten Gene gekoppelt ist. In Abbildung 8 sind repräsentativ für die zweimonatlichen Kontrollen der Transfektionseffizienz die Ergebnisse einer Kontrolle der Zelllinie U-87 MG dargestellt. Um die transfizierten Zellen von den nicht transfizierten Zellen zu differenzieren, wurde die Fluoreszenzintensität der nicht transfizierten Zellen gemessen. Bei Messungen im höheren Bereich der Fluoreszenzintensität handelt es sich um die transfizierten Zellen. In dem unten genannten Beispiel der Zelllinie U-87 MG waren 93% der mit einem *IDH1*-Wildtyp transfizierten Zellen und 99% der mit *IDH1*-R132H-Mutation transfizierten Zellen weiterhin erfolgreich transfiziert.

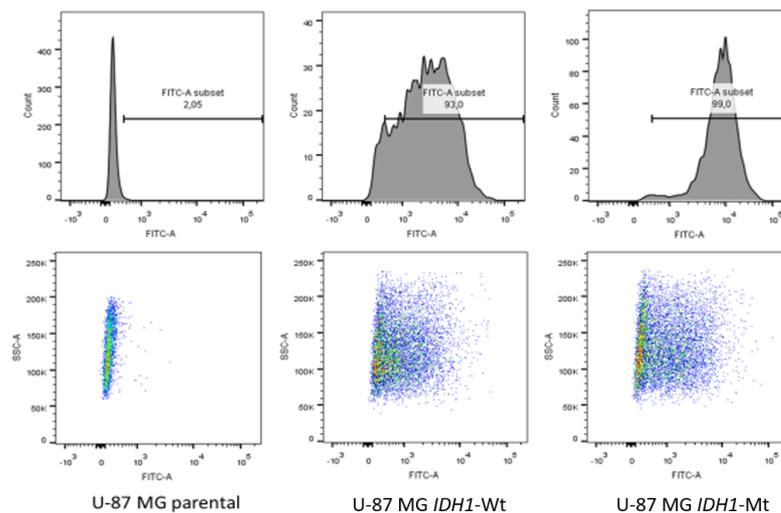


Abb. 8: Bestimmung der Intensität von EGFP in den transfizierten und nicht transfizierten Zellen der Zelllinie U-87 MG.

Mittels dem FITC-A - Gate wurde die Transfektionseffizienz bestimmt. Dementsprechend exprimierten noch 93% der Zellen, welche initial mit dem *IDH1*-Wildtyp kodierendem Plasmid transfiziert waren und 99% der initial mit dem *IDH1*-R132H kodierenden Plasmid transfizierten Zellen das Reporter gen GFP. EGFP, enhanced-green-fluorescent protein.

## 4.2 Zytostatikabehandlung der *IDH1*-Wildtyp- bzw. *IDH1*-R132H-transfizierten Glioblastomzellen

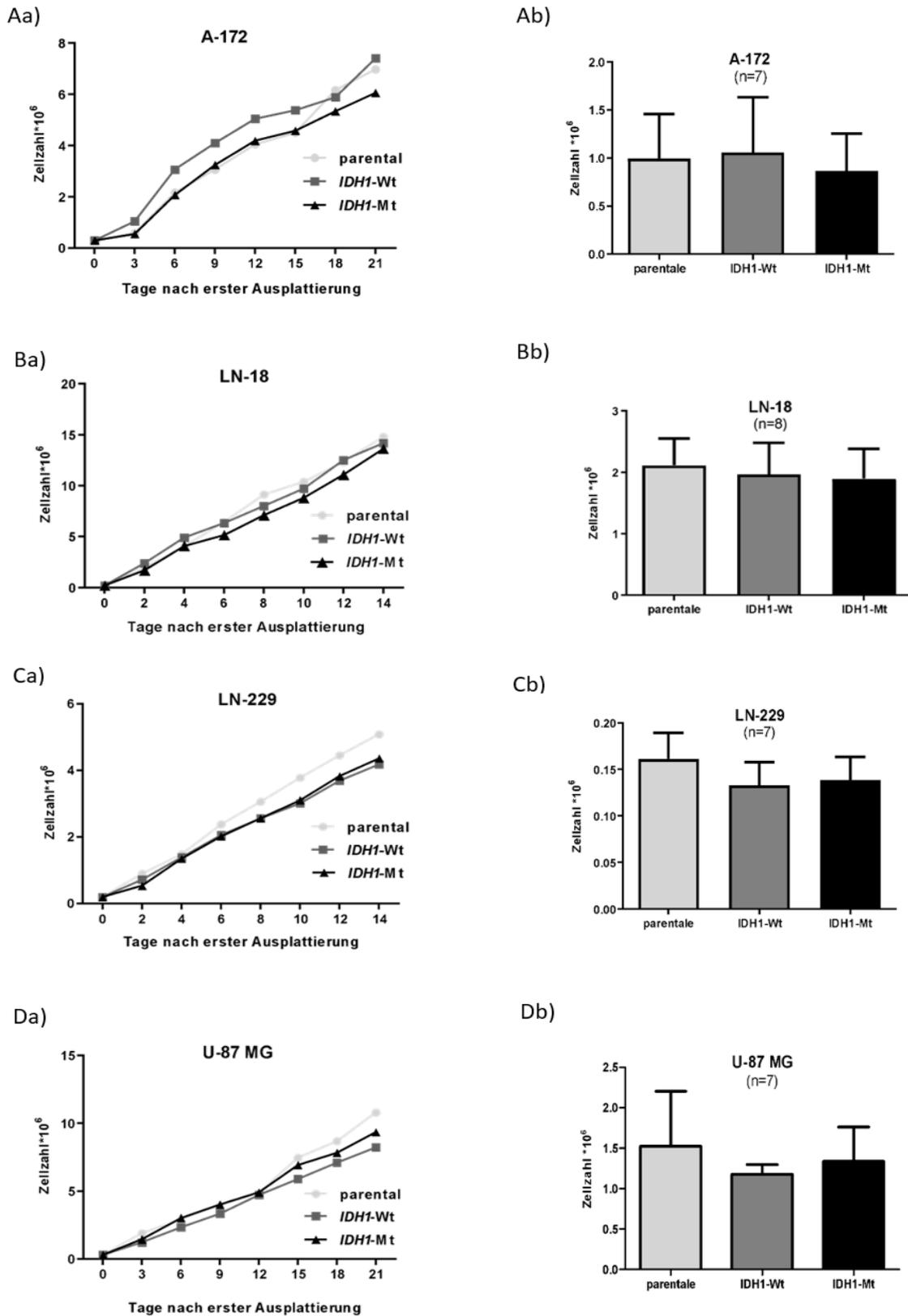
Das Enzym ALKBH2 repariert DNA-Schäden, welche durch monofunktionale Alkylanzien verursacht werden, und könnte dadurch an der Resistenzbildung von Glioblastomen gegenüber Temozolomid beteiligt sein [61]. Falls der in *IDH1*-R132H-positiven Zellen gebildete Onkometabolit D-2-HG zu einer kompetitiven Hemmung des  $\alpha$ -KG-abhängigen Enzyms ALKBH2 führt, würden monofunktionale Alkylanzien wie MMS und TMZ zytotoxischer in *IDH1*-R132H-exprimierenden Zellen als in *IDH1*-Wildtyp-Zellen wirken. Diese Hypothese wurde in den eigenen Untersuchungen experimentell überprüft.

### 4.2.1 Wachstumsrate der parentalen und transfizierten Glioblastomzellen

Viele Zytostatika haben eine zellzyklusabhängige Wirkung. Die Voraussetzung für eine Vergleichbarkeit der Zytostatika-Sensibilität zwischen *IDH1*-Wildtyp- und *IDH1*-R132H-transfizierten Glioblastomzellen ist eine vergleichbare Proliferationsrate. Aus diesem Grund wurde die Proliferationsrate der parentalen und transfizierten Glioblastomzellen bestimmt und verglichen (siehe Abschnitt 3.5.1).

Für jede Zelllinie wurden sieben unabhängige Zellzahlmessungen der parentalen, der *IDH1*-Wildtyp- und der *IDH1*-R132H-transfizierten Zellen durchgeführt. Anschließend wurden die Wachstumskurven der Zelllinien ermittelt (Abbildung 9 Aa-Da). Hierfür wurde auf der Ordinate die seit dem Zeitpunkt des Ausplattierens berechnete Gesamtzellzahl dargestellt. Auf der X-Achse wurden die Tage nach dem ersten Ausplattieren abgebildet. Die Wachstumskurve der *IDH1*-Wildtyp-exprimierenden Zellen der Zelllinie A-172 verlief zu jedem Messpunkt parallel zu der Wachstumskurve der *IDH1*-R132H-exprimierenden Zellen. Die Wachstumskurven der parentalen, *IDH1*-Wildtyp- und *IDH1*-R132H-transfizierten Zellen der übrigen Zelllinien waren annähernd identisch.

Zusätzlich zu den Wachstumskurven wurden die sieben Zellzahlmessungen miteinander verglichen (Abbildung 9 Ab-Db). Dabei wurde kein signifikanter Unterschied der Zellzahlzunahme zwischen den parentalen und transfizierten Glioblastomzellen in den Zelllinien A-172, LN-18, LN-229 und U-87 MG festgestellt (Abbildung 9 Ab-Db).

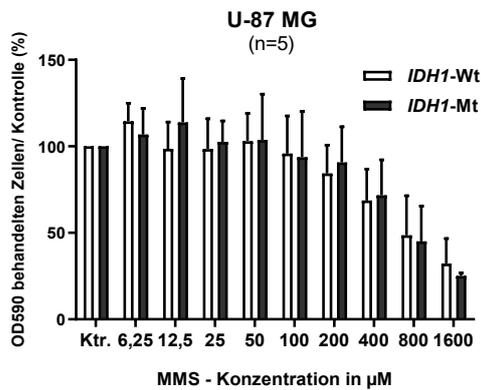


**Abb. 9: Wachstumsrate der parentalen und transfizierten Glioblastomzellen**  
 Vergleich der Wachstumskurve (Aa-Da) und der theoretisch berechneten Zellzahl nach 21 Tagen Kultivierung (Ab-Db) zwischen den parentalen und den *IDH1*-Wildtyp- sowie *IDH1*-R132H-transfizierten Zellen der Zelllinien A-172, LN-18, LN-229 und U-87 MG.

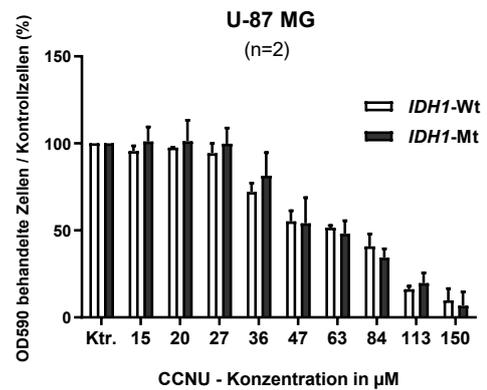
#### **4.2.2 Empfindlichkeit der *IDH1*-Wildtyp- und *IDH1*-R132H-transfizierten Glioblastomzellen auf die Zytostatika MMS, CCNU und Doxorubizin**

Die Empfindlichkeit der mit *IDH1*-Wildtyp- und mit *IDH1*-R132-Mutation transfizierten Glioblastomzellen auf unterschiedliche Zytostatika wurde nach 72 h Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen der Zytostatika Methylmethansulfonat (MMS), CCNU (Lomustin) bzw. Doxorubizin (DOX) mittels Kristallviolett-Färbung bestimmt. Mit der Kristallviolett-Färbung wurden hierbei ausschließlich adhärente und damit vitale Zellen angefärbt [92]. Nach Lyse der Zellen wurde photometrisch die optische Dichte bei 590 nm ( $OD_{590}$ ) gemessen. Um die *IDH1*-Wildtyp-transfizierten Zellen mit den *IDH1*-R132H-transfizierten Zellen besser vergleichen zu können, wurde die  $OD_{590}$  der behandelten Zellen des jeweiligen Genotyps auf die  $OD_{590}$  der unbehandelten Zellen (Kontrolle) prozentual bezogen. Für keine der untersuchten Glioblastomzelllinien wurde bei den durchgeführten Experimenten ein Unterschied zwischen mit *IDH1*-Wildtyp oder *IDH1*-R132H transfizierten Zellen bezüglich des Ansprechens auf die Zytostatika MMS, CCNU und DOX festgestellt. Exemplarisch sind hier die Ergebnisse der Glioblastomzelllinie U-87 MG abgebildet (Abbildung 10 A). Die Ergebnisse für die anderen untersuchten Zelllinien finden sich im Anhang in Abschnitt 7.2 (Abbildung 26-28).

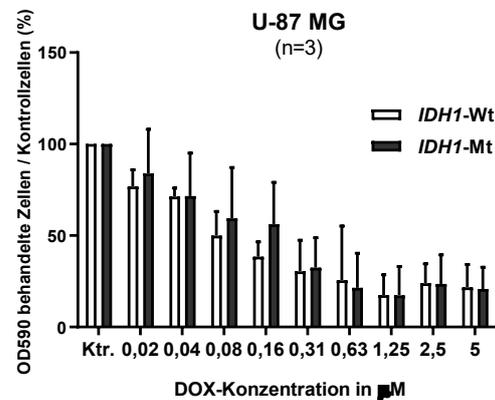
A)



B)



C)



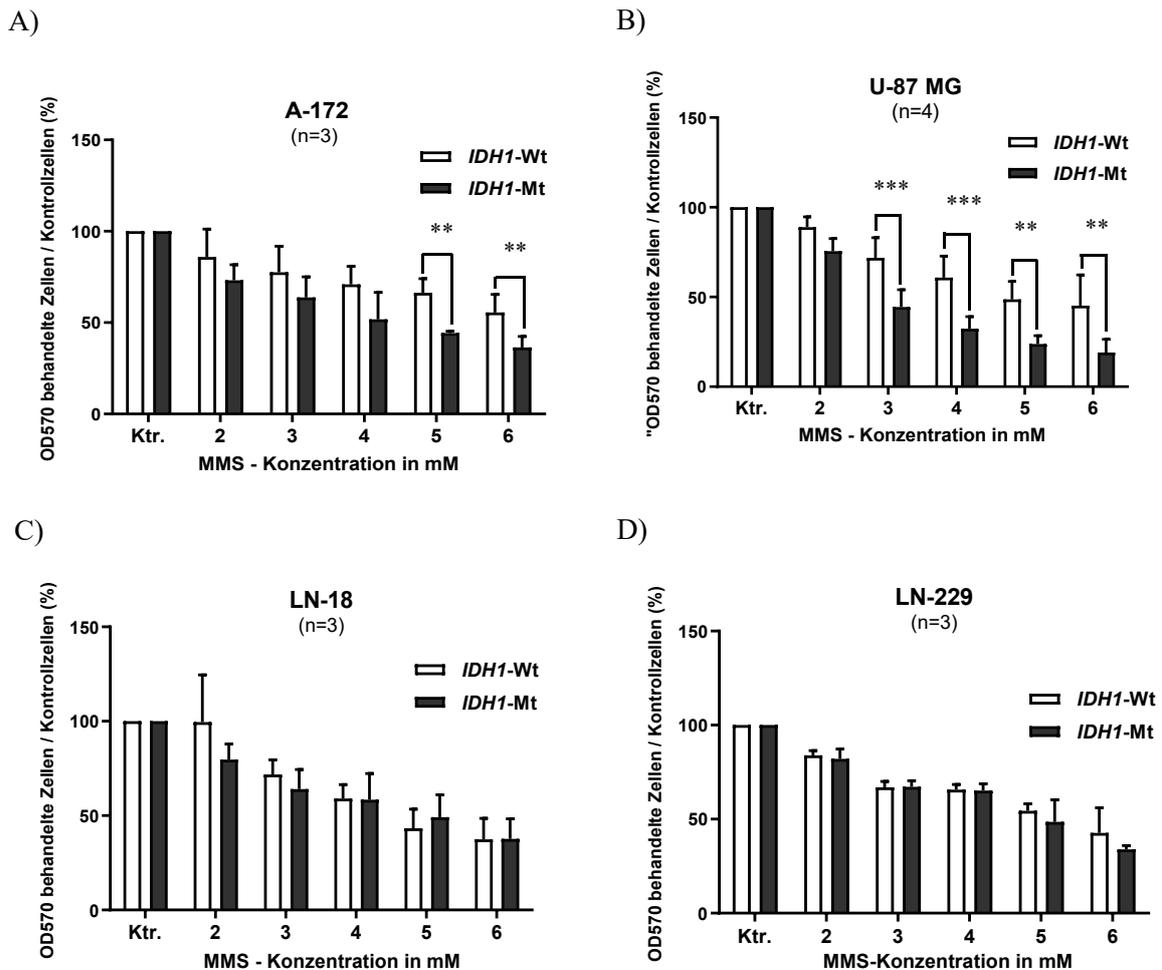
**Abb. 10: Empfindlichkeit der *IDH1*-Wildtyp- und *IDH1*-R132H-transfizierten Glioblastomzellen auf die Zytostatika Methylnmethansulfonat (MMS), Lomustin (CCNU) und Doxorubizin (DOX)**

Vergleich des Ansprechens von *IDH1*-Wildtyp- oder *IDH1*-R132H-transfizierten Zellen der Zelllinie U-87 MG auf die Zytostatika MMS, CCNU und DOX. Nach 72 h Behandlung mit MMS (A), CCNU (B) oder DOX (C) wurde zur relativen Bestimmung der Zellzahl die Kristallviolett-Färbe-Methode angewandt.

**4.2.3 Empfindlichkeit der transfizierten Glioblastomzellen gegenüber hochdosiertem MMS**

Die Empfindlichkeit der *IDH1*-Wildtyp- oder *IDH1*-R132H-transfizierten Glioblastomzellen gegenüber der Behandlung mit dem hochdosierten Zytostatikum MMS wurde mit Hilfe des MTT-Assays II bestimmt. In Abbildung 11 sind die Ergebnisse der Behandlung mit MMS wiedergegeben. Für die Zelllinie A-172 wurde bei der Behandlung der Zellen mit 5 mM und 6 mM MMS eine signifikant höhere ( $p > 0,01$ ) Sensibilität der *IDH1*-R132H-transfizierten Zellen im Vergleich zu den *IDH1*-Wildtyp-transfizierten Zellen festgestellt (Abbildung 11 A). Für die Zelllinie U-87 MG wurde eine hochsignifikant ( $p < 0,001$ ) höhere Empfindlichkeit der *IDH1*-R132-transfizierten Zellen gegenüber der Behandlung mit 3 mM und 4 mM MMS im Vergleich zu den *IDH1*-Wildtyp-transfizierten Zellen

festgestellt. Des Weiteren wurde eine signifikant höhere ( $p < 0,01$ ) Empfindlichkeit der *IDH1*-R132H-transfuzierten Zellen gegenüber der Behandlung mit 5 mM und 6 mM MMS im Vergleich zu den *IDH1*-Wildtyp-transfuzierten Zellen ermittelt (siehe Abbildung 11 B). Für die Zelllinien LN-18 und LN-229 ließen sich bei den hier verwendeten Konzentrationen keine Unterschiede bezüglich des Ansprechens auf MMS zwischen *IDH1*-Wildtyp- und *IDH1*-R132H-transfuzierten Zellen feststellen (Abbildung 11 C und D).

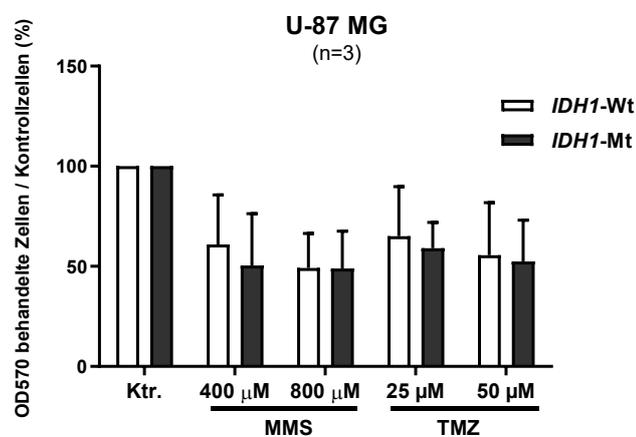


**Abb. 11: Empfindlichkeit der transfuzierten Glioblastomzellen gegenüber hochdosiertem Methylmethansulfonat (MMS)**

Sensibilität der *IDH1*-Wildtyp- bzw. *IDH1*-R132H-transfuzierten Zellen der Zelllinien A-172 (A), LN-18 (B), LN-229 (C) und U-87 MG (D) gegenüber einstündlicher Behandlung mit hochdosiertem MMS und anschließender 48 h Kultivierung. Die relative Messung der Zellzahl erfolgte mittels MTT-Assay

#### 4.2.4 Vergleich der Sensibilität der *IDH1*-Wildtyp- oder *IDH1*-R132H-transfizierten Zellen der Zelllinie U-87 MG auf eine zehntägige Behandlung mit TMZ oder MMS

Die transfizierte Zelllinie U-87 MG wurde für 10 Tage mit den Zytostatika MMS (400  $\mu$ M, 800  $\mu$ M) oder TMZ (25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M) behandelt. Die Empfindlichkeit der Zellen auf die Zytostatika wurde anschließend durch das MTT-Assay I bestimmt (siehe Abschnitt 4.2.3). Zur Beurteilung der Wirkstärke der Zytostatika wurde die optische Dichte bei 570 nm der behandelten Zellen auf die der unbehandelten Zellen (Ktr.) prozentual bezogen. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Hierbei zeigte sich keine unterschiedliche Empfindlichkeit der *IDH1*-Wildtyp- verglichen mit den *IDH1*-R132H-transfizierten Zellen gegenüber der zehntägigen Behandlung mit 25  $\mu$ M oder 50  $\mu$ M TMZ bzw. 400  $\mu$ M oder 800  $\mu$ M MMS für die Zelllinie U-87 MG (Abbildung 12).



**Abb. 12: Empfindlichkeit der transfizierten Zelllinie U-87 MG gegenüber einer zehntägigen Behandlung mit Temozolomid (TMZ) und Methymethansulfonat (MMS)**

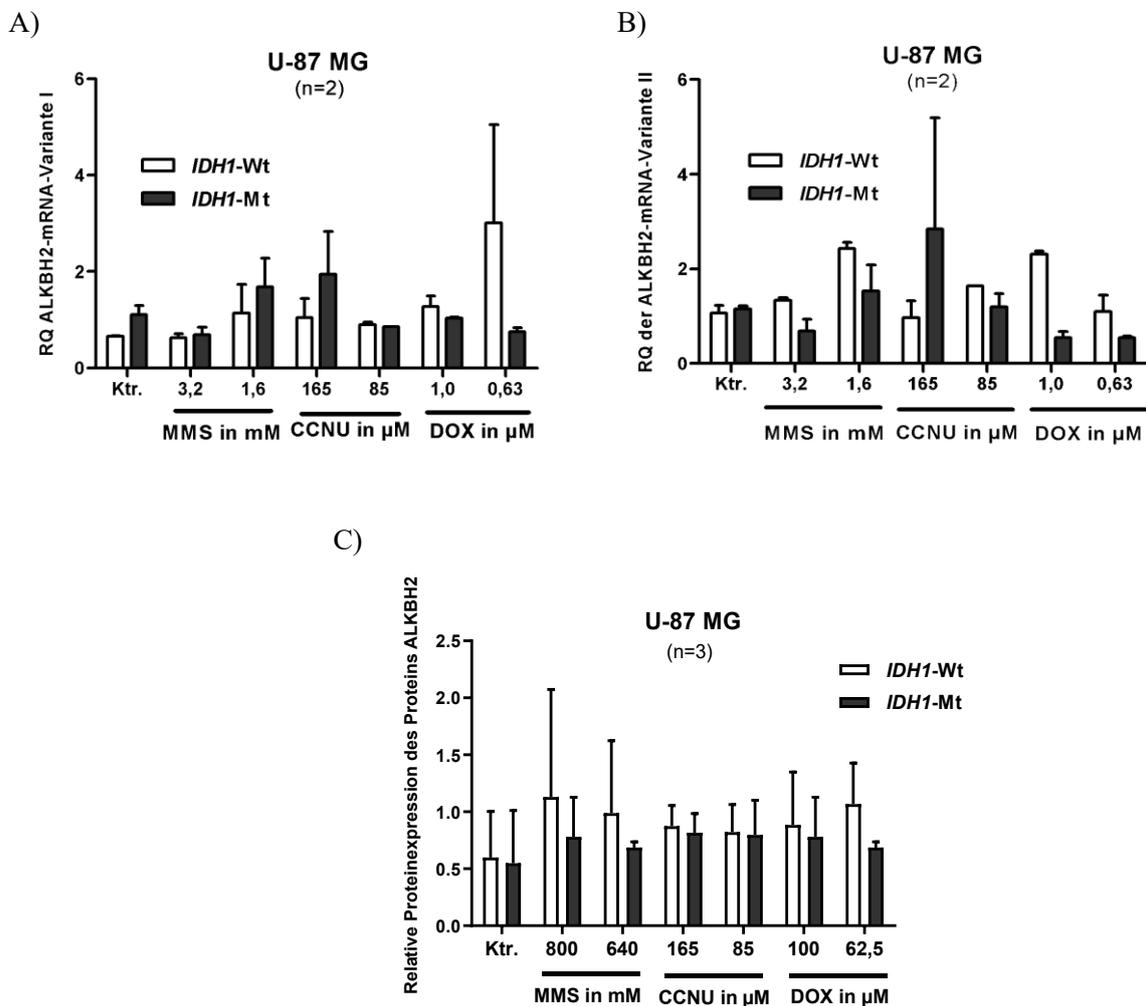
Vergleich der Sensibilität der *IDH1*-Wildtyp- oder *IDH1*-R132H-transfizierten U-87 MG Zellen nach zehntägiger Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von Methymethansulfonat (MMS) bzw. Temozolomid (TMZ). Eine relative Messung der Zellzahl erfolgte durch die MTT-Methode I.

#### 4.2.5 Vergleich der ALKBH2-mRNA und der ALKBH2-Protein Expression in *IDH1*-Wildtyp- oder *IDH1*-R132H-transfizierten Glioblastomzellen nach der Behandlung mit verschiedenen Zytostatika

In diesen Experimenten wurde untersucht, ob eine Behandlung von Glioblastomzellen mit alkylierenden Zytostatika zur Hochregulation des Enzyms ALKBH2 auf mRNA und/oder Proteinebene führt. Des Weiteren wurde überprüft, ob es zwischen *IDH1*-Wildtyp- und *IDH1*-R132H-transfizierten Glioblastomzellen einen relativen Unterschied in der Expression der ALKBH2-mRNA bzw. des ALKBH2-Proteins gibt. Die Experimente wurden mit der *TP53*-Wildtyp-Zelllinie U-87 MG durchgeführt [93]. In den *IDH1*-Wildtyp- und in den *IDH1*-R132H-transfizierten Zellen der Zelllinie U-87 MG wurde nach 24 h Behandlung mit den Zytostatika MMS (3,2 mM, 1,6 mM  $\mu$ M), CCNU (85  $\mu$ M, 165  $\mu$ M) bzw. DOX (0,63  $\mu$ M, 1,0  $\mu$ M) jeweils die relative Expression der ALKBH2-mRNA und des ALKBH2-Proteins bestimmt. Die oben genannten Konzentrationen wurden, wie bereits in Abschnitt

3.5.3. beschrieben, ausgewählt, da nach 78 h Behandlung der Zellen mit den entsprechenden Zytostatika die OD<sub>590</sub> 10 % bzw. 30 % der Kontrolle entsprachen. Die relative Expression des Proteins ALKBH2 wurde auf die relative Expression des Referenzproteins  $\alpha$ -Aktin normalisiert.

Weder in der mittels semiquantitativer RT-PCR bestimmten relativen Expression der mRNA-Varianten I und II (Abbildung 13 A und B) noch bezüglich der relativen Expression des ALKBH2-Proteins (Abbildung 13 C) ließ sich ein Unterschied zwischen *IDH1*-Wildtyp- versus *IDH1*-R132H-transfizierten Zellen der Glioblastomzelllinie U-87 MG feststellen. Zusätzlich war weder in den *IDH1*-Wildtyp- noch in den *IDH1*-R132H-transfizierten Zellen nach der Behandlung mit DOX, CCNU oder MMS eine signifikante Hochregulation von ALKBH2 auf mRNA - oder Proteinebene nachzuweisen.



**Abb. 13: Expression von ALKBH2-mRNA- und ALKBH2-Protein in *IDH1*-Wildtyp- oder *IDH1*-R132H-transfizierten Glioblastomzellen nach der Behandlung mit verschiedenen Zytostatika** Relative mRNA-Expression der beiden Spleißvarianten von ALKBH2 sowie relative Proteinexpression von ALKBH2 in den *IDH1*-Wildtyp- bzw. *IDH1*-R132H-transfizierten U-87 MG Zellen nach 24 h Behandlung mit verschiedenen Zytostatika. Die Messung der relativen ALKBH2-mRNA-Variante I (A) bzw. -Variante II (B) erfolgte mittels Real-Time-PCR und die Messung der Proteinexpression mittels der Western-Blot Methode.

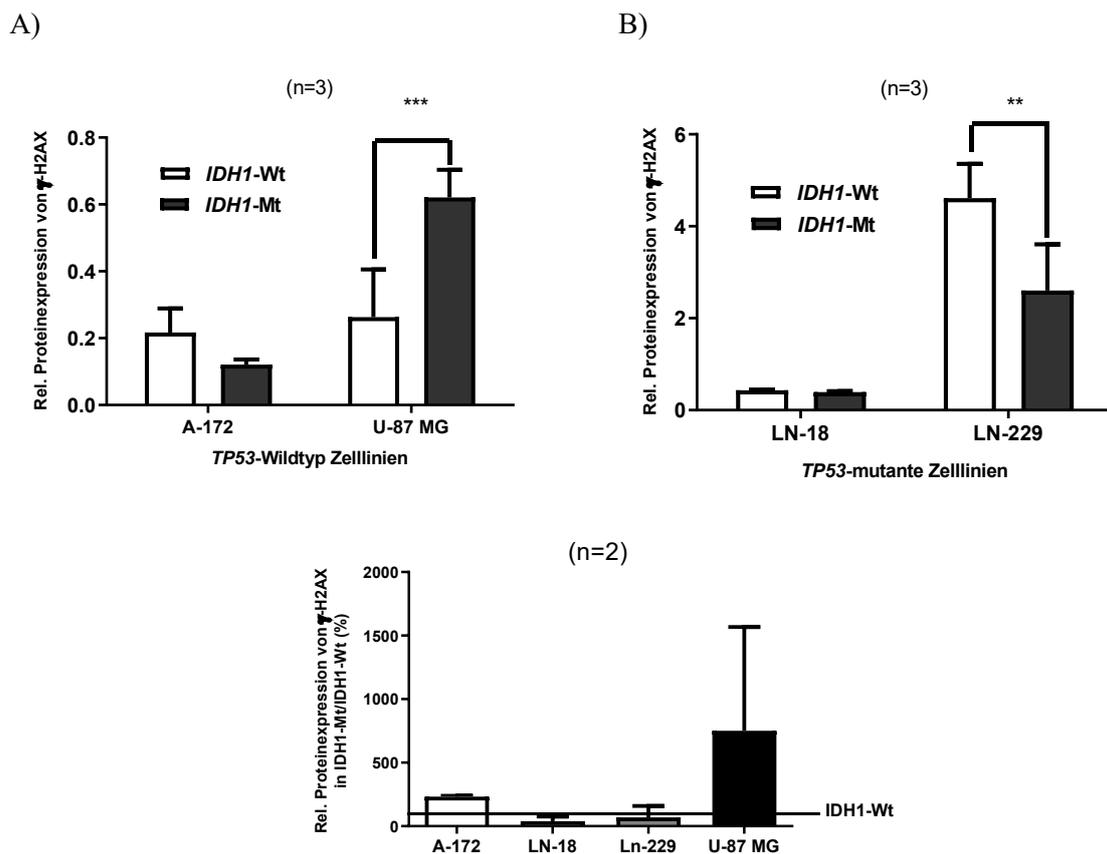
#### **4.2.6 Expression von $\gamma$ -H2AX und ALKBH2 nach Behandlung der *IDHI*-Wildtyp- bzw. *IDHI*-R132H-transfizierten Glioblastomzelllinien mit hochkonzentriertem Methylmethansulfonat**

Die Glioblastomzelllinien A-172, LN-18, LN-229 und U-87 MG wurden für eine Stunde mit 3,2 mM oder mit 5 mM MMS behandelt und dann nach erfolgtem Mediumswechsel für 48 h im Zellinkubator kultiviert. Danach erfolgte die Messung der Expression des Proteins  $\gamma$ -H2AX und des Proteins ALKBH2 mittels Western-Blot Analyse. Es wurde die Konzentration 3,2 mM gewählt, weil diese Konzentration bereits in Abschnitt 4.2.5 getestet worden war und damit ein Vergleich zwischen den Ergebnissen der Experimente ermöglicht wurde. Zusätzlich wurde die höhere Konzentration von 5 mM MMS verwendet, weil sich bei dieser Konzentration nach einer Stunde Behandlung sowohl bei der Zelllinie A-172 als auch bei der Zelllinie U-87 MG ein signifikant höheres Ansprechen der *IDHI*-R132H-transfizierten Zellen im Vergleich zu den *IDHI*-Wildtyp-transfizierten Glioblastomzellen gezeigt hatte (Abbildung 11). Es wurden drei unabhängige Experimente mit der Konzentration von 3,2 mM MMS und zwei unabhängige Experimente mit der Konzentration von 5 mM MMS durchgeführt. Die relative Proteinexpression von  $\gamma$ -H2AX und von ALKBH2 wurde auf die des Referenzproteins Vinculin normalisiert.

Innerhalb der Experimente differierte die relative Proteinexpression von  $\gamma$ -H2AX nach der Behandlung der Glioblastomzellen mit 5 mM MMS stark, weswegen zur besseren Vergleichbarkeit der Experimente die relative Proteinexpression von  $\gamma$ -H2AX in den *IDHI*-R132H-transfizierten Zellen auf die relative Proteinexpression von  $\gamma$ -H2AX in den *IDHI*-Wildtyp-transfizierten Zellen bezogen wurde.

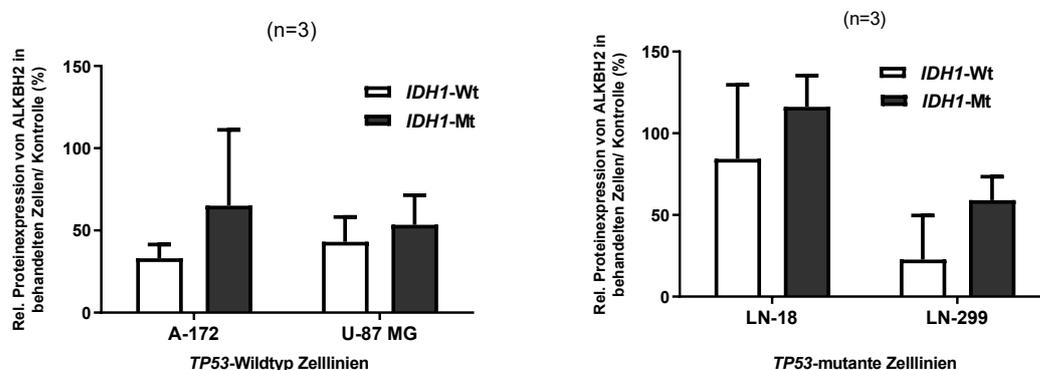
In der Zelllinie U-87 MG wurde in den *IDHI*-R132H-transfizierten Zellen nach der Behandlung mit 3,2 mM MMS eine signifikant höhere ( $p < 0,001$ ) relative Proteinexpression von  $\gamma$ -H2AX im Vergleich zu den *IDHI*-Wildtyp-transfizierten Zellen gemessen (Abbildung 14 A). Die relative Proteinexpression von  $\gamma$ -H2AX war in den *IDHI*-R132H-transfizierten Zellen ungefähr dreimal höher als in den *IDHI*-Wildtyp-transfizierte Zellen (Abbildung 14 C). Nach der Behandlung der Zellen mit 5 mM MMS wurde in beiden Experimenten ebenfalls eine deutlich höhere Expression des Proteins  $\gamma$ -H2AX in den *IDHI*-R132H-transfizierten Zellen im Vergleich zu den *IDHI*-Wildtyp-transfizierten Zellen detektiert; jedoch war die Proteinexpression interexperimentell extrem unterschiedlich, so dass kein Signifikanzniveau erreicht wurde (Abbildung 14 D). Für die Zelllinien A-172 wurde lediglich nach der Behandlung mit 5 mM MMS ein signifikanter Unterschied zwischen *IDHI*-Wildtyp- und *IDHI*-R132H-transfizierten Zellen festgestellt (Abbildung 14 D). Für die Zelllinie LN-18 wurde nach der Behandlung mit MMS kein signifikanter Unterschied in der Expression von  $\gamma$ -H2AX zwischen *IDHI*-Wildtyp- oder *IDHI*-R132H-transfizierten Zellen festgestellt (Abbildung 14 A, B und D). Für die Zelllinie LN-229 zeigte sich eine signifikant ( $p < 0,05$ ) höhere Expression von  $\gamma$ -H2AX in den *IDHI*-Wildtyp- im Vergleich zu

den *IDH1*-R132H-transfizierte Zellen nach der Behandlung mit 3,2 mM MMS (Abbildung 14 B). Zudem waren nach der Behandlung mit 3,2 mM MMS in der Zelllinie LN-229 sowohl in den *IDH1*-Wildtyp- als auch in den *IDH1*-R132H-transfizierte Zellen eine deutlich höhere  $\gamma$ -H2AX Expression im Vergleich zu den übrigen untersuchten Zelllinien messbar. Die Expression von  $\gamma$ -H2AX war in den *IDH1*-Wildtyp-transfizierte Zellen (M= 4,6; SD: 0,74) ungefähr doppelt so hoch wie in den *IDH1*-R132H-transfizierte Zellen (M=2,6; SD: 0,82). Die mittlere relative Expression von  $\gamma$ -H2AX in den *IDH1*-Wildtyp-transfizierte Zellen der Zelllinien A-172, LN-18 und U-87 MG lag bei 0,29 (SD=0,12). Der Mittelwert der relativen Expression von  $\gamma$ -H2AX in den *IDH1*-R132H-transfizierte Zellen war 0,38 (SD=0,19). In der Zelllinie LN-229 war die  $\gamma$ -H2AX-Expression in den *IDH1*-Wildtyp-transfizierte Zellen ungefähr 15-mal höher und in den *IDH1*-R132H-transfizierte Zellen ca. 7-mal höher als in den entsprechend transfizierte Sublinien der übrigen Zelllinien. Es fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen der relativen Expression von  $\gamma$ -H2AX in *IDH1*-Wildtyp- versus *IDH1*-R132H-transfizierte Zellen der Zelllinie LN-229 nach der Behandlung mit 5 mM MMS (Abbildung 14 C).



**Abb. 14:** Expression von  $\gamma$ -H2AX nach Behandlung der *IDH1*-Wildtyp- bzw. *IDH1*-R132H-transfizierte Glioblastomzelllinien mit hochkonzentriertem Methylmethansulfonat (MMS) Relative Proteinexpression von  $\gamma$ -H2AX nach einstündiger Behandlung von *IDH1*-Wildtyp- bzw. *IDH1*-R132H-transfizierte Glioblastomzellen mit 3,2 mM (A und B) oder 5 mM (C) MMS und anschließender Weiterkultivierung der Zellen für 48 h.

In keiner der untersuchten Zelllinien ließ sich ein signifikanter Unterschied der Expression von ALKBH2 in *IDH1*-Wildtyp- versus *IDH1*-R132H-transfizierten Zellen nach der Behandlung mit 3,2 mM MMS feststellen (Abbildung 15). Dennoch war in allen hier untersuchten Zelllinien ausnahmslos in den *IDH1*-R132H-transfizierten Zellen im Vergleich zu den entsprechenden *IDH1*-Wildtyp-transfizierten Zellen eine höhere relative ALKBH2-Proteinexpression nachzuweisen, was zumindest eine entsprechende Tendenz anzeigt. Bis auf die *IDH1*-R132H-transfizierten Zellen der Zelllinie LN-18 wurde bei allen anderen hier untersuchten Zelllinien nach Behandlung mit 3,2 mM MMS eine niedrigere relative Expression des Enzyms ALKBH2 im Vergleich zu den unbehandelten Zellen gemessen. Die relative Expression von ALKBH2 in den *IDH1*-R132H-transfizierten Zellen der Zelllinien LN-18 war nach der Behandlung mit MMS vergleichbar mit der Expression der unbehandelten Zellen.



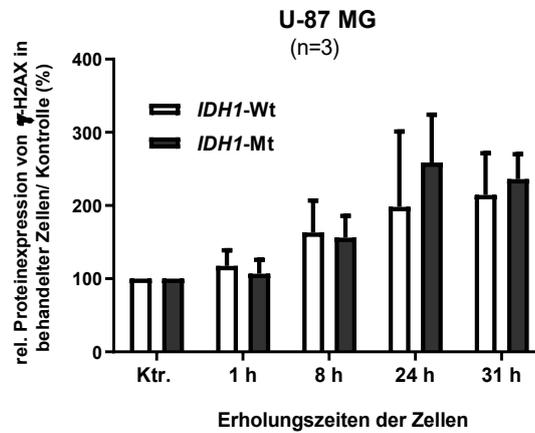
**Abb. 15: Expression von ALKBH2 nach Behandlung der *IDH1*-Wildtyp- bzw. *IDH1*-R132H-transfizierten Glioblastomzelllinien mit hochkonzentriertem Methylmethansulfonat (MMS)**

Relative Proteinexpression des Enzyms ALKBH2 in *IDH1*-Wildtyp- bzw. *IDH1*-R132H-transfizierten Zellen der Glioblastomzelllinien A-172, LN-18, LN-299 und U-87 MG nach der Behandlung mit 3,2 mM MMS.

#### 4.2.7 Phosphorylierung von $\gamma$ -H2AX nach Behandlung mit hochkonzentriertem MMS und verschiedenen Erholungszeiten in der transfizierten Zelllinie U-87 MG

Die relative Proteinexpression von  $\gamma$ -H2AX war nach der Behandlung der transfizierten Zelllinien mit MMS in den *IDH1*-R132H-transfizierten im Vergleich zu den *IDH1*-Wildtyp-transfizierten Zellen in der Zelllinie U-87 MG höher (vgl. Abschnitt 4.2.6). Zusätzlich wurde die Dynamik der relativen Proteinexpression von  $\gamma$ -H2AX in *IDH1*-Wildtyp- versus *IDH1*-R132H-transfizierten Zellen der Zelllinie U-87 MG untersucht. Hierfür wurden die Zellen für 1 h mit 3,2 mM MMS behandelt. Anschließend erfolgte die Probengewinnung nach 1 h, 8 h, 24 h und 31 h Erholungszeit. Die Analysen wurden mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Die Fluoreszenzintensität der behandelten Zellen wurden auf die Fluoreszenzintensität der unbehandelten Zellen prozentual bezogen. Tendenziell stieg die relative Expression des Proteins  $\gamma$ -H2AX 24 h nach Beendigung der Behandlung mit MMS in den *IDH1*-Wildtyp- und *IDH1*-R132H-transfizierten Zellen in der Zelllinie U-87 MG an. Zwischen den

Erholungszeiten von 24 h und 31 h nahm die Expression von  $\gamma$ -H2AX tendenziell dann wieder etwas ab. Zu keinem der gewählten Erholungszeiten ließ sich ein Unterschied in der Expression von  $\gamma$ -H2AX in *IDH1*-Wildtyp- versus *IDH1*-R132H-transfizierten Zellen feststellen.

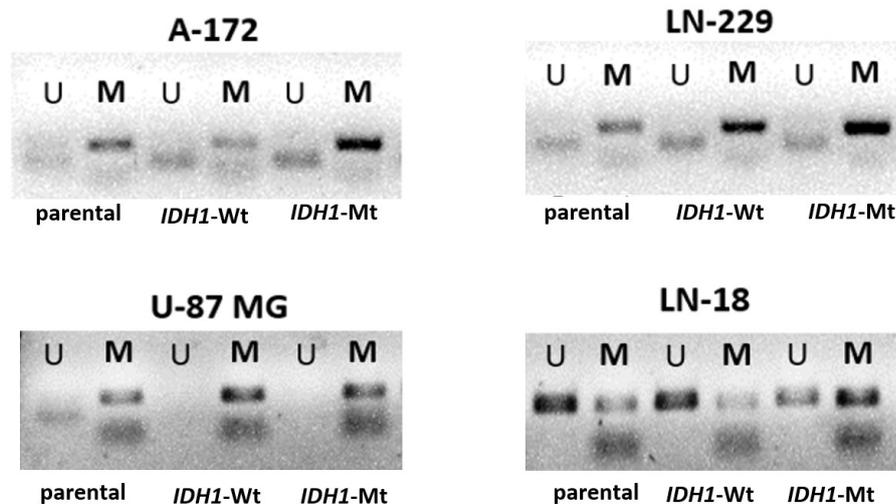


**Abb. 16: Phosphorylierung von  $\gamma$ -H2AX nach Behandlung mit hochkonzentriertem Methylmethansulfonat (MMS) und verschiedenen Erholungszeiten in der transfizierten Zelllinie U-87 MG**  
Relative Proteinexpression von  $\gamma$ -H2AX nach Behandlung mit 3,2 mM MMS in *IDH1*-Wildtyp- bzw. *IDH1*-R132H-transfizierten Zellen der Zelllinie U-87 MG. Bei den Replikaten wurde die Messung nach verschiedenen Erholungszeiten nach Behandlung mit MMS durchgeführt.

#### 4.2.8 Bestimmung der *MGMT*-Promotormethylierung in mit *IDH1*-Wildtyp- oder *IDH1*-R132H- transfizierten sowie parentalen Glioblastomzellen mittels methylierungsspezifischer PCR

Die *IDH1*-R132H-Mutation führt in Astrozytomen und Oligodendrogliomen zur Akkumulation epigenetischer Veränderungen, zu denen auch die Promotormethylierung des *MGMT*-Gens zählt. Aus diesem Grund wurde mit Hilfe einer methylierungsspezifischen PCR untersucht, ob die Transfektion der Glioblastomzellen mit dem *IDH1*-R132H-mutanten Plasmid zu einer Hypermethylierung des *MGMT*-Promotors führt. Die Transfektion und das *Cell Sorting* mittels FACS der Zelllinien LN-18, LN-229 und U-87 MG erfolgte im August 2014. Die Transfektion und das *Cell Sorting* der Zelllinie A-172 wurde im März 2015 durchgeführt. Die *MGMT*-Promotormethylierung wurde im November 2015, also 1 Jahr und 3 Monate nach der Transfektion der Zelllinien LN-18, LN-229 und U-87 MG und 7 Monate nach Transfektion der Zelllinie A-172 analysiert. Innerhalb dieses Zeitraums konnte durch die methylierungsspezifische PCR für keine der verwendeten Zelllinien (A-172, LN-18, LN-229 und U-87 MG) eine unterschiedliche *MGMT*-Promotormethylierung zwischen parentalen, *IDH1*-Wildtyp- und *IDH1*-R132H-transfizierten Zellen festgestellt werden. Die methylierungsspezifische PCR wurde zweimal mit zu unterschiedlichen Zeitpunkten gewonnenen Proben durchgeführt. Für jede PCR wurden alle Zelllinien zeitgleich aufgetragen. Zur besseren Übersicht wurde das PCR-Gel in Abbildung 17 nach

den Zelllinien sortiert (die Originalabbildung der PCR-Analyse ist dem Anhang in Abschnitt 7.3 beigelegt).



**Abb. 17. Methylierungsspezifische PCR-Analyse der *MGMT*-Promotormethylierung in parentalen Zellen, *IDH1*-Wildtyp- und *IDH1*-R132H-transfizierten Zellen der Zelllinien A-172, LN-18, LN-229 und U-87 MG.** Bei der Zelllinie LN-18 handelt es sich um die einzige der vier Zelllinien, die einen zumindest partiell unmethylierten *MGMT*-Promotor aufweist. U; Signal für die unmethylierte *MGMT*-Promotorsequenz. M; Signal für die methylierte *MGMT*-Promotorsequenz.

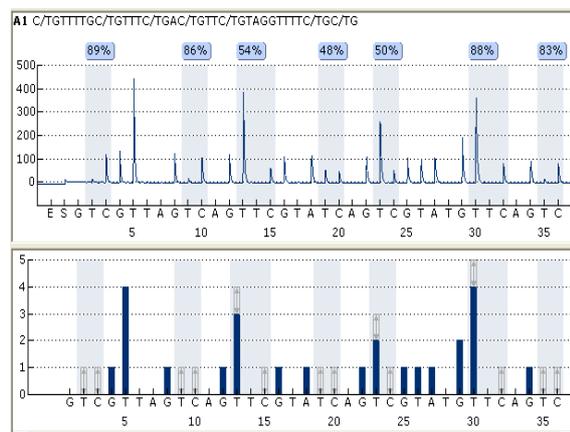
#### 4.2.9 Bestimmung der *MGMT*-Promotormethylierung von *IDH1*-Wildtyp- oder *IDH1*-R132H-transfizierten sowie parentalen Glioblastomzellen mittels Pyrosequenzierung

Zur genauen Bestimmung des prozentualen Anteiles an CpG-Methylierungen in einem sieben CpG-Dinukleotide umfassenden Bereich der *MGMT*-Promotorregion wurde eine Pyrosequenzierung von Bisulfit-behandelter DNA der verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Dabei wurde keine prozentuale Änderung der CpG-Methylierung der *MGMT*-Promotorregion zwischen parentalen Zellen, *IDH1*-Wildtyp- und *IDH1*-R132H-transfizierten Zellen in den untersuchten Zelllinien beobachtet. Da in den parentalen Zellen der Zelllinie U-87 MG sowie der Zelllinie LN-229 bereits ein Anteil an CpG-Methylierung der *MGMT*-Promotorregion von über 90 % gemessen wurde, wurde in diesen Zelllinien auf eine Analyse der *MGMT*-Promotorregion in den *IDH1*-Wildtyp- und *IDH1*-R132H-mutanten Zellen verzichtet. Der prozentuale Anteil an CpG-Methylierung der *MGMT*-Promotorregion in der Zelllinien A-172 lag bei parentalen, *IDH1*-Wildtyp- und *IDH1*-R132H-mutanten Zellen bei ca. 81 % und in der Zelllinie LN-18 bei ca. 51 %.

Der prozentuale Anteil an CpG-Methylierung der *MGMT*-Promotorregion korrelierte gut mit der Proteinexpression des Enzyms *MGMT*, da die Zelllinie LN-18 den geringsten Anteil an CpG-Methylierung (51 %) aufwies und zugleich die einzige der transfizierten Zelllinien ist, welche das *MGMT*-Protein exprimiert. Die relative *MGMT*-Expression wurde in den Glioblastomzelllinien A-172,

LN-18, LN-229, T-98G; TP-365MG und U-87 MG auf Protein- und auf mRNA-Ebene bestimmt. In den Zelllinien LN-18, T-98G und TP-365MG konnte MGMT-mRNA nachgewiesen werden. Die Zelllinie T-98G wies die höchste relative mRNA-Expression auf, gefolgt von der Zelllinie LN-18, in welcher ca. 34 % der relativen MGMT-mRNA-Expression von T-98G gemessen wurde. Die Zelllinie TP-365MG wies nur 2 % der relativen MGMT-mRNA-Expression von T-98G auf. In Abbildung 18 D ist die relative Expression der MGMT-mRNA in den Zelllinien prozentual auf die relative MGMT-Expression von T-98G bezogen, welche die höchsten MGMT-mRNA Level aufwies.

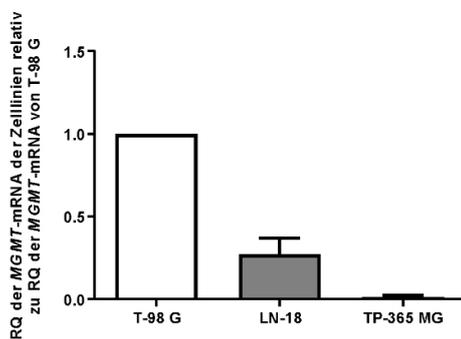
A) **Pyrosequenzierung der MGMT-Promotorregion in der parentalen Zelllinie A-172**



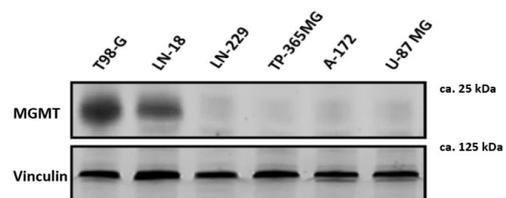
B)

	A-172	LN-18	LN-229	U-87 MG
<b>Methylierte Allelfrequenz</b>	81 %	51 %	93 %	95 %
<b>Expression des MGMT-Proteins</b>	Kein Protein	vorhanden	Kein Protein	Kein Protein

C)



D)



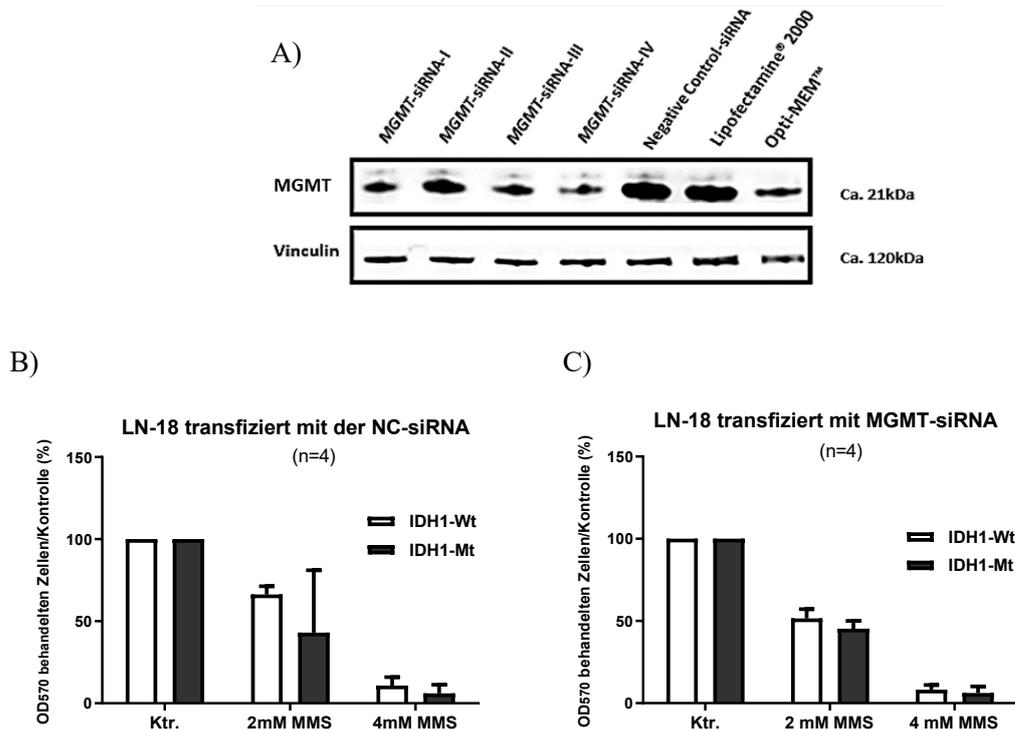
**Abb. 18: MGMT-Promotormethylierung von IDH1-Wildtyp- oder IDH1-R132H-transfizierten sowie parentalen Glioblastomzellen mittels Pyrosequenzierung**

Exemplarische Darstellung der Auswertung der Pyrosequenzierung der CpG-Methylierung des MGMT-Promotors in der parentalen Zelllinie A-172 (A) und tabellarische Übersicht der methylierten Allelfrequenzen (in %) sowie der MGMT-Proteinexpression in den Zelllinien A-172, LN-18, LN-229 und U-87 MG (B). Zudem Darstellung der vor der IDH1-Transfektion stattgefundenen Untersuchung bezüglich der MGMT-Expression auf mRNA- (C) und Proteinebene (D) der Glioblastomzelllinien A-172, LN-18, LN-229, T-98G, TP-365MG und U-

87 MG. Da in den Zelllinien A-172, LN-229 und U-87 MG keine MGMT-mRNA nachweisbar war, wurden diese in der Abbildung C nicht dargestellt.

### **4.3 Ansprechen der transfizierten Zelllinie LN-18 auf MMS-Behandlung in Abhängigkeit zur MGMT-Expression**

Die Transfektion der Zelllinie LN-18 mit MGMT-siRNA führte für alle verwendeten MGMT-siRNAs zur Reduktion der MGMT-Proteinexpression (Abbildung 19 A). Die stärkste Reduktion der Proteinexpression wurde durch die Transfektion der Zellen mit der MGMT-siRNA IV erreicht. Aus diesem Grund wurde für die Herunterregulation der MGMT-Expression und die anschließende Behandlung der *IDHI*-Wildtyp- oder *IDHI*-R132H-transfizierten Zellen mit MMS die MGMT-siRNA IV gewählt. Die *IDHI*-Wildtyp- und *IDHI*-R132H-transfizierten Zellen der Zelllinie LN-18 wurden mit MGMT-siRNA bzw. Kontroll (NC)-siRNA transfiziert. Anschließend wurden die Zellen für 1 h mit 2 mM und 4 mM MMS behandelt und nach dieser Behandlung für 48 h weiterkultiviert. Die oben genannten Konzentrationen wurden ausgewählt, da bei der Zelllinie U-87 MG bei 2 mM MMS keine und bei 4 mM MMS eine signifikant unterschiedliche Toxizität von MMS in *IDHI*-Wildtyp- versus *IDHI*-R132H-transfizierten Zellen festgestellt worden waren. Da U-87 MG eine *MGMT*-Promotor-Hypermethylierung aufweist, wurden die Ergebnisse dieser Zelllinien nach MMS-Behandlung als Vergleich herangezogen. Höhere MMS-Konzentrationen konnten bei diesem Experiment nicht verwendet werden, da sich die siRNA-Transfektion bereits toxisch oder zumindest wachstumshemmend auf die Zellen auswirkte und daher bei höheren MMS-Konzentrationen kaum noch Zellen nachweisbar waren, wodurch die Messgenauigkeit stark beeinträchtigt worden wäre. Für die Bestimmung der Empfindlichkeit der Zellen auf das Zytostatikum MMS wurden die Zellen mit Kristallviolett gefärbt und anschließend, wie in Abschnitt 3.6.1 beschrieben, die optische Dichte bei 590 nm der behandelten Zellen auf die optische Dichte bei 590 nm der unbehandelten Zellen (Ktr.) prozentual bezogen. In den mit MGMT-siRNA transfizierten *IDHI*-Wildtyp-Zellen wurde nach der Behandlung mit 2 mM MMS und anschließender Kristallviolett-Färbung eine signifikant ( $p < 0,01$ ) geringere relative optische Dichte bei 590 nm verglichen mit der relativen optischen Dichte bei 590 nm der mit NC-siRNA transfizierten *IDHI*-Wildtyp- Zellen gemessen. Nach der Behandlung der *IDHI*-Wildtyp-Zellen mit 4 mM MMS zeigte sich tendenziell ebenfalls eine stärkere Ansprache der mit MGMT-siRNA transfizierten Zellen verglichen mit den mit NC-siRNA transfizierten Zellen, wobei jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte. Der Grund hierfür war am ehesten die hohe Toxizität von 4 mM MMS, welche zu einer sehr starken Reduktion der Zellzahl und daher zu einer kaum messbaren optischen Dichte bei 590nm nach Kristallviolett-Färbung führte. Hieraus resultierten Ungenauigkeiten in der photometrischen Messung. Bei den *IDHI*-R132H-transfizierten Zellen der Zelllinie LN-18 wurde nach der Behandlung der Zellen mit den verschiedenen Konzentrationen keine unterschiedliche Empfindlichkeit auf das Zytostatikum MMS der mit MGMT-siRNA transfizierten Zellen verglichen mit den mit NC-siRNA transfizierten Zellen beobachtet.



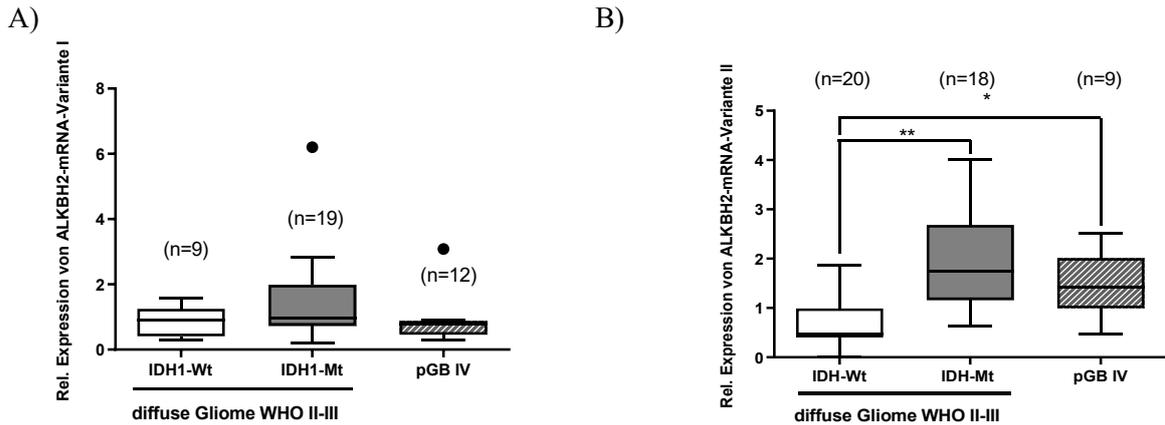
**Abb. 19: Ansprechen der transfizierten Zelllinie LN-18 auf Methylnmethansulfonat (MMS)-Behandlung in Abhängigkeit zur MGMT-Expression**

Nachweis einer verminderten MGMT-Expression mittels Western-Blot-Methode nach Transfektion verschiedener MGMT-siRNAs in die Glioblastomzelllinie LN-18 (A). Ansprechen der *IDH1*-Wildtyp- bzw. *IDH1*-R132H-transfizierten Zellen der Zelllinie LN-18 auf die einstündige Behandlung mit 2 mM oder 4 mM Methylnmethansulfonat (MMS) nach der Transfektion mit MGMT-siRNA (B) bzw. NC-siRNA (C). Eine relative Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels der Kristallviolett-Methode.

#### 4.4 Bestimmung der ALKBH2 und MGMT mRNA-Expression in diffusen Gliomen

##### 4.4.1 ALKBH2 mRNA-Expression in diffusen Gliomen

In aus diffusen Gliomen verschiedener WHO-Grade gewonnener cDNA wurde die relative ALKBH2 mRNA-Expression mittels semiquantitativer RT-PCR bestimmt. Zwei verschiedene ALKBH2 mRNA-Varianten wurden untersucht. Die Anzahl der untersuchten cDNA-Proben / Tumoren pro Tumorgruppe sind in der Beschreibung der Abbildung 20 angegeben. Die diffusen Gliome der WHO-Grade II und III wurden unterschieden in *IDH*-Wildtyp und *IDH*-mutierte Tumoren. In den *IDH1*-Wildtyp-Gliomen wurde im Vergleich zu den *IDH1*-mutierten Gliomen eine signifikant ( $p < 0,001$ ) niedrigere und im Vergleich zu *IDH*-Wildtyp Glioblastomen ebenfalls signifikant ( $p < 0,05$ ) niedrigere Expression der ALKBH2-mRNA-Variante II gemessen (siehe Abbildung 20 B). Die relative Expression der ALKBH2-mRNA Variante I unterschied sich zwischen diesen Tumorguppen nicht (siehe Abbildung 20 A).

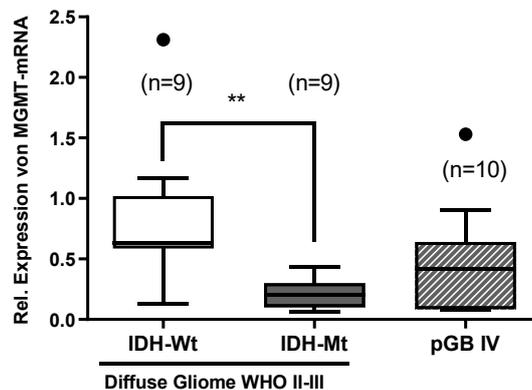


**Abb. 20: ALKBH2 mRNA-Expression in diffusen Gliomen**

Bestimmung der relativen Expression von ALKBH2-mRNA-Variante I (A) bzw. -Variante II (B) in *IDH1*-Wildtyp (*IDH1*-Wt) bzw. *IDH1*-mutierten (*IDH1*-Mt) diffusen Gliomen der WHO-Grade II und III und in primären Glioblastomen (WHO-Grad IV).

#### 4.4.2 MGMT mRNA-Expression in diffusen Gliomen

In diffusen Gliomen der WHO-Grade II und III wurde mittels real-time PCR die relative MGMT-mRNA-Expression bestimmt. Die *IDH1*-Wildtyp-Gliome wiesen eine signifikant ( $p < 0,01$ ) höhere Expression von MGMT-mRNA im Vergleich zu den *IDH*-mutierten Tumoren auf. Die relative MGMT-mRNA-Expression in *IDH*-Wildtyp Glioblastomen unterschied sich nicht von der in *IDH1*-Wildtyp- bzw. *IDH1*-mutierten Gliomen der WHO-Grade II und III.



**Abb. 21: MGMT mRNA-Expression in diffusen Gliomen**

Relative MGMT mRNA-Expression in diffusen Gliomen der WHO-Grade II und III mit *IDH1*-Mutation (*IDH1*-Mt) bzw. *IDH1*-Wildtyp (*IDH1*-Wt) und in primären Glioblastomen (pGB IV) mit *IDH1*-Wildtyp.

## 5 Diskussion

In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass der in *IDH1*-mutierten Glioblastomzellen gebildete Metabolit D-2-Hydroxyglutarat (D-2-HG) zu einer kompetitiven Hemmung des  $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängigen Reparaturenzyms ALKBH2 führt und hieraus eine verminderte Resistenz der Tumorzellen gegenüber monofunktionalen Alkylanzien resultiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass D-2-HG einen Einfluss auf die enzymatische Aktivität von ALKBH2 haben könnte, wobei vermutlich der genetische Hintergrund der Tumorzellen eine Rolle spielt. Zur Validierung der hier vorgelegten Ergebnisse bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen, unter anderem auch an primärem humanen Tumorgewebe.

### 5.1 Aktivität des Enzyms ALKBH2 in Glioblastomzellen mit *IDH1*-Mutation

Im Jahr 2003 publizierten Welford und Kollegen eine Arbeit, in welcher sie verschiedene 2-OG Analoga bezüglich ihrer potentiellen Eigenschaft als ALKBH-Inhibitoren testeten und fanden, dass D-2-HG als einziges der untersuchten Analoga nicht zu einer Inhibition der ALKBH-Enzyme führte [94]. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wiesen Chen und Kollegen [95] eine D-2-HG-abhängige Inhibition des Enzyms ALKBH2 nach, indem sie ALKBH2 und D-2-HG „im Reagenzglas“ zusammenbrachten. Die letztgenannte Arbeitsgruppe verwendete im Verhältnis zur  $\alpha$ -KG-Konzentration höhere Konzentrationen von D-2-HG als die Arbeitsgruppe von Welford und Kollegen. Die in Glioblastomen mit *IDH1*-Mutation gemessenen Konzentrationen von D-2-HG [38] und das Verhältnis von D-2-HG zu  $\alpha$ -KG stimmen mit den in den Experimenten von Chen und Kollegen verwendeten Konzentrationen annähernd überein. Dennoch ist es wichtig, sich zu verdeutlichen, dass bei einem solchen experimentellen Ansatz die Bedeutung der subzellulären Kompartimente und die Kompensationsmechanismen der Zellen nicht berücksichtigt werden. Das Enzym ALKBH2 ist beispielsweise im Nukleus lokalisiert [70], während das *IDH1*-mutierte Enzym den Metabolit D-2-HG im Zytosol bildet [96]. Zudem wurde bei Gliomen mit *IDH1*-Mutation eine kompensatorische Hochregulierung von IDH2 beobachtet [97]. Daher erschien für die vorliegende Dissertationsarbeit ein Zelllinienmodell angebracht, um die Rolle einer *IDH1*-Mutation sowie von anderen, vom *IDH1*-Status unabhängigen Einflussfaktoren auf die Zytotoxizität von monofunktionalen alkylierenden Zytostatika auf Glioblastomzellen näher zu untersuchen.

Für die Einschätzung der Prognose sowie für die Diagnostik und Therapie von Glioblastomen spielen molekulargenetische Alterationen eine zunehmend größere Rolle. In mehreren wissenschaftlichen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche molekulargenetische Alterationen nicht unabhängig voneinander betrachtet werden sollten. So postulierten z.B. Molenaar et al. [43], dass die

Kombination aus *IDHI*-Mutation und Hypermethylierung des *MGMT*-Promotors einen 2-Gen-Prädiktor darstellt, der als eigenständiger Biomarker zu betrachten ist, dessen Bedeutung über die der einzelnen Parameter hinausgeht. Die Arbeitsgruppe von Jin et al. [98] benutzte dagegen einen Prädiktor, der sich aus fünf Genen (*APEX1*, *APRT*, *PARP2*, *PMS2L2* und *POLR2L*) zusammensetzt, die bei der DNA-Reparatur beteiligt sind. Aus diesem Grunde wurden in der vorliegenden Dissertationsarbeit Glioblastomzelllinien mit molekulargenetischen Alterationen gewählt, welche unabhängig von der *IDHI*-Mutation die Funktionalität von ALKBH2 oder dessen Relevanz als Reparaturenzym beeinflussen könnten.

Bei kontinuierlicher Behandlung der entweder mit der *IDHI*-R132H- oder der *IDHI*-Wildtyp-Sequenz transfizierten Glioblastomzelllinien mit einer niedrigen Konzentration von Methylmethansulfonat (MMS) über 72 Stunden wurde in den eigenen Untersuchungen in keiner der Zelllinien eine unterschiedliche Empfindlichkeit zwischen den *IDHI*-R132H-transfizierten Zellen und den *IDHI*-Wildtyp-transfizierten Zellen beobachtet. Die Zelllinie U-87 MG wurde zudem über 10 Tage mit MMS bzw. mit Temozolomid (TMZ) behandelt, wobei sich ebenfalls keine unterschiedlichen Empfindlichkeiten der Zellen mit *IDHI*-R132H-Transfektion verglichen mit den *IDHI*-Wildtyp-transfizierten Zellen zeigten. Der Umstand, dass ausschließlich nach einer hochdosierten und diskontinuierlichen Behandlung mit MMS Hinweise für eine reduzierte Aktivität des Enzyms ALKBH2 gefunden wurden, zeigt, dass durch die Behandlung mit den hier untersuchten Zytostatika die Reparaturfunktion von ALKBH2 wahrscheinlich nicht komplett ausfällt, sondern dass vielmehr die Reparaturkapazität von ALKBH2 in Gliomzellen mit *IDHI*-Mutation gegenüber Gliomzellen mit dem *IDHI*-Wildtyp herabgesetzt wird. Diese Vermutung stimmt mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Chen et al. überein, die bei den in Gliomen gemessenen Konzentrationen von D-2-HG eine etwa 80 %ige Reduktion der Aktivität von ALKBH2 feststellten.

### **5.1.1 Regulatorischen Kompensationsmechanismen in Zellmodellen und Tumorgewebe**

Der durch mutiertes *IDH1* generierte Onkometabolit D-2-HG führt vermutlich zu einer kompetitiven Hemmung des Enzyms ALKBH2, indem er das aktive Zentrum des Enzyms blockiert, welches normalerweise  $\alpha$ -KG bindet [95]. Eine mögliche Resistenzbildung von Tumoren gegenüber Chemotherapeutika besteht in der Hochregulierung von Reparaturenzymen (siehe Abschnitt 1.4). Daher ist durchaus denkbar, dass Glioblastomzellen unter bzw. nach Behandlung mit monofunktionalen alkylierenden Zytostatika vermehrt ALKBH2 bilden. Ebenso könnte eine kompetitive Hemmung von ALKBH2 in *IDHI*-R132H-mutierten Gliomzellen zu einer verstärkten Bildung von ALKBH2 verglichen mit der Bildung in *IDHI*-Wildtyp-Zellen führen. Hierdurch könnte in *IDHI*-R132H-mutierten Gliomzellen eine mit *IDHI*-Wildtyp-Gliomzellen vergleichbare Reparaturkapazität der durch die Zytostatika induzierten DNA-Schäden herbeigeführt werden. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde

nach der Behandlung der mit *IDH1*-Wildtyp- bzw. *IDH1*-R132H-transfizierten Glioblastomzelllinie U-87 MG mit verschiedenen Konzentrationen von MMS die Expression der ALKBH2-mRNA sowie des ALKBH2-Proteins bestimmt. Es zeigte sich, dass in der verwendeten Zelllinie weder auf transkriptioneller Ebene noch auf Proteinebene eine kompensatorische Hochregulierung der Expression des Enzyms ALKBH2 in *IDH1*-R132H-mutierten Zellen verglichen mit *IDH1*-Wildtyp-Zellen festzustellen war (vgl. Abschnitt 4.2.5).

Zusätzlich zur Untersuchung der Kompensationsmechanismen einer reduzierten Aktivität von ALKBH2 in Zellmodellen, wurde in cDNA aus Hirntumorgewebe geprüft, ob die relative Expression von ALKBH2-mRNA in *IDH1*-Wildtyp- im Vergleich zu *IDH1*-mutierten Gliomen unterschiedlich ist. Hierfür wurde die relative mRNA-Expression der beiden ALKBH2-Transkriptvarianten mittels semiquantitativer Real Time-PCR bestimmt. Während Variante I die gesamte kodierende Sequenz des *ALKBH2*-Gens enthält, fehlt Variante II die alpha-KG-bindende Domäne und damit die enzymatische Funktion [75]. In den untersuchten *IDH*-mutierten Gliomen zeigte sich im Vergleich zu den *IDH*-Wildtyp Gliomen eine höhere Expression der ALKBH2-mRNA-Variante II. Da die Translation dieser mRNA zu einem enzymatisch inaktiven Protein führt, spielt sie nicht direkt eine Rolle bei der Reparatur von DNA-Schäden. Ob sie indirekt bei der DNA-Reparatur z.B durch Induktion der Variante I beteiligt ist, wurde bisher noch nicht untersucht.

An der Reparatur von Zytostatika-induzierten DNA-Schäden sind multiple Reparatursysteme beteiligt. Das in Gliomen am besten erforschte und klinisch relevanteste Reparaturenzym ist die O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) [99], [26]. Ebenso wie ALKBH2 repariert MGMT DNA-Schäden, welche durch Alkylanzien verursacht werden (vgl. Abschnitt 1.5.4.). In der vorliegenden Arbeit fand sich eine niedrigere Expression von MGMT auf mRNA-Ebene in WHO-Grad II und III Gliomen mit *IDH1*-Mutation im Vergleich zu WHO-Grad II und III Gliomen ohne *IDH1*-Mutation (vgl. Abschnitt 4.4.2.). Dies passt zu der Beobachtung anderer Autoren, dass in *IDH*-mutierten Gliomen häufiger als in *IDH*-Wildtyp Gliomen eine Hypermethylierung des *MGMT*-Promotors vorliegt [100], welche wiederum zu einer eingeschränkten *MGMT*-Transkription und somit reduzierter MGMT mRNA-Expression führt.

## **5.2 Rolle der *MGMT*-Promotor-Hypermethylierung in Glioblastomzellen mit *IDH1*-R132H-Mutation**

In einer experimentellen Studie von Johannessen und Kollegen [69] wurde nur bei Glioblastomzellen mit *MGMT*-Promotorhypermethylierung eine durch ALKBH2 vermittelte Resistenz gegenüber den

alkylierenden Substanzen Temozolomid und Methylmethansulfonat beobachtet. Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertationsarbeit stimmen mit dieser Beobachtung überein. Für die MGMT-exprimierenden Zelllinie LN-18 ließ sich weder bei der Behandlung mit niedrigen (vgl. Abschnitt 4.2.2) noch bei der Behandlung mit hohen MMS-Konzentrationen (vgl. Abschnitt 4.2.3) ein unterschiedliches Ansprechen von Zellen mit Transfektion der *IDHI*-Wildtyp- versus Zellen mit Transfektion der *IDHI*-R132H-Mutation feststellen. Die Expression des Reparaturenzyms MGMT führt in Gliomen unter anderem zur Resistenz gegenüber Temozolomid [101] und ist in einem höheren Maß an der Verringerung der Zytotoxizität des Zytostatikums beteiligt als ALKBH2 (siehe Abschnitt 1.6). Möglicherweise werden die Auswirkungen einer reduzierten Aktivität von ALKBH2 in Anwesenheit des Reparaturenzyms MGMT kompensiert. Um zu prüfen, ob das Enzym ALKBH2 ausschließlich in Zelllinien ohne MGMT-Expression für die Resistenzbildung gegenüber MMS und TMZ relevant ist, wurde die MGMT-Expression in der Zelllinie LN-18 mittels MGMT-siRNA reduziert und die Zellen anschließend mit MMS behandelt. Hierbei zeigte sich allerdings wiederum kein signifikanter Unterschied zwischen Zellen mit *IDHI*-Wildtyp-Transfektion und solchen mit *IDHI*-R132H-Transfektion.

Zudem wurden in der Glioblastomzelllinie LN-229, welche eine Hypermethylierung des *MGMT*-Promotors aufweist, keine signifikanten Unterschiede zwischen *IDHI*-Wildtyp- oder *IDHI*-R132H-transfizierten Zellen bezüglich des Ansprechens auf Methylmethansulfonat festgestellt (siehe Abschnitt 4.2.2 und 4.2.3). Da die Zelllinien LN-18 und LN-229 jeweils eine Mutation des Gens *TP53* aufweisen und das Protein p53 auf Transkriptionsebene an der Regulation von ALKBH2 beteiligt ist (siehe Abschnitt 5.3), kann angenommen werden, dass unabhängig vom *IDHI*-Status eine durch die *TP53*-Mutation vermittelte regulatorisch bedingte Dysfunktion von ALKBH2 vorliegt. Diese Hypothese wird in Abschnitt 5.3. adressiert.

### **5.3 Rolle des *TP53*-Status für Regulierung der Expression von ALKBH2 in Glioblastomzellen**

Ein wichtiger molekulargenetischer Unterschied zwischen den in dieser Dissertationsarbeit verwendeten Zelllinien A-172 bzw. U-87 MG und LN-18 bzw. LN-229 betrifft das *TP53*-Gen [102]. Die Zelllinien A-172 [103] und U-87 MG [104] weisen die Wildtypsequenz des *TP53*-Gens auf, während dieses Gen in den Zelllinien LN-18 und LN-229 mutiert ist. Die eigenen Untersuchungen legen nahe, dass die vermehrte Toxizität von MMS gegenüber *IDHI*-R132H-transfizierten im Vergleich zu *IDHI*-Wildtyp-transfizierten Zellen nur solche Glioblastomzelllinien betrifft, die *TP53* Wildtyp sind. Diese Schlussfolgerung stimmt mit den Beobachtungen von Wang et al. [105] überein, die bei einer

retrospektiven Analyse von Patienten mit Glioblastomen, die mit Bestrahlung und Chemotherapie behandelt worden waren, beobachtet hatten, dass Mutationen von *IDH1*, die Promotor-Hypermethylierung von *MGMT* sowie eine Mutation von *TP53* unabhängige prognostische Faktoren darstellen und dass die Hypermethylierung des *MGMT*-Promotors und der *TP53*-Status vom *IDH*-Mutationsstatus abhängen: Patienten, deren Tumor eine *IDH1*-Mutation und gleichzeitig eine Hypermethylierung des *MGMT*-Promotors aufweist, hatten eine längere progressionsfreie Überlebenszeit und eine längere Gesamtüberlebenszeit als solche, deren Tumoren keine *MGMT*-Promotor-Hypermethylierung aufwiesen. Allerdings zeigte sich in dieser Analyse, dass das Vorhandensein einer Hypermethylierung des *MGMT*-Promotors oder einer *TP53*-Mutation auch bei Patienten mit einem *IDH1*-Wildtypstatus des Tumors mit einer längeren Überlebenszeit verbunden ist [105]. Lee et al. [106] berichteten, dass DNA-Reparaturmechanismen auch bei der Resistenzbildung gegenüber einer photodynamischen adjuvanten Therapie von Patienten mit Glioblastomen eine wichtige Rolle spielen. Hierbei erhöht p53 die Aktivität des Reparaturenzyms ALKBH2. Die Autoren unterzogen Zellen der Glioblastomzelllinie U-87 MG einer photodynamischen Therapie und nach 3 Stunden wurden die überlebenden und damit resistenten Zellen geerntet, um darin die Expression von Reparaturgenen zu bestimmen. Dabei zeigte sich, dass das DNA-Reparaturenzym ALKBH2 nach der photodynamischen Behandlung sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene deutlich erhöht war und dass das Tumorprotein p53 an den Promotor von *ALKBH2* bindet und dadurch zur Entstehung der Resistenz gegenüber der photodynamischen Therapie beiträgt [106]. Zusätzlich stellte die Arbeitsgruppe von Johannessen et al. [69] fest, dass eine nicht genotoxische Aktivierung des p53-Signalweges bei Glioblastomzellen mit einem *TP53*-Wildtyp zu einer Herunterregulierung der Expression des Enzyms ALKBH2 führt. Wenn die Ergebnisse der oben genannten Studien kombiniert werden, ergibt sich die Schlussfolgerung, dass eine genotoxische Wirkung zu einer vermehrten Transkription von *ALKBH2* führt, während eine nicht-genotoxische Aktivierung über p53 zu einer Herunterregulation von ALKBH2 führt. Dementsprechend würde eine durch DNA-Schäden induzierte Aktivierung von p53 die Expression des Enzyms ALKBH2 erhöhen. Bei einer *TP53*-Mutation wäre dieser Signalweg inaktiviert und es würde somit ein wichtiger regulatorischer Mechanismus zur Stimulation der Expression des Enzyms ALKBH2 fehlen. Ein solcher Ausfall des Regulationsmechanismus würde erklären, warum in den hier durchgeführten Untersuchungen bei der *TP53*-mutierten Zelllinie LN-229 trotz Hypermethylierung des *MGMT*-Promotors und bei der *TP53*-mutierten Zelllinie LN-18 auch nach Behandlung mit *MGMT*-siRNA keine unterschiedliche Zytotoxizität des Zytostatikums MMS in *IDH1*-Wildtyp- und *IDH1*-R132H-transfizierten Zellen festgestellt wurde.

Die klinische Relevanz der hier beschriebenen experimentellen zellbiologischen Befunde wird durch eine klinische Beobachtungsstudie von Ogura et al. evident [107]. In dieser Studie wurde bei anaplastischen Gliomen bzw. Glioblastomen der Einfluss von *TP53*-Status, *MGMT*-Status und *IDH1*-Status auf das Gesamtüberleben der Patienten analysiert. Hierfür wurden anaplastische Gliome bzw.

Glioblastome von 226 Patienten immunhistologisch untersucht und auf dem Boden der oben genannten Kriterien drei Subgruppen zugeordnet. In Gruppe A wurden Patienten mit Gliomen eingeordnet, welche eine *IDH1*-Mutation und eine MGMT-Expression aufwiesen. Gruppe B umfasste Gliome, welche keine *IDH1*-Mutation, keine MGMT-Expression und keine oder nur eine sehr schwache p53-Expression zeigten. Der Gruppe C wurden Gliome zugeordnet, in welchen *IDH1* nicht mutiert war, welche jedoch entweder das Enzym MGMT exprimierten oder, falls sie kein MGMT exprimierten, eine p53-Expression aufwiesen. Interessanterweise überlebten die Patienten in Gruppe C am kürzesten. Entsprechend den Befunden von Ogura et al [107] hatte bei den untersuchten Tumorzellen eine p53-Expression nur dann eine prognostische Bedeutung, wenn weder eine *IDH1*-Mutation noch eine MGMT-Expression vorlag. Diese klinischen Beobachtungen sind in Einklang mit den Ergebnissen der hier vorgelegten experimentellen Arbeit. Nach den Ergebnissen der hier vorgelegten Dissertationsschrift ist ALKBH2 nur in Gliomen ohne MGMT-Expression hinsichtlich der Therapiesensitivität relevant. Die ALKBH2-Dysfunktion kann zum einem durch eine *IDH1*-Mutation und zum anderen durch eine *TP53*-Mutation bedingt sein. Eine Dysfunktion des Enzyms führt in diesem Fall zu einer höheren Zytotoxizität des Zytostatikums Temozolomid, was letztlich zu einem längeren Gesamtüberleben der Patienten führen dürfte.

## **5.4 Mögliche klinische Bedeutungen**

### **5.4.1 Gestörte Regulation der ALKBH2-Expression durch Mutationen von *TP53* in Gliomen**

Die Relevanz des Transkriptionsfaktors p53 wird besonders deutlich daran, dass ca. 30 % der *IDH*-Wildtyp Glioblastome [108] und mehr als 80% der *IDH*-mutierten Glioblastome *TP53*-Mutationen aufweisen [109]. *TP53*-Mutationen finden sich zudem bei mehr als 80 % der *IDH*-mutierten astrozytären Gliome der WHO-Grade II und III [109], während in Oligodendrogliomen und deren Vorstufen ausschließlich der *TP53*-Wildtyp vorhanden ist [110]. Eine durch eine *TP53*-Mutation vermittelte regulatorische Dysfunktion des Enzyms ALKBH2 würde daher bei fast allen *IDH*-mutierten astrozytären Gliomen inklusive der *IDH*-mutierten Glioblastome und ca. einem Drittel der *IDH*-Wildtyp Glioblastome zu einer höheren Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika beitragen können, da in diesen Tumoren die Hochregulation von ALKBH2 durch p53 gestört ist.

### **5.4.2 Mögliche Relevanz von ALKBH2 in Oligodendrogliomen**

Eine durch ALKBH2 vermittelte Resistenzbildung gegenüber Temozolomid (TMZ) ist ausschließlich in Gliomzellen ohne MGMT zu beobachten [69]. Gleichzeitig weisen die meisten astrozytären Gliome mit *IDH1*-Mutation zusätzlich eine *TP53*-Mutation auf. In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurde in den *TP53*-mutanten Glioblastomzellen kein unterschiedliches Ansprechen von *IDH1*-mutanten Zellen verglichen mit *IDH1*-Wildtyp-Zellen festgestellt. Möglicherweise führt eine *TP53*-Mutation

unabhängig vom *IDH1*-Status zu einer Dysfunktion des Enzyms ALKBH2. Ausgehend von den Ergebnissen der hier vorgelegten Dissertationsarbeit kann man die Hypothese aufstellen, dass eine Inhibition von ALKBH2 durch D-2-HG und somit der *IDH1*-Status ausschließlich bei solchen Gliomen eine therapeutische Rolle spielt, welche keine *TP53*-Mutation, sondern vielmehr eine Kombination von Hypermethylierung des *MGMT*-Promotors und *IDH1*-Mutation aufweisen. Typische Gliome, die eine solche molekulargenetische Alteration aufweisen, sind Oligodendrogliome [91]. Oligodendrogliome sind neben der *IDH*-Mutation durch einen kombinierten Verlust der Chromosomenarme 1p und 19q (1p/19q-Kodeletion) charakterisiert [7] [50] und sprechen in der Regel gut auf eine DNA-alkylierende Chemotherapie an. Ob eine erhöhte Expression von ALKBH2 möglicherweise einen Mechanismus der Therapieresistenz in Oligodendrogliomen darstellt, ist eine interessante Hypothese, die in zukünftigen Forschungsarbeiten abgeklärt werden sollte.

### **5.4.3 Mögliche Therapieansätze für Glioblastome mit verminderter ALKBH2-Expression**

#### **5.4.3.1 Systemische und lokale Chemotherapie von Glioblastomen**

Die Standardtherapie von Glioblastompatienten besteht aus der operativen Entfernung des Tumors mit nachfolgender Bestrahlung und Chemotherapie. Als Zytostatikum der Wahl wird Temozolomid (TMZ) benutzt, welches zu den monofunktionalen Alkylanzien gehört (siehe Abschnitt 1.5). Die alkylierende Substanz Methylmethansulfonat (MMS) wird wegen der hohen Toxizität fast ausschließlich für *in vitro*-Studien und tierexperimentelle Untersuchungen verwendet. In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurde nach hochkonzentrierter Behandlung mit MMS in Glioblastomzellen nach Transfektion von *IDH1*-R132H eine höhere Empfindlichkeit auf das Zytostatikum im Vergleich *IDH1*-Wildtyp-transfizierten Zellen festgestellt. Die Glioblastomzellen wurden diskontinuierlich mit MMS behandelt, da bei den angewandten Konzentrationen die Zytotoxizität für eine kontinuierliche Anwendung zu hoch gewesen wäre. In der klinischen Situation stellt sich eine diskontinuierliche oder auch eine lokal begrenzte Therapie der Tumorzellen im Vergleich zu den *in vitro* Versuchen deutlich problematischer dar. Die Blut-Hirn-Schranke erlaubt zwar einen Durchtritt der bei Gliomen üblicherweise verwendeten Chemotherapeutika; allerdings werden wirksame Konzentrationen dieser Substanzen im Tumor nur mit Dosen erreicht, die bei systemischer Gabe multiple Nebenwirkungen verursachen können. Prinzipiell gibt es unterschiedliche Möglichkeiten diese Problematik bei der Therapie des Glioblastoms zu umgehen: Seit den 1990er Jahren ist ein lokales adjuvantes Therapieprinzip verfügbar, bei dem im Anschluss an die chirurgische Resektion von Gliomen ein mit Carmustin imprägniertes, biodegradierbares Polymer in die Tumorresektionshöhle eingebracht wird [111]. Eine andere Möglichkeit der Lokalthherapie beim Glioblastom ist die intra-arterielle Verabreichung von Chemotherapeutika mit Hilfe neuer optischer Techniken und Tracern, Nanopartikeln, neuen zellulären Substanzen und speziellen Präparationen von Medikamenten, die ggf. über Mikrokatheter direkt in die

Hirn-zuführenden Arterien eingebracht werden können, eventuell verbunden mit einer osmotischen Öffnung der Blut-Hirn-Schranke [112]. Diese Methoden sind aber überwiegend in Studien mit kleinen Fallzahlen von Patienten oder in Tierversuchen erprobt worden und haben bisher noch keinen Eingang in die Standardtherapie des Glioblastoms gefunden.

#### **5.4.3.2 Potenzielle Chemotherapeutika**

In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurde in Einklang mit den Ergebnissen anderer Autoren [69], [113] eine durch ALKBH2 vermittelte Resistenz gegenüber dem Zytostatikum MMS festgestellt. MMS erzeugt mehr DNA-Schäden, die von ALKBH2 repariert werden, als das Zytostatikum TMZ und würde sich daher theoretisch als geeignetes Therapeutikum anbieten (siehe Abschnitt 1.6). Jedoch wird MMS bisher nicht zur systemischen Therapie von Patienten eingesetzt. Der Umstand, dass MMS eines der am häufigsten benutzten Zytostatika zur experimentellen Auslösung von DNA-Schäden darstellt und zugleich therapeutisch bisher keinerlei Relevanz besitzt, ist durch die hohe Toxizität dieser Substanz *in vivo*, insbesondere eine hohen Hepatotoxizität [114] zu erklären.

Von Wang et al. [113] wurde eine erhöhte Empfindlichkeit von Gliomen mit einer *IDHI*-Mutation gegenüber dem Zytostatikum CCNU (Lomustin) beobachtet. Die Autoren schlossen hieraus, dass das stärkere Ansprechen der Zellen mit *IDHI*-Mutation auf das alkylierende Zytostatikum auf eine durch D-2-HG vermittelte Hemmung des Enzyms ALKBH2 zurückzuführen sei. CCNU wird seit langem in der Therapie von Gliomen eingesetzt, insbesondere bei Oligodendrogliomen sowie bei Rezidiven von Gliomen [115], [116]. Zudem wurde in der NOA-9-Studie bei Patienten mit *MGMT*-Promotormethylierten Glioblastomen eine längere Überlebenszeit nachgewiesen, wenn diese statt der alleinigen Standardtherapie mit TMZ zusätzlich noch CCNU erhielten [117]. Es wurde nachgewiesen, dass die sogenannte "health-related quality of life", also die Lebensqualität der Patienten sowie die neurokognitiven Funktionen durch die Kombinationstherapie im Vergleich zur Monotherapie mit Temozolimid nicht beeinträchtigt waren [118].

In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurde in Glioblastomzellen mit transfiziertem *IDHI*-Wildtyp oder *IDHI*-R132H kein unterschiedliches Ansprechen auf eine Behandlung mit CCNU beobachtet. Da CCNU ein bifunktionales Alkylanz ist und ALKBH2 DNA-Schäden repariert, die von monofunktionalen Alkylanzien wie TMZ und MMS herbeigeführt werden [52], ist dieses Ergebnis nicht unerwartet.

In nicht-kleinzelligen Lungenkrebszellen wurde durch Herunterregulierung von ALKBH2 ein stärkeres Ansprechen der Tumorzellen auf Cisplatin erreicht [119]. Da zudem beobachtet wurde, dass Cisplatin

in Zellen mit einer *IDH1*-Mutation eine starke Wirkung entfaltet als in *IDH1*-Wildtyp-Zellen, kann spekuliert werden, dass hierfür eine Inhibition von ALKBH2 durch D-2-HG verantwortlich ist [120].

Eine epigenetische Herunterregulierung der Transkription von *MGMT* wird als ein wesentlicher Grund für die Wirksamkeit von TMZ angesehen [27]. Der *MGMT*-Status kann daher als Indikator für die Vorhersage des Ansprechens auf Temozolomid herangezogen werden [121], [44]. In *in vitro*-Studien wurde nachgewiesen, dass Cisplatin die Aktivität von *MGMT* reduziert, so dass bei einer kombinierten Therapie von Cisplatin und TMZ die effektive Dosis von TMZ erhöht wird [122]. Dadurch wird entsprechend einer aktuellen Beobachtungsstudie bei Patienten mit Glioblastom-Rezidiven die Überlebenszeit verlängert [123]. Bisher liegen aber noch keine Ergebnisse von randomisierten klinischen Studien mit diesem Regime vor, so dass die Größe des Effekts noch nicht sicher abzuschätzen ist.

## 5.5 Schwachpunkte der vorliegenden Dissertationsarbeit

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertationsarbeit basieren auf Experimenten mit Glioblastomzelllinien sowie mRNA-Untersuchungen an primärem Tumorgewebe von Gliompatienten. Ein Nachteil bei der Verwendung von etablierten Glioblastomzelllinien sind mögliche molekulargenetische Veränderungen, welche in Folge der Kultivierung der Glioblastomzelllinien *in vitro* entstanden sind. Dadurch können sich ggf. bei den Zellkulturexperimenten wichtige Unterschiede im Ansprechen dieser Zellen auf verschiedene Einflussfaktoren im Vergleich zu den Tumorzellen im ursprünglichen Tumor ergeben. Solche Veränderungen scheinen sich bereits kurz nach der Überführung des Tumorgewebes in die Zellkultur zu ereignen [124]. Durch einfachere und schnellere Methoden zur Sequenzierung des Genoms, wie z.B. *next generation sequencing* [125], werden immer mehr Zelllinien auf neu aufgetretene molekulargenetische Alterationen in Folge der Kultivierung *in vitro* untersucht. So wurde z.B. bei der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinie A-172 eine neu akquirierte Deletion des Chromosomabschnitts 9p21.3 entdeckt [126]. Zusätzlich handelte es sich bei den verwendeten Zelllinien ausschließlich um Linien, die aus *IDH*-Wildtyp-Glioblastomen gewonnen wurden und die erst *in vitro* mit der *IDH1*-R132H-Mutation transfiziert wurden. Diese *IDH1*-Mutation ist allerdings typisch für *IDH*-mutierte Glioblastome, die häufig aus niedriggradigeren Vorläuferläsionen durch Progression entstehen. Da *IDH*-Wildtyp-Glioblastome und *IDH*-mutierte Glioblastome sich molekulargenetisch deutlich voneinander unterscheiden [127], könnte die *IDH*-Mutation in *IDH*-mutierten Glioblastomzellen möglicherweise andere Auswirkungen entfalten als in *IDH*-Wildtyp Glioblastomzellen. Auf Grund limitierter Verfügbarkeit von etablierten primär *IDH*-mutierten Glioblastomzelllinien konnte diese Einschränkung der Aussagen mit den Ergebnissen der hier

vorgelegten Arbeit nicht ausgeschlossen werden. Für die Transfektion wurden Plasmide als Vektoren verwendet. Plasmide führen zur ektope Expression der transfizierten Gene und sind nicht an regulatorische Mechanismen der Zellen gebunden. Ein Nachteil bei der Transfektion der *IDHI*-R132H-Mutation mittels Plasmiden besteht darin, dass das Gen, das durch den Plasmid kodiert wird, zusätzlich zu dem endogenen Gen exprimiert wird. Hierdurch erfolgte die Synthese des *IDHI*-Wildtyp-Enzyms durch die endogene DNA der Glioblastomzellen und unabhängig von dieser erfolgte die Synthese des mutanten *IDHI*-Proteins von der stabil integrierten Plasmid-DNA. Die *IDHI*-Mutation in Gliomen ist typischerweise eine heterozygote Mutation [128], so dass die Expression des Enzyms des *IDHI*-Wildtyps und der *IDHI*-Mutation jeweils von einem Allel erfolgt. Durch die zusätzliche Proteinbiosynthese, wie sie in den transfizierten Glioblastomzellen vorliegt, ist nicht auszuschließen, dass die Konzentrationsverhältnisse zwischen den Enzymen des *IDHI*-Wildtyps und der *IDHI*-Mutation nicht dem in Gliomen mit *IDHI*-Mutation entsprechen. Zusätzlich wurde die Empfindlichkeit der mit der *IDHI*-R132H-Mutation transfizierten Zelllinien mit der Empfindlichkeit der mit *IDHI*-Wildtyp transfizierten Zelllinien verglichen. In einer Arbeit anderer Autoren wurde gezeigt, dass die Überexpression von *IDH1* zu einer Resistenz gegenüber dem Zytostatikum TMZ führt [129]. Letztlich könnten die Ergebnisse in der hier vorgelegten Arbeit nicht das Resultat einer stärkeren Empfindlichkeit der *IDHI*-mutanten Zellen gegenüber dem Zytostatikum TMZ darstellen, sondern einer stärkeren Resistenz der *IDHI*-Wildtyp transfizierten Zellen entsprechen. Da allerdings eine höhere Empfindlichkeit der *IDHI*-mutanten Zellen ausschließlich bei Zytostatika beobachtet wurde, deren Schäden von *ALKBH2* repariert werden, erscheint dies eher unwahrscheinlich.

## 5.6 Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen der eigenen Dissertationsarbeit

Die Ergebnisse der hier vorgelegten Dissertationsarbeit zeigen, dass *IDHI*-R132H-transfizierte Glioblastomzellen stärker auf das monofunktionale Alkylans Methylmethansulfonat (MMS), jedoch nicht stärker auf das bifunktionale Alkylans CCNU reagieren, als *IDHI*-Wildtyp-transfizierte Glioblastomzellen. Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür wäre, dass das  $\alpha$ -KG-abhängige Enzym *ALKBH2* durch den in *IDHI*-R132H-transfizierten Glioblastomzellen gebildeten Metaboliten D-2-HG kompetitiv gehemmt wird und hieraus eine reduzierte enzymatische Aktivität von *ALKBH2* resultiert. Da *ALKBH2* DNA-Schäden repariert, die durch MMS und andere monofunktionale Alkylanzien induziert werden, führt die *IDHI*-Mutation zu einer reduzierten Resistenz gegenüber den o.g. Zytostatika. Einschränkend ist jedoch zu erwähnen, dass die durch das Enzym Isocitrat-Dehydrogenase I (*IDH1*) vermittelte Dysfunktion des Reparaturenzyms *ALKBH2* nur unter bestimmten Bedingungen relevant zu sein scheint: Erstens scheint die im Vergleich zu *IDHI*-Wildtyp-transfizierten Glioblastomzellen stärkere Empfindlichkeit der *IDHI*-R132H-transfizierten Glioblastomzellen von der

Konzentration des verwendeten Zytostatikums abhängig zu sein. In der vorliegenden Dissertationsarbeit zeigte sich nur ein stärkeres Ansprechen nach diskontinuierlicher Behandlung mit hochkonzentriertem MMS. Die MMS-Konzentration war hierbei ca. 3mal höher als die Konzentration, die für die kontinuierliche Behandlung benutzt wurde. Eine hohe Konzentration von MMS war in den hier durchgeführten Zellexperimenten wegen einer starken Zytotoxizität nicht kontinuierlich anwendbar. Im klinischen Alltag wird statt des monofunktionale alkylierenden Zytostatikums MMS das monofunktionale alkylierende Zytostatikum Temozolomid (TMZ) eingesetzt. In der hier vorgelegten Dissertationsarbeit konnte TMZ nicht in hohen Dosen verwendet werden, da es sich nur in DMSO lösen lässt und DMSO ab einer bestimmten Konzentration selbst eine zytotoxische Wirkung ausübt. Eine Möglichkeit wäre hier, TMZ direkt in dem Zellkulturmedium zu lösen, welches man für die Kultur der Zellen verwendet. Insgesamt ist allerdings die durch ALKBH2 vermittelte DNA-Reparatur nach Behandlung mit MMS und TMZ vergleichbar, da es sich bei beiden Zytostatika um monofunktionale Alkylanzien handelt. Bei einer niedrigen Dosierung von TMZ wie auch von MMS ließen sich in der hier vorgelegten Dissertationsarbeit keine Unterschiede der Empfindlichkeit zwischen *IDH1*-R132H- und *IDH*-Wildtyp-transfizierten Glioblastomzellen feststellen. Allerdings kann wegen der Ähnlichkeit der durch beide Zytostatika induzierten DNA-Schäden vermutet werden, dass eine höhere Konzentration von TMZ ebenso wie die hier durchgeführte Behandlung mit hochkonzentriertem MMS für *IDH1*-R132H-transfizierte Glioblastomzellen stärker toxisch wirkt als für *IDH1*-Wildtyp-transfizierte Glioblastomzellen. In der klinischen Situation wären bei einer Behandlung mit deutlich höheren Konzentrationen von TMZ als den derzeit für die Therapie verwendeten Konzentrationen deutlich mehr Nebenwirkungen zu erwarten. Insgesamt müssen Nutzen und Nebenwirkungen der Therapie gut abgewogen werden. Eine regionale Chemotherapie mit alkylierenden Substanzen, wie sie bereits durch Implantate oder endovaskuläre Infusionen von Carmustin möglich ist, wäre dann vielleicht auch für die Behandlung mit TMZ vorteilhaft. Dies ist aber noch nicht erprobt worden.

Weiterhin ist es von besonderer Bedeutung, dass die stärkere Empfindlichkeit der Glioblastomzellen nach *IDH1*-R132H-Transfektion gegenüber monofunktionalen Alkylanzien nur für diejenigen Tumorzellen zutrifft, die eine Hypermethylierung des *MGMT*-Promotors aufweist. Nach den hier vorgelegten Experimenten kann vermutet werden, dass eine reduzierte Aktivität des Enzyms ALKBH2 durch das Reparaturenzym *MGMT* kompensiert werden kann. Als weiterer möglicher Einflussfaktor auf die Regulation der ALKBH2-Expression wurde an Hand der Ergebnisse der hier vorgelegten Arbeit der *TP53*-Mutationsstatus gefunden. Eine Regulation des Enzyms ALKBH2 durch p53 wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben [106]. Eine *TP53*-Mutation könnte dementsprechend unabhängig vom *IDH1*-Status zu einer verminderten Aktivität des Enzyms ALKBH2 führen. Hierdurch wäre zu erklären, warum die Empfindlichkeit der Zelllinien mit einer *TP53*-Mutation gegenüber MMS in *IDH1*-Wildtyp- und *IDH1*-R132H-transfizierten Glioblastomzellen nicht unterschiedlich war.

Der *TP53*-Status und der *IDH1*-Status in Gliomen spielen somit beide eine Rolle für die Regulation und Funktion des Reparaturenzyms ALKBH2. Die therapeutische Relevanz des Enzyms ALKBH2 hängt zusätzlich vom *MGMT*-Status ab. Für die Therapie von Gliomen könnte dies möglicherweise bedeuten, dass Patienten mit Gliomen, die sowohl eine Hypermethylierung des *MGMT*-Promotors als auch eine *TP53*-Mutation und/oder *IDH1*-Mutation aufweisen, stärker von einer Therapie mit monofunktionalen Alkylanzien wie z.B. MMT oder TMZ profitieren könnten, als Patienten, deren Tumoren keine *TP53*-Mutation und/oder *IDH1*-Mutation aufweisen. Diese Hypothese passt zu der klinischen Beobachtung eines besseren Ansprechens von *IDH*-mutierten im Vergleich zu *IDH*-nicht-mutierten Glioblastomen auf TMZ, mit einer entsprechend längeren Überlebenszeit der Patienten mit *IDH*-mutierten Glioblastomen unter der gegenwärtigen Standardtherapie. Eine eindeutige Rolle von *TP53*-Mutationen für das Ansprechen von Glioblastomen auf TMZ ist bislang klinisch dagegen noch nicht gezeigt worden [130].

Von Wu et al. wurde beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom eine ALKBH2-vermittelte Resistenzbildung gegenüber Cisplatin beobachtet [119]. Möglicherweise würden Patienten mit Glioblastomen, welche die oben erwähnten, mit einer therapeutisch relevanten ALKBH2-Dysfunktion einhergehenden molekulargenetischen Alterationen aufweisen, von einer kombinierten Therapie mit Temozolomid und Cisplatin profitieren. Diese Zusammenhänge müssten allerdings zunächst in Gliommodellen *in vitro* und *in vivo* überprüft und ggf. verifiziert werden. Ein möglicher Ansatz wäre z.B. die Transfektion von *TP53*-Wildtyp-Zelllinien mit der *TP53*-Mutation und die anschließende Behandlung der transfizierten Zelllinien mit MMS, TMZ und Cisplatin. Eine Bedeutung für die individuelle Therapie von Glioblastompatienten lässt sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt allerdings aus den eigenen *in vitro* Ergebnissen noch nicht ableiten.

## 6 Verzeichnisse

### 6.1 Literaturverzeichnis

1. Ostrom, Q.T., et al., *CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2007-2011*. Neuro-Oncology, 2014. **16**(suppl 4): p. iv1-iv63.
2. Davis, M.E., *Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment*. Clin J Oncol Nurs, 2016. **20**(5 Suppl): p. S2-8.
3. Tran, B. and M.A. Rosenthal, *Survival comparison between glioblastoma multiforme and other incurable cancers*. J Clin Neurosci, 2010. **17**(4): p. 417-21.
4. Ho, V.K., et al., *Changing incidence and improved survival of gliomas*. Eur J Cancer, 2014. **50**(13): p. 2309-18.
5. Weller, M., et al., *European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas*. The Lancet Oncology, 2017. **18**(6): p. e315-e329.
6. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *The definition of primary and secondary glioblastoma*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(4): p. 764-72.
7. Louis, D.N., et al., *The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary*. Acta Neuropathol, 2016. **131**(6): p. 803-20.
8. Eckel-Passow, J.E., et al., *Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors*. N Engl J Med, 2015. **372**(26): p. 2499-508.
9. Suzuki, H., et al., *Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas*. Nat Genet, 2015. **47**(5): p. 458-68.
10. Weller, M., et al., *Molecular classification of diffuse cerebral WHO grade II/III gliomas using genome- and transcriptome-wide profiling improves stratification of prognostically distinct patient groups*. Acta Neuropathol, 2015. **129**(5): p. 679-93.
11. Brat, D.J., et al., *cIMPACT-NOW update 5: recommended grading criteria and terminologies for IDH-mutant astrocytomas*. Acta Neuropathol, 2020. **139**(3): p. 603-608.
12. Huse, J.T., et al., *Mixed glioma with molecular features of composite oligodendroglioma and astrocytoma: a true "oligoastrocytoma"?* Acta Neuropathol, 2015. **129**(1): p. 151-3.
13. Sahm, F., et al., *Farewell to oligoastrocytoma: in situ molecular genetics favor classification as either oligodendroglioma or astrocytoma*. Acta Neuropathol, 2014. **128**(4): p. 551-9.
14. Ware, M.L., M.S. Berger, and D.K. Binder, *Molecular biology of glioma tumorigenesis*. Histol Histopathol, 2003. **18**(1): p. 207-16.
15. Pearson, P.L. and R.B. Van der Luit, *The genetic analysis of cancer*. J Intern Med, 1998. **243**(6): p. 413-7.
16. Levitt, N.C. and I.D. Hickson, *Caretaker tumour suppressor genes that defend genome integrity*. Trends Mol Med, 2002. **8**(4): p. 179-86.
17. Lengauer, C., K.W. Kinzler, and B. Vogelstein, *Genetic instabilities in human cancers*. Nature, 1998. **396**(6712): p. 643-649.
18. Kinzler, K.W. and B. Vogelstein, *Landscaping the Cancer Terrain*. Science, 1998. **280**(5366): p. 1036.
19. Lengauer, C., K.W. Kinzler, and B. Vogelstein, *Genetic instabilities in human cancers*. Nature, 1998. **396**(6712): p. 643-9.
20. Marx, J., *Oncogenes reach a milestone*. Science, 1994. **266**(5193): p. 1942.
21. Martin, S., H. Janouskova, and M. Dontenwill, *Integrins and p53 pathways in glioblastoma resistance to temozolomide*. Front Oncol, 2012. **2**: p. 157.
22. (DGN), D.G.f.N., *Leitlinien-S2K: Langfassung der Leitlinie "Gliome"*. 2015: p. 15-18.
23. Annovazzi, L., M. Mellai, and D. Schiffer, *Chemotherapeutic Drugs: DNA Damage and Repair in Glioblastoma*. Cancers (Basel), 2017. **9**(6).

24. Stupp, R., et al., *Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma*. New England Journal of Medicine, 2005. **352**(10): p. 987-996.
25. Esteller, M. and J.G. Herman, *Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O6-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer*. Oncogene, 2004. **23**(1): p. 1-8.
26. Kaina, B. and M. Christmann, *DNA repair in personalized brain cancer therapy with temozolomide and nitrosoureas*. DNA Repair (Amst), 2019. **78**: p. 128-141.
27. Hegi, M.E., et al., *MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 997-1003.
28. Everhard, S., et al., *Identification of regions correlating MGMT promoter methylation and gene expression in glioblastomas*. Neuro Oncol, 2009. **11**(4): p. 348-56.
29. Hegi, M.E., et al., *MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma*. New England Journal of Medicine, 2005. **352**(10): p. 997-1003.
30. Reifenberger, G., et al., *Predictive impact of MGMT promoter methylation in glioblastoma of the elderly*. Int J Cancer, 2012. **131**(6): p. 1342-50.
31. Brandes, A.A., et al., *Temozolomide concomitant and adjuvant to radiotherapy in elderly patients with glioblastoma: correlation with MGMT promoter methylation status*. Cancer, 2009. **115**(15): p. 3512-8.
32. Herrlinger, U., et al., *Lomustine-temozolomide combination therapy versus standard temozolomide therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CeTeG/NOA-09): a randomised, open-label, phase 3 trial*. Lancet, 2019. **393**(10172): p. 678-688.
33. Parsons, D.W., et al., *An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme*. Science, 2008. **321**(5897): p. 1807-12.
34. Weller, M., et al., *Molecular classification of diffuse cerebral WHO grade II/III gliomas using genome- and transcriptome-wide profiling improves stratification of prognostically distinct patient groups*. Acta Neuropathol, 2015. **129**(5): p. 679-93.
35. Yan, H., et al., *IDH1 and IDH2 mutations in gliomas*. N Engl J Med, 2009. **360**(8): p. 765-73.
36. Al-Khallaf, H., *Isocitrate dehydrogenases in physiology and cancer: biochemical and molecular insight*. Cell Biosci, 2017. **7**: p. 37.
37. Dalziel, K., *Isocitrate dehydrogenase and related oxidative decarboxylases*. FEBS Lett, 1980. **117 Suppl**: p. K45-55.
38. Dang, L., et al., *Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate*. Nature, 2009. **462**(7274): p. 739-44.
39. Natsumeda, M., et al., *Accumulation of 2-hydroxyglutarate in gliomas correlates with survival: a study by 3.0-tesla magnetic resonance spectroscopy*. Acta Neuropathol Commun, 2014. **2**: p. 158.
40. Xu, W., et al., *Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of  $\alpha$ -ketoglutarate-dependent dioxygenases*. Cancer Cell, 2011. **19**(1): p. 17-30.
41. Lu, C., et al., *IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation*. Nature, 2012. **483**(7390): p. 474-8.
42. Yang, P., et al., *IDH mutation and MGMT promoter methylation in glioblastoma: results of a prospective registry*. Oncotarget, 2015. **6**(38): p. 40896-906.
43. Molenaar, R.J., et al., *The combination of IDH1 mutations and MGMT methylation status predicts survival in glioblastoma better than either IDH1 or MGMT alone*. Neuro Oncol, 2014. **16**(9): p. 1263-73.
44. Stupp, R., et al., *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 987-96.
45. Wick, W., et al., *Prognostic or predictive value of MGMT promoter methylation in gliomas depends on IDH1 mutation*. Neurology, 2013. **81**(17): p. 1515-22.
46. Liu, J.T., D. Meza, and N. Sanai, *Trends in fluorescence image-guided surgery for gliomas*. Neurosurgery, 2014. **75**(1): p. 61-71.
47. Phi, L.T.H., et al., *Cancer Stem Cells (CSCs) in Drug Resistance and their Therapeutic Implications in Cancer Treatment*. Stem Cells Int, 2018. **2018**: p. 5416923.
48. Haar, C.P., et al., *Drug resistance in glioblastoma: a mini review*. Neurochem Res, 2012. **37**(6): p. 1192-200.

49. Zhang, J., M.F. Stevens, and T.D. Bradshaw, *Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance*. *Curr Mol Pharmacol*, 2012. **5**(1): p. 102-14.
50. Weller, M., et al., *European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas*. *Lancet Oncol*, 2017. **18**(6): p. e315-e329.
51. Drabløs, F., et al., *Alkylation damage in DNA and RNA--repair mechanisms and medical significance*. *DNA Repair (Amst)*, 2004. **3**(11): p. 1389-407.
52. Kondo, N., et al., *DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways*. *J Nucleic Acids*, 2010. **2010**: p. 543531.
53. Stojic, L., R. Brun, and J. Jiricny, *Mismatch repair and DNA damage signalling*. *DNA Repair (Amst)*, 2004. **3**(8-9): p. 1091-101.
54. Schärer, O.D., *Nucleotide excision repair in eukaryotes*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013. **5**(10): p. a012609.
55. Räschle, M., et al., *DNA repair. Proteomics reveals dynamic assembly of repair complexes during bypass of DNA cross-links*. *Science*, 2015. **348**(6234): p. 1253671.
56. Iliakis, G., *Backup pathways of NHEJ in cells of higher eukaryotes: Cell cycle dependence*. *Radiotherapy and Oncology*, 2009. **92**(3): p. 310-315.
57. Rodgers, K. and M. McVey, *Error-Prone Repair of DNA Double-Strand Breaks*. *Journal of cellular physiology*, 2016. **231**(1): p. 15-24.
58. Robertson, A.B., et al., *DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it*. *Cell Mol Life Sci*, 2009. **66**(6): p. 981-93.
59. Kaina, B., et al., *MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents*. *DNA Repair (Amst)*, 2007. **6**(8): p. 1079-99.
60. Fan, C.H., et al., *O6-methylguanine DNA methyltransferase as a promising target for the treatment of temozolomide-resistant gliomas*. *Cell Death & Disease*, 2013. **4**(10): p. e876-e876.
61. Kondo, N., et al., *DNA Damage Induced by Alkylating Agents and Repair Pathways*. *Journal of Nucleic Acids*, 2010. **2010**: p. 543531.
62. Sharma, S., et al., *Role of MGMT in tumor development, progression, diagnosis, treatment and prognosis*. *Anticancer Res*, 2009. **29**(10): p. 3759-68.
63. Radke, J., et al., *Predictive MGMT status in a homogeneous cohort of IDH wildtype glioblastoma patients*. *Acta Neuropathologica Communications*, 2019. **7**(1): p. 89.
64. Bobola, M.S., et al., *Repair of 3-methyladenine and abasic sites by base excision repair mediates glioblastoma resistance to temozolomide*. *Front Oncol*, 2012. **2**: p. 176.
65. Duncan, T., et al., *Reversal of DNA alkylation damage by two human dioxygenases*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(26): p. 16660-5.
66. Fedeles, B.I., et al., *The AlkB Family of Fe(II)/ $\alpha$ -Ketoglutarate-dependent Dioxygenases: Repairing Nucleic Acid Alkylation Damage and Beyond*. *J Biol Chem*, 2015. **290**(34): p. 20734-42.
67. Ougland, R., et al., *Non-homologous functions of the AlkB homologs*. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2015. **7**(6): p. 494-504.
68. Cetica, V., et al., *Pediatric brain tumors: mutations of two dioxygenases (hABH2 and hABH3) that directly repair alkylation damage*. *J Neurooncol*, 2009. **94**(2): p. 195-201.
69. Johannessen, T.C., et al., *The DNA repair protein ALKBH2 mediates temozolomide resistance in human glioblastoma cells*. *Neuro Oncol*, 2013. **15**(3): p. 269-78.
70. Li, P., et al., *ABH2 couples regulation of ribosomal DNA transcription with DNA alkylation repair*. *Cell Rep*, 2013. **4**(4): p. 817-29.
71. Uhlén M, F.L., Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson Å, Kampf C, Sjöstedt E, Asplund A, Olsson I, Edlund K, Lundberg E, Navani S, Szigartyo CA, Odeberg J, Djureinovic D, Takanen JO, Hober S, Alm T, Edqvist PH, Berling H, Tegel H, Mulder J, Rockberg J, Nilsson P, Schwenk JM, Hamsten M, von Feilitzen K, Forsberg M, Persson L, Johansson F, Zwahlen M, von Heijne G, Nielsen J, Pontén F. *Tissue-based map of the human proteome*. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000189046-ALKBH2> [homepage] 2015 [cited 2020 26.10.2020].
72. Fujii, T., et al., *ALKBH2, a novel AlkB homologue, contributes to human bladder cancer progression by regulating MUC1 expression*. *Cancer Sci*, 2013. **104**(3): p. 321-7.

73. Ringvoll, J., et al., *Repair deficient mice reveal mABH2 as the primary oxidative demethylase for repairing 1meA and 3meC lesions in DNA*. *Embo j*, 2006. **25**(10): p. 2189-98.
74. Uhlén M, F.L., Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson Å, Kampf C, Sjöstedt E, Asplund A, Olsson I, Edlund K, Lundberg E, Navani S, Szgyarto CA, Odeberg J, Djureinovic D, Takanen JO, Hober S, Alm T, Edqvist PH, Berling H, Tegel H, Mulder J, Rockberg J, Nilsson P, Schwenk JM, Hamsten M, von Feilitzen K, Forsberg M, Persson L, Johansson F, Zwahlen M, von Heijne G, Nielsen J, Pontén F. *Tissue-based map of the human proteome*. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000189046-ALKBH2/tissue> [homepage] 2015 [cited 2020 25.10.2023].
75. Tsujikawa, K., et al., *Expression and sub-cellular localization of human ABH family molecules*. *J Cell Mol Med*, 2007. **11**(5): p. 1105-16.
76. Podhorecka, M., A. Skladanowski, and P. Bozko, *H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy*. *J Nucleic Acids*, 2010. **2010**.
77. Firsanov, D.V., L.V. Solovjeva, and M.P. Svetlova, *H2AX phosphorylation at the sites of DNA double-strand breaks in cultivated mammalian cells and tissues*. *Clin Epigenetics*, 2011. **2**(2): p. 283-97.
78. Wu, C.Y., et al., *Critical role of monoubiquitination of histone H2AX protein in histone H2AX phosphorylation and DNA damage response*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(35): p. 30806-15.
79. Nikolova, T., et al., *Chloroethylating nitrosoureas in cancer therapy: DNA damage, repair and cell death signaling*. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2017. **1868**(1): p. 29-39.
80. Cappelli, E., et al., *Repair of 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea-induced damage by mammalian cell extracts*. *Carcinogenesis*, 1995. **16**(9): p. 2267-70.
81. Md. Mujibur, R. and S. Young Rok, *An Overview on DNA Damage and DNA Repair in Cancer Research*. *Journal of Cancer Prevention*, 2008. **13**(4): p. 237-246.
82. Spencer, D.M., et al., *DNA repair in response to anthracycline-DNA adducts: a role for both homologous recombination and nucleotide excision repair*. *Mutat Res*, 2008. **638**(1-2): p. 110-21.
83. Kalyanaraman, B., *Teaching the basics of the mechanism of doxorubicin-induced cardiotoxicity: Have we been barking up the wrong tree?* *Redox Biol*, 2020. **29**: p. 101394.
84. Wyatt, M.D. and D.L. Pittman, *Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks*. *Chem Res Toxicol*, 2006. **19**(12): p. 1580-94.
85. Frosina, G. and A. Abbondandolo, *The current evidence for an adaptive response to alkylating agents in mammalian cells, with special reference to experiments with in vitro cell cultures*. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 1985. **154**(2): p. 85-100.
86. Beranek, D.T., *Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents*. *Mutat Res*, 1990. **231**(1): p. 11-30.
87. Cui, B., et al., *Decoupling of DNA damage response signaling from DNA damages underlies temozolomide resistance in glioblastoma cells*. *Journal of Biomedical Research*, 2010. **24**(6): p. 424-435.
88. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
89. Staszewski, O., T. Nikolova, and B. Kaina, *Kinetics of gamma-H2AX focus formation upon treatment of cells with UV light and alkylating agents*. *Environ Mol Mutagen*, 2008. **49**(9): p. 734-40.
90. Chowdhury, A., N. Hossain, and R.M. Mazumdar. *PYROSEQUENCING- PRINCIPLES AND APPLICATIONS*. 2012.
91. Harrington, C.T., et al., *Fundamentals of pyrosequencing*. *Arch Pathol Lab Med*, 2013. **137**(9): p. 1296-303.
92. Feoktistova, M., P. Geserick, and M. Leverkus, *Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells*. *Cold Spring Harb Protoc*, 2016. **2016**(4): p. pdb.prot087379.
93. Van Meir, E.G., et al., *Analysis of the p53 Gene and its expression in human glioblastoma cells*. *Cancer Research*, 1994. **54**(3): p. 649-652.
94. Welford, R.W., et al., *The selectivity and inhibition of AlkB*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(12): p. 10157-61.

95. Chen, F., et al., *Oncometabolites d- and l-2-Hydroxyglutarate Inhibit the AlkB Family DNA Repair Enzymes under Physiological Conditions*. Chem Res Toxicol, 2017. **30**(4): p. 1102-1110.
96. Yang, H., et al., *IDH1 and IDH2 mutations in tumorigenesis: mechanistic insights and clinical perspectives*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(20): p. 5562-71.
97. Navis, A.C., et al., *Increased mitochondrial activity in a novel IDH1-R132H mutant human oligodendroglioma xenograft model: in situ detection of 2-HG and  $\alpha$ -KG*. Acta neuropathologica communications, 2013. **1**: p. 18-18.
98. Jin, S., et al., *Identification of a DNA Repair-Related Multigene Signature as a Novel Prognostic Predictor of Glioblastoma*. World Neurosurg, 2018. **117**: p. e34-e41.
99. Pandith, A.A., et al., *Concordant association validates MGMT methylation and protein expression as favorable prognostic factors in glioma patients on alkylating chemotherapy (Temozolomide)*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 6704.
100. Turcan, S., et al., *IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype*. Nature, 2012. **483**(7390): p. 479-83.
101. Lee, S.Y., *Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme*. Genes Dis, 2016. **3**(3): p. 198-210.
102. Van Meir, E.G., et al., *Analysis of the p53 gene and its expression in human glioblastoma cells*. Cancer Res, 1994. **54**(3): p. 649-52.
103. Alonso, M., et al., *Flavopiridol induces apoptosis in glioma cell lines independent of retinoblastoma and p53 tumor suppressor pathway alterations by a caspase-independent pathway*. Mol Cancer Ther, 2003. **2**(2): p. 139-50.
104. Memmel, S., et al., *Cell surface area and membrane folding in glioblastoma cell lines differing in PTEN and p53 status*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e87052.
105. Wang, K., et al., *Prognostic value of MGMT promoter methylation and TP53 mutation in glioblastomas depends on IDH1 mutation*. Asian Pac J Cancer Prev, 2014. **15**(24): p. 10893-8.
106. Lee, S.Y., et al., *TP53 regulates human AlkB homologue 2 expression in glioma resistance to Photofrin-mediated photodynamic therapy*. Br J Cancer, 2010. **103**(3): p. 362-9.
107. Ogura, R., et al., *Immunohistochemical profiles of IDH1, MGMT and P53: practical significance for prognostication of patients with diffuse gliomas*. Neuropathology, 2015. **35**(4): p. 324-35.
108. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma*. Am J Pathol, 2007. **170**(5): p. 1445-53.
109. Ceccarelli, M., et al., *Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma*. Cell, 2016. **164**(3): p. 550-63.
110. Riemenschneider, M.J., et al., *Molecular diagnostics of gliomas: state of the art*. Acta Neuropathol, 2010. **120**(5): p. 567-84.
111. Chowdhary, S.A., T. Ryken, and H.B. Newton, *Survival outcomes and safety of carmustine wafers in the treatment of high-grade gliomas: a meta-analysis*. J Neurooncol, 2015. **122**(2): p. 367-82.
112. Ellis, J.A., et al., *Reassessing the Role of Intra-Arterial Drug Delivery for Glioblastoma Multiforme Treatment*. J Drug Deliv, 2015. **2015**: p. 405735.
113. Wang, P., et al., *Oncometabolite D-2-Hydroxyglutarate Inhibits ALKBH DNA Repair Enzymes and Sensitizes IDH Mutant Cells to Alkylating Agents*. Cell Rep, 2015. **13**(11): p. 2353-2361.
114. Reitman, F.A., H.G. Shertzer, and M.L. Berger, *Toxicity of methylating agents in isolated hepatocytes*. Biochemical pharmacology, 1988. **37**(16): p. 3183-3188.
115. van den Bent, M.J., et al., *Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy in newly diagnosed anaplastic oligodendroglioma: long-term follow-up of EORTC brain tumor group study 26951*. J Clin Oncol, 2013. **31**(3): p. 344-50.
116. Weller, M. and E. Le Rhun, *How did lomustine become standard of care in recurrent glioblastoma?* Cancer Treat Rev, 2020. **87**: p. 102029.
117. Tzaridis, T., et al., *MGMT promoter methylation analysis for allocating combined CCNU/TMZ chemotherapy: Lessons learned from the CeTeG/NOA-09 trial*. Int J Cancer, 2020.
118. Weller, J., et al., *Health-related quality of life and neurocognitive functioning with lomustine-temozolomide versus temozolomide in patients with newly diagnosed, MGMT-methylated*

- glioblastoma (CeTeG/NOA-09): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 2019. **20**(10): p. 1444-1453.
119. Wu, S.S., et al., *Down-regulation of ALKBH2 increases cisplatin sensitivity in H1299 lung cancer cells*. *Acta Pharmacol Sin*, 2011. **32**(3): p. 393-8.
120. Khurshed, M., et al., *IDH1-mutant cancer cells are sensitive to cisplatin and an IDH1-mutant inhibitor counteracts this sensitivity*. *Faseb j*, 2018. **32**(11): p. fj201800547R.
121. Hegi, M.E., et al., *Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity*. *J Clin Oncol*, 2008. **26**(25): p. 4189-99.
122. D'Atri, S., et al., *Attenuation of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase activity and mRNA levels by cisplatin and temozolomide in jurkat cells*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000. **294**(2): p. 664-71.
123. Wang, Y., et al., *Continuous dose-intense temozolomide and cisplatin in recurrent glioblastoma patients*. *Medicine (Baltimore)*, 2017. **96**(10): p. e6261.
124. Baskaran, S., et al., *Primary glioblastoma cells for precision medicine: a quantitative portrait of genomic (in)stability during the first 30 passages*. *Neuro Oncol*, 2018. **20**(8): p. 1080-1091.
125. Kurkowiak, M., et al., *Genomic landscape of human erythroleukemia K562 cell line, as determined by next-generation sequencing and cytogenetics*. *Acta Haematologica Polonica*, 2017. **48**(4): p. 343-349.
126. Li, A., et al., *Genomic changes and gene expression profiles reveal that established glioma cell lines are poorly representative of primary human gliomas*. *Mol Cancer Res*, 2008. **6**(1): p. 21-30.
127. Crespo, I., et al., *Molecular and Genomic Alterations in Glioblastoma Multiforme*. *The American Journal of Pathology*, 2015. **185**(7): p. 1820-1833.
128. Tiburcio, P.D.B., et al., *Functional requirement of a wild-type allele for mutant IDH1 to suppress anchorage-independent growth through redox homeostasis*. *Acta Neuropathol*, 2018. **135**(2): p. 285-298.
129. Madala, H.R., et al., *Beyond Brooding on Oncometabolic Havoc in IDH-Mutant Gliomas and AML: Current and Future Therapeutic Strategies*. *Cancers (Basel)*, 2018. **10**(2).
130. Weller, M., et al., *Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the German Glioma Network*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(34): p. 5743-50.

## 6.2 Verzeichnis der Abbildungen

<b>Abb. 1: Enzymatische Funktionen von Wildtyp-IDH1 und mutiertem IDH1 (modifiziert nach Hanumantha Rao Madala et al. [40]).</b>	6
<b>Abb. 2: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus der <math>\gamma</math>-pH2AX-Messung.</b>	
<i>In den oberen Wells der 6-Well-Platten wurden IDH1-Wildtyp-Zellen (IDH1-Wt), in die unteren Wells der 6-Well-Platten IDH1-R132H-mutierte Zellen (IDH1-Mt) der Zelllinie U-87 MG pipettiert. Die Stundenangabe in den Wells zeigt die Erholungszeit nach der Behandlung mit MMS an. Die unbehandelten Zellen wurden als Kontrolle (Ktr.) bezeichnet.</i>	38
<b>Abb. 3: Schematische Darstellung der DNA-Pyrosequenzierung.</b>	44
<b>Abb. 4: Schematische Darstellung der siRNA-Transfektion und anschließender Methylmethansulfonat-Behandlung von IDH1-Wildtyp- und IDH1-R132H-mutierten Zellen der Glioblastomzelllinie LN-18.</b>	47
	84

<b>Abb. 5: Repräsentative Darstellung der FACS-Einstellung zum Cell Sorting der transfizierten Zellen am Beispiel der IDH1-R132H-mutanten Zellen der Zelllinie U-87 MG.</b>	48
<b>Abb. 6: Nachweis des IDH1-Wildtyp Proteins (A) bzw. des IDH1-R132H-mutierten Proteins (B) in den transfizierten Glioblastomzellen mit Hilfe der Western-Blot Methode.</b>	49
<b>Abb. 7: Konzentration von 2-HG (2-Hydroxyglutarat) in IDH1-Wildtyp und IDH1-R132H transfizierten Glioblastomzellen.</b>	50
<b>Abb. 8: Bestimmung der Intensität von EGFP in den transfizierten und nicht transfizierten Zellen der Zelllinie U-87 MG.</b>	
Mittels dem FITC-A - Gate wurde die Transfektionseffizienz bestimmt. Dementsprechend exprimierten noch 93% der Zellen, welche initial mit dem IDH1-Wildtyp kodierendem Plasmid transfiziert waren und 99% der initial mit dem IDH1-R132H kodierenden Plasmid transfizierten Zellen das Reporter-gen GFP. EGFP, enhanced-green-fluorescent protein.	50
<b>Abb. 9: Wachstumsrate der parentalen und transfizierten Glioblastomzellen</b>	
Vergleich der Wachstumskurve (Aa-Da) und der theoretisch berechneten Zellzahl nach 21 Tagen Kultivierung (Ab-Db) zwischen den parentalen und den IDH1-Wildtyp- sowie IDH1-R132H-transfizierten Zellen der Zelllinien A-172, LN-18, LN-229 und U-87 MG.	52
<b>Abb. 10: Empfindlichkeit der IDH1-Wildtyp- und IDH1-R132H-transfizierten Glioblastomzellen auf die Zytostatika Methylnmethansulfonat (MMS), Lomustin (CCNU) und Doxorubizin (DOX)</b>	
Vergleich des Ansprechens von IDH1-Wildtyp- oder IDH1-R132H-transfizierten Zellen der Zelllinie U-87 MG auf die Zytostatika MMS, CCNU und DOX. Nach 72 h Behandlung mit MMS (A), CCNU (B) oder DOX (C) wurde zur relativen Bestimmung der Zellzahl die Kristallviolett-Färbemethode angewandt.	54
<b>Abb. 11: Empfindlichkeit der transfizierten Glioblastomzellen gegenüber hochdosiertem Methylnmethansulfonat (MMS)</b>	
Sensibilität der IDH1-Wildtyp- bzw. IDH1-R132H-transfizierten Zellen der Zelllinien A-172 (A), LN-18 (B), LN-229 (C) und U-87 MG (D) gegenüber einstündlicher Behandlung mit hochdosiertem MMS und anschließender 48 h Kultivierung. Die relative Messung der Zellzahl erfolgte mittels MTT-Assay	55
<b>Abb. 12: Empfindlichkeit der transfizierten Zelllinie U-87 MG gegenüber einer zehntägigen Behandlung mit Temozolomid (TMZ) und Methylnmethansulfonat (MMS)</b>	
Vergleich der Sensibilität der IDH1-Wildtyp- oder IDH1-R132H-transfizierten U-87 MG Zellen nach zehntägiger Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von Methylnmethansulfonat (MMS) bzw. Temozolomid (TMZ). Eine relative Messung der Zellzahl erfolgte durch die MTT-Methode I.	56
<b>Abb. 13: Expression von ALKBH2-mRNA- und ALKBH2-Protein in IDH1-Wildtyp- oder IDH1-R132H-transfizierten Glioblastomzellen nach der Behandlung mit verschiedenen Zytostatika</b>	
Relative mRNA-Expression der beiden Spleißvarianten von ALKBH2 sowie relative Proteinexpression von ALKBH2 in den IDH1-Wildtyp- bzw. IDH1-R132H-transfizierten U-87 MG Zellen nach 24 h Behandlung mit verschiedenen Zytostatika. Die Messung der relativen ALKBH2-mRNA-Variante I (A) bzw. -Variante II (B) erfolgte mittels Real-Time-PCR und die Messung der Proteinexpression mittels der Western-Blot Methode.	57
<b>Abb. 14: Expression von <math>\gamma</math>-H2AX nach Behandlung der IDH1-Wildtyp- bzw. IDH1-R132H-transfizierten Glioblastomzelllinien mit hochkonzentriertem Methylnmethansulfonat (MMS)</b>	
Relative Proteinexpression von $\gamma$ -H2AX nach einstündiger Behandlung von IDH1-Wildtyp- bzw. IDH1-R132H-	85

transfizierten Glioblastomzellen mit 3,2 mM (A und B) oder 5 mM (C) MMS und anschließender Weiterkultivierung der Zellen für 48 h. \_\_\_\_\_ 59

**Abb. 15: Expression von ALKBH2 nach Behandlung der IDH1-Wildtyp- bzw. IDH1-R132H-transfizierten Glioblastomzelllinien mit hochkonzentriertem Methylmethansulfonat (MMS)**

Relative Proteinexpression des Enzyms ALKBH2 in IDH1-Wildtyp- bzw. IDH1-R132H-transfizierten Zellen der Glioblastomzelllinien A-172, LN-18, LN-229 und U-87 MG nach der Behandlung mit 3,2 mM MMS. \_\_\_\_\_ 60

**Abb. 16: Phosphorylierung von  $\gamma$ -H2AX nach Behandlung mit hochkonzentriertem Methylmethansulfonat (MMS) und verschiedenen Erholungszeiten in der transfizierten Zelllinie U-87 MG**

Relative Proteinexpression von  $\gamma$ -H2AX nach Behandlung mit 3,2 mM MMS in IDH1-Wildtyp- bzw. IDH1-R132H-transfizierten Zellen der Zelllinie U-87 MG. Bei den Replikaten wurde die Messung nach verschiedenen Erholungszeiten nach Behandlung mit MMS durchgeführt. \_\_\_\_\_ 61

**Abb. 17. Methylierungsspezifische PCR-Analyse der MGMT-Promotormethylierung in parentalen Zellen, IDH1-Wildtyp- und IDH1-R132H-transfizierten Zellen der Zelllinien A-172, LN-18, LN-229 und U-87 MG.**

Bei der Zelllinie LN-18 handelt es sich um die einzige der vier Zelllinien, die einen zumindest partiell unmethylierten MGMT-Promotor aufweist. U; Signal für die unmethylierte MGMT-Promotorsequenz. M; Signal für die methylierte MGMT-Promotorsequenz. \_\_\_\_\_ 62

**Abb. 18: MGMT-Promotormethylierung von IDH1-Wildtyp- oder IDH1-R132H-transfizierten sowie parentalen Glioblastomzellen mittels Pyrosequenzierung**

Exemplarische Darstellung der Auswertung der Pyrosequenzierung der CpG-Methylierung des MGMT-Promotors in der parentalen Zelllinie A-172 (A) und tabellarische Übersicht der methylierten Allelfrequenzen (in %) sowie der MGMT-Proteinexpression in den Zelllinien A-172, LN-18, LN-229 und U-87 MG (B). Zudem Darstellung der vor der IDH1-Transfektion stattgefundenen Untersuchung bezüglich der MGMT-Expression auf mRNA- (C) und Proteinebene (D) der Glioblastomzelllinien A-172, LN-18, LN-229, T-98G, TP-365MG und U-87 MG. Da in den Zelllinien A-172, LN-229 und U-87 MG keine MGMT-mRNA nachweisbar war, wurden diese in der Abbildung C nicht dargestellt. \_\_\_\_\_ 63

**Abb. 19: Ansprechen der transfizierten Zelllinie LN-18 auf Methylmethansulfonat (MMS)-Behandlung in Abhängigkeit zur MGMT-Expression**

Nachweis einer verminderten MGMT-Expression mittels Western-Blot-Methode nach Transfektion verschiedener MGMT-siRNAs in die Glioblastomzelllinie LN-18 (A). Ansprechen der IDH1-Wildtyp- bzw. IDH1-R132H-transfizierten Zellen der Zelllinie LN-18 auf die einstündige Behandlung mit 2 mM oder 4 mM Methylmethansulfonat (MMS) nach der Transfektion mit MGMT-siRNA (B) bzw. NC-siRNA (C). Eine relative Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels der Kristallviolett-Methode. \_\_\_\_\_ 65

**Abb. 20: ALKBH2 mRNA-Expression in diffusen Gliomen**

Bestimmung der relativen Expression von ALKBH2-mRNA-Variante I (A) bzw. -Variante II (B) in IDH1-Wildtyp (IDH1-Wt) bzw. IDH1-mutierten (IDH1-Mt) diffusen Gliomen der WHO-Grade II und III und in primären Glioblastomen (WHO-Grad IV). \_\_\_\_\_ 66

**Abb. 21: MGMT mRNA-Expression in diffusen Gliomen**

Relative MGMT mRNA-Expression in diffusen Gliomen der WHO-Grade II und III mit IDH1-Mutation (IDH1-Mt) bzw. IDH1-Wildtyp (IDH1-Wt) und in primären Glioblastomen (pGB IV) mit IDH1-Wildtyp. \_\_\_\_\_ 66

**Abb. 22: Bestimmung der Intensität von EGFP in den transfizierten und nicht transfizierten Zellen der Zelllinie A-172.**

Mittels SSC-A- und FSC-A-Gate konnten die vitalen Zellen von Zellbestandteilen unterschieden werden. Danach waren 83,5% der nicht transfizierten Probenbestandteile vitale Zellen. 71,1% der IDH1-Wildtyp transfizierten und 80% der IDH1-R132H transfizierten Zellen waren vital. Mittels FITC-A-Gate wurde die Transfektionseffizienz bestimmt. Danach exprimierten noch 56,1% der Zellen, welche initial mit dem IDH1-Wildtyp kodierenden Plasmid transfiziert worden waren und 56,1% der initial mit dem IDH1-R132H kodierenden Plasmid transfizierten Zellen das Reporter gen GFP. \_\_\_\_\_ 90

**Abb. 23: Bestimmung der Intensität von EGFP in den transfizierten und nicht transfizierten Zellen der Zelllinie LN-18.**

Mittels FITC-A - Gate wurde die Transfektionseffizienz bestimmt. Danach exprimierten noch 63,0% der Zellen, welche initial mit dem IDH1-Wildtyp kodierendem Plasmid transfiziert waren und 72,4% der initial mit dem IDH1-R132H kodierenden Plasmid transfizierten Zellen das Reporter gen GFP. \_\_\_\_\_ 91

**Abb. 24: Bestimmung der Intensität von EGFP in den transfizierten und nicht transfizierten Zellen der Zelllinie LN-229.**

Mittels FITC-A - Gate wurde die Transfektionseffizienz bestimmt. Danach exprimierten noch 66,8% der Zellen, welche initial mit dem IDH1-Wildtyp kodierendem Plasmid transfiziert waren und 62,6% der initial mit dem IDH1-R132H kodierenden Plasmid transfizierten Zellen das Reporter gen GFP. \_\_\_\_\_ 91

**Abb. 25: Bestimmung der Intensität von EGFP in den transfizierten und nicht transfizierten Zellen der Zelllinie U-87 MG.**

Mittels dem FITC-A-Gate wurde die Transfektionseffizienz bestimmt. Dementsprechend exprimierten noch 93% der Zellen, welche initial mit dem IDH1-Wildtyp kodierendem Plasmid transfiziert waren und 99% der initial mit dem IDH1-R132H kodierenden Plasmid transfizierten Zellen das Reporter gen GFP. \_\_\_\_\_ 92

**Abb. 26: Empfindlichkeit der IDH1-Wildtyp- und IDH1-R132H-transfizierten Zelllinie A-172 gegenüber den Zytostatika Methylnmethansulfonat (MMS), Lomustin (CCNU) und Doxorubizin (DOX)**

Vergleich des Ansprechens von IDH1-Wildtyp- und IDH1-R132H-transfizierten Zellen der Zelllinie A-172 auf die Zytostatika MMS (A), CCNU (B) und Doxorubizin (C). Für keines der untersuchten Zytostatika wurde ein unterschiedliches Ansprechen zwischen IDH1-Wildtyp und IDH1-R132H transfizierten Zellen der Zelllinien A-172 festgestellt. \_\_\_\_\_ 93

**Abb. 27: Empfindlichkeit der IDH1-Wildtyp- und IDH1-R132H-transfizierten Zelllinie LN-18 gegenüber den Zytostatika Methylnmethansulfonat (MMS), Lomustin (CCNU) und Doxorubizin (DOX)**

Vergleich des Ansprechens von IDH1-Wildtyp- und IDH1-R132H-transfizierten Zellen der Zelllinie LN-18 auf die Zytostatika MMS (A), CCNU (B) und Doxorubizin (C). Für keines der untersuchten Zytostatika wurde ein unterschiedliches Ansprechen zwischen IDH1-Wildtyp und IDH1-R132H transfizierten Zellen der Zelllinie LN-18 festgestellt. \_\_\_\_\_ 94

**Abb. 28: Empfindlichkeit der IDH1-Wildtyp- und IDH1-R132H-transfizierten Zelllinie LN-18 gegenüber den Zytostatika Methylnmethansulfonat (MMS), Lomustin (CCNU) und Doxorubizin (DOX)**

Vergleich des Ansprechens von IDH1-Wildtyp- und IDH1-R132H-transfizierten Zellen der Zelllinie LN-18 auf die Zytostatika MMS (A), CCNU (B) und Doxorubizin (C). Für keines der untersuchten Zytostatika wurde ein unterschiedliches Ansprechen zwischen IDH1-Wildtyp und IDH1-R132H transfizierten Zellen der Zelllinie LN-229 festgestellt. \_\_\_\_\_ 95

**Abb. 29: MGMT-Promotormethylierung in mit IDH1-Wildtyp oder IDH1-R132H transfizierten sowie parentalen Glioblastomzellen mittels methylierungsspezifischer PCR**

Ergebnisse der methylierungsspezifische PCR des MGMT-Promotors in den parentalen Zellen, IDH1-Wildtyp- und IDH1-R132H-transfizierten Zellen der Zelllinien A-172, LN-18, LN-229 und U-87 MG). Zusätzlich zu den Zelllinien wurde eine PCR-Probe aus peripherem Blut als Positivkontrolle einer fehlenden MGMT-Promotor-Hypermethylierung und eine PCR-Probe der Zelllinie A-172, bei welcher die MGMT- Promotor-Hypermethylierung bekannt ist, als Positivkontrolle einer vorhanden Methylierung aufgetragen. \_\_\_\_\_ 96

### 6.3 Verzeichnis der Tabellen

<b>Tabelle 1:</b> Auflistung der verwendeten Zytostatika mit induzierten DNA-Schäden und dazugehörigen Reparaturmechanismen _____	14
<b>Tabelle 2:</b> Zellkulturmaterialien. _____	16
<b>Tabelle 3:</b> Reagenzien und Chemikalien. _____	17
<b>Tabelle 4:</b> Lösungen und Puffer. _____	19
<b>Tabelle 5:</b> Laborkits. _____	20
<b>Tabelle 6:</b> Zytostatika. _____	20
<b>Tabelle 7:</b> Primär- und Sekundärantikörper. _____	21
<b>Tabelle 8:</b> Oligonukleotide. _____	21
<b>Tabelle 9:</b> Primer für die methylierungs-spezifische PCR _____	22
<b>Tabelle 10:</b> siRNAs. _____	22
<b>Tabelle 11:</b> Laborgeräte. _____	22
<b>Tabelle 12:</b> Software. _____	23
<b>Tabelle 13:</b> Reaktionsmix für eine konventionelle PCR. _____	25
<b>Tabelle 14:</b> Einstellungen des Thermocyclers für die Standard-PCR. _____	25
<b>Tabelle 15:</b> Programm für die qRT-PCR Reaktion. _____	27
<b>Tabelle 16:</b> Reaktionsmix für die Transkription von RNA in cDNA. _____	28
<b>Tabelle 17:</b> Pipettierschema des HotStar HiFidelity Polymerase Reaktionsansatzes. _____	31
<b>Tabelle 18:</b> PCR-Schema der HotStar HiFidelity Polymerase PCR-Reaktion. _____	31
<b>Tabelle 19:</b> Ansätze für den Verdau des Plasmids pIRES2-EGFP- und des PCR-Produktes durch die Restriktionsenzyme XhoI und EcoRI. _____	31
<b>Tabelle 20:</b> Pipettierschema für drei verschiedene Infusionsansätze. _____	32
<b>Tabelle 21:</b> Pipettierschema der PCR zum Nachweis der Plasmid-DNA in Minisäulen. _____	33
<b>Tabelle 22:</b> Verwendete Zytostatika-Endkonzentration in den verschiedenen Experimenten. _____	37

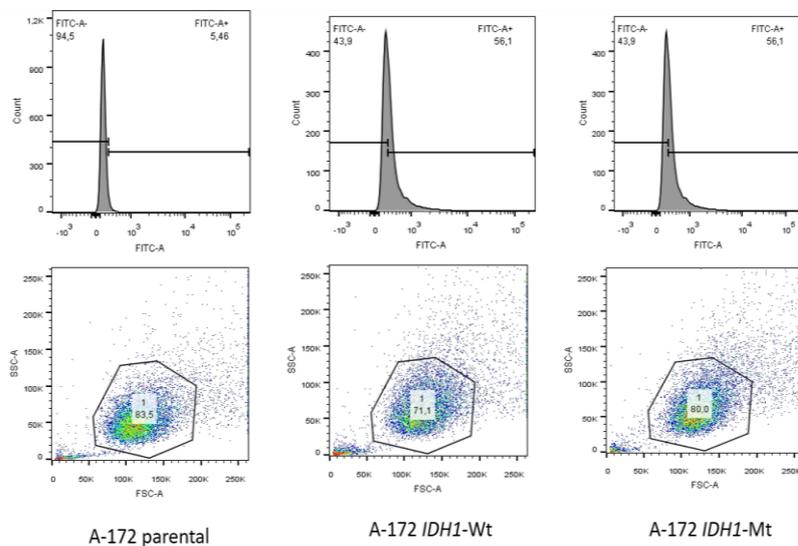
<b>Tabelle 23:</b> Reaktionsmix für die methylierungsspezifische PCR mit Primern für methylierte Templates.____	42
<b>Tabelle 24:</b> Reaktionsmix für die methylierungsspezifische PCR mit Primern für unmethylierte Templates.	43
<b>Tabelle 25:</b> Einstellung des Thermocyclers für die methylierungs-spezifische PCR._____	43
<b>Tabelle 26:</b> Reaktionmix für die Pyrosequenzierung. _____	44
<b>Tabelle 27:</b> Reaktionmix für die Pyrosequenzierungs-PCR._____	45
<b>Tabelle 28:</b> Einstellung des Thermocyclers für die Synthese des PCR-Produktes für die Pyrosequenzierung.	45
<b>Tabelle 29:</b> Reaktionsmix für die Transfektion von MGMT-siRNA. _____	46
<b>Tabelle 30:</b> Reaktionsmix für die Transfektion von Negative Control-siRNA._____	46
<b>Tabelle 31:</b> Reaktionsmix der Vektorlösung. _____	46

## 7 Anhang

### 7.1 Zusätzliche Abbildungen zu Abschnitt 4.1.3

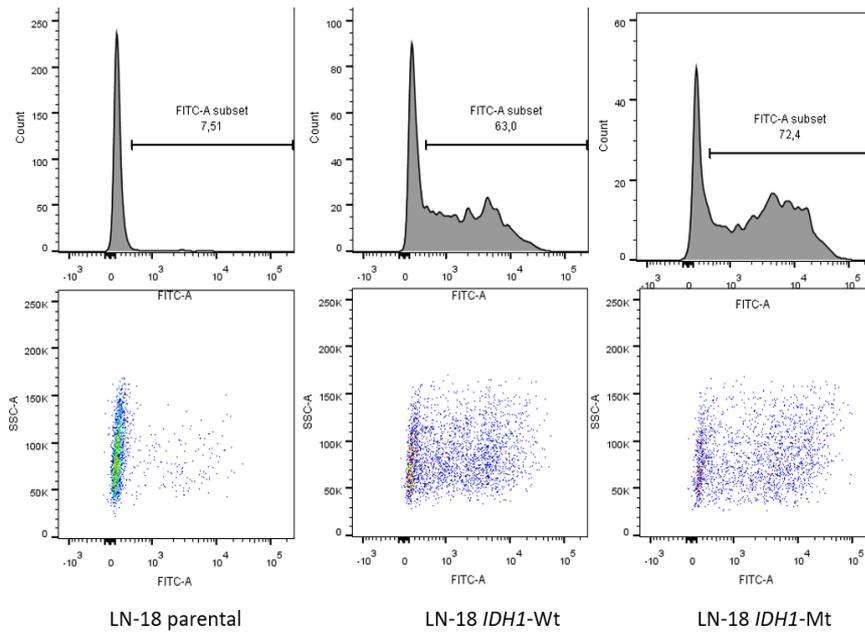
#### Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels Durchflusszytometrie

Mittels der Intensitätsbestimmung von EGFP in den mit *IDH1*-Wildtyp bzw. *IDH1*-R132H transfizierten Glioblastomzellen konnte sichergestellt werden, dass weiterhin eine ausreichende Transfektionseffizienz vorliegt.



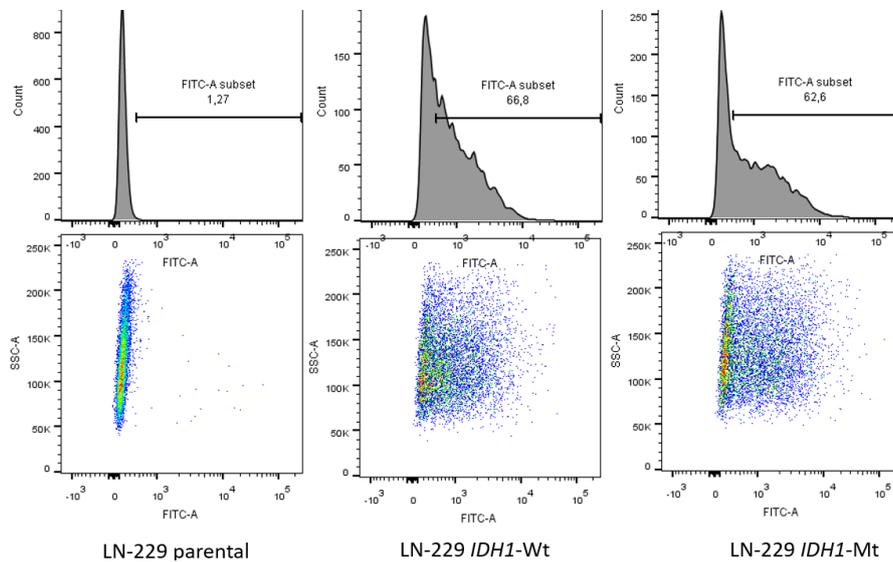
**Abb. 22: Bestimmung der Intensität von EGFP in den transfizierten und nicht transfizierten Zellen der Zelllinie A-172.**

Mittels SSC-A- und FSC-A-Gate konnten die vitalen Zellen von Zellbestandteilen unterschieden werden. Danach waren 83,5% der nicht transfizierten Probenbestandteile vitale Zellen. 71,1% der *IDH1*-Wildtyp transfizierten und 80% der *IDH1*-R132H transfizierten Zellen waren vital. Mittels FITC-A-Gate wurde die Transfektionseffizienz bestimmt. Danach exprimierten noch 56,1% der Zellen, welche initial mit dem *IDH1*-Wildtyp kodierenden Plasmid transfiziert worden waren und 56,1% der initial mit dem *IDH1*-R132H kodierenden Plasmid transfizierten Zellen das Reporter-gen GFP.



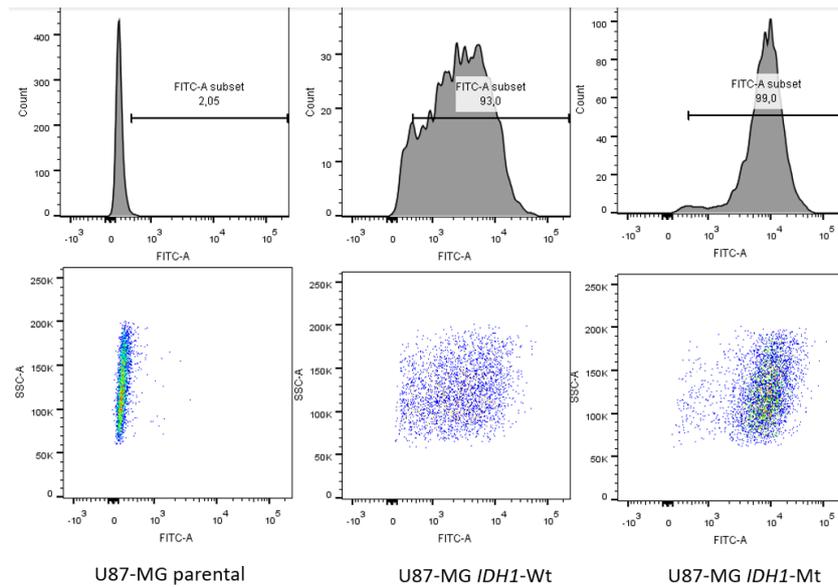
**Abb. 23: Bestimmung der Intensität von EGFP in den transfizierten und nicht transfizierten Zellen der Zelllinie LN-18.**

Mittels FITC-A - Gate wurde die Transfektionseffizienz bestimmt. Danach exprimierten noch 63,0% der Zellen, welche initial mit dem *IDH1*-Wildtyp kodierendem Plasmid transfiziert waren und 72,4% der initial mit dem *IDH1*-R132H kodierenden Plasmid transfizierten Zellen das Reportergen GFP.



**Abb. 24: Bestimmung der Intensität von EGFP in den transfizierten und nicht transfizierten Zellen der Zelllinie LN-229.**

Mittels FITC-A - Gate wurde die Transfektionseffizienz bestimmt. Danach exprimierten noch 66,8% der Zellen, welche initial mit dem *IDH1*-Wildtyp kodierendem Plasmid transfiziert waren und 62,6% der initial mit dem *IDH1*-R132H kodierenden Plasmid transfizierten Zellen das Reportergen GFP.



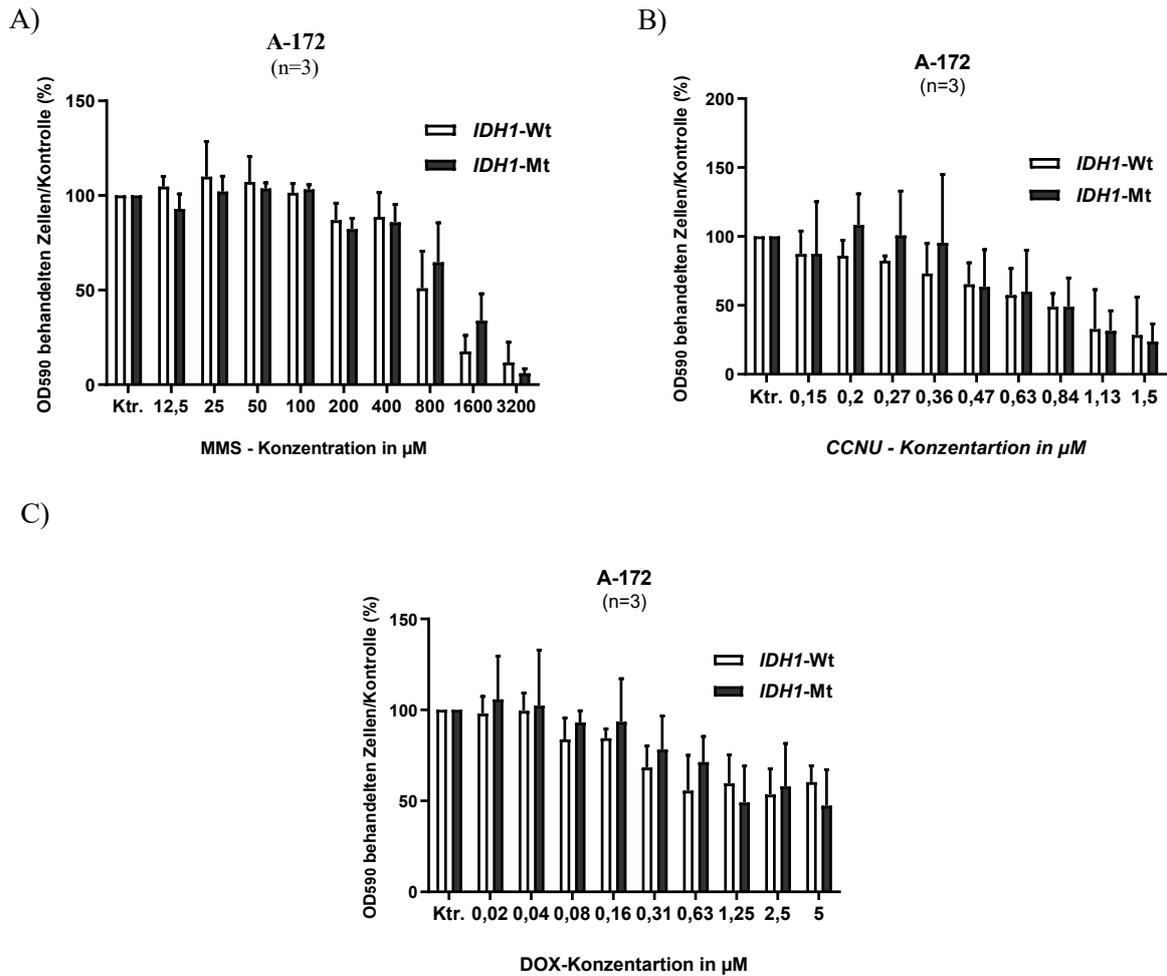
**Abb. 25: Bestimmung der Intensität von EGFP in den transfizierten und nicht transfizierten Zellen der Zelllinie U-87 MG.**

Mittels dem FITC-A-Gate wurde die Transfektionseffizienz bestimmt. Dementsprechend exprimierten noch 93% der Zellen, welche initial mit dem *IDH1*-Wildtyp kodierendem Plasmid transfiziert waren und 99% der initial mit dem *IDH1*-R132H kodierenden Plasmid transfizierten Zellen das Reportergen GFP.

## 7.2 Zusätzliche Abbildungen zu Abschnitt 4.2.2

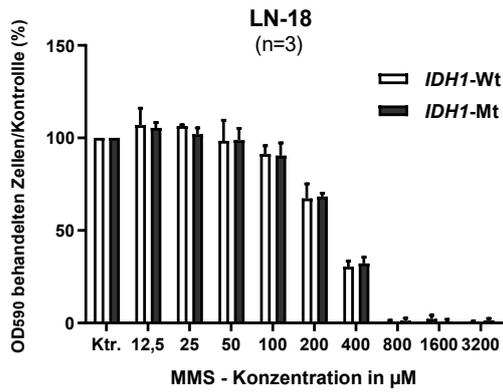
### Empfindlichkeit von *IDH1*-Wildtyp- und *IDH1*-R132H-transfizierten Glioblastomzellen gegenüber den Zytostatika MMS, CCNU und Doxorubizin

Das Ansprechen der *IDH1*-Wildtyp-transfizierten Zellen der Zelllinien A-172, LN-18, LN-229 und U-87 MG auf die Zytostatika Methylmethansulfonat (MMS), Lomustin (CCNU) und Doxorubizin (DOX) wurde mit dem Ansprechen auf die oben genannten Zytostatika der *IDH1*-R132H transfizierten Zellen verglichen. Die Zellen wurden für 72 h mit MMS, CCNU und DOX behandelt und hiernach wurden die verbliebenen vitalen Zellen mit der Kristallviolett-Methode bestimmt (siehe Abschnitt 4.2.2).

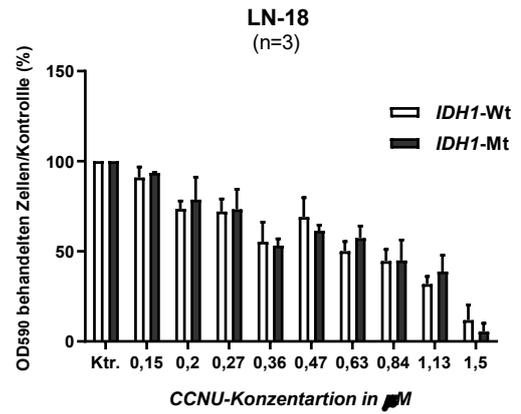


**Abb. 26: Empfindlichkeit der *IDH1*-Wildtyp- und *IDH1*-R132H-transfizierten Zelllinie A-172 gegenüber den Zytostatika Methylmethansulfonat (MMS), Lomustin (CCNU) und Doxorubizin (DOX)**  
 Vergleich des Ansprechens von *IDH1*-Wildtyp- und *IDH1*-R132H-transfizierten Zellen der Zelllinie A-172 auf die Zytostatika MMS (A), CCNU (B) und Doxorubizin (C). Für keines der untersuchten Zytostatika wurde ein unterschiedliches Ansprechen zwischen *IDH1*-Wildtyp und *IDH1*-R132H transfizierten Zellen der Zelllinien A-172 festgestellt.

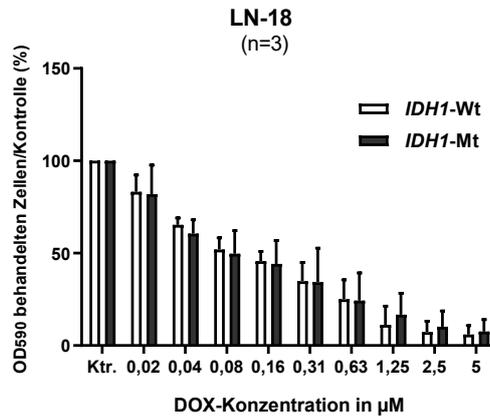
A)



B)

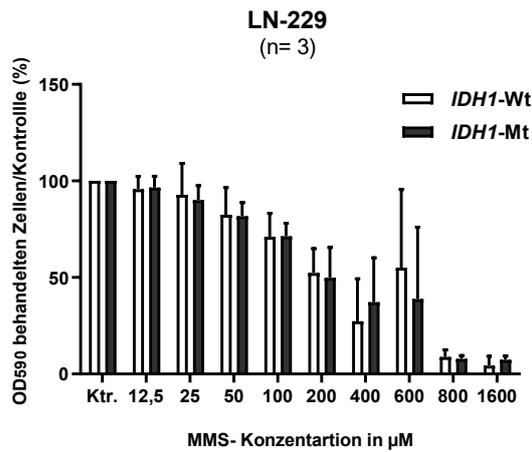


C)

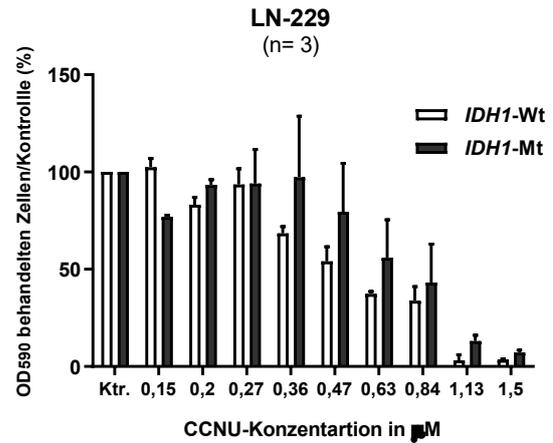


**Abb. 27: Empfindlichkeit der *IDH1*-Wildtyp- und *IDH1*-R132H-transfizierten Zelllinie LN-18 gegenüber den Zytostatika Methylmethansulfonat (MMS), Lomustin (CCNU) und Doxorubizin (DOX)**  
 Vergleich des Ansprechens von *IDH1*-Wildtyp- und *IDH1*-R132H-transfizierten Zellen der Zelllinie LN-18 auf die Zytostatika MMS (A), CCNU (B) und Doxorubizin (C). Für keines der untersuchten Zytostatika wurde ein unterschiedliches Ansprechen zwischen *IDH1*-Wildtyp und *IDH1*-R132H transfizierten Zellen der Zelllinie LN-18 festgestellt.

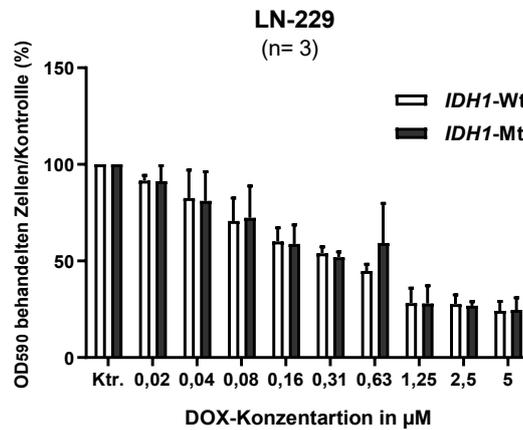
A)



B)



C)



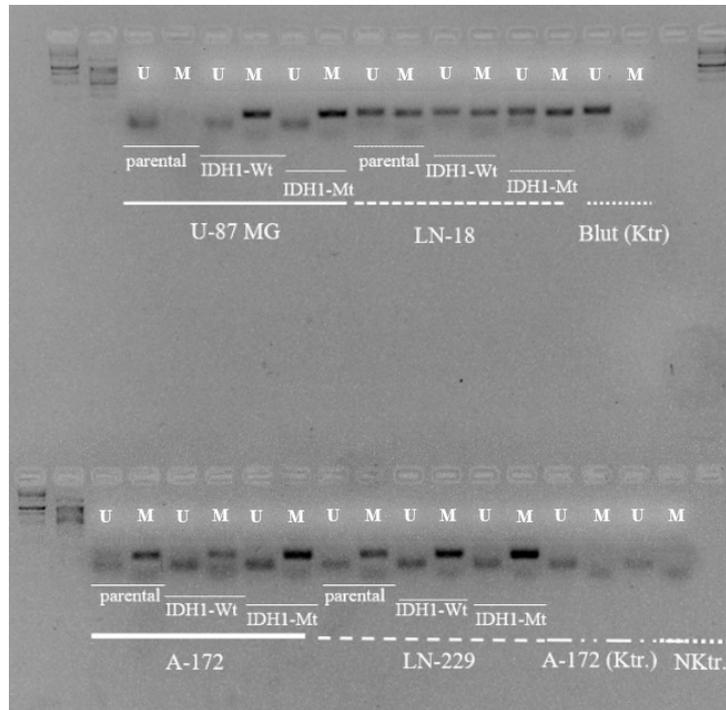
**Abb. 28: Empfindlichkeit der *IDH1*-Wildtyp- und *IDH1*-R132H-transfizierten Zelllinie LN-18 gegenüber den Zytostatika Methylnmethansulfonat (MMS), Lomustin (CCNU) und Doxorubizin (DOX)**

Vergleich des Ansprechens von *IDH1*-Wildtyp- und *IDH1*-R132H-transfizierten Zellen

der Zelllinie LN-18 auf die Zytostatika MMS (A), CCNU (B) und Doxorubizin (C). Für keines der untersuchten Zytostatika wurde ein unterschiedliches Ansprechen zwischen *IDH1*-Wildtyp und *IDH1*-R132H transfizierten Zellen der Zelllinie LN-229 festgestellt.

### 7.3 Zusätzliche Abbildungen zu Abschnitt 4.2.8

Bestimmung der *MGMT*-Promotormethylierung in mit *IDH1*-Wildtyp- oder *IDH1*-R132H- transfizierten sowie parentalen Glioblastomzellen mittels methylierungsspezifischer PCR



**Abb. 29: *MGMT*-Promotormethylierung in mit *IDH1*-Wildtyp oder *IDH1*-R132H transfizierten sowie parentalen Glioblastomzellen mittels methylierungsspezifischer PCR**

Ergebnisse der methylierungsspezifische PCR des *MGMT*-Promotors in den parentalen Zellen, *IDH1*-Wildtyp- und *IDH1*-R132H-transfizierten Zellen der Zelllinien A-172, LN-18, LN-229 und U-87 MG). Zusätzlich zu den Zelllinien wurde eine PCR-Probe aus peripherem Blut als Positivkontrolle einer fehlenden *MGMT*-Promotor-Hypermethylierung und eine PCR-Probe der Zelllinie A-172, bei welcher die *MGMT*- Promotor-Hypermethylierung bekannt ist, als Positivkontrolle einer vorhandenen Methylierung aufgetragen.

## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Guido Reifenberger und Frau Dr. Christiane Knobbe-Thomsen für die Überlassung dieses Themas. Zudem möchte ich Frau Dr. Christiane Knobbe-Thomsen für ihre Betreuung, für ihre Einführung in die Laborarbeit und die wöchentliche Diskussionsmöglichkeit mit unserer Arbeitsgruppe danken. Ein herzliches Dankeschön auch an Herrn Dr. Sascha Steltgens, der mir bei Schwierigkeiten im Laboralltag weiterhalf.

Ein besonderer Dank geht an meine Familie: meinen Eltern, meiner Schwester Christina und insbesondere meine Zwillingschwester Carmen sowie an meinen Freund Elias Chasoglou und meine Freundin Magdalena Furtak, die mir stets zur Seite standen und auf die ich mich immer verlassen kann.