

Aus dem Institut für Neuropathologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Guido Reifenberger

**Die Relevanz des Arylhydrocarbon-Rezeptor
Nuclear Translocator (ARNT) Proteins für die
Proliferationsfähigkeit und Therapiesensitivität
von Gliomen**

Dissertation

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

vorgelegt von
Ramona Deißmann
2024

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Guido Reifenberger

Zweitgutachter: PD Dr. rer. nat. Csaba Mahotka

Für meine Familie

Zusammenfassung

Jedes Jahr erkranken mehr als 8000 Patienten in Deutschland neu an einem Gehirntumor. Bei Erwachsenen handelt es sich hierbei häufig um ein Isozitatdehydrogenase (IDH)-Wildtyp Glioblastom, ein sehr bösartiges Gliom, das mit einer medianen Überlebenszeit von 14 - 16 Monaten nach Diagnosestellung zu den aggressivsten Krebsarten des Menschen gehört. Die Therapie von IDH-Wildtyp Glioblastomen besteht aus einem multimodalen Ansatz, bei dem eine Resektion mit anschließender Radio- und Chemotherapie kombiniert wird. Das Standardchemotherapeutikum, das hierfür verwendet wird, ist Temozolomid. Jedoch sind die Tumoren insgesamt relativ therapieresistent. Die genaue Ursache dieser Resistenz ist multifaktoriell und noch nicht ausreichend erforscht. Außerdem wachsen Glioblastome diffus infiltrierend in das angrenzende Gehirngewebe, was eine vollständige Resektion mit dem Ziel einer kurativen Therapie unmöglich macht. Aufgrund dieser Tatsachen werden neue Therapieansätze gesucht, die die infauste Prognose dieser Krebserkrankung verbessern können. Ein mögliches Ziel einer Therapie könnte das Arylhydrocarbon-Rezeptor Nuclear Translocator (ARNT) Protein darstellen. ARNT wird vom Arylhydrocarbon-Rezeptor (AHR) und vom Hypoxie-induzierten Faktor 1 alpha (HIF1- α) gebunden und ist somit an der zellulären Reaktion auf endogene und exogene Liganden sowie auf Hypoxie beteiligt. AHR wird von dem Tryptophanabbauprodukt Kynurenin aktiviert. Dieses Molekül liegt in Gliomen aufgrund einer Überaktivität des Enzyms Tryptophan-2,3-Dioxygenase (TDO) erhöht vor. Durch die Bindung von AHR an ARNT werden Gene induziert, die die Fähigkeit der Tumorzellen zur Migration, Invasion und zur Bildung von Kolonien verstärken. Durch schnelles Tumorwachstum kommt es im Gewebe von Glioblastomen zudem zu einer Hypoxie, was wiederum die Expression von HIF1- α induziert. HIF1- α selbst sorgt für die Induktion von Zellproliferation, Neoangiogenese und Veränderungen des Zellmetabolismus. Somit stellt ARNT eine Schnittstelle zweier wichtiger Signalwege in Gliomen dar. In eigenen Expressionsanalysen wiesen ARNT und die Gene des AHR-Komplexes eine heterogene Expression in unterschiedlichen Glioblastomzelllinien auf. Mit Hilfe eines durch CRISPR-Cas9 induzierten *Knock-outs* wurde die Rolle von ARNT für das Wachstumsverhalten von *in vitro* kultivierten Glioblastomzelllinien und für deren Sensitivität gegenüber Temozolomid untersucht. Die durchgeführten Experimente zeigten, dass ARNT essentiell für AHR- und HIF1- α -vermittelte Signalwege in Glioblastomzellen ist. Außerdem hatte ARNT einen positiven Einfluss auf das Zellwachstum und verstärkte die Resistenz gegenüber Temozolomid. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass ARNT ein mögliches Therapieziel in IDH-Wildtyp Glioblastomen darstellen könnte. Weitere Untersuchungen werden notwendig sein, um herauszufinden, durch welche Mechanismen ARNT die Sensitivität gegenüber Temozolomid beeinflusst, welche Bedeutung dies für die klinische Therapie des Glioblastoms hat und ob eine Modulation der Expression oder Funktion von ARNT das Überleben der Patienten möglicherweise positiv beeinflussen kann.

Abstract

Approximately 8000 patients are newly diagnosed with a brain tumor in Germany each year. The most frequently diagnosed brain tumor type originating from the brain parenchyma in adults is isocitrate dehydrogenase (IDH)-wildtype glioblastoma, a central nervous system (CNS) World Health Organization (WHO) grade 4 glioma. Glioblastoma is one of the most aggressive forms of cancer as indicated by a median overall survival of only 14 – 16 months. The therapeutic approach consists of a combination of surgery, radiotherapy and chemotherapy. The standard chemotherapeutic agent used for glioblastoma treatment is temozolomide. Unfortunately, many glioblastomas do not respond to chemotherapy. The reason for the primary or acquired therapy resistance appears to be multifactorial and needs further investigation. In addition, glioblastomas are tumors which diffusely infiltrate the adjacent healthy brain tissue. Due to this invasive behavior, a curative surgical treatment is not possible. This is why new therapeutic targets are the subject of current studies. One possible target might be the arylhydrocarbon receptor nuclear translocator protein ARNT. ARNT dimerizes with the transcription factors arylhydrocarbon receptor (AHR) and hypoxia induced factor α (HIF1- α), and thereby regulates the cellular response to endo/-exobiotic ligands and hypoxia. In gliomas AHR is activated by kynurenine. Due to an overactivation of the enzyme tryptophane-2,3-Dioxygenase (TDO), gliomas produce high amounts of kynurenine. The AHR-ARNT heterodimer enhances tumor cell proliferation, migration, a invasiveness as well as clonogenic survival. The rapid tumor growth of high-grade gliomas leads to hypoxic regions within the tumor. Hypoxia in turn induces HIF1- α . The HIF1- α -ARNT dimer also promotes proliferation, neoangiogenesis and alteration of the cellular metabolism. Thus, ARNT is at the centre of two major signalling pathways in gliomas. Expression analyses revealed a heterogenous expression pattern of ARNT and the AHR-complex encoding genes in different glioblastoma cell lines. By using CRISPR-Cas9 gene editing to establish *ARNT*-deficient knock-out cells the relevance of ARNT for growth, proliferation and temozolomide sensitivity in glioblastoma cell lines was investigated in this thesis. These experiments showed that ARNT is essential for AHR- and HIF1- α -dependent signalling pathways in gliomas. In addition, ARNT promoted clonogenicity and enhanced the resistance against temozolomide. Taken together, ARNT seems to be a promising candidate for a therapeutic target in the multimodal approach to IDH-wildtype glioblastoma patient treatment. However, further research is required to uncover the mechanisms by which ARNT modulates the sensitivity to temozolomide and to evaluate the possible significance of these findings for clinical treatment and for prediction of the prognosis of patients.

Abkürzungsverzeichnis

3-ISP	3-Indoxylsulfat Kaliumsalz
AhR	Arylhydrocarbon-Rezeptor
AHRR	Arylhydrocarbon-Rezeptor-Repressor
AIC	(4)-aminoimidazol-4(5)-carboxamid
ANOVA	Analysis of Variance
APGN	Alkylpurin-DNA-N-Glykosylase
ARNT	Arylhydrocarbon receptor nuclear translocator
ATP	Adenosintriphosphat
Bak	Bcl-2 Antagonist/Killer
Bax	Bcl-2-associated X protein
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BER	Basen-Exzisions-Reparatur
bHLH	Basic helix loop helix
CCNU	Lomustin
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeat
Cas	CRISPR-assozierte Systeme
CO ₂	Kohlendioxid
CYP	Cytochrom P450
DNA	Desoxyribonukleonsäure
DMOG	Dimethyloxalylglycin
EGLN1	Egl-9 family hypoxia inducible factor 1
EV	Empty vector
FC	Fold change
FDG	Fluordesoxyglucose
HDR	Homology-directed-repair
HIF1- α	Hypoxie-induzierter Faktor 1 α
HFE	High Fe
HK2	Hexokinase 2
HRE	Hypoxia response element
HuR	Human universal Reference
IC ₅₀	Mittlere Inhibitorische Konzentration
IDH	Isocitratdehydrogenase
IDO	Indoleamin-2,3-Dioxygenase
KO	Knock-out
LDHA	Laktatdehydrogenase A
M	Molar
MDR1	Multidrug resistance protein 1
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MMR	Mismatch-Repair
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MSH6	MutS homolog 6
MTIC	5-(3-N-methyltriazin-1-yl)-imidazol-4-carboxamid
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NFE2L2	Nuclear factor erythroid 2 related factor 2
NF κ B	Nuclear Factor K light chain enhancer
NHEJ	Non-homologous end joining
NQO1	NADP(H)-Dehydrogenase Quinone 1
NT	Non-targeting
O ₂	Sauerstoff
PAH	Prolyl-/Asparaginy-Hydroxylase
PAS	Per-ARNT-Sim
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDK1	Pyruvat Dehydrogenase Kinase 1
PD1	Programmed cell death protein 1

PE	Plating efficiency
PET	Positronenemissionstomographie
Polk	DNA-Polymerase K
RB1	Retinoblastomgen 1
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
Rpm	Rounds per minute
sAHRm	Selektiver AHR-Modulator
SLC2A2	Solute carrier family 2 member 2
sgRNA	Single guide Ribonukleinsäure
TALEN	Transcription activator-like effector nuclease
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlorbenzodioxin
TDO	Tryptophan-2,3-Dioxygenase
TMZ	Temozolomid
TP53	Tumorprotein 53
TSP1	Thrombospondin 1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VHL	Von Hippel Lindau Protein
WHO	World Health Organisation
XRE	Xenobiotic response elements
ZNS	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	
1.1	Gliome	1
1.2	Temozolomid	6
1.3	Merkmale von Krebszellen	7
1.4	Der Arylhydrocarbon-Rezeptor Nuclear Translocator (ARNT)	11
1.5	Die Rolle des Arylhydrocarbon-Rezeptors in Gliomen	12
1.6	Die Rolle von HIF1- α in Gliomen	13
1.7	CRISPR-Cas9	14
1.8	Eigene Zielsetzung	16
2.	Material und Methoden	
2.1	Materialien	17
2.2	Zellkultur	24
2.3	Agarosegel-Herstellung und Gelelektrophorese	26
2.4	RNA-Extraktion und cDNA-Nachweis	27
2.5	Proteinextraktion und -nachweis	32
2.6	DNA-Extraktion	35
2.7	Erstellen von CRISPR-Cas9 <i>Knock-outs</i>	36
2.8	Wachstumsanalyse	43
2.9	<i>Colony formation Assay</i>	44
2.10	MTT-Assay	45
2.11	Funktionelle Validierung der CRISPR-Cas9 <i>Knock-outs</i>	46
2.12	Korrelationsanalysen	47
3.	Ergebnisse	
3.1	Die Expression von Genen des AHR-Komplexes in Glioblastom-Zelllinien auf mRNA- und Proteinebene	49
3.2	Die Assoziation der Expression von <i>ARNT</i> und <i>ARNT</i> -abhängiger Genen in Glioblastomen	52
3.3	Die Expression von <i>ARNT</i> in Relation zum Methylierungsstatus des <i>MGMT</i> -Promotors in Gliomen	54
3.4	Herstellung von <i>ARNT-Knock-out</i> Klonen in den Zelllinien T98G und LN229	54
3.5	Der Einfluss von <i>ARNT-Knock-out</i> auf die Expression von AHR, AHRR und ARNT2	56
3.6	Analyse des Wachstumsverhaltens	57
3.7	Test der Fähigkeit zum Bilden von Kolonien	60
3.8	Der Einfluss von ARNT auf die Seneszenz	63
3.9	Dosis-Wirkungskurven für Temozolomid	63
3.10	Die mRNA-Expression von Genen des AHR-Komplexes in Temozolomid-resistenten Zellen	68
3.11	Der Einfluss von ARNT auf die Expression von AHR-Zielgenen	69

3.12	Der Einfluss von 3-ISP auf die Expression von <i>AHRR</i> und <i>CYP1A1</i> in T98G mit <i>ARNT-Knock-out</i>	72
3.13	Der Einfluss von DMOG auf die Expression von HIF1- α Zielgenen in T98G mit <i>ARNT-Knock-out</i>	74
4.	Diskussion	
4.1	Die Expression der Komponenten des AHR-Komplexes in Glioblastomen ist heterogen	76
4.2	Die Expression von <i>ARNT</i> in Glioblastomen korreliert nicht mit dem Methylierungsstatus des <i>MGMT</i> -Promotors	77
4.3	Limitationen der CRISPR-Cas9-Methode	77
4.4	<i>ARNT-Knock-out</i> verringert die Expression von <i>AHRR</i> und <i>ARNT2</i> in LN229 und T98G Glioblastomzellen	79
4.5	<i>ARNT</i> hat keinen Einfluss auf die Proliferationsfähigkeit unter normoxischen Bedingungen	80
4.6	<i>ARNT</i> erhöht das klonogene Überleben von Glioblastomzellen	82
4.7	<i>ARNT</i> hat keinen Einfluss auf die Seneszenz von Glioblastomzellen	82
4.8	Vollständiger Verlust von <i>ARNT</i> -Proteinexpression führt zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Temozolomid	83
4.9	Vollständiger Verlust von <i>ARNT</i> -Protein verändert den zellulären Phänotyp	85
4.10	<i>ARNT</i> ist relevant für AHR-vermittelte Signalwege in Glioblastomzellen	86
4.11	<i>ARNT</i> ist relevant für HIF1- α -vermittelte Signalwege in Glioblastomzellen	88
4.12	<i>ARNT</i> bildet als Schnittstelle von AHR und HIF1- α vermittelter Signaltransduktion in Gliomen ein Ziel für neue therapeutische Strategien	89
4.13	Schlussfolgerung und Ausblick	92
5.	Literatur und Quellenverzeichnis	94

1. Einleitung

1.1 Gliome

In Deutschland erkranken jedes Jahr mehr als 8000 Patienten an einem Gehirntumor. Bei Erwachsenen ist hierbei unter den hirneigenen Tumoren das Isozitatdehydrogenase (IDH)-Wildtyp-Glioblastom der häufigste und zugleich bösartigste Tumor, der entsprechend der Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) für Tumoren des zentralen Nervensystems (ZNS) in den ZNS WHO-Grad 4 eingestuft [0]. Gehirntumore lassen sich je nach ihrem Ursprung in verschiedene Gruppen einteilen. Eine große Gruppe stellen die Gliome dar, die aus neuroepithelialen Stamm- oder Vorläuferzellen des Gehirns entstehen und gemäß der WHO-Klassifikation 2021 bei Erwachsenen in drei verschiedene Entitäten eingeteilt werden: (1) Astrozytom, IDH-mutiert, (2) Oligodendrogliom, IDH-mutiert und 1p/19q-kodeletiert und (3) Glioblastom, IDH-Wildtyp [1]. Im Kindesalter werden verschiedene weitere Gliome unterschieden, unter denen das gutartige pilozytische Astrozytom am häufigsten ist. Die Prognose variiert zwischen einem rezidivfreiem Überleben von Jahrzehnten bei den meisten Patienten mit einem pilozytischen Astrozytom und einem medianen Gesamtüberleben von nur 14-16 Monaten bei Patienten mit IDH-Wildtyp Glioblastomen [2, 3]. Gliome sind folglich eine sehr heterogene Gruppe von Tumoren. Warum sich gesunde Gehirnzellen zu einem Gehirntumor entwickeln, ist bis heute weitgehend ungeklärt. Das *Brain Tumor Epidemiology Consortium* hat 2010 eine Übersicht über (mögliche) Risikofaktoren für Gliome und Meningeome erarbeitet. Genetische Syndrome wie das Li-Fraumeni-Syndrom, ein hereditäres Tumorsyndrom, das durch eine Keimbahn-Mutation des Gens für das Tumorprotein 53 (*TP53*) verursacht wird, oder auch die Neurofibromatosen Typ 1 und Typ 2 sind als Risikofaktoren für bestimmte Gliome identifiziert worden [4]. Der einzige exogene Risikofaktor, der bewiesenermaßen einen Einfluss auf die Entstehung eines Gehirntumors hat, ist eine kraniale Strahlentherapie [4]. Weitere Faktoren wie etwa die Benutzung von Handys oder auch Infektionen konnten beim Menschen nicht als Risikofaktoren identifiziert werden [4, 5]. Da keine eindeutig vermeidbaren Risikofaktoren nachgewiesen werden konnten, ist eine Prävention und gezielte Früherkennung von sporadischen Gliomen bis heute nicht möglich.

1.1.1 Symptome von Gliomen

Die Symptome eines Gehirntumors können vielfältig sein. Man unterscheidet zwischen lokalisationsbezogenen Symptomen und raumfordernden Effekten, also Symptomen, die durch die Steigerung des intrakraniellen Drucks und die Verdrängung von Hirngewebe durch das Tumorgewebe entstehen. Ein typisches Erstsymptom eines intrakraniellen Tumors kann ein epileptischer Anfall sein. Spezifische lokalisationsbezogene Ausfallerscheinungen wie Visusminderung oder Paresen können schon einen ersten Aufschluss darüber geben, wo sich der Tumor befindet. Eine Besonderheit von Gehirntumoren ist, dass neben somatischen Symptomen auch psychische und kognitive Defizite auftreten können, unter anderem Wesensveränderungen und kognitive Leistungsminderungen. Zusätzlich zu den lokalisationsbezogenen Symptomen, kann ein Tumor durch seine Masse den intrakraniellen Druck erhöhen. Typische Symptome hierfür sind Kopfschmerzen, Übelkeit und Schwindel [6]. All diese Symptome sind jedoch nicht spezifisch für einen Gehirntumor, sodass die definitive Diagnosestellung ausschließlich anhand des klinischen Bildes nicht möglich ist.

1.1.2 Diagnostik von Gliomen

Besteht der Verdacht, an einem Gehirntumor erkrankt zu sein, folgt eine diagnostische Abklärung in mehreren Stufen. Der erste wichtige Schritt bei der Diagnostik von intrakraniellen Tumoren ist eine gezielte neurologische Untersuchung. Für die weitere Abklärung sind bildgebende Verfahren erforderlich. Der Goldstandard ist hierbei die Magnet-Resonanztomographie (MRT), da hier sowohl Ausdehnung und Lage des Tumors sowie assoziierte Störungen der Blut-Hirn-Schranke gut sichtbar werden. Auch die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) kann wichtige Informationen über die Malignität des Tumors liefern, zum Beispiel die F-18-Fluorethyltyrosin Positronen-Emissions-Tomographie. Trotzdem kann die Differentialdiagnose zwischen einem Tumor oder einer anderen raumfordernden Läsion schwierig sein, sodass, wenn möglich, eine Gewebe-basierte Diagnosesicherung durch eine stereotaktische Biopsie oder offene Operation angestrebt werden sollte. Die stereotaktische Biopsie stellt einen gezielten und relativ risikoarmen Eingriff dar, der die Entnahme von Tumorgewebe ohne eine offene Kraniotomie ermöglicht. Aus den entnommenen

Gewebeproben werden histologische Präparate hergestellt, anhand derer dann eine neuropathologische Diagnosestellung gemäß der WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems erfolgt [7]. Je nach Diagnose und in Abhängigkeit von dem individuellen Gesundheitszustand des Patienten wird nach der neuropathologischen Diagnosestellung eine weiterführende Therapie eingeleitet werden [7].

Die neuropathologische Diagnostik hat sich in den letzten 20 Jahren stark verändert. Neue Technologien ermöglichen zusätzlich zur mikroskopischen Diagnostik auch eine Beurteilung des Tumors auf molekularer Ebene. Dies hat auch die Klassifikation von Gehirntumoren maßgeblich beeinflusst. Während die WHO-Klassifikation von ZNS-Tumoren von 2007 auf der histologischen Entität des Tumors basierte, wird seit 2016 eine sogenannte integrierte Diagnose gestellt. Hierbei spielen neben der Histologie auch molekulare Marker eine wichtige Rolle, sodass die Diagnosestellung zusätzlich sowohl prognostische als auch prädiktive Aussagen enthält. Wichtige molekulare Marker von Gliomen sind insbesondere eine Mutation der *Isocitrat-Dehydrogenase (IDH) 1* und *2* Gene in diffusen astrozytären und oligodendroglialen Gliomen sowie eine zusätzliche 1p/19q-Kodeletion in oligodendroglialen Tumoren [8]. Zusätzlich dazu enthält die Diagnose den ZNS WHO-Grad, wobei ZNS WHO-Grad 1 für niedrigmaligne und langsam wachsende Tumore steht, während Tumoren des ZNS WHO-Grad 4 schnell wachsen und aggressiv sind [8]. Ein Beispiel für eine integrierte Diagnose ist z.B.: Glioblastom, IDH-Wildtyp (ZNS WHO-Grad 4).

Die Novelierung der Histologie-basierten WHO-Klassifikation war notwendig, da sich gezeigt hat, dass bestimmte molekulare Marker bessere prognostische und prädiktive Aussagen ermöglichen als eine rein Histologie-basierte Klassifikation der Tumoren. Um eine präzisere und individuellere Therapie zu ermöglichen, sind deswegen weitere Marker wichtig. Zusätzlich dazu ist die histologische Beurteilung von der Erfahrung des Untersuchers abhängig und dadurch mit einer gewissen Variabilität assoziiert, so dass mit Hilfe von molekularen Markern die Diagnosestellung objektiver erfolgen kann [9]. Einige dieser molekularen Marker sind relevant für eine Diagnosestellung, andere wiederum sind prädiktiv oder prognostisch wertvoll. Der Unterschied zwischen prognostisch und prädiktiv ist, dass sich anhand eines prädiktiven Markers der Erfolg einer Therapie abschätzen lässt, während ein prognostischer Faktor einen Effekt betrachtet, der Einfluss auf das Überleben des Patienten hat, unabhängig von der Therapie [9].

Im Folgenden wird kurz auf die wichtigsten molekularen Marker in der Diagnostik und Therapie von Gliomen eingegangen. Die Isocitrat-Dehydrogenase (IDH) ist ein Enzym, das NADP⁺ zu NADPH reduziert, wobei IDH1 im Zytosol vorkommt, während IDH2 mitochondrial vorliegt. Durch eine *Gain of function* Mutation verändert das Enzym seine Substratspezifität und produziert D2-Hydroxyglutarat aus Isocitrat anstelle von α -Ketoglutarat [9]. Die R132H-Variante von IDH1 kann immunhistochemisch nachgewiesen werden [8]. Seltener Mutationen in *IDH1* und *IDH2* müssen mittels Sequenzierung nachgewiesen werden, wobei die Mutationen charakteristischerweise an Kodon R132 in *IDH1* oder an dem homologen Kodon R172 in *IDH2* nachweisbar sind. Allen diesen Mutationen gemein ist die aberrante Produktion von D2-Hydroxyglutarat. Der Nachweis einer IDH1- oder IDH2-Mutation führt zu der Designation „IDH-mutiert“ [8–10]. Da IDH-Mutationen häufig in Gliomen der ZNS WHO-Grade 2 und 3 vorkommen, hat der Marker einen diagnostischen Wert. Zusätzlich hat der Nachweis einer IDH-Mutation auch einen prognostischen Wert, da Patienten mit IDH-mutierten Tumoren länger überleben als Patienten mit IDH-Wildtyp Tumoren. Der IDH-Mutationsstatus hat jedoch keinen prädiktiven Wert [8, 9].

Die 1p/19q-Kodeletion bedeutet eine komplette Deletion des kurzen Arms von Chromosom 1 und des langen Arms von Chromosom 19, die z.B. durch Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung oder mittels PCR-basierter Methoden nachweisbar ist. Bei der 1p/19q-Kodeletion handelt es sich sowohl um einen diagnostischen, einen prognostischen und einen prädiktiven Marker. Diagnostisch weist die Kodeletion bei kombiniertem Nachweis einer IDH-Mutation auf einen oligodendroglialen Tumor hin. Darüberhinaus sind Tumoren mit einem kombinierten 1p/19q-Verlust prognostisch günstiger als Tumoren ohne diesen kombinierten Verlust. Auch ist die Kodeletion ein positiv prädiktiver Marker für den Erfolg einer kombinierten Radio- und Chemotherapie [9, 8].

Ein weiterer wichtiger prognostischer und prädiktiver Marker ist die *MGMT*-Promotomethylierung, auf die im Zusammenhang mit Temozolomid in Kapitel 1.2. näher eingegangen wird.

1.1.3 Therapie von Gliomen

Steht die Diagnose eines glialen Gehirntumors fest, wird eine entsprechende Therapie eingeleitet. Das genaue Therapieschema hängt von der Entität des Tumors, also der

vollständigen integrierten Diagnose ab. Sowohl eine Operation, als auch eine Radiotherapie und eine Chemotherapie können in dem Therapieplan enthalten sein und kombiniert werden [6]. Eine Operation hat das Ziel, den Hirndruck zu verringern und den Tumor möglichst vollständig zu entfernen [6]. Während einer Operation am Gehirn muss immer zwischen der Aggressivität der Exzision und dem Funktionserhalt abgewogen werden. Wird zu viel reseziert, kann der Patient neurologische Defizite entwickeln. Verbleiben jedoch Tumorzellen, ist die Wahrscheinlichkeit für ein Rezidiv hoch. Um dem Operateur den Weg zu weisen, können verschiedene Techniken angewandt werden. Intraoperativ kann ein MRT oder ein fluoreszierender Farbstoff, 5-Aminolävulinsäure, der Tumorgewebe fluoreszieren lässt, verwendet werden. Um postoperative neurologische Defizite zu vermeiden, können ein funktionelles Monitoring mit evozierten Potentialen oder *Brain-mapping* bei einer Wach-Operation hilfreich sein [11].

Eine Radiotherapie wird bevorzugt bei Gliomen der ZNS WHO-Grade 3 und 4 durchgeführt. Bei der Bestrahlung sollte darauf geachtet werden, dass strahlensensible Regionen, wie zum Beispiel der Sehnerv, möglichst wenig belastet werden [6]. Eine Radiotherapie verlängert das Gesamtüberleben von Patienten mit bösartigen Gliomen [12]. Wenn vor der Radiotherapie eine chirurgische Entfernung des Tumors stattgefunden hat, kann nach der Operation das Tumorbett bestrahlt werden, um verbliebene Krebszellen abzutöten. Eine andere Option ist eine stereotaktische Bestrahlung, das heißt eine sehr gezielte Bestrahlung einzelner Bereiche [6]. Das genaue Bestrahlungsschema hängt von der Entität des Tumors, dem Alter des Patienten, der Vollständigkeit der Resektion und der Prognose ab [11]. Bei Glioblastomen wird beispielsweise nach einer Exzision des Tumors eine fraktionierte Radiotherapie begleitet von einer Chemotherapie mit Temozolomid für 6 Wochen mit insgesamt 60 Gy durchgeführt [13].

Die Chemotherapie hat bei intrakraniellen Tumoren, im Vergleich zu anderen soliden Tumoren, einen relativ geringen Stellenwert. Häufig eingesetzte Substanzen sind Temozolomid zur Primärtherapie und im Rezidiv bei IDH-mutierten Astrozytomen und IDH-Wildtyp Glioblastomen oder die Kombination aus Procarbazin, CCNU, und Vincristin bei IDH-mutierten und 1p/19q-kodeletierten Oligodendrogliomen [6, 11].

Trotz der multimodalen Therapiemöglichkeiten ist die Prognose von bösartigen Gliomen, insbesondere des IDH-Wildtyp Glioblastoms sehr schlecht. Wichtige Faktoren, die bei der Prognose eine Rolle spielen, sind neben der Tumorentität

ebenfalls das Alter des Patienten, die Vollständigkeit der Resektion und das Vorhandensein von positiven prognostischen molekularen Markern wie IDH-Mutation und 1p/19q-Kodeletion [11].

1.2 Temozolomid

Temozolomid (TMZ) ist das Standardchemotherapeutikum zur Therapie von malignen Gliomen. Die Substanz ist oral verfügbar und gehört zur Wirkstoffgruppe der alkylierenden Zytostatika. Durch die Lipophilie der Substanz ist sie gut Blut-Hirn-Schranken-gängig und eignet sich deswegen für die Therapie von Gehirntumoren [13]. Die Wirkung von Temozolomid wird in **Abbildung 1** dargestellt und im Folgenden erläutert. Sie basiert auf der nicht enzymatischen Umwandlung in 5-(3-N-methyltriazin-1-yl)-imidazol-4-carboxamid (MTIC). MTIC wird weiter hydrolysiert zu 5(4)-aminoimidazol-4(5)-carboxamid (AIC) und Methylhydrazin. Der zytotoxische Effekt wird durch Addition von Methylgruppen an N⁷ und O⁶ von Guanin und O³ von Adenin erreicht. Die Alkylierung von Guanin an O⁶ führt während der nächsten Replikation zu einer falschen Base, Thymin statt Cytosin [13, 14]. Dieser *Mismatch* von Basen kann vom *Mismatch-repair* System (MMR) erkannt werden. In Folge von versuchter DNA-Reparatur kommt es schließlich zu Doppelstrangbrüchen, die zum Zelltod führen [15]. Jedoch wirkt Temozolomid bei ca. 50% aller Patienten nicht. Diese Patientengruppe wird auch als *Non-responder* bezeichnet. Mögliche Ursachen für eine fehlende Wirksamkeit von Temozolomid ist eine Überexpression der O⁶-Methylguanin-DNA Methyltransferase (MGMT), von DNA-Reparaturproteinen wie Alkylpurine-DNA-N-Glycosylase (APGN) oder von Basen-Exzisions-Reparaturproteinen (BER) [13].

MGMT ist ein DNA-Reparaturprotein, das Alkylierungen an O⁶ von Guanin abbauen kann, die durch alkylierende Chemotherapeutika wie Temozolomid eingebracht wurden. Somit sind Tumoren mit einer hohen MGMT-Aktivität deutlich resistenter gegenüber derartigen Chemotherapeutika als Tumoren mit nur geringer oder fehlender MGMT-Aktivität. Es ist möglich, dass der Promotor des *MGMT*-Gens in den Tumorzellen methyliert ist, sodass es zu einem *gene silencing* kommt und das Protein nicht exprimiert wird. Eine *MGMT*-Promotormethylierung wurde als positiver prädiktiver Marker für die Wirksamkeit einer Chemotherapie mit Temozolomid identifiziert [8, 9]. Anhand der Feststellung des *MGMT*-Promotormethylierungsstatus

eines Tumors wird im Rahmen der Diagnostik die Sensitivität eines Glioms gegenüber Temozolomid eingeschätzt [13].

Während MGMT die Methylierung an O⁶-Methylguanin reparieren kann, repariert das Enzym Alkylpurine-DNA-N-Glycosylase (APNG) N³-Methyladenine und N⁷-Methylguanin. In einer Studie wurde berichtet, dass eine hohe Expression von APNG mit einem kürzeren Überleben von Glioblastompatienten assoziiert ist [16].

Zusätzliche Genmutationen, die im Verdacht stehen einen Einfluss auf die Temozolomid-Resistenz zu haben, sind Mutationen in den Genen *TP53*, *HFE* und *MSH6*, so dass die Resistenz von Gliomen gegenüber Temozolomid ein multifaktorielles Geschehen ist [13].

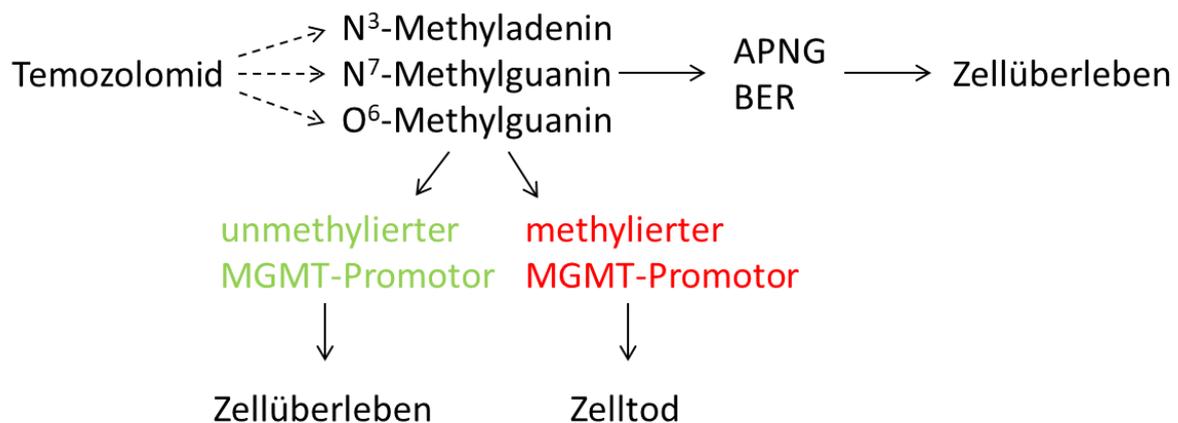


Abbildung 1: Übersicht der Temozolomid-Wirkung und möglicher Resistenzmechanismen.

1.3 Merkmale von Krebszellen

Jede Krebszelle hat ihren Ursprung in einer normalen „gesunden“ Zelle. Um Krebs als Erkrankung zu verstehen, ist es notwendig zu begreifen, was Krebszellen sind und inwiefern sie sich von gesunden Körperzellen unterscheiden. Hierfür formulierten Hanahan und Weinberg die so genannten *Hallmarks of Cancer* [17]. Diese werden im Folgenden exemplarisch zusammengefasst.

In jeder gesunden Zelle besteht eine Homöostase zwischen Zellteilung, Zelldifferenzierung und Zelltod. Diese Prozesse werden im Zellzyklus durch verschiedene Gene kontrolliert, die bei einer Fehlregulation zur Tumorentstehung beitragen können. Als Konsequenz einer genetischen Veränderung liegt ein defektes, ein verändertes oder eine veränderte Menge des entsprechenden Proteins vor [18].

Um unkontrolliert wachsen zu können, müssen für eine Zelle vier Bedingungen erfüllt

sein: Es müssen Wachstumsfaktoren vorhanden sein, wachstumsinhibitorische Signale müssen unterdrückt werden, Zelltod durch Apoptose/Autophagie/Nekrose müssen unterdrückt werden und die Zelle muss eine sogenannte replikative Immortalität erreichen [17]. Zu diesem Zweck können Tumore selbst Wachstumsfaktoren produzieren, die autokrin oder parakrin auf das Gewebe wirken können. Außerdem kann die Dichte von Wachstumsrezeptoren erhöht werden oder durch strukturelle Veränderungen eine konstitutive Aktivität ermöglicht werden [17]. Gene, die für Wachstumsfaktoren kodieren oder die Progression des Zellzyklus verstärken, werden auch Protoonkogene genannt. Ein Protoonkogen kann durch eine *Gain of function* Mutation zum Onkogen werden. Hierbei reicht eine Mutation aus, da diese dominant ist. Onkogene haben verschiedene Funktionen, unter anderem die Aktivierung des Zellzyklus, Inhibition der Differenzierung und Blockade der Apoptose [18].

Das Zellwachstum wird darüber hinaus auch negativ durch Wachstumsinhibitoren reguliert. Diese Wachstumsinhibitoren werden auch Tumorsuppressorgene genannt und müssen von einer Tumorzelle unterdrückt werden. Ein Tumorsuppressorgen verliert bei einer Mutation beider Allele seine Funktion, es handelt sich also um eine *Loss of function* Mutation. Bekannte Beispiele für Tumorsuppressorgene sind die Gene *RB1* und *TP53* [17, 18]. *TP53* reagiert auf *DNA-damage* Signale und unterbricht den Zellzyklus, damit die DNA repariert werden kann. Ist der Schaden zu groß, geht die Zelle in Apoptose. Somit wird verhindert, dass sich Mutationen anhäufen können. Durch Inaktivierung von *TP53* können jedoch auch mutierte und geschädigte Zellen überleben und Mutationen akkumulieren [17, 18]. *TP53* wird auch als Wächter des Genoms bezeichnet und spielt bei vielen Krebsarten sowie dem hereditären Li-Fraumeni-Syndrom eine Rolle [18].

Für die ungehinderte Proliferation müssen neoplastische Zellen außerdem dem Zelltod entkommen, der zum Beispiel durch Apoptose, Nekrose oder Autophagie induziert wird. Stress-Signale wie Onkogene oder DNA-Schaden können den programmierten Zelltod durch die intrinsische oder extrinsische Aktivierung von Caspasen auslösen. Hierfür ist die Balance zwischen pro-apoptotischen Faktoren, wie Bax oder Bak, und anti-apoptotischen Faktoren wie Bcl-2 relevant. Um dem programmierten Zelltod zu entgehen gibt es Tumorzellen, die kein *TP53* exprimieren oder anti-apoptotische Faktoren erhöhen, um das Überleben der Zelle zu sichern [17, 18].

Neben der Deregulation von pro- und antiproliferativen Signalen muss eine

Tumorzelle, um ungehindert wachsen zu können, zusätzlich das Endreplikationsproblem lösen, damit eine replikative Immortalität erreicht werden kann. Eine normale Zelle kann nur eine bestimmte Anzahl von Zellzyklen durchlaufen bevor sie in Seneszenz geht, einen Zustand, in dem die Zelle nicht mehr teilungsfähig ist. Die DNA-Synthese während der Replikation erfolgt an einem Haupt- und einem Folgestrang, sodass am Ende von jedem Replikationszyklus ein Überhang entsteht, der entfernt wird. Damit hierbei keine wichtige Erbinformation verloren geht befinden sich an diesen Stellen die Telomere, nicht-kodierende *Tandem-repeats*. Folglich verkürzen sich die Telomere nach jedem Zellzyklus und die Verkürzung der Telomere ist ein Zeichen der Alterung einer Zelle. Wird ein kritischer Punkt in der Telomerlänge erreicht, kann die Zelle sich nicht weiter teilen, sondern geht in Seneszenz oder Apoptose. Um diese Limitierung zu umgehen exprimieren viele Tumorzellen ein Enzym, das die Enden der Telomere wieder verlängern kann, die sogenannte Telomerase. So ist es der Tumorzelle möglich sich unendlich weiter zu teilen [17].

Wie auch alle anderen Zellen, benötigen Tumorzellen Blutgefäße, die die Versorgung der Zellen gewährleisten und Metabolite des Zellstoffwechsels entsorgen. Da die bereits vorhandenen Gefäße dafür nicht ausreichend sind, kommt es zu einer Neubildung von Gefäßen, der Neovaskularisierung. Diese Neovaskularisierung wird durch eine fehlende Balance zwischen pro-angiogenetischen Faktoren, wie *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) und anti-angiogenetischen Faktoren wie Thrombospondin1 (TSP1) zu Gunsten der pro-angiogenetischen Faktoren ermöglicht. Es kommt neben einer Aussprossung von neuen Gefäßen ebenfalls zu einem Gefäßwachstum und dadurch zu einem veränderten Blutfluss, ebenso wie zu Mikrohämorrhagien und einer Thrombosierung von Gefäßen [17].

Zusätzlich dazu verändert sich der Energiestoffwechsel in den Krebszellen, denn durch die erhöhte Teilungsrate benötigen diese mehr Energie als eine normale Zelle. In gesunden Zellen wird im aeroben Zustand Energie durch den Abbau von Glucose zu Pyruvat gewonnen, wobei CO₂ entsteht. Im anaeroben Zustand, wenn keine oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien stattfinden kann, entsteht hingegen Laktat als Abbauprodukt und statt 20 ATP, werden nur 2 ATP gewonnen. Eine Krebszelle hingegen gewinnt auch im aeroben Zustand ihre Energie nur durch Glykolyse. Da diese jedoch weniger effizient ist, werden kompensatorisch zum Beispiel Glucose-Transporter hochreguliert. Dieser ineffizientere Weg des Energiegewinns wird wahrscheinlich gewählt, um Stoffwechselmetabolite zu erzeugen, die zur Synthese

neuer Aminosäuren und Nukleotide benötigt werden [17, 19].

Die Umstellung des Metabolismus wird auch „Warburg“-Effekt genannt. Den Warburg-Effekt kann man sich bei der Diagnostik von Tumoren mit Hilfe eines FDG (18F-Fluorodeoxyglucose)-PET-Scans zu Nutze machen, indem der erhöhte Metabolismus von Glucose mit Hilfe von radioaktiv markierter Glukose sichtbar gemacht wird [17].

Tumorzellen entstehen aus körpereigenen, gesunden Zellen und verändern sich durch eine Akkumulation von genetischen Mutationen. Das Immunsystem und Immunreaktionen basieren auf der Unterscheidung zwischen „Körpereigenem“ und „Körperfremdem“. Damit ein Tumor überleben kann, ohne vom Immunsystem zerstört zu werden, müssen Immunzellen supprimiert werden, so dass der Tumor überleben kann [17]. Untersuchungen haben ergeben, dass viele Tumore Immunzellen enthalten. Obwohl man früher lange dachte, dass dies den Versuch des Immunsystems, den Tumor zu bekämpfen, widerspiegeln würde, besagen neuere Theorien, dass Entzündungsreaktionen das Tumorstadium und die Tumorgenese durch das Freisetzen von Wachstumsfaktoren und Proliferationssignalen sogar unterstützen können [17, 20].

Ein Tumor hat außerdem einen gewissen Einfluss auf seine Umgebung, das so genannte *Microenvironment*. Hier befinden sich Zellen und Stoffwechselmetabolite, die der Tumor maßgeblich beeinflussen kann [17].

Insgesamt zeichnen sich Krebszellen durch eine genomische Instabilität aus. Während in gesunden Zellen Mutationen relativ selten sind, akkumulieren diese in einem Tumor im Laufe seiner Entwicklung. Durch einen Verlust von DNA-Reparaturmechanismen oder *DNA-damage* Signalen kommt es zu einer sukzessiven Veränderung des Genoms von neoplastischen Zellen. Dabei verändern sich die Zellen jedoch nicht alle gleichermaßen. Einige Mutationen erbringen der mutierten Zelle einen Überlebens- oder Wachstumsvorteil, was dazu führt, dass dieser Subklon innerhalb des Tumors häufiger vorkommt [17]. Es entsteht folglich eine genomische Variabilität und eine Heterogenität der Zellen innerhalb eines Tumors. Dies erschwert insbesondere die Therapie, da verschiedene Tumorklone unterschiedlich sensitiv gegenüber einer Bestrahlung oder einer Chemotherapie sein können [21].

1.4 Der Arylhydrocarbon-Rezeptor-Nuclear-Translocator (ARNT)

Wie zuvor beschrieben, ist die Tumorentstehung komplex, wobei viele Zusammenhänge noch nicht abschließend geklärt sind. So stehen z.B. diverse Gene im Verdacht, einen Einfluss auf die Pathogenese und Malignität von Gliomen zu haben. Eines dieser Gene kodiert den Aryl-hydrocarbon-Rezeptor (AHR), der den Aryl hydrocarbon nuclear translocator (ARNT) bindet. ARNT, der auch HIF1- β genannt wird, gehört zu der Familie der *Basic helix-loop-helix* Proteine. Durch die Bildung eines Heterodimers mit dem Aryl-hydrocarbon Rezeptor (AHR) und Hypoxia induced factor 1 α (HIF1- α) stellt ARNT einen wichtigen Knotenpunkt in der zellulären Signaltransduktion dar (siehe **Abbildung 2**).

Durch die Bindung an AHR ist ARNT an der Verstoffwechslung von Fremdstoffen beteiligt, sowie an diversen pathologischen Prozessen wie Entzündungsreaktionen und in der Tumorgenese. Im inaktiven Zustand liegt AHR zytoplasmatisch an mehrere Chaperone gebunden vor. AHR kann über Liganden aktiviert werden. Häufige anzutreffende exogene Liganden sind aromatische Hydrocarbone, Flavonoide und Indole, während Arachidonsäuremetabolite, Trypophanabbauprodukte und Kynurenin-Metabolite häufige endogene Liganden darstellen. Nach der Bindung eines Liganden wird der vorher zytosolisch vorliegende AHR in den Zellkern transportiert. Im Zellkern bindet AHR an ARNT. Das aktive Heterodimer kann dann an der DNA an so genannte *Xenobiotic response elements* (XRE) binden und somit die Genexpression der entsprechenden zugehörigen Gene beeinflussen. Nach erfolgter Bindung wird der AHR wieder ins Zytosol exportiert, wo er proteosomal abgebaut wird. Wichtige Zielgene des AHR-ARNT-Komplexes sind Stoffwechsellenzyme wie CYP1A1 und der Arylhydrocarbon Rezeptor Repressor (AHRR). Der AHRR hat eine ähnliche Struktur wie der AHR, kann jedoch keine Liganden binden. Stattdessen kann der AHRR Korepressoren binden und bindet außerdem an ARNT, sodass ARNT kein aktives Heterodimer mit AHR mehr bilden kann. Dieser negative Feedbackmechanismus schützt den Organismus vor Überstimulation [22].

Durch die Bindung an HIF1- α ist ARNT zusätzlich ein wichtiger Teil der zellulären Antwort auf Hypoxie. HIF1- α ist ein Transkriptionsfaktor und gehört wie ARNT zur *Basic Helix-Loop-helix* Familie. Unter normoxischen Bedingungen wird HIF1- α durch das von Hippel Lindau Protein (VHL) hydroxyliert und letztendlich proteosomal abgebaut. Liegen jedoch hypoxische Bedingungen vor, wird das Protein nicht hydroxyliert sondern kann in den Zellkern translozieren. Hier bindet HIF1- α an ARNT.

Das aktive Heterodimer HIF1- α -ARNT kann dann durch eine Bindung an *Hypoxia response elements* (HRE) die Transkription verschiedener Gene induzieren. Diese Zielgene beeinflussen u.a. die Zellproliferation, Neoangiogenese und den Glucosemetabolismus, z.B. VEGF und LDHA [23].

Insgesamt spielt ARNT bei einer Vielzahl von zellulären Mechanismen eine zentrale Rolle.

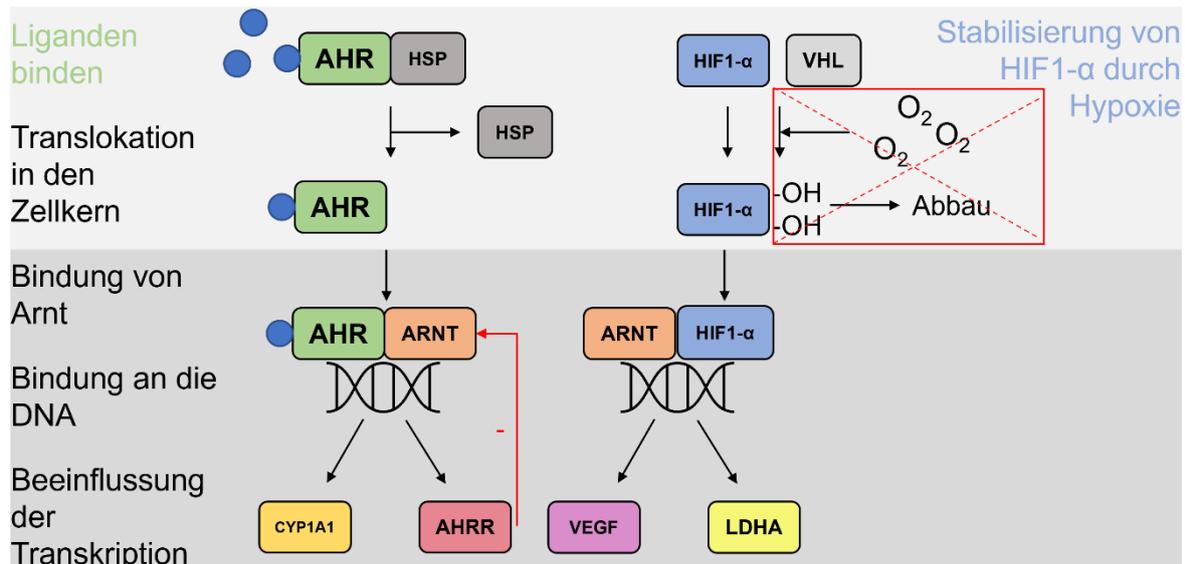


Abbildung 2: Links: AHR liegt in Ruhe zytoplasmatisch und an HSP-90 gebunden vor. Nach Bindung eines Liganden dissoziiert HSP-90. Im Zellkern bindet AHR an ARNT und kann dann an die DNA binden. Hierdurch kann die Transkription verschiedener Gene beeinflusst werden, u.a. *CYP1A1* und *AHRR*. Rechts: Unter normoxischen Bedingungen wird HIF1- α von VHL hydroxyliert und dann abgebaut. Fehlt der Sauerstoff für die Hydroxylierung (bei Hypoxie) wird HIF1- α nicht abgebaut und transloziert in den Zellkern. Hier bindet es - wie AHR - an ARNT und induziert die Transkription unterschiedlicher Gene, z.B. *VEGF* und *LDHA*.

1.5 Die Rolle des Arylhydrocarbon-Rezeptors in Gliomen

Der AHR spielt eine wichtige Rolle für die zelluläre Adaptation an endogene und exogene Metabolite. Einer der endogenen AHR-Liganden ist die essentielle Aminosäure Tryptophan und das Tryptophanabbauprodukt Kynurenin [24]. Tryptophan wird in vielen Organen von dem Enzym Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) verstoffwechselt. In Gliomen hingegen wird Tryptophan durch die Tryptophan-2,3-dioxygenase (TDO) abgebaut. Die TDO in Gliomen ist so stark aktiv, dass es im Mikromilieu von Gliomen niedrige Tryptophanspiegel und hohe Konzentrationen des Tryptophanabbauproduktes Kynurenin gibt [25]. Die dadurch entstandene Menge von Kynurenin ist so hoch, dass der Tumor durch die überaktive TDO den AHR selbst aktivieren kann (Autoaktivierung). Der AHR, aktiviert durch Kynurenin, sorgt in Gliomzellen für ein verstärktes Wachstum, eine erhöhte Invasivität sowie die Fähigkeit

zum Bilden von Kolonien [25, 26]. Der AHR-Komplex scheint zusätzlich dazu eine wichtige Rolle für die tumorinduzierte Immunsuppression zu spielen [27, 28]. Studien konnten außerdem eine Korrelation zwischen der Expression von AHR sowie AHR-Zielgenen und dem Überleben von Patienten nachweisen. Beide sind ein prognostisch ungünstige Faktoren für Patienten mit Gliomen [24, 29].

Dass AHR eine wichtige Rolle in der Krebsentstehung spielt, ist Thema diverser Untersuchungen. Bereits 1985 konnten Greenlee und Neal anhand von AHR den Mechanismus des kanzerogenen Effekt von TCDD erklären [30]. Auch in anderen Krebsarten spielt AHR eine wesentliche Rolle. Mäuse mit einer konstitutiven Aktivierung des AHR erkrankten sowohl an Magen-, als auch an Leberzellkarzinomen [31, 32].

Insgesamt zeigt sich die Relevanz von AHR in Gliomen vor allem hinsichtlich der zellulären Veränderungen durch das Mikromilieu des Tumors, der tumorinduzierten Immunsuppression und der Förderung des Tumorwachstum.

1.6 Die Rolle von HIF1- α in Gliomen

Ein wesentliches Merkmal von Glioblastomen ist das schnelle Wachstum des Tumors. Dieses führt dazu, dass insbesondere zentrale Tumorareale nicht ausreichend mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden. Histologisch zeigt sich dies in der Bildung Tumorgewebsnekrosen, welche teilweise von Tumorzellen in Pallisadenformationen umgeben sind. Durch die Hypoxie kommt es zu einer Aktivierung von HIF1- α und somit zur Induktion von Neoangiogenese [33]. Die daraus resultierenden neu gebildeten Gefäße können jedoch nicht dauerhaft suffizient den Sauerstoffbedarf des Tumorgewebes decken, sodass es nach kurzer Zeit erneut zu hypoxischen Bedingungen kommt und HIF1- α erneut aktiviert wird [33, 34]. In Gliomen wird HIF1- α nicht nur durch Hypoxie sondern auch durch die Aktivierung von onkogenen Signalwegen, z.B. über MAPK/ERK, p53 und P3K/PTEN aktiviert [34].

Wie in **1.3** beschrieben, unterscheidet sich der Zellmetabolismus in Gliomen von dem Metabolismus gesunder Zellen. *HIF1- α* ist mit *PI3K* eines der Treibergene für die Umstellung des Energiehaushaltes und den Warburg-Effekt [35]. Durch die daraufhin vermehrt stattfindende Glykolyse akkumuliert außerdem Laktat, was eine Entzündungsreaktion in der Tumorumgebung begünstigt [36].

Liegt in einem Gliom eine IDH-Mutation vor, wird in dem Tumor mehr HIF1- α

exprimiert. Das von IDH produzierte α -Ketoglutarat sorgt im physiologischen Zellstoffwechsel für den Abbau von HIF1- α . Liegt jedoch eine Mutation der IDH vor, wird weniger α -Ketoglutarat produziert, sodass ein degradierender Faktor für HIF1- α wegfällt und HIF1- α somit akkumulieren kann [37, 10]. HIF1- α sorgt in Gliomen außerdem durch die Induktion und Differenzierung regulatorischer T-Zellen für eine Suppression des Immunsystems und verhindert somit, dass die Krebszellen vom körpereigenen Immunsystem erkannt werden [38].

1.7 CRISPR-Cas9

Um die Funktion von einzelnen Genen weiter zu ergründen, gibt es verschiedene gentechnische Methoden. Eine neuere Methode ist die so genannte CRISPR-Cas Methode, die es einfach und effizient ermöglicht, einzelne Gene zu verändern. Ursprünglich handelt es sich hierbei um einen Abwehrmechanismus von Bakterien und Archaeen gegen Viren. Kommen diese Organismen mit einem Virus oder einem Teil seiner DNA in Kontakt, so kann eine Genschere dieses Erbgut zerschneiden. Die Bruchstücke des Virusgenoms werden dann als sogenannte *Spacer*-Sequenz zwischen palindromischen Sequenzen im bakteriellen Genom eingefügt. Diese Region wird auch *Clustered regularly interspaced short palindromic repeat*, kurz CRISPR, genannt. Dieser Teil wird in eine Leit-RNA (auch *guide RNA* oder *sgRNA* genannt) umgeschrieben, die dann dafür sorgt, dass CRISPR-assoziierte Systeme, kurz Cas, das Virusgenom bei erneutem Kontakt erkennen und zerschneiden. Somit wird das Bakterium immun gegen das Virus und das CRISPR-System sorgt gleichzeitig dafür, dass nur fremde DNA und nicht die zelleigene DNA beschädigt wird. Das System wird zusammen als CRISPR-Cas-System bezeichnet. Es ist möglich, die Leitsequenz für das Cas-Protein mit einer beliebigen Sequenz zu ersetzen und damit einen Schnitt in der DNA an jeder gewünschten Stelle hinzuzufügen [39]. Somit können Gene gezielt manipuliert werden, um in Zellen sowie in Tiermodellen die Funktionen von Genen aufzudecken. Darüber hinaus ist es möglich, das Erbgut gezielt zu verändern, sodass Gendefekte repariert werden können. Daraus ergibt sich die Hoffnung auf eine Möglichkeit genetische Erkrankungen und auch Krebserkrankungen zu heilen [40]. Aber auch in der Landwirtschaft werden gentechnische Methoden eingesetzt um die Erträge zu erhöhen oder Resistenzen gegenüber Schädlingen herbeizuführen [39]. Ältere gentechnische Methoden, wie Zinkfingernukleasen oder TALEN, haben den

Nachteil, dass sie schwierig zu handhaben sind und darüber hinaus sehr zeitaufwändig sind [39]. Jede Genschere birgt jedoch das Risiko, auch an einer nicht gewünschten Stelle die DNA zu spalten. Dieses Phänomen wird als *off-target* Effekt bezeichnet und dessen Ausmaß muss vor allem im Hinblick auf den therapeutischen Einsatz von Genschere so gering wie möglich gehalten werden [39]. Obwohl dieses Risiko auch bei dem CRISPR-Cas-System besteht, hat dieses dennoch viele Vorteile: Das Austauschen der Leit-RNA funktioniert verhältnismäßig einfach, sodass Versuchsreihen mit vielen Versuchstieren oder Zellen schnell durchgeführt werden können und man außerdem in kurzer Zeit viele verschiedene Gene modifizieren kann. Der Schnitt, der durch das Cas-Protein erzeugt wird, ist an einer spezifischen Stelle, nämlich bei Cas9-Proteinen von *Streptococcus Pyogenes* zwischen der 17 und 18. Base der Zielsequenz. Im Gegensatz dazu schneidet TALEN an variablen Stellen. Ein weiterer Vorteil ist, dass es sogar möglich ist, mehrere Gene gleichzeitig zu manipulieren [41].

Für die gezielte Genmanipulation mit CRISPR-Cas ist es zunächst notwendig, die Leitsequenz des Cas-Proteins zu designen. Hierfür stehen Libraries und Design tools zu Verfügung, um die Menge von off-targets so gering wie möglich zu halten. Darüber hinaus ist es notwendig, die Leit-RNA und ein Plasmid für das Cas-Protein in die gewünschte Zelle zu einzubringen. Mittlerweile gibt es verschiedene Cas-Proteine, die verwendet werden können; dies ist abhängig vom genauen Verwendungszweck. Auch die Wege die gewünschten Plasmide in die Zellen einzubringen, so genannte *Delivery* Systeme, sind vielfältig. Ein Beispiel ist die virale Transduktion, bei der das gewünschte Plasmid in entsprechenden Zelllinien mit Verpackungsplasmiden in ein Virus verpackt wird, das dann in einem weiteren Schritt die Zielzellen infiziert und das gewünschte Plasmid somit in die Zielzelle einbringt. Ist sowohl ein Cas-Protein, als auch die Leit-RNA in dieser Zelle vorhanden, kann das CRISPR-Cas-System aktiv werden. Mit Hilfe der Leit-RNA fñgt das Cas-Protein an der DNA einen Doppelstrangbruch ein. Dieser Doppelstrangbruch kann entweder durch *Non-homologous-end-joining* (NHEJ) oder *Homology-directed repair* (HDR) repariert werden. Die NHEJ ist so fehlerbehaftet, so dass es hierbei infolge von Insertionen oder Deletionen zu einer *Frameshift*-Mutation und dem vorzeitigen Einbau eines Stoppkodons kommen kann. Infolgedessen kann das Protein, für das das Gen kodiert, nicht vollständig vorhanden oder nicht funktionsfähig sein. Diese Methode eignet sich zur Erstellung von *Knock-outs*, also dem gezielten Ausschalten eines Gens. Die HDR

hingegen ist ein sehr genauer Reparaturmechanismus, mit dem sich sogar einzelne Nukleotide modifizieren lassen. Hierfür ist allerdings noch eine Reparaturvorlage notwendig, um die gewünschte Mutation zu erzeugen. Trotz aller Fortschritte durch das CRISPR-Cas-System entsteht die gewünschte Mutation trotzdem nicht in allen Zellen, sodass Zellklone mit der gewünschten Genmutation isoliert und auf die Mutation hin getestet werden müssen [41, 42].

1.8 Eigene Zielsetzung

Ausgangspunkt der im folgenden dargestellten Experimente war, dass die untersuchten Glioblastomzelllinien unabhängig von der *MGMT*-Promotormethylierung ein unterschiedliches Resistenzverhalten gegenüber Temozolomid haben. Dies legt nahe, dass auch andere Gene eine Rolle für das Resistenzverhalten von Glioblastomzelllinien gegenüber Temozolomid spielen. Trotz multimodaler Therapiemöglichkeiten sind Gliome nicht heilbar und im Falle von einer Diagnose eines Glioblastoms haben betroffene Patienten eine sehr schlechte Prognose.

Sowohl *in vitro* Experimente an Gliomzelllinien, als auch statistische Analysen haben gezeigt, dass der AHR-Komplex eine Rolle für die Malignität und die Prognose von Patienten*innen mit Gliomen spielt. Auch ist HIF1- α an zentralen Prozessen in der Tumorphagenese von Gliomen beteiligt. Somit stellt ARNT einen zentralen Knotenpunkt der Signaltransduktion in Gliomen dar.

Durch einen in Zelllinien induzierten Verlust der Expression, sogenannte *Knock-outs*, sollte die Rolle des *Aryl-hydrocarbon-Nuclear-Translocator* (ARNT) auf das Wachstumsverhalten von Gliomzellen und die Temozolomid-Sensitivität untersucht werden. Mit den genmodifizierten Zellen wurden funktionelle Tests zur Quantifizierung der Proliferation, Bestimmung der Kapazität zur Bildung von Kolonien und Analyse des Ansprechens der Gliomzellen auf Temozolomid durchgeführt. Diese Analysen sollten neue Aspekte der Resistenzentwicklung von Glioblastomzellen gegenüber Temozolomid aufdecken, um so eine präzisere prädiktive Diagnostik für Patienten stellen zu können und neue Ansatzpunkte für die Therapie zu ermitteln.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Die **Tabelle 1** gibt einen Überblick über die verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Material	Bestellnummer	Hersteller
6-Well Zellkultur-Multischale, Nunclon™ Delta Surface	140685	Thermo Scientific™, Waltham, USA
96-Well Zellkultur-Multischale, Nunclon™ Delta Surface	161093	Thermo Scientific™, Waltham, USA
Amersham™ Protran™ 0.2 µM NC	GE10600001	GE healthcare, Little Chalfont, UK
Combitips advanced® 1 ml/ 5 ml	0030089.430/ 0030089.456	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Corning® Zellschaber	CLS3010	Corning, New York, USA
Kryoröhrchen Zellkultur (1.8 ml)	375418	Thermo Scientific™, Waltham, USA
MicroAMP® Fast Optical 96-Well Reaktionsmikrotiterplatte	4346906	Applied Biosystems®, Foster City, USA
my-Budget 8er Strips Caps	30-SP-0075	Bio-Budget, Krefeld, Deutschland
my-Budget 96-Well PCR-Platten	30-SP-9600	Bio-Budget, Krefeld, Deutschland
NuPAGE™ Novex™ 4-12 % Bis-Tris Protein Gele	NP0321/ NP0322/ NP0323/ NP0335/ NP0336	Thermo Scientific™, Waltham, USA
Omnifix® Solo Einmalspritzen, 10 ml	4617100V	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Petrischalen 10cm	391-0561	VWR®, Darmstadt, Deutschland
Reagenz-/Zentrifugenröhrchen mit Schraubverschluss, 15 ml/ 50 ml	188271/ 227261	VWR®, Darmstadt, Deutschland
Safe-Lock Tubes, 0,5 ml/ 1,5 ml/ 2,0 ml	0030121023/ 0030120086/ 30120094	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Skalpell	5205052	Feather Safety Razor CO-, Ltd., Osaka, Japan
Spritzenvorsatzfilter, 0,45 µm	514-0063	VWR®, Darmstadt, Deutschland
Stripetten, 5 ml/ 10 ml/ 25 ml	4487/ 4488/ 4489	Corning, New York, USA

TipOne® Pipette	S1120-3810/ S1123-1810/ S1120-1840/ S1120-8810/ S1122-1830	STARLAB, Hamburg, Deutschland
Vakuumfiltrationseinheit 250ml, 0,2 µm PES Membran steril	514-0330	VWR®, Darmstadt, Deutschland
Vi-CELL™ 4 ml Sample Vials	383721	BECKMAN COULTER®, Brea, USA
Whatman™ Gel-Blotting-Bögen (300×600 mm)	732-4092	VWR®, Darmstadt, Deutschland
Zellkulturflasche 25 cm ² Nunc™ EasYFlask™	156367	Thermo Scientific™, Waltham, USA
Zellkulturflasche 75 cm ² Nunc™ EasYFlask™	156499	Thermo Scientific™, Waltham, USA
Zellkulturschale 100x21 mm, Nunclon™ Delta (10 cm)	172931	Thermo Scientific™, Waltham, USA
Zellkulturschale 150x21 mm, Nunclon™ Delta (15 cm Dish)	168381	Thermo Scientific™, Waltham, USA

2.1.2 Verwendete Chemikalien

Die **Tabelle 2** fasst die verwendeten Chemikalien zusammen.

Chemikalie	Bestellnummer	Hersteller
Ampicillin-Natriumsalz	A0839,0025	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Antikörper		
α-Aktin	A2066-100	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
AHR	83200	Cell signaling Technology, Danvers, USA
AHRR	ab108518	Abcam, Cambridge, Großbritannien
ARNT	5537	Cell signaling Technology, Danvers, USA
ARNT2	ab70122	Abcam, Cambridge, Großbritannien
LI-COR IRDye 800CW Goat anti-Rabbit IgG	926-32211	LI-COR®, Lincoln, USA
Agar-Agar Kobe I	5210.2	ROTH®, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	3810.3	ROTH®, Karlsruhe, Deutschland
Benzonase	9025-65-4	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
Blasticidin	A11139-03	Thermo Scientific™/Gibco™, Waltham, USA
BSA	8076.3	ROTH®, Karlsruhe, Deutschland
BsmBI Restriktionsenzym	R0580L	New England Biolabs, Ipswich, USA
Chloroform	602-006-00-4	Merck Millipore, Burlington, USA
DNA-Leiter 1kb	85-1000-250	Bio-Budget, Krefeld, Deutschland
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	67-68-5	PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland

2. Material und Methoden

Dimethylformamide (DMF)	270547-1L	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
DNA-Leiter 100bp+1,5kb	852150-050	Bio-Budget, Krefeld, Deutschland
DMEM	41965039	Thermo Scientific™/Gibco™, Waltham, USA
DMOG	89464-63-1	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
Dulbecco's Phosphate-Buffered Salines (PBS)	14190094	Thermo Scientific™/Gibco™, Waltham, USA
EDTA	CN06.3	ROTH®, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure 100%	3738.5	ROTH®, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol absolut	20.821.330	VWR®, Darmstadt, Deutschland
FastAP (1U/µl)	EF0654	Thermo Scientific™, Waltham, USA
Fetal Calve Serum FCS	10270106	Thermo Scientific™/Gibco™, Waltham, USA
Formaldehyde Lösung 37%	4979.2	ROTH®, Karlsruhe, Deutschland
Geneticin (G418)	10131027	Thermo Scientific™/Gibco™, Waltham, USA
Hefeextrakt	2363.2	ROTH®, Karlsruhe, Deutschland
Hind III Restriktionsenzym	FD0504	Fermentas / Thermo Scientific™, Waltham, USA
Isopropanol	CP414	ROTH®, Karlsruhe, Deutschland
3-Indoxyl-Sulfate-Kaliumsalz	3875	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
Kristallviolett	T123.3	ROTH®, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	CP43.4	ROTH®, Karlsruhe, Deutschland
MES	4256.4	ROTH®, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	T145.3	ROTH®, Karlsruhe, Deutschland
Midori Green	617004	NIPPON Genetics Europe, Düren, Deutschland
NEB Buffer 3.1	B7203S	New England Biolabs, Ipswich, USA
NEB Buffer Cutsmart	B7204S	New England Biolabs, Ipswich, USA
NEB Buffer 2	B7002S	New England Biolabs, Ipswich, USA
Opti-MEM	11058021	Thermo Scientific™/Gibco™, Waltham, USA
Outgrowth Medium	B9035S	New England Biolabs, Ipswich, USA
Oxoid™ phosphate buffered saline tablets (PBS 10X)	BR0014G	Thermo Scientific™, Waltham, USA
Ponceau	6226-79-5	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
Penicillin-Streptomycin	15140122	Thermo Scientific™/Gibco™, Waltham, USA
Plasmide		
LentiCas9-Blast	1000000049	Addgene, Cambridge, USA
Lenti guide Puro	52963	Addgene, Cambridge, USA
pLentiCas9-BFP	78545	Addgene, Cambridge, USA
pLentiCas9-GFP	78546	Addgene, Cambridge, USA
pLentiCas9-T2A-BFP	78547	Addgene, Cambridge, USA
pLentiCas9-T2A-GFP	78548	Addgene, Cambridge, USA
pMD2.G	12259	Addgene, Cambridge, USA
pMDLg/pRRE	12251	Addgene, Cambridge, USA
psPAX2 Packing Plasmid	12260	Addgene, Cambridge, USA
pRSV-Rev	12253	Addgene, Cambridge, USA

pCMV-VSV-G Packing Plasmid	8454	Addgene, Cambridge, USA
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor	4906837001	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
Polyethyleneimine (PEI)	408727	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
Protease Inhibitor	11836170001	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
Protein-Gel	NP0321BOX	Invitrogen™/Thermo Scientific™, Waltham, USA
Proteinmarker PageRuler Prestained	26616	Thermo Scientific™, Waltham, USA
Puromycin	A11138-03	Thermo Scientific™/Gibco™, Waltham, USA
PVU II Restruktionsenzym	M0202	New England Biolabs, Ipswich, USA
RNA		
Human Adult normal Tissue: Corpus Callosum	R1234045-10	BioChain Institute, Inc., Newark, USA
Human Adult normal Tissue: Frontallappen	R1234051-50	BioChain Institute, Inc., Newark, USA
Human Adult normal Tissue: Occipitallappen	R1234062-50	BioChain Institute, Inc., Newark, USA
Human Adult normal Tissue: Parietallappen	R1234066-50	BioChain Institute, Inc., Newark, USA
Human Adult normal Tissue: Temporallappen	R1234078-50	BioChain Institute, Inc., Newark, USA
Human Universal Reference	740000-41	Agilent, Santa Clara, USA
RNA-magic	56-1000	Bio-Budget, Krefeld, Deutschland
RPMI 1640 Medium	11875-093	Thermo Scientific™/Gibco™, Waltham, USA
SDS 20% Lösung	1057.1	ROTH®, Karlsruhe, Deutschland
SDS Pellets	CN30.4	ROTH®, Karlsruhe, Deutschland
Taq DNA-Polymerase	10342-020	Invitrogen™/Thermo Scientific™, Waltham, USA
Temozolomid	sc-203292A	Santa Cruz Biotechnology, Huissen, Niederlande
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT)	M5655	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
Tris Base	77-86-1	Merck Millipore, Burlington, USA
TRIS Hydrochlorid (TRIS-HCl)	9090.3	ROTH®, Karlsruhe, Deutschland
Trizol	15596018	Thermo Scientific™, Waltham, USA
Trypsin-EDTA (0,05%)	25300054	Thermo Scientific™/Gibco™, Waltham, USA
Tween 20	9005-64-5	ROTH®, Karlsruhe, Deutschland

2.1.3 Verwendete Kits

Die **Tabelle 3** zeigt die verwendeten Kits.

Kit	Bestellnummer	Hersteller
Pure Link Gel extraction Kit	K210012	Thermo Scientific™, Waltham, USA
Dnase I recombinant, Rnase-free	4716728001	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
HotStarTaq DNA Polymerase	203205	Qiagen, Hilden, Deutschland
Monarch® DNA Gel Extraction Kit	T1020L	New England Biolabs, Ipswich, USA
my-Budget dNTP-Set	80-85011000	Bio-Budget, Krefeld, Deutschland

Pierce™ BCA Protein Assay Kit	23225	Thermo Scientific™, Waltham, USA
Platinum™ SYBR™ Green qPCR SuperMix-UDG w/ROX	11744100	Thermo Scientific™, Waltham, USA
Plasmid Maxi Kit (25)	12163	Qiagen, Hilden, Deutschland
Plasmid Miniprep Kit I	12-69 42-02	VWR/PEQLab®, Darmstadt, Deutschland
QIAamp DNA Mini Kit (250)	51306	Qiagen, Hilden, Deutschland
Revert First Strand cDNA Synthesis Kit	K1622	Thermo Scientific™, Waltham, USA
T4 DNA Ligase Kit	M0202	New England Biolabs, Ipswich, USA
Taq DNA Polymerase, recombinant	10342-020	Thermo Scientific™, Waltham, USA

2.1.4 Rezepte für verwendete Lösungen

Die **Tabelle 4** gibt einen Überblick über die verwendeten Lösungen.

Lösung/Puffer	Protokoll
Ampicillin-Lösung	1 g Ampicillin-Natriumsalz, 5 ml Ethanol, 5 ml dH ₂ O
Kristallviolett	1 g Kristallviolett, 110ml Formalin (37%), 40 ml Methanol, 10 Tabletten 10xPBS, dH ₂ O ad 1 l
Lämmli-Puffer (4x)	100 mM TRIS, 6 % SDS, 40 % Glycerin, 4 % β-Mercaptoethanol, Spatelspitze Bromphenolblau, dH ₂ O
Laufpuffer (20x)	50 mM Tricine, 50 mM TRIS Base, 0,1 % SDS
LB-Medium	10 g Tryptone, 5 g Hefeextrakt, 10g NaCl, 950 ml dH ₂ O, PH: 7, autoklaviert
LB-Agar	15 g Agar pro 1 l LB-Medium, PH: 7, autoklaviert
MES (20x)	195,2 g MES, 121,2 g TRIS-Base, 20 g SDS, 6 g EDTA, dH ₂ O ad 1 l
MTT-Reagent	5 mg/ml 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide in PBS, steril filtriert
MTT-Solvent	400 ml DMF, 160 g SDS-Pellets, 20 ml Essigsäure 100%, 780 ml dH ₂ O
RIPA 100mM	50 mM TRIS-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 1% NP - 40, 0,5 % Natriumdesoxycholat, 0,1 % SDS
RIPA complete	10 ml RIPA 100 mM, 1 Tablette Protease-Stop, 1 Tablette PhosSTOP, 10 µl Benzonase
Ponceau S-S	5 % Essigsäure, 0,1 % Ponceau S
Polyethyleneimine	1 mg/ ml in dH ₂ O
TAE-Puffer	242 g TRIS, 57,1 ml Essigsäure 100%, 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8.0), dH ₂ O ad 1 l
TBS (10x)	10 mM TRIS, 150 mM NaCl, dH ₂ O
TBS-T	1 l TBS, 1 ml Tween (20)
Transferpuffer (10x)	25 mM TRIS, 0,2 M Glycerin, dH ₂ O
Transferpuffer (1x)	1:10 Transferpuffer (10x), 20 % Methanol, dH ₂ O

2.1.5 Verwendete Geräte

Die **Tabelle 5** listet die verwendeten Geräte auf.

Gerät	Hersteller
Biometra TRIO (PCR thermal cycler)	Analytik Jena, Jena, Deutschland
NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
PARADIGM™ (Plate reader)	BECKMAN COULTER®, Brea, USA
StepOnePlus Real-Time PCR System	Applied Biosystems®, Foster City, USA
Vi-CELL™ XR (Cell counter)	BECKMAN COULTER®, Brea, USA
X Cell SureLock™ Electrophoresis Cell	Thermo Scientific™, Waltham, USA

2.1.6 Verwendete Software

Die **Tabelle 6** gibt einen Überblick über die verwendete Software.

Software	Anwendungsbereich	Softwarehersteller
Citavi v6	Literaturverwaltungsprogramm	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Switzerland
Excel	Statistische Analyse	Microsoft, Redmond, USA
Gimp v.2.10.8	Bildbearbeitungsprogramm	Open source: https://www.gimp.org/
GraphPad Prism v7-8	Statistische Analyse und graphische Darstellung	GraphPad, San Diego, USA
Image Studio Lite v2.1	Densitometrische Proteinquantifizierung	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
ImageJ	Bildbearbeitung	Open source: https://imagej.nih.gov/ij/
Multimode Analysis Software	Plate Reader Software	PerkinElmer, Waltham, USA
NIS Elements BR v3.2	Zelldarstellungssoftware	Nikon Corporation, Minato, Japan
Powerpoint	Erstellen von Abbildungen	Microsoft, Redmond, USA
R	Statistische Analyse	Open source: https://cran.r-project.org/mirrors.html
RStudio	Statistische Analyse	Posit PBC, Boston, USA
StepOne™ Software v2.0.1	QPCR Analyse	Thermo Scientific™, Waltham, USA
ViCELLXR v2.03	Zellzählung	BECKMAN COULTER®, Brea, USA

2.1.7 Verwendete Primer

Die **Tabelle 7** zeigt die verwendeten Primer.

Gen	Oligonukleotid	Oligonukleotid-Sequenz 5'-3'	Annealing-temperatur	Verwendung
ARF1	R3	TCCCACACAGTGAAGCTGAT G	66,4 °C	Referenzgen QPCR
	F1	GACCACGATCCTCTACAAGC	61,3 °C	Referenzgen QPCR
AHR	AHR-Hs-F1	CCACTTCAGCCACCATCCATA	67,0 °C	cDNA Nachweis
	AHR-Hs-R1	CAGCTCTGCTTCAGTATATCC TAA	60,5 °C	cDNA Nachweis
AHRR	AHRR-Hs-F1	CTCCGCAGCGGAGATGAAA	68,8 °C	cDNA Nachweis

2. Material und Methoden

	AHRR-Hs-R1	GGTTTTCCATGCAGTTCCGAT T	67,9 °C	cDNA Nachweis
ARNT	ARNT-Hs-F1	CATCCACTGATGGCTCCTATA A	62,7 °C	cDNA Nachweis
	ARNT-Hs-R1	GAGTCACGGAGTCAGACACA TA	61,8 °C	cDNA Nachweis
ARNT sgRNA5	Hs-ARNT- sgRNA5-Seq F	CTATGTCTGGTTGTATCCAGA GCAT	64,1 °C	Kontrolle Klonierung
	Hs-ARNT- sgRNA5-Seq R	GATGCAAGTGAGAGCTGCTG AA	66,9 °C	Kontrolle Klonierung
ARNT2	ARNT2-Hs-F1	CGGTGCCACAGAGTTCTTA	65,1 °C	cDNA Nachweis
	ARNT2-Hs-R1	GCTCTCAGCAGATGGCTTT	62,3 °C	cDNA Nachweis
CYP1A1	F1	GAAGATGGTCAAGGAGCACT ACA	64.3 °C	cDNA Nachweis
	R1	GAGGTCCAAGACGATGTTAA TGA	64.0 °C	cDNA Nachweis
CYP1B1	R1	CCACGACCTGATCCAATTCTG	66.6 °C	cDNA Nachweis
	F1	GGCCACTATCACTGACATCTT C	62.5 °C	cDNA Nachweis
EGLN1	EGLN1-Hs-F1	CAGCATGGACGACCTGATAC GGATTATCAACATGACGTACA TAAC	63.2 °C	cDNA Nachweis
	EGLN1-Hs-R1		60.0 °C	cDNA Nachweis
HK2	HK2-Hs-F1	GCTGTGGTGAACGACACAGT	64.1 °C	cDNA Nachweis
	HK2-Hs-R1	GTTGCGCATCTCCTCCATGTA	67.2 °C	cDNA Nachweis
LDHA	LDHA-Hs-F1	GTCCAGCGTAACGTGAACAT C	64.4 °C	cDNA Nachweis
	LDHA-Hs-R1	CCAAGCCACGTAGGTCAAGA TAT	65.0 °C	cDNA Nachweis
NFE2L2	R1	GGCTTCTGGACTTGGAACCA T	66.4 °C	cDNA Nachweis
	F1	GACGGTATGCAACAGGACAT TG	66.3 °C	cDNA Nachweis
NQO1	R1	GTCTGCGGCTTCCAGCTTCTT	69.0 °C	cDNA Nachweis
	F1	GGACCTCTATGCCATGAATTC	62.2 °C	cDNA Nachweis
Myc1	R1	GTTCTTTGAAACTGAAT	48.5 °C	Mycoplasmentest
	F1	ACACCATGGGAGCTGGTAAT	63.2 °C	Mycoplasmentest
Myc2	R2	GCATCCACCAWAWACTCT	51.8 °C	Mycoplasmentest
	F2	CTTCWTCGACTTYCAGACCC CAAGGCAT	74.4 °C	Mycoplasmentest
PDK1	PDK1-Hs-F1	GCAAGAGTTGCCTGTCAGAC T	63.6 °C	cDNA Nachweis
	PDK1-Hs-R1	GTCCTGAAGACTCTGGATAT AC	59.8 °C	cDNA Nachweis
SLC2A1	SLC2A1-Hs-F1	CATCAACCGCAACGAGGAGA A	69.4 °C	cDNA Nachweis
	SLC2A1-Hs-R1	CAGGATGGTGACCTTCTTCTC	62.6 °C	cDNA Nachweis
POL-κ	F1	CCAGGAAGTGGTAAAGGAAA TT	62.0 °C	cDNA Nachweis
	R	GCTTGTCTATTGGGAAGAATT T	60.0 °C	cDNA Nachweis
U6	U6	CGTGACGTAGAAAGTAATAAT TTCTTGGG	66.7 °C	Sequenzierung
WI3306	F1	GTAATGCAGCTTTGACCAT	57.7 °C	cDNA Kontrolle
	R2	TGCTCTGTTCTCAGGCAGAC	63.5 °C	cDNA Kontrolle

2.1.8 Verwendete sgRNAs

Die **Tabelle 8** zeigt die verwendeten sgRNAs.

Gen	Oligonukleotid	Oligonukleotid-Sequenz 5'-3'	Annealing-Temperatur
ARNT 1	Top	CACCGGTCGCCGCTTAATAG CCCTC	77,1°C
	Bottom	AAACGAGGGCTATTAAGCGGCGAC C	74,1°C
ARNT 2	Top	CACCGTGATCAGATGTCTAA CGATA	65,9°C
	Bottom	AAACTATCGTTAGACATCT GATCAC	59,2°C
ARNT 3	Top	CACCGGCATCAGATGTACCATCAC	70,3°C
	Bottom	AAACGTGATGGTACATCTGATGTCC	66,8°C
ARNT 4	Top	CACCGCTCAGCCTATTCACAGAAAC	70,4°C
	Bottom	AAACGTTTTCTGTGAATAGGCTGAGC	67,2°C
ARNT 5	Top	CACCGTGAATAGGCTGAGCTTTGTG	71,3°C
	Bottom	AAACCACAAAGCTCAGCCTATTCAC	67,1°C
ARNT 6	Top	CACCGGTGGAGGAGCCATTGTCCAG	78,4°C
	Bottom	AAACCTGG ACAATGGCTCCTCCACC	74,2°C

2.2 Zellkultur

Bei den verwendeten Zelllinien handelt es sich um kommerziell erhältliche Zelllinien, die bei American Type Culture Collection (ATCC) oder der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) erworben wurden. Die verschiedenen Zelllinien entstammen alle humanen Glioblastomen. Folgende Zelllinien wurden verwendet: A172, LN18, LN229, SNB19, T98G und U87MG. Die Zelllinie TP365MG wurde der Arbeitsgruppe freundlicherweise von Prof. V. Peter Collins, Cambridge, UK zur Verfügung gestellt. Als Referenzzelllinie diente die Zelllinie HEK293, die ebenfalls kommerziell erhältlich ist und beim DSMZ erworben wurden. Hierbei handelt es sich um eine Zelllinie, die aus humanen embryonalen Nierenzellen etabliert wurde. Zusätzlich wurde die Zelllinie HepG2 verwendet. Diese Zelllinie entstammt einem hepatozellulären Karzinom und wurde von ATCC erworben.

2.2.1 Pflege der Zellen

Die Zellen wurden in DMEM mit 4,5 g/L Glukose, 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Alle 2 – 3 Tage wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit PBS gewaschen. Wenn die Zellen subkonfluent waren, wurden sie 1:10 gesplittet. Hierfür wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Es wurde zum Ablösen der Zellen Trypsin-EDTA auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 5 – 10 min bei 37 °C wurde eine Einzelzellsuspension mittels Auf- und Abpipettierens erzeugt, das Trypsin mit FCS-haltigem Medium inhibiert und die gewünschte Menge der Zellkulturflasche

entnommen, sodass mit den Zellen bei Bedarf weitergearbeitet werden konnte. Zu den in der Flasche belassenen Zellen wurde dann neues Medium gegeben.

2.2.2 Einfrieren der Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und bei 1000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium, 90 % FCS und 10 % DMSO, resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden in ein Kryoröhrchen pipettiert. Dieses wurde bei - 80 °C eingefroren.

2.2.3 Auftauen der Zellen

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen mit den Zellen von - 80 °C in ein 37 °C warmes Wasserbad gelegt. Nachdem die Zellen aufgetaut waren, wurde 1 ml PBS in das Kryoröhrchen gegeben und die Mischung in ein 15 ml Falcon überführt. Nach einer Abzentrifugation bei 1000 rpm für 5 min wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit frischem Kulturmedium in eine mittlere Zellkulturflasche (T 75) überführt. Anschließend wurde neues Medium hinzugegeben und die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und die Zellen unter dem Mikroskop betrachtet. Nach mindestens 48 h wurden bei frisch aufgetauten Zellen jeweils 500 µl Zellkulturüberstand für einen Mykoplasmentest abgenommen.

2.2.4 Mykoplasmen-Test

Um eine Kontamination der Zellen mit Mykoplasmen auszuschließen, wurde jede aufgetaute Probe auf Mykoplasmen getestet und positiv getestete Zelllinien wurden verworfen. Für den Mykoplasmentest wurde zunächst 500 µl Zellkulturüberstand abgenommen. Es wurden dann sequentiell 2 PCRs als sogenannte „Nested-PCR“ durchgeführt.

1. PCR:

5 µl	Zellkulturüberstand
2,5 µl	10xPuffer (ohne MgCl)
0,5 µl	10 mM dNTPs
0,5 µl	Myc F1 (10 µM)
0,5 µl	Myc R1 (10 µM)
0,75 µl	50 mM MgCl ₂
0,1 µl	Taq DNA Polymerase

15,15 H₂O

PCR-Programm 1. PCR:

	94 °C	5'	Denaturierung
Anzahl Zyklen 35	94 °C	30"	Denaturierung
	55 °C	2'	Annealing
	72 °C	1'	Elongation
	72 °C	5'	Elongation
	10 °C	∞	Kühlung

2. PCR:

1 µl	PCR-Produkte der 1. PCR
1,5 µl	10xPuffer (-MgCl)
2,5 µl	2 mM dNTPs
0,3 µl	Myc F2 (10 µM)
0,3 µl	Myc R2 (10 µM)
0,75 µl	50 mM MgCl ₂
0,1 µl	Taq DNA Polymerase
8,55 µl	H ₂ O

PCR-Programm 2. PCR:

	94 °C	5'	Denaturierung
Anzahl Zyklen 30	94 °C	30"	Denaturierung
	55 °C	2'	Annealing
	72 °C	1'	Elongation
	72 °C	5'	Elongation
	10 °C	∞	Kühlung

Es wurden bei jeder PCR-Untersuchung zwei Positiv-Kontrollen (zuvor positiv getestete Zellen) und zwei Negativ-Kontrollen (Wasser) mitgeführt. Die PCR-Produkte wurden auf ein 2 % Agarose-Gel aufgetragen (Herstellung siehe **2.2**) und bei 170 V für 20 min gelelektrophoretisch aufgetrennt.

2.3 Agarosegel-Herstellung und Gelelektrophorese

Für die Herstellung eines Agarose-Gels wurde Agarosepulver und TEA-Puffer (Herstellung siehe **6.4**) bis zum vollständigen Auflösen der Agarose in einer Mikrowelle

erhitzt. Je nach Größe des gewünschten PCR-Produkts wurde ein Agarose-Gel mit einem Agarosegehalt zwischen 0,5 – 2,0 % hergestellt. Als Farbstoff wurde Midori Green verwendet (3,5 µl auf 100 ml Agarose-Lösung). Um die Größe der aufgetrennten DNA- bzw. RNA-Fragmente zu bestimmen, wurde in die erste Geltasche 8 µl des 100 bp Marker/1 kb Marker pipettiert. Zu den Proben wurde je 1/5 Laufpuffer hinzugegeben, bevor diese in die Geltaschen pipettiert wurden.

2.4 RNA-Extraktion und cDNA-Nachweis

2.4.1 RNA-Extraktion

Für die RNA-Extraktion wurden 1.000.000 Zellen auf einer 6-Well-Platte kultiviert, bis sie eine Konfluenz von ca. 80 – 100 % erreicht hatten. Dann wurde die Extraktion nach dem folgenden Protokoll durchgeführt:

1. Medium absaugen und je 1 ml Trizol auf die Zellen geben.
2. Trizol 5 min einwirken lassen und dann in ein 2 ml Reagenzröhrchen überführen.
3. 200 µl Chloroform (100 %) dazugeben und ca. 15 s mit Hilfe des Vortexmischers vermischen.
4. 15 min bei Raumtemperatur stehen lassen.
5. 15 min bei 13.500 rpm und bei 4°C abzentrifugieren.
6. Die wässrige Phase (klare obere Phase) abnehmen und 500 µl Isopropanol (100 %) dazugeben.
7. Durch invertieren mischen und 10 min bei Raumtemperatur stehen lassen
8. Abzentrifugieren für 10 min bei 13.500 rpm und 4 °C.
9. Den Überstand vorsichtig abschütten und das RNA-Pellet mit 75 % EtOH/RNase-frei waschen.
10. Abzentrifugieren für 10 min bei 13.500 rpm und 4 °C.
11. Ethanol abschütten und ausdampfen lassen.
12. Die RNA in 50 µl RNase-freiem Wasser lösen und sofort auf Eis stellen.

2.4.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Um den RNA-Gehalt festzustellen, wurde jeweils 1,5 µl des RNA-Extraktes verwendet, um im NanoDrop 2000 Spektrophotometer die RNA-Konzentration festzustellen. Über die Absorption von UV-Licht ist es mit dem NanoDrop 2000 möglich, die RNA-

Konzentration innerhalb einer Konzentrationsbreite von 0,4 – 15,000 ng/ μ l festzustellen. Hierfür wird die Absorption bei 260 nm mit dem Extinktionsfaktor 40 (für RNA) multipliziert, was dann die Konzentration der RNA in ng/ μ l ergibt. Der Quotient der Absorption der RNA A260/A280 sollte 1,8 – 2,0 betragen, was auf eine gute Qualität der RNA hinweist.

2.4.3 Qualitätskontrolle der RNA

Für die Qualitätskontrolle wurde 1 μ g RNA auf ein 2 %iges Agarosegel (Herstellung siehe 2.2) aufgetragen und bei 170 V für 20 min gelektrophoretisch aufgetrennt. Bei der Auswertung wurde darauf geachtet, dass deutliche Banden für 28s und 18s ribosomale RNA vorhanden war und sich kein oder nur wenig Schmier im niedermolekularen Bereich zeigte, da letzteres ein Hinweis auf degradierte RNA ist. Da RNA relativ instabil ist, war es für die weiteren Experimente notwendig, diese in cDNA umzuschreiben. Insgesamt wurde jeweils 1 μ g RNA in cDNA umgeschrieben. Für den DNase-Verdau und die cDNA-Synthese wurde das PCR Gerät Biometra Trio verwendet.

2.4.4 DNase-Verdau

Der DNase-Verdau wurde - um mögliche Kontamination der RNA-Proben mit DNA-Resten zu beseitigen - nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. Reaktionsmix in PCR-Röhrchen erstellen
 - 1 μ g RNA
 - 1 μ l DNase Buffer
 - 0,5 μ l DNase
 - H₂O bis 10 μ l auffüllen.
2. Die PCR-Platten abzentrifugieren und den Reaktionsmix für 45 min bei 37 °C inkubieren.
3. Die Reaktion mit 1 μ l 0,2 μ M EDTA abstoppen.
4. Reaktionsmix für 10 min bei 75 °C erwärmen.

2.4.5 cDNA Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde das Revert First Strand cDNA Synthesis Kit von Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland) verwendet.

Für den Reaktions-Ansatz wurden folgende Komponenten benötigt:

11 µl	DNase verdauter RNA-Mix
4 µl	5x Reaction Buffer
1 µl	Random Primer
1 µl	RiboLock RNase Inhibitor
2 µl	10 mM dNTP-Mix
1 µl	Reverse Transkriptase (RT)

Die cDNA-Synthese wurde nach dem folgenden Schema durchgeführt:

25 °C	5'	cDNA-Synthese
42 °C	1 h	cDNA-Synthese
70 °C	5'	Inaktivierung der RT
12 °C	∞	Kühlung

Nach der cDNA-Synthese wurde die cDNA 1:20 mit H₂O verdünnt und bei 4 °C gelagert.

2.4.6 Qualitätskontrolle der cDNA

Nach der cDNA-Synthese wurde eine Kontrolle für die cDNA-Synthese und den DNase-Verdau durchgeführt. Für die Kontrolle der cDNA wurden Primer gegen das Referenzgen Adenosyl-Ribosylierungsfaktor 1 (*ARF1*) verwendet. Für die Kontrolle des DNase-Verdau wurden Primer gegen eine genomische DNA-Sequenz (*WI3306*) verwendet. Es wurden jeweils Kontrollen mitgeführt.

Test-PCR-Ansatz mit cDNA-Primern:

2 µl	10x Buffer
0,5 µl	10 mM dNTP's
0,5 µl	MgCl ₂
0,1 µl	Taq HST
0,5 µl	<i>ARF1</i> F1 10 µM
0,5 µl	<i>ARF1</i> R1 10 µM
3 µl	cDNA (verdünnt)

Test-PCR-Ansatz mit DNA-Primern:

2 µl	10x Buffer
0,5 µl	10 mM dNTP's
0,5 µl	MgCl ₂
0,1 µl	Taq HAST
0,5 µl	W13306 R1 10µM
0,5 µl	W13306 R2 10 µM
1 µl	cDNA (verdünnt)

PCR-Protokoll für beide Ansätze:

	95 °C	15'	Denaturierung
	95 °C	30"	Denaturierung
Anzahl Zyklen 36	58 °C	30"	Annealing
	72 °C	1'	Elongation
	72 °C	5'	Elongation
	10 °C	∞	Kühlung

Die PCR-Produkte wurden auf einem 2 % Agarosegel (Herstellung siehe **2.3**) bei 170 V für 20 min gelelektrophoretisch aufgetrennt. Bei der Auswertung wurde darauf geachtet, dass sich bei der Kontrolle der cDNA in allen Proben Banden befinden, während bei der Kontrolle des DNase-Verdau keine Bande in den PCR-Produkten vorhanden sein sollten.

2.4.7 Herstellung einer Primer-Matrix für die *Realtime*-PCR

Um das ideale Verhältnis der *Forward*- und *Reverse*-Primer zu ermitteln, wurde eine semiquantitative *Realtime*-PCR mit Hilfe eines *SYBR Green* Reagenz und verschiedenen Konzentrationskombinationen der Primer durchgeführt.

Hierfür wurde mit dem Primermix ein Reaktionsmix mit je 62,5 µl *SYBR Green*, 2,5 µl ROX und Wasser (auffüllen auf 100 µl) hergestellt.

Dabei wurden 6 verschiedene Primer-Konzentrations-Kombinationen getestet:

FP	RP
50 ng	50 ng
50 ng	300 ng
300 ng	50 ng

300 ng	300 ng
900 ng	300 ng
900 ng	900 ng

Die PCR wurde nach dem folgenden Schema durchgeführt:

	95 °C	10'	<i> Holding-Stage</i>
40 Zyklen	95 °C	15"	60 °C
95 °C	15"	<i> Melt Curve-Stage</i>	
	60 °C	1'	
	95 °C	15"	

2.4.8 Realtime-PCR

Für die semiquantitative Genexpressionsbestimmung wurde die cDNA mit Hilfe einer semiquantitativen *Realtime-PCR* auf einem *StepOnePlus Realtime* PCR-System analysiert, wobei ein *SYBR Green*-Kit von Invitrogen verwendet wurde.

Es wurden folgende cDNA Proben verwendet: Die cDNA von den o.g. Zelllinien mit je 4 Replikaten sowie 4 cDNA-Proben, deren RNA aus nicht-neoplastischem Hirngewebe isoliert wurden. Von jeder dieser cDNA-Proben wurden 3 Replikate verwendet. Für die Auswertung wurde als Referenzgen *ARF1* und als Kalibrator die Human Universal Reference RNA verwendet (HUR).

Der Reaktionsmix wurde wie folgt pipettiert:

Gen	Forward Primer	Reverse Primer	SYBR Green	Rox	cDNA	H ₂ O
<i>AHR</i>	0,6 µl	0,6 µl	10 µl	0,5 µl	3 µl	5,3 µl
<i>AHRR</i>	0,6 µl	0,1 µl	10 µl	0,5 µl	3 µl	5,8 µl
<i>ARNT</i>	0,6 µl	0,6 µl	10 µl	0,5 µl	3 µl	5,3 µl
<i>ARNT2</i>	0,6 µl	0,6 µl	10 µl	0,5 µl	3 µl	5,3 µl
<i>ARF1</i>	0,6 µl	0,6 µl	10 µl	0,5 µl	3 µl	5,3 µl

Die PCR-Reaktion erfolgte nach dem bereits in **2.2.7** beschriebenen Protokoll.

Anhand von Amplifikationskurven wird der Anstieg der Fluoreszenz mit der Anzahl der PCR-Zyklen für die verschiedenen Proben dargestellt. Die Anzahl der PCR-Zyklen, die zur Überschreitung eines definierten Schwellenwertes benötigt wird, wird als

Threshold cycle (CT-Wert) bezeichnet und kann somit zur Quantifizierung verwendet werden. Zur Auswertung wurde eine vergleichende Quantifizierung des gewünschten Genes mit dem Referenzgen *ARF1* nach der $2^{-\Delta\Delta}$ -CT Methode durchgeführt.

2.5 Proteinextraktion und -nachweis

2.5.1 Proteinextraktion

Für die Proteinextraktion wurden die Zellen in 10 cm oder in 15 cm Kulturschalen bis zu einer Konfluenz von 80 – 100 % kultiviert. Die Proteine wurden dann entsprechend folgendem Protokoll extrahiert und aufgereinigt:

1. Das Medium absaugen.
2. 5 ml kaltes PBS auf die Zellen geben und die Zellen mit einem Zellschaber abschaben, alternativ wurden die Zellen auch mit Trypsin vereinzelt.
3. Abzentrifugieren bei 1.000 rpm für 5 min.
4. Das Zellpellet mit 1 ml PBS in ein neues Röhrchen überführen und erneut bei 3.000 rpm für 5 min abzentrifugieren.
5. Das PBS abnehmen und das Zellpellet in 50 – 200 μ l RIPA-Puffer mit Proteinase- und Phosphataseinhibitoren (RIPA complete) resuspendieren.
6. Die Suspension für 30 s bei einer Amplitude von 100 sonifizieren.
7. Die Proteine für 1 h auf einem Rotor bei 4 °C extrahieren.
8. Für 15 min bei 13.500 rpm bei 4 °C abzentrifugieren.
9. Den Überstand (das Proteinlysate) abnehmen und in ein neues Röhrchen überführen.
10. Mit dem Proteinlysate auf Eis weiterarbeiten oder dieses bei - 20 °C lagern.

2.5.2 Proteinquantifizierung

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration in dem Proteinlysate wurde ein *BCA Assay* mit dem *Pierce BCA Protein assay Kit* von Thermo Fisher Scientific durchgeführt. Von jeder Proteinprobe wurden jeweils 2 Replikate gemessen. Als Konzentrationsstandard wurden bei jeder Messung Triplikate einer Proteinkonzentrations-Standard-Serie mit gemessen, die aus verschiedenen Konzentrationen von bovinem Serumalbumin in RIPA-Puffer gelöst bestand. Die Proteinquantifizierung wurde nach dem folgenden Protokoll in einer 96-well-Platte durchgeführt:

1. Pro Well 5 µl Proben oder Standardreihe vorlegen.
2. Jeweils 176,5 µl Reagent A und 3,5 µl Reagent B pro Well hinzufügen.
3. Mischen.
4. Inkubieren bei 37°C und 5 % CO₂ für 30 min.
5. Messen der Absorption bei 562nm.

2.5.3 Westernblotanalyse

Zur Visualisierung der Expression eines bestimmten Proteins wurden Westernblots durchgeführt. Diese wurden in 3 Schritten durchgeführt: Auftrennen der Proteine, Blotten und Hybridisieren.

2.5.3.1 Auftrennen der Proteine

1. Je 30 µg Protein und die entsprechende Menge (1:4) Lämmli-Puffer in ein Röhrchen pipettieren.
2. Mischung für 5 min bei 95 °C erwärmen, um die Proteine zu denaturieren.
3. Zusammenbauen der Laufkammer und Einsetzen von 4 – 12 % Bis-Tris Proteingelen.
4. Befüllen der Laufkammer mit 1x MES und spülen der Taschen.
5. Befüllen der Taschen mit je 30 µg Protein und der entsprechenden Menge Lämmli-Puffer, sowie in einer Tasche 3 µl *Prestained* Proteinmarker.
6. Eine Spannung von 80 V, später 140 V angelegen, bis die Proteine aufgetrennt sind.

2.5.3.2 Blotten

1. Nach dem Auftrennen der Proteine, die Gele aus der Laufkammer entnehmen.
2. Erstellen eines Transfer-Sandwiches: Den ersten Sandwichrahmen in eine mit Transferpuffer gefüllte Wanne legen, darauf einen Schwamm, 3 Lagen Blotting Papier, 1 Blotting Membran, das Gel, 3 Lagen Blotting Papier, einen Schwamm und den zweiten Sandwichrahmen legen. Dabei darauf achten, dass keine Luftblasen entstehen.

3. Die Sandwichhalterung in die mit Transferpuffer gefüllte Transferkammer stellen und bei 250 mA für 150 min transferieren. Auf die korrekte Orientierung des Sandwiches im elektrischen Feld achten!
4. Um die Überhitzung der Transferkammer zu verhindern wird diese in eine mit Eis befüllte Wanne gestellt.
5. Nach dem Ende des Transfers, die Transfersandwiches entnehmen und vorsichtig auseinandernehmen.
6. Um die Qualität des Transfers zu überprüfen, die Membran nach dem Blotten in einer Schale mit Ponceau S anfärben.
7. Nach Beurteilung der Banden wird dieses mit TBS-T abgewaschen.

2.5.3.3 Hybridisierung

1. Membranen in TBS-T mit 5 % Milchpulver für eine Stunde inkubieren.
2. Die Milchlösung abschütten und die Membranen 3 x 10 min mit TBS-T waschen.
3. Den primären Antikörper in eine TBS-T Lösung mit 5 % BSA verdünnen und die Membranen damit über Nacht bei 4 °C bei ständigem Schütteln hybridisieren. Die Antikörper wurden hierbei wie folgt verdünnt: AHR (Cell signaling Technology, Bestellnummer 83200), AHRR(Abcam, Bestellnummer ab108518) und ARNT (Cell signaling Technology, Bestellnummer 5537) 1:1000 und ARNT2 (Abcam, Bestellnummer ab70122) 1:500.
4. Die Lösung mit dem primären Antikörper entfernen und die Membranen erneut 3 x 10 min mit TBS-T waschen.
5. Den Sekundärantikörper (rb800, Li-COR®, Bestellnummer 926-32211) 1:10.000 in TBS-T mit 5 % Milchpulver verdünnen und auf die Membranen geben.
6. Die Membranen für 1 Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln hybridisieren.
7. Die Sekundärantikörperlösung entfernen und die Membranen 3 x 10 min mit TBS-T waschen.
8. Die Membranen mit Hilfe eines Westernblot-Imagingsystems analysieren. Hierfür wurde ein LI-COR Odyssey® DLX-Scanner (LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg) und das Programm Image Studio (LI-COR) verwendet

9. Danach die Membranen mit TBS-T und 5 % Milchpulver für eine Stunde blocken.
10. Waschen mit TBS-T 3 x 10 min.
11. Den α -Aktin-Antikörper (Sigma-Aldrich®, Bestellnummer A2066-100) 1:2000 in TBS-T mit 5 % BSA verdünnen und über Nacht bei 4 °C schütteln.
12. Die Lösung mit dem Antikörper entfernen und die Membranen 3 x 10 min mit TBS-T waschen.
13. Den Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:10000 in 10 ml TBS-T mit 5 % Milchpulver geben und eine Stunde im Dunkeln schütteln.
14. Waschen der Membranen mit TBST 3x 10 min.
15. Die Membranen mittels Westernblot-Imagingsystem analysieren (siehe 8.).

2.5.3.4 Auswertung

Für die Auswertung der Westernblots wurden die Membranen mit Hilfe des LI-COR Imaging Systems eingescannt und mit dem Programm Image Studio ausgewertet. Es wurden gleich große Rechtecke um die jeweiligen Banden gelegt, um die Signalstärke zu ermitteln. Die hieraus resultierenden Daten des Kanals „Signal 800“ wurden in *Graphpad prism* exportiert und durch eine „baseline correction“ zu den jeweiligen Aktin-Werten normalisiert.

2.6 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion aus Zellen wurde mit dem DNA Mini Kit (250) von QIAGEN (Hilden, Deutschland) wie folgt durchgeführt:

1. Zellpellet mit 1 – 2 Millionen Zellen in 200 μ l PBS resuspendieren.
2. 20 μ l Proteinase K hinzufügen und vortexen.
3. 200 μ l des Buffer LA hinzufügen und 15 s vortexen.
4. Die Mischung für 10 min bei 56 °C inkubieren.
5. Mit 200 μ l 100 % Ethanol die DNA lösen.
6. Die Mischung in eine *Spin column* füllen und für 1 Minute bei 8000 rpm zentrifugieren.
7. 500 μ l AW1 Puffer in die *Spin column* geben und für 1 Minute bei 8000 rpm zentrifugieren. Den Durchfluss verwerfen.

8. 500 µl AW2 Puffer in die *Spin column* geben und für 3 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren. Den Durchfluss verwerfen.
9. *Spin column* in neues Röhrchen geben und für 1 Minute zentrifugieren. Den Durchfluss verwerfen.
10. *Spin column* in ein neues Röhrchen geben.
11. 30 µl AE Puffer hinzugeben, für 5 Minute bei Raumtemperatur inkubieren, 1 Minute bei 8000 rpm zentrifugieren.
12. Weitere 30 µl AE Puffer hinzugeben und erneut für 2 Minuten zentrifugieren.

2.7 Erstellen von CRISPR-Cas9 Knock-outs

Die Protokolle der genmodifizierenden CRISPR-Methode basierten auf CRISPR 101: A Desktop Resource Created and Compiled by Addgene May 2017 (2nd Edition, vgl. www.addgene.org). Zunächst wurde das Plasmid pLentiguide-Puro mit dem Restriktionsenzym BsmBI (New England Biolabs, Ipswich, USA) verdaut und mittels Gelelektrophorese und dem Pure Link Gel Extraction Kit (Thermo Scientific™, Waltham, US) aufgereinigt. Mit den *Top*- und *Bottom*- Primern wurde das T4 DNA Ligase Kit von New England Biolabs, Ipswich, USA verwendet. Nach der Ligation wurden die Plasmide in DH5α *E. coli* transformiert. Aus den Bakterien wurde das Plasmid isoliert und mittels Sanger-Sequenzierung sequenziert. Nach Bestätigung der korrekten Sequenz erfolgte eine weitere Transformation von *E. coli*. Danach wurde eine Plasmidisolierung mittels Plasmid Maxi Kit (25) (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt und das Plasmid mit Hilfe von virusproduzierenden HEK-FT Zellen in Viruspartikel verpackt. Die Viren wurden dann abgenommen und die gewünschten Zellen mit den generierten Viruspartikeln infiziert.

2.7.1 Vektor-Verdau und Aufreinigung

1. Verdau des pLentiguide-Puro mit folgendem Reaktionsmix für 2 h bei 55 °C inkubieren
 - 5 µg pLentiguide-Puro
 - 3 µl BsmBI
 - 5 µl 10x Buffer
 - 32 µl H₂O

2. Je 10 µl Laufpuffer dazu geben und je 30 µl in eine große Agarose-Gel Tasche eines 1,2 % Agarosegels (Herstellung siehe **2.2**) pipettieren.
3. 180 V Spannung für 50 min anlegen.
4. Die obere Bande möglichst genau ausschneiden und in ein Reaktionsgefäß geben.
5. 1000 µl Lösungspuffer hinzufügen.
6. Das Gel bei 50 °C inkubieren und ca. alle 3 min das Reaktionsgefäß invertieren.
7. Nachdem sich das Gel aufgelöst hat, noch weitere 5 min inkubieren.
8. Das gelöste Gel in eine „*Quick-Gel-Extraction Column*“ füllen und diese in das Auffangröhrchen stellen.
9. Für 1 min bei 12.000 rpm zentrifugieren, den Durchfluss verwerfen.
10. 500 µl Waschpuffer auf die Säule geben und für 1 min bei 12.000 rpm zentrifugieren.
11. Abschließend bei maximaler Geschwindigkeit für ca. 2 min trocken zentrifugieren.
12. Die Säule in ein neues Reaktionsgefäß stellen.
13. 30 µl Puffer hinzufügen und 5 min bei Raumtemperatur inkubieren.
14. Bei 12.000 rpm für 1 min zentrifugieren.
15. Das Eluat nochmals auf die Säule pipettieren und 5 min inkubieren lassen.
16. Bei 12.000 rpm für 2 min zentrifugieren.
17. Konzentration der DNA mit dem Nanodrop-Spektrophotometer messen.
18. Die DNA bei - 20 °C lagern.

2.7.2 Primer-Annealing

Für das Binden der Primer wurde folgender Reaktions-Mix erstellt:

- 11,25 µl Primer *Top* 100 µM
- 11,25 µl Primer *Bottom* 100 µM
- 2,5 µl NEB2 Puffer

Annealing-Reaktion:

- 37 °C 1“
- 95 °C 5‘
- 70 Zyklen 95 °C 12“ ΔT -1 °C

25°C ∞

Nach dem *Annealing* wurde eine Verdünnungsreihe mit folgenden Verdünnungen erstellt: 1:400, 1:200, 1:100, 1:50.

2.7.3 Ligation

Folgender Ansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert:

- 1 µl der verdünnten Primer-*Annealing*-Reaktion
- 1 µl verdautes Plasmid (entspricht ca. 50ng)
- 1 µl 10xT4 DNA-Ligase Puffer
- 0,5 µl T4 DNA Ligase
- 6,5 µl H₂O

2.7.4 Transformation 1

1. 50 µl *E. coli* auf Eis auftauen.
2. 2 µl Ligationsansatz zu den Bakterien hinzugeben und umrühren.
3. Den Mix 30 min auf Eis inkubieren.
4. Den Mix 40 s im Wasserbad bei 41 °C erhitzen (*heat shock*).
5. Den Mix 2 min auf Eis legen.
6. 150 µl LB-Medium hinzugeben.
7. 50 min bei 37 °C bei 225 rpm inkubieren, währenddessen die Bakterienplatten im Inkubator trocknen.
8. Die Bakterien jeweils auf 2 Bakterienplatten mit LB-Agar und Ampicillin (blockiert die Zellwandsynthese) 1:1.000 ausstreichen und bei 37 °C inkubieren.
9. Die gewachsenen Kolonien einzeln picken und in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin transferieren.
10. 12 – 16 h bei 250 rpm bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubieren.
11. 15 min bei 4.000 rpm abzentrifugieren.

2.7.5 Plasmidisolation 1

Zur Plasmidisolation wurde das Plasmid Miniprep Kit I von VWR (Darmstadt, Deutschland) entsprechend folgendem Protokoll durchgeführt:

1. *Elution Buffer* auf 80 °C erhitzen.

2. Das Pellet in 250 µl *Solution I* resuspendieren und in ein Reaktionsgefäß transferieren.
3. 250 µl *Solution II* hinzufügen und vorsichtig invertieren.
4. 350 µl *Solution III* hinzufügen und vorsichtig invertieren.
5. 10 min mit 13.500 rpm bei Raumtemperatur zentrifugieren.
6. Säule mit dem Lysat befüllen.
7. 1 min bei 13.500 rpm zentrifugieren.
8. 500 µl Plasmid Buffer hinzufügen und 1 min mit 13.500 rpm zentrifugieren.
9. 750 µl DNA *Wash Buffer* hinzufügen und 1 min mit 13.500 rpm zentrifugieren.
10. Trocken zentrifugieren für 2 min mit 13.500 rpm.
11. Säule in ein neues Reaktionsgefäß stellen und 50 µl des erwärmten *Elution Buffer* auf die Säule geben.
12. Zentrifugieren für 1 min mit 13.500 rpm.

Zum Test, ob die gewünschte sgRNA in den Vektor kloniert wurde, wurde ein Verdau mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *PvuII* durchgeführt. Anhand der entstandenen Fragmente lässt sich mit Hilfe einer Gelelektrophorese sehen, ob die Ligation funktioniert hat. Hierfür wurden 2 µl 10x Puffer, 0,5 µl Enzym, 14,5 µl H₂O und 3 µl DNA bei 37 °C für 2h inkubiert. Anschließend wurde der Verdau auf ein 0,8 % Agarose-Gel aufgetragen und bei 170 V zweimal 20 min laufen gelassen.

Die Proben, die die gewünschten Fragmente in der Gelelektrophorese aufgewiesen haben, wurden dann mit Hilfe einer Sanger-Sequenzierung validiert. Hier kann der in den vorherigen Schritten erstellte Primer in der extrahierten DNA nachgewiesen werden. Es wurden 500 ng der Probe mit Wasser (ad 6 µl) und 1 µl 10 µM U6 Primer gemischt. Die Sanger-Sequenzierungen wurden von StarSeq GmbH (Ort, Land) durchgeführt.

2.7.6 Transformation 2

Die zweite Transformation wurde analog zur ersten Transformation (siehe **2.5.4**) durchgeführt, doch statt 50 µl Outgrowth Medium wurde LB-Medium verwendet. Die Proben wurden dann in 100 ml LB-Medium mit Ampicillin 1:1000 über Nacht bei 225 rpm und bei 37 °C inkubiert.

2.7.7 Plasmidisolierung 2

Um das Plasmid der zweiten Transformation zu isolieren, wurde eine Plasmidisolierung mit Hilfe des QIAGEN Plasmid Maxi Kit (25) durchgeführt:

1. Das Bakterienpellet in 10 ml P1-Puffer resuspendieren.
2. 10 ml P2-Puffer hinzufügen, invertieren und 5 min bei Raumtemperatur inkubieren.
3. 10 ml gekühlten P3-Puffer durch invertieren mit der Lösung vermischen und 20 min auf Eis inkubieren.
4. Für 30 min bei 4.000 rpm und 4 °C abzentrifugieren und den Überstand erneut für 15 min bei 4 °C zentrifugieren.
5. QIAGEN Tip 500-Säule mit 15 ml QBT equilibrieren.
6. Den Überstand von Schritt 5 auf die Säule geben und durchlaufen lassen
7. Die Säule 2-mal mit je 30 ml Waschpuffer waschen.
8. Die DNA in 15 ml QF Puffer in ein 50 ml Falcon-Röhrchen eluieren.
9. Das Eluat mit 10,5 ml Isopropanol versetzen und invertieren und bei 4 °C und 4.000 rpm für 30 min zentrifugieren.
10. Das DNA-Pellet mit 5 ml 70 % Ethanol waschen und bei 4.000 rpm für 10 min bei 4 °C zentrifugieren.
11. Das Pellet ca. 20 min trocknen lassen und in 300 – 500 µl TE-Buffer lösen
12. Die Plasmidlösung bei - 20 °C aufbewahren.

2.7.8 Produktion von Lentiviren

Für die Produktion von Lentiviren wurden HEK-FT Zellen benutzt. Die Schritte 4.- 6. wurden freundlicherweise von Frau Jana Ettlinger durchgeführt.

1. Die HEK 293-FT Zellen zunächst für 3 Tage in DMEM-Medium mit 10 % FCS und 1 % Penicillin-Streptomycin kultivieren, danach in DMEM-Medium mit 10 % FCS, 1 % Penicillin-Streptomycin und 0,1 % Geneticin weiter kultivieren.
2. Einen Tag bevor die Plasmide auf die Zellen gegeben werden, 6 Millionen Zellen in mittleren Zellkulturflaschen ausplattieren und in DMEM mit 10 % FCS und 1 % Penicillin-Streptomycin kultivieren.
3. Am nächsten Tag das Medium durch OptiMem ersetzen.

4. Jeweils 21 µg Plasmid mit 10 µg pVSVg, 15 µg psPAX2 mit OptiMem und PEI in einem Reaktionsgefäß mischen, 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren und dann auf die HEK 293-FT Zellen geben.
5. Am nächsten Tag das Medium wechseln und die Zellen weiter in DMEM mit FCS kultivieren.
6. Nach insgesamt 3 Tagen die Virussuspension abnehmen, durch einen Filter mit 0,45 µm Porengröße geben und einfrieren.

2.7.9 Infektion der Zielzellen

Cas9-exprimierende Zellen wurden mit den Viruspartikeln transduziert. Um als Zielzellen für die Geneditierung mit dem CRISPR-Cas System zu dienen, wurden zuvor in die Zelllinien T98G und LN229 verschiedene Cas 9-Plasmide kloniert. Hierbei wurde entweder ein Plasmid für ein Cas 9-Protein (Blast) oder Fusionsproteine mit Blue fluorescent protein (BFP), Green fluorescent protein (GFP) oder T2A-Green fluorescent protein (TG) verwendet. Die Schritte 2.-3. Wurden freundlicherweise von Frau Jana Ettliger durchgeführt.

1. Je 500.000 Zellen der gewünschten Zelllinie in einer kleinen Zellkulturflasche aussäen.
2. Am nächsten Tag diese mit 1 ml Virussuspension infizieren.
3. Die Virussuspension am folgenden Tag abnehmen.
4. Am Tag darauf die Zellen mit 0,5 ml Trypsin ablösen und 4,5 ml Medium zugeben.
5. Die gewünschte Menge Zellen auf einer 15 cm Zellkulturschale ausplattieren.
 - a. Für die LN229 Cas9-GFP wurde hierbei 1 ml verwendet, bei den Zellen LN229 Cas9-Blast, LN229 Cas9-BFP, LN229 Cas9-TG, T98G Cas9-Blast, T98G Cas9-BFP und T98G Cas9-TG wurden nur 0,5 ml verwendet.
6. Die Zellen zunächst in Medium mit Puromycin kultivieren, nach 2 – 4 Tagen Doppelselektionsmedium mit Puromycin (1,4 µg/ 100 ml) und Blastidin (11 µg / 100 ml) verwenden.

2.7.10 Test der sgRNAs

Um herauszufinden welche der in Schritt 8 klonierten sgRNAs den besten *Knock-out* ermöglichen wurden LN229 Cas9-GFP Zellen mit den Viruspartikeln der

verschiedenen sgRNAs transduziert. Von den Zellen wurden RNA (siehe **2.4**) und Protein (siehe **2.5**) extrahiert und mittels *Realtime*-PCR und Westernblot der *Knock-out* untersucht.

2.7.11 Selektion der Zellen

Nach der Infektion der Zellen (siehe **2.7.9**) wurden einzelne Zellklone in 10 cm Zellkulturschalen kultiviert und die Kolonien möglichst einzeln geerntet.

1. Wenn einzelne Zellkolonien gewachsen sind, diese auf der Schale mit einem Stift markieren.
2. Das Medium absaugen und 12 ml PBS auf die Schale geben.
3. Mit einer Pipettenspitze vorsichtig die Zellen an der markierten Stelle abkratzen und dabei 100 µl PBS mit den abgekratzten Zellen mit Hilfe der Pipette aufnehmen.
4. Das PBS in 0,5 ml Trypsin in einer 12-Well-Platte geben, sodass sich die Zellen lösen.
5. Je 1 ml Doppelselektionsmedium hinzugeben.
6. Alle 4 – 5 Tage das Medium wechseln.
7. Wenn die Zellen subkonfluent werden, werden sie mit 0,5 ml Trypsin geerntet und in einer 10 cm Schale ausplattiert.

2.7.12 Nachweis der Mutation

Um die Effizienz des *Knock-outs* in den Klonen zu bestimmen, wurde von jedem Klon RNA extrahiert und eine *Realtime-PCR* für das gewünschte Gen durchgeführt (siehe **2.4**), sowie Proteine extrahiert und ein Westernblot (siehe **2.5**) durchgeführt. Zusätzlich wurde mittels Sanger-Sequenzierung die Mutation auf genomischer Ebene nachgewiesen. Für Letzteres wurde zunächst die DNA der Zellen extrahiert (siehe **2.6**) und auf 100 ng/10 ml verdünnt. Mit den verdünnten Proben wurde eine Polymerase-Ketten-Reaktion wie folgt pipettiert:

PCR-Ansatz:

2 µl	10x Buffer
0,5 µl	10 mM dNTP's
0,5 µl	MgCl ₂
0,1 µl	Taq HST

0,5 µl	Forward Primer 10µM
0,5 µl	Reverse Primer 10 µM
13,9 µl	H ₂ O
2 µl	DNA

PCR-Protokoll:

	95 °C	15'	Denaturierung
	95 °C	30"	Denaturierung
Anzahl Zyklen 36	58 °C	30"	Annealing
	72 °C	1'	Elongation
	72 °C	5'	Elongation
	10 °C	∞	Kühlung

Die PCR-Produkte wurden mit 5 µl Laufpuffer auf ein 1,5 % – 1,8 % Agarosegel aufgetragen und bei 180 µl für 30 min laufen gelassen. Die Banden wurden ausgeschnitten und mit Hilfe des Pure Link Quick Gel Extraktion Kit von Thermo Scientific aufgereinigt (siehe 2.7.1). Die aufgereinigte DNA wurde dann mittels Sanger-Sequenzierung analysiert. Hierfür wurden je 60ng DNA in 6µl Wasser mit 1 µl Primer (Hs-ARNT-sgRNA5-Seq F oder Hs-ARNT-sgRNA5-Seq R) verwendet. Wenn die Genmodifikation erfolgreich war, konnte das Gen in der Sanger-Sequenzierung nicht nachgewiesen werden. Mit drei Klonen, in denen der *Knock-out* auf RNA und Proteinebene nachgewiesen werden konnte und die Mutation auf DNA-Ebene validiert wurde, wurden dann die verschiedenen funktionellen Tests durchgeführt.

2.8 Wachstumsanalyse

Das Wachstum von Zellen in Kultur wird in 4 Phasen eingeteilt: Die *lag*-Phase, in der sich die Zellen an die Kulturbedingungen gewöhnen, die *log*-Phase, in der es zu einem exponentiellen Wachstum kommt, die stationäre Phase, in der die Zellen durch limitierte Menge von Nährstoffen und fehlenden Raum aufhören zu proliferieren und die Absterbephase. Um das Zellwachstum von Zellen zu vergleichen, ist es möglich die Verdopplungszeit, also die Zeit zwischen 2 Zellteilungen zu berechnen. Diese Untersuchung wurde nach dem folgenden Protokoll durchgeführt:

1. Die kultivierten Zellen ernten und zählen.

2. 600.000 Zellen in 6 ml Medium geben.
3. Pro Zelllinie je 1 ml der Zellsuspension in vier 10 cm Kulturschalen aussäen
4. An Tag 3, 6, 9 und 12 die Zellen unter dem Mikroskop fotografieren.
5. Zellen in 2 ml Trypsin und 8 ml Medium ernten und bei 1000 rpm für 5 min abzentrifugieren.
6. Überstand abnehmen und das Pellet in 1 ml resuspendieren.
 - a. Da die Zellzahl an den Tagen 9 und 12 für den Zellzähler zu hoch ist, an den Tagen 9 und 12 die Zellen in 10 ml aufnehmen und davon 1 ml zum Zählen verwenden.
7. Zellen zählen.
8. An den Tagen 6 und 9 zusätzlich das Medium wechseln.

Die Wachstumskurven und die Verdopplungszeit wurden aus der Zellzahl der Tage 3 bis 9 mit GraphPad Prism unter den folgenden Bedingungen errechnet: „*Nonlinear regression analysis*“ mit der Methode „*exponential growth equation*“.

2.9 Colony Formation Assay

Ein *Colony Formation Assay* ist eine vielfach genutzte Methode, um die Fähigkeit einer Zelle sich klonal zu vermehren, d.h. aus einer Zelle eine Kolonie zu bilden, zu bestimmen.

1. Pro Zelllinie 1.000 bzw. 500 Zellen in Duplikaten auf 6-Well-Platten aussäen.
2. 12 Tage lang bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubieren, alle 3 – 4 Tage das Medium wechseln.
3. Nach 12 Tagen das Medium absaugen.
4. Die Kolonien mit jeweils 2 ml Kristallviolett 1 Stunde färben.
5. Farbe abschütten.
6. Platten in Leitungswasser ausgiebig waschen.
7. Die Schalen bis zum nächsten Tag trocknen lassen.
8. Im LI-COR Imaging System einscannen.
9. Das Kristallviolett in 10 %iger Essigsäure lösen.
10. Von der Kristallviolett-Essigsäure je 200 µl auf eine 96-Well-Platte pipettieren.
11. Absorption bei 590 nm messen.

Die Auswertung wurde mit der Bildbearbeitungssoftware ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) unter den folgenden Bedingungen durchgeführt: „*Make binary*“, „*waterhed*“, „*Analyze particles: With size 1 pixel to infinity and circularity 0,1-1-0*“. Daraus errechnet sich die Menge der gezählten Kolonien.

2.10 MTT-Assay

Der 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Assay ist eine etablierte Methode, um die Zellviabilität zu evaluieren und um zytotoxische Effekte einer Substanz zu quantifizieren. Die Methode basiert auf der Fähigkeit von lebenden Zellen, das gelbe MTT zu dem lilafarbenden Formazan zu reduzieren.

Für das Erstellen von Dosis-Wirkungskurven mit Temozolomid wurden die Zellen über 8 Tage mit verschiedenen Konzentrationen Temozolomid inkubiert und nach ca. 24 Stunden mittels MTT der Anteil lebender Zellen gemessen.

1. Je 250.000 Zellen in 21 ml Medium geben.
2. Je 100 µl der Zellsuspension mit ca. 1.200 Zellen auf eine 96-Well-Platte pipettieren, pro Zelllinie werden Zellen in jeweils 3 Replikaten pro Konzentration verwendet.
3. Je 100 µl DMEM mit FCS und Penicillin-Streptomycin dazugeben.
4. Am nächsten Tag das Medium absaugen und in DMEM mit PS und FCS gelöstes Temozolomid in verschiedenen Verdünnungen dazugeben
 - a. Es wurden hierbei 0 µM, 25 µM, 100 µM, 200 µM, 400 µM, 800 µM oder 1.000 µM Temozolomid auf die Zellen gegeben.
5. Als Negativkontrolle in die leeren Wells auf der Platte 100 µl Medium geben.
6. Je 10 µl MTT in jedes Well geben, ab diesem Schritt im Dunkeln arbeiten.
7. Die Zellen 2 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ im Dunkeln inkubieren.
8. Je 100 µl MTT-solvent in jedes Well geben und über Nacht im Dunkeln schütteln.
9. Am nächsten Tag im PARADIGM™ (Plate reader) von BECKMAN COULTER®, (Brea, USA) bei einer Wellenlänge von 570 nm zu der Referenz von 650 nm die Absorption messen.

Für die statistische Auswertung wurden die bei 650 nm gemessenen Referenzwerte von den bei 570 nm gemessenen Werten abgezogen. Davon wurden die Mittelwerte

der Wells nur mit Medium abgezogen. Es folgte eine Normalisierung auf die unbehandelte Kontrolle. Dann wurden normalisierte *Dose-response*-Kurven mit GraphPad Prism unter den folgenden Bedingungen erstellt: "Nonlinear regression analysis" mit der Methode "*log(inhibitor) vs. normalized response*" und der Anpassungsmethode "*Least squares fit*". Daraus wird eine Dosis-Wirkungskurve ermittelt und der IC₅₀-Wert der verwendeten Substanz errechnet.

2.11 Funktionelle Validierung der CRISPR-Cas9 *Knock-outs*

Das Molekül 3-Indoxyl-Sulfat-Kaliumsalz (3-ISP) ist ein potenter AHR-Agonist, mit dem sich in Leberzellen AHR-Zielgene induzieren lassen. Die Gliomzelllinien und HEK293-Zellen wurden zunächst wie beschrieben kultiviert (siehe 2.2 Zellkultur), während die HepG2-Zellen in RPMI1640 mit 10 % FCS und 1 % Penicillin-Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert wurden. Zum Einfrieren der HepG2 Zellen wurde RPMI1640 mit 5 % DMSO verwendet. Um herauszufinden, wie sich Gliomzelllinien mit und ohne ARNT gegenüber 3-ISP verhalten, wurden die Gliomzelllinien und die HepG2-Zellen 6h mit 3-ISP oder DMOG nach u.g. Protokoll behandelt.

Die Zellen wurden mit der Substanz wie folgt behandelt:

1. Je 700.000 Zellen der gewünschten Zelllinie auf einer 6-Well-Platte aussäen.
2. Am nächsten Tag jeweils 0 µM, 10 µM, 100 µM, oder 1000 µM 3-Indoxyl-Sulfate-Kaliumsalz (3-ISP) oder 0 µM, 10 µM, 100 µM, oder 1000 µM DMOG hinzugeben.
3. 6 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubieren.
4. Medium abnehmen.
5. Zellen in Trizol lysieren, um die RNA zu extrahieren (siehe 2.4 RNA-Extraktion).
6. Umschreiben der RNA in cDNA (siehe 2.4 Herstellung von cDNA).
7. cDNA mittels Realtime-PCR nachweisen (siehe 2.4.8 Realtime-PCR).

Für die *Realtime*-PCR wurde folgender PCR-Mix verwendet:

Gen	Forward Primer	Reverse Primer	SYBR Green	Rox	cDNA	H ₂ O
AHR	0,6 µl	0,6 µl	10 µl	0,5 µl	3 µl	5,3 µl
AHRR	0,6 µl	0,1 µl	10 µl	0,5 µl	3 µl	5,8 µl

<i>ARNT</i>	0,6 µl	0,6 µl	10 µl	0,5 µl	3 µl	5,3 µl
<i>ARNT2</i>	0,6 µl	0,6 µl	10 µl	0,5 µl	3 µl	5,3 µl
<i>ARF1</i>	0,6 µl	0,6 µl	10 µl	0,5 µl	3 µl	5,3 µl
<i>CYP1A1</i>	0,1 µl	0,1 µl	10 µl	0,4 µl	3 µl	6,4 µl
<i>CYP1B1</i>	0,1 µl	0,1 µl	10 µl	0,4 µl	3 µl	6,4 µl
<i>NFE2L2</i>	0,1 µl	0,1 µl	10 µl	0,4 µl	3 µl	6,4 µl
<i>NQO1</i>	0,1 µl	0,1 µl	10 µl	0,4 µl	3 µl	6,4 µl
<i>POLk</i>	0,1 µl	0,6 µl	10 µl	0,4 µl	3 µl	5,9 µl
<i>ARF1</i>	0,1 µl	0,1 µl	10 µl	0,4 µl	3 µl	6,4 µl
<i>EGLN</i>	0,6 µl	0,6 µl	10 µl	0,4 µl	2 µl	6,4 µl
<i>HK2</i>	0,6 µl	0,6 µl	10 µl	0,4 µl	2 µl	6,4 µl
<i>LDHA</i>	0,6 µl	0,6 µl	10 µl	0,4 µl	2 µl	6,4 µl
<i>PDK1</i>	1,8 µl	1,8 µl	10 µl	0,4 µl	2 µl	4,0 µl
<i>SLC2A1</i>	1,8 µl	1,8 µl	10 µl	0,4 µl	2 µl	4,0 µl
<i>ARF1</i>	0,6 µl	0,6 µl	10 µl	0,4 µl	2 µl	6,4 µl

2.12 Korrelationsanalysen

Für die bioinformatischen Analysen wurden Daten aus dem cBioPortal for Cancer Genomics (<https://www.cbioportal.org/>) am 13.09.2022 heruntergeladen. Es wurden ausschließlich Daten von Glioblastomen aus der im Jahre 2013 erschienen Studie von Brennan et al. verwendet [43]. Für die mRNA-Expressionsanalysen wurde der zScore gewählt. Das Ziel der zScore-Normalisierung von mRNA-Expressionswerten dient dazu, dass auch Gene mit deutlich unterschiedlichen Expressionsniveaus gegeneinander untersucht werden können. Der zScore ist von der jeweils verwendeten Serie von mRNAs abhängig, da ein einzelner Tumor nur Werte im Kontext zu den anderen Tumoren erhält [44]. Die Analyse der Daten wurde freundlicherweise von Frau Dr. Christiane Knobbe-Thomsen durchgeführt.

2.12.1 Korrelation der *ARNT*-mRNA-Expression mit der mRNA-Expression verschiedener Gene

Unter Verwendung von R (Open source: <https://cran.r-project.org/mirrors.html>), RStudio (Posit PBC, Boston, USA) und GraphPadPrism (GraphPad, San Diego, USA) wurden die zScore-normalisierten Expressionswerte der *ARNT*-mRNA in Korrelation

zur mRNA-Expression verschiedener anderer Gene analysiert. Hierbei wurden insbesondere Gene untersucht, die in mehr oder weniger direktem Zusammenhang zur Aktivität des AHR- sowie des HIF1 α -Signaltransduktionsweges stehen. Es wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet (r) sowie das Quadrat des Korrelationskoeffizienten (R^2) und der p-Wert der Korrelation.

2.12.2 Korrelation der *ARNT*-mRNA-Expression mit dem *MGMT*-

Promotormethylierungsstatus

Für die Auswertungen wurden Glioblastome verwendet, für die der *MGMT*-Promotormethylierungsstatus als „methyliert“ („methylated“) oder „nicht methyliert“ („unmethylated“) bekannt war. Unter Verwendung von R, RStudio und GraphPadPrism wurden die zScore-normalisierten Expressionswerte der *ARNT*-mRNA in einem Boxplot-Diagramm gegen den *MGMT*-Promotormethylierungsstatus aufgetragen.

3. Ergebnisse

3.1 Die Expression von Genen des AHR-Komplexes in Glioblastomzelllinien auf mRNA- und Proteinebene

Mittels semiquantitativer *Realtime* RT-PCR wurde die mRNA-Expression der Gene *AHR*, *AHRR*, *ARNT* und *ARNT2* semi-quantitativ in den Glioblastomzelllinien A172, LN18, LN229, SNB19, T98G, TP365MG und U87MG sowie der HEK293-Zelllinie untersucht. Zum Vergleich wurde ebenfalls Proben aus nicht-neoplastischem Hirngewebe verwendet (non-neoplastic brain = NB). Die Ergebnisse sind in **Abbildung 3** dargestellt und lassen sich folgendermaßen zusammenfassen: Das Gen *AHR* wurde in der Zelllinie A172 nicht bzw. in der Zelllinie SNB19 nur sehr niedrig mit einer relativen Expression (RE) im Vergleich zu nicht-neoplastischem Hirngewebe von 0.01 exprimiert. Im Gegensatz dazu exprimierte die Zelllinie T98G *AHR* höher (RE = 3,1) als nicht-neoplastisches Hirngewebe. Die im Vergleich zum nicht-neoplastischem Hirngewebe erhöhte mRNA-Expression in T98G war statistisch signifikant ($p = 0,0026$) (**Abbildung 3A**). Während *AHRR* im nicht-neoplastischem Hirngewebe nur gering exprimiert wurde, war die Expression in den Zelllinien LN229 (RE = 70,8) und T98G (RE = 80,8) im Vergleich besonders hoch (**Abbildung 3B**). Die mRNA-Expression von *AHRR* in LN229 und T98G war mit $p = < 0,0001$ statistisch signifikant erhöht. Hingegen war die Expression von *AHRR* in den Zelllinien A172, LN18, SNB19 und U87MG niedriger als in nicht-neoplastischem Hirngewebe (**Abbildung 3B**). *ARNT* zeigte sich in den Zelllinien LN229 (RE = 1,9) und TP365MG (RE = 1,5) signifikant höher exprimiert als in nicht-neoplastischem Hirngewebe (LN229; $p < 0,0001$; TP365MG, $p = 0,0041$). In den Gliomzelllinien A172, LN18, SNB19 und U87MG war die Expression von *ARNT* mRNA im Vergleich zu nicht-neoplastischem Hirngewebe signifikant niedriger (A172 $p = 0,0093$; LN18 $p = 0,0003$; SNB19 $p = 0,0002$; U87MG $p < 0,0001$). T98G wies eine ähnliche mRNA-Expression wie nicht-neoplastisches Hirngewebe auf (RE = 0,9) (**Abbildung 3C**). Die mRNA-Expression von *ARNT2* war in den meisten getesteten Glioblastomzelllinien im Vergleich zum nicht-neoplastischen Hirngewebe erniedrigt. Am geringsten ausgeprägt war das Expressionslevel in den Zelllinien A172 (RE = 0,01), SNB19 (RE = 0,02) und U87MG (RE = 0,006). Die *ARNT2*-Expression war in der Zelllinie T98G fast genauso hoch wie in nicht-neoplastischem Hirngewebe (RE = 0,97) (**Abbildung 3D**).

Mittels Westernblot-Analyse ließ sich die heterogene Expression der verschiedenen Proteine bestätigen (**Abbildung 3E**). Es wurde ersichtlich, dass in der Zelllinie A172 die Proteine AHR, ARNT und ARNT2 nicht oder nur sehr schwach exprimiert werden. In der Zelllinie SNB19 lies sich ebenfalls kein AHR-Protein nachweisen. Im Vergleich zu der Zelllinie HEK293 war die AHR-Expression in allen 7 Gliomzelllinien erhöht. Die Proteinexpression von ARNT und ARNT2 war im Vergleich zur HEK293-Zelllinie ähnlich hoch oder erniedrigt. Die Proteinexpression von AHRR konnte aufgrund mangelnder Spezifität des verfügbaren Antikörpers nicht quantifiziert werden.

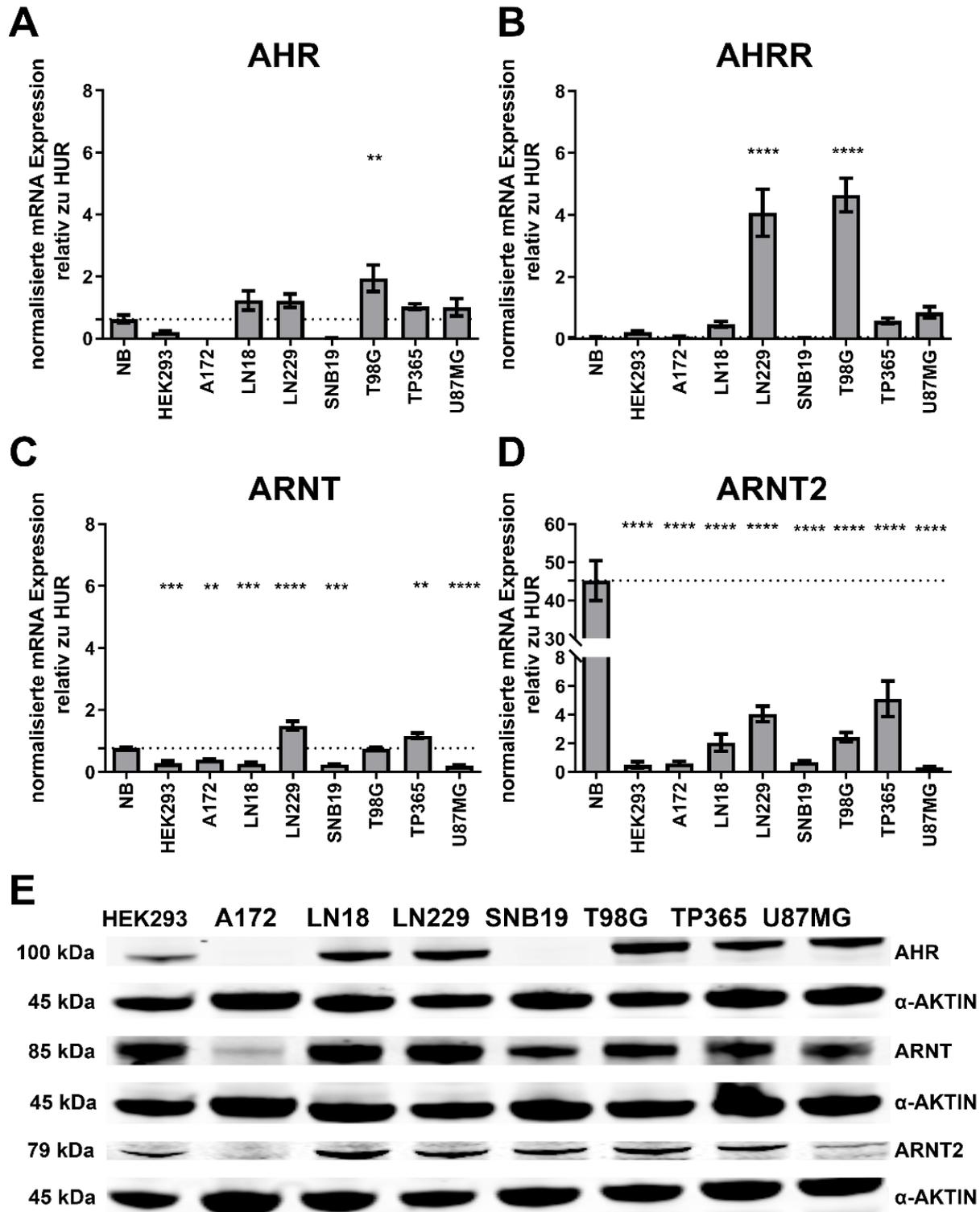


Abbildung 3: Die mRNA-Expression der Gene (A) *AHR*, (B) *AHRR*, (C) *ARNT*, (D) *ARNT2* wurde in 7 Gliomzelllinien und HEK293-Zellen mittels Realtime-RT-PCR nachgewiesen. Dargestellt werden die Mittelwerte \pm SEM von vier unabhängig durchgeführten Experimenten, normalisiert zur Human Universal Reference (HUR) =1. Die Ergebnisse der PCR wurden mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode analysiert und mit Hilfe eines One-way-ANOVA Tests, gefolgt von einem Dunnett's multiple comparison Test, statistisch ausgewertet. NB, nicht-neoplastisches Hirngewebe. (E) Repräsentative Westernblots der Proteinexpression der einzelnen Proteine in den 8 Zelllinien.

3.2 Die Assoziation der Expression von *ARNT* und *ARNT*-abhängiger Gene in Glioblastomen

Unter Verwendung öffentlich zugänglicher RNA-Seq-Daten wurden die mRNA-Expression verschiedener Gene miteinander korreliert (**Abbildung 4**), die statistische Analyse mittels Pearson Korrelation ist in **Tabelle 9** dargestellt. Hierbei zeigte sich, dass die Expression verschiedener Komponenten der Transkriptionsfaktorkomplexe, die in Beziehung mit *ARNT* stehen, positiv mit der mRNA-Expression von *ARNT* korreliert waren. Interessanterweise zeigte sich auch eine positive Assoziation zwischen der mRNA-Expression von *ARNT* und *MGMT*, wenn auch nur relativ schwach ausgeprägt.

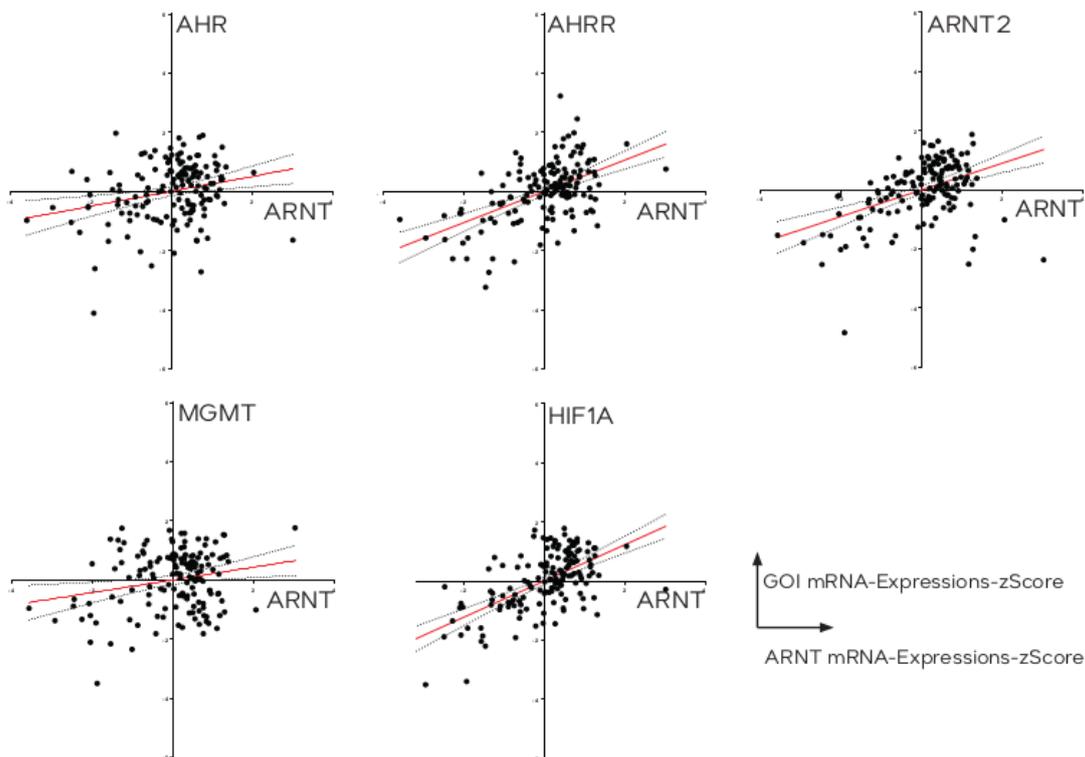


Abbildung 4: Dargestellt wird die Korrelation der zScores zwischen der mRNA-Expression von *ARNT* auf der einen Seite und *AHR*, *AHRR*, *ARNT2*, *MGMT* und *HIF1A* auf der anderen Seite. Der Maßstab der Achsen ist für alle Korrelationen identisch.

Gene of interest	R ²	r	p-Wert
<i>AHR</i>	0,0628	0,2506	0,0018
<i>AHRR</i>	0,2803	0,5295	< 0,0001
<i>ARNT2</i>	0,2023	0,4497	< 0,0001
<i>MGMT</i>	0,0461	0,2146	0,0079
<i>HIF1A</i>	0,0628	0,3763	< 0,0001

Tabelle 9: Statistische Werte der Korrelationen zwischen der mRNA-Expression von *ARNT* und den verschiedenen anderen

untersuchten Genen (Pearson's Korrelation).

Weiterhin wurde die mRNA-Expression von *ARNT* mit der mRNA-Expression von bekannten HIF1- α Zielgenen untersucht (**Abbildung 5**). Die entsprechende statistische Analyse wird in **Tabelle 10** dargestellt. Die höchste Korrelation fand sich zwischen der mRNA-Expression von *ARNT* und *EGLN1* ($r = 0,7$) sowie zwischen *ARNT* und *HK2* ($r = 0,6$). Geringer korrelierten die Expression von *ARNT* und *LDHA* ($r = 0,4$).

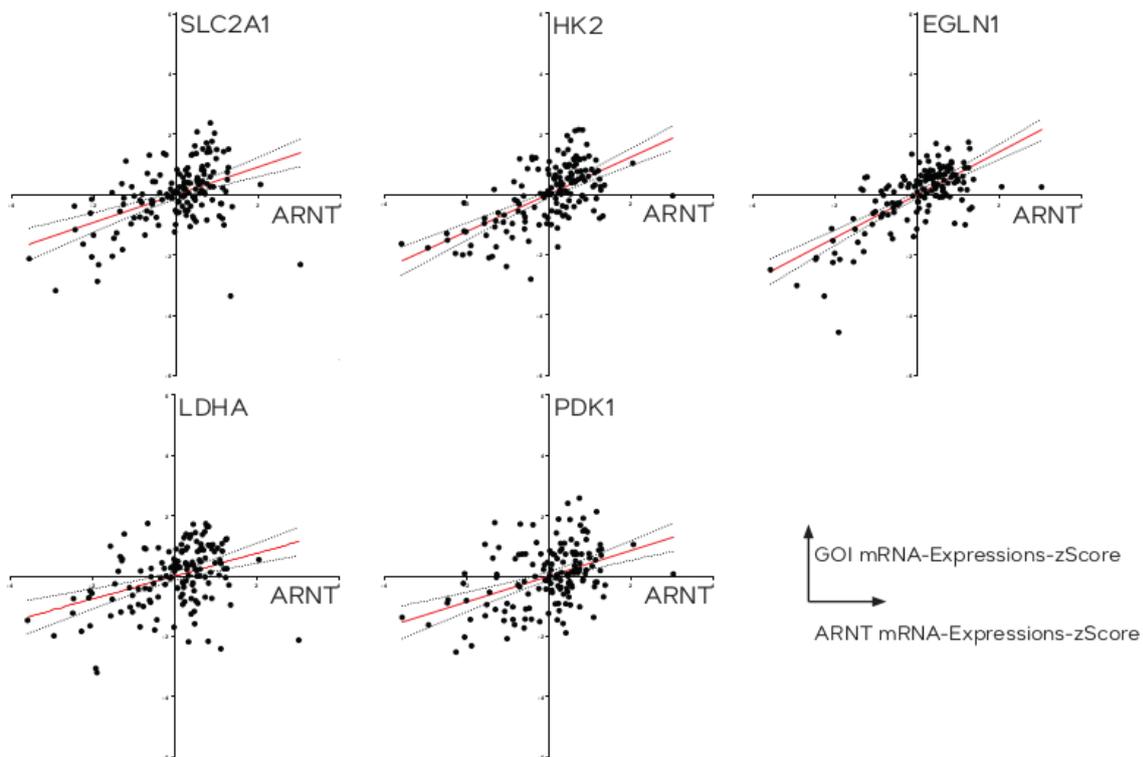


Abbildung 5: Dargestellt wird die Korrelation der zScores zwischen *ARNT* auf der einen Seite und *SLC2A1*, *HK2*, *EGLN1*, *LDHA* und *PDK1* auf der anderen Seite. Der Maßstab der Achsen ist für alle Genen identisch.

Gene of interest	R²	r	p-Wert
<i>SLC2A1</i>	0,2101	0,4584	< 0,0001
<i>HK2</i>	0,3806	0,6169	< 0,0001
<i>EGLN1</i>	0,5062	0,7115	< 0,0001
<i>LDHA</i>	0,1431	0,3783	< 0,0001
<i>PDK1</i>	0,1820	0,4266	< 0,0001

Tabelle 10: Statistische Werte der Korrelationen der Expression von *ARNT* und den verschiedenen anderen Genen (Pearson's Korrelation).

3.3 Die Expression von *ARNT* in Relation zum Methylierungsstatus des *MGMT*-Promotors in Gliomen

In einer weiteren statistischen Analyse wurde untersucht, ob möglicherweise ein Zusammenhang zwischen der mRNA-Expression von *ARNT* und dem *MGMT*-Promotormethylierungsstatus in IDH-Wildtyp Glioblastomen besteht, zumal sich eine leichte Korrelation der mRNA-Expression von *ARNT* und *MGMT* gezeigt hatte (**Abbildung 4**). Hierbei zeigte sich jedoch kein Zusammenhang: der mediane z-Score der *MGMT*-Promotor-methylierten Tumoren betrug $0,07381 \pm 0,1256$, der der *MGMT*-Promotor-unmethylierten Tumoren $-0,02596 \pm 0,1324$ (SD) (**Abbildung 6**). Auch zeigt sich eine große Streuung der Werte ($p = 0,5906$, ungepaarter T-test mit Welch's Korrektur).

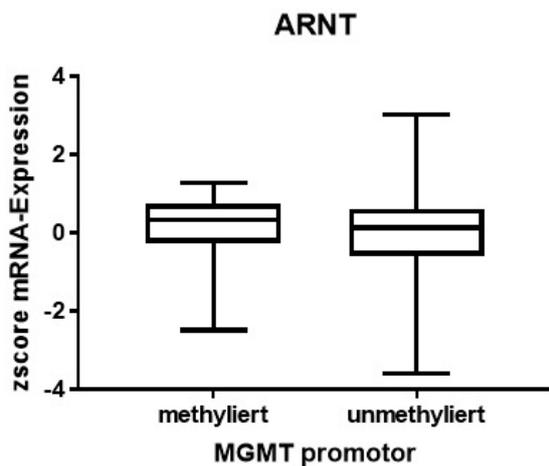


Abbildung 6: Dargestellt wird der z-Score der mRNA-Expression von *ARNT* in 55 Glioblastomen mit methyliertem *MGMT*-Promotor, und 66 Glioblastomen mit unmethyliertem *MGMT*-Promotor (Daten heruntergeladen von cBioPortal am 13.09.2022).

3.4 Herstellung von *ARNT*-Knock-out-Klonen der Zelllinien T98G und LN229

Um die Relevanz des Gens *ARNT* für die Pathophysiologie und die Temozolomid-Sensitivität von Gliomzellen zu beurteilen, wurden mit Hilfe des genmodifizierenden Systems CRISPR-Cas9 stabile *ARNT*-Knock-out Klone dieser beiden Glioblastomzelllinien erstellt. Da die mRNA-Expression von *AHR*, *AHRR* und *ARNT* in LN229 im Vergleich zum nicht-neoplastischem Hirngewebe höher war, wurden diese Zelllinien ausgewählt, um einen stabilen CRISPR-Cas9 *Knock-out* zu erzielen. Als weitere Zelllinie wurde T98G ausgewählt, die eine hohe mRNA-Expression von *AHR* und *AHRR*, sowie eine mit nicht-neoplastischem Hirngewebe vergleichbare mRNA Expression von *ARNT* aufwies (siehe 3.1).

Zunächst wurden 36 Zellklone pro Zelllinie erstellt, wobei in jeder Zelllinie 3 Klone ausgewählt wurden, in denen der *Knock-out* mit höchster Effizienz vorlag. Der *Knock-out* wurde auf mRNA- und Proteinebene anhand von 2 Replikaten von jeweils 3 Zellklonen nachgewiesen. Die mRNA-Expression und Proteinexpression von *ARNT* sind in **Abbildung 7** dargestellt.

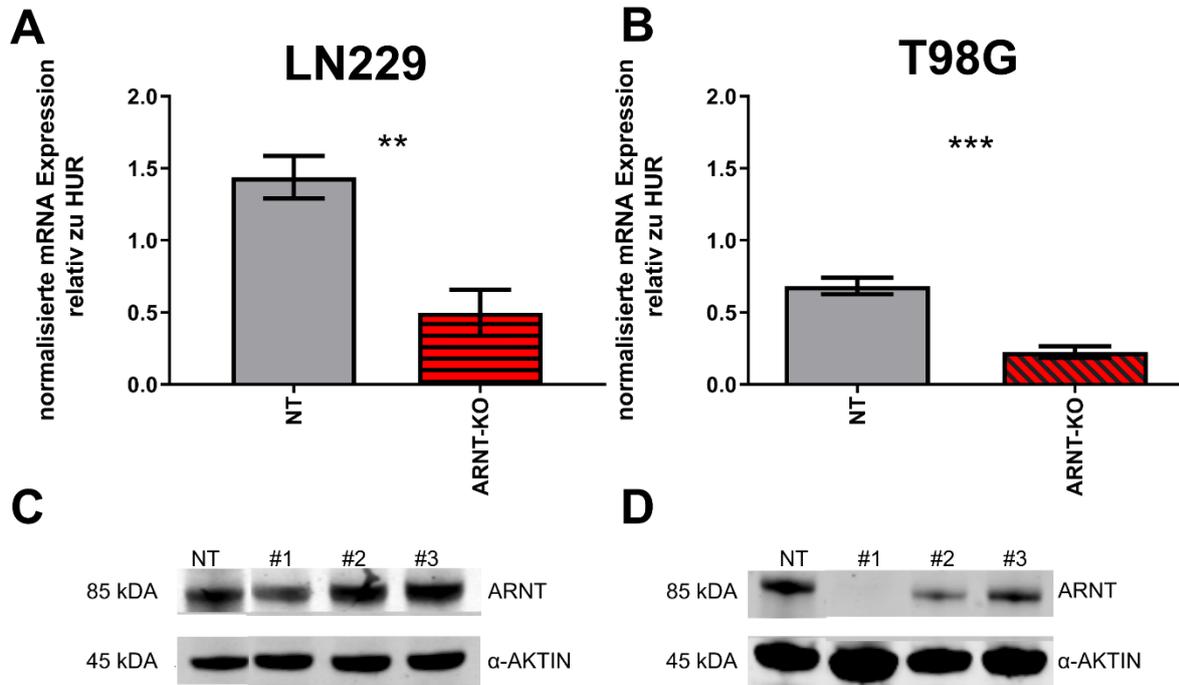


Abbildung 7: Dargestellt ist die mRNA-Expression von *ARNT* in der Non-target Kontrolle (NT) im Vergleich zum *ARNT-Knock-out* (KO) in den Zelllinien **(A)** LN229 und **(B)** T98G. Die mRNA-Expression wurde mittels semiquantitativer Realtime-RT-PCR in zwei unabhängig durchgeführten Experimenten nachgewiesen. Abgebildet wird jeweils der Mittelwert \pm SEM. Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe eines ungepaarten T-Tests und einer Korrektur nach Welch durchgeführt. **(C)** und **(D)** zeigen repräsentative Westernblots zur Expression von *ARNT* auf Proteinebene in der Non-target Kontrolle (NT) und drei verschiedenen Knock-out-Klonen der Zelllinien LN229 (C) und T98G (D).

Es zeigten sich die folgenden Ergebnisse: In der Zelllinie LN229 wurden in den *ARNT*-editierten Klonen im Vergleich zu Non-Target (NT)-Kontrollzellen dieser Zelllinie eine Reduktion der mRNA-Expression von *ARNT* um 65 % erreicht. Der Unterschied war statistisch signifikant ($p = 0,0015$) (**Abbildung 7A**). In der Zelllinie T98G wurde für 3 *ARNT*-editierte Klone eine Reduktion der *ARNT* mRNA-Expression im Vergleich zur NT-Kontrolle um 67 % erreicht ($p = 0,0001$) (**Abbildung 7B**). In den Western Blot-Analysen wiesen alle editierten Zellklone der Zelllinie LN229 eine verbliebene *ARNT*-Proteinexpression auf (**Abbildung 7C**), während der editierte Klon #1 der T98G Zelllinie im Westernblot keine *ARNT*-Proteinexpression mehr zeigte (**Abbildung 7D**).

3.5 Der Einfluss von *ARNT-Knock-out* auf die Expression von *AHR*, *AHRR* und *ARNT2*

Die Veränderung der mRNA-Expression von *AHR*, *AHRR* und *ARNT2* in LN229 und T98G Zellen nach *ARNT-Knock-out* wird in **Abbildung 8** dargestellt. Als Referenz wurden hierbei Zellen verwendet, in die anstelle der *ARNT*-sgRNA eine *Non-targeting*-Sequenz kloniert wurde. Diese Sequenzen erkennen keine Gensequenz im menschlichen Genom und dienen als Negativ-Kontrolle. In der Zelllinie LN229 unterschied sich die mRNA-Expression von *AHR* nach *ARNT-Knock-out* kaum (+ 9 %) von der Kontrolle (NT). Allerdings reduzierte sich die mRNA-Expression von *AHRR* signifikant bei *ARNT-KO* um 44 % ($p = 0,0061$). Ebenfalls zeigte sich eine Reduktion von 45 % der mRNA-Expression des Gens *ARNT2* im *ARNT-Knock-out* (**Abbildung 8A**). Diese Differenz war jedoch statistisch nicht signifikant ($p = 0,0526$). In der Zelllinie T98G zeigte sich die mRNA-Expression der Gene *AHR*, *AHRR* und *ARNT2* im *ARNT-Knock-out* ähnlich wie in der Zelllinie LN229. Die Expression der mRNA von *AHR* war in *ARNT-KO*-Zellen annähernd gleich wie in den Kontrollen (- 10 %). Die mRNA-Expression des Gens *AHRR* reduzierte sich im Vergleich zur Kontrolle um 51 %, die Expression von *ARNT2* um 48 % nach *ARNT-KO*. Die Differenz der mRNA-Expression von *ARNT2* zwischen *ARNT-KO*- und NT-Zellen war statistisch signifikant ($p = 0,0063$) (**Abbildung 8B**).

Die Westernblot-Experimente (**Abbildung 8C**) erbrachten für die Zelllinie LN229 eine mehr als doppelt so hohe Expression des *AHR* in Zellen mit *ARNT-Knock-out* im Vergleich zur NT-Kontrolle. Die Proteinexpression von *ARNT2* entsprach hingegen im *ARNT-Knock-out* der Kontrolle. In der Zelllinie T98G war die Proteinexpression von *AHR* im *ARNT-Knock-out* signifikant um 49 % im Vergleich zu den Kontrollzellen reduziert ($p = 0,0469$). Auch die Proteinexpression von *ARNT2* war in den *ARNT-Knock-out*-Zellen um 62 % niedriger.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die mRNA-Expression von *AHRR* und *ARNT2* in den *ARNT-Knock-out*-Zelllinien im Vergleich zu den Kontroll-transfizierten Zelllinien verringert war, während die mRNA-Expression von *AHR* auf gleichem Niveau blieb. Auf Proteinebene sah man in LN229 einen Anstieg, in T98G jedoch einen Abfall der Expression von *AHR*. *ARNT2* zeigte nach *ARNT-Knock-out* in der Zelllinie LN229 im Vergleich zur Kontrolle keine veränderte Expression, während die Expression in der Zelllinie T98G nach *ARNT-Knock-out* deutlich reduziert war.

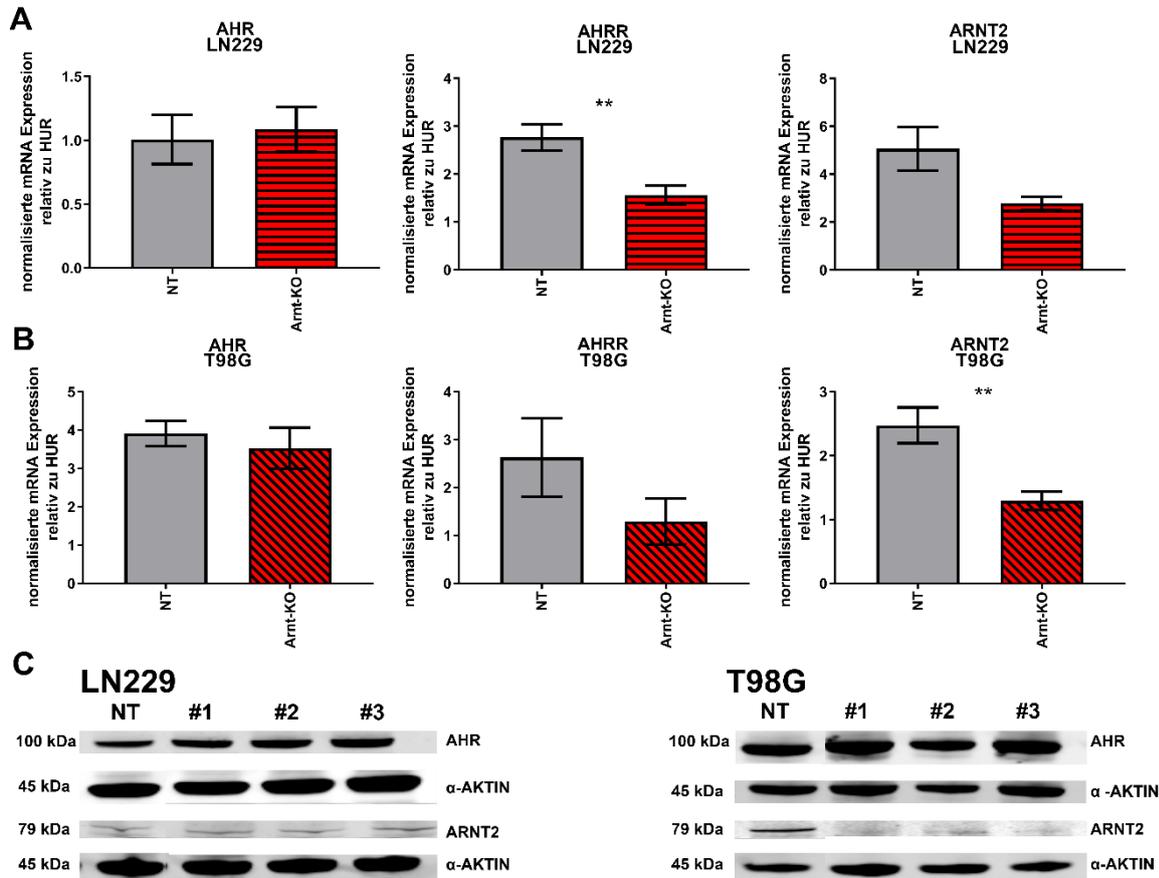


Abbildung 8: Dargestellt ist die relative mRNA-Expression der Gene AHR, AHRR und ARNT2 in (A) LN229 und (B) T98G mit ARNT-Knock-out (ARNT-KO) im Vergleich zu Non-targeting Kontrolle (NT), die mit Hilfe einer semiquantitativen Realtime-PCR durchgeführt wurde. Abgebildet ist jeweils der Mittelwert \pm SEM von 3 Klonen mit jeweils 2 unabhängig erstellten Replikaten. Die statistische Auswertung wurde mittels ungepaartem T-Test und Korrektur nach Welch durchgeführt. (C) Repräsentative Bilder der durchgeführten Westernblots.

3.6 Analyse des Wachstumsverhaltens

Für die Einschätzung des Wachstumsverhaltens und die Quantifizierung der Proliferationsfähigkeit wurden Wachstumskurven erstellt, wie in 2.7 beschrieben, und die Verdopplungszeit innerhalb der Phase des exponentiellen Wachstums zwischen Tag 1 und 9 errechnet. Verglichen wurde hierbei das Wachstumsverhalten der *ARNT*-editierten Zellen zu einer *Non-target*-Kontrolle (NT), um herauszufinden, ob *ARNT* eine Rolle für das Wachstumsverhalten in den Zelllinien LN229 und T98G spielt. Die Ergebnisse werden in **Abbildung 9** für die Zelllinien LN229 und T98G dargestellt.

Es ergaben sich folgenden Ergebnisse: In der Zelllinie LN229 stieg die Zellzahl der *ARNT*-KO und NT-Zellen innerhalb der ersten 6 Tage in gleicher Weise an. Nach 9 Tagen Inkubationszeit war die Zellzahl von LN229 *ARNT*-KO auf das 234-fache (im Vergleich zu Tag 1) gestiegen. Die Zellzahl der *ARNT*-KO Zellen war um 31 % höher als die der NT-Zellen. Diese Differenz war statistisch signifikant ($p = 0,021$), lag jedoch

nach 12 Tagen Inkubationszeit nur noch um 10 % höher, so dass der Unterschied dann nicht mehr statistisch signifikant war (**Abbildung 9A**). Die Verdopplungszeit der *ARNT*-KO Zellen unterschied sich mit 1,3 Tagen nicht signifikant von der Verdopplungszeit der NT-Zellen mit 1,5 Tagen (**Abbildung 9A**). In der Zelllinie T98G verlief die Wachstumskurve der *ARNT*-KO Zellen innerhalb der ersten 6 Tage ebenfalls identisch mit der Wachstumskurve der NT-Zellen. Innerhalb der ersten 6 Tage stieg die Zellzahl um das 15-fache an. Zwischen Tag 9 und Tag 12 stieg die Zellzahl der *ARNT*-KO-Zellen um 117 % und die Zellzahl der NT-Zellen um 83 %. Dieser Unterschied war zwar in den Wachstumskurven sichtbar, jedoch nicht statistisch signifikant (**Abbildung 9C**). Bei der Berechnung der Verdopplungszeit der Zellen zeigte sich sowohl bei den *ARNT*-KO-Zellen, als auch bei den NT-Zellen ein Verdopplungszeit von 1,6 Tagen (**Abbildung 9D**).

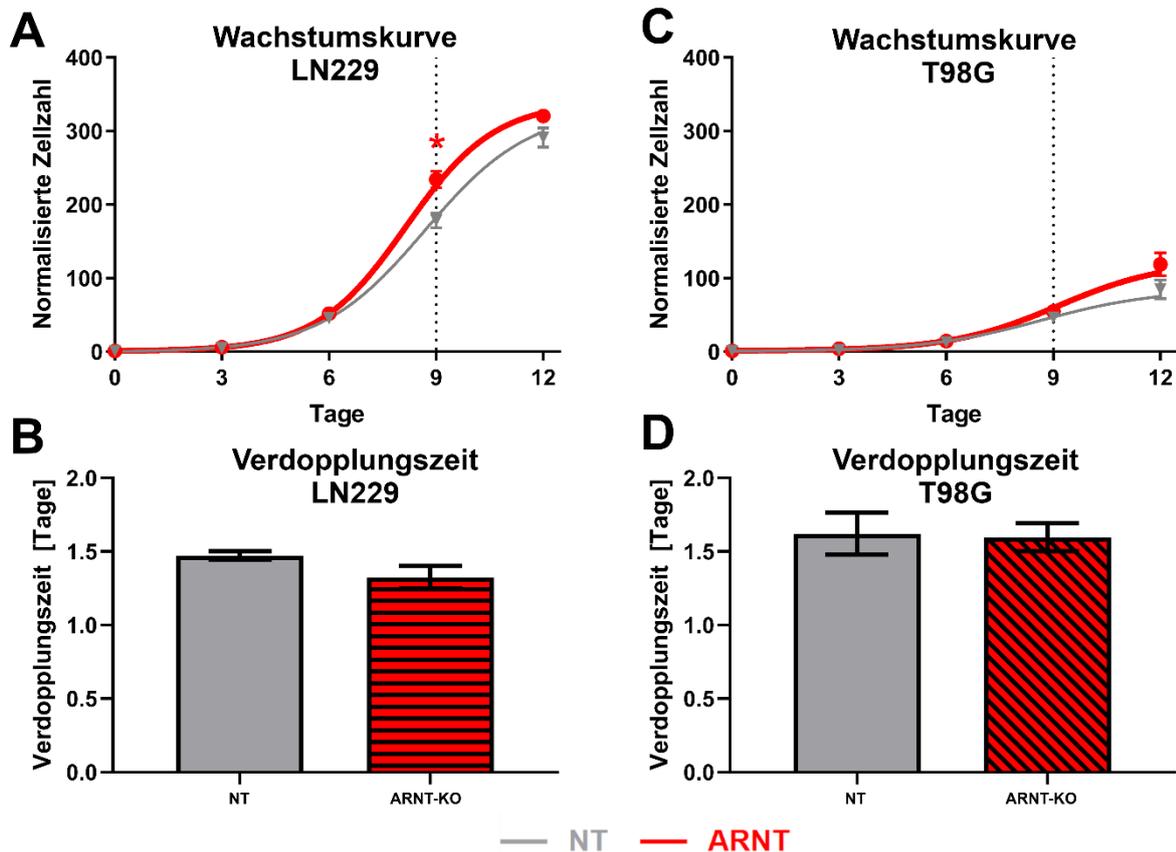


Abbildung 9: Dargestellt ist die Wachstumsanalyse der Zelllinien der *ARNT*-Knock-out Klone von LN229 und T98G (rot) und der zugehörigen *Non-targeting* Kontrollen (NT), wobei an Tag 1 100.000 Zellen ausgesät wurden und für 12 Tage kultiviert wurden. Alle drei Tage wurde jeweils eine Zellkulturschale mit Zellen trypsinisiert, gezählt und die Gesamtzellzahl bestimmt. Die Zellzahl wurde normalisiert und eine sigmoide Wachstumskurve mittels non-linearer Regression von GraphPad Prism erstellt. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM von zwei technischen Replikaten mit je 3 biologischen Replikaten dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem T-Test und Korrektur nach Welch. Abgebildet ist (A) die Wachstumskurven der Zelllinie LN229 und die daraus errechnete Verdopplungszeit (B). Die Wachstumskurven der Zelllinie T98G werden in (C) dargestellt, die Verdopplungszeit der *ARNT*-KO Zellen wird in (D) mit der Non-Target Kontrolle (NT) verglichen.

Anhand der mikroskopischen Bilder, die im Verlauf des Experiments erstellt wurden, ließen sich die verwendeten Zelllinien morphologisch beschreiben. Die Bilder sind in **Abbildung 10** und **11** dargestellt.

Die Zellen der Zelllinie LN229 waren nach 9 Tagen fast konfluent in den Zellkulturschalen gewachsen. Die Zelldichte zeigte keinen Unterschied zwischen den NT-Kontrollen und den *ARNT-KO*-Zellen. Die Morphologie der Zellen wies keine offensichtlichen Unterschiede auf.

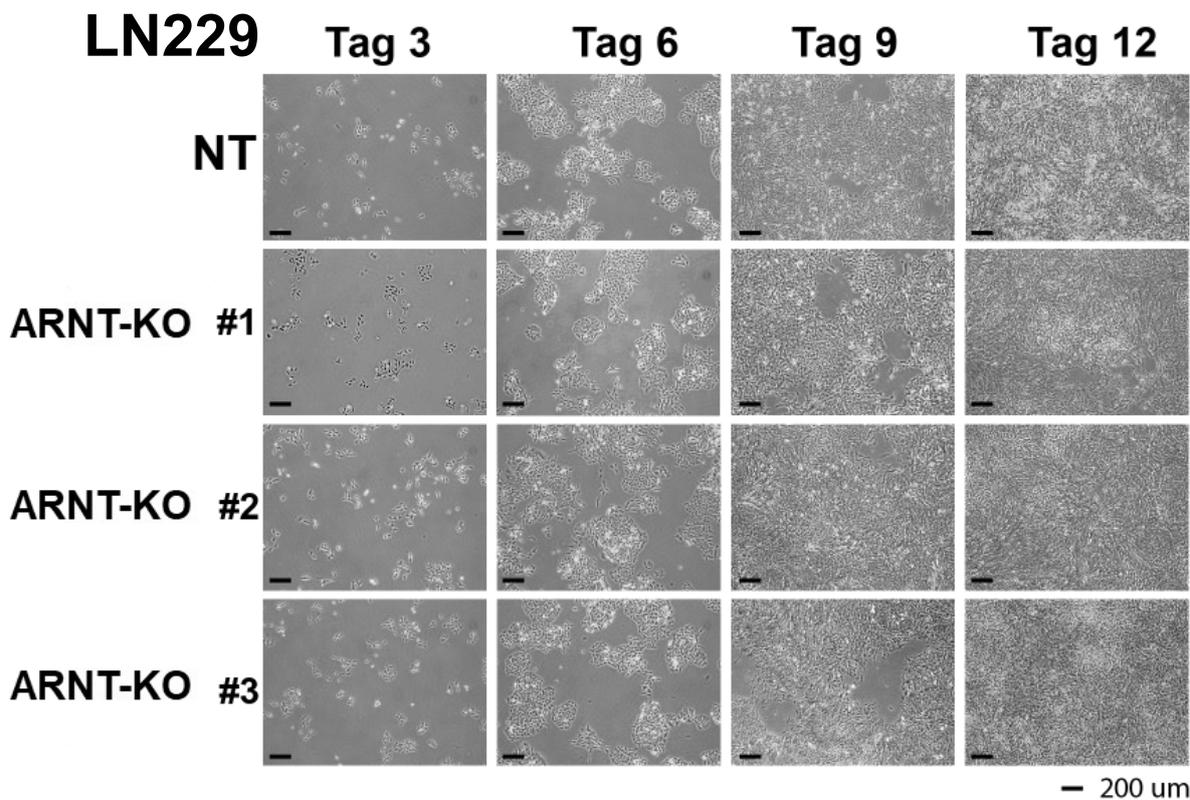


Abbildung 10: Dargestellt sind repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der *Non-targeting*-Kontrollzellen (NT) sowie von drei *ARNT-Knock-out*-Kulturen der Glioblastomzelllinie LN229 vor dem Ernten und Zählen der Zellen an Tag 3, 6, 9 und 12 nach Beginn des Experiments.

Auch die Zellen der Zelllinie T98G waren nach 9 Tagen Inkubationszeit konfluent gewachsen. Morphologisch fiel auf, dass die *ARNT-KO #1* Zellen, die im Gegensatz zu den *ARNT-KO #2* und *#3* Zellen keine Proteinexpression aufwiesen (siehe **3.4**), eine spindelzelligere Morphologie aufwiesen (**Abbildung 11**). Alles in allem war weder in der Zelllinie LN229 noch in der Zelllinie T98G ein relevanter Unterschied der Proliferationsfähigkeit hinsichtlich der Zellzahl und der Verdopplungszeit zwischen den *ARNT-KO*-Zellen und den NT-Zellen zu sehen.

60 %. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant (**Abbildung 12C**). Auffällig war, dass bei T98G *ARNT-KO* Klon #1 die gebildeten Kolonien größer waren als in *ARNT-KO* #2 und #3 und in der NT-Kontrolle (**Abbildung 12D**).

Insgesamt fand sich eine größere Varianz der Zellen mit *ARNT-Knock-out* der Zelllinie T98G als in der Zelllinie LN229. Betrachtet man die Klone einzeln, zeigte sich, dass *ARNT-KO* Klon #1 größere Kolonien bildete. Es gab jedoch keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Anzahl von Kolonien.

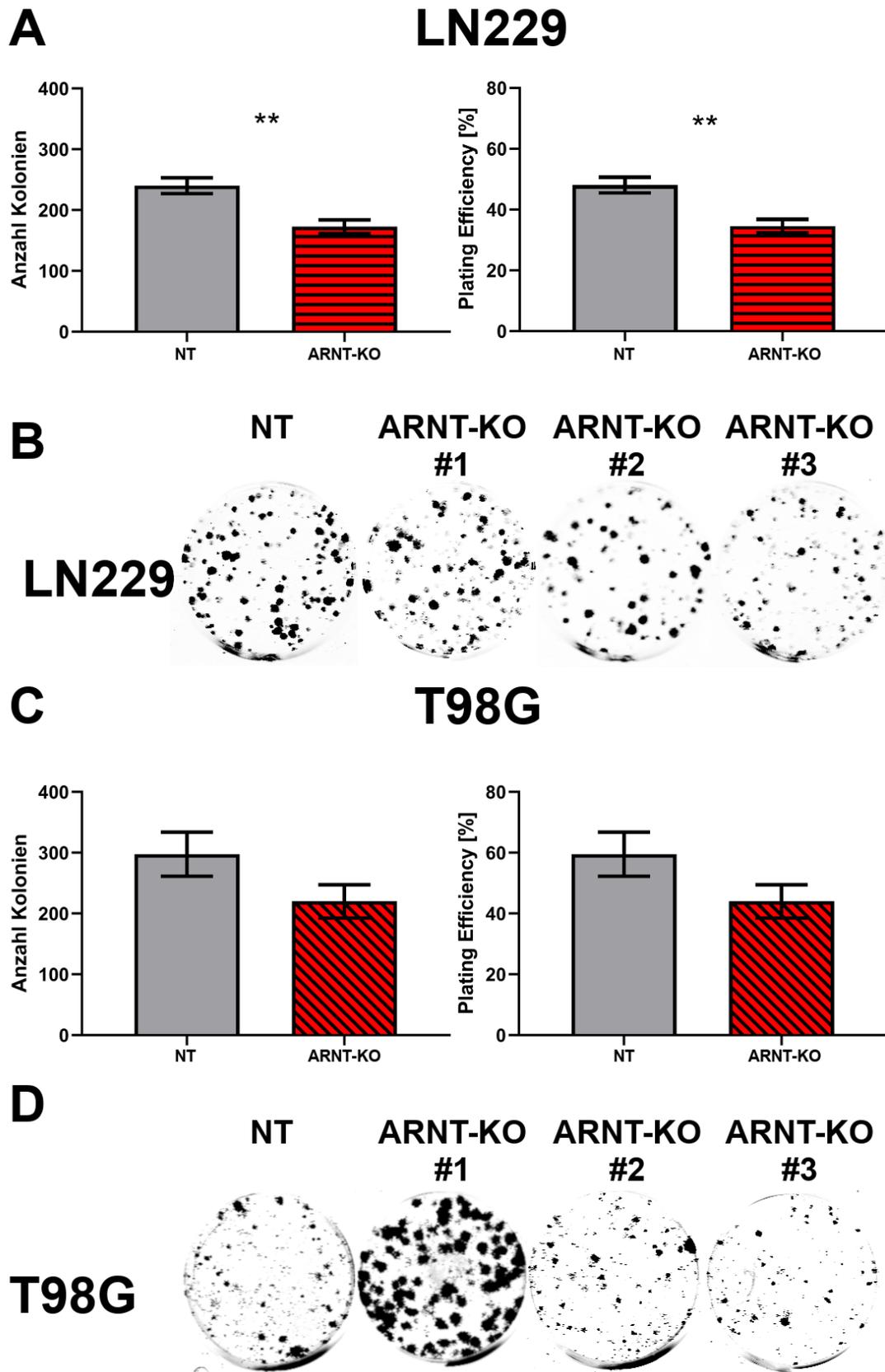


Abbildung 12: Dargestellt sind Colony formation Assays der Zelllinien LN229 (A, B) und T98G (C, D) mit stabilem *ARNT*-Knock-out im Vergleich zu *Non-Target* Kontrollen (NT). Verwendet wurden je 3 Kulturen mit jeweils 2 unabhängig erstellten

Replikaten. Das experimentelle Design wird in 2.7 beschrieben. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt und stammten aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die statistische Auswertung wurde mittels ungepaartem t-Test und Korrektur nach Welch durchgeführt. (A) Anzahl an Kolonien der Zelllinie LN229, die nach 12 Tagen Inkubationszeit gefärbt und sodann mittels ImageJ gezählt wurden. Die *Plating efficiency* wurde anhand des Verhältnisses von gefärbten Kolonien zu ausgesäten Zellen errechnet. (B) Repräsentative Bilder der angefärbten Kolonien von LN229 NT und LN229 ARNT-KO. Analog dazu zeigt (C) die Anzahl der Kolonien und die *Plating efficiency* für die Zelllinie T98G. (D) Repräsentative Bilder der angefärbten Kolonien von T98G.

3.8 Der Einfluss von ARNT auf die Seneszenz

Für die Einschätzung ob der Verlust von *ARNT* einen Einfluss auf die Seneszenz von Glioblastomzellen in der Kultur hat, wurden die mRNA-Expressionslevel des Gens β -Galaktosidase in den Zelllinien LN229 und T98G mittels semiquantitativer Realtime-RT-PCR untersucht (**Abbildung 13**). In der Zelllinie LN229 zeigten die Zellen mit *ARNT-Knock-out* eine 6 % höhere mRNA-Expression von β -Galaktosidase als die Kontrollzellen (NT) (**Abbildung 13A**). Bei der Zelllinie T98G war die Expression von β -Galaktosidase auf mRNA-Ebene nach *ARNT-Knock-out* um 18 % reduziert im Vergleich zu den Kontroll-Zellen (**Abbildung 13B**). Beide Differenzen waren statistisch nicht signifikant.

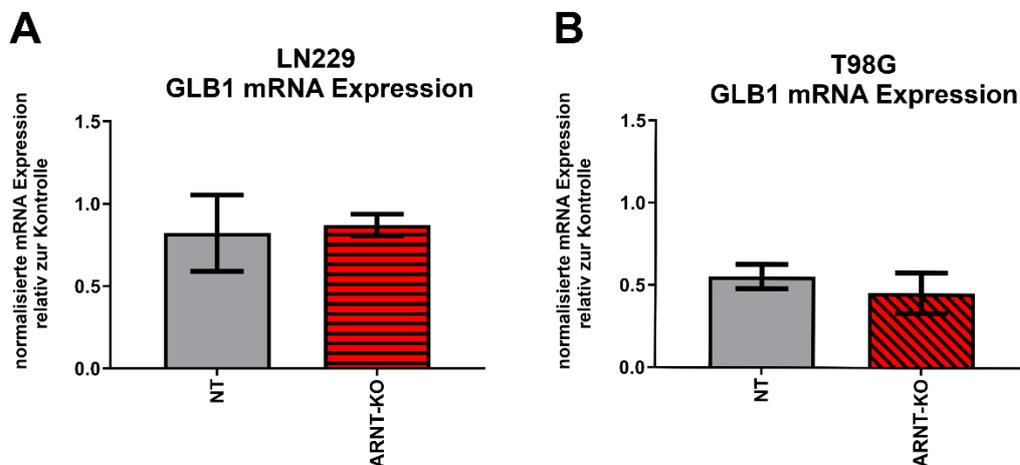


Abbildung 13: Dargestellt wird die mRNA Expression von β -Galaktosidase (*GLB1*) in der *Non-target* Kontrolle (NT) im Vergleich zum *ARNT-Knockout* (*ARNT-KO*) in den Zelllinien (A) LN229 und (B) T98G. Die mRNA-Expression wurde mittels semiquantitativer Realtime-PCR nachgewiesen. Abgebildet wird jeweils der Mittelwert \pm SEM. Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe eines ungepaarten T-Tests und einer Korrektur nach Welch durchgeführt.

3.9 Dosis-Wirkungskurven mit Temozolomid

Um herauszufinden, wie Glioblastomzelllinien auf Temozolomid reagieren und ob der *ARNT-Knock-out* einen Einfluss auf das Ansprechen der Zellen auf Temozolomid hat, wurden die Zelllinien T98G und LN229 mit 0 μ M – 1000 μ M Temozolomid behandelt und die Zellviabilität im Anschluss zu definierten Zeitpunkten mittels MTT-Assay ermittelt. Die Ergebnisse der 8-tägigen Behandlung der Zellen mit Temozolomid sind

in **Abbildung 14** für LN229 und **Abbildung 15** für T98G dargestellt.

Wie in **Abbildung 14** zu sehen, zeigte sich nach 72 Stunden Inkubationszeit eine Reduktion der Zellviabilität um ca. 20 % (ca. 15 % bei NT und 17 % bei *ARNT-KO*) bei 1000 μM TMZ, wobei die geringfügige Differenz zwischen *ARNT-KO* und den Kontrollen nicht signifikant war. Nach 96 Stunden Inkubationszeit zeigte sich in beiden Zelllinien eine Reduktion der Viabilität um >20 % ab 100 μM TMZ. Bei 1000 μM betrug die Viabilität der NT- und *ARNT-KO*-Zellen ca. 54 % bzw. 53 %. Auch die IC_{50} -Werte waren mit 818 μM (NT) vs. 825 μM (*ARNT-KO*) sehr ähnlich. Nach 120 Stunden Inkubationszeit betrug die Zellviabilität nur noch 70 % ab einer TMZ-Konzentration von 200 μM . Bei der höchsten Konzentration sank der Anteil der lebenden Zellen auf ca. 45 % ab. Am 6. Tag des Experimentes reduzierte sich die Zellviabilität der *ARNT-KO*-Zellen um ca. 50% bei einer TMZ-Konzentration von 200 μM , während in den Kontrollen dieser Wert schon bei 100 μM TMZ erreicht wurde. Bei 800 μM TMZ lag die Viabilität bei beiden Zelllinien < 35 %. Nach 168 Stunden reduzierte sich die Zellviabilität schon bei niedrigen Konzentrationen (20 μM) um > 20 %. Ab 200 μM lag in *ARNT-KO* und NT-Zellen nur noch eine Viabilität von 50% vor. In der höchsten Konzentration TMZ sank die Viabilität der Zellen auf < 25 % ab. Es waren keine signifikanten Differenzen zwischen *ARNT-KO* und Kontrolle festzustellen. Nach 8 Tagen Inkubationszeit lag schon bei niedrigster Dosierung von TMZ eine Reduktion der Viabilität um 20 % vor. Bei 1000 μM lag eine Viabilität von < 20 % vor.

Die IC_{50} -Werte (**Tabelle 11**) unterstützten die Befunde der Viabilitätskurven. Auch hier waren keine signifikanten Differenzen zwischen LN229 *ARNT-KO*- und NT-Zellen festzustellen. Die einzige größere, jedoch nicht signifikante, Differenz ergab sich nach 144 Stunden Inkubationszeit. Hier betrug die IC_{50} für *ARNT-KO* 342 μM und für NT 154 μM . Dieser Unterschied war im weiteren Verlauf des Experiments nicht mehr sichtbar.

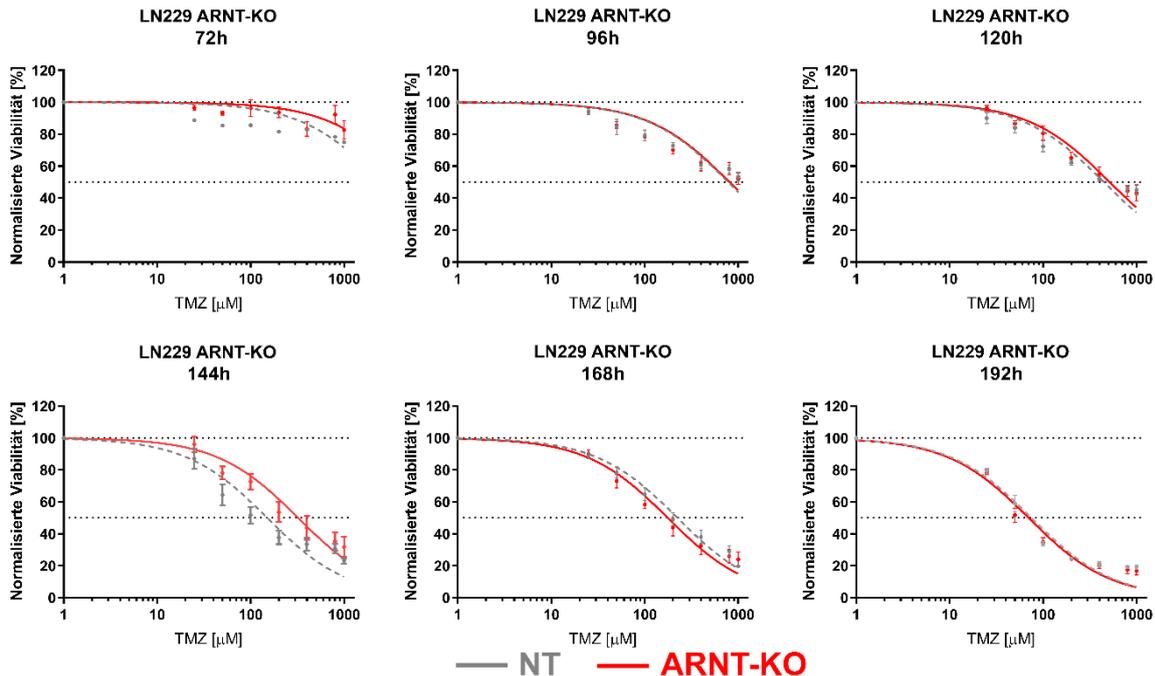


Abbildung 14: Die Zelllinie LN229 wurde nach *ARNT-Knock-out* (*ARNT-KO*) im Vergleich zu einer Non-Target Kontrolle (NT) über 8 Tage mit steigenden Konzentrationen (0, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 μM) Temozolomid behandelt und die Zellviabilität mittels MTT-Assays nach 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 168 h und 192 h gemessen. Dargestellt sind die Dosis-Wirkungskurven für die *ARNT-KO* und NT-Zellen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten, die mit der Software GraphPad Prism von je 3 unabhängigen Zellkulturen extrapoliert wurden.

Inkubationszeit	NT	ARNT-KO
72 h	2365 \pm 294,9	7657 \pm 4140
96 h	817,7 \pm 83,29	825,1 \pm 157
120 h	489,1 \pm 40,43	558 \pm 113
144 h	154,2 \pm 44,29	341,3 \pm 86,42
168 h	225 \pm 39,26	187,4 \pm 39
192 h	76,26 \pm 7,564	69 \pm 6,844

Tabelle 11: IC_{50} -Werte [μM] von LN229 NT und *Arnt-KO* Zellen für die Behandlung mit Temozolomid zu den angegebenen Zeitpunkten.

In **Abbildung 15** sowie **Tabelle 12** wird die Viabilität von Zellen der Zelllinie T98G nach Behandlung mit Temozolomid dargestellt. Nach 72 Stunden zeigte sich in der höchsten Konzentration eine Reduktion der Zellviabilität um ca. 67 % für *ARNT-KO*-Zellen und ca. 46 % für NT-Zellen. Nach weiteren 24 Stunden Inkubationszeit wurde eine Reduktion der Viabilität um > 40 % für *ARNT-KO*-Zellen ab 400 μM TMZ erreicht, für NT-Zellen erst bei 800 μM . Nach 5 Tagen Inkubationszeit zeigten sich Unterschiede zwischen *ARNT-KO*- und NT-Zellen in den beiden höchsten TMZ-Konzentrationen. Bei 800 μM TMZ reduzierte sich die Viabilität von *ARNT-KO*-Zellen um > 70 %, während die Reduktion bei den Kontrollen bei ca. 52 % lag. Bei 1000 μM TMZ lag die Viabilität

der Zellen mit *ARNT-KO* bei 14%, bei den Kontrollzellen bei 30 %. Die Viabilität der Kontrollzellen war also doppelt so hoch. Nach 144 Stunden lag der Anteil an überlebenden Zellen bei 100 μM TMZ zwischen 83 % (*ARNT-KO*) und 87 % (NT) und war somit in den niedrig dosierten Bereichen relativ ähnlich. Ab 400 μM TMZ zeigten sich jedoch Differenzen, die in den höheren Konzentrationen deutlicher wurden. Bei 800 μM TMZ war die Viabilität der Kontrollzellen mit ca. 41% doppelt so hoch wie die der *ARNT-KO*-Zellen (20 %). Bei Gabe von 1000 μM TMZ war die Zellviabilität von *ARNT-KO*-Zellen ebenfalls nur halb so hoch wie die der Kontrollzellen, d.h. ca. 10 % gegenüber ca. 22 %. Diesen Trend sah man auch nach 7 Tagen Inkubationszeit ab einer TMZ-Konzentration von >800 μM . Nach 8 Tagen zeigte sich die höhere TMZ-Sensibilität von *ARNT-KO*-Zellen auch schon bei Konzentrationen ab 200 μM . Hier sank der Anteil an überlebenden Zellen mit *ARNT-KO* um 36%, der der Kontrollzellen jedoch nur um 9%. Ab 800 μM TMZ war die Viabilität der *ARNT-KO*-Zellen auf < 15 % gesunken, bei den Kontrollzellen auf <40%.

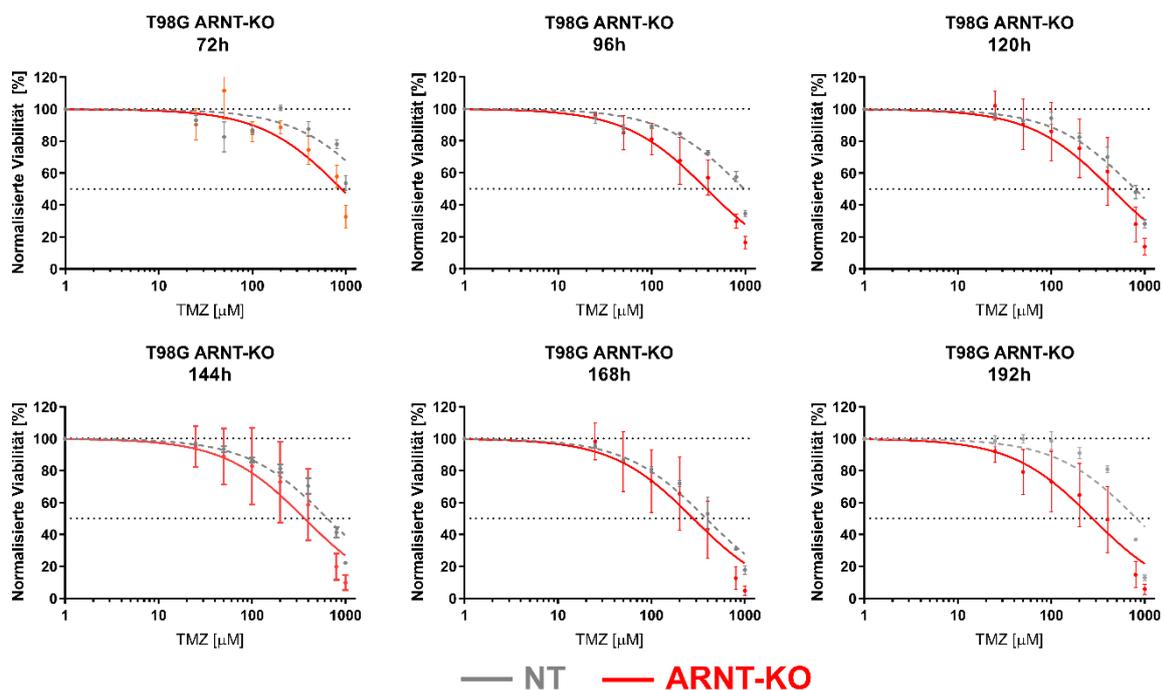


Abbildung 15: Die Zelllinie T98G wurde nach *ARNT-Knock-out* (*ARNT-KO*) im Vergleich zu einer Non-Target Kontrolle (NT) über 8 Tage mit steigenden Konzentrationen (0, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 μM) Temozolomid behandelt und die Zellviabilität mittels MTT-Assays nach 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 168 h und 192 h gemessen. Dargestellt sind die Dosis-Wirkungskurven für die *ARNT-KO* und NT-Zellen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten, die mit der Software GraphPad Prism von je 3 unabhängig erstellten Zellkulturen extrapoliert wurden.

Inkubationszeit	NT	ARNT-KO
72 h	1939 \pm 340,6	981,7 \pm 265
96 h	846,4 \pm 71,3	420 \pm 139
120 h	721,5 \pm 107,1	556,5 \pm 254

144 h	605,7 ± 60,5	481,8 ± 213,3
168 h	393 ± 39,25	320,7 ± 133,9
192 h	667,9 ± 46,55	331,8 ± 136

Tabelle 12: IC₅₀-Werte [μM] von T98G NT und ARNT-KO für die Behandlung mit Temozolomid zu den angegebenen Zeitpunkten.

Insgesamt war anhand der Überlebenskurven eine hohe Varianz innerhalb der *ARNT-KO*-Klone sichtbar. Dies erkannte man auch anhand der errechneten IC₅₀-Werte. Ab dem 4. Tag war die Varianz zwischen *ARNT-KO*-Zellen 2 – 3,5-mal so hoch wie in den Kontrollzellen. Betrachtet man die Überlebenskurven der drei *ARNT-KO*-Kulturen getrennt, zeigten sich folgende Ergebnisse (**Abbildung 16**).

Nach einer Inkubationszeit von 96 Stunden war die Viabilität in *ARNT-KO* Klon #1 um 45 % bei 50 μM gesunken. Diese Reduktion der Zellviabilität wurde bei den anderen Klonen erst bei Konzentration von 400 μM (#2) bzw. 800 μM (#3) erreicht. Nach 144 h lag die Viabilität von *ARNT-KO* Klon #1 bei 1000 μM nur noch bei 1 %, bei *ARNT-KO* Klon #2 und #3 noch zwischen 10 – 20 %. Nach 8 Tagen sah man für *ARNT-KO* Klon #1 schon in niedrigen Konzentrationen eine Reduktion der Zellviabilität um ca. 50 %. Auch die IC₅₀-Werte zeigten, dass TMZ die Zellen des Klons #1 schneller abtötet. Der IC₅₀-Wert von *ARNT-KO* #1 nach 72h lag bei 512 μM, während die anderen Zellklone einen Wert von > 1000 μM aufweisen. Nach 8 Tagen Inkubationszeit lag der Wert bei 60 μM für *ARNT-KO* Klon #1 und > 400 für *ARNT-KO* Klone #2 und #3 (**Tabelle 13**).

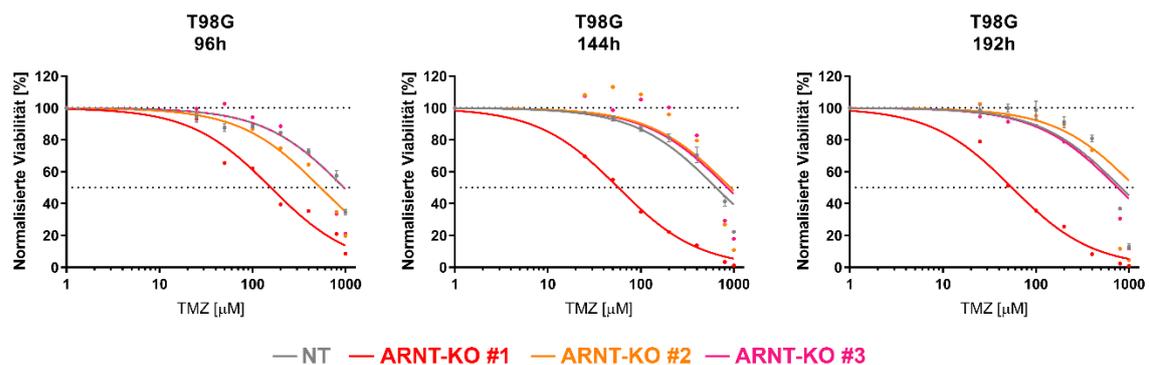


Abbildung 16: In der Zelllinie T98G wurde die Zellviabilität von *ARNT-Knockout*-Zellen (*ARNT-KO*) im Vergleich zu Non-Target Kontrollzellen (NT) nach 8 Tage Behandlung mit Temozolomid in steigenden Konzentrationen (0, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 μM) mittels MTT-Assay nach 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 168 h und 192 h gemessen. Dargestellt sind die Dosis-Wirkungskurven für die *ARNT-KO* und NT-Zellen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten, die mit der Software GraphPad Prism von je 3 unabhängig erstellten Zellkulturen, extrapoliert worden sind. Die in Abbildung 14 beschriebenen Ergebnisse wurde hier nach den einzelnen *ARNT-KO*-Zellklonen der Zelllinie T98G ausgewertet.

Inkubationszeit	NT	ARNT-KO #1	ARNT-KO #2	ARNT-KO #3
72 h	1939,0	512,2	1430,0	1003,0
96 h	846,4	153,6	484,7	624,0

120 h	721,5	99,2	592,3	978,0
144 h	605,7	56,5	664,8	724,0
168 h	393,0	53,3	467,5	441,2
192 h	667,9	59,5	464,3	471,7

Tabelle 13: Abgebildet sind die IC₅₀-Werte [µM] von T98G NT- und ARNT-KO-Zellen für die Behandlung mit TMZ nach den angegebenen Zeiträumen.

3.10 Die mRNA-Expression von Genen des AHR-Komplexes in Temozolomid-resistenten Zellen

Mit Hilfe einer kontinuierlichen längerfristigen niedrig dosierten Gabe von Temozolomid (TMZ), können Gliomzellen resistent gegenüber TMZ gemacht werden. Um herauszufinden, ob die Gene in TMZ-resistenten Zelllinien im Vergleich zum TMZ-sensitiveren Wildtyp unterschiedlich stark exprimiert sind, wurde in den Zelllinien LN18 und LN229 die Expression der AHR-Gene im TMZ sensitiven Wildtyp und in TMZ-resistenten Zellen bestimmt (**Abbildung 17**). Die Zellen wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Weller, Zürich zur Verfügung gestellt (Happold et al. [45]).

Die Expression der Gene des AHR-Komplexes wies sowohl im Vergleich zwischen den Zelllinien LN18 und LN229, als auch innerhalb der jeweiligen sensitiven und resistenten Klone große Unterschiede auf (**Abbildung 17**). Die mRNA-Expression von

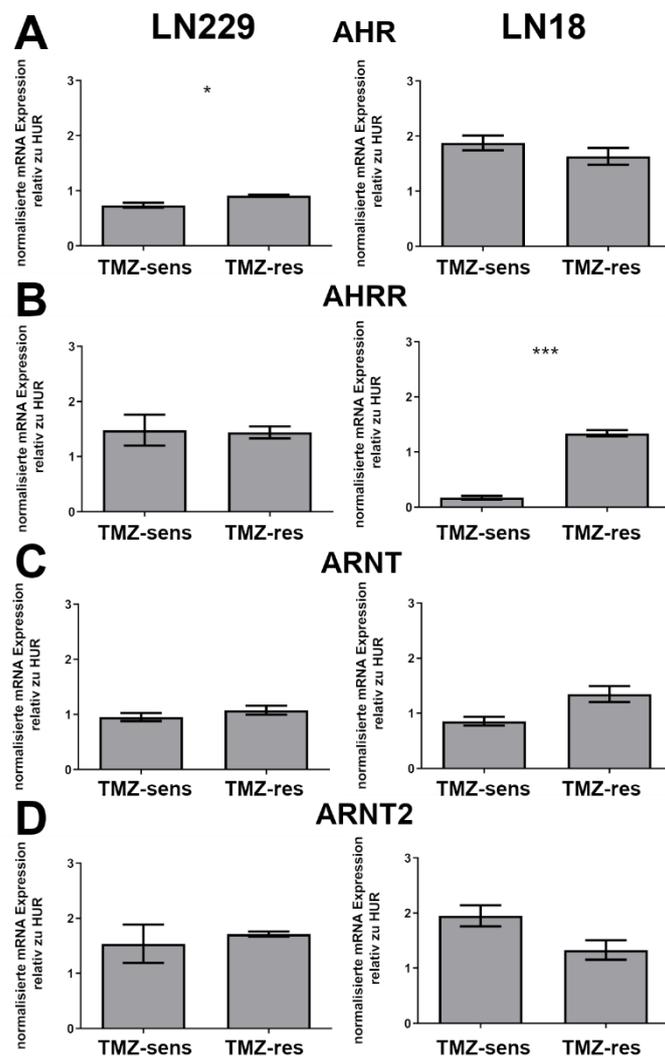


Abbildung 17: Dargestellt ist die mRNA-Expression von *AHR*, *AHRR*, *ARNT* und *ARNT2* in den LN229 und LN18 Glioblastomzelllinien, wobei jeweils der sensitivere Wildtyp (sens) und TMZ-resistente Zellen (res) miteinander verglichen werden. Die mRNA-Expression wurde mittels semiquantitativer Realtime-RT-PCR nachgewiesen. Abgebildet ist jeweils der Mittelwert \pm SEM. Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe eines ungepaarten T-Tests und einer Korrektur nach Welch durchgeführt.

AHR war in der LN229-Zelllinie in den resistenten Zellen signifikant höher ($p = 0,0412$) als in den sensitiven Zellen. Der relative Unterschied der mRNA-Expression betrug 24 %. Ebenso war die mRNA-Expression von *AHRR* in LN18 TMZ-resistenten Zellen signifikant höher ($p = 0,0002$) exprimiert als in den sensitiven Wildtyp-Zellen. Die Expression der mRNA von *AHRR* in TMZ-resistenten Zellen war 7,7-fach so hoch wie in den Wildtyp-Zellen. In der Zelllinie LN18 war *ARNT* in den TMZ-resistenten Zellen höher exprimiert als in den Wildtyp-Zellen, während in der Zelllinie LN229 kein Unterschied in der Expression zwischen den resistenten und den Wildtyp-Zellen bestand. Die Expression der mRNA von *ARNT* in LN18 TMZ-resistenten Zellen war um 58 % höher im Vergleich zu den sensitiven Wildtyp-Zellen, dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant ($p = 0,0561$). In der Zelllinie LN18 war *ARNT2* in den TMZ-resistenten Zellen 32 % weniger exprimiert als in den Wildtyp-Zellen. Auch dieser Unterschied war nicht statistisch signifikant. In der Zelllinie LN229 fiel bei der mRNA-Expression in den Wildtyp-Zellen eine verhältnismäßig hohe Varianz innerhalb der Zellproben auf (SEM = 0,35), die in den TMZ-resistenten Zelle nicht vorhanden war (SEM = 0,05).

3.11 Der Einfluss von ARNT auf die Expression von AHR-Zielgenen

Wie bereits in 1.4 beschrieben, resultiert die Wirkung von AHR auf der Dimerisierung mit ARNT und der anschließenden Bindung an regulatorische Elemente der DNA. Als Transkriptionsfaktor kann AHR so die Expression bestimmter Gene beeinflussen. Gene, die durch den AHR reguliert werden sind unter anderem *CYP1A1*, *CYP1B1*, *NFE2L2*, *NQO1*, DNA-Polymerasek (*POLK*) und *AHRR*.

In **Abbildung 18** wird die mRNA Expression der AHR-Zielgene *CYP1A1*, *CYP1B1*, *NFE2L2*, *NQO1*, DNA-Polymerasek und *AHRR* in LN229-Glioblastomzellen mit *ARNT-Knock-out* im Vergleich zur NT-Kontrollzellen dargestellt. Die Expression der mRNA von *CYP1B1* war im Mittel doppelt so hoch in den *ARNT-Knock-out*-Zellen wie in den Kontrollzellen. Die mRNA-Expression von *CYP1A1* war im *ARNT-Knock-out* zu 61 % höher als in NT-Zellen. In den Zellen mit *ARNT-KO* konnte eine um 29 % erhöhte mRNA-Expression von *NFE2L2* detektiert werden. Die mRNA-Expression der Gene *AHRR* und DNA-Polymerasek war mit + 22 % und + 12 % in den *ARNT-Knock-out*-Zellen geringfügig erhöht. Die mRNA-Expression von *NQO1* war als einziges der untersuchten Gene um 11 % geringer im *ARNT-Knock-out*-Zellen als in den NT-Zellen.

Obwohl die beschriebenen Unterschiede statistisch nicht signifikant waren, lässt sich eine Tendenz, dass die untersuchten AHR-Zielgene in LN229 mit *ARNT-Knock-out* mehrheitlich höher exprimiert sind als in den Kontrollzellen, erkennen. In T98G-Glioblastomzellen wurde die mRNA-Expression von *CYP1A1* und *AHRR* nach *ARNT-Knock-out* im Vergleich zu den NT-Kontrollzellen untersucht (**Abbildung 18B**). Im Vergleich zur NT-Kontrolle war hier die Expression der mRNA von *CYP1A1* um 95 % und die Expression der mRNA von *AHRR* im *ARNT-Knock-out* um 62 % erniedrigt.

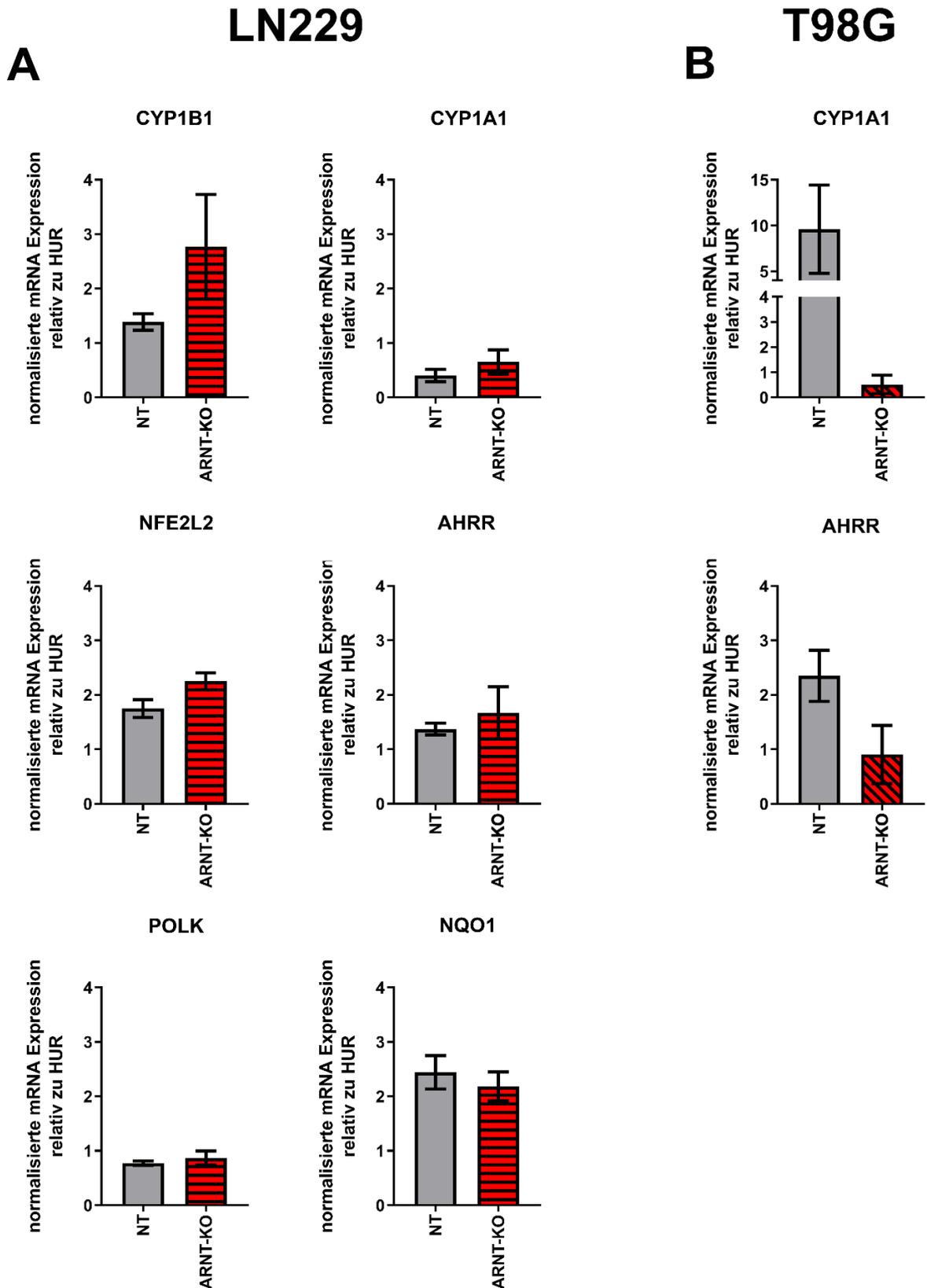


Abbildung 18: Dargestellt ist die relative mRNA-Expression von AHR-Zielgenen in *ARNT-KO*- im Vergleich zu *Non-Target* Kontrollzellen (NT). Die Daten wurden mittels semiquantitativer Realtime-RT-PCR generiert. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM von je 3 Zellklonen, relativ zur Human Universal Reference (HUR) = 1. (A) Zeigt die mRNA-Expression von *CYP1B1*, *CYP1A1*, *NFE2L2*, *AHRR*, *DNA-Polymerase* (*POLk*) und *NQO1* in LN229 mit *ARNT-Knock-out* im Vergleich zur Kontrolle (NT). (B) mRNA-Expression von *CYP1A1* und *AHRR* in T98G *ARNT-Knock-out* Zellen im Vergleich zu NT-Kontrollzellen.

3.12 Der Einfluss von 3-ISP auf die mRNA-Expression von *AHRR* und *CYP1A1* in T98G-Glioblastomzellen mit *ARNT-Knock-out*

AHR ist ein Transkriptionsfaktor, der über Liganden aktiviert wird und AHR-Zielgene sodann hochregulieren kann. Ein potenter AHR-Agonist ist 3-ISP. In **Abbildung 19** wird der Einfluss des AHR-Agonisten auf die Expression der *CYP1A1*- und der *AHRR*-RNA in den Zelllinien HepG2 und T98G in Kontrollzellen sowie in Zellen mit *ARNT-Knock-out* gezeigt.

In der Zelllinie HepG2 (**Abbildung 19A**) stieg die mRNA-Expression von *AHRR* und *CYP1A1* nach 6-stündiger Inkubation mit 1000 μM 3-ISP um das 3,9 – 4,9-fache, wobei bereits eine deutliche Induktion bei 100 μM 3-ISP zu sehen war. Die Expression von *CYP1A1* ohne 3-ISP war im Vergleich zu T98G EV ca. 1000-fach und im Vergleich zu T98G *ARNT-KO* #1 ca. 10.000-fach erhöht. Aufgrund dieses grundlegenden Unterschiedes des mRNA-Expressionsniveaus dieser Gene in HepG2 und T98G wurde auf eine Anpassung der Skalierung der Y-Achse in **Abbildung 19** verzichtet. In der Zelllinie T98G mit *Empty vector* (EV, Kontrolle) war ein bis zu 5,2-facher Anstieg der mRNA-Expression von *CYP1A1* nach Behandlung mit 3-ISP detektierbar. Im *ARNT-KO* Klon #1 stieg die mRNA-Expression geringfügig von 0,02 auf 0,09 (relativ zur HuR = 1), wobei zu berücksichtigen ist, dass die basale Expression der *CYP1A1*-mRNA in den KO-Zellen deutlich unter der basalen Expression der Kontrolle lag. Die mRNA-Expression von *AHRR* lies sich in der Kontrolle mittels 3-ISP ca. 1,8-fach steigern. Die *AHRR* mRNA-Level waren bei *ARNT-Knock-out* – wie auch bei *CYP1A1* – mit maximal 0,8 gering. Mittels 3-ISP lies sich die mRNA-Expression von initial 0,3 um ca. das 2,8-fache steigern (**Abbildung 19B**).

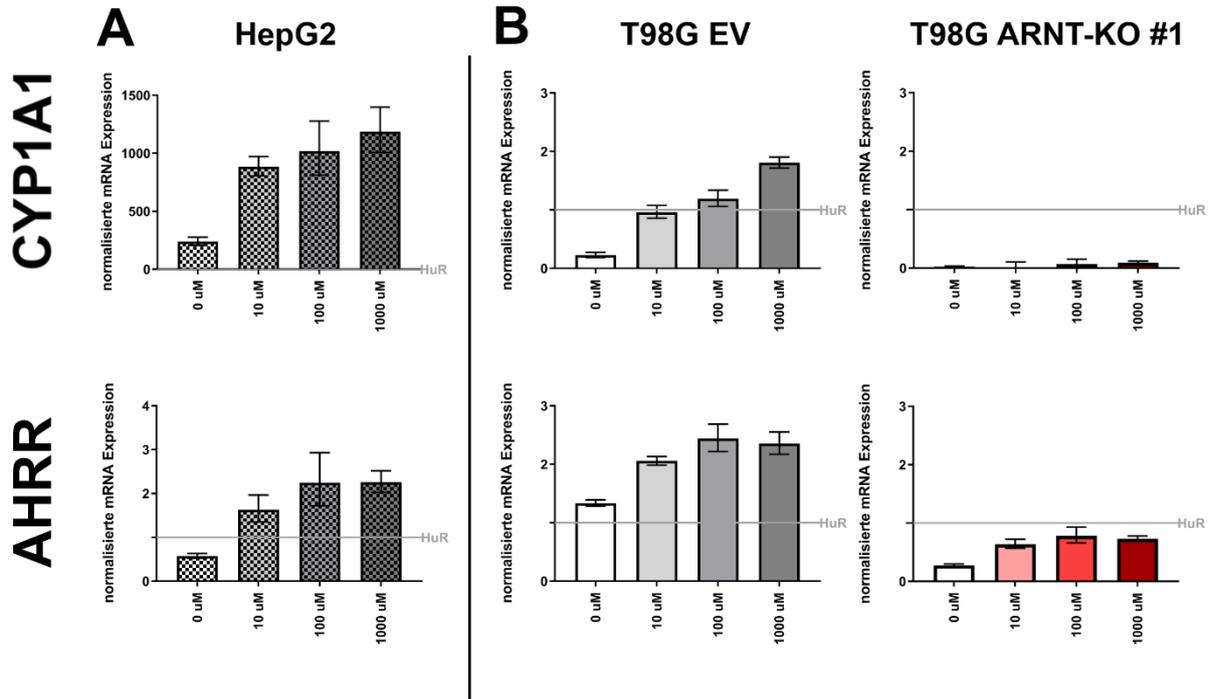


Abbildung 19: Dargestellt ist die mRNA-Expression (Mean mit upper/lower Limit) von *CYP1A1* und *AHRR* in HepG2 bzw. T98G mit *ARNT-Knock-out* (KO) und *Empty vector*-Kontrolle (EV) nach 6h Behandlung mit 0, 10, 100 oder 1000 µM 3-ISP, normalisiert zur Human Universal Reference (HUR). Die Daten wurden freundlicherweise von Frau Dr. Christiane Knobbe-Thomsen zur Verfügung gestellt. Auf eine Anpassung der Y-Achsen-Skalierung in (A) und (B) wurde aufgrund der beträchtlichen Expressionsunterschiede und fehlender absoluter Vergleichbarkeit der beiden Zelllinien verzichtet.

3.13 Der Einfluss von DMOG auf die Expression von HIF1- α Zielgenen in T98G-Glioblastomzellen mit *ARNT-Knock-out*

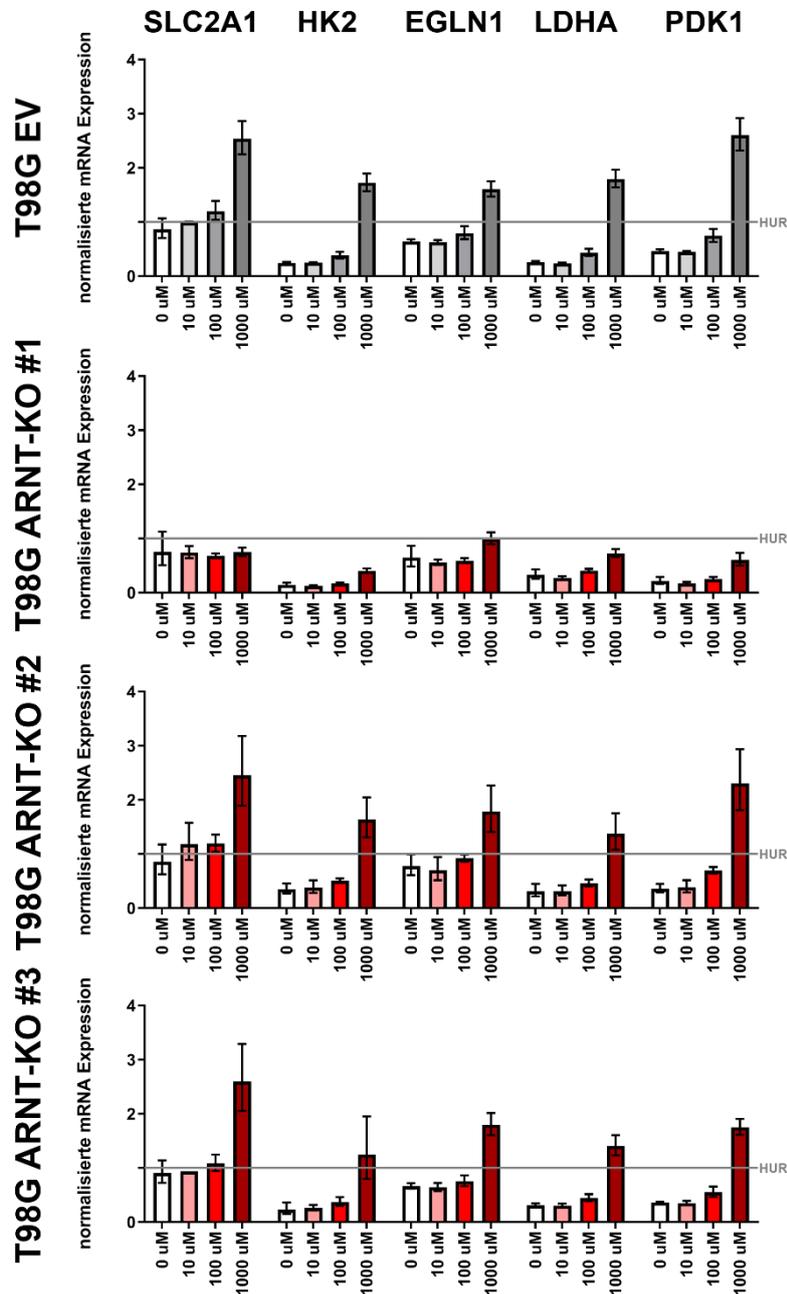


Abbildung 20: Dargestellt ist die mRNA-Expression (Mean mit upper/lower Limit) von SLC2A1, HK, LDHA, EGLN1 und PDK1 in T98G-Zellen mit ARNT-Knock-out und der Empty Vector-Kontrolle (EV) nach 6h Behandlung mit 0, 10, 100 oder 1000 µM DMOG, normalisiert zur Human Universal Reference (HUR). Die Daten wurden freundlicherweise von Frau Dr. Christiane Knobbe-Thomsen zur Verfügung gestellt.

HIF1- α ist ein Transkriptionsfaktor, der diverse Gene induzieren kann. In **Abbildung 20** wird die Induzierbarkeit von HIF1- α -regulierten Genen in der Zelllinie T98G mit und ohne *ARNT-Knock-out* dargestellt. Die mRNA-Expression von SLC2A1, das für Glut1 kodiert, lies sich mit 1000 µM DMOG in der Kontrolle (EV) und den *ARNT-KO*-Klonen #2 und #3 um das 2,8- bis 2,9-fache steigern. Im *ARNT-KO*-Klon #1 blieb das mRNA-Level hingegen gleich. Die mRNA-Expression von Hexokinase 2 lies sich im dargestellten Experiment im EV 7-fach, in Klon #2 und #3 4,5-5,5-fach erhöhen. Dagegen stieg das Signal bei *ARNT-KO* Klon #1 nur leicht an (ca. 2,8-fach). Die Expression

von LDHA lies sich nur geringfügig im Klon #1 induzieren (ca. 1,5-fache Steigerung der mRNA-Expression). Hingegen war die mRNA-Expression in den anderen Klonen

2,3 bis 2,7-fach bzw. 2,5-fach im EV erhöht. 1000 μ M DMOG erhöhte die mRNA-Expression von *EGLN* und *PDK1* im Klon #1 um ca. das Doppelte, in den Klonen #2 und #3 um mehr als das 4-fache, während die mRNA-Expression in den EV-Zellen sogar um mehr als das 5-fache erhöht war. Insgesamt zeigte die T98G *ARNT*-KO #1 Zellen allenfalls geringe Anstiege der mRNA-Expression der HIF1 α -Zielgene, während die anderen beiden *ARNT*-KO Klone eine stärkere Induzierbarkeit der Gene *SLC2A1*, *HK2*, *LDHA*, *EGLN* und *PDK1* aufweisen. Die Steigerung der mRNA-Expression durch DMOG war in der Kontrolle mit EV am höchsten. Die Veränderungen der mRNA-Expression ließen sich v.a. nach Inkubation mit 1000 μ M DMOG erkennen.

4. Diskussion

4.1 Die Expression der Komponenten des AHR-Komplexes in Glioblastomen ist heterogen

ARNT ist Bestandteil des AHR-Komplexes. Für ein tiefergehendes Verständnis wurde daher zunächst die Expression von Genen, die für Komponenten des AHR-Komplexes kodieren, in Gliomen auf mRNA- und Proteinebene untersucht. Wie in **Abbildung 3** (s.o.) dargestellt wird, exprimierten humane Gliomzelllinien die Gene *AHR*, *AHRR*, *ARNT* und *ARNT2*. Die Expression der einzelnen Gene war in den verschiedenen Zelllinien unterschiedlich. Im Einklang mit den eigenen Ergebnissen (vgl. **3.1**) beschrieben auch Gramatzki et al. *in vitro* eine heterogene Expression von AHR in Gliomzelllinien, wobei ebenfalls hohe AHR-Level in T98G und niedrige in A172 detektiert wurden [28]. *AHRR* wird in der Literatur als Tumorsuppressor gewertet [46, 47]. Sowohl Darmkrebszellen als auch Brustkrebs-, Lungenkrebs- und Magenkrebszellen zeigten eine erniedrigte mRNA-Expression von *AHRR* im Vergleich zu gesundem Gewebe [35]. In den Gliomzelllinien LN229 und T98G wurden jedoch sehr hohe Level von *AHRR* mRNA detektiert, überraschenderweise jedoch nur geringe Level in nicht-neoplastischem Hirngewebe. Es gibt also Zelltyp-spezifische Unterschiede in der Expression und vermutlich auch in der Funktion von *AHRR*.

Gliomzelllinien mit einer niedrigen mRNA-Expression von *ARNT* (A172, SNB19, U87) zeigten ebenfalls eine niedrige mRNA-Expression von *ARNT2*. Ähnlich verhielt es sich bei den Gliomzelllinien LN229, T98G und TP365MG, die alle eine relativ hohe mRNA Expression von *ARNT* und *ARNT2* aufweisen. Zusätzlich dazu war *ARNT2* in allen Gliomzelllinien sehr viel niedriger als in nicht-neoplastischem Hirngewebe (NB) exprimiert. Die Expression von *ARNT* und *ARNT2* scheint also miteinander zusammenzuhängen. In einer Korrelationsanalyse in humanen Glioblastomen zeigte sich mit $r = 0,45$ eine mäßiggradige Korrelation der Expression der beiden Gene (vgl. **3.2**).

Auffällig war außerdem, dass die Zelllinien A172 und SNB19 kaum mRNA von *AHR*, *AHRR*, *ARNT* und *ARNT2* exprimierten. Die Zelllinien T98G und LN229 exprimierten dagegen alle Gene des AHR-Komplexes verhältnismäßig hoch. Es gibt also ebenfalls Unterschiede zwischen Zelllinien, die für eine unterschiedliche Expression der einzelnen Komponenten des AHR-Komplexes verantwortlich sind. Warum dies so ist, bedarf weiteren Analysen. Bioinformatische Untersuchungen der Korrelationen der

Expression von *ARNT* und den anderen Genen des AHR-Komplexes zeigte in der Serie humaner Glioblastome insbesondere auch zwischen *ARNT* und *AHR* eine Assoziation (vgl. 3.2). Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Expressionsanalysen eine heterogene Expression der Gene des AHR-Komplexes in Gliomzellen. Dies legt eine multifaktorielle Regulation der mRNA-Expression dieser Gene nahe, insbesondere da der AHR in der Zelle als ein Rezeptor für endogene und exogene Liganden fungiert und es der Zelle somit ermöglicht, auf Umwelteinflüsse oder Stoffwechselveränderungen zu reagieren [22].

4.2 Die Expression von *ARNT* in Glioblastomen korreliert nicht mit dem Methylierungsstatus des *MGMT*-Promotors

In der in 3.3 beschriebenen Korrelationsanalyse ließ sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Methylierung des *MGMT*-Promotors und dem Expressionsniveau von *ARNT* mRNA in humanen Glioblastomen nachweisen. Die *MGMT*-Promotormethylierung ist ein positiv prädiktiver Marker für das Ansprechen von IDH-Wildtyp-Glioblastomen auf eine Therapie mit Temozolomid (siehe 1.2). Würde die Methylierung mit der Expression von *ARNT* korrelieren, wäre nicht klar differenzierbar, ob die beschriebenen Ergebnisse (vgl. 3.9) auf den Methylierungsstatus des *MGMT*-Promotors oder die veränderte Expression von *ARNT* zurückzuführen sind. Außerdem muss vor diesem Hintergrund der Vergleich der Zelllinien reflektiert werden, da die Zelllinien LN229 und T98G einen unterschiedlichen *MGMT*-Promotor-Methylierungsstatus aufweisen. In der Zelllinie LN229 ist der Promotor des *MGMT*-Gens methyliert und folglich ist kein *MGMT*-Protein nachweisbar. In der Zelllinie T98G hingegen ist *MGMT* vorhanden [48]. Daher reagierten die Zelllinien unterschiedlich sensitiv auf Temozolomid.

4.3 Limitationen der CRISPR-Cas9-Methode

Die CRISPR-Cas9-Methode bringt, wie in 1.7 beschrieben, viele Vorteile zur Erforschung der Funktion einzelner Gene mit sich. Die Methode ist effizient, kostengünstig, einfach anwendbar sowie mittlerweile vielfach verwendet und damit gut etabliert [49, 50]. Trotzdem gibt es gewisse Grenzen, Probleme und Herausforderungen bei der Anwendung der Methode zu beachten.

Zunächst gilt es zu bedenken, dass Geneditierung auch mit CRISPR-Cas nicht zu 100 % effizient ist. Das heißt es wird immer Zellen geben, die keine CRISPR-Cas

induzierte Mutation aufweisen, was im Falle eines *Knock-out*-Experimentes bedeutet, dass die Zelle das Zielgen noch aufweist und entsprechend exprimiert. Dieses Problem lässt sich beheben, indem Subpopulationen gebildet werden, um einzelne Zellklone voneinander zu trennen. Idealerweise trennt man somit die Zellen mit dem *Knock-out* von den Zellen ohne den *Knock-out* [51, 42]. Sollte man ein Gen editieren, das für die Zelle überlebensnotwendig ist, werden hierbei jedoch nur Subpopulationen überleben, in denen das Gen noch funktionsfähig ist und die Geneditierung somit nicht funktioniert hat. Es sollte ebenfalls beachtet werden, dass editierte Zellen häufig eine verringerte Proliferationsrate und Differenzierungsmöglichkeiten aufweisen als nicht-editierte Zellen [51]. Es ist also nicht möglich, editierte und nicht-editierte Zellen miteinander zu vergleichen. Stattdessen muss man auf Zellen mit einer sgRNA ohne ein definiertes Ziel zurückgreifen, sogenannte *Non-Targeting*-Sequenzen (NT). Außerdem erschwert dies die Produktion von Gen-editierten Zellen bei niedrig effizienter Geneditierung. Hierbei entstehen weniger Zellen der Zellpopulation mit der gewünschten genetischen Veränderung, wobei diese zusätzlich noch Wachstumsnachteile aufweisen. Die Effizienz der CRISPR-Cas Methode hängt stark von DNA-Reparaturmechanismen für die induzierten Doppelstrangbrüche ab, da das System nur einen DNA-Schnitt erzeugt, jedoch die Zelle auf ihre eigenen DNA-Reparaturmechanismen zurückgreifen muss. Diese Reparaturmechanismen können in Zellen unterschiedlich ausgeprägt sein [51]. Entstehen am Beispiel von einem *Knock-out* Experiment Zellen ohne 100 %-igen *Knock-out*, sind diese zwar für weitere Experimente nicht wertlos, jedoch ist es möglich, dass Effekte nicht oder nicht so deutlich sichtbar sind, wie sie es in einer Zellpopulation ohne vorhandenes Restprotein wären. Vor diesem Hintergrund müssen auch die in **Kapitel 3** beschriebenen Ergebnisse reflektiert werden. Wie in **3.4** beschrieben, wiesen in der Zelllinie LN229 alle Zellklone ein Restprotein auf, während in der Zelllinie T98G ein Zellklon ohne Restprotein folglich mit 100 %-igem *Knock-out* entstanden ist. Dieser zeigte in **3.9**, **3.12** und **3.13** andere Eigenschaften als die anderen Zellklone.

Ein weiteres Problem bei allen genmodifizierenden Systemen sind Genmutationen, die auch an ungewünschten Stellen auftreten, so genannte *Off-Target*-Effekte. *Off-Target*-Effekte sind bei der CRISPR-Cas Methode häufig und müssen möglichst gering gehalten werden, um in Experimenten präzise Ergebnisse zu erzielen sowie bei einer möglichen Anwendung am Patienten Sicherheit zu garantieren [51]. Um potentielle *off-Targets* zu erkennen und diese zu reduzieren, ist das Designen der sgRNA, die für die

Erkennung der richtigen Gensequenz des Cas-Protein zuständig ist (siehe 1.7), essentiell. Es werden komplexe computerbasierte Simulationen verwendet, um mögliche *off-Targets* anhand von strukturellen Ähnlichkeiten sowie der Lokalisation des gewünschten Ziels zu bestimmen und somit die sgRNA möglichst passend zu erstellen. Jedoch ist es hierbei wichtig, zu beachten, dass nicht jedes *off-Target* einen Effekt hat und das Cas-Protein nicht an jedem potentiellen *off-Target* eine Mutation erzeugt. Leider gibt es keine großen Studien über die Genauigkeit der Vorhersagen von verschiedenen sgRNA Design-Tools. Dennoch sind Kontrollmöglichkeiten von *off-Target* Mutationen vorhanden. Tsai et al. [52] schlagen hierfür die Verwendung mehrere sgRNAs mit demselben Ziel vor, da die *off-Target* Mutationen nicht zufällig passieren, sondern im direkten Zusammenhang mit der Zielsequenz stehen. Außerdem wäre es möglich die vorhandenen Ergebnisse zu validieren, indem die genetische Veränderung wieder umgekehrt wird. Im Falle eines *Knock-outs* müsste die Funktion des Gens also wiederhergestellt werden [52].

Zusätzlich dazu spielt auch die Methode, mit der die Plasmide in die Zellen eingebracht werden eine wichtige Rolle, die sogenannte *Delivery*-Methode. Besonders bei der *in vivo* Geneditierung müssen die Zielzellen möglichst effektiv erreicht werden und eine möglichen Zytotoxizität verhindert werden [51]. In den hier beschriebenen Experimenten wurde eine lentivirale Transfektionsmethode gewählt, da diese eine stabile Expression von Cas9 und der sgRNA in vielen Säugetierzellen ermöglicht [42, 53].

Zusammenfassend bietet die CRISPR-Cas Methode eine effiziente Möglichkeit, die Relevanz bestimmter Gene *in vitro* und *in vivo* zu erforschen, wobei die Ergebnisse vor dem Hintergrund von potentiell unvollständiger Geneditierung sowie möglichen *off-Target* Mutationen kritisch reflektiert werden sollten.

4.4 ARNT-Knock-out verringert die Expression des AHRR und ARNT2 in LN229 und T98G Glioblastomzellen

Die Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalyse von *AHR*, *AHRR* und *ARNT2* in *ARNT-Knock-out*-Zellen (**Abbildung 8** in 3.5) zeigten, dass auf mRNA-Ebene beide Zelllinien eine reduzierte Expression von *AHRR* und *ARNT2* mRNA aufwiesen. Die Expression von *ARNT*, *AHRR* und *ARNT2* könnte also miteinander zusammenzuhängen. Da die Transkription von *AHRR* durch die Bindung des AHR/ARNT-Dimers induziert wird, ist

dieser Zusammenhang plausibel und wird im Kontext mit der Induzierbarkeit von AHR Target-Genen in **4.10** weiter diskutiert.

Auf Proteinebene zeigt sich in der Zelllinie T98G ebenfalls eine verringerte Expression von AHR, nicht jedoch in der Zelllinie LN229. Es ist also möglich, dass sich die Regulationsmechanismen in den Zelllinien unterscheiden. Was sich jedoch nicht zeigte, war eine kompensatorische Erhöhung der Expression von *ARNT2* bei Verlust der Expression von *ARNT*. Dies wäre denkbar, da *ARNT* und *ARNT2* strukturell sehr ähnlich sind. Die Proteine von *ARNT* und *ARNT2* unterscheiden sich nur in einer Aminosäure [54]. Je nach dem Liganden, der AHR aktiviert, können entweder *ARNT*, *ARNT2* oder sogar beide an AHR binden [55]. Bindet Benzyapyren an AHR bilden sich hauptsächlich AHR/*ARNT*-Dimere [55]. Bei Exposition mit TCDD können sowohl AHR-*ARNT*- als auch AHR-*ARNT2*-Dimere gebildet werden [55]. Das unterschiedliche Bindungsverhalten von AHR/*ARNT* und AHR/*ARNT2* wird einer einzigen Aminosäurevariation zwischen *ARNT* und *ARNT2* zugeschrieben [54, 20]. Es wurde nachgewiesen, dass unter Stimulation mit TCDD bei Fehlen von *ARNT* das *CYP1A1* Gen als AHR-Zielgen nicht induziert werden kann [55]. Sekine et al. zeigten, dass *ARNT2* die Funktion von *ARNT* in Hypoxie-induzierten Signalwegen, jedoch nicht in Xenobiotika-induzierten Regulationsmechanismen, kompensieren kann [54]. Analog konnte mit Hilfe eines *Knock-downs* von *ARNT2* neben einer verringerten Expression von Transkriptionsfaktoren, die als Marker für Malignität verwendet werden, eine Hochregulation von *ARNT* nachgewiesen werden. Es ergab sich jedoch kein Anhalt dafür, dass *ARNT* in diesem Falle das Fehlen von *ARNT2* kompensieren konnte [56]. *ARNT* und *ARNT2* sind also trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit keineswegs gegeneinander austauschbar. Sowohl die o. g. Ergebnisse als auch die weiteren genannten Quellen belegen eine komplexe Regulation der Effekte von *ARNT* und *ARNT2*. Bei einer therapeutischen Inhibition von *ARNT* scheint es diesen Ergebnissen zufolge eher unwahrscheinlich, dass *ARNT2* diese Effekte vollständig aufheben könnte.

4.5 ARNT hat keinen Einfluss auf die Proliferationsfähigkeit unter normoxischen Bedingungen

Im Allgemeinen lässt sich das Wachstum von Zellen in Kultur in 4 Phasen unterteilen. In der Lag-Phase findet zunächst kaum Wachstum statt, da sich die Zellen an das neue

Medium und die Kulturbedingungen gewöhnen müssen. In der Log-Phase steigt die Zellzahl dann exponentiell an, bevor das Wachstum in eine stationäre Phase übergeht. Gehen der Platz und die Nährstoffe zur Neige, beginnen die ersten Zellen abzusterben. Damit geht das Zellwachstum in die letzte Phase, die Absterbephase, über [57]. Maligne entartete Zellen, wie es Gliomzellen sind, haben häufig die Eigenschaft, stark und schnell zu proliferieren.

Wie in **Abbildung 9** dargestellt, konnte kein Einfluss von ARNT auf die Proliferationsfähigkeit in LN229 und T98G nachgewiesen werden. Obwohl sich die Wachstumskurven minimal unterschieden, zeigen die Zellen mit *ARNT-Knock-out* keinen Unterschied in der Verdopplungszeit im Vergleich zu den Kontrollen. In Hela Zellen, sowie auch in kolorektalen Krebszellen konnte jedoch ein deutlicher Einfluss von ARNT auf die Proliferationsaktivität nachgewiesen werden. ARNT wies in beiden Experimenten positiv proliferative Eigenschaften auf [58, 59]. Da sich dieses Ergebnis in den untersuchten Gliomzellen nicht replizieren ließ, besteht die Möglichkeit, dass die proliferativen Eigenschaften von ARNT abhängig vom Zelltyp oder vom *Microenvironment* sind. Dies ist zum einen dadurch plausibel, dass ARNT in Kooperation mit AHR eine wesentliche Rolle bei zellulären Reaktionen auf endogene Liganden spielt [22]. In Gliomen konnte nachgewiesen werden, dass AHR einen positiven Einfluss auf die Zellproliferation hat [24, 60]. Zum anderen dimerisiert ARNT ebenfalls mit HIF1- α und somit kann der Sauerstoffgehalt im *Microenvironment* von Tumoren ebenfalls auf ARNT-vermittelte Signalwege einen Einfluss haben [61, 62].

Shi et al. stellten die Hypothese auf, dass ARNT vor allem in frühen Tumorstadien einen Einfluss auf das Zellwachstum in Tumoren hat [63]. Diese Beobachtung lässt sich damit erklären, dass es hypoxische Konditionen in Tumoren vor allem in frühen Tumorstadien gibt, bevor sich neue Blutgefäße bilden konnten [64]. Aufgrund dessen erhofften sich Li et al. auch ein besseres Ansprechen von Tumoren in frühen Stadien auf eine Inhibition von HIF1- α als im weiteren Wachstumsverlauf [65]. Somit ist es möglich, dass die positiv proliferativen Effekte von ARNT in den durchgeführten Experimenten nicht zur Darstellung kamen, da die Zellen nicht unter hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden. Es sind weitere Untersuchungen notwendig, um festzustellen, ob ARNT unter hypoxischen Bedingungen die Zellproliferation von Gliomzellen beeinflussen kann.

4.6 ARNT erhöht das klonogene Überleben von Glioblastomzellen

Auch wenn kein Effekt von ARNT auf die Proliferationsfähigkeit von Glioblastomzellen nachgewiesen werden konnte, zeigte sich trotzdem ein Einfluss auf das klonogene Überleben (**Abbildung 12** in **3.7**). In der Zelllinie LN229 wies der *ARNT-Knock-out* eine signifikant geringere Anzahl von Kolonien und eine reduzierte *Plating efficiency* im Vergleich zur Kontrolle auf. Eine ähnliche Tendenz war ebenfalls in der Zelllinie T98G nachweisbar, der Unterschied zur Kontrolle war jedoch hier nicht signifikant. ARNT hat folglich einen positiven Einfluss auf das klonogene Überleben von Glioblastomzellen.

Von Opitz et al. [24] und Gramatzki et al. [26] wurde zudem ein positiver Effekt von AHR auf das klonogene Überleben von Glioblastomzellen beschrieben, d.h. es konnte ein verringertes klonogenes Überleben bei Gabe eines AHR-Inhibitors nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu wurde das klonogene Überleben durch Aktivierung des AHR erhöht [24, 26]. Der in **3.7** beschriebene Effekt von ARNT auf die Fähigkeit zur Bildung von Kolonien könnte also durch AHR/ARNT-vermittelte Signalwege zustande kommen.

4.7 ARNT hat keinen Einfluss auf die Seneszenz von Glioblastomzellen

Als Seneszenz bezeichnet man ein Stadium im Lebenszyklus einer Zelle, in dem die Zelle nicht mehr in der Lage ist, sich zu teilen. In der Regel geht jede Zelle nach einer bestimmten Anzahl von Zellteilungen in die replikative Seneszenz. Faktoren, die für den Eintritt in die Seneszenz verantwortlich sind, sind unter anderem die Länge der Telomere, freie Radikale und DNA-Schäden [66].

Anhand des Nachweises des mRNA-Expressionsniveaus des Gens *β -Galaktosidase* (**Abbildung 13** in **3.8**) zeigte sich in den *ARNT-Knock-out*-Zellen der Glioblastomzelllinien LN229 und T98G keine verstärkte Seneszenz. Seneszenz ist sowohl im Rahmen der Tumorentstehung, als auch im Zusammenhang mit Tumortherapie relevant. DNA-Schäden sowie Seneszenz können über chronische Entzündungsreaktionen die Tumorentstehung begünstigen [20, 67]. In der Tumortherapie sind seneszente Zellen bedeutsam, da diese durch fehlendes Wachstum resistent gegenüber den klassischen Chemotherapeutika sind und somit nicht abgetötet werden können [66]. Es gibt Mechanismen, über welche diese seneszenten Zellen wieder in den Zellzyklus eintreten und erneut proliferieren können [68]. Interessanterweise konnte in Zellen, die in Seneszenz gehen, eine stark erhöhte

Expression von AHR nachgewiesen werden. Dies wird als Reaktion der Zelle, die Zellproliferation wiederherzustellen, um so der Seneszenz zu entgehen, gedeutet [69, 70]. Auch Temozolomid induziert Seneszenz bei Durchführung einer Chemotherapie. Das Polyphenol Resveratrol, das als Kombinationstherapeutikum für eine Temozolomid-Behandlung getestet wurde, erhöhte in Kombination mit Temozolomid nicht nur den Anteil seneszenten Zellen sondern sorgte ebenfalls für eine zusätzliche Toxizität gegenüber Krebszellen [71]. Dies unterstreicht die Relevanz der Seneszenz für das Therapieansprechen von Gliomen.

4.8 Vollständiger Verlust der ARNT-Proteinexpression führt zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Temozolomid

Wie in **3.9** dargestellt wird, reagierten die getesteten Glioblastomzelllinien unterschiedlich sensitiv auf das Chemotherapeutikum Temozolomid. In der Zelllinie LN229 konnte kein Unterschied im Ansprechen zwischen den *ARNT-Knock-outs* und den Kontrollen nachgewiesen werden, wobei dies möglicherweise auch durch den nicht vollständigen *Knock-out* von *ARNT* in dieser Zelllinie zu erklären sein könnte. Wie in **Abbildung 15** ersichtlich, zeigte sich zwischen den Zellklonen von T98G *ARNT-KO* eine große Varianz der Zellviabilität nach Behandlung mit Temozolomid. Deswegen wurde in **Abbildung 16** das in **3.9** beschriebene Experiment einzeln nach den Zellklonen aufgeteilt dargestellt. Bei der erneuten Auswertung fiel auf, dass Klon #1 sensitiver auf Temozolomid reagiert als die anderen getesteten Zellklone. Dieser Zellklon wies im Westernblot keine Expression von ARNT mehr auf (**Abbildung 7** in **3.4**). Bei vollständigem Verlust von ARNT-Protein reagierten die Zellen der Zelllinie T98G folglich sensitiver auf Temozolomid. Anhand von weiteren *ARNT-Knock-out* Klonen ließ sich diese Hypothese bestätigen (**Abbildung 21**).

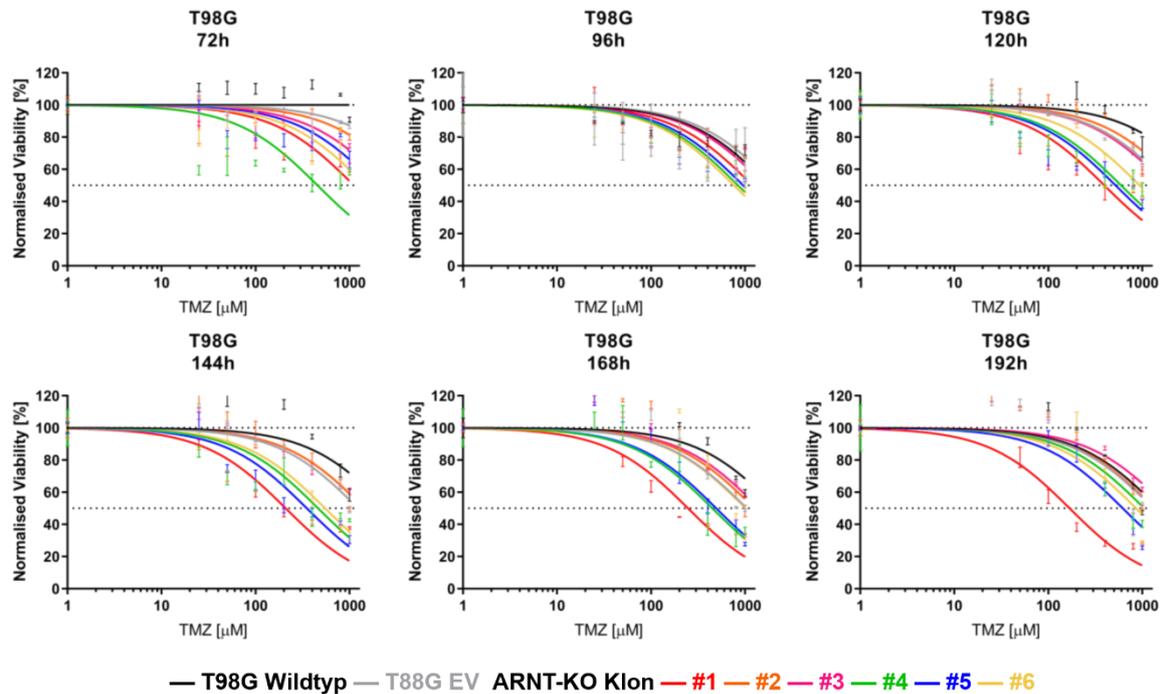


Abbildung 21: Dargestellt ist die Zellviabilität von T98G mit *ARNT-Knock-out* im Vergleich zur *Empty-Vector*-Kontrolle (EV) und zum Wildtyp, die mit steigenden Konzentrationen (0, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 μM) TMZ behandelt wurden. Die Viabilität der behandelten Zellen wurden mittels MTT-Assays nach 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 168 h und 192 h bestimmt. Dargestellt sind Dosis-Wirkungskurven für jede Zelllinie, die mit der Software GraphPad Prism extrapoliert wurden. Dabei entsprechen die Zellklone #1, #2, #3 den bereits in 3.4 – 3.13 beschriebenen Zellklonen. Bei den Zellklonen #4, #5, #6 handelt es sich um weitere erstellte Zellklone (zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Christiane Knobbe-Thomsen), die ebenfalls kein ARNT-Protein im Westernblot aufwiesen.

Es ließ sich folglich nachweisen, dass die Gliomzellen bei einem vollständigen Fehlen von ARNT-Protein sensitiver gegenüber Temozolomid sind. Dieser Effekt scheint bei residualer ARNT-Proteinexpression nicht vorhanden zu sein. Die Restaktivität des Proteins von ARNT ist folglich wesentlich für das Ansprechen auf das Chemotherapeutikum. Interessant ist weiterhin die Frage, über welchen Mechanismus ARNT einen Einfluss auf die Effektivität der Temozolomid-Chemotherapie nehmen kann und ob ARNT ein mögliches therapeutisches Ziel zur Verbesserung der Therapiesensitivität in Gliomen sein könnte.

Auch die veränderte Genexpression in Temozolomid-resistenten Zellen unterstreicht die Relevanz des AHR-Komplexes hinsichtlich der Chemotherapiesensitivität (**Abbildung 17** in **3.10**). In der Zelllinie LN229 zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Expression von *AHR* mRNA in den TMZ-resistenten Zellen. In der Zelllinie LN18 erhöhte sich die mRNA-Expression von *AHRR* signifikant in den resistenten Zellen. Die Expression von *ARNT* mRNA war in Temozolomid-resistenten Zellen tendenziell erhöht, jedoch nicht statistisch signifikant. Folglich könnte eine Inhibition von ARNT zu einer erhöhten Therapiesensitivität von Glioblastomzellen gegenüber Temozolomid

führen.

Bisher konnte nachgewiesen werden, dass ARNT die Wirkung verschiedener Chemotherapeutika beeinflusst und außerdem eine Rolle bei der Resistenzentwicklung ihnen gegenüber spielt. Huang et al. berichteten über eine reduzierte Expression von ARNT in Krebszellen nach Behandlung mit Cisplatin, Doxorubicin und Paclitaxel [58]. Diese reduzierte Expression von ARNT korrelierte mit stärkeren zytotoxischen Effekten in Cisplatin-sensitiven Zellen, während eine Reduktion von ARNT in Cisplatin-resistenten Zellen diese ebenfalls sensitiver machte [72]. Dieser Effekt wurde mit einer verringerten mitochondrialen Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch ARNT erklärt [59]. Oxidativer Stress, also die Bildung von ROS, spielen neben dem in 1.2 beschriebenen Hauptwirkmechanismus von Temozolomid ebenfalls eine Rolle für die Zytotoxizität und Wirksamkeit des Medikaments [73, 74]. In Temozolomid-resistenten Zellen konnte keine Produktion reaktiver Sauerstoffspezies nach Behandlung mit Temozolomid nachgewiesen werden. Bei Erhöhung des oxidativen Stresses, konnte jedoch eine Sensitivität erreicht werden [74]. Die beobachtete erhöhte Sensitivität auf Temozolomid bei vollständigem Verlust von ARNT lässt sich also möglicherweise durch einen erhöhten oxidativen Stress in den Tumorzellen erklären. Unterstützen lässt sich diese These dadurch, dass eine Aktivierung von HIF1- α zu einer Verringerung von ROS führt, indem es Zellen durch die Induktion von PDK1 vor oxidativem Stress schützt und eine hohe Expression des Faktors mit einer Therapieresistenz assoziiert ist [75]. Zusätzlich zur Reduktion von oxidativem Stress beeinflusst HIF1- α die Sensitivität gegenüber Temozolomid durch die Expression von MGMT. So konnte *in vitro* in Gliomzellen Zellen mit *Knock-down* von HIF1- α eine erhöhte Sensitivität gegenüber Temozolomid durch verringerte Expression von MGMT nachgewiesen werden [76, 75, 77]. Die Ergebnisse zeigen, dass die Temozolomid-Sensitivität von Gliomzellen durch fehlende Expression von ARNT erhöht wird, wobei HIF1- α und die Bildung von ROS bei diesem Effekt wahrscheinlich eine Rolle spielen.

4.9 Vollständiger Verlust von ARNT-Protein verändert den zellulären Phänotyp

Wie in 3.6 beschrieben und in **Abbildung 11** zu sehen ist, unterschieden sich die Zellklone T98G *ARNT*-KO #1 optisch sowohl von den anderen Zellklonen mit *ARNT*-*Knock-out* als auch von den Kontrollzellen. Die Zellen des Klons #1 zeigten

überwiegend eine spindelförmige Konfiguration mit bipolaren Fortsätzen, während die Zellen der anderen Klone eher dreieckig imponierten. Auch die Kolonien des T98G *ARNT*-KO #1 mit dem vollständigem Proteinverlust waren größer (**Abbildung 12** in **3.7**). Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die spindelförmigen Zellen eine größere Oberfläche aufweisen als die nicht-spindelförmigen Zellen. Mit Hilfe von weiteren erstellten Zellklonen mit *ARNT-Knock-out* konnte die Veränderung des Phänotyps ebenfalls lichtmikroskopisch nachgewiesen werden. Diese morphologischen Veränderungen bei fehlender *ARNT*-Expression wurden auch von Huang et al. [58] in Melanom- und Adenokarzinomzellen beobachtet. Es wurde nachgewiesen, dass bei dem Verlust von *ARNT* der Fibronectin/Integrin/FAK-Signalweg aktiviert wird. Diese Aktivierung führt zusätzlich zu einer veränderten Zellmobilität und somit zu einer erhöhten Fähigkeit zur Migration und Invasion. Für Krebszellen ist dieser Signalweg daher wichtig für die Metastasierung [58]. Es wurde nachgewiesen, dass Hypoxie ähnliche morphologische Veränderungen in Glioblastomzellen induzieren kann [78]. Ein *Knock-out* von HIF1- α kann diesen Effekt unterdrücken [79], während ein *ARNT-Knock-out* diesen induziert. Es ist also anzunehmen, dass die Veränderungen der Zellmorphologie, die mit erhöhter Invasivität und Migrationsfähigkeit assoziiert sind, sowohl durch *ARNT* als auch *ARNT*-unabhängig über HIF1- α vermittelt werden.

4.10 *ARNT* ist relevant für AHR-vermittelte Signalwege in Glioblastomzellen

ARNT ist als Dimerisierungspartner von AHR und HIF1- α ein wichtiger Bestandteil der in **1.4** beschriebenen Signaltransduktion. Die essentielle Rolle, die *ARNT* bei der AHR-Signaltransduktion in Gliomen spielt, kann anhand der Expression und Induzierbarkeit von AHR-Zielgenen wie *CYP1A1* und *AHRR* evaluiert werden. Wie in **Abbildung 18** in **3.11** deutlich wird, sind *CYP1A1* und *AHRR* in der Zelllinie T98G mit *ARNT-Knock-out* stark reduziert. *ARNT* scheint folglich für die Expression beider Gene in dieser Zelllinie relevant zu sein. Ein Ligand des AHR ist 3-Indoxylkaliumsalz (3-ISP). 3-ISP ist ein potenter, direkter AHR-Agonist und kann AHR-Zielgene wie *CYP1A1* und *AHRR* signifikant induzieren [45]. Die Induzierbarkeit von *AHRR* und *CYP1A1* ist im Allgemeinen miteinander vergleichbar [80]. Jedoch kann es zu Abweichungen bei der Stärke der Induktion kommen, die durch die unterschiedliche Affinität des AHR/*ARNT*-Heterodimers an die jeweiligen Elemente der DNA zustande kommen [80].

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Schroeder et al. [81] ließen sich die Gene *CYP1A1* und *AHRR* in der Zelllinie HepG2 Zellen induzieren (**Abbildung 19A, Kapitel 3.12**). Die mRNA-Expression von *CYP1A1* in *ARNT-Knock-out* Glioblastomzellen war sehr gering und ließ sich auch durch 3-ISP kaum steigern, während die Kontrollzellen eine ca. 5-fache Induktion aufwiesen. Tsuchiya et al. [80] konnten eine Abhängigkeit von der Menge konstitutiv exprimierten AHRRs und der reziproken Induzierbarkeit eben dieses nachweisen. In Zellen mit sehr hohen AHRR-Leveln ließ sich AHRR demzufolge nicht induzieren [80]. Obwohl auch die Zelllinie T98G im Vergleich zu anderen Gliomzelllinien AHRR hoch exprimiert (**Abbildung 3 in 3.1**), war die Expression in T98G nach *ARNT-Knock-out* deutlich reduziert (siehe **Abbildung 18 in 3.11**). Daher war die Induktion von *AHRR* in der Kontrolle auch deutlich sichtbar. Im Vergleich dazu ließ sich die mRNA-Expression von *AHRR* in *ARNT-Knock-out* Glioblastomzellen zwar leicht erhöhen, doch die mRNA-Level blieben in den *ARNT-Knock-out* Zellen trotzdem sehr gering. Die geringfügige Erhöhung der mRNA-Expression nach *ARNT-Knock-out* kann ein Hinweis auf andere Transkriptionsfaktoren sein, die die Transkription von *CYP1A1* und *AHRR* regulieren können. Für die Induktion von *CYP1A1* wurden einige AHR-unabhängige Signalwege beschrieben. In Medulloblastomen konnte zum Beispiel nachgewiesen werden, dass *CYP1A1* und andere CYP450 Isoenzyme AHR-unabhängig exprimiert werden [82]. Außerdem konnte eine Behandlung der Zellen mit Serum AHR-unabhängig die Expression von *CYP1A1* in kolorektalen Adenokarzinomzellen induzieren [83, 84]. Die genauen Signalwege sind bislang unzureichend charakterisiert. Kandidaten, die die Expression von *CYP1A1* ebenfalls regulieren könnten, sind unter anderem der *Retinoic acid receptor*, Tyrosinkinasen, sowie der *Peroxisome proliferator-activated receptor* [85, 86]. AHRR wird neben AHR auch durch NFκB reguliert [87, 88]. Letzteres kann wiederum u.a. durch 3-ISP induziert werden [89].

Die Ergebnisse in **Abbildung 19** zeigen insgesamt, dass bei vollständigem Verlust des ARNT-Proteins in T98G-Glioblastomzellen die Induktion von *CYP1A1* und *AHRR* kaum möglich ist. Die Signaltransduktion von AHR und die AHR-vermittelten Effekte in Gliomen lassen sich also durch das Fehlen von ARNT unterbrechen. Im Einklang damit konnten Gramatzki et al. nachweisen, dass ARNT ein limitierender Faktor für die Aktivität des AHR in einigen Glioblastomzelllinien ist [26]. Die Daten bestärken weiterhin die Argumentation in **4.4**, dass ARNT2 bei Verlust von ARNT dessen Funktion nicht kompensieren kann. Zusammenfassend ist ARNT für AHR-vermittelte

Signalwege in Gliomen, zumindest in der Zelllinie T98G, notwendig.

4.11 ARNT ist relevant für HIF1- α vermittelte Signalwege in Glioblastomzellen

Da ARNT ebenfalls mit HIF1- α dimerisiert, wird im Folgenden die Bedeutung von ARNT für HIF1- α -vermittelte Signalwege in Gliomen diskutiert. Im Kontext von HIF1- α wird ARNT häufig auch als HIF1- β bezeichnet [90]. Der Transkriptionsfaktor HIF1- α ist der zentrale Baustein in der zellulären Antwort auf Hypoxie und spielt eine Rolle bei der Regulation des Zellmetabolismus (siehe 1.6). Durch HIF1- α -vermittelt werden u.a. die Gene *SLC2A1* (*GLUT1*), Hexokinase 2 (*HK2*), Laktatdehydrogenase A (*LDHA*) und Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase 1 (*PDK1*) induziert [90, 91]. Dimethyloxalylglycin (DMOG) ist ein Inhibitor der Prolyl- und Asparaginy-Hydroxylase (PAH) und sorgt für eine Akkumulation von HIF1- α [92]. Somit kann der Effekt von Hypoxie auf Zellen imitiert werden [93].

Bei *SLC2A1/Glut1* fiel auf, dass keine Veränderung der Expression durch DMOG nach *ARNT-Knock-out* in Glioblastomzellen sichtbar war. Daher wird *SLC2A1* in T98G-Zellen wahrscheinlich selektiv über HIF1- α /HIF1- β (ARNT) reguliert. Wie auch in 4.10 beschrieben, kann die geringe Steigerung der mRNA-Expression von *HK2*, *LDHA*, *EGLN1* und *PDK1* in den *ARNT-Knock-out*-Zellen dadurch erklärt werden, dass es zu einem geringen Anteil auch HIF1- α -unabhängige Induktionswege gibt. Beispielsweise wird die Expression von *HK2* ebenfalls über den Akt/mTOR-Signalweg beeinflusst [94]. Auch die Expression von *EGLN1* wird nicht ausschließlich durch HIF1- α , sondern ebenfalls durch den Östrogen- und Androgen-Rezeptor reguliert [95]. Insgesamt zeigen die in **Abbildung 20** dargestellten Daten, dass in T98G-*ARNT-Knock-out*-Zellen durch DMOG-Behandlung die Gene *SLC2A1*, *HK2*, *LDHA*, *EGLN1* und *PDK1* nicht bzw. kaum induziert wurden. ARNT, als Dimerisierungspartner von HIF1- α , ist folglich notwendig für die HIF1- α -vermittelte Induktion der o.g. Gene in dieser Glioblastomzelllinie. Im Einklang damit konnten Wood et al. ebenfalls an *ARNT*-defizienten Hepatom-Zellen nachweisen, dass ARNT eine Schlüsselrolle bei vielen HIF1- α vermittelten Signalwegen spielt [61]. Die Relevanz von ARNT für HIF1- α abhängige Signalwegen kann man sich im Rahmen von neuen therapeutischen Strategien zu Nutze machen (siehe 4.12).

4.12 ARNT bildet als Schnittstelle von AHR- und HIF1- α -vermittelter Signaltransduktion in Gliomen ein potentielles Ziel für neue therapeutische Strategien

ARNT stellt einen zentralen Knotenpunkt in der Signaltransduktion von AHR- und HIF1- α in Gliomen dar (siehe 4.10 und 4.11). Aufgrund der Relevanz dieser Signalwege in der Pathophysiologie von Gliomen im Besonderen und Tumoren im Allgemeinen, könnte ARNT als ein zentraler Ansatzpunkt für eine zielgerichtete Therapie fungieren. Im Folgenden werden einige bereits bestehende Therapiestrategien, die AHR- bzw. HIF1- α -vermittelte Signalwege involvieren, sowie ihre Signifikanz für die Therapie von Gliomen erläutert. Auf Grundlage dessen werden Vor- und Nachteile einer möglichen therapeutischen Inhibition von ARNT diskutiert.

ARNT ist notwendig für AHR-vermittelte Effekte in Glioblastomen (siehe 4.10 und 4.11). AHR werden je nach Tumor, Spezies und experimentellen Gegebenheiten (*in vivo* vs. *in vitro*) sowohl positive als auch negative kanzerogene Effekte zugeschrieben. Glioblastome zeigen eine hohe Expression von AHR (siehe 4.1), sodass therapeutisch hier am ehesten AHR-Antagonisten der vielversprechendste Ansatz sind [96].

Eine wichtige Rolle spielt die immunmodulatorische Funktion von AHR. So konnte nachgewiesen werden, dass über Kynurenin aktivierter AHR zu einer Hochregulation von *Programmed cell death protein 1* (PD1) führt und somit eine Inhibition des AHR-Signalweges eine pharmakologische Alternative zu herkömmlichen PD1-Inhibitoren wie Pembrolizumab darstellt [97]. Bei der Therapie von Glioblastomen ist die Datenlage zur Effektivität jedoch diskrepant. Eine neoadjuvante Immuntherapie kann die Überlebenszeit verbessern, jedoch konnten mehrere Studien keine positiven Effekte der herkömmlichen immunmodulatorische Therapie in Gliomen nachweisen, sodass neue Ansätze zu der vielfach erfolgreich in anderen Tumoren verwendeten immunmodulatorischen Therapie notwendig sind [98–100].

Auch Resveratrol hat positive Effekte auf die Therapie von Glioblastomen, da es die Toxizität von Temozolomid erhöht [71]. Diese Effekte können ebenfalls zum Teil auf einen Antagonismus am AHR zurückgeführt werden [96, 101]. Eine weitere therapeutische Strategie ist die Anwendung von selektiven AHR-Rezeptor Modulatoren (kurz SAHRms). SAHRms sind AHR-Liganden, die gewebespezifisch agonistische oder antagonistische Effekte aufweisen [102]. Beispiele hierfür sind bekannte Substanzen wie Atorvastatin, Leflunomid oder Omeprazol. Jin et al. [103] veröffentlichten 2020 eine Studie zur möglichen Anwendung von Omeprazol in

Glioblastomen. Dieses inhibiert nachweislich das Zellwachstum, die Migration und Proliferation. Angewendet wird das Medikamente bereits in der onkologischen Therapie von Pankreaskarzinomen und Mammakarzinomen, wobei bei letzteren ebenfalls die Interaktion mit AHR und Östrogen-Rezeptoren ausgenutzt wird [97, 103]. Eine Kombination von Omeprazol und Temozolomid konnte die o.g. Effekte verstärken, was das Potential von AHR-Signalwegen als therapeutisches Ziel in der Therapie von Gliomen zeigt [103].

Insgesamt zielen diverse neue therapeutische Strategien zur Therapie von Gliomen auf die Beeinflussung des AHR-Signalweges ab. Jedoch spielt noch keiner der o.g. Ansatzpunkte im klinischen Alltag eine relevante Rolle. Neben den genannten AHR-abhängigen Prozessen, ist ARNT ebenfalls relevant für die HIF1- α -vermittelte Signaltransduktion (siehe 4.11). Zusätzlich zur pathogenetischen Rolle von HIF1- α in der Malignität und Progression von Tumoren (siehe 1.6), spielt HIF1- α eine wichtige Rolle für das Ansprechen von Tumoren auf Therapie. Hypoxische Tumorareale sind aus mehreren Gründen weniger sensitiv gegenüber zytoreduktiver Therapie [104]. Zunächst besteht eine geringere Bioverfügbarkeit von Therapeutika durch eine Minderperfusion. In hypoxischen Tumorbereichen findet kaum Proliferation statt, sodass viele Agenzien, die hauptsächlich auf sich teilende Zellen abzielen, nicht wirksam sind. Außerdem basiert der zytotoxische Effekt vieler Chemotherapeutika - wie auch Temozolomid (siehe 4.8) - aber auch der Radiotherapie auf der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies. Die Level von ROS werden durch HIF1- α verringert und ein wesentlicher Wirkmechanismus des therapeutischen Ansatzes fällt weg [104, 105]. Eine therapeutische Inhibition des HIF1- α Signalweges kann folglich potentiell über eine Erhöhung von oxidativem Stress und eine veränderte Expression von *MGMT* (siehe 4.8) die Sensitivität von Gliomen gegenüber einer Therapie mit Temozolomid beeinflussen. Verschiedene Strategien zur Inhibition des HIF1- α Signalweges sind Gegenstand der aktuellen Forschung. Ansatzpunkte hierbei sind u.a. *Small molecules* als direkte HIF1- α -Inhibitoren und Inhibitoren von HIF1- α -induzierten Genen wie *VEGF* oder *PDK1* [75, 106]. Ein weiterer therapeutischer Ansatz ist die Reduktion von Hypoxie, zum Beispiel durch hyperbare Sauerstofftherapie oder Erhöhung der O_2 - Level durch Sauerstofftransporter wie Hämoglobinderivate, Fluorocarbone oder dem aktuell in Phase II der klinischen Prüfung befindlichem Radio- und Chemotherapiesensitizer NVX-108 [107]. Auch das Ausnutzen der Hypoxie für eine gezielte Therapie durch Hypoxie-aktivierte *Prodrugs* stellt einen neuen Ansatzpunkt

in der Therapie dar [105, 107].

Aktuelle Studien unterstreichen die Relevanz des Zusammenhangs von Temozolomid-Sensitivität, oxidativem Stress und ARNT-Expression in Glioblastomen durch den Einsatz des Chemotherapiesensitizer Curcumin [108]. Curcumin sorgt in Kombination mit Temozolomid für eine erhöhte Produktion von ROS [59]. Außerdem sorgt es für den proteasomalen Abbau von ARNT und damit zu einer Inhibition von HIF1- α vermittelter Gentranskription, was die Schlüsselrolle von ARNT hervorhebt [109].

Geht man in dem AHR- und HIF1- α -Signalweg einen Schritt weiter, kann die Signaltransduktion von AHR und gleichzeitig von HIF1- α auch durch eine Inhibition von ARNT unterbrochen werden. Dieser therapeutische Ansatz hätte zusätzlich den Vorteil, dass auch Effekte des HIF1- α Subtypen HIF2- α unterdrückt werden können, da ARNT als Dimerisierungspartner beider Faktoren fungiert [110]. Obwohl die Datenlage bezüglich der Rolle von HIF2- α uneinheitlich ist, ist es möglich, dass dies für einen therapeutisch Effekt relevant ist, da eine Inhibition von HIF1- α allein nicht ausreichend und die Inhibition von ARNT somit effektiver sein könnte [63]. Außerdem weisen HIF1- α und AHR einige Gemeinsamkeiten auf, sodass synergistische Effekte der beiden Faktoren wahrscheinlich sind, die beide durch ein Fehlen von ARNT unterdrückt werden könnten. Sowohl AHR als auch HIF1- α sind an der zellulären Reaktion auf Veränderungen des Mikroenvironments beteiligt. Beide binden an denselben Dimerisierungspartner (ARNT) und binden ebenfalls beide das Chaperon HSP90. Zusätzlich dazu modulieren sie beide *den Immunescape* der Tumorzellen [111].

Eine wichtige mögliche Schwäche der Inhibition von ARNT ist jedoch, dass sowohl AHR als auch HIF1- α zusätzlich ARNT-unabhängige Effekte vermitteln. Es ist notwendig, die Relevanz dieser genauer zu verstehen, um eine Aussage über die Effektivität einer Inhibition von ARNT im Kontext einer Tumorthherapie zu bewerten [22, 61]. Ebenso ist es wahrscheinlich, dass die Relevanz von ARNT-vermittelten Effekten stark vom Zelltyp abhängig ist. Die Bedeutsamkeit beider möglicher Schwachpunkte und deren Signifikanz für die Therapie in Gliomen bedarf weiterer Forschungsarbeit. Zusammenfassend lassen sich über ARNT, AHR- und HIF1- α -vermittelte Effekte regulieren und somit kann möglicherweise das Tumorwachstum und das Therapieansprechen beeinflusst werden. Aus den gewonnenen Erkenntnissen über Temozolomid-Sensitivität, AHR/ARNT- und HIF1- α /ARNT-vermittelte Signalwege, sowie deren Zusammenhang zeigt sich, dass ARNT ein geeignetes und potentiell

erfolgsversprechendes neues therapeutisches Ziel für die Behandlung von Gliomen darstellen könnte.

4.13 Schlussfolgerung und Ausblick

Der AHR-Komplex spielt sowohl bei der Krebsentstehung, als auch bei der malignen Progression von Krebszellen eine wichtige Rolle. Da die Funktion des AHR-Komplexes als Transkriptionsfaktor von ARNT abhängig ist, werden im Folgenden anhand der durchgeführten Experimente die Rolle von ARNT in Glioblastomen und daraus resultierende mögliche therapeutische Konsequenzen zusammengefasst.

Zunächst zeigte sich eine heterogene Expression von Komponenten des AHR-Komplexes in verschiedenen Glioblastomzelllinien. Es ließ sich keine Korrelation zwischen der mRNA-Expression von *ARNT* und dem *MGMT*-Promotormethylierungsstatus in Glioblastomen nachweisen. Bei Untersuchungen anhand von Glioblastomzelllinien mit Hilfe einer CRISPR-Cas9-medierten Geneditierung von *ARNT* stellte sich heraus, dass ARNT in der Zelllinie T98G die Fähigkeit zur Bildung von Kolonien unterstützt. Zusätzlich zeigte sich eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem Chemotherapeutikum Temozolomid in Glioblastomzellen, die kein ARNT exprimieren. Damit stellt ARNT ein mögliches therapeutisches Ziel für eine Kombinationstherapie dar, um Glioblastomzellen für die Chemotherapie mit Temozolomid zu sensitivieren. Zusätzlich dazu zeigten T98G-Glioblastomzellen mit vollständigem Verlust von ARNT-Protein nach CRISPR-Cas9 Geneditierung einen morphologisch veränderten Phänotyp. Es konnte nicht nachgewiesen werden, dass ARNT unter normoxischen Bedingungen die Proliferationsfähigkeit beeinflusst, es ist jedoch möglich, dass dies unter hypoxischen Bedingungen anders ist.

Weitere Untersuchungen zeigten, dass ARNT einen Knotenpunkt für AHR- und HIF1 α -vermittelte Prozesse darstellt. Inwiefern eine Inhibition von ARNT die tumorrelevanten Signalwege, die sowohl von AHR oder HIF1- α ausgehen können, *in vivo* in Glioblastomen unterdrücken kann, bedarf weiteren Forschungsarbeiten. Weiterhin scheint es unwahrscheinlich, dass ARNT2 bei einer Inhibition von ARNT für ARNT kompensieren könnte.

Insgesamt zeigen die durchgeführten Experimente sowie die verfügbaren Literaturdaten, dass ARNT einen vielversprechenden Kandidaten für weitere Untersuchungen im Zusammenhang mit der Therapie von Gliomen darstellt.

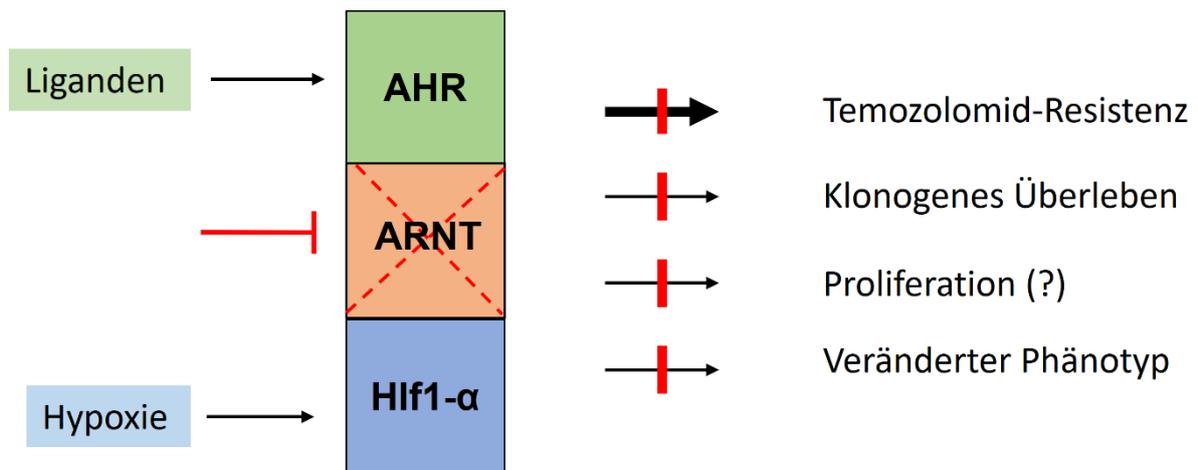


Abbildung 22: Zusammenfassung der Effekte von ARNT in Glioblastomen: Die eigenen Experimente zeigen, dass eine Inhibition von ARNT in Glioblastomzellen zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Temozolomid, einem verringerten klonogenen Überleben, möglicherweise einer verringerten Proliferationsfähigkeit und einem veränderten Phänotyp einhergeht.

5. Literatur- und Quellenverzeichnis

- 0 Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V (Hrsg) (2019) Krebs in Deutschland für 2015/2016, 12. Ausgabe, Berlin. DOI: 10.25646/5977.3
- 1 Louis et al (2021) The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol* 23(8):1231-1251. DOI: 10.1093/neuonc/noab106
- 2 Stupp R, Mason WP, Van den Bent, Martin J., Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC (2005) Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med* 352 (10): 987-996. DOI: 10.1056/NEJMoa043330
- 3 Schneider T, Mawrin C, Scherlach C, Skalej M, Firsching R (2010) Gliomas in adults. *Dtsch Arztebl Int* 107(45): 799-807. DOI: 10.3238/arztebl.2010.0799
- 4 Bondy ML, Scheurer ME, Malmer B, Barnholtz-Sloan JS, Davis FG, Il'yasova D, Kruchko C, McCarthy BJ, Rajaraman P, Schwartzbaum JA, Sadetzki S, Schlehofer B, Tihan T, Wiemels JL, Wrensch M, Buffler PA (2008) Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium. *Cancer* 113(7): 1953–1968. DOI: 10.1002/cncr.23741
- 5 Little MP, Rajaraman P, Curtis RE, Devesa SS, Inskip PD, Check DP, Linet MS (2012) Mobile phone use and glioma risk: comparison of epidemiological study results with incidence trends in the United States. *BMJ* 344: e1147. DOI: 10.1136/bmj.e1147
- 6 Hiddemann W (Hrsg) (2010) Die Onkologie. Springer Medizin, Heidelberg
- 7 Goldbrunner R, Ruge M, Kocher M, Lucas CW, Galldiks N, Grau S (2018) The Treatment of Gliomas in Adulthood. *Dtsch Arztebl Int* 115(20-21): 356–364. DOI: 10.3238/arztebl.2018.0356
- 8 Gupta A, Dwivedi T (2017) A Simplified Overview of World Health Organization Classification Update of Central Nervous System Tumors 2016. *J Neurosci Rural Pract* 8(4): 629–641. DOI: 10.4103/jnrp.jnrp_168_17
- 9 Weller M, Stupp R, Hegi ME, van den Bent M, Tonn JC, Sanson M, Wick W, Reifenberger G (2012) Personalized care in neuro-oncology coming of age: why we need MGMT and 1p/19q testing for malignant glioma patients in clinical practice. *Neuro-oncology* 14: iv100-8. DOI: 10.1093/neuonc/nos206
- 10 Cohen AL, Holmen SL, Colman H (2013) IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *Curr Neurol Neurosci Rep* 13(5): 345. DOI: 10.1007/s11910-013-0345-4
- 11 Weller M, van den Bent M, Tonn JC, Stupp R, Preusser M, Cohen-Jonathan-Moyal E, Henriksson R, Le Rhun E, Balana C, Chinot O, Bendszus M, Reijneveld JC, Dhermain F, French P, Marosi C, Watts C, Oberg I, Pilkington G, Baumert BG, Taphoorn MJB, Hegi M, Westphal M, Reifenberger G, Soffietti R, Wick W (2017) European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. *The Lancet Oncology* 18(6): e315-e329. DOI:10.1016/S1470-2045(17)30194-8

- 12 Laperriere N, Zurawb L, Cairncross G (2002) Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. *Radiotherapy and Oncology* 64 (3): 259–273. DOI: DOI: 10.1016/s0167-8140(02)00078-6
- 13 Lee SY (2016) Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes Dis* 3(3): 198–210. DOI: 10.1016/j.gendis.2016.04.007
- 14 Baker SD, Wirth M, Statkevich P, Reidenberg P, Alton K, Sartorius SE, Dugan M, Cutler D, Batra V, Grochow LB, Donehower RC, Rowinsky EK (1999) Absorption, Metabolism, and Excretion of ¹⁴C-Temozolomide following Oral Administration to Patients with Advanced Cancer. *Clinical Cancer Research* 5(2): 309–317.
- 15 Drabløs F, Feyzi E, Aas PA, Vaagbø CB, Kavli B, Bratlie MS, Peña-Diaz J, Otterlei M, Slupphaug G, Krokan HE (2004) Alkylation damage in DNA and RNA-repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair (Amst)* 3(11): 1389–1407. DOI: 10.1016/j.dnarep.2004.05.004
- 16 Agnihotri S, Gajadhar AS, Ternamian C, Gorlia T, Diefes KL, Mischel PS, Kelly J, McGown G, Thorncroft M, Carlson BL, Sarkaria JN, Margison GP, Aldape K, Hawkins C, Hegi M, Guha A (2012) Alkylpurine-DNA-N-glycosylase confers resistance to temozolomide in xenograft models of glioblastoma multiforme and is associated with poor survival in patients. *J Clin Invest* 122(1): 253–266. DOI: 10.1172/JCI59334
- 17 Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144 (5): 646–673. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013
- 18 Schmoll H-J, Höffken K, Possinger K (Hrsg) (2006) Kompendium internistische Onkologie. Springer, Heidelberg
- 19 Liberti MV, Locasale JW (2016) The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci* 41(3): 211–218. DOI: 10.1016/j.tibs.2015.12.001
- 20 Grivnenkov SI, Greten FR, Karin M (2010) Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140(6): 883–899. DOI: 10.1016/j.cell.2010.01.025
- 21 Yap TA, Gerlinger M, Futreal PA, Pusztai L, Swanton C (2012) Intratumor heterogeneity: seeing the wood for the trees. *Sci Transl Med* 4(127): 127ps10. DOI: 10.1126/scitranslmed.3003854
- 22 Larigot L, Juricek L, Dairou J, Coumoul X (2018) AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochimie Open* 7 : 1–9. DOI: 10.1016/j.biopen.2018.05.001
- 23 Lee J-W, Bae S-H, Jeong J-W, Kim S-H, Kim K-W (2004) Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions. *Experimental and Molecular Medicine* 36 (1): 1-12 DOI: 10.1038/emm.2004.1
- 24 Opitz CA, Litzemberger UM, Sahm F, Ott M, Tritschler I, Trump S, Schumacher T, Jestaedt L, Schrenk D, Weller M, Jugold M, Guillemin GJ, Miller CL, Lutz C, Radlwimmer B, Lehmann I, Deimling A von, Wick W, Platten M (2011) An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 478(7368): 197–203. DOI: 10.1038/nature10491
- 25 Platten M, Opitz C, Wick W (2012) The aryl hydrocarbon receptor as a promoter of malignant glioma. *Cell Cycle* 11(4): 643–644. DOI:10.4161/cc.11.4.19357
- 26 Gramatzki D, Pantazis G, Schittenhelm J, Tabatabai G, Köhle C, Wick W, Schwarz M, Weller M, Tritschler I (2009) Aryl hydrocarbon receptor inhibition

- downregulates the TGF- β /Smad pathway in human glioblastoma cells. *Oncogene* 28: 2593-2605. DOI: 10.1038/onc.2009.104
- 27 Quintana FJ, Basso AS, Iglesias AH, Korn T, Farez MF, Bettelli E, Caccamo M, Oukka M, Weiner HL (2008) Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 453(7191): 65–71. DOI: 10.1038/nature06880
- 28 Platten M, Opitz C, Wick W (2012) The aryl hydrocarbon receptor in tumor immunity. *Cell Cycle* 11(4): 643–644. DOI:10.4161/cc.11.4.19357
- 29 Wu S, Li J, Cao M, Yang J, Li Y-X, Li Y-Y (2016) A novel integrated gene coexpression analysis approach reveals a prognostic three-transcription-factor signature for glioma molecular subtypes. *BMC Syst Biol* 10 Suppl 3 (71): 370-380. DOI: 10.1186/s12918-016-0315-y
- 30 Greenlee WF, Neal RA (1985) The Ah Receptor: A Biochemical and Biologic Perspective. *The Receptors* (2): 89-129. DOI: 10.1016/B978-0-12-185202-3.50010-X
- 31 Andersson P, McGuire J, Rubio C, Gradin K, Whitelaw ML, Pettersson S, Hanberg A, Poellinger L (2002) A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor induces stomach tumors. *PNAS* 99 (15): 9991-9995. DOI: 10.1073/pnas.152706299
- 32 Moennikes O, Loeppen S, Buchmann A, Andersson P, Ittrich C, Poellinger L, Schwarz M (2004) A Constitutively Active Dioxin/Aryl Hydrocarbon Receptor Promotes Hepatocarcinogenesis in Mice. *Journal of Cancer Research* 64 (14): 4707-4710. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-03-0875
- 33 Kaur B, Khwaja FW, Severson EA, Matheny SL, Brat DJ, van Meir EG (2005) Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis1. *Neuro-oncology* 7(2): 134–153. DOI: 10.1215/S1152851704001115
- 34 Domènech M, Hernández A, Plaja A, Martínez-Balibrea E, Balañà C (2021) Hypoxia: The Cornerstone of Glioblastoma. *Int J Mol Sci* 22(22): 12608. DOI: 10.3390/ijms222212608
- 35 Courtney R, Ngo DC, Malik N, Ververis K, Tortorella SM, Karagiannis TC (2015) Cancer metabolism and the Warburg effect: the role of HIF-1 and PI3K. *Mol Biol Rep* 42(4): 841–851. DOI:10.1007/s11033-015-3858-x
- 36 Colegio OR, Chu N-Q, Szabo AL, Chu T, Rhebergen AM, Jairam V, Cyrus N, Brokowski CE, Eisenbarth SC, Phillips GM, Cline GW, Phillips AJ, Medzhitov R (2014) Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature* 513(7519): 559–563. DOI: 10.1038/nature13490
- 37 Zhao L, Shu Q, Sun H, Ma Y, Kang D, Zhao Y, Lu J, Gong P, Yang F, Wan F (2020) Targeting Aryl Hydrocarbon Receptor with small molecule, 1'H-indole-3'-carbonyl-thiazole-4-carboxylic acid methyl ester blocked human glioma cell invasion via MYH9. *BioRxiv*. DOI: 10.1101/2020.01.13.903674
- 38 Mascanfroni ID, Takenaka MC, Yeste A, Patel B, Wu Y, Kenison JE, Siddiqui S, Basso AS, Otterbein LE, Pardoll DM, Pan F, Priel A, Clish CB, Robson SC, Quintana FJ (2015) Metabolic control of type 1 regulatory T cell differentiation by AHR and HIF1- α . *Nat Med* 21(6): 638–646. DOI: 10.1038/nm.3868
- 39 Cathomen T, Puchta H (Hrsg) (2018) CRISPR/Cas9 – Einschneidende Revolution in der Gentechnik. Springer, Berlin

- 40 Wu S-S, Li Q-C, Yin C-Q, Xue W, Song C-Q (2020) Advances in CRISPR/Cas-based Gene Therapy in Human Genetic Diseases. *Theranostics* 10(10): 4374–4382. DOI: 10.7150/thno.43360
- 41 Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F (2013) Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* 8(11): 2281–2308. DOI: 10.1038/nprot.2013.143
- 42 Addgene (Hrsg.) (2017) CRISPR 101: A Desktop Resource. 2. Auflage <https://www.addgene.org/educational-resources/ebooks/>
- 43 Brennan CW, Verhaak RGW, McKenna A et al (2013) The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 155(2): 462–477. DOI: 10.1016/j.cell.2013.09.034
- 44 Software solutions for Life Science Data management and integration (2023) Review of RNA-seq normalisation methods. <https://genestack.com/news/blog/review-of-rna-seq-normalisation-methods/>. Zugegriffen: 18. Januar 2023
- 45 Happold C, Roth P, Wick W, Schmidt N, Florea A-M, Silginer M, Reifenberger G, Weller M (2012) Distinct molecular mechanisms of acquired resistance to temozolomide in glioblastoma cells. *J Neurochem* 122(2): 444–455. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2012.07781.x
- 46 Hahn ME, Allan LL, Sherr DH (2009) Regulation of constitutive and inducible AHR signaling: Complex interactions involving the AHR repressor. *Biochemical Pharmacology* 77 (4): 485–497. DOI: 10.1016/j.bcp.2008.09.016
- 47 Zudaire E, Cuesta N, Murty V, Woodson K, Adams L, Gonzalez N, Martínez A, Narayan G, Kirsch I, Franklin W, Hirsch F, Birrer M, Cuttitta F (2008) The aryl hydrocarbon receptor repressor is a putative tumor suppressor gene in multiple human cancers. *J Clin Invest* 118(2): 640–650. DOI: 10.1172/JCI30024
- 48 Ettlinger J, Reifenberger G, Knobbe-Thomsen CB (2018) CRISPR/Cas9 screen to identify novel mechanisms of therapy resistance to temozolomide in glioblastoma. https://www.researchgate.net/publication/333311655_CRISPRCas9_screen_to_identify_novel_mechanisms_of_therapy_resistance_to_temozolomide_in_Glioblastoma
- 49 Tschaharganeh DF, Lowe SW, Garippa RJ, Livshits G (2016) Using CRISPR/Cas to study gene function and model disease in vivo. *FEBS J* 283(17): 3194–3203. DOI: 10.1111/febs.13750
- 50 Ma Y, Zhang L, Huang X (2014) Genome modification by CRISPR/Cas9. *FEBS J* 281(23): 5186–5193. DOI: 10.1111/febs.13110
- 51 Chen M, Mao A, Xu M, Weng Q, Mao J, Ji J (2019) CRISPR-Cas9 for cancer therapy: Opportunities and challenges. *Cancer Lett* 447 (10): 48–55. DOI: 10.1016/j.canlet.2019.01.017
- 52 Tsai SQ, Joung JK (2016) Defining and improving the genome-wide specificities of CRISPR-Cas9 nucleases. *Nat Rev Genet* 17(5): 300–312. DOI: 10.1038/nrg.2016.28
- 53 Lino CA, Harper JC, Carney JP, Timlin JA (2018) Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug Deliv* 25(1): 1234–1257. DOI: 10.1080/10717544.2018.1474964

- 54 Dougherty EJ, Polienz RS (2008) Analysis of AhR-Arnt and Arnt2 complexes in vitro and in cell culture. *Toxicol Sci.* 103 (1): 191–206. DOI: 10.1093/toxsci/kfm300
- 55 Sekine H, Mimura J, Yamamoto M, Fujii-Kuriyama Y (2006) Unique and overlapping transcriptional roles of arylhydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt) and Arnt2 in xenobiotic and hypoxic responses. *J Biol Chem* 281(49): 37507–37516. DOI: 10.1074/jbc.M606910200
- 56 Bogeas A, Morvan-Dubois G, El-Habr EA, Lejeune F-X, Defrance M, Narayanan A, Kuranda K, Burel-Vandenbos F, Sayd S, Delaunay V, Dubois LG, Parrinello H, Rialle S, Fabrega S, Idbaih A, Haiech J, Bièche I, Virolle T, Goodhardt M, Chneiweiss H, Junier M-P (2018) Changes in chromatin state reveal ARNT2 at a node of a tumorigenic transcription factor signature driving glioblastoma cell aggressiveness. *Acta Neuropathol* 135(2): 267–283. DOI: 10.1007/s00401-017-1783-x
- 57 Godbey WT (Hrsg) (2014) *An Introduction to Biotechnology*. Woodland publishing, Cambridge
- 58 Huang Chi-Ruei, Lee, Chung-Ta, Chang, Kwang-Yu, Chang W-C, Lui Y-W, Lee J-C, Chen B-K Down-regulation of ARNT promotes cancer metastasis by activating the fibronectin/integrin beta/FAK axis. *Oncotarget* 6 (13): 11530–11546. DOI: 10.18632/oncotarget.3448
- 59 Shieh J-M, Shen C-J, Chang W-C, Cheng H-C, Chan Y-Y, Huang W-C, Chang W-C, Chen B-K (2014) An increase in reactive oxygen species by deregulation of ARNT enhances chemotherapeutic drug-induced cancer cell death. *PLoS ONE* 9(6): e99242. DOI: 10.1371/journal.pone.0099242
- 60 Dever DP, Opanashuk LA (2012) The aryl hydrocarbon receptor contributes to the proliferation of human medulloblastoma cells. *Mol Pharmacol* 81(5): 669–678. DOI: 10.1124/mol.111.077305
- 61 Wood SM, Gleadle JM, Pugh CW, Hankinson O, Ratcliffe PJ (1996) The Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (ARNT) in Hypoxic Induction of Gene Expression. *J Biol Chem* 271 (25): 15117-15123. DOI: 10.1074/jbc.271.25.15117
- 62 Zielloa JE, Jovina IS, Huang Y (2007) Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 Regulatory Pathway and its Potential for Therapeutic Intervention in Malignancy and Ischemia. 80(2): 51-60. PMID: PMC2140184
- 63 Shi S, Yoon DY, Hodge-Bell K, Huerta-Yepez S, Hankinson O (2010) Aryl hydrocarbon nuclear translocator (hypoxia inducible factor 1beta) activity is required more during early than late tumor growth. *Mol Carcinog* 49(2):157–165. DOI: 10.1002/mc.20585
- 64 Li X-F, Carlin S, Urano M, Russell J, Ling CC, O'Donoghue JA (2007) Visualization of hypoxia in microscopic tumors by immunofluorescent microscopy. *Cancer Res* 67(16): 7646–7653. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4353
- 65 Li L, Lin X, Staver M, Shoemaker A, Semizarov D, Fesik SW, Shen Y (2005) Evaluating hypoxia-inducible factor-1alpha as a cancer therapeutic target via inducible RNA interference in vivo. *Cancer Res* 65(16): 7249–7258. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-04-4426
- 66 Wagener C, Müller O (2010) *Molekulare Onkologie*. Thieme, Stuttgart
- 67 Rodier F, Coppé J-P, Patil CK, Hoeijmakers WAM, Muñoz DP, Raza SR, Freund A, Campeau E, Davalos AR, Campisi J (2009) Persistent DNA

- damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nature cell biology* 11(8): 973–979. DOI: 10.1038/ncb1909
- 68 Milanovic M, Fan DNY, Belenki D, Däbritz JHM, Zhao Z, Yu Y, Dörr JR, Dimitrova L, Lenze D, Monteiro Barbosa IA, Mendoza-Parra MA, Kanashova T, Metzner M, Pardon K, Reimann M, Trumpp A, Dörken B, Zuber J, Gronemeyer H, Hummel M, Dittmar G, Lee S, Schmitt CA (2018) Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness. *Nature* 553(7686): 96–100. DOI: 10.1038/nature25167
- 69 Harper PA, Riddick DS, Okey AB (2006) Regulating the regulator: factors that control levels and activity of the aryl hydrocarbon receptor. *Biochemical Pharmacology* 72(3): 267–279. DOI:10.1016/j.bcp.2006.01.007
- 70 Ray SS, Swanson HI (2004) Dioxin-induced immortalization of normal human keratinocytes and silencing of p53 and p16INK4a. *J Biol Chem* 279(26): 27187–27193. DOI: 10.1074/jbc.M402771200
- 71 Filippi-Chiela EC, Thomé MP, Bueno e Silva, Mardja Massur, Pelegrini AL, Ledur PF, Garicochea B, Zamin LL, Lenz G (2013) Resveratrol abrogates the Temozolomide-induced G2 arrest leading to mitotic catastrophe and reinforces the Temozolomide-induced senescence in glioma cells. *BMC Cancer* 14(13): 1–13. DOI: 10.1186/1471-2407-13-147
- 72 Chan Y-Y, Kalpana S, Chang W-C, Chang W-C, Chen B-K (2013) Expression of Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator enhances Cisplatin resistance by upregulating MDR1 expression in cancer cells. *Mol Pharmacol* 84 (4): 591-602. DOI: 10.1124/mol.113.087197
- 73 Yin H, Zhou Y, Wen C, Zhou C, Zhang W, Hu X, Wang L, You C, Shao J (2014) Curcumin sensitizes glioblastoma to temozolomide by simultaneously generating ROS and disrupting AKT/mTOR signaling. *Oncol Rep* 32(4): 1610–1616. DOI: 10.3892/or.2014.3342
- 74 Lo Dico A, Salvatore D, Martelli C, Ronchi D, Diceglie C, Lucignani G, Ottobrini L (2019) Intracellular Redox-Balance Involvement in Temozolomide Resistance-Related Molecular Mechanisms in Glioblastoma. *Cells* 8(11): 1315. DOI: 10.3390/cells8111315
- 75 Wang G, Wang J-J, Fu X-L, Guang R, To S-ST (2017) Advances in the targeting of HIF-1 α and future therapeutic strategies for glioblastoma multiforme (Review). *Oncol Rep* 37(2): 657–670. DOI: 10.3892/or.2016.5309
- 76 Zhao T, Zhu Y, Morinibu A, Kobayashi M, Shinomiya K, Itasaka S, Yoshimura M, Guo G, Hiraoka M, Harada H (2014) HIF-1-mediated metabolic reprogramming reduces ROS levels and facilitates the metastatic colonization of cancers in lungs. *Sci Rep* 4 (3793): 1-7. DOI: 10.1038/srep03793
- 77 Tang J-H, Ma Z-X, Huang G-H, Xu Q-F, Xiang Y, Li N, Sidlauskas K, Zhang EE, Sheng-Qing L (2016) Downregulation of HIF-1 α sensitizes U251 glioma cells to the temozolomide (TMZ) treatment. *Experimental Cell Research* 343(2): 148-158. DOI: 10.1016/j.yexcr.2016.04.011
- 78 Macharia LW, Muriithi W, Heming CP, Nyaga DK, Aran V, Mureithi MW, Ferrer VP, Pane A, Filho PN, Moura-Neto V (2021) The genotypic and phenotypic impact of hypoxia microenvironment on glioblastoma cell lines. *BMC Cancer* 21(1):1248. DOI: 10.1186/s12885-021-08978-z
- 79 Joseph JV, Conroy S, Pavlov K, Sontakke P, Tomar T, Eggens-Meijer E, Balasubramanian V, Wagemakers M, Dunnen WFA den, Kruyt FAE (2015) Hypoxia enhances migration and invasion in glioblastoma by promoting a

- mesenchymal shift mediated by the HIF1 α -ZEB1 axis. *Cancer Lett* 359(1):107–116. DOI:10.1016/j.canlet.2015.01.010
- 80 Tsuchiya Y, Nakajima M, Itoh S, Iwanari M, Yokoi T (2003) Expression of aryl hydrocarbon receptor repressor in normal human tissues and inducibility by polycyclic aromatic hydrocarbons in human tumor-derived cell lines. *Toxicol Sci* 72(2): 253–259. DOI: 10.1093/toxsci/kfg022
- 81 Schroeder JC, Dinatale BC, Murray IA, Flaveny CA, Liu Q, Laurenzana EM, Lin JM, Strom SC, Omiecinski CJ, Amin S, Perdew GH (2010) The uremic toxin 3-indoxyl sulfate is a potent endogenous agonist for the human aryl hydrocarbon receptor. *Biochemistry* 49(2): 393–400. DOI: 10.1021/bi901786x
- 82 Wu M-L, Li H, Wu D-C, Wang X-W, Chen X-Y, Kong Q-Y, Ma J-X, Gao Y, Liu J (2005) CYP1A1 and CYP1B1 expressions in medulloblastoma cells are AhR-independent and have no direct link with resveratrol-induced differentiation and apoptosis. *Neurosci Lett* 384(1-2): 33–37. DOI:10.1016/j.neulet.2005.04.055
- 83 Guigal N, Seree E, Bourgarel-Rey V, Barra Y (2000) Induction of CYP1A1 by serum independent of AhR pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 267(2): 572–576. DOI: 10.1006/bbrc.1999.1959
- 84 Guigal N, Seree E, Nguyen QB, Charvet B, Desobry A, Barra Y (2001) Serum induces a transcriptional activation of CYP1A1 gene in HepG2 independently of the AhR pathway. *Life Sciences* 68(18): 2141–2150. DOI: 10.1016/S0024-3205(01)01022-0
- 85 Séré E, Villard P-H, Pascussi J-M, Pineau T, Maurel P, Nguyen QB, Fallone F, Martin P-M, Champion S, Lacarelle B, Savouret J-F, Barra Y (2004) Evidence for a new human CYP1A1 regulation pathway involving PPAR-alpha and 2 PPRE sites. *Gastroenterology* 127(5): 1436–1445. DOI: 10.1053/j.gastro.2004.08.023
- 86 Delescluse C, Lemaire G, Sousa G de, Rahmani R (2000) Is CYP1A1 induction always related to AHR signaling pathway? *Toxicology* 153(1-3): 73–82. DOI:10.1016/S0300-483X(00)00305-X
- 87 Haarmann-Stemmann T, Abel J (2006) The arylhydrocarbon receptor repressor (AhRR): structure, expression, and function. *Biol Chem* 387(9): 1195–1199. DOI: 10.1515/BC.2006.147
- 88 Baba T, Mimura J, Gradin K, Kuroiwa A, Watanabe T, Matsuda Y, Inazawa J, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y (2001) Structure and expression of the Ah receptor repressor gene. *J Biol Chem* 276(35): 33101–33110. DOI: 10.1074/jbc.M011497200
- 89 Yang J, Li H, Zhang C, Zhou Y (2022) Indoxyl sulfate reduces Ito f ROS/MAPK and NF- κ B signaling pathways. *JCI Insight* 7(3): e145475. DOI: 10.1172/jci.insight.145475
- 90 Dengler VL, Galbraith M, Espinosa JM (2014) Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 49(1): 1–15. DOI: 10.3109/10409238.2013.838205
- 91 Masoud GN, Li W (2015) HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B* 5(5):378–389. DOI: 10.1016/j.apsb.2015.05.007
- 92 Khan MI (2022) Exploration of metabolic responses towards hypoxia mimetic DMOG in cancer cells by using untargeted metabolomics. *Saudi Journal of Biological Sciences* 29(10):103426. DOI: 10.1016/j.sjbs.2022.103426

- 93 Zhdanov AV, Okkelman IA, Collins FWJ, Melgar S, Papkovsky DB (2015) A novel effect of DMOG on cell metabolism: direct inhibition of mitochondrial function precedes HIF target gene expression. *Biochim Biophys Acta* 1847(10):1254–1266. DOI: 10.1016/j.bbabi.2015.06.016
- 94 Roberts DJ, Miyamoto S (2015) Hexokinase II integrates energy metabolism and cellular protection: Acting on mitochondria and TORCing to autophagy. *Cell Death Differ* 22(2): 248–257. DOI: 10.1038/cdd.2014.173
- 95 Strocchi S, Reggiani F, Gobbi G, Ciarrocchi A, Sancisi V (2022) The multifaceted role of EGLN family prolyl hydroxylases in cancer: going beyond HIF regulation. *Oncogene* 41(29): 3665–3679. DOI: 10.1038/s41388-022-02378-8
- 96 Murray IA, Patterson AD, Perdew GH (2014) Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe. *Nat Rev Cancer* 14(12): 801–814. DOI:10.1038/nrc3846
- 97 Lim TX, Ahamed M, Reutens DC (2022) The aryl hydrocarbon receptor: A diagnostic and therapeutic target in glioma. *Drug Discov Today* 27(2): 422–435. DOI: 10.1016/j.drudis.2021.09.021
- 98 Nayak L, Molinaro AM, Peters K, Clarke JL, Jordan JT, Groot J de, Nghiemphu L, Kaley T, Colman H, McCluskey C, Gaffey S, Smith TR, Cote DJ, Severgnini M, Yearley JH, Zhao Q, Blumenschein WM, Duda DG, Muzikansky A, Jain RK, Wen PY, Reardon DA (2021) Randomized Phase II and Biomarker Study of Pembrolizumab plus Bevacizumab versus Pembrolizumab Alone for Patients with Recurrent Glioblastoma. *Clin Cancer Res* 27(4): 1048–1057. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-20-2500
- 99 Wang X, Guo G, Guan H, Yu Y, Lu J, Yu J (2019) Challenges and potential of PD-1/PD-L1 checkpoint blockade immunotherapy for glioblastoma. *J Exp Clin Cancer Res* 38 (87): 1-13. DOI: 10.1186/s13046-019-1085-3
- 100 Cloughesy TF, Mochizuki AY, Orpilla JR, Hugo W, Lee AH, Davidson TB, Wang AC, Ellingson BM, Rytlewski JA, Sanders CM, Kawaguchi ES, Du L, Li G, Yong WH, Gaffey SC, Cohen AL, Mellinghoff IK, Lee EQ, Reardon DA, O'Brien BJ, Butowski NA, Nghiemphu PL, Clarke JL, Arrillaga-Romany IC, Colman H, Kaley TJ, Groot JF de, Liau LM, Wen PY, Prins RM (2019) Neoadjuvant anti-PD-1 immunotherapy promotes a survival benefit with intratumoral and systemic immune responses in recurrent glioblastoma. *Nat Med* 25(3): 477-486. DOI: 10.1038/s41591-018-0337-7
- 101 Ciolino Hp, Daschner PJ, Ye GC (1998) Resveratrol inhibits Transcription of CYP1A1 invitro by preventing activation of the aryl hydrocarbon receptor. *Cancer Res* 58(24): 5707–5712. PMID: 9865727
- 102 Safe S, Jin U-H, Park H, Chapkin RS, Jayaraman A (2020) Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR) Ligands as Selective AHR Modulators (SAhRMs). *Int J Mol Sci* 21(18): 1-16. DOI: 10.3390/ijms21186654
- 103 Jin U-H, Michelhaugh SK, Polin LA, Shrestha R, Mittal S, Safe S (2020) Omeprazole Inhibits Glioblastoma Cell Invasion and Tumor Growth. *Cancers (Basel)* 12(8): 1-15. DOI: 10.3390/cancers12082097
- 104 Haar CP, Hebbar P, Wallace GC, Das A, Vandergrift WA, Smith JA, Giglio P, Patel SJ, Ray SK, Banik NL (2012) Drug resistance in glioblastoma: a mini review. *Neurochem Res* 37(6): 1192–1200. DOI: .1007/s11064-011-0701-1

- 105 Graham K, Unger E (2018) Overcoming tumor hypoxia as a barrier to radiotherapy, chemotherapy and immunotherapy in cancer treatment. *Int J Nanomedicine* 13: 6049–6058. DOI: 10.2147/IJN.S140462
- 106 Giaccia A, Siim BG, Johnson RS (2003) HIF-1 as a target for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2(10): 803–811. DOI: 10.1038/nrd1199
- 107 NuvOx LLC (Responsible Party) (2023) A Phase II Double-blind, Randomized, Prospective, Placebo Controlled Study of NanO2TM Combined With Radiation and Temozolomide in Patients With Newly-diagnosed Glioblastoma multiforme. <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03862430>
- 108 Sordillo LA, Sordillo PP, Helson L (2015) Curcumin for the Treatment of Glioblastoma. *Anticancer Research* 35(12): 6373-6378. PMID: 26637846
- 109 Choi H, Chun Y-S, Kim S-W, Kim M-S, Park J-W (2006) Cucurmin inhibits Hypoxia-Inducible Factor-A by Degrading Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator: A Mechanism of Tumor Growth Inhibition 70 (5): 1664-1671. DOI: 10.1124/mol.106.025817
- 110 Gordan JD, Simon MC (2007) Hypoxia Inducible Factors: Central Regulators of the Tumor Phenotype. *Current opinion in Genetics and Development* 17(1): 71-77. DOI: 10.1016/j.gde.2006.12.006
- 111 Gabriely G, Wheeler MA, Takenaka MC, Quintana FJ (2017) Role of AHR and HIF-1 α in Glioblastoma Metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 28(6): 428–436. DOI: 10.1016/j.tem.2017.02.009

Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Guido Reifenberger für die Möglichkeit, meine Promotion am Institut für Neuropathologie durchführen zu können, sowie für die konstruktive Kritik und die Ratschläge in den wöchentlichen Besprechungen bedanken.

Ein weiteres Dankeschön geht an meinen Zweitgutachter, Herrn PD Dr. rer. nat. Czaba Mahotka, für die Übernahme des Korreferats und die Diskussionen über meine Arbeit.

Bedanken möchte ich mich weiterhin bei Frau Dr. Christiane Knobbe-Thomsen. Danke, dass Du mit so viel Zeit und Geduld meine Arbeit von Anfang bis Ende betreut, geplant und begleitet hast.

Ein riesiges Dankeschön geht an Jana, die jeden Tag mit mir im Labor verbracht hat, die mir die Experimente beigebracht, mit mir geplant und diskutiert hat. Außerdem möchte ich mich für die Bereitstellung der Zellen für die CRISPR-Cas Methode und das Teilen der Protokolle bedanken. Danke auch dafür, dass Du bei keinem missratenem Westernblot die Geduld mit mir verloren hast. Ich habe viel von Dir gelernt und ohne Dich hätte die Arbeit nur halb so viel Spaß gemacht.

Danken möchte ich außerdem allen Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Neuropathologie für ihre fachliche Unterstützung und die Beantwortung meiner vielen Fragen.

Ich möchte all meinen Freunden danken, die mich immer unterstützt haben. Danke, dass ich auf jeden Einzelnen von Euch zählen kann.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern danken, die mich auf jedem Schritt meines Lebens begleiten. Dank Euch kann ich meinen Weg gehen und meinen Träumen folgen. Bedanken möchte ich mich an dieser Stelle ebenfalls für Eure fachliche Unterstützung meiner Arbeit.