



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Aus der Klinik für Neurochirurgie

der Universität zu Lübeck

Direktorin: Prof. Dr. med. Naureen Keric

**Effekte des Retinoids Bexaroten auf die Gliomstammzelllinie T1338-1
und Bedeutung von Mutationen
in den Retinoid-X-Rezeptor-Isotypen α , β und γ**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- **Aus der Sektion Medizin** -

Vorgelegt von

Florian Will

aus Marburg

Lübeck 2025

1. Berichterstatterin: PD. Dr. rer. nat. Christina Zechel
Ko-Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Jens Mittag
2. Berichterstatter: PD Dr. med. Heinz-Wolfram Bernd

Tag der mündlichen Prüfung: 23.06.2025
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 24.06.2025

Promotionskommission der Sektion Medizin

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis (4)

Tabellenverzeichnis (11)

Abbildungsverzeichnis (12)

1. Einleitung (14)

1.1. Intrakranielle Neoplasien (14)

1.2. Das Glioblastom (15)

1.3. *Stem-like Glioma Cells* (17)

1.4. Der Retinoid-X-Rezeptor (21)

1.5. Fragestellung (26)

2. Material & Methoden (28)

2.1. Material (28)

2.1.1. Zelllinie (35)

2.1.2. Bakterienstamm (37)

2.1.3. *pCRTM2.1-TOPOTM*-Vektor (38)

2.1.4. Oligonukleotide (*Primer*) (39)

2.2. Methoden (40)

2.2.1. Zellkultur (40)

2.2.2. Extraktion genomischer DNA (41)

2.2.3. Agarose-Gelelektrophorese (41)

2.2.4. Polymerasekettenreaktion (42)

2.2.5. Reinigung von PCR-Fragmenten (44)

2.2.6. TOPO-TA-Klonierung und Transformation kompetenter Bakterien (44)

2.2.7. Plasmid-Minipräparation und Nachweis von Insertionen (45)

2.2.8. Sequenzierung (47)

2.2.9. Immunzytochemie (49)

2.2.10. BrdU-ELISA (50)

2.2.11. Statistik (52)

3. Ergebnisse (54)

3.1. Eine gleichzeitige Editierung in zwei verschiedenen RXR-Genen ist möglich (54)

3.1.1. Editierungsstatus in LV₂-sgRXR $\alpha\beta$ -[T1338-1]-C5-Subklonen (57)

3.1.2. Editierungsstatus in LV₂-sgRXR $\alpha\gamma$ -[T1338-1]-H6-Subklonen (58)

3.1.3. Fazit der Analysen zum Editierungsstatus von LV ₂ -sgRXRαβ-[T1338-1]-C5- und LV ₂ -sgRXRαγ-[T1338-1]-H6-Subklonen	(63)
3.2. Charakterisierung von <i>Stem-like Glioma Cells</i> (SLGC) mit spezifischer RXR-Editierung	(65)
3.2.1. Effekte der Editierung auf die Expression des Rezeptors	(65)
3.2.2. Effekte von Bexaroten und Temozolomid auf editierte Klone	(70)
3.2.2.1. Effekte der Behandlung auf die Zellproliferation	(70)
3.2.2.2. Effekte der Behandlung auf den Stammzellcharakter	(74)
3.2.2.3. Effekte der Behandlung auf die Integrität der DNA	(81)
4. Diskussion	(87)
4.1. Der bi-allelele Knockout von RXRG, nicht aber RXRB war erfolgreich	(87)
4.1.1. Die Editierungen im Exon 4 führen zu einer funktionellen Inaktivierung der DBD	(88)
4.1.2. Der Knockout eines RXR-Isotyps könnte durch einen anderen kompensiert werden	(90)
4.2. Der pro-proliferative Effekt von Bexaroten wird durch RXRβ und/oder RXRγ vermittelt	(91)
4.3. Der funktionelle RXR-Knockout beeinflusst den Stammzellcharakter der SLGC nicht	(92)
4.4. Bexaroten hat keinen Einfluss auf TMZ-induzierte DNA-Doppelstrangbrüche	(93)
4.5. Schlussfolgerungen und Limitationen	(94)
5. Zusammenfassung	(96)
6. Literaturverzeichnis	(98)
7. Anhang	(105)
7.1. Ergänzende Abbildungen	(105)
7.2. Ethikantrag	(110)
8. Danksagungen	(112)

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
9cRA	9- <i>cis</i> -Retinsäure
A/C/G/T	Adenin/Cytosin/Guanin/Thymin
Abb.	Abbildung
ABC	ATP-bindende Kasette
ad	adult
AF	Aktivierungsfunktion
AG	Arbeitsgruppe
Amp	Ampicillin
ANOVA	Varianzanalyse
AS	Aminosäure-Position
atRA	<i>all-trans</i> -Retinsäure
AUS	Australien
Bex	Bexaroten
bFGF	basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor
BIT	Gemisch aus bovinem Serumalbumin/Insulin/Transferrin
bp	Basenpaar
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
BTIC	<i>Brain Tumor initiating Cell</i>
BTSC	<i>Brain Tumor Stem Cell</i>
C ^(ter)	Carboxy-Terminus(/-terminal)
CAN	Kanada
CD133	<i>Cluster of Differentiation 133</i>
CH	Schweiz
cm/mm/μm/nm	Zentimeter/Millimeter/Mikrometer/Nanometer
CN	China
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRISPR/Cas9	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i> / CRISPR-assoziiertes Protein 9
CSC	<i>Cancer Stem Cell</i>
Cy3	Cyanin 3

d/h/min/sec	Tag/Stunde/Minute/Sekunde
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DBD	DNA-bindende Domäne
DE	Deutschland
DH5 α	Stamm DH5 α von <i>Escherichia-coli</i> -K12-Bakterien
DLX2	<i>Distal-less</i> Homöobox-Protein 2
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
DR	<i>Direct Repeat</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EcoR1	erste aus <i>Escherichia-coli</i> -Stamm RY13 isolierte Restriktionsendonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF(R)	Epidermaler Wachstumsfaktor (-Rezeptor)
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
endA1	Endonuklease A (inaktiviert)
ER	<i>Everted Repeat</i>
<i>et al.</i>	und andere (Autor/-innen)
F	<i>forward</i>
FABP7	Fettsäure-bindendes Protein 7
FACS	<i>Fluorescence-activated Cell Sorting</i>
FCS	fetales Kälberserum
FXR	Farnesoid-X-Rezeptor
g/mg/ μ g/ng	Gramm/Milligramm/Mikrogramm/Nanogramm
GBM	<i>Glioblastoma multiforme</i>
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
GFAP	Saures Gliafaserprotein
GSC	<i>Glioma Stem Cell</i>
H	Wasserstoff
H12	Helix 12
H ₂ O	Wasser
HAT	Histon-Acetyltransferase

HCl	Salzsäure
HDAC	Histon-Deacetylase
HRE	Hormonresponsives Element
HRP	Meerrettichperoxidase
hu	human
ICC	Immunzytochemie
IDH1/2	Isocitratdehydrogenase 1/2
IgG	Immunglobulin G
Ins	Insertion
IR	<i>Inverted Repeat</i>
Kap.	Kapitel
kb	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
K _D	Dissoziationskonstante
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KM	Kontrastmittel
L	linksdrehend
l/ml/μl	Liter/Milliliter/Mikroliter
LB	Luria-Bertani
LBD	Liganden-bindende Domäne
LDA	<i>Limiting Dilution Assay</i>
LE	<i>Low Electroendosmosis</i>
LXR	Leber-X-Rezeptor
M/mM/μM/nM	Mol/Millimol/Mikromol/Nanomol pro Liter
MCS	Multiple Klonierungsstelle
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
mRNA	<i>Messenger-Ribonukleinsäure</i>
MTIC	5-(3-Monomethyl-1-triazeno)imidazol-4-carboxamid
mut	mutiert
N ^(ter)	Amino-Terminus(/-terminal)
Na	Natrium
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid

NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
NaOH	Natriumhydroxid
N-Cor	Nukleärer-Rezeptor-Ko-Repressor
NF1	Neurofibromin 1
NL	Niederlande
NLS	Kernlokalisierungssignal
NMD	<i>Nonsense-mediated mRNA Decay</i>
NPC	neurale Progenitorzelle
NR	nukleärer Rezeptor
NSC	neurale Stammzelle
NT	Nukleotid-Position
NTD	N-terminale Domäne
Nurr1	<i>Nuclear Receptor-related 1 Protein</i>
O	Sauerstoff
OD	relative optische Dichte
OJA	<i>Orange Juice Agar</i>
ORF	Offener Leserahmen
ori	Replikationsursprung
p	p-Wert (Irrtumswahrscheinlichkeit)
p. a.	zur Analyse (Reinheitsgrad)
P160/SRC	Steroid-Rezeptor-Ko-Aktivator der p160-Familie
PAM	<i>Protospacer-adjacent Motif</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	<i>Potentia Hydrogenii</i>
Plac	lac-Promotor
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
PROM1	Prominin-1
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog
Pu	Purinbase
r	rekombinant
R	<i>reverse</i>
RAR	Retinsäure-Rezeptor

recA1	Rekombinase A (inaktiviert)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
RXRA/B/G	Gen des Retinoid-X-Rezeptor-Isotyps $\alpha/\beta/\gamma$
<i>rxr$\alpha/\beta/\gamma$</i>	<i>Messenger</i> -Ribonukleinsäure des Retinoid-X-Rezeptor-Isotyps $\alpha/\beta/\gamma$
RXR $\alpha/\beta/\gamma$	Retinoid-X-Rezeptor-Isotyp $\alpha/\beta/\gamma$ (Protein)
S2	Biologische Sicherheitsstufe 2
SB	Natriumborat
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	Schweden
sgRNA	<i>Single-Guide</i> -Ribonukleinsäure
SLGC	<i>Stem-like Glioma Cell</i>
SMRT	<i>Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid Hormone Receptors</i>
Sol	<i>Solution</i>
Sox2	SRY(<i>Sex-determining Region Y</i>)-Box 2
T(B)E	Tris[hydroxymethyl]aminomethan-(Borat-)Ethylendiamintetraacetat
T(MZ)	Temozolomid
T _A	<i>Annealing</i> -Temperatur
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBR2	<i>T-Box Brain Protein 2</i>
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TOPO	Topoisomerase I
TR	Thyroidhormon-Rezeptor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTF	Tumortheraiefelder
U	Enzymeinheit
UK	Vereinigtes Königreich Großbritannien und Nordirland
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
USA	Vereinigte Staaten von Amerika

UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VDR	Vitamin-D3-Rezeptor
VEGF	Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor
w/v	Gewicht pro Volumen
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
x	-fach
xg	-fache Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
ZF	Zinkfinger
Zn	Zink
ZNS	zentrales Nervensystem
γ H2AX	phosphorylierte Histonvariante H2AX

Tab. 1: Kodierung der 20 kanonischen Aminosäuren

Symbol (Einbuchstabenkode)	Abkürzung (Dreibuchstabenkode)	Bezeichnung	Acyl-Gruppe
A	Ala	Alanin	Alanyl-
C	Cys	Cystein	Cysteinyl-
D	Asp	Asparaginsäure	α -Aspartyl-
E	Glu	Glutaminsäure	α -Glutamyl-
F	Phe	Phenylalanin	Phenylalanyl-
G	Gly	Glycin	Glycyl-
H	His	Histidin	Histidyl-
I	Ile	Isoleucin	Isoleucyl-
K	Lys	Lysin	Lysyl-
L	Leu	Leucin	Leucyl-
M	Met	Methionin	Methionyl-
N	Asn	Asparagin	Asparaginyl-
P	Pro	Prolin	Prolyl-
Q	Gln	Glutamin	Glutaminyl-
R	Arg	Arginin	Arginyl-
S	Ser	Serin	Seryl-
T	Thr	Threonin	Threonyl-
V	Val	Valin	Valyl-
W	Trp	Tryptophan	Tryptophyl-
Y	Tyr	Tyrosin	Tyrosyl-

(Zusammenstellung nach: iupac.qmul.ac.uk/AminoAcid/, letzter Zugriff am 15.07.2024)

Tabellenverzeichnis

- Tab. 1: Kodierung der 20 kanonischen Aminosäuren (10)
- Tab. 2: Verbrauchsmaterialien (28)
- Tab. 3: (Bio-)Chemikalien und Reagenzien (29)
- Tab. 4: Puffer und Lösungen (31)
- Tab. 5: Kits für die Aufreinigung von DNA (31)
- Tab. 6: Kits mit bzw. ohne Enzym-Komponente (32)
- Tab. 7: Primäre Antikörper für die Immunzytochemie (32)
- Tab. 8: Sekundäre Antikörper für die Immunzytochemie (33)
- Tab. 9: Geräte und Hilfsmittel (33)
- Tab. 10: *Software* (34)
- Tab. 11: Klone der SLGC-Linie T1338-1 (36)
- Tab. 12: Zellkulturmedien (36)
- Tab. 13: Medien für Bakterienkulturen und Agarplatten (37)
- Tab. 14: *Primer* für PCR oder Sequenzierung (39)
- Tab. 15: TBE-Agarosegele (42)
- Tab. 16: DNA-Gel-Ladefarbstoffe (42)
- Tab. 17: PCR-*Mastermix* (43)
- Tab. 18: *Cycler*-Programm für die PCR (43)
- Tab. 19: Reaktionsvolumina bei der TA-Klonierung (45)
- Tab. 20: Zusammensetzung der Ansätze für Restriktionsverdau (47)
- Tab. 21: Pipettierschema für die Sequenzierungsreaktion (48)
- Tab. 22: *Cycler*-Programm für die Sanger-Sequenzierung (48)
- Tab. 23: Editierungen im RXRG-Gen der H6-Subklone (64)

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Modell der zellulären Hierarchie von SLGC (18)
- Abb. 2: Permissive und nicht-permissive RXR-Heterodimere (23)
- Abb. 3: Struktur und Rolle des RXR in Transaktivierung und -repression (25)
- Abb. 4: *pCRTM2.1-TOPOTM*-Plasmid (38)
- Abb. 5: Analyse von EcoR1-verdauten und unverdauten Plasmiden auf einem 1,6%-igen TBE-Agarosegel (55)
- Abb. 6: Analyse von PCR-Produkten auf einem 1,6%-igen TBE-Agarosegel (55)
- Abb. 7: Editierung von RXR β im Klon C5E11 (57)
- Abb. 8: Editierung von RXR γ im Klon H6C4 (59)
- Abb. 9: Konsequenzen der Editierungen auf die RXR γ -DBD im Klon H6C4 (60)
- Abb. 10: Editierung von RXR γ im Klon H6C9 (62)
- Abb. 11: Konsequenzen der Editierungen auf die RXR γ -DBD im Klon H6C9 (63)
- Abb. 12: Expression von RXR α in editierten Klonen der SLGC-Linie T1338-1 (66)
- Abb. 13: Expression von RXR β in editierten Klonen der SLGC-Linie T1338-1 (67)
- Abb. 14: Expression von RXR γ in editierten Klonen der SLGC-Linie T1338-1 (68)
- Abb. 15: Effekte von Bexaroten und/oder Temozolomid auf das Proliferationsverhalten von editierten Zellklonen (71)
- Abb. 16: Stammzellcharakter nach Behandlung mit Bexaroten in An- und Abwesenheit von Temozolomid (75)
- Abb. 17: Stammzellcharakter nach Behandlung mit Bexaroten in An- und Abwesenheit von Temozolomid (76)
- Abb. 18: Stammzellcharakter nach Behandlung mit Bexaroten in An- und Abwesenheit von Temozolomid (77)
- Abb. 19: Stammzellcharakter nach Behandlung mit Bexaroten in An- und Abwesenheit von Temozolomid (78)
- Abb. 20: Effekte der Behandlung auf die Gesamtzellzahl und das Verhältnis von SLGC zu Nicht-SLGC (79)
- Abb. 21: Induktion der Phosphorylierung der Histonvariante H2AX (γ H2AX) durch TMZ und Modulation durch Bexaroten (82)
- Abb. 22: Induktion der Phosphorylierung der Histonvariante H2AX (γ H2AX) durch TMZ und Modulation durch Bexaroten (83)
- Abb. 23: Induktion der Phosphorylierung der Histonvariante H2AX (γ H2AX) durch TMZ und Modulation durch Bexaroten (84)
- Abb. 24: Induktion der Phosphorylierung der Histonvariante H2AX (γ H2AX) durch TMZ und Modulation durch Bexaroten (85)

Abb. 25: Effekte der Behandlung auf die Gesamtzellzahl und die Phosphorylierung der Histonvariante H2AX (γ H2AX) (86)

Abb. 26: Exon 4 des humanen RXR-Gens und flankierende Intronsequenzen (105)

Abb. 27: Editierung von RXR α in den Klonen C5 und H6 (106)

Abb. 28: Effekte der Behandlungen auf den Klon C5E11 $\alpha\beta$ (106)

Abb. 29: Kontrollfärbung für die gegen RXR α (grün) und GFAP (rot) gerichteten Antikörper (107)

Abb. 30: Kontrollfärbung für die gegen RXR β (rot) und Nestin (grün) gerichteten Antikörper (107)

Abb. 31: Kontrollfärbung für die gegen RXR γ (rot) und Nestin (grün) gerichteten Antikörper (108)

Abb. 32: Kontrollfärbung für die gegen CD133 (grün) und Sox2 (rot) gerichteten Antikörper (108)

Abb. 33: Kontrollfärbung für die gegen γ H2AX (rot) und Nestin (grün) gerichteten Antikörper (109)

Abb. 34: Referenzaufnahmen zur Klassifizierung der γ H2AX-Signale (rot) (109)

1. Einleitung

1.1. Intrakranielle Neoplasien

Epidemiologisch stellen intrakranielle Neoplasien mit ca. 20 % die zweithäufigste maligne Tumorerkrankung im Kindesalter dar, im Erwachsenenalter beträgt der Anteil ca. 2 % (Louis *et al.*, 2016; Ostrom *et al.*, 2020). Die Klassifizierung erfolgt gemäß den Leitlinien der Weltgesundheitsorganisation (WHO), die zuletzt 2021 angepasst wurden (Louis *et al.*, 2021). Dabei werden sowohl histopathologische Kriterien als auch molekulare Marker für die Zuordnung zu den Tumorentitäten und WHO-Graden genutzt. Daneben spielen die Tumorlokalisierung und -größe, das Patientenalter, der allgemeine Gesundheitszustand und andere klinische Befunde eine Rolle (Ohgaki & Kleihues, 2013). Während z. B. ein pilozytisches Astrozytom (Gliom, WHO-Grad I) mit einer 10-Jahres-Überlebensrate von > 95 % einhergeht, beträgt die mittlere Überlebenszeit im Fall eines Glioblastoms (Gliom, WHO-Grad IV) nur wenige Monate (Ohgaki & Kleihues, 2013).

Gliome stellen eine Untergruppe der neuroepithelialen Tumoren dar. Diese Tumoren des zentralen Nervensystems entstehen entweder aus differenzierten glialen Zellen (Astrozyten, Oligodendrozyten) oder aus deren Vorläuferzellen. Neben adulten neuralen Stammzellen und adulten neuralen Progenitoren kommen auch Ependymzellen als Ursprungszellen für die Entstehung von Gliomzellen infrage (Huse & Holland, 2010; Ostrom *et al.*, 2020). Astrozytome, die sich von Astrozyten oder deren Vorläuferzellen ableiten, werden in pilozytische Astrozytome (WHO-Grad I), diffuse Astrozytome (WHO-Grad II), anaplastische Astrozytome (WHO-Grad III) und Glioblastome (WHO-Grad IV) eingeteilt (Ohgaki & Kleihues, 2013; Louis *et al.*, 2016). Pilozytische Astrozytome treten typischerweise im Kindesalter auf, sind durch ein langsames Wachstum gekennzeichnet und können in der Regel vollständig reseziert und somit kurativ behandelt werden (Burkhard *et al.*, 2003). Gliome des WHO-Grades II und III, wie das diffuse bzw. anaplastische Astrozytom, treten im Mittel im 35. bzw. 37. Lebensjahr auf und lassen sich häufig nicht mehr kurativ therapieren (Ohgaki & Kleihues, 2013). Unter der Standardtherapie, die eine Resektion und Bestrahlung umfasst, beträgt die mediane Überlebenszeit 11 bzw. 9 Jahre (Ostrom *et al.*, 2020). Darüber hinaus können diese Gliome als maligne Tumoren des WHO-Grades IV rezidivieren, die daraufhin als sekundäre Glioblastome klassifiziert werden (Louis *et al.*, 2016).

Als Risikofaktoren gelten hereditäre Tumorsyndrome wie z. B. die Neurofibromatose Typ 1 (Defekt im Tumorsuppressor Neurofibromin 1, NF1) und das Li-Fraumeni-Syndrom (Defekt im Tumorsuppressor p53) (Melin *et al.*, 2017). Die Wahrscheinlichkeit, an einem malignen Gliom zu erkranken, erhöht sich zudem um den Faktor 2-4, sofern die Diagnose bereits in erstgradiger

Verwandtschaft besteht (Hemminki *et al.*, 2009). Mit Ausnahme ionisierender Strahlung wurden bisher keine eindeutigen Belege für eine Bedeutung exogener Karzinogene festgestellt (Wen *et al.*, 2020).

1.2. Das Glioblastom

Das Glioblastom, auch als *Glioblastoma multiforme* (GBM) bezeichnet, ist ein Astrozytom des WHO-Grades IV (Louis *et al.*, 2016). Mit ca. 20 % handelt es sich dabei um die häufigste hirneigene Neoplasie (Ostrom *et al.*, 2020). Das GBM ist der dritthäufigste Tumor bei Kindern unter zwei Jahren, die höchste Inzidenz verteilt sich jedoch auf die Altersgruppen um das 45. bzw. 62. Lebensjahr (Louis *et al.*, 2016; Ostrom *et al.*, 2020). 90 % aller Glioblastome sind primär und entstehen *de novo*, ohne sich aus einem Astrozytom eines geringeren Grades zu entwickeln. Diese als primäre GBM bezeichneten Neoplasien sind durch einen Isocitratdehydrogenase(IDH)-Wildtyp und das Auftreten im höheren Lebensalter gekennzeichnet. Das sekundäre GBM ist mit einem relativen Anteil von 10 % seltener und entsteht aus rezidivierenden Zellen eines diffusen bzw. anaplastischen Astrozytoms. Es trägt die für zweit- bzw. drittgradige Astrozytome charakteristische Mutation im IDH1-Gen (seltener im IDH2-Gen) und manifestiert sich im mittleren Lebensalter (Louis *et al.*, 2016, 2021). Durch eine Punktmutation in einer definierten Region der zytoplasmatischen IDH1 (oder seltener der mitochondrialen IDH2) kommt es zu einer veränderten Enzymaktivität. Statt der Umsetzung von Isocitrat zu α -Ketoglutarat katalysiert die IDH1 (IDH2) unter NADPH-Verbrauch die Bildung des Onkometaboliten 2-Hydroxyglutarat. Dies hat einen drastischen Einfluss auf die Redox-Bilanz und das Epigenom der Zellen (Cairns *et al.*, 2011; Islam *et al.*, 2018). Die Bestimmung des IDH-Status ist in diagnostischer und prognostischer Hinsicht bedeutsam, da diffuse Astrozytome mit IDH-Mutation eine bessere Prognose aufweisen als solche ohne IDH-Mutation (Ohgaki & Kleihues, 2013). GBM mit einem IDH-Wildtyp sind typischerweise im Marklager der Großhirnhemisphäre lokalisiert, GBM mit IDH-Mutation primär frontotemporal (Lai *et al.*, 2011). Abgesehen von der obligaten Bestimmung des IDH-Status werden auch molekulare Marker wie der p53- und PTEN(Phosphatase und Tensin Homolog)-Status, die Chromosom 1p/19q-Kodeletion oder die EGFR(Epidermaler-Wachstumsfaktor-Rezeptor)-Überexpression für die Diagnose und Prognose herangezogen (Louis *et al.*, 2016). So zeigen 27 % der primären, aber 81 % der sekundären GBMs eine Mutation des Tumorsuppressors p53. Primäre GBM weisen zu 36 % eine Amplifikation des EGFR-Gens und zu 24 % den Verlust des Tumorsuppressors PTEN auf, während diese Veränderungen in sekundären GBM selten sind (Louis *et al.*, 2016).

Die Anamnese der Patient/-innen umfasst aufgrund des rapiden Tumorprogresses nur einige Wochen. Es werden unspezifische Symptome wie diffuse Kopfschmerzen, Wesensveränderungen und generalisierte Krampfanfälle beobachtet. Daneben können auch Symptome wie z. B. fokalneurologische Defizite auftreten, die mit der Lokalisation des Tumors assoziierbar sind. Durch die

Kompression des umliegenden Hirnparenchyms und dessen Reaktion in Form eines perifokalen Ödems kann es zudem zu einer ausgedehnten Raumforderung kommen. Dies würde sich durch Hirndruckzeichen wie bspw. eine Vigilanzstörung und/oder Nüchternerebrechen äußern. Eine Blutung kann zusätzlich einen hämorrhagischen Infarkt induzieren, im Falle einer kompromittierten Liquorzirkulation können Symptome eines Hydrozephalus vorliegen. Ebenso ist jedoch auch eine vollständige Symptomfreiheit möglich (Herrlinger *et al.*, 2017).

Diagnostisch führend ist die radiologische Bildgebung. In der Magnetresonanztomographie zeigt das Glioblastom mit IDH-Wildtyp typischerweise eine inhomogene Raumforderung mit unregelmäßiger Begrenzung, perifokalem Ödem, Nekrosen und girlandenförmiger Anreicherung von Kontrastmittel (KM), durch die sich ggf. die Mittellinie verlagert. Im Gegensatz dazu zeigt das IDH-mutierte GBM tendenziell geringer ausgeprägte Nekrosen, weniger KM-*Enhancement* und vermehrt zystische Areale (Lundy *et al.*, 2020). Histologisch sind atypische Kernmorphologien, eine Hyperzellularität sowie eine mikrovaskuläre Proliferation im Sinne einer Kolliquationsnekrose mit pallisadenartigem Randwall zu beobachten (D'Alessio *et al.*, 2019).

Das Glioblastom infiltriert die funktionellen Gewebe des Gehirns, aber auch meningeale Strukturen. Breitet sich der Tumor *per continuitatem* über das *Corpus callosum* auf die kontralaterale Seite aus, entsteht das seltene (ca. 5 %) Bild eines sog. Schmetterlingsglioms (Herrlinger *et al.*, 2017). Eine Metastasierung ist generell selten, es können aber in < 0,5 % der Fälle Fernmetastasen (meist sog. Abtropfmetastasen) auftreten (Lah *et al.*, 2020). Aufgrund des stark infiltrierenden Wachstums ist eine kurative Resektion des GBM nicht möglich. Sofern ein chirurgischer Eingriff voraussichtlich keine neuen neurologischen Defizite erzeugt sowie die bestehende Symptomatik lindert und die Prognose verbessert, wird eine Teilresektion angestrebt. Darüber hinaus umfasst die GBM-Standardtherapie eine adjuvante Radiochemotherapie bestehend aus fraktionierter Bestrahlung und oraler Applikation des Alkylans Temozolomid (TMZ) (Stupp *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu vielen anderen Zytostatika kann TMZ die Blut-Hirn-Schranke überwinden (Newlands *et al.*, 1997). TMZ ist ein *Prodrug*, das im Körper bei physiologischem pH nicht-enzymatisch in den aktiven Metaboliten 5-(3-Monomethyl-1-triazeno)imidazol-4-carboxamid (MTIC) umgewandelt wird (Hegi *et al.*, 2005). Die zusätzliche Gabe von TMZ steigerte im Vergleich zur alleinigen, fraktionierten Bestrahlung die 5-Jahres-Überlebensrate von 1,9 % auf 9,8 % (Stupp *et al.*, 2009). Zur Verminderung perifokaler Ödeme, deren Auftreten auch unter der Standardbehandlung möglich ist, können z. B. Mannitol oder Glucocorticoide verabreicht werden (Esquenazi *et al.*, 2017).

Im Fall eines GBM mit IDH-Wildtyp hängt die adjuvante Applikation von TMZ vom Patientenalter ab. Wurde ein Alter von 65 Jahren noch nicht überschritten, erfolgen *Radiatio* und Chemotherapie. In allen anderen Fällen ist die Methylierung des Promotors des O6-Methylguanin-

DNA-Methyltransferase(MGMT)-Gens entscheidend (Wick *et al.*, 2014). Das Protein MGMT ist ein Reparaturenzym, das die von TMZ übertragene Methylgruppe von den Guanosylresten in der DNA abspaltet (Hegi *et al.*, 2005). Die Expression der MGMT nimmt mit einer zunehmenden Methylierung des MGMT-Promotors ab. Etwa 50 % aller Glioblastome weisen eine MGMT-Promotor-Hypermethylierung auf, was in einem besseren Ansprechen auf TMZ resultiert und damit die Überlebenszeit verlängert (Wick *et al.*, 2014). Daher kommt in diesem Fall TMZ kombiniert mit *Radiatio* oder in Monotherapie zum Einsatz. Bei einer Hypomethylierung des MGMT-Promotors erfolgt lediglich eine Bestrahlung (Malmström *et al.*, 2012; Wick *et al.*, 2012).

Eine weitere therapeutische Option stellen Tumortheraiefelder (TTF) dar. Es wird angenommen, dass die elektromagnetischen Wechselfelder die Polymerisierung der Mikrotubuli des Spindelapparats während der Mitose beeinflussen und intrazelluläre Makromoleküle und Organellen während der Zytokinese dislozieren, sodass es konsekutiv mindestens zu einer Störung der Zellteilung kommt (Kirson *et al.*, 2007). Die adjuvante Kombination aus TTF und TMZ war der alleinigen Applikation von TMZ in einer randomisierten Phase III-Studie überlegen (Stupp *et al.*, 2017). Die TTF-Therapieadhärenz der Patient/-innen ist aufgrund der assoziierten Konditionen (Entfernung der Kopfschmerzen, Mitführen des Gerätes, Applikation über 18 h/d) jedoch vermindert (Bublak & Wick, 2016). Zudem besteht die Indikation aufgrund der Position notwendiger Klebepads nur bei supratentorieller Lage des Tumors (Kirson *et al.*, 2007).

Trotz umfangreicher klinischer und experimenteller Studien hat sich die Therapie des GBM seit 2005 nur geringfügig verändert und die Prognose ist noch immer infaust (Ohgaki & Kleihues, 2013). Eine Rezidivfreiheit ist nahezu ausgeschlossen. Im Falle eines Rezidivs beträgt die mittlere Überlebenszeit weniger als 6 Monate (Seystahl *et al.*, 2016). Die schlechte Therapie-Responsivität sowie die hohe Rezidivrate des Glioblastoms sind u. a. auf die ausgeprägte molekulare und zelluläre Heterogenität zurückzuführen. Dabei kommt einer Subpopulation von GBM-Zellen, den sog. *Stem-like Glioma Cells* (SLGC), eine entscheidende Rolle zu (Lan *et al.*, 2017; Gimple *et al.*, 2022).

1.3. Stem-like Glioma Cells

Die Initiation und Progression von Tumoren werden durch eine verhältnismäßig kleine Subpopulation von Zellen vorangetrieben, die in der Literatur als *Brain Tumor initiating Cells* (BTIC), *Cancer Stem Cells* (CSC), *Brain Tumor Stem Cells* (BTSC), *Glioma Stem Cells* (GSC) oder *Stem-like Glioma Cells* (SLGC) bezeichnet werden (Dirks, 2010; Van Meir *et al.*, 2010; Choschick *et al.*, 2014; Schonberg *et al.*, 2014). Diese Zellen besitzen Eigenschaften von normalen, adulten neuronalen Stammzellen (adNSC) oder Progenitoren (adNPC) und bilden wie diese eine zelluläre Hierarchie aus, die die

Stammzelle und weiter differenzierte Progenitorzellen umfasst (Abb. 1; Chen *et al.*, 2010; Gimple *et al.*, 2022). Dieser Sachverhalt wird am besten durch den Begriff der SLGC umschrieben (Choschzick *et al.*, 2014), weshalb dieser in der vorliegenden Arbeit verwendet wird. SLGC besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung sowie zur Proliferation, Differenzierung und Trans-Differenzierung (Schonberg *et al.* 2014; Gimple *et al.*, 2022). Obwohl SLGC Eigenschaften von adNSC aufweisen und adNSC-Marker exprimieren, resultiert die Differenzierung von SLGC in der Entstehung von Zellen der Tumormasse (Nicht-SLGC, sog. *Bulk Tumor Cells*), nicht aber in der Bildung funktioneller Neuronen oder Gliazellen (Chen *et al.*, 2010; Gimple *et al.*, 2022). Die Transdifferenzierung trägt zur Vaskularisierung bei, da aus SLGC Zellen mit Ähnlichkeiten zu endothelialen Zellen und Perizyten entstehen können, die das Wachstum des GBM fördern (Lobo *et al.*, 2007; Ward & Dirks, 2007; Ricci-Vitiani *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2013). Überdies wird vermutet, dass SLGC an der Therapieresistenz, der Entstehung eines Rezidivs sowie dem Umgehen einer ausgeprägten Immunantwort beteiligt sind (Beier *et al.*, 2011).

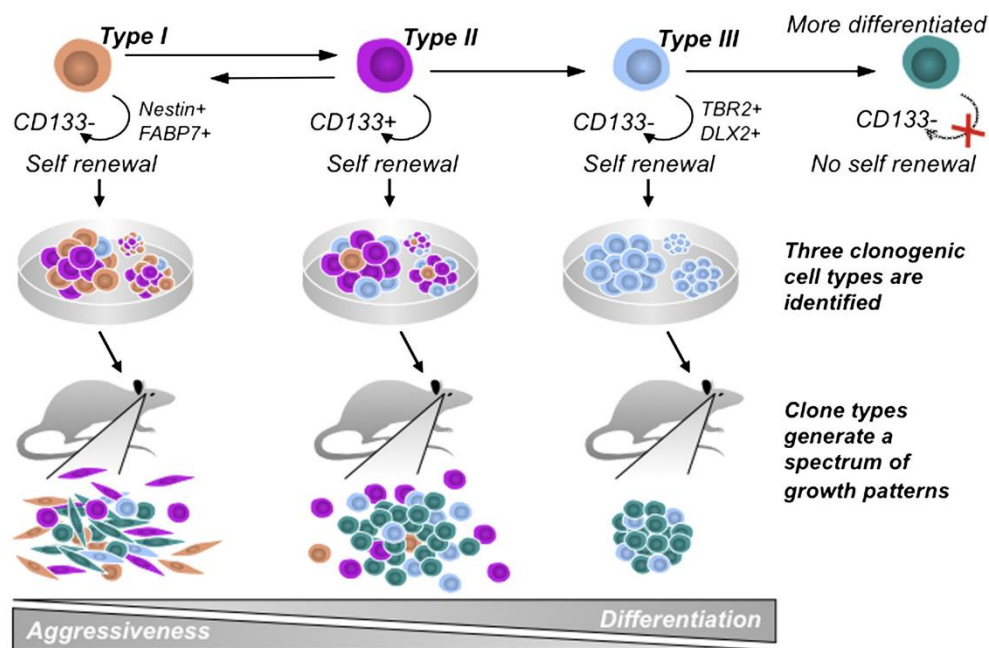


Abb. 1: Modell der zellulären Hierarchie von SLGC. Dargestellt sind die Stammzelle (Typ I), die beiden Progenitorstadien (Typ II und III) sowie die Expression ausgewählter Marker. Die Expression des Intermediärfilaments Nestin und des Transkriptionsfaktors Sox2 (SRY[Sex-determining Region Y]-Box 2), die in allen drei Stadien nachweisbar ist und mit zunehmender Differenzierung abnimmt, wurde in der Abbildung weggelassen. Gerade Pfeile symbolisieren die Fähigkeit zur Differenzierung, gebogene Pfeile die Fähigkeit zur Selbsterneuerung. Bei der Differenzierung von Typ-III-Zellen in die Tumorzellmasse (grünes Symbol) verlieren die Zellen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung. Alle drei SLGC-Subtypen generieren in der Maus orthotope Tumoren, mit verschiedenen Zellzusammensetzungen. CD133: Cluster of Differentiation 133; DLX2: Distal-less Homöobox-Protein 2; FABP7: Fettsäure-bindendes Protein 7; TBR2: T-Box Brain Protein 2. (Chen *et al.*, 2010, modifiziert)

Bei der Differenzierung durchlaufen die Tumorstammzellen des GBM mehrere Progenitor-Stadien. Nach dem von Chen *et al.* (2010; Abb. 1) erstellten Modell der zellulären Hierarchie differenziert die Gliomstammzelle (Typ-I-Zelle) zunächst in einen frühen Progenitor (Typ-II-Zelle), der durch eine weitere Differenzierung zum späten Progenitor (Typ-III-Zelle) wird. Eine gemeinsame Eigenschaft aller drei SLGC-Subtypen ist, dass sie nach einer Xenotransplantation in das Gehirn immundefizienter Mäuse orthotope Tumoren generieren, die sich jedoch in ihrer Aggressivität unterscheiden. Dabei schienen Präparationen von Typ-I-Zellen die orthotopen Tumoren mit der höchsten Invasivität zu generieren (Chen *et al.*, 2010); ein Ergebnis, das in späteren Studien unserer AG widerlegt wurde (Zechel *et al.*, 2024).

Wie oben kurz erwähnt, exprimieren SLGC Proteine, die als adNSC- und/oder adNPC-Marker gelten. Analog zu den normalen Zellen erfolgt die Expression der Marker in den SLGC in Abhängigkeit davon, in welchem Ausmaß die Zelle Stammzeleigenschaften (sog. *Stemness*) besitzt (Gimple *et al.*, 2022; Zechel *et al.*, 2024). Bedeutsame Marker sind das Intermediärfilament Nestin, das Zellen neuralen Ursprungs auszeichnet sowie das Intermediärfilament GFAP (Saures Gliafaserprotein), das in reifen Astrozyten und in den adNSC der subventrikulären Zone exprimiert wird (Chen *et al.*, 2010; Yang & Wang, 2015). GFAP kann als Marker für differenzierende SLGC genutzt werden (Yuan *et al.*, 2004). Allerdings tritt in humanen GBM auch die Situation auf, dass die Typ-I-Zelle GFAP-positiv ist und die Differenzierung mit einer Herunterregulierung von GFAP einhergeht (Günther *et al.*, 2008; Choschick *et al.*, 2014). Das Vorhandensein GFAP-positiver Typ-I-Zellen tritt Patient/-innen-spezifisch auf, ist weniger häufig als der umgekehrte Fall und könnte ein Hinweis darauf sein, dass sich die SLGC des betreffenden Individuums von adNSC ableiten (Zechel *et al.*, 2024). Ein universeller SLGC-Marker ist selbst nach nunmehr 15-jähriger Forschung nicht bekannt, was auf die ausgesprochene Heterogenität der Tumoren und der SLGC zurückzuführen ist (Gimple *et al.*, 2022). Allerdings weisen alle SLGC die Expression des Transkriptions- und Pluripotenzfaktors Sox2 (SRY[*Sex-determining Region Y*]-Box 2) auf. Dabei ist die Sox2-Expression in der Typ-I-Zelle am höchsten, nimmt mit der zunehmenden Differenzierung ab und ist in Nicht-SLGC nicht mehr nachweisbar. Diese Beobachtungen wurden *in vitro* getätigt und treffen ebenfalls auf die Situation *in vivo* zu (Chen *et al.*, 2010; Zechel *et al.*, 2024). Die Schlussfolgerung, dass Sox2 der für den Stammzellcharakter entscheidende Faktor ist, wird auch durch die Arbeiten von Alonso *et al.* (2011) gestützt, die zeigten, dass eine starke Verminderung der Sox2-Expression zum Verlust des Stammzellcharakters der SLGC führte.

Problematisch ist die Bedeutung des Glykoproteins CD133 (*Cluster of Differentiation 133*; synonym: Prominin-1 [PROM1]), das über einen langen Zeitraum als *Bona-Fide*-Marker für SLGC galt. So wurden während langer Phasen der SLGC-Forschung Antikörper gegen PROM1/CD133 zur Isolierung von SLGC aus GBM-Biopsien eingesetzt und mit diesen Zellen Analysen zur Therapie-Responsivität von SLGC durchgeführt. Obwohl Beier *et al.* bereits 2007 Hinweise darauf erhielten, dass

auch CD133-negative Zellen Eigenschaften von SLGC aufweisen, wurde der Sachverhalt erstmals 2010 durch Chen *et al.* deutlich formuliert. Nach deren Modell der zellulären Hierarchie (Abb. 1) ist die Typ-I-Zelle eine Sox2-positive, CD133-negative Zelle, die durch Differenzierung zur Sox2-positiven, CD133-positiven Typ-II-Zelle wird, die wiederum in eine Sox2-positive, CD133-negative Typ-III-Zelle differenziert. Während sich dieser Sachverhalt in Zellkulturen gut nachvollziehen lässt, ist dies *in vivo* nicht möglich. So zeigten Vibratom-Schnitte von GBM-Biopsien keine CD133-Expression in den Sox2-positiven Bereichen, obwohl diese hinsichtlich der Sox2-Expression eindeutig die Kriterien der zellulären Hierarchie erfüllten (Zechel *et al.*, 2024). Da eine Selektion auf SLGC mithilfe des Kulturmediums erfolgen kann, das ursprünglich für die Kultivierung von adNSC/adNPC entwickelt wurde (Dirks, 2010), ist die FACS(*Fluorescence-activated Cell Sorting*)-vermittelte Sortierung von GBM-Zellen mit CD133-Antikörpern verzichtbar. SLGC werden in Serum-freiem Medium mit Serum-Ersatz und den Wachstumsfaktoren EGF (Epidermaler Wachstumsfaktor) und bFGF (basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor) kultiviert. Darin sterben Nicht-SLGC, während die SLGC die ihnen eigene Hierarchie und Wachstumsform entwickeln, die zwischen vollständiger Adhärenz, adhärennten Zellaggregaten oder frei schwimmenden Sphäroiden variiert (Lee *et al.*, 2006; Choschick *et al.*, 2014; Raju *et al.*, 2015).

Da für die meisten *In-vitro*-Analysen FACS-sortierte Populationen CD133-positiver Zellen der Bestrahlung und/oder TMZ-Applikation ausgesetzt wurden (Beier *et al.*, 2011; Schonberg *et al.*, 2014), sind die Aussagen dieser Arbeiten limitiert. Diese Daten legten u. a. die Schlussfolgerung nahe, dass SLGC eine höhere Radio- und TMZ-Resistenz als Nicht-SLGC zeigen und dafür die raschere Aktivierung von DNA-Reparatursystemen ausschlaggebend ist (Bao *et al.*, 2006). Beier *et al.* (2008) zeigten jedoch, dass CD133-positive Zellen empfindlicher auf TMZ reagierten als CD133-negative Zellen aus humanen GBM. Für die Resistenz gegenüber TMZ könnten in SLGC und Nicht-SLGC neben dem MGMT-Status Transmembranproteine der ATP-bindende-Kassette(ABC)-Transporter-Familie eine Rolle spielen, indem sie Arzneistoffe aus der Zelle zu transportieren vermögen (Bleau *et al.*, 2009).

In vivo, d. h. im *Microenvironment* des GBM spielt die bidirektionale Kommunikation zwischen SLGC und den benachbarten Tumor- und Nicht-Tumorzellen eine maßgebliche Rolle (Heddleston *et al.*, 2009; Hjelmeland *et al.*, 2011). Der Begriff *Microenvironment* beschreibt jenes anatomische Areal, das durch einen bestimmten Sauerstoffgehalt, die Verfügbarkeit von Nährstoffen und die Kommunikation zwischen Tumorzellen und Immunzellen charakterisiert ist. Weiterhin sind SLGC in sog. Nischen, dreidimensionalen Strukturen bestehend aus Zellen und Komponenten der extrazellulären Matrix, lokalisiert. Solche Nischen wurden in der Nähe von Blutgefäßen (sog. perivaskuläre Nische), aber auch an der invasiven Front des GBM (sog. hypoxische Nische) identifiziert (Lathia *et al.*, 2011). Sowohl die perivaskuläre als auch die hypoxische Nische tragen zur Therapieresistenz bei (Rosen & Jordan, 2009). Für die in perivaskulären Nischen lokalisierten SLGC wurde die Synthese und das Freisetzen von VEGF

(Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor) beschrieben, wodurch die Vaskulo- und Angiogenese des Tumors gefördert werden (Lathia *et al.*, 2011). Die bisherigen klinischen Erfahrungen mit dem VEGF-Inhibitor Bevacizumab (Gilbertson & Rich, 2007) ergaben jedoch keinen positiven Einfluss auf das Gesamtüberleben (Gilbert *et al.*, 2014). Somit stellte sich die Frage, ob die Aktivierung von Signalwegen, die einen Einfluss auf Proliferation, Differenzierung oder Stoffwechsel haben, eine Optimierung der Standardtherapie ermöglichen könnte.

1.4. Der Retinoid-X-Rezeptor

Der Retinoid-X-Rezeptor (RXR) gehört zur Familie der nukleären Rezeptoren (NR). Diese Familie umfasst eine heterogene Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die in die Regulation der Embryo- und Organogenese, der Homöostase sowie von Metabolismus, Inflammation und Reproduktion involviert sind (Zhang *et al.*, 2004; Weikum *et al.*, 2018). NR lassen sich anhand ihrer Homologie oder ihres Aktivierungsmechanismus vier Klassen zuordnen, wobei der RXR und der Retinsäure-Rezeptor (RAR) Mitglieder der Gruppe II sind (Evans & Mangelsdorf, 2014). Für die Mehrzahl der NR wurden Liganden identifiziert, die die Aktivität dieser Transkriptionsfaktoren regulieren (Gronemeyer & Laudet, 1995; Petkovich & Chambon, 2022, und Referenzen darin). Dabei handelt es sich typischerweise um lipophile Substanzen, darunter Hormone (z. B. Steroid- oder Schilddrüsenhormone), aber auch Vitamine (z. B. Vitamin A oder Vitamin D3) (Xu & Lambert, 2003). Ein endogener Ligand für den RXR ist das Vitamin-A-Derivat 9-*cis*-Retinsäure (9cRA). Daneben können jedoch auch freie Fettsäuren an den RXR binden (Dawson & Xia, 2012), darunter u. a. die Arachidonsäure (Calderon & Kim, 2007). Ein hinsichtlich dieser Arbeit bedeutsamer synthetischer, RXR-spezifischer Ligand ist das Retinoid-Analogon Bexaroten. Dabei handelt es sich um einen RXR-*pan*-Agonisten (Rexinoid), der einerseits für die Therapie des kutanen T-Zell-Lymphoms zugelassen ist¹, andererseits aber auch neuroprotektive Effekte zeigte (Tanaka & De Luca, 2009; Dheer *et al.*, 2018). Der RAR kann aufgrund differenter geometrischer Eigenschaften seiner Ligandenbindetasche sowohl 9cRA als auch *all-trans*-Retinsäure (atRA) binden und durch diese aktiviert werden (Klaholz *et al.*, 1998). Das Rexinoid Bexaroten kann den RAR weder binden noch dessen Aktivität beeinflussen (Boehm *et al.*, 1994).

¹ www.ema.europa.eu/de/documents/overview/targretin-epar-medicine-overview_de.pdf (letzter Zugriff am 15.07.2024)

Nukleäre Rezeptoren der Gruppe II regulieren die Transkription in Form von Homodimeren oder bilden Heterodimere mit anderen NR (Lefebvre *et al.*, 2010; Sever & Glass, 2013). Der RXR kann über verschiedene Heterodimere einen Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung, aber auch den Stoffwechsel nehmen (Aranda & Pascual, 2001). Die Aktivität des RXR hängt dabei sowohl vom Dimerisierungspartner als auch von dem Hormonresponsiven Element (HRE) ab, das von dem jeweiligen Heterodimer erkannt und gebunden wird. Als HRE wird ein kurzer DNA-Sequenzabschnitt innerhalb der Promotor- und/oder Enhancer-Regionen eines Gens bezeichnet, der für jeden Partner im Rezeptordimer eine Bindestelle enthält. Diese Sequenzen sind zueinander in einem definierten Abstand und einer definierten Orientierung (*Direct Repeat* [DR], *Inverted Repeat* [IR] oder *Everted Repeat* [ER]) angeordnet (Details diesbezüglich auf den folgenden Seiten).

RXR-Heterodimere sind für den RXR, genauer den RXR-Agonisten, entweder permissiv oder nicht-permissiv (Abb. 2). Zu den nicht-permissiven Heterodimeren gehören die RXR/RAR-, RXR/TR(Thyroidhormon-Rezeptor)- und RXR/VDR(Vitamin-D3-Rezeptor)-Heterodimere. Permissive Heterodimere bildet der RXR z. B. mit dem PPAR (Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor), LXR (Leber-X-Rezeptor), FXR (Farnesoid-X-Rezeptor) und Nurr1 (*Nuclear Receptor-related 1 Protein*) (Aranda & Pascual, 2001; Dawson & Xia, 2012; Evans & Mangelsdorf, 2014). Während permissive Heterodimere sowohl vom RXR-Liganden als auch vom Liganden des Dimerisierungspartners allein aktiviert werden können, müssen nicht-permissive Heterodimere zunächst durch den Liganden des RXR-Partners aktiviert werden, bevor der RXR-Ligand eine Wirkung ausüben kann (Aranda & Pascual, 2001; Dawson & Xia, 2012). Im Fall eines permissiven Heterodimers kann somit die Anwesenheit jedes Liganden eine transkriptionelle Aktivität auslösen und die Aktivität des aktivierten Partners verstärken. Ist die Aktivität nach der Bindung beider Liganden höher als die Summe der beiden isolierten Aktivitäten, ist eine synergistische Aktivierung anzunehmen. Im nicht-permissiven Heterodimer kann der RXR-Ligand die Aktivität des Partners verstärken, sobald dieser einen Agonisten gebunden hat (Abb. 2; Evans & Mangelsdorf, 2014).

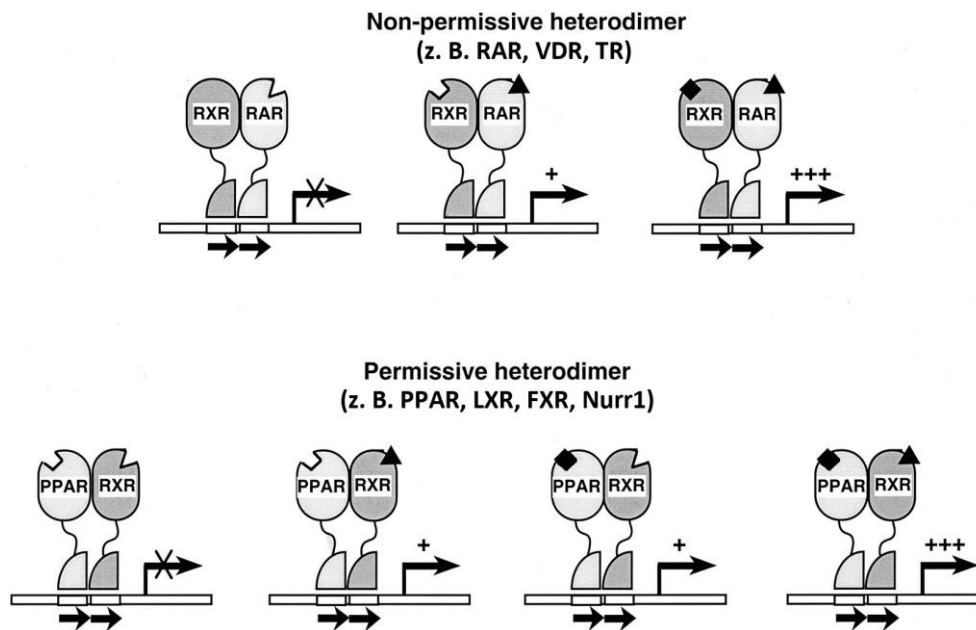


Abb. 2: Permissive und nicht-permissive RXR-Heterodimere. Je nach Typ des Dimerisierungspartners kann der RXR-Ligand allein zur Transaktivierung beitragen (permissives Heterodimer) oder nicht (nicht-permissives Heterodimer). →→: Responsives Element vom DR-Typ; +, +++: Stärke der transkriptionellen Aktivität; weitere Erläuterungen im Text. RAR: Retinsäure-Rezeptor; VDR: Vitamin-D3-Rezeptor; TR: Thyroidhormon-Rezeptor; PPAR: Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor; LXR: Leber-X-Rezeptor; FXR: Farnesoid-X-Rezeptor; Nurr1: *Nuclear Receptor-related 1 Protein*. (Aranda & Pascual, 2001, modifiziert)

Ein weiterer Unterschied, der zwischen permissiven und nicht-permissiven RXR-Heterodimeren auffällt, sind die Dissoziationskonstanten (K_D) der Liganden. So liegen die K_D für die Agonisten sowohl des RAR als auch des TR und VDR im nanomolaren Bereich; dies gilt ebenso für die Bindung von 9cRA und Bexaroten an den RXR. Die K_D für PPAR, LXR und FXR liegen hingegen im mikromolaren Bereich, was damit zusammenhängt, dass permissive RXR-Heterodimere häufig als Sensoren für Metabolite oder Gifte fungieren und verschiedene Stoffwechselprozesse beeinflussen. Dagegen agieren nicht-permissive RXR-Heterodimere häufig als Regulatoren von Zellproliferation, -differenzierung und Apoptose (Dawson & Xia, 2012, und Referenzen darin). Überdies ist der RXR über die Aktivierung der Mikroglia und Remyelinisierung für verschiedene neurologische Erkrankungen, u. a. Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und Multiple Sklerose von Bedeutung (Natrajan *et al.*, 2015; Spathis *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2019).

Ungeachtet ihrer funktionellen Heterogenität zeigen NR eine hochkonservierte modulare Struktur, die sich in der Anwesenheit von fünf (im Fall des RAR sechs) Domänen manifestiert, die mit A-E (im Fall des RAR A-F) bezeichnet werden (Abb. 3A; Gronemeyer & Laudet, 1995). Die N-terminale Domäne (NTD) A/B beinhaltet die ligandenunabhängige Aktivierungsfunktion 1 (AF1), die mit verschiedenen Ko-Regulatoren interagiert und durch posttranslationale Modifikation reguliert wird (Rochette-Egly, 2003). Der N-terminale Bereich der A-Domäne kann durch die Nutzung verschiedener

Promotoren oder differenzielles Spleißen unterschiedlich lang sein, wodurch verschiedene Isoformen ein- und desselben NR entstehen (Gronemeyer & Laudet, 1995; Orlov *et al.*, 2012). Im Gegensatz zur A/B-Domäne ist die DNA-bindende Domäne (DBD, Domäne C), die die Bindung des HRE ermöglicht, hochkonserviert (Orlov *et al.*, 2012). Die DBD umfasst zwei Zinkfinger vom Cys-Cys-Typ und eine als P-Box bezeichnete Aminosäuresequenz. Die P-Box liegt im C-terminalen Bereich des ersten Zinkfingers und ist für die Erkennung und Bindung des Konsensusmotivs (PuGGTCA) in den HRE notwendig. Jeder der beiden Partner in permissiven und nicht-permissiven RXR-Heterodimeren bindet an ein PuGGTCA-Motiv (Lee *et al.*, 1993). In der RXR-DBD und den DBD seiner Partner befindet sich im N-terminalen Bereich des zweiten Zinkfingers die sog. D-Box. Ihre Funktion liegt in der Ausbildung eines (schwachen) Dimerisierungs-*Interfaces* zwischen den DBD der beiden Partner, das es den Heterodimeren ermöglicht, zwischen z. B. einem RARE, TRE, VDRE oder PPARE zu differenzieren. Diese *Response-Elemente* enthalten jeweils zwei Kopien des Konsensusmotivs in identischer Ausrichtung (*Direct Repeat* [DR]), wobei sich zwischen beiden Motiven ein Abstand (*Spacer*) von einem (DR1, PPRE), zwei (DR2, RARE), drei (DR3, VDRE), vier (DR4, TRE) oder fünf (DR5, RARE) Nukleotiden befindet (Gronemeyer & Laudet, 1995; Rastinejad *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2000). Da für die Bindung eines Rezeptordimers an das zugehörige HRE ein gewisses Maß an Flexibilität erforderlich ist, sind die DBD und die ebenfalls hochkonservierte Liganden-bindende Domäne (LBD) über ein „Scharnier“, die sog. *Hinge-Region*, miteinander verknüpft (Orlov *et al.*, 2012). Die LBD faltet sich in allen NR in ein sog. helikales *Sandwich*, in dessen Inneren somit eine hydrophobe Tasche für die Bindung des Liganden entsteht (Le Maire & Bourguet, 2014; Petkovich & Chambon, 2022, und Referenzen darin). Weiterhin weist die LBD eine starke Dimerisierungsoberfläche für die Interaktion mit der LBD des Dimerisierungspartners und die ligandenabhängige Aktivierungsfunktion 2 (AF2) auf (Le Maire & Bourguet, 2014). Ein wesentlicher Teil der AF2 ist die Helix 12 (H12), die in der Abwesenheit von Agonisten von der LBD wegorientiert ist, wodurch eine Oberfläche für die Bindung von Ko-Repressor-Komplexen entsteht. Nach der Bindung eines zugehörigen Agonisten kommt es zu drastischen Konformationsänderungen und einer Umlagerung der H12, sodass eine Oberfläche für die Bindung von Ko-Aktivator-Komplexen entsteht, die die Transkription ermöglichen (Abb. 3; De Lera *et al.*, 2007).

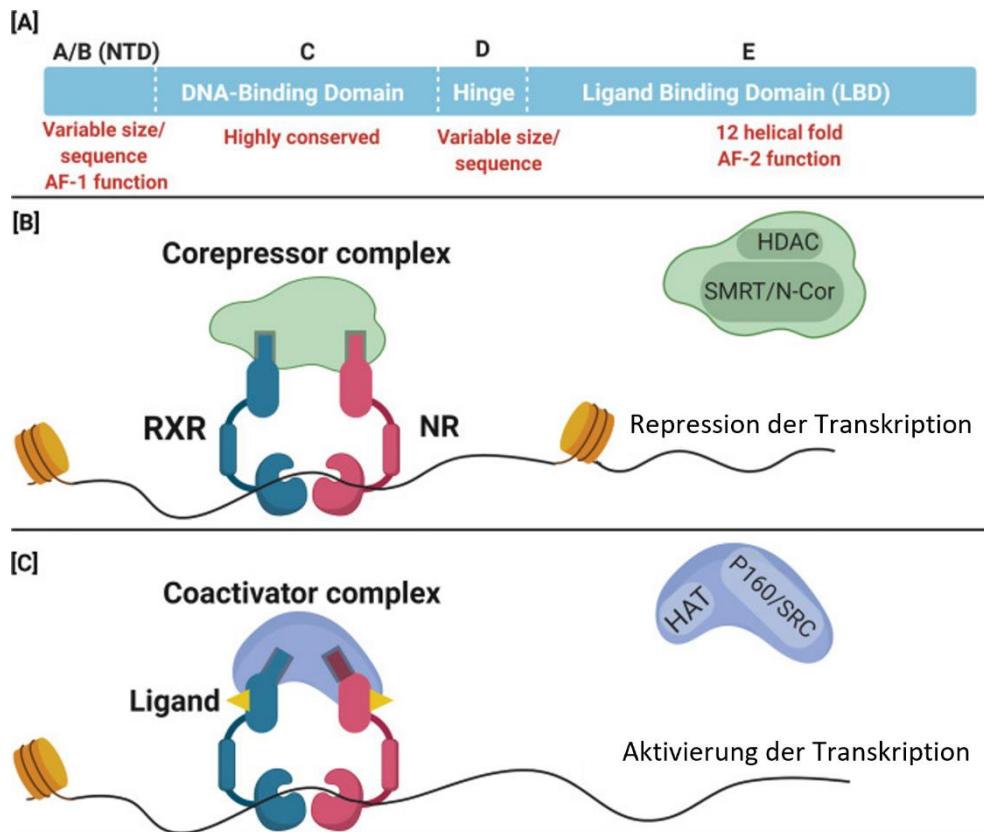


Abb. 3: Struktur und Rolle des RXR in Transaktivierung und -repression. (A) Schematische Darstellung der 5 Domänen (A-E) des RXR. Die N-terminale Domäne (NTD) A/B enthält die Aktivierungsfunktion 1 (AF1); die Domäne C ist die DNA-bindende Domäne (DBD) und umfasst zwei Zinkfinger; die Domäne D fungiert als „Scharnier“ (Hinge) zwischen C und E; die Domäne E ist die Liganden-bindende Domäne (LBD), umfasst eine Dimerisierungs-Domäne und enthält die Aktivierungsfunktion 2 (AF2). (B) Beteiligung des RXR an der Rekrutierung eines Ko-Repressor-Komplexes (Histon-Deacetylase [HDAC] und *Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid Hormone Receptors* / Nukleärer-Rezeptor-Ko-Repressor [SMRT/N-CoR]) in Abwesenheit eines Liganden. NR: nukleärer Rezeptor. (C) Beteiligung des RXR an der Rekrutierung eines Ko-Aktivator-Komplexes (Histon-Acetyltransferase [HAT] und Steroid-Rezeptor-Ko-Aktivator der p160-Familie [P160/SRC]) in Anwesenheit eines Liganden. (Sharma *et al.*, 2022, modifiziert)

Der RXR existiert in Säugern in Form von 3 verschiedenen Proteinen, die von drei verschiedenen Genen kodiert werden. Um diese von den oben erwähnten Isoformen der Proteine differenzieren zu können, werden die drei kodierten Rezeptortypen RXR α , β und γ als Isotypen bezeichnet (Gronemeyer & Laudet, 1995). Welche Isoformen dieser drei RXR-Isotypen vorliegen, ist vom Gewebe abhängig und wird durch Faktoren bedingt, die ein alternatives Spleißen oder eine alternative Promotorenutzung determinieren (Lefebvre *et al.*, 2010; Dawson & Xia, 2012). Hinsichtlich des RXR α -Isotyps wird in den meisten Geweben, aufgrund von alternativem Spleißen, die RXR α 1-Isoform exprimiert, während der RXR α in der Leber, Niere und dem Hirngewebe die vorherrschende Isoform ist. RXR α 2 und α 3 wurden im Hoden identifiziert, RXR α 4 wurde bis *dato* nicht weiter funktionell charakterisiert. Die Expression von RXR β erfolgt vor allem in Endothelzellen und

Monozyten, wurde jedoch auch in mehreren Tumorzelllinien nachgewiesen. Im Mausmodell zeigte sich eine hohe Expression von RXR γ 1 in Muskel- und Hirngewebe, wohingegen RXR γ 2 vorrangig in Skelett- und Herzmuskulatur exprimiert wird. Die hohe Expression von RXR γ im Mausgehirn beschränkt sich allerdings nur auf wenige umschriebene Areale wie das *Striatum*, den *Hippocampus*, die *Amygdala* und vereinzelte Zellen im frontalen und entorhinalen *Cortex* (Sharma *et al.*, 2022, und Referenzen darin). Der Einfluss post-translationaler Modifikationen ist bisher unklar (Macoritto *et al.*, 2008). Da auch die diversen Dimerisierungspartner des RXR in mehreren Isotypen und -formen in Säugern vorkommen (Gronemeyer & Laudet, 1995), ergibt sich ein pleiotropes Wirkungsspektrum, das für zahlreiche physiologische Prozesse, aber auch Erkrankungen des menschlichen Organismus eine Bedeutung haben kann.

1.5. Fragestellung

Wie sich aus den obigen Darstellungen ergibt, trägt die Anwesenheit von SLGC entscheidend zur schlechten Prognose des GBM bei. Die Vorarbeiten unserer AG ergaben Hinweise darauf, dass in SLGC, die aus Patient/-innenbiopsien isoliert wurden, RAR-abhängige und RAR-unabhängige RXR-regulierte Signalwege eine Rolle spielen (Choschzick *et al.*, 2014; Dabrock *et al.*, 2023). Um die Bedeutung des RXR hinsichtlich Proliferation und Differenzierung oder metabolischer Prozesse zu untersuchen, wurden im Vorfeld dieser Arbeit zwei experimentelle Konzepte realisiert: Einerseits wurden SLGC aus verschiedenen malignen Gliomen mit RAR-*pan*-Agonisten und RAR-*pan*-Antagonisten sowie RAR-Isotyp-selektiven Agonisten und RXR-*pan*-Agonisten behandelt und die Effekte auf Zellproliferation und Differenzierung untersucht. Da die Stabilität und die Selektivität der Retinoide limitiert sind, wurden weiterhin in einer ausgewählten SLGC-Linie die drei Gene funktionell inaktiviert, die für die drei RAR-Isotypen kodieren. Dieselbe Strategie wurde auf die drei Gene angewandt, die für die RXR-Isotypen kodieren (Dabrock *et al.*, 2023). Die Inaktivierung erfolgte mittels CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* / CRISPR-assoziiertes Protein 9) (Jinek *et al.*, 2012). Bei der editierten SLGC-Linie handelte es sich um T1338-1, die eine gute Retinoid- und Rexinoid-Responsivität aufwies. Die vorliegende Arbeit ist eine Fortsetzung der von meiner Kollegin Amanda Dabrock begonnenen Arbeiten zur Editierung von RXR-Isotypen in T1338-1-Zellen und umfasst 5 Teilprojekte.

- 1) Zunächst sollten Zellklone, die mittels *Limiting Dilution Assay* (LDA) aus einem RXR-Editierungsansatz isoliert worden waren, auf Editierungen im RXRB- bzw. RXRG-Gen untersucht werden. Dabei war bereits bekannt, dass in den Zellklonen LV₂-sgRXR $\alpha\beta$ -[T1338-1]-C5 und LV₂-sgRXR $\alpha\gamma$ -[T1338-1]-H6 RXRB- bzw. RXRG-Editierungen vorliegen, diese Zellklone jedoch heterogene Zellpopulationen mit Anteilen an Wildtypsequenzen darstellen.

Insbesondere sollte geklärt werden, ob LV₂-sgRXR $\alpha\beta$ -[T1338-1]-C5- und LV₂-sgRXR $\alpha\gamma$ -[T1338-1]-H6-Subklone existieren, die bi-allelische Editierungen in den RXRA/RXRB-Genen (C5-Subklone) bzw. RXRA/RXRG-Genen (H6-Subklone) tragen. Die bi-allelische Editierung im RXRA-Gen war vor Beginn der vorliegenden Arbeit verifiziert worden.

- 2) Im zweiten Schritt sollten mehrere editierte Zellklone einer phänotypischen Charakterisierung unterzogen werden. Hierfür wurden neben den in der vorliegenden Arbeit isolierten Zellklonen auch solche eingesetzt, die den Arbeiten von Amanda Dabrock entstammten. Zunächst galt es, mittels immunzytochemischer Analysen (ICC) die Expression und subzelluläre Lokalisation der Rezeptor-Isotypen RXR α , RXR β und RXR γ zu ermitteln. Weiterhin sollten neben der Expression von Sox2 auch Marker wie Nestin und GFAP erfasst werden.
- 3) Darüber hinaus sollten die editierten Klone mit Bexaroten in An- und Abwesenheit von Temozolomid behandelt und deren Einfluss auf die Proliferation ermittelt werden. Ziel der Experimente war es, zu überprüfen, ob Bexaroten die Aktivität von TMZ modulieren kann und welcher RXR-Isotyp dabei eine Rolle spielen könnte.
- 4) Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob sich der Anteil von Typ-I-, Typ-II- oder Typ-III-Zellen nach der TMZ- und/oder Bexaroten-Behandlung verändert. Dazu wurden dieselben Klone wie für die Proliferationsanalysen eingesetzt und die Expression von Sox2 und CD133 immunzytochemisch erfasst.
- 5) Parallel zu den in (4) beschriebenen Experimenten sollte immunzytochemisch die Phosphorylierung der Histonvariante H2AX (γ H2AX) untersucht werden, die als ein Maß für die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen betrachtet werden kann (Turinetti & Giachino, 2015).

2. Material & Methoden

2.1. Material

Tab. 2: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller/Bezugsquelle (Sitz)
96-Loch-Platten (Mikrotiterplatten für Zellkulturen)	Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)
Deckglas	Epredia (Braunschweig, DE)
Einmalplastikpipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)
Einmalplastikröhrchen mit Rundboden (12 ml)	Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)
Einmalplastikröhrchen, skaliert (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)
Kammerobjektträger (<i>Chamber Slides</i>) 0,2-0,5 ml Lab-Tek™ II	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)
Pasteurpipetten (mit/ohne Watte)	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Biozym Scientific (Oldendorf, DE)
Petrischalen	Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)
Pipettenspitzen (für 8-Kanal-Pipetten)	Starlab (Ahrensburg, DE)
Pipettenspitzen (für Gilson P20, P100, P1000)	Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)
Reaktionsgefäße mit Sicherheitsverschluss (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf (Hamburg, DE)
sterile Plastikröhrchen mit Schubdeckel (12 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Zahnstocher (nach Erwerb autoklaviert, steril)	Edeka (Hamburg, DE)
Zellkulturflaschen (25 cm ² [T25])	Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)

DE: Deutschland; PCR: Polymerasekettenreaktion.

Tab. 3: (Bio-)Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller/Bezugsquelle (Sitz)
6x DNA Loading Dye	BioRad (München, DE)
6x Orange DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)
6x TriTrack DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)
Agarose LE	Biozym Scientific (Oldendorf, DE)
all-trans-Retinsäure (atRA)	Sigma-Aldrich (München, DE)
Ampicillin-Stammlösung (100 mg/ml)	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Bexaroten (K_D [RXR α] = 33 nM; K_D [RXR β] = 24 nM; K_D [RXR γ] = 25 nM)	Tocris Bioscience (Bristol, UK)
Chloroform (p. a.)	Merck (Darmstadt, DE)
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol; 50 μ g/ml)	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich (München, DE)
dNTP-Mix (10 mM)	Roche (Mannheim, DE)
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Sigma-Aldrich (München, DE)
Eisessig	Sigma-Aldrich (München, DE)
Ethanol (100 % und 70 % , p. a.)	J.T. Baker (Deventer, NL)
Ethanol (70 % , technisch)	Sigma-Aldrich (München, DE)
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	BioRad (München, DE)
FCS (fetales Kälberserum)	Gibco (Karlsruhe, DE)
Fibronectin (1 mg/ml)	PromoCell (Heidelberg, DE)
Fluoromount-G™	Southern Biotech (Birmingham, USA)
GeneRuler (1 kb Plus DNA-Leiter)	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)
HCl (Salzsäure)	Sigma-Aldrich (München, DE)
HiDi™ Formamid	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)
LB Broth Agar (Lennox)	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)
LB Broth Pulver (Lennox)	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)
L-Glutamin	PromoCell (Heidelberg, DE)
Methanol (100 %)	Merck (Darmstadt, DE)
NaOH (Natriumhydroxid)	Merck (Darmstadt, DE)
Natriumazid (0,2%-ige Lösung)	Merck (Darmstadt, DE)
Nuklease-freies Wasser	Ambion (Darmstadt, DE)
Penicillin/Streptomycin	PromoCell (Heidelberg, DE)
RIVAL Me Nagellack	Dirk Rossmann (Burgwedel, DE)

Roti®-Phenol	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Merck (Darmstadt, DE)
Temozolomid (Temodal®)	Essex Pharma (München, DE)
TRIS-Base (Tris[hydroxymethyl]aminomethan)	Sigma-Aldrich (München, DE)
Trypan-blau (0,4 %)	Fluka Analytical (Seelze, DE)
Trypsin/EDTA (0,05 %)	Gibco (Karlsruhe, DE)
X-Gal (10 %)	Invitrogen (Carlsbad, USA)

DE: Deutschland; DNA: Desoxyribonukleinsäure; dNTP: Desoxyribonukleotid; kb: Kilobase; LB: Luria-Bertani; LE: *Low Electroendosmosis*; NL: Niederlande; p. a.: zur Analyse; UK: Vereinigtes Königreich Großbritannien und Nordirland; USA: Vereinigte Staaten von Amerika; X-Gal: 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid.

Tab. 4: Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
1x BrdU-Waschpuffer	5 % (v/v) 20x BrdU-Waschpuffer; 95 % (v/v) H ₂ O (Milli-Q®)
1x PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,5 mM KH ₂ PO ₄ ; in H ₂ O (Milli-Q®); autoklaviert
1x TBE	89 mM TRIS-Base; 1 mM EDTA (pH 8,0); 89 mM Borat-Salz; in H ₂ O (Milli-Q®)
1x TE	10 mM TRIS-HCl (pH 7,5); 1 mM EDTA (pH 8,0); in H ₂ O (Milli-Q®); autoklaviert
Färbelösung für ICC	10 % FCS; 0,04 % Na-Azid in 1x PBS
Fibronectin-Lösung	0,1 % (v/v) Fibronectin (1 mg/ml); 99,9 % (v/v) 1x PBS
ICC-Fixiergemisch	95 % (v/v) Ethanol; 5 % (v/v) Essigsäure; auf -20 °C temperiert
Sol I	50 mM Glukose; 25 mM TRIS-HCl (pH 8,0); 10 mM EDTA (pH 8,0); in H ₂ O (Milli-Q®); steril gefiltert
Sol II	0,2 M NaOH; 1 % SDS; in H ₂ O (Milli-Q®); vor jeder Anwendung frisch angesetzt
Sol III	60 ml 5 M Kaliumacetat; 11,5 ml eiskalte Essigsäure; 28,5 ml H ₂ O (pH 4,8); steril gefiltert
TE/RNase	0,5 % (v/v) RNase Cocktail™ Enzymgemisch (20 µg/ml; Tab. 6) in 1 ml 1x TE (pH 7,5)
X-Gal Lösung	10 % (w/v) X-Gal in DMSO

BrdU: 5-Brom-2'-desoxyuridin; DMSO: Dimethylsulfoxid; EDTA: Ethylendiamintetraacetat; FCS: fetales Kälberserum; H₂O: Wasser; HCl: Salzsäure; ICC: Immunzytochemie; KCl: Kaliumchlorid; KH₂PO₄: Kaliumdihydrogenphosphat; Na: Natrium; Na₂HPO₄: Dinatriumhydrogenphosphat; NaCl: Natriumchlorid; PBS: Phosphatgepufferte Salzlösung; RNase: Ribonuklease; SDS: Natriumdodecylsulfat; Sol: *Solution*; T(B)E: TRIS-(Borat-)EDTA; TRIS: Tris(hydroxymethyl)aminomethan; X-Gal: 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid.

Tab. 5: Kits für die Aufreinigung von DNA

Bezeichnung	Hersteller/Bezugsquelle (Sitz)
DNeasy® Blood & Tissue Kit	Qiagen (Hilden, DE)
NucleoSEQ® Kit	Macherey-Nagel (Düren, DE)
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit	Macherey-Nagel (Düren, DE)

DE: Deutschland; PCR: Polymerasekettenreaktion.

Tab. 6: Kits mit bzw. ohne Enzym-Komponente

Bezeichnung	Hersteller/Bezugsquelle (Sitz)
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)
BrdU Cell Proliferation Assay Kit #6813	Cell Signaling Technology (Massachusetts, USA)
EcoR1 (12 U/μl) mit 10x Puffer	Promega (Madison, USA)
Proteinase K (600 U/ml)	Roche Applied Science (Mannheim, DE)
RNase Cocktail™ Enzymgemisch	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)
Taq-Polymerase (5 U/μl) mit 10x Puffer	VWR International (Pennsylvania, USA)
TOPO™ TA Cloning™ Kit	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)

BrdU: 5-Brom-2'-desoxyuridin; DE: Deutschland; EcoR1: erste aus *Escherichia coli*-Stamm RY13 isolierte Restriktionsendonuklease; PCR: Polymerasekettenreaktion; RNase: Ribonuklease; Taq: *Thermus aquaticus*; TE: TRIS-EDTA; TOPO: Topoisomerase I; U: Enzyeinheit; USA: Vereinigte Staaten von Amerika.

Tab. 7: Primäre Antikörper für die Immunzytochemie

Bezeichnung	Verdünnung	Hersteller (Sitz)
mouse-anti-CD133 (W6B3C1, #130-092-395)	1:200	MACS Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, DE)
mouse-anti-human-Nestin (#MAB5326)	1:100	Merck Millipore (Temecula, CAN)
mouse-anti-RXRα (K8508, #433900)	1:200	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)
rabbit-anti-GFAP (#AB5804)	1:250	Merck Millipore (Temecula, CAN)
rabbit-anti-RXRβ (#PA5-111571)	1:100	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)
rabbit-anti-RXRγ (#PA5-110337)	1:100	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)
rabbit-anti-Sox2 (#3579)	1:100	Merck Millipore (Temecula, CAN)
rabbit-anti-γH2AX (#9718)	1:200	Cell Signaling Technology (Danvers, USA)

CAN: Kanada; CD133: *Cluster of Differentiation* 133; DE: Deutschland; GFAP: Saures Gliafaserprotein; RXR: Retinoid-X-Rezeptor; Sox2: SRY(*Sex-determining Region Y*)-Box 2; UK: Vereinigtes Königreich Großbritannien und Nordirland; USA: Vereinigte Staaten von Amerika; γH2AX: phosphorylierte Histonvariante H2AX.

Tab. 8: Sekundäre Antikörper für die Immunzytochemie

Bezeichnung	Verdünnung	Hersteller (Sitz)
goat-anti-mouse DyLight® (#96871)	1:300	Abcam (Cambridge, UK)
goat-anti-rabbit Cy3 (#111-165-003)	1:300	Jackson Immuno-Research (Newmarket, Suffolk, UK)

Cy3: Cyanin 3; UK: Vereinigtes Königreich Großbritannien und Nordirland.

Tab. 9: Geräte und Hilfsmittel

Bezeichnung	Hersteller (Sitz)
8-Kanal-Pipetten (5-50 µl, 50-300 µl)	Starlab (Ahrensburg, DE)
Applied Biosystems 3130 Genetic Analyser	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)
Brutschrank Galaxy 170S	Eppendorf New Brunswick (Hamburg, DE)
DYKEM® TEXPEN® Markierstift (1,5 mm)	neoLab (Berlin, DE)
EasyPhor Midi Gelelektrophorese-Kammer mit Zubehör	Biozym Scientific (Oldendorf, DE)
Fluoreszenzmikroskop Biozero 8000	Keyence (Neu-Isenburg, DE)
GeneTouch Thermal Cycler	Bioer Technology (Hangzhou, CN)
Heizblock HB-LS1	VLM (Bielefeld, DE)
Heracell™ VIOS 160i CO ₂ -Inkubator	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)
Heraeus™ Heracell™ 150 CO ₂ -Inkubator	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)
Heraeus™ Pico 17 Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)
Inkubator UNE 400	Memmert (Schwabach, DE)
Leica DMil Lichtmikroskop	Leica Microsystems (Wetzlar, DE)
LKB UV-Transilluminator	LKB (Stockholm, SE)
Micro-Zentrifuge ROTILABO®	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Mikroliter-Pipette (0,2-0,5 µl)	Starlab (Ahrensburg, DE)
Mikroliter-Pipetten (P20, P200, P1000)	Gilson (Middletown, USA)
Milli-Q® Direct Wasseraufbereitungssystem	Merck (Darmstadt, DE)
Molecular Imager ChemiDoc XRS	BioRad (München, DE)
Neubauer-Zählkammer	Karl Hecht (Sondheim, DE)
New Brunswick™ Galaxy® 170 S high capacity CO ₂ -Inkubator	Eppendorf New Brunswick (Hamburg, DE)
New Brunswick™ Innova® 42 Incubator Shaker	Eppendorf New Brunswick (Hamburg, DE)

Sunrise™ Absorbance Microplate Reader	Tecan (Männedorf, CH)
T100™ Thermal Cycler	BioRad (München, DE)
Vortex Genie 2™	Bender & Hobein (Zürich, CH)
VX-65 Autoklav	Systec (Linden, DE)
Wasserbad	Köttermann (Uetze, DE)
Zellkultur-Werkbank Safe 2020 S2	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)
Zentrifuge 5418R	Eppendorf (Hamburg, DE)
Zentrifuge ROTINA 380 R	Hettich (Tuttlingen, DE)

CH: Schweiz; CN: China; CO₂: Kohlenstoffdioxid; DE: Deutschland; S2: Biologische Sicherheitsstufe 2; SE: Schweden; USA: Vereinigte Staaten von Amerika; UV: Ultraviolett.

Tab. 10: Software

Bezeichnung	Hersteller (Sitz)
BZ-9000 Observation Application	Keyence (Neu-Isenburg, DE)
Chromas (Version 2.6.6)	Technelysium (City of Gold Coast, AUS)
CorelDRAW Graphics Suite X8	Corel Corporation (Ottawa, CAN)
ENSEMBL Genome Browser (Release 106)	EMBL-EBI (Cambridge, UK)
ExPASy Translate Tool	Swiss Institute of Bioinformatics (Lausanne, CH)
GraphPad Prism 9	GraphPad Software (San Diego, USA)
Magellan™ Reader Control and Data Analysis Software	Tecan (Männedorf, CH)
Microsoft Office (2021)	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
Quantity One (Version 4.6.2)	BioRad (München, DE)
QuPath, Open-Source-Software (Versionen 0.2.3 bis 0.4.8)	QuPath-Entwickler (Bankhead <i>et al.</i> , 2017), University of Edinburgh (Edinburgh, UK)
Sequencing Analysis Software (Version 5.2)	Applied Biosystems (Foster City, USA)

AUS: Australien; CAN: Kanada; CH: Schweiz; DE: Deutschland; UK: Vereinigtes Königreich Großbritannien und Nordirland; USA: Vereinigte Staaten von Amerika.

2.1.1. Zelllinie

Bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen handelt es sich um verschiedene Klone bzw. Subklone der SLGC-Linie T1338-1, die sich von der Primärkultur (T1338) eines primären GBM eines 57-jährigen männlichen Patienten ableitet und in der AG Zechel etabliert wurde. Für die Arbeiten mit humanem Tumormaterial liegt der AG ein positives Votum der Ethikkommission der Universität zu Lübeck vor (Aktenzeichen 08-070, 27.06.2008 und 18.03.2009; Kap. 7.2). Nach der ärztlichen Aufklärung erteilen die Patient/-innen schriftlich ihre Einwilligung zur Verwendung von Gewebeproben in der Forschung. Die Tumorsektion erfolgt stets im Rahmen der Standardtherapie durch die Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UKSH), Campus Lübeck. Die histopathologische Beurteilung des Tumorgewebes erfolgt gemäß WHO-Klassifikation (Louis *et al.*, 2016, 2021) durch das Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE). Die im Forschungslabor verwendeten humanen Gliomgewebe werden vor der Verwendung durch Zuordnung einer fortlaufenden 4-stelligen Nummer mit vorangestelltem „T“ anonymisiert.

Die in dieser Arbeit verwendeten T1338-1-Klone bzw. -Subklone (Tab. 11) wurden von der med. Doktorandin Amanda Dabrock isoliert (Dabrock *et al.*, 2023). Die Zellklone entstammen mehreren *Limiting Dilution Assays* (LDA), die nach der CRISPR/Cas9-vermittelten Editierung der Gene RXRA, RXRB und RXRG auf 96-Loch-Platten durchgeführt wurden. Bei der Benennung symbolisieren die griechischen Buchstaben $\alpha\beta$, $\alpha\gamma$, β und γ jeweils die Herkunft aus den Editierungsansätzen, die Kombination aus Buchstabe und Zahl die Position auf der korrespondierenden 96-Loch-Platte und die griechischen Buchstaben dahinter die nachweislich editierten Gene. Es sei angemerkt, dass die Charakterisierung beider Subklone des Klons LV₂-sgRXR $\alpha\gamma$ -[T1338-1]-H6 und eingeschränkt des Subklons LV₂-sgRXR $\alpha\gamma$ -[T1338-1]-C5E11 in der vorliegenden Arbeit erfolgte.

Tab. 11: Klone der SLGC-Linie T1338-1

Bezeichnung: LV₂ - sgRXR...	targtierter RXR-Isotyp	RXRα- Status	RXRβ- Status	RXRγ- Status	Kurzbezeichnung:
$\alpha\beta$ - [T1338-1] - B11 mock	α , β	WT	WT	WT	B11 mock
$\alpha\beta$ - [T1338-1] - C5 (?)	α , β	mut	?	WT	C5
$\alpha\beta$ - [T1338-1] - C5E11 (?)	α , β	mut	#	WT	C5E11
$\alpha\beta$ - [T1338-1] - C5H6 (?)	α , β	mut	#	WT	C5H6
$\alpha\beta$ - [T1338-1] - E9 β	α , β	WT	mut	WT	E9 β
$\alpha\gamma$ - [T1338-1] - E6 α	α , γ	mut	WT	WT	E6 α
$\alpha\gamma$ - [T1338-1] - E8 α	α , γ	mut	WT	WT	E8 α
$\alpha\gamma$ - [T1338-1] - F4 α	α , γ	mut	WT	WT	F4 α
$\alpha\gamma$ - [T1338-1] - H6 (?)	α , γ	mut	WT	?	H6
$\alpha\gamma$ - [T1338-1] - H6C4 (?)	α , γ	mut	WT	#	H6C4
$\alpha\gamma$ - [T1338-1] - H6C9 (?)	α , γ	mut	WT	#	H6C9
β - [T1338-1] - E5 β	β	WT	mut	WT	E5 β
β - [T1338-1] - G3 β	β	WT	mut	WT	G3 β
γ - [T1338-1] - D7 γ	γ	WT	WT	mut	D7 γ
γ - [T1338-1] - D12 γ	γ	WT	WT	mut	D12 γ

LV₂: lentivirales System, das zur Editierung eingesetzt wurde; sgRXR: *Single-Guide*-Ribonukleinsäure für ein Retinoid-X-Rezeptor-kodierendes Gen; [T1338-1]: Editierungsansatz der SLGC-Linie T1338-1; mut: mutiert; WT: Wildtyp; ?: Editierungsstatus vor Beginn der vorliegenden Arbeit unklar; #: in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Tab. 12: Zellkulturmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller (Sitz)
Basismedium	80 % DMEM/Ham's F12	Biochrom (Berlin, DE)
	2 % (v/v) L-Glutamin	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
	1 % Penicillin/Streptomycin	PromoCell (Heidelberg, DE)
	1 % (v/v) Amphotericin B	PromoCell (Heidelberg, DE)
N-Medium	80 % Basismedium	
	20 % (v/v) BIT	Biochrom (Berlin, DE)
	Human r-EGF (20 ng/ml)	PromoCell (Heidelberg, DE)
	Human r-bFGF (20 ng/ml)	Gibco (Karlsruhe, DE)

bFGF: basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor; BIT: Gemisch aus bovinem Serumalbumin/Insulin/Transferrin; DE: Deutschland; DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*; EGF: Epidermaler Wachstumsfaktor; r: rekombinant.

2.1.2. Bakterienstamm

Als Wirtszellen für rekombinante *pCRTM2.1-TOPOTM*-Plasmide aus der TOPO-TA-Klonierung dienten kompetente *Escherichia-coli*-K12-Bakterien des Stammes DH5 α (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE). Der Genotyp lautet: F- ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rK-, mK+) phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1 tonA.

Der *Locus* lacZ Δ M15 ermöglicht die Blau-weiß-Selektion auf OJA-Platten (Tab. 13). Weiterhin sei angemerkt, dass die recA1-Mutation durch die Ausschaltung von Rekombinasen die homologe Rekombination unterbindet; die endA1-Mutation resultiert in der Inaktivierung einer intrazellulären Endonuklease, wodurch die Degradation von transfizierten Plasmiden verhindert wird.

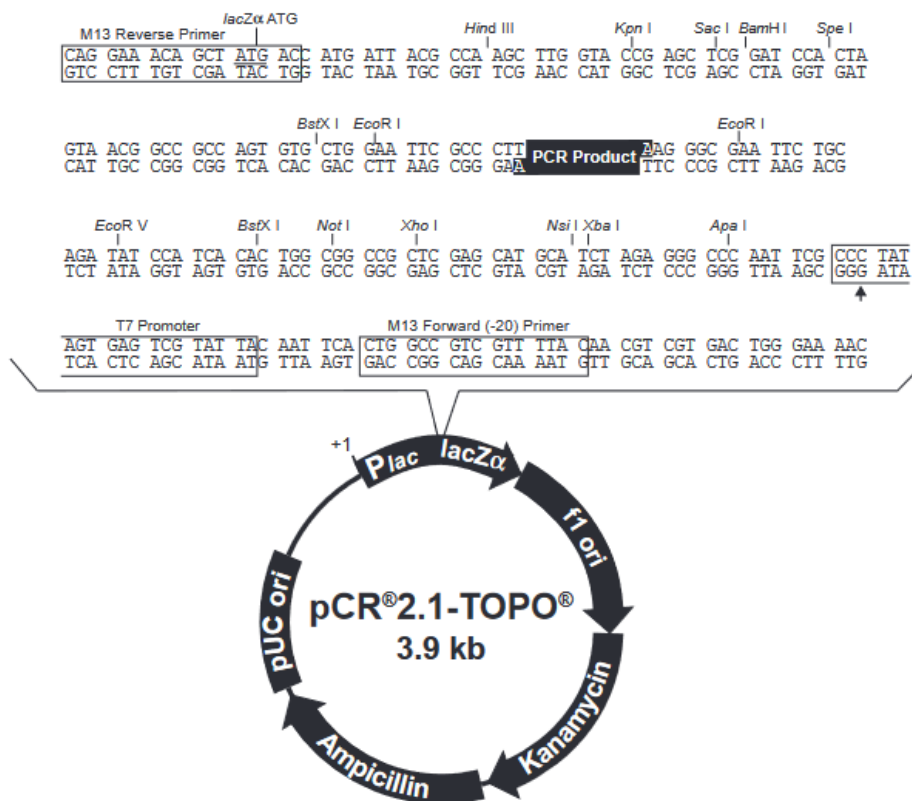
Tab. 13: Medien für Bakterienkulturen und Agarplatten

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB-Medium	20 g LB-Pulver (Lennox) pro 1 l H ₂ O (Milli-Q®); autoklaviert
LB/Amp-Medium (Ampicillin-Konzentration: 100 μ g/ml)	1 ml Ampicillin-Stammlösung (Tab. 3) zu 1 l LB-Medium geben
LB/Amp-Agar-Platten (OJA-Platten)	20 g LB-Agar (Lennox) in 1 l LB-Medium autoklavieren; nach dem Abkühlen auf 50 °C 1 ml X-Gal-Lösung (Tab. 3) und 1 ml Ampicillin-Stammlösung zugeben

Amp: Ampicillin; H₂O: Wasser; LB: Luria-Bertani; OJA: *Orange Juice Agar*; X-Gal: 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid.

2.1.3. pCR™2.1-TOPO™-Vektor

Zur TA-Klonierung (Green & Sambrook, 2012) des Exons 4 der für die Proteine RXR α , RXR β und RXR γ kodierenden Gene wurde das pCR™2.1-TOPO™-Plasmid (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE) verwendet. Es ermöglicht nach Transformation von DH5 α -Bakterien (Kap. 2.1.2) eine Blau-weiß-Selektion auf OJA-Platten. Das Plasmid besitzt zwei Restriktionsstellen für EcoR1, die unmittelbar 5' und 3' der TOPO-Klonierungsstelle liegen. Weiterhin trägt der Vektor die Information für eine Ampicillin-Resistenz und weist eine Bindungsstelle für den M13-Primer (Tab. 14) zur Sanger-Sequenzierung auf (Abb. 4).



Comments for pCR[®]2.1-TOPO[®] 3931 nucleotides

LacZ α fragment: bases 1-547
M13 reverse priming site: bases 205-221
Multiple cloning site: bases 234-357
T7 promoter/priming site: bases 364-383
M13 Forward (-20) priming site: bases 391-406
f1 origin: bases 548-985
Kanamycin resistance ORF: bases 1319-2113
Ampicillin resistance ORF: bases 2131-2991
pUC origin: bases 3136-3809

Abb. 4: pCR™2.1-TOPO™-Plasmid. Der linearisierte Vektor besitzt 3'-T-Überhänge sowie eine kovalent gebundene Topoisomerase I, was die Ligation mit PCR-Produkten der Taq-Polymerase ermöglicht. Die Bindungsstellen für den M13-Primer (*forward* und *reverse*) flankieren die Multiple Klonierungsstelle (MCS), welche zwei EcoR1-Restriktionsstellen beinhaltet und innerhalb des lacZ α -Locus liegt. Der Vektor trägt zudem die Gene für eine Ampicillin- und Kanamycin-Resistenz. f1 ori: Replikationsursprung der f1-Phage; kb: Kilobase; ORF: Offener Leserahmen; Plac: lac-Promotor; pUC ori: Replikationsursprung des pUC-Plasmids; T7 promoter: Erkennungssequenz für die T7-RNA-Polymerase. (Herstellerangaben)

2.1.4. Oligonukleotide (*Primer*)

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma *MWG Eurofins Genomics* (Ebersberg, DE) bezogen. Die Konzentration der Stammlösung betrug stets 100 µM, die Konzentration der für Experimente eingesetzten *Primer*-Verdünnungen 10 µM.

Tab. 14: *Primer* für PCR oder Sequenzierung

Bezeichnung	Sequenz	T _A [°C]	Fragmentlänge
hu_RXRβ_DBD_F	5' - GGT GAA GGT GTC TCC ATG C - 3'	58	Länge des Wildtyp-
hu_RXRβ_DBD_R	5' - GTG GGA TAA GGG AGA AGG G - 3'		PCR-Produkts: 289 bp
hu_RXRγ_DBD_F	5' - GCT TTC TGT CCC AAT GCC C - 3'	58	Länge des Wildtyp-
hu_RXRγ_DBD_R	5' - CCC TTG CCT AGG AAA TGC C - 3'		PCR-Produkts: 369 bp
M13_62_ex_F	5' - GTT GTA AAA CGA CGG CCA GTG - 3'	62	*

A/C/G/T: Basen der DNA, Adenin/Cytosin/Guanin/Thymin; bp: Basenpaar; DBD: DNA-bindende Domäne; F: *forward*; hu: human; M13: M13-Bakteriophagen-Sequenz; R: *reverse*; RXR: Retinoid-X-Rezeptor; T_A: *Annealing*-Temperatur. *: nur für Sanger-Sequenzierungen eingesetzt; der *M13_62_ex_F-Primer* bindet im *pCR™2.1-TOPO™*-Vektor 95 bp 5' der Klonierungsstelle.

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Die SLGC-Klone wurden im Zellkultur-Inkubator (Tab. 9) in serumfreiem N-Medium (Tab. 12) in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37 °C und unter kontinuierlicher CO₂-Begasung (5 %) kultiviert. Da alle Klone und die für Kontrollexperimente genutzte T1338-1-Mutterkultur ein sphäroidales Wachstum aufwiesen, dienten die Größe und die Farbe der Sphäroide sowie die Farbe des Kulturmediums als Kriterien für die Notwendigkeit, eine Passage der Zellen durchzuführen. So zeigte die zunehmend gelbliche Färbung des ursprünglich rötlichen Mediums eine Verschiebung des pH-Werts vom neutralen in den sauren Bereich an.² Große und mittelgroße Sphäroide entwickeln eine bräunliche Verfärbung im Inneren der Aggregate, die auf einen zunehmenden Mangel an Nährstoffen und Sauerstoff hinweist und bei den Abkömmlingen der SLGC-Linie T1338-1 innerhalb eines Tages eine Induktion des Zelltods auslösen kann (empirische Daten des Labors, persönliche Mitteilung von PD Dr. rer. nat. C. Zechel).

Passagieren und Ernten

Wie oben erläutert, zeigen die Klone der Zelllinie T1338-1 ein sphäroidales Verhalten. Daher handelt es sich beim Passagieren dieser Zellen primär um ein enzymatisches und mechanisches Dissoziieren der Aggregate und erst sekundär um ein Aussäen der Zellen in einer gewünschten Verdünnung. Um die Zellen zu passagieren oder zu ernten, wurde die Zellsuspension in ein steriles Einmalplastikröhrchen mit Rundboden (Tab. 2) transferiert und darin für 3 min bei 250 xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig entfernt und das Zellpellet mit 1x PBS gewaschen, wobei erneut wie oben angegeben zentrifugiert wurde. Danach wurde das Pellet mittels einer sterilen Pasteurpipette in 1 ml Trypsin/EDTA (Tab. 3) so lange bei Raumtemperatur resuspendiert, bis eine homogene Einzelzellsuspension entstanden war. Die enzymatische Reaktion wurde mit einem äquivalenten Volumen an N-Medium gestoppt. Abschließend wurde für 5 min bei 500 xg und Raumtemperatur zentrifugiert und die Zellen, je nach weiterem Vorhaben, in 1x PBS (Zählen und Plattieren) oder N-Medium (Passagieren) resuspendiert. Überschüssige Zellen wurden mit 1x PBS gewaschen, in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt, für 1 min bei 1000 xg und Raumtemperatur pelletiert und nach Entfernen des Überstandes bei -20 °C gelagert. Weiterhin wurden Zellen in T25-Zellkulturflaschen (Tab. 2) expandiert und von diesen Zellpellets angefertigt, um Material für die Analysen von Biomolekülen zu gewinnen.

² www.binder-world.com/de-de/wissen/detail/schluesselfaktor-in-der-zell-und-gewebekultur-der-ph-wert (letzter Zugriff am 15.07.2024)

Bestimmung der Zellzahl

Für die diversen Experimente wurden die Zellen stets in einer definierten Zellzahl plattiert. Um die Anzahl an geernteten Zellen in der Einzelzellsuspension zu ermitteln, wurde die Neubauer-Zählkammer (Tab. 9) eingesetzt. Hierzu wurden 20 µl der enzymatisch und mechanisch dissoziierten Zellen in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß transferiert und dort mit 20 µl Trypan-Blau-Lösung (Tab. 3) gemischt. Ein Tropfen dieser Suspension wurde nach Herstellerangaben in die Zählkammer überführt und unter dem Lichtmikroskop je zweimal 16 Felder ausgezählt. Der Faktor der Neubauer-Zählkammer beträgt 1×10^4 .

2.2.2. Extraktion genomischer DNA

Um die genomische DNA (gDNA) aus Zellpellets zu isolieren, kam das *DNeasy[®]Blood & Tissue Kit* (Tab. 5) nach Herstellerangaben zum Einsatz. Es wurden jedoch einige Modifizierungen des Protokolls vorgenommen, die im Folgenden geschildert werden: So erfolgte das Durchmischen von Komponenten in den Reaktionsgefäßen ausschließlich durch Schnippen und Invertieren, um das Scheren der hochmolekularen DNA zu vermeiden. Überdies wurde nach Zugabe des AL-Puffers und der Proteinase K die Inkubationszeit bei 56 °C auf 1 h verlängert, um das Verdauen der Histone zu optimieren. Weiterhin wurden im Fall von kleinen Zellpellets 50 µl statt 200 µl AE-Puffer für die Elution eingesetzt und der Puffer vor der Elution für 10 min bei Raumtemperatur auf der Ionenaustauschsäule inkubiert, um die Ausbeute an gDNA zu erhöhen. Durch diese Änderungen wurden die Qualität und die Quantität der gDNA-Extraktion deutlich verbessert. Um das Ergebnis der gDNA-Extraktion zu prüfen, wurden 5 µl des Eluats auf einem 0,5%-igen TBE-Agarose-Gel analysiert (Kap. 2.2.3). Die Lagerung der extrahierten gDNA erfolgte bei 4 °C.

2.2.3. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse der Produkte aus der gDNA-Extraktion (Kap. 2.2.2), den PCR-Ansätzen (Kap. 2.2.4), Plasmid-Präparationen und Restriktionsverdauen (Kap. 2.2.7) wurden diese auf TBE-Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei wurde die Konzentration der Agarose im Gel an die Größe des zu analysierenden Fragments angepasst.

Tab. 15: TBE-Agarosegele

Anteil der Agarose im Gel (w/v)	Anwendung
0,5 %	gDNA
1,0 %	Plasmide
1,6 %	PCR-Produkte, Plasmide nach Restriktionsverdau

gDNA: genomische Desoxyribonukleinsäure; PCR: Polymerasekettenreaktion.

Je nach Fragestellung wurde die entsprechende Menge an Agarose (Tab. 3) abgewogen und in einem 250ml-Erlenmeyerkolben mithilfe einer handelsüblichen Mikrowelle in 50 ml 1x TBE-Puffer (Tab. 4) gelöst. Nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C wurde 1 µl Ethidiumbromid-Lösung (Tab. 3) hinzugefügt und die Lösung in die vorbereitete Gelküvette gegossen. Nach dem Polymerisieren wurde das Gel in der *EasyPhor Midi* Gelelektrophorese-Kammer (Tab. 9) platziert und vollständig mit 1x TBE-Puffer bedeckt. Im Fall von präparativen Gelen (Kap. 2.2.5) wurden die Kammern vor der Elektrophorese gereinigt und frischer 1x TBE-Puffer eingesetzt. Für analytische Gele konnte derselbe TBE-Puffer mehrfach genutzt werden. Die zu analysierenden DNA-Proben wurden, je nach Fragestellung, mit verschiedenen DNA-Gel-Ladepuffern versetzt, wobei die finale Konzentration stets 1x *Loading Dye* (Tab. 16) betrug.

Tab. 16: DNA-Gel-Ladefarbstoffe

Bezeichnung	Anwendung
6x DNA Loading Dye (Tab. 3)	gDNA
6x Orange DNA Loading Dye (Tab. 3)	PCR-Produkte, Restriktionsverdaue
6x TriTrack DNA Loading Dye (Tab. 3)	unverdaute Plasmide

(g)DNA: (genomische) Desoxyribonukleinsäure; PCR: Polymerasekettenreaktion.

Die Gelelektrophorese erfolgte für 25-30 min bei 100 V und Raumtemperatur. Die Detektion der DNA-Banden erfolgte mithilfe des *Molecular Imager ChemiDoc XRS* (Tab. 9) unter Verwendung der *Software Quantity One* (Tab. 10).

2.2.4. Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktionen (PCR) wurden nach Standard-Protokoll (Green & Sambrook, 2012) durchgeführt. Dabei wurde stets die Taq-Polymerase (Tab. 6) eingesetzt. Die Methode der PCR wurde verwendet, um das Exon 4 des Gens RXRB bzw. RXRG aus gDNA zu amplifizieren. Weiterhin

wurde nach der TA-Klonierung (Kap. 2.2.6) und Plasmid-Minipräparation die Anwesenheit der gewünschten Insertion in den TOPO-Vektoren mittels PCR überprüft. Für die PCR-Ansätze wurden nach dem in Tabelle 17 dargestellten Pipettierschema *Mastermixes* hergestellt. Je 19 µl *Mastermix* wurden in je ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert, auf 4 °C gekühlt und danach 1 µl Template (gDNA oder Plasmid-DNA) hinzugefügt. Für jede PCR wurden eine Negativ- und eine Positiv-Kontrolle mitgeführt, die mit demselben *Mastermix* angesetzt wurden.

Tab. 17: PCR-Mastermix

Komponente	Volumen der Komponenten pro 20 µl Reaktionsvolumen
H ₂ O (steril, Nuklease-frei)	12,5 µl
<i>Forward-Primer</i> (10 µM)	2 µl
<i>Reverse-Primer</i> (10 µM)	2 µl
dNTP (je 10 mM)	0,4 µl
10x Taq-Puffer	2 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl

dNTP: Desoxyribonukleotide; H₂O: Wasser; Taq: *Thermus aquaticus*; U: Enzymeinheit.

Die PCR wurde im *GeneTouch Thermal Cycler* (Tab. 9) unter Verwendung des in Tabelle 18 dargestellten *Cycler*-Programms durchgeführt. Die *Annealing*-Temperatur sowie die erforderliche Anzahl an Zyklen sind *Primer*-spezifisch und wurden dementsprechend angepasst.

Tab. 18: Cycler-Programm für die PCR

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Anzahl der Zyklen
initiale Denaturierung	94	3	1
Denaturierung	94	0,5	40
<i>Annealing</i>	#	0,5	
Synthese	72	0,5	
finale Synthese	72	7	1
Kühlung	4	∞	1

#: für die *Annealing*-Temperaturen siehe Tab. 14; ∞: andauernd.

Anschließend wurden die Proben mit jeweils 4 µl des 6x Orange DNA *Loading Dye* (Tab. 16) versetzt und auf einem 1,6%-igen TBE-Agarosegel (Tab. 15) aufgetrennt. Im Fall von präparativen PCR-Ansätzen wurden zunächst 1/10 des PCR-Ansatzes auf einem analytischen TBE-Agarosegel aufgetrennt. Die übrigen 9/10 der Reaktion wurden später für präparative Gele verwendet. PCR-Proben ohne Ladepuffer wurden bei -20 °C gelagert, PCR-Proben mit Ladepuffer bei 4 °C.

2.2.5. Reinigung von PCR-Fragmenten

Um PCR-Produkte für TOPO-TA-Klonierungen oder Sanger-Sequenzierungen nutzen zu können, wurden diese auf präparativen TBE-Agarosegelen (Tab. 15) aufgetrennt und anschließend mithilfe des *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit* (Tab. 5) nach Herstellerangaben gereinigt. Dabei wurde das Arbeitsprotokoll durch einige Modifizierungen optimiert: Zunächst wurde die gewünschte DNA-Bande mithilfe eines Skalpell auf dem *LKB UV-Transilluminator* (Tab. 9) ausgeschnitten, in ein steriles 1,5ml-Reaktionsgefäß transferiert und das Gewicht des Gel-Fragments bestimmt. Pro 100 mg Gel wurden 200 µl NTI-Puffer (Kit-Komponente) hinzugefügt und bei 50 °C inkubiert, bis das Gel vollständig geschmolzen war. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Lösung auf eine *NucleoSpin*-Säule transferiert. Alle Zentrifugationen der *NucleoSpin*-Säulen (Beladen, Waschen, Eluieren) erfolgten für 1 min bei 20.000 xg und Raumtemperatur. Darüber hinaus wurden stets zwei Waschschrte mit jeweils 600 µl NT3-Puffer (Kit-Komponente) durchgeführt. Nach dem Trockenzentrifugieren der *NucleoSpin*-Säulen wurde die DNA mit 15-30 µl NE (Kit-Komponente) eluiert, wobei das Volumen des Puffers der eingesetzten Menge an zu reinigendem PCR-Produkt angepasst wurde. Um die Effizienz der Elution zu erhöhen, wurde der NE-Puffer vor Zentrifugation für 10 min auf der Säule inkubiert. Um den Erfolg der Reinigung zu prüfen und die Menge an eluierter DNA abzuschätzen, wurden 2 µl des Eluats auf einem 1,6%-igen TBE-Agarosegel (Tab. 15) aufgetrennt. Die Lagerung der gereinigten DNA erfolgte bei -20 °C.

2.2.6. TOPO-TA-Klonierung und Transformation kompetenter Bakterien

Die gereinigten PCR-Fragmente wurden mittels TA-Klonierung (Green & Sambrook, 2012) in den Vektor *pCR™2.1-TOPO™* (Kap. 2.1.3) kloniert. Hierfür wurde das *TOPO™ TA Cloning™ Kit* (Tab. 6) nach Herstellerangaben eingesetzt (Tab. 19), wobei die Inkubationszeit auf 30 min erhöht wurde. Das im Kit enthaltene Plasmid *pCR™2.1-TOPO™* (kurz: TOPO-Vektor) besitzt einen 3'-T(Desoxythymidin)-Überhang, an den kovalent die Topoisomerase I des Vacciniavirus gebunden ist (Herstellerangabe). PCR-Produkte, die mithilfe der Taq-Polymerase synthetisiert wurden, besitzen einen komplementären A(Desoxyadenosin)-Überhang. Die Topoisomerase kann eine Phosphodiester-Bindung zwischen dem

3'-A-Überhang des PCR-Fragments und dem 3'-T-Überhang des TOPO-Vektors bilden, wobei gleichzeitig die Topoisomerase vom Vektor gelöst wird (Green & Sambrook, 2012).

Tab. 19: Reaktionsvolumina bei der TA-Klonierung

Komponente	Volumen
gereinigtes PCR-Produkt	0,5 - 2 μ l (abhängig von der DNA-Konzentration)
<i>Salt Solution</i> (Kit-Komponente)	1 μ l
<i>pCRTM2.1-TOPOTM</i> -Vektor	1 μ l
H ₂ O (Nuklease-frei, Kit-Komponente)	Δ
Gesamtvolumen	6 μl

Δ : Differenz aus Gesamtvolumen und der Summe der Volumina der anderen Komponenten; DNA: Desoxyribonukleinsäure; H₂O: Wasser.

Auf die Rekombination von TOPO-Vektor und Ziel-DNA erfolgte die Transformation von DH5 α -Bakterien. Dazu wurde pro Reaktion ein 100 μ l-Aliquot chemisch kompetenter DH5 α -Bakterien (Kap. 2.1.2) auf Eis aufgetaut. Diese Aliquots wurden mir freundlicherweise von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Das Reaktionsgemisch aus der Topoisomerase-Reaktion wurde auf Eis vollständig in das Reaktionsgefäß mit den Bakterien transferiert und durch Schnippen gemischt. Es schloss sich eine Inkubation für 30 min auf Eis an. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 90 sec bei 42 °C, gefolgt von einer weiteren Inkubation für 5 min auf Eis. Anschließend wurde die Suspension in ein steriles Plastikröhrchen mit Schubdeckel (Tab. 2) überführt, welches zuvor mit 500 μ l LB-Medium (ohne Antibiotikum; Tab. 13) befüllt worden war. Es folgte eine Inkubation im Schüttel-Inkubator (Tab. 9) für 45 min bei 200 rpm und 37 °C. Abschließend wurde die Bakteriensuspension vollständig auf zwei OJA-Platten (Tab. 13) ausplattiert und diese über Nacht bei 37 °C im Inkubator *UNE 400* (Tab. 9) inkubiert.

2.2.7. Plasmid-Minipräparation und Nachweis von Insertionen

Um die Plasmide aus den transformierten Bakterien zu isolieren, wurde eine Plasmid-Minipräparation nach dem Prinzip der *Alkaline Lysis* durchgeführt (Green & Sambrook, 2012). Dazu wurden zunächst 10-12 Minikulturen (je 3 ml LB/Amp-Medium [Tab. 13] in sterilen Plastikröhrchen mit Schubdeckeln [Tab. 2]) mit je einer weißen Bakterienkolonie beimpft. Dies erfolgte mithilfe eines sterilen Zahnstochers (Tab. 2). Da eine α -Komplementation bei kurzen *In-Frame*-Insertionen im TOPO-Vektor in DH5 α -Bakterien möglich ist (Green & Sambrook, 2012), wurden auch 2-4 Minikulturen mit

blauen Bakterienkolonien beimpft. Anschließend wurden die Kulturen für 16 h im Bakterien-schüttler (Tab. 9) bei 37 °C inkubiert.

Am Folgetag wurden je 1,5 ml der Minikulturen in jeweils ein 1,5ml-Reaktionsgefäß transferiert und für 1 min bei 20.000 xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurde das Pellet durch Vortexen in 100 µl Sol I (Tab. 4) resuspendiert. Nach einer Inkubation über 5 min bei Raumtemperatur wurden 200 µl frisch angesetzte Sol II (Tab. 4) hinzugefügt. Die Reaktionsgefäße wurden so lange durch Invertieren gemischt, bis die Lyse der Bakterien durch das Aufklaren der Lösung angezeigt wurde. Danach wurde für 10-15 min auf Eis inkubiert, bevor 150 µl eisgekühlte Sol III (Tab. 4) hinzugefügt wurden. Im Anschluss wurden die Reaktionsgefäße so lange durch Vortexen gemischt, bis die Viskosität deutlich vermindert war und sich ein weißes Präzipitat ausgebildet hatte. Es folgte eine Inkubation für mindestens 10 min auf Eis. Die Präzipitate wurden durch eine Zentrifugation für 15 min bei 20.000 xg und Raumtemperatur pelletiert. Anschließend wurden 400 µl des klaren Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 200 µl Roti®-Phenol-Lösung (Tab. 3) hinzugefügt und durch Vortexen vermischt. Nachfolgend wurden 200 µl Chloroform (Tab. 3) hinzugegeben und erneut gevortext. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation für 8 min bei 10.000 xg und Raumtemperatur. Die wässrige Phase mit der Plasmid-DNA wurde mit 850 µl Ethanol (100 %, p. a.) vermischt. Die Ausfällung der DNA wurde durch eine Inkubation für 30 min bei -20 °C vervollständigt. Durch die anschließende Zentrifugation für 15 min bei 20.000 xg und Raumtemperatur wurde das DNA-Präzipitat pelletiert. Der Überstand wurde abgegossen, 800 µl Ethanol (70 %, p. a.) hinzugefügt und für 10 min bei 20.000 xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Der alkoholhaltige Überstand wurde danach möglichst vollständig entfernt und die Plasmid-DNA für 10-20 min luftgetrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 50 µl TE/RNase (Tab. 4) gelöst. Um den Verdau von ko-präzipitierten RNA-Molekülen zu fördern, wurde für 30 min bei 37 °C im Heizblock (Tab. 9) inkubiert. Abschließend wurde der Erfolg der Minipräparation mittels Elektrophorese auf einem 1%-igen TBE-Agarosegel (Tab. 15) überprüft. Dazu wurden 5 µl Plasmid-haltige Lösung und der 6x TriTrack DNA *Loading Dye* (Tab. 16) eingesetzt. Die Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

Um auf eine erfolgreiche Insertion von DNA-Fragmenten in den TOPO-Vektor zu testen, wurde zunächst ein analytischer Restriktionsverdau mit EcoR1 durchgeführt. Diese Restriktionsendonuklease wurde gewählt, da der TOPO-Vektor zwei EcoR1-Schnittstellen besitzt, welche 11 bzw. 6 Basen 5' bzw. 3' der Insertionsstelle liegen (Abb. 4). Die Restriktionsverdau erfolgte für 90 min bei 37 °C. Die Zusammensetzung der Reaktionsgemische ist in Tabelle 20 dargestellt.

Tab. 20: Zusammensetzung der Ansätze für Restriktionsverdaue

Komponente	Volumen
Plasmid-DNA	1,5 - 4 μ l
10x EcoR1-Puffer	2 μ l
EcoR1 (12 U/ μ l)	0,5 μ l
H ₂ O (destilliert, Nuklease-frei)	Δ
Gesamtvolumen	20 μl

Δ : Differenz aus Gesamtvolumen und der Summe der Volumina der anderen Komponenten; DNA: Desoxyribonukleinsäure; EcoR1: erste aus *Escherichia-coli*-Stamm RY13 isolierte Restriktionsendonuklease.

Nach der Inkubation bei 37 °C wurden die Proben mit 4 μ l 6x Orange *Loading Dye* (Tab. 16) versetzt und gut gemischt. Die Hälfte der Probe wurde in eine Geltasche pipettiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt (Kap. 2.2.3). Zum Vergleich wurde in der benachbarten Geltasche eine Probe des unverdauten Plasmids platziert. Die Auftrennung erfolgte auf 1,6%-igen TBE-Agarosegelen (Tab. 15). Der verbliebene Rest der Restriktionsverdaue wurde für eine Wiederholung der Analyse asserviert.

Jene Plasmide, die sich aufgrund des EcoR1-Verdaus als rekombinant herausgestellt hatten, wurden zusätzlich einer analytischen PCR unterzogen. Hierbei wurden die RXR-spezifischen *Primer* (Tab. 14) eingesetzt, um die Identität der Insertion zu verifizieren. Für diese PCR wurde jeweils 1 μ l Plasmid als Template verwendet und ansonsten wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben vorgegangen. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte auf 1,6%-igen TBE-Agarosegelen (Kap. 2.2.3).

2.2.8. Sequenzierung

Die Sequenzierung der rekombinanten Plasmid-DNA erfolgte mit dem *BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Tab. 6). Dieses Kit nutzt die von F. Sanger entwickelte Didesoxy-/Kettenabbruch-Methode (Green & Sambrook, 2012) und enthält sowohl Desoxy- als auch Didesoxy-Nukleotide in einem vorgegebenen Verhältnis. Die Anwendung des Kits erfolgte nach Herstellerangaben mit kleinen Modifizierungen, die die eingesetzten Volumina an Puffer und *BigDye[®]* betrafen. Die Anpassungen basierten auf empirischen Werten, die von der AG Hiort/Werner (Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie und Diabetes, UKSH, Campus Lübeck) erhoben worden waren. Das Reaktionsvolumen von 20 μ l enthielt die in Tabelle 21 dargestellten Komponenten. Die Reaktionen erfolgten in PCR-Reaktionsgefäßen im *GeneTouch Thermal Cycler* (Tab. 9) mit dem in Tabelle 22 notierten Programm.

Um die vollständige Sequenz der Insertionen erfassen zu können, wurde der *Primer M13_62_ex_F* (Tab. 14) eingesetzt, der im TOPO-Vektor bindet (Abb. 4).

Tab. 21: Pipettierschema für die Sequenzierungsreaktion

Komponente	Volumen pro Reaktion
<i>Primer</i> (10 µM)	1 µl
5x SB-Puffer (<i>BigDye</i> ®-Puffer)	3,5 µl
Plasmid	2 - 5 µl (abhängig von der Plasmidkonzentration)
<i>BigDye</i> ® <i>Terminator v3.1 Reagenz</i>	1 µl
H ₂ O (Nuklease-frei)	Δ
Gesamtvolumen	20 µl

Δ: Differenz aus Gesamtvolumen und der Summe der Volumina der anderen Komponenten.

Tab. 22: *Cycler*-Programm für die Sanger-Sequenzierung

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Anzahl der Zyklen
initiale Denaturierung	96	3	1
Denaturierung	98	1/6	
<i>Annealing</i>	62	1,5	25
Synthese	50	1,5	
finale Synthese	50	1	1
Kühlung	4	∞	1

∞: andauernd.

Nach dem Abschluss der Sequenzierungsreaktion wurden die Proben durch Gelfiltrations-Chromatographie mittels des *NucleoSEQ*® *Kits* (Tab. 5) gereinigt. Das Herstellerprotokoll wurde dabei leicht modifiziert, um die Effizienz zu erhöhen: Zunächst wurden die Säulen für 5 min bei 3.000 rpm und Raumtemperatur in einer *Pico*-Tischzentrifuge (Tab. 9) im Standard-Rotor für 1,5ml-Reaktionsgefäße zentrifugiert. Danach wurde das Zuckerpolymer in 600 µl nukleasefreiem Wasser aufgenommen. Durch Klopfen wurden Luftblasen zwischen den *Beads* des Zuckerpolymers entfernt. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur und ein erneutes Entfernen von Luftblasen durch Klopfen. Die *Beads* wurden anschließend durch Zentrifugation für 5 min bei 3.000 rpm und Raumtemperatur in einer *Pico*-Tischzentrifuge konzentriert. Die Säule wurde danach in einem 1,5ml-Reaktionsgefäß platziert, die 20 µl aus der Sequenzierungsreaktion mittig aufgetragen und für 10 min

bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde wie oben beschrieben zentrifugiert, um die Probe zu eluieren. Im Anschluss daran wurden zu jeder gereinigten Probe 20 µl *HiDi™* Formamid (Tab. 3) hinzugefügt, für 2 min bei 92 °C inkubiert und auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Proben wurden entweder bei -20 °C gelagert oder unmittelbar mittels Kapillarelektrophorese im *Applied Biosystems 3130 Genetic Analyser* (Tab. 9) analysiert. Bedient wurde der Sequenzierer durch die Mitarbeiter der AG Hiort/Werner. Die Analyse der Sequenzen erfolgte mithilfe der *Software Chromas* und dem *BLAST/BLAT Tool* der *ENSEMBL*-Datenbank (Tab. 10). Für die Ableitung von Aminosäuresequenzen wurde das *ExpASy Translate Tool* (Tab. 10) eingesetzt.

2.2.9. Immunzytochemie

Für die immunzytochemischen Untersuchungen wurden die Klone, wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, in N-Medium (Tab. 12) expandiert, geerntet und die Zellen gezählt. Danach wurden die Zellen in einer Dichte von 1×10^4 Zellen/cm² auf Kammerobjektträgern (*Chamber Slides*; Tab. 2) plattiert. Pro Kammer wurden 500 µl N-Medium eingesetzt. Am Folgetag schloss sich die Behandlung der Zellen mit DMSO, Bexaroten, Temozolomid (TMZ) oder einer Kombination aus Bexaroten und TMZ (Tab. 3) an. Jeweils zwei Kammern wurden identisch behandelt. Bexaroten wurde in einer Konzentration von 0,1 µM, TMZ in einer Konzentration von 25 µM eingesetzt; die Konzentration an DMSO betrug in allen Ansätzen 1 %. Fünf Tage nach der Behandlung (d5) wurden die Zellen zunächst einmal mit 1x PBS gewaschen. Danach erfolgte die Fixierung mit dem auf -20 °C temperierten ICC-Fixiergemisch (Tab. 4) für exakt 7 min bei -20 °C. Danach wurden die Kammerobjektträger einmalig zügig mit 1x PBS gewaschen, gefolgt von zwei weiteren Waschschritten mit 1x PBS für jeweils 10 min bei Raumtemperatur. Abschließend wurden die Zellen mit 1x PBS überschichtet und bis zur weiteren Bearbeitung bei 4 °C gelagert.

Die immunzytochemischen Analysen erfolgten stets in Form von Doppelfärbungen mit zwei verschiedenen Primärantikörpern und umfassten eine Gegenfärbung des Zellkerns mit DAPI (Tab. 3). Zunächst wurde der Kunststoffaufsatz der *Chamber Slides* behutsam vom gläsernen Objektträger abgetrennt. Anschließend wurden die Grenzbereiche zwischen den Arealen mit den Zellen mithilfe eines hydrophoben Markierstiftes (Tab. 9) umrandet, um ein Abfließen der Färbelösung zu vermeiden. Nachdem eventuell vorhandene PBS-Reste vorsichtig entfernt worden waren, wurden jeweils 25 µl Färbelösung pro Areal aufgebracht und homogen verteilt. Diese Färbelösung beinhaltete die beiden primären Antikörper (Tab. 7) sowie 10 % FCS und 0,04 % Natriumazid (Tab. 3). Die Objektträger wurden danach in einer Feuchtkammer für 16 h bei 4 °C inkubiert. Am Folgetag erfolgten zunächst drei Waschschrritte mit 1x PBS für jeweils 10 min bei Raumtemperatur. Daraufhin wurden erneut pro Areal jeweils 25 µl Färbelösung aufgebracht, homogen verteilt und 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Diese

Färbelösung enthielt die beiden sekundären Antikörper (Tab. 8) sowie 10 % FCS und 0,04 % Natriumazid. Dieser Färbeschritt sowie die weiteren Schritte wurden unter stark gedimmtem Licht durchgeführt. Danach wurden die Objektträger erneut dreimal für jeweils 10 min bei Raumtemperatur mit 1x PBS gewaschen. Für die Kernfärbung mittels DAPI wurde eine Lösung (1:200) mit 1x PBS hergestellt. 25 µl dieser Lösung wurden analog zu den vorherigen Färbeschritten auf jedes Areal aufgebracht. Die DAPI-Färbung erfolgte für 10 min bei Raumtemperatur, gefolgt von einem dreimaligen Waschen mit 1x PBS für jeweils 10 min. Abschließend wurden die Objektträger mit einem Tropfen *Fluoromount-G™* (Tab. 3) pro Areal und einem Deckglas (Tab. 2) abgedeckt und mit kommerziellem Nagellack (Tab. 3) versiegelt.

Die sich anschließende mikroskopische Auswertung wurde mithilfe des Fluoreszenzmikroskops *Biozero 8000* (Tab. 9) und der *Software BZ-9000 Observation Application* (Tab. 10) durchgeführt. Dabei wurden von zwei identisch behandelten Arealen insgesamt zehn repräsentative Mikrophotographien angefertigt. Zudem wurden Sphäroide aufgrund ihrer Dreidimensionalität mithilfe der *Z-Stack*-Technologie fotografiert. Die eingesetzten Belichtungszeiten für die Sox2/CD133- und Nestin/γH2AX-Doppelfärbungen waren zuvor in der AG empirisch ermittelt worden. Die Sox2- und γH2AX-Signale wurden mithilfe der *Open-Source-Software QuPath* (Tab. 10) quantifiziert, was für die CD133- und Nestin-Signale aufgrund der geringen Signalstärke (CD133) bzw. der sehr heterogenen Zellmorphologie (Nestin) nicht möglich bzw. nicht sinnvoll war. Die Anzahl von Zellen mit deutlicher CD133-Expression wurde durch händisches Auszählen ermittelt.

Die Ermittlung der Belichtungszeiten für die Färbungen mit den Antikörpern gegen RXRα, RXRβ und RXRγ waren Bestandteil von Vorexperimenten der vorliegenden Arbeit. Dabei wurden stets Kontrollpräparate angefertigt, die nur mit dem primären oder sekundären Antikörper inkubiert wurden. Eine Quantifizierung mittels der *QuPath-Software* war aufgrund der geringen Signalstärken und der inhomogenen Verteilung der Signale in den Zellkernen nicht möglich. Weiterhin wurden zum Teil zytoplasmatische Signale detektiert, was durchaus der Biologie von nukleären Rezeptoren entspricht (Gronemeyer & Laudet, 1995; Petkovich & Chambon, 2022, und Referenzen darin), mit einer zuverlässigen Quantifizierung jedoch nicht vereinbar ist.

2.2.10. BrdU-ELISA

Das *BrdU Cell Proliferation Assay Kit* (Tab. 6) fand Anwendung, um die Auswirkungen der Behandlungen mit Bexaroten und/oder TMZ auf die Proliferation der Zellklone zu untersuchen. Dieses kolorimetrische Immunassay (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay* [ELISA]) ermöglicht eine Quantifizierung der Proliferation, indem die Inkorporation des Basenanalogs 5-Brom-2'-

desoxyuridin (BrdU) während der DNA-Replikation gemessen wird. Dabei wird BrdU anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut (Wojtowicz & Kee, 2006) und kann nachfolgend mithilfe eines spezifischen Antikörpers detektiert werden. Der Nachweis erfolgt kolorimetrisch mithilfe der Meerrettichperoxidase (HRP), die kovalent an einen sekundären Antikörper gekoppelt ist (Herstellerangabe). Auf der Basis von umfangreichen Vorarbeiten einer Kollegin in der AG (cand. M.Sc. Jana Nielsen) wurde das Herstellerprotokoll modifiziert, wobei lediglich die eingesetzten Volumina der Antikörper-Verdünnungen sowie von Detektions- und Stopp-Reagenz verringert wurden. Sämtliche Abläufe, Arbeitsschritte und Inkubationsbedingungen blieben unverändert.

Die Analysen erfolgten auf 96-Loch-Platten. Diese wurden am Tag vor dem Ausplattieren der Zellen mit einer Fibronectin-Lösung (1:1000 in 1x PBS) beschichtet (Tab. 4), über Nacht in einem Zellkultur-Inkubator (Tab. 9) inkubiert und vor dem Benutzen dreimal mit 100 µl 1x PBS pro Vertiefung gewaschen. Die Zellen wurden in einer Dichte von 2×10^4 Zellen/cm² plattiert, wobei stets zwei identische Platten parallel angefertigt wurden. Die jeweils erste und letzte Spalte einer Platte blieben Zell-frei und wurden während des ELISA für die Erhebung der Leerwerte genutzt. Einen Tag nach dem Plattieren wurden die Zellen behandelt. Jeweils eine komplette Spalte wurde mit DMSO (1 %), drei verschiedenen Bexaroten-Konzentrationen (1 µM; 0,1 µM; 0,01 µM), zwei verschiedenen TMZ-Konzentrationen (25 µM, 50 µM) oder der Kombination von Bexaroten (1 µM; 0,1 µM; 0,01 µM) mit 25 µM TMZ behandelt. Eine weitere Reihe erhielt 1 µM *all-trans*-Retinsäure (atRA) (Tab. 3) und diente als Referenz bei der späteren Auswertung. Die BrdU-Stammlösung (Kit-Komponente, Tab. 6) wurde 1:1000 in Medium verdünnt und 2 h nach Beginn der Behandlung wurden pro Vertiefung 10 µl dieser Verdünnung hinzugefügt.

Im Einklang mit den Empfehlungen des Herstellers und früheren Erfahrungen der AG wurde der ELISA fünf Tage nach der Behandlung (d5) durchgeführt. Zunächst wurde das Medium mithilfe einer Pasteurpipette (Tab. 2) und einer elektrischen Pumpe aus den Vertiefungen aspiriert. Es folgte die Fixierung der Zellen mit 50 µl Fixierlösung (Kit-Komponente) pro Vertiefung, wobei 30 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Anschließend wurde gewaschen und nachfolgend die vorbereitete Antikörper-Verdünnung (1:100-Verdünnung des Anti-BrdU-Antikörpers im zugehörigen Diluenten [Kit-Komponenten]) zugegeben. Es wurden 50 µl pro Vertiefung pipettiert und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Antikörper-Lösung vorsichtig entfernt und die Platten dreimal mit 50 µl 1x Waschpuffer (Kit-Komponente) pro Vertiefung gewaschen. Anschließend wurde der Sekundärantikörper (Anti-Mouse-IgG, HRP-konjugierter Antikörper) im Verhältnis 1:100 mit dem zugehörigen Diluenten (Kit-Komponente) verdünnt. Pro Vertiefung wurden 50 µl Verdünnung pipettiert und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde erneut dreimal wie zuvor gewaschen. Schließlich wurden in jede Vertiefung 50 µl des Substrats TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, Kit-Komponente) pipettiert, woraufhin sich eine Farbänderung von farblos zu

bläulich zeigte. Diese Reaktion wurde nach 10 min durch das Hinzufügen von 50 µl Stopp-Lösung (Kit-Komponente) beendet. Die relative optische Dichte (OD) wurde innerhalb von 30 min nach dem Beenden der Reaktion am *Sunrise™ Absorbance Microplate Reader* (Tab. 9) bestimmt. Gemessen wurde bei einer Wellenlänge $\lambda = 450$ nm (Referenzwellenlänge $\lambda = 490$ nm). Die Messdaten wurden in tabellarischer Form als *Excel*-Dateien (Tab. 10) exportiert und eine statistische Auswertung (Kap. 2.2.11) durchgeführt.

2.2.11. Statistik

Die BrdU-ELISA wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (*One-Way-ANOVA*) und des Programms *GraphPad Prism 9* (Tab. 10) analysiert. Die Analyse erfolgte auf 96-Loch-Platten, auf denen 10 Spalten mit Zellen eines einzigen Klons mit einem Retinoid, TMZ oder einer Kombination aus diesen behandelt wurden. Jede Spalte umfasste jeweils 8 voneinander unabhängige Einzelwerte. Es wurden ausschließlich die Werte derselben 96-Loch-Platte untereinander verglichen, obwohl parallel ein technisches Replikat der betreffenden Platte hergestellt und bearbeitet wurde. Dabei wurden für jede Spalte (= 8 unabhängige Werte) jeweils der arithmetische Mittelwert sowie die Standardabweichung ermittelt. Es wurde graphisch verifiziert, dass die Messwerte einer Normalverteilung unterlagen. Danach erfolgte der Vergleich der drei Behandlungsgruppen: (1) absteigende Bexaroten-Konzentrationen, (2) aufsteigende TMZ-Konzentrationen, (3) absteigende Bexaroten-Konzentrationen in Anwesenheit von 25 µM TMZ. Weiterhin wurden im Vergleich zur DMSO-Kontrolle die Änderungen durch TMZ (25 µM und 50 µM), 25 µM TMZ / 1 µM Bexaroten und 1 µM Bexaroten ermittelt. Somit wurden insgesamt 7 Tests durchgeführt. Das globale Signifikanzniveau von 0,05 wurde entsprechend der Bonferroni-Korrektur für multiples Testen und mit $0,05/7 \approx 0,0071$ definiert. Alle p-Werte mit $p < 0,0071$ wurden mit einem Asterisk als statistisch signifikant gekennzeichnet. Über die Zellklone hinweg, die als unabhängige Experimente zu werten sind, wurde nicht für multiples Testen adjustiert.

Eine statistische Auswertung der immunzytochemischen Analysen (ICC) erfolgte nur in Teilen. Für die ICC mit den Anti-RXR-Antikörpern erfolgte keine statistische Bewertung, da die Signale teilweise nur schwach waren. Im Hinblick auf die Doppelfärbung mit Antikörpern gegen Nestin und γ H2AX wurden die Gesamtzellzahlen und die Anzahl der γ H2AX-positiven Zellen ermittelt; die Detektion von Nestin hatte allein den Zweck, den Nachweis einer Zelle nach Ausblendung des DAPI-Kanals zu ermöglichen. Hinsichtlich der Doppelfärbung mit Antikörpern gegen CD133 und Sox2 wurden die Gesamtzellzahlen und die Anzahl der Sox2-negativen Zellen ermittelt; das CD133-Signal war meist sehr schwach und nicht in allen Membranbereichen erkennbar. Für die statistische Auswertung wurden die verblindet ermittelten Gesamtzellzahlen von 2 unabhängigen technischen Replikaten mit je 10 repräsentativen Mikrophotographien miteinander verglichen. Nachdem graphisch verifiziert

worden war, dass die Datenpunkte eine Normalverteilung aufwiesen, erfolgte hierzu ein statistischer Vergleich der Gesamtzellzahlen zwischen den Behandlungen (DMSO-Kontrolle, Bexaroten, TMZ, Bexaroten/TMZ; insgesamt 6 Tests) mittels *One-Way*-ANOVA. Unter Berücksichtigung des multiplen Testens bei der Durchführung der paarweisen Vergleiche in den Zellgruppen wurde das Signifikanzniveau von 0,05 Bonferroni-korrigiert und auf $0,05/6 \approx 0,0083$ gesetzt. In den Graphen (Abb. 20, 25) wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit angegeben, ob die Unterschiede innerhalb der Gruppe signifikant waren. Der jeweilige Anteil Sox2-negativer (Abb. 20) bzw. γ H2AX-positiver (Abb. 25) Zellen wurde in entsprechender Relation in den Graphen dargestellt; eine vergleichende statistische Bewertung der Anteile Sox2-negativer bzw. γ H2AX-positiver Zellen erfolgte nicht. Die Gründe hierfür sind die häufig sehr geringen Anteile dieser Zellen, die morphologische Heterogenität der Zellkerne sowie die Inhomogenität einiger Präparate.

Es erfolgte überdies eine biometrische Beratung durch Frau Univ.-Prof. Dr. rer. biol. hum. Inke R. König (Leitung des Institutes für Medizinische Biometrie und Statistik, Universität zu Lübeck), um die Validität der in der vorliegenden Arbeit angewandten statistischen Methoden sicherzustellen.

3. Ergebnisse

Die Ergebnisse umfassen die molekularbiologischen Analysen (TA-Klonierung, Sequenzierung) von insgesamt vier verschiedenen T1338-1-Subklonen aus zwei verschiedenen Doppel-Editierungsansätzen (Kap. 3.1), gefolgt von den immunzytochemischen Analysen zur RXR-Isotyp-Expression (Kap. 3.2.1). Wie bereits in der Fragestellung angesprochen, wurden für die Behandlungsexperimente mit TMZ und Bexaroten (Kap. 3.2.2) außer den in dieser Arbeit untersuchten Subklonen mehrere Klone mit Editierungen in RXR-Genen eingesetzt, die aus früheren Analysen stammten.

3.1. Eine gleichzeitige Editierung in zwei verschiedenen RXR-Genen ist möglich

Wie oben beschrieben, wurden im Vorfeld dieser Arbeit die Zellklone LV₂-sgRXR $\alpha\beta$ -[T1338-1]-C5 (im Folgenden als C5 bezeichnet) und LV₂-sgRXR $\alpha\gamma$ -[T1338-1]-H6 (im Folgenden als H6 bezeichnet) einem *Limiting Dilution Assay* (LDA) unterzogen, da es sich um heterogene Zellpopulationen handelte, die Zellen mit verschiedenen Kombinationen von Editierungen und Wildtypsequenzen enthielten. Von diesen Zellklonen war bekannt, dass sie im RXRA-Gen editiert sind (Abb. 27 in Kap. 7.1) und zudem Editierungen im RXRB- (C5-Klone) oder RXRG-Gen (H6-Klone) vorliegen könnten. Einige der mittels LDA isolierten Subklone wurden in der vorliegenden Arbeit auf ihren Editierungsstatus untersucht. Dabei sollte insbesondere geklärt werden, ob Klone mit bi-allelischen Editierungen in zwei verschiedenen RXR-Genen vorhanden waren.

Die mittels des CRISPR/Cas9-Systems durchgeführten Editierungen erfolgten für alle drei RXR-Gene im Exon 4, das in allen drei Fällen für die DBD des jeweiligen Transkriptionsfaktors kodiert. Dabei war die sgRNA jeweils derart designt, dass genau die Region targetiert wurde, die für den ersten Zinkfinger kodiert. Dieser ist für die selektive Erkennung und Bindung des PuGGTCA-Motivs im HRE essenziell (Gronemeyer & Laudet, 1995). Eine Mutation in dieser Region sollte daher mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einem funktionellen Knockout des betreffenden RXR führen.

Zunächst werden am Beispiel eines Subklons (LV₂-sgRXR $\alpha\gamma$ -[T1338-1]-H6C4, im Folgenden als H6C4 bezeichnet) kurz die essenziellen Zwischenergebnisse vorgestellt. Danach werden die Ergebnisse zum Editierungsstatus der C5-Subklone (Kap. 3.1.1) und H6-Subklone (Kap. 3.1.2) beschrieben. Wie in den früheren Arbeiten der Kollegin Amanda Dabrock wurde mithilfe der in Tabelle 14 gelisteten *Primer* das Exon 4 des RXRB- bzw. RXRG-Gens aus der gDNA der untersuchten Zellklone amplifiziert. Die Abbildung 5 zeigt beispielhaft ein TBE-Agarosegel, auf dem die nach der TA-Klonierung und Plasmid-Minipräparation erhaltenen rekombinanten TOPO-Vektoren aufgetrennt wurden. Jeweils rechts der

isolierten Plasmid-DNA wurde eine EcoR1-verdaute Probe aufgetrennt. Die Abbildung belegt die Anwesenheit einer Insertion, die im Gel an der Position zwischen den Markerbanden von 300 und 400 Basenpaaren (bp) migriert. Dies entspricht der erwarteten Länge der klonierten DNA, die im Fall des RXRG-Wildtyp-Exons 4 369 bp beträgt, zuzüglich der 5' und 3' der Klonierungsstelle gelegenen Vektorsequenzen von ca. 15 bp (Abb. 4 in Kap. 2.1.3). Weiterhin wird deutlich, dass sich die Fragmentlängen der mit EcoR1 herausgeschnittenen Insertionen geringfügig unterscheiden.

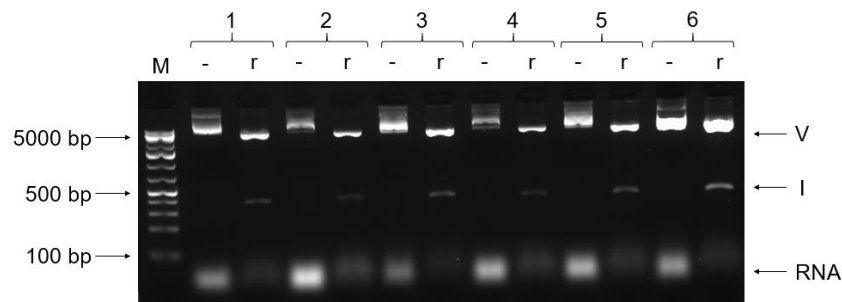


Abb. 5: Analyse von EcoR1-verdauten und unverdauten Plasmiden auf einem 1,6%-igen TBE-Agarosegel. Die untersuchten Plasmide leiten sich von der TA-Klonierung des RXRG-Exons 4 des Zellklons H6C4 ab. Gezeigt ist die Gegenüberstellung der Plasmide vor (-) und nach dem EcoR1-Verdau (r). Die Auftrennung erfolgte parallel zu dem Marker *GeneRuler* (Tab. 3), die Markerbanden mit Längen von 100, 500 und 5000 bp sind hervorgehoben. Die Nummern geben die Nummerierung der Plasmid-Präparationen an. V: Vektor; I: Insertion; RNA: Ribonukleinsäure.

Um zu prüfen, ob es sich bei den Insertionen der Plasmide um die gewünschten RXR-Amplifikate handelte, wurden mit den rekombinanten Plasmiden und den RXRB- bzw. RXRG-*Primer*-Paaren Polymerasekettenreaktionen (PCR) durchgeführt. Abbildung 6 zeigt ein typisches Beispiel einer gelelektrophoretischen Auftrennung von Produkten einer solchen PCR. Ebenso wie nach dem EcoR1-Verdau wird deutlich, dass sich die Amplifikate einiger Insertionen geringfügig in der Länge unterscheiden (Abb. 6).

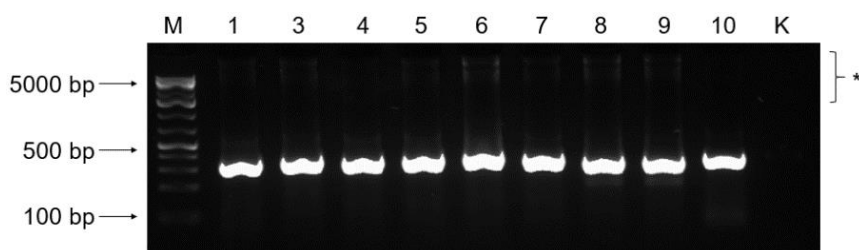


Abb. 6: Analyse von PCR-Produkten auf einem 1,6%-igen TBE-Agarosegel. Die Amplifikate entstammen PCR-Reaktionen mit dem *Primer*-Paar *hu_RXR γ _DBD_F/R* und rekombinanten TOPO-Plasmiden. Es wurden dieselben Plasmide wie in Abbildung 5 eingesetzt sowie vier weitere Plasmide, die aus demselben Klonierungsansatz stammten und sich vom Zellklon H6C4 ableiteten. Die Auftrennung erfolgte parallel zu dem Marker *GeneRuler* (Tab. 3), die Markerbanden mit Längen von 100, 500 und 5000 bp sind hervorgehoben. K: PCR-Kontrolle ohne *Template*; *: die schwachen Hintergrundbanden korrespondieren mit den als *Template* eingesetzten Plasmiden.

Für die nachfolgende Sanger-Sequenzierung wurden nur solche Plasmide eingesetzt, die eine Insertion trugen und deren Insertion mit den RXRB- bzw. RXRG-*Primern* amplifiziert werden konnte. Pro Klonierungsansatz wurden zwölf Plasmide analysiert. Die Chromatogramme der Sanger-Sequenzierungen wurden auf Eindeutigkeit überprüft, Chromatogramme mit *Doppel-Peaks* wurden von den weiteren Analysen ausgeschlossen.

3.1.1. Editierungsstatus in LV₂-sgRXRαβ-[T1338-1]-C5-Subklonen

Im Fall des Subklons LV₂-sgRXRαβ-[T1338-1]-C5H6 (im Folgenden als C5H6 bezeichnet) wurden in zehn von vierzehn Plasmiden Insertionen mit der RXRG-Wildtyp-Sequenz nachgewiesen; vier Plasmide trugen keine Insertion. Die bi-allelische Editierung im RXRA-Gen wurde vor Beginn der vorliegenden Arbeit durch Kolleg/-innen im Labor bestätigt (Abb. 27 in Kap. 7.1).

Die Analyse des Subklons LV₂-sgRXRαβ-[T1338-1]-C5E11 (im Folgenden als C5E11 bezeichnet) ergab in sechs von elf Plasmiden die Wildtyp-Sequenz; vier von elf Plasmiden trugen keine Insertion. Die Insertion eines Plasmids (und im Verlauf dreier weiterer Plasmide) zeigte die Transversion eines Thymidin-Rests (T → G), der vier Nukleotide 5' der *Protospacer-adjacent-Motif*(PAM)-Sequenz liegt (Abb. 7A). Diese Transversion würde zur Substitution eines der beiden Cysteinyl-Reste in der P-Box des ersten Zinkfingers führen (Abb. 7B/C). Für den Subklon C5E11 könnte somit neben der bi-allelischen Editierung im RXRA-Gen in einigen Zellen ebenfalls eine Editierung im RXRB-Gen vorliegen, die zu einer Inaktivierung des RXRβ führen könnte.



Abb. 7: Editierung von RXRβ im Klon C5E11. (A) Nukleotidsequenz des RXRB (Exon 4) und Vergleich mit der Insertion des Plasmids p6, die sich nachfolgend in drei weiteren Plasmiden einer zweiten Klonierungsrunde nachweisen ließ. Die sgRNA-bindende Region ist fett gedruckt, die PAM-Sequenz ist in blau angegeben. Abweichungen von der Wildtypsequenz (WT) sind rot dargestellt und unterstrichen. **(B)** Aminosäuresequenz (Einbuchstabencode) der RXRβ-DBD im Vergleich mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz der Plasmid-Insertion. Die Sequenzen der beiden Zinkfinger sind grau markiert, die vier das Zink-Ion (Zn²⁺) komplexierenden Cysteinyl-Reste sind jeweils in grün dargestellt und fett gedruckt. Die Bereiche der P-Box (CEGCKG) und D-Box (CRDNKD) sind ebenfalls fett gedruckt. Abweichungen von der Wildtypsequenz sind rot eingefärbt und unterstrichen. **(C)** Schematische Darstellung der RXRβ-Wildtyp-DBD und der ermittelten potenziellen Änderungen. Die Symbole und farblichen Markierungen entsprechen denjenigen im Teil B.

3.1.2. Editierungsstatus in LV₂-sgRXRαγ-[T1338-1]-H6-Subklonen

Es wurden zwei verschiedene LV₂-sgRXRαγ-[T1338-1]-H6-Subklone untersucht, die im Folgenden als H6C4 und H6C9 bezeichnet werden. Das Vorliegen einer bi-allelischen Editierung im RXRA-Gen wurde für beide Zellklone vor Beginn der vorliegenden Arbeit durch Kolleg/-innen im Labor verifiziert (Abb. 27 in Kap. 7.1).

Im Fall von H6C4 wurden neun Plasmide sequenziert. Die Insertionen von drei Plasmiden (p4, p5, p10) zeigten eine *In-Frame*-Deletion von 9 Nukleotiden, unter Einbezug der PAM-Sequenz (Abb. 8A). Diese würde zur Deletion eines Cysteinyln-Rests sowie zweier weiterer Aminosäurereste in der P-Box des ersten Zinkfingers führen (Abb. 8B, 9). Die Plasmide p1 und p7 wiesen eine sog. Indel-Mutation (kombinierte Deletion/Insertion; Chang *et al.*, 2017) ohne Leserasterverschiebung auf. Dabei wurden 5' des PAM 20 Nukleotide deletiert und ein aberrantes Dinukleotid (AA) eingefügt (Abb. 8A). Diese Indel-Mutation führte zur Deletion von drei Aminosäureresten der P-Box, unter Einbezug des N-terminalen Cysteinyln-Rests und weiterer sechs N-terminal gelegener Aminosäurereste. Weiterhin würden drei aberrante Aminosäurereste (N^{ter}-QKG-C^{ter}) eingefügt (Abb. 8B, 9). Durch diese Veränderungen würde nicht nur die P-Box, sondern auch weitere Bereiche des ersten Zinkfingers substanziell geschädigt (Abb. 9). Die Insertion des Plasmids p6 zeigte eine Indel-Mutation ohne Leserasterverschiebung. Unter Einbezug des PAM wurden 17 Nukleotide deletiert und 8 aberrante Nukleotide eingefügt. Diese Mutation resultierte in einer vollständigen Deletion der P-Box und von sechs flankierenden Aminosäureresten. Zusätzlich käme es zu einer Insertion eines aberranten Pentapeptids (N^{ter}-GYGCLGI-C^{ter}; Abb. 8B, 9). Die Insertion des Plasmids p3 ergab drei Nukleotide 5' des PAM eine Veränderung an 4 Positionen der Nukleotidsequenz zuzüglich einer *In-Frame*-Insertion von 3 Nukleotiden (Abb. 8A). Diese Mutation würde zu Veränderungen im N-terminalen Bereich der P-Box und dem Verlust des hier lokalisierten Cysteinyln-Rests führen (Abb. 8B, 9).

A

NT 165417220

<i>Human RXRγ WT</i>	GAAAGCACTACGGGGTATACAGTTGTGA AGG CTGCAAAGGG
H6C4: p1,7	GAAAGCA AA ----- AAGG CTGCAAAGGG
H6C4: p4,5,10	GAAAGCACTACGGGGTATACAGTT-----GCAAAGGG
H6C4: p6	GAAAGCACTACGGGG GATACGGGTGCTA -----AGGG

NT 165417220

<i>Human RXRγ WT</i>	GAAAGCACTACGGGGTATACAGTTG--- TGAAGG CTGCAAAGGG
H6C4: p3	GAAAGCACTACGGGGTATACA AACCTTTGAAGG CTGCAAAGGG

B

AS 139

<i>Human RXRγ WT</i>	CAICGDRSSGKHYGVVSC EG CKGFFKRTIRKDLIYT CRDNKDCLIDKQRNRCQYCRYQKCLVM
H6C4: p1,7	CAICGDRSSGK QKG ----- CKGFFKRTIRKDLIYT CRDNKDCLIDKQRNRCQYCRYQKCLVM
H6C4: p4,5,10	CAICGDRSSGKHYGVVSC --- CKGFFKRTIRKDLIYT CRDNKDCLIDKQRNRCQYCRYQKCLVM
H6C4: p6	CAICGDRSSGKHYG YGGLGI --- FKRTIRKDLIYT CRDNKDCLIDKQRNRCQYCRYQKCLVM

AS 139

<i>Human RXRγ WT</i>	CAICGDRSSGKHYGVVSC -EG CKGFFKRTIRKDLIYT CRDNKDCLIDKQRNRCQYCRYQKCLVM
H6C4: p3	CAICGDRSSGKHYGVV KPFEG CKGFFKRTIRKDLIYT CRDNKDCLIDKQRNRCQYCRYQKCLVM

Abb. 8: Editierung von RXR γ im Klon H6C4. (A) Nukleotidsequenz des RXRG (Exon 4) und Vergleich mit den Insertionen der untersuchten Plasmide. Die sgRNA-bindende Region ist fett gedruckt, die PAM-Sequenz ist in blau angegeben. Abweichungen von der Wildtypsequenz (WT) sind rot dargestellt und unterstrichen; deletierte Nukleotide bzw. „Platzhalter“ im WT werden durch „-“ symbolisiert. **(B)** Aminosäuresequenz (Einbuchstabencode) der RXR γ -DBD im Vergleich mit den abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Plasmid-Insertionen. Die Sequenzen der beiden Zinkfinger sind grau markiert, die vier das Zink-Ion komplexierenden Cysteinyln-Reste sind jeweils in grün dargestellt und fett gedruckt. Die Bereiche der P-Box (CEGCKG) und D-Box (CRDNKD) sind ebenfalls fett gedruckt. Abweichungen von der Wildtypsequenz sind rot eingefärbt und unterstrichen; deletierte Aminosäurereste bzw. „Platzhalter“ im WT werden durch „-“ symbolisiert.

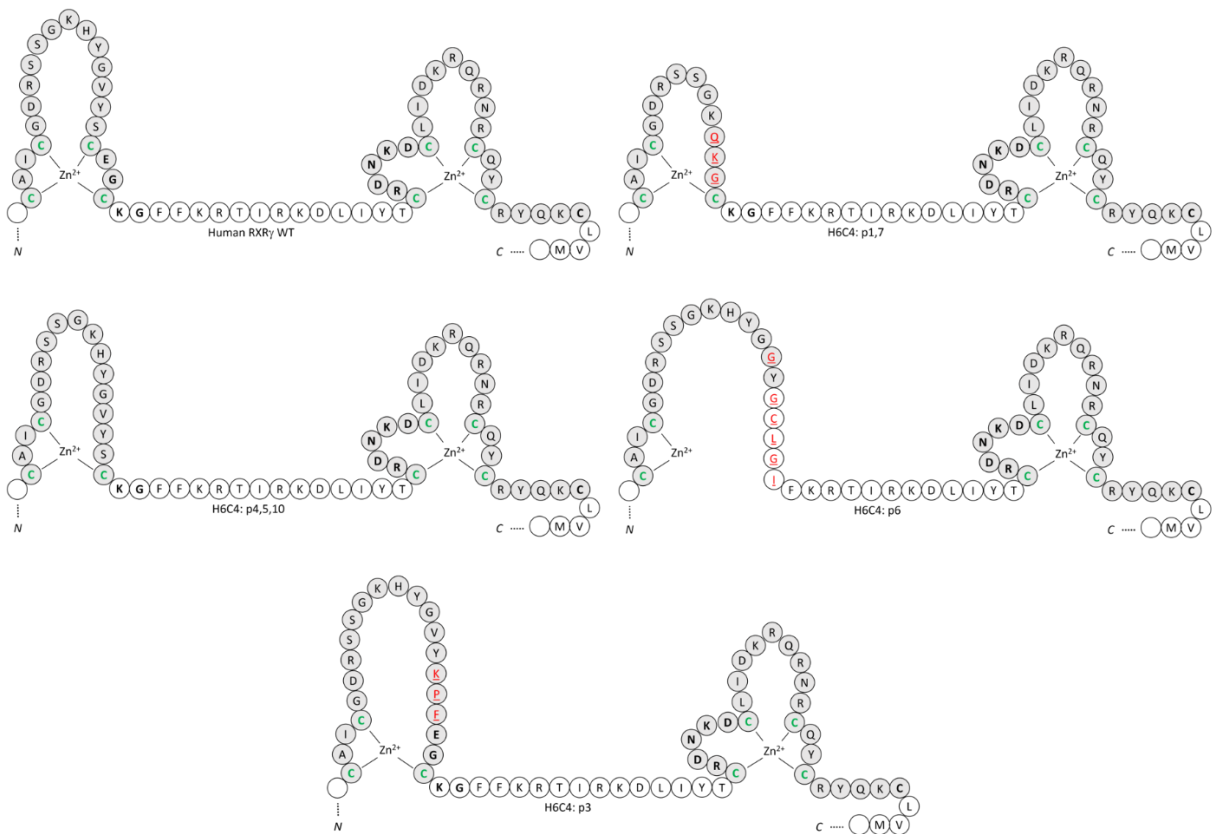


Abb. 9: Konsequenzen der Editierungen auf die RXR γ -DBD im Klon H6C4. Schematische Darstellung der RXR γ -Wildtyp-DBD und der potenziellen Änderungen. Aminosäuresequenz (Einbuchstabencode) der RXR γ -DBD im Vergleich zu den von den Insertionen der Plasmide abgeleiteten Aminosäuresequenzen. Die Sequenzen der beiden Zinkfinger sind grau markiert, die vier das Zink-Ion (Zn^{2+}) komplexierenden Cysteinyl-Reste sind jeweils in grün dargestellt und fett gedruckt. Die Bereiche der P-Box (CEGCKG) und D-Box (CRDNKD) sind ebenfalls fett gedruckt. Abweichungen von der Wildtypsequenz sind rot eingefärbt und unterstrichen.

Im Fall des Subklons H6C9 wurden 23 Plasmide sequenziert. Dabei wurden sieben verschiedene Mutationen identifiziert, darunter vier Indel-Mutationen. Die Insertionen der Plasmide p1 und p2 zeigten eine Veränderung im Bereich des PAM und der angrenzenden sgRNA-bindenden Region. Dabei wurde außer einer *In-Frame*-Insertion von 3 Nukleotiden der Austausch von 4 Nukleotiden unmittelbar 5' des PAM festgestellt. Dies würde zur Substitution des Cysteinyl-Rests der P-Box und des benachbarten Seryl-Rests sowie dem Einbau eines zusätzlichen Aminosäurerests führen (Abb. 10A/B, 11). Im Plasmid p3 wurde eine Indel-Mutation identifiziert, die 28 Nukleotide umfasste und keinen Einfluss auf das Leseraster hatte (Abb. 10A). Dabei wurden das komplette PAM und ca. die Hälfte der sgRNA-Bindungsstelle durch 10 neue Nukleotide ersetzt und 18 *downstream* gelegene Nukleotide deletiert (Abb. 10A). Diese Mutation führte zur Deletion der P-Box und zum Austausch von sechs Aminosäureresten, die N-terminal der P-Box im ersten Zinkfinger lokalisiert sind (Abb. 10B, 11). Plasmid p4 zeigte eine ähnliche Indel-Mutation wie Plasmid p3 (23 Nukleotide wurden durch 5 aberrante Nukleotide substituiert), bei der ebenfalls keine Leserasterverschiebung erfolgte. Im Unterschied zu p3 blieb bei p4 das PAM erhalten und die Deletion erstreckte sich über den kompletten

Bereich der sgRNA-bindenden Region. Dies würde zum Verlust des N-terminalen Bereichs der P-Box sowie der angrenzenden sieben Aminosäurereste des ersten Zinkfingers führen und in der Anwesenheit von drei aberranten Aminosäureresten resultieren (Abb. 10A/B, 11). Die Insertionen von zwei weiteren Plasmiden (p91, p95) zeigten eine *In-Frame*-Deletion von 9 Nukleotiden, unter Einbezug der PAM-Sequenz (Abb. 10A). Diese Deletion würde zum Verlust von drei Aminosäureresten der P-Box, inklusive des N-terminalen Cysteinyln-Rests führen (Abb. 10B, 11).

Fünf Plasmide (p92-94, p96, p98) wiesen Insertionen mit einer Deletion von 57 Nukleotiden auf, die auch das PAM umfasste (Abb. 10A). Dadurch würde die gesamte P-Box zuzüglich zweier N-terminal davon gelegener Aminosäuren sowie aller Aminosäurereste zwischen der P-Box und der D-Box deletiert (Abb. 10B, 11). Eine nahezu identische Deletion wurde in neun weiteren Plasmiden (p97, p111-118) detektiert. Diese umfasste 58 Nukleotide und war lediglich am 3'-Ende um ein zusätzliches Nukleotid länger (Abb. 10A). Der Verlust dieses zusätzlichen Nukleotids resultierte jedoch in einer Leserasterverschiebung und einem prämaturnen Stopp-Codon. In der abgeleiteten Aminosäuresequenz käme es daher zum Verlust der P-Box und ab dem Valyl-Rest an Position 153 (V153) zu einem aberranten C-Terminus, der 31 Aminosäurereste umfasste (Abb. 10B, 11). Im Plasmid p10 wurde ebenfalls eine Mutation identifiziert, bei der 58 Basenpaare (inklusive des PAM) deletiert waren und die 3' an derselben Position endete, wie es hinsichtlich p97 und p111-118 der Fall war (Abb. 10A). Allerdings wurden in p10 13 neue, aberrante Nukleotide nachgewiesen, sodass es nicht zu einem *Frame-Shift* käme. Entsprechend bliebe der zweite Zinkfinger mit der D-Box erhalten, während die P-Box und die Verbindung zwischen den beiden Zinkfingern deletiert würde (Abb. 10B, 11).

A

	NT 165417220
<i>Human RXRγ WT</i>	GAAAGCACTACGGGGTATACAGTTG --- TGAAGGCTGCAAAGGG
H6C9: p1,2	GAAAGCACTACGGGGTATACA <u>AACCTT</u> TGAAGGCTGCAAAGGG
	NT 165417220
<i>Human RXRγ WT</i>	GAAAGCACTACGGGGTATACAGTTGTGAAGGCTGCAAAGGG
H6C9: p3	GAAAGCA <u>AAAAGGGTGG</u> -----AAAGGG
H6C9: p4	GAAAG <u>GCAA</u> -----AAGGCTGCAAAGGG
	NT 165417220
<i>Human RXRγ WT</i>	GAAAGCACTACGGGGTATACAGTTGTGAAGGCTGCAAAGGG TTCTTCAAGAGGACGATAAGGAAGGACCTCATCTACACGTG
H6C9: p91,95	GAAAGCACTACGGGGTATACAGTT-----GCAAAGGG TTCTTCAAGAGGACGATAAGGAAGGACCTCATCTACACGTG
H6C9: p92-94,96,98	GAAAGCACTACGGGGTA----- -----TACACGTG
H6C9: p97,111-118	GAAAGCACTACGGGGTA----- -----ACACGTG
H6C9: p10	GAAAGCACTACGGGGTA <u>GTGCTGCAACTGC</u> ----- -----ACACGTG

B

	AS 139
<i>Human RXRγ WT</i>	CAICGDRSSGKHYGVVYSC -EG CKGFFKRTIRKDLIYT CRDNKDC LIDKRQRNRCQYCRYQKCLVM
H6C9: p1,2	CAICGDRSSGKHYGVVYKPF EG CKGFFKRTIRKDLIYT CRDNKDC LIDKRQRNRCQYCRYQKCLVM
	AS 139
<i>Human RXRγ WT</i>	CAICGDRSSGKHYGVVYSC EG CKGFFKRTIRKDLIYT CRDNKDC LIDKRQRNRCQYCRYQKCLVM
H6C9: p3	CAICGDRSSGKQKGWK -----GFFKRTIRKDLIYT CRDNKDC LIDKRQRNRCQYCRYQKCLVM
H6C9: p4	CAICGDRSSGNQK -----G CKGFFKRTIRKDLIYT CRDNKDC LIDKRQRNRCQYCRYQKCLVM
	AS 139
<i>Human RXRγ WT</i>	CAICGDRSSGKHYGVVYSC EG CKGFFKRTIRKDLIYT CRDNKDC LIDKRQRNRCQYCRYQKCLVM
H6C9: p91,95	CAICGDRSSGKHYGVVYSC ---KGFFKRTIRKDLIYT CRDNKDC LIDKRQRNRCQYCRYQKCLVM
H6C9: p92-94,96,98	CAICGDRSSGKHYGV -----YT CRDNKDC LIDKRQRNRCQYCRYQKCLVM
H6C9: p97,111-118	CAICGDRSSGKHYGV <u>TRVGIKTSASLTSVSATAASTVAIRSALSWA*</u>
H6C9: p10	CAICGDRSSGKHYGV <u>VLQLH</u> ----- TCRDNKDC LIDKRQRNRCQYCRYQKCLVM

Abb. 10: Editierung von RXR γ im Klon H6C9. (A) Nukleotidsequenz des RXRG (Exon 4) und Vergleich mit den Insertionen der sequenzierten Plasmide. Die sgRNA-bindende Region ist fett gedruckt, die PAM-Sequenz ist in blau angegeben. Abweichungen von der Wildtypsequenz (WT) sind rot dargestellt und unterstrichen; deletierte Nukleotide bzw. „Platzhalter“ im WT werden durch „-“ symbolisiert. **(B)** Aminosäuresequenz (Einbuchstabencode) der RXR γ -DBD im Vergleich mit den abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Plasmid-Insertionen. Die Sequenzen der beiden Zinkfinger sind grau markiert, die vier das Zink-Ion komplexierenden Cysteinyl-Reste sind jeweils in grün dargestellt und fett gedruckt. Die Bereiche der P-Box (CEGCKG) und D-Box (CRDNKD) sind ebenfalls fett gedruckt. Abweichungen von der Wildtypsequenz sind rot eingefärbt und unterstrichen; deletierte Aminosäurereste bzw. „Platzhalter“ im WT werden durch „-“ symbolisiert, die Anwesenheit eines prämaternen Stopp-Codons durch *.

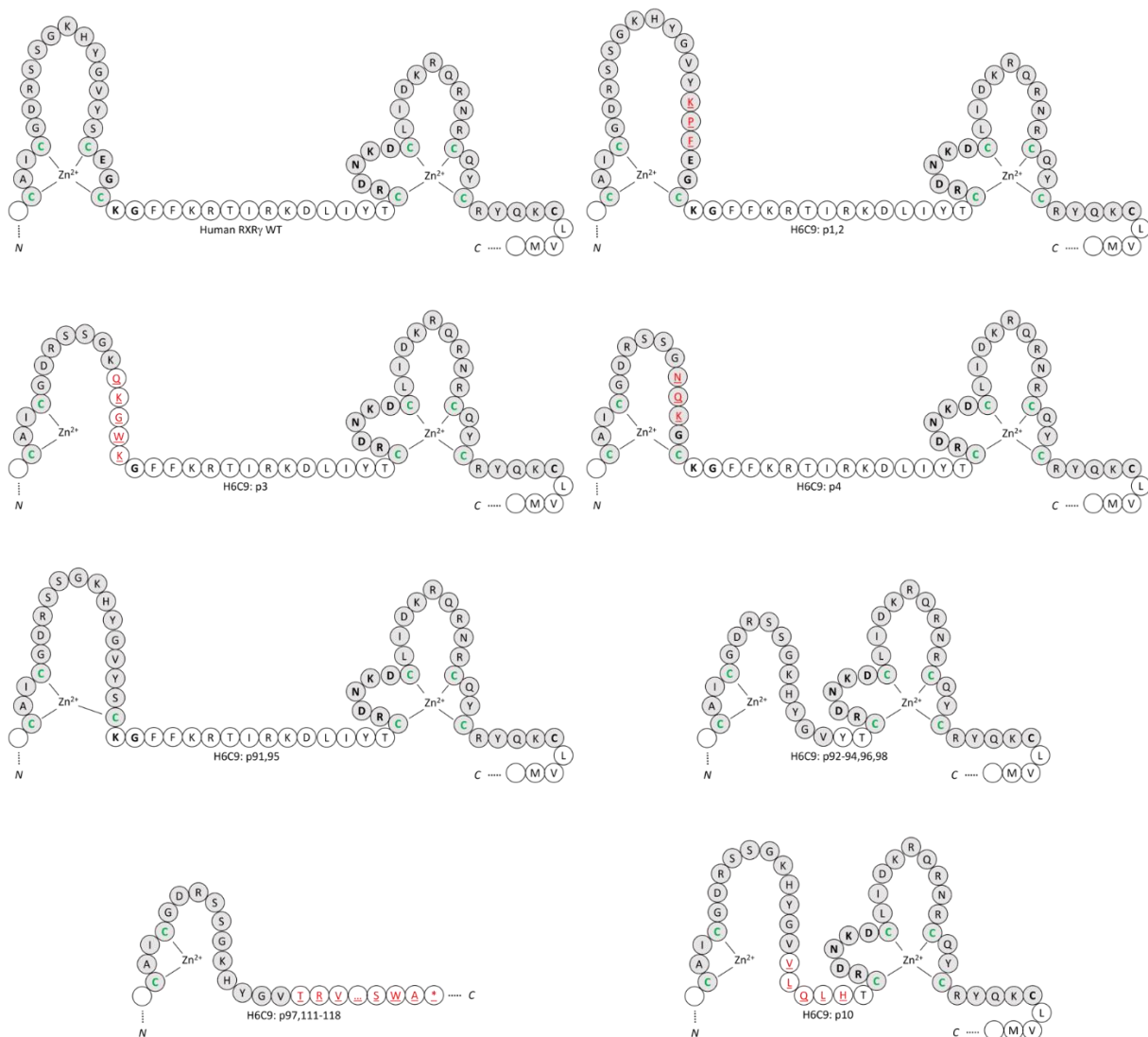


Abb. 11: Konsequenzen der Editierungen auf die RXR γ -DBD im Klon H6C9. Schematische Darstellung der RXR γ -Wildtyp-DBD und der potenziellen Änderungen. Aminosäuresequenz (Einbuchstabencode) der RXR γ -DBD im Vergleich zu den von den Insertionen der Plasmide abgeleiteten Aminosäuresequenzen. Die Sequenzen der beiden Zinkfinger sind grau markiert, die vier das Zink-Ion (Zn²⁺) komplexierenden Cysteinyl-Reste sind jeweils in grün dargestellt und fett gedruckt. Die Bereiche der P-Box (CEGCKG) und D-Box (CRDNKD) sind ebenfalls fett gedruckt. Abweichungen von der Wildtypsequenz sind rot eingefärbt und unterstrichen. Die Anwesenheit eines prämaternen Stopp-Codons wird durch * symbolisiert.

3.1.3. Fazit der Analysen zum Editierungsstatus von LV₂-sgRXR $\alpha\beta$ -[T1338-1]-C5- und LV₂-sgRXR $\alpha\gamma$ -[T1338-1]-H6-Subklonen

Für die beiden untersuchten C5-Subklone wurden nur im Fall des Klons C5E11 Hinweise auf eine Editierung im RXRB-Gen erhalten. Diese betraf die P-Box und sollte somit in einem funktionellen Knockout des RXR β resultieren. Da in der Mehrheit der sequenzierten Plasmide RXRB-Wildtypsequenzen nachgewiesen wurden, sollte von einer mono-allelischen Editierung des RXRB-Gens

in einer Subpopulation von Zellen ausgegangen werden. Der Klon wurde dennoch für weitere Analysen eingesetzt und wird im Folgenden als C5E11 $\alpha\beta$ bezeichnet.

Im Fall der beiden H6-Subklone wurden für beide Klone multiple Veränderungen nachgewiesen, was auf eine heterogene Zellpopulation hinweist. Im Fall von H6C4 wurden vier verschiedene Typen von Mutationen im RXRG-Gen ermittelt, im Fall von H6C9 sogar sieben (Tab. 23). Zwei Typen von Editierungen, (1) die *In-Frame*-Deletion von 9 bp und (2) die Kombination von 3bp-*In-Frame*-Insertion und 4bp-Substitution, wurden in beiden Zellklonen nachgewiesen. Da in beiden Klonen keine RXRG-Wildtypsequenzen detektiert wurden, kann bei beiden Klonen von einer vollständigen bi-allelischen Editierung ausgegangen werden. Welche Kombinationen von Editierungen in einzelnen Zellen der Klonkulturen vorkommen, kann nicht auf Grundlage der Häufigkeiten der identifizierten Mutationen definiert werden. Entscheidend ist jedoch, dass alle nachgewiesenen Mutationen in Defekten der P-Box resultierten, wobei in der Regel der N-terminale Cysteinyl-Rest deletiert oder durch einen anderen Aminosäurerest ersetzt wäre. Im Klon H6C9 war die Deletion von 57 bp, die als *In-Frame*-Deletion oder durch Kombination mit zusätzlichen, kleinen Veränderungen in Form einer *In-Frame*-Indel oder *Frame-Shift*-Deletion vorkam, die häufigste Veränderung. Im Kontext der *In-Frame*-Deletion und *In-Frame*-Indel käme es zu einem Verlust der P-Box und der Region zwischen erstem und zweiten Zinkfinger, im Fall der *Frame-Shift*-Deletion zum kompletten funktionellen Verlust der gesamten DBD.

Beide H6-Subklone wurden für weitere Analysen eingesetzt und werden im Folgenden als H6C4 $\alpha\gamma$ und H6C9 $\alpha\gamma$ bezeichnet.

Tab. 23: Editierungen im RXRG-Gen der H6-Subklone

Zellklon	Mutation der Nukleotidsequenz [Anzahl Plasmide/Gesamtzahl Plasmide]	Effekte auf die RXR γ -DBD
H6C4	<i>In-Frame</i> -Deletion: 9 bp [3/9] #	Defekte: P-Box
	<i>In-Frame</i> -Indel: 18 bp (Δ : 20 bp; Ins: 2 bp) [2/9]	Defekte: P-Box/ZF1
	<i>In-Frame</i> -Indel: 9 bp (Δ : 17 bp; Ins: 8 bp) [1/9]	Defekte: P-Box/ZF1
	<i>In-Frame</i> -Insertion: 3 bp & Substitution: 4 bp [1/9] #	Defekte: P-Box/ZF1
H6C9	<i>In-Frame</i> -Insertion: 3 bp & Substitution: 4 bp [2/23] #	Defekte: P-Box/ZF1
	<i>In-Frame</i> -Deletion: 9 bp [2/23] #	Defekte: P-Box
	<i>In-Frame</i> -Deletion: 57 bp [5/23]	Defekte: P-Box/ZF1/ZF1-2
	<i>Frame-Shift</i> -Deletion: 58 bp [9/23]	Verlust: P-Box, ZF1-2, ZF2
	<i>In-Frame</i> -Indel: 45 bp (Δ : 58 bp; Ins: 13 bp) [1/23]	Defekte: P-Box/ZF1/ZF1-2
	<i>In-Frame</i> -Indel: 18 bp (Δ : 28 bp; Ins: 10 bp) [1/23]	Defekte: P-Box/ZF1
<i>In-Frame</i> -Indel: 18 bp (Δ : 23 bp; Ins: 5 bp) [1/23]	Defekte: P-Box/ZF1	

bp: Basenpaar; Δ : Deletion; Ins: Insertion; #: identische Mutation wurde für beide Subklone identifiziert; ZF1: erster Zinkfinger; ZF1-2: Bereich zwischen erstem und zweitem Zinkfinger; ZF2: zweiter Zinkfinger.

3.2. Charakterisierung von *Stem-like Glioma Cells* (SLGC) mit spezifischer RXR-Editierung

Im Folgenden werden die Eigenschaften ausgewählter editierter SLGC-Klone und -Subklone näher beschrieben und mit nicht editierten T1338-1-Zellen, darunter der *mock*-editierte Klon B11, verglichen. Die Auswahl der Zellklone für diese Experimente erfolgte anhand ihrer Editierung. Es wurden Klone mit bi-allelischen Editierungen ausschließlich im RXRA-, RXRB- oder RXRG-Gen (Tab. 11) sowie drei (Sub-)Klone mit partieller bzw. vollständiger Editierung in zwei RXR-Isotyp-Genen (Kap. 3.1) analysiert. Als Kontrolle für die Experimente wurde der *mock*-editierte Klon B11 und nicht die T1338-1-Mutterkultur eingesetzt, da dieser Klon denselben experimentellen Prozeduren ausgesetzt war wie die editierten Klone. Aus Gründen der Verfügbarkeit von Zellmaterial sowie des Wachstumsverhaltens der Klone wurden nicht alle Zellklone jeder Untersuchung zugeführt.

3.2.1. Effekte der Editierung auf die Expression des Rezeptors

Zunächst sollten die Expression und die subzelluläre Lokalisation der RXR-Isotypen RXR α , RXR β und RXR γ in editierten und nicht editierten SLGC-Klonen untersucht werden. Dazu wurden zunächst Testfärbungen mit den Antikörpern auf *Chamber Slides* mit jeweils acht Kammern durchgeführt, wobei je vier verschiedene SLGC-Klone im Duplikat plattiert wurden. Für die Antikörperfärbungen wurden die von den Herstellern vorgeschlagenen Bedingungen eingesetzt. Weiterhin erfolgten Kontrollfärbungen ohne Primär- und ohne Sekundärantikörper.

Die Testfärbungen erfolgten mit den Anti-RXR-Antikörpern allein oder als Doppelfärbungen mit Primärantikörpern gegen ein im Zytoplasma lokalisiertes Intermediärfilament (Nestin oder Saures Gliafaserprotein [GFAP]). Eine Auswahl der Testfärbungen ist in den Abbildungen 29-31 (Kap. 7.1) zusammengefasst. Es zeigte sich, dass mit dem monoklonalen Anti-RXR α -Antikörper, der gegen die A/B-Domäne des RXR α -Proteins (Aminosäurereste 2-133) gerichtet ist (Herstellerangabe), Signale im Zellkern detektiert wurden, die eine unregelmäßige Verteilung aufwiesen und in der Regel schwach ausgeprägt waren (Abb. 29A). Die Färbungen mit dem polyklonalen Antikörper, der gegen ein synthetisches Peptid eines unbekanntens Teils des RXR β -Proteins gerichtet ist (die Information ist Eigentum des Herstellers), ergaben ein vergleichbares Ergebnis wie diejenigen mit dem Anti-RXR α -Antikörper (Abb. 30A). Der polyklonale Anti-RXR γ -Antikörper, der gegen den N-Terminus des RXR γ -Proteins (A/B-Domäne, Aminosäurereste 1-137) gerichtet ist (Herstellerangabe), detektierte unter den drei Antikörpern die stärksten Signale, die sich ausnahmslos im Zellkern befanden (Abb. 31A). Die Kontrollfärbungen zur Ermittlung eventuell vorhandener Hintergrundsignale ergaben keine relevanten Signale, womit unspezifische Färbungen ausgeschlossen waren (Abb. 29-31, jeweils B, C). Da die Hersteller eine Kreuzreaktion der Antikörper gegen die jeweils anderen RXR-Isotypen ausschließen,

belegten die Testfärbungen, dass die gewählten Bedingungen für den Nachweis geeignet waren. Da die Hersteller keine Informationen zu den Dissoziationskonstanten der Antikörper zur Verfügung stellen und die Angaben zu den detektierten Regionen vage bzw. nicht verfügbar sind, ist die Interpretation der immunzytochemischen Färbungen (ICC) eingeschränkt.

Dennoch wurden mit diesen Antikörpern im Weiteren ICC an den editierten Klonen durchgeführt. Diese Untersuchungen erfolgten als Doppelfärbungen, wobei neben einem Antikörper gegen RXR α , RXR β oder RXR γ gleichzeitig ein Antikörper gegen das Intermediärfilament Nestin oder GFAP zur Anwendung kam. Dabei wurde jeder Zellklon drei Doppelfärbungen unterzogen und jede Doppelfärbung im Duplikat, mit anschließender Kernfärbung mit DAPI, durchgeführt. Die Darstellungen der Färbungen in den Abbildungen 12-14 fassen jeweils alle Färbungen gegen einen RXR-Isotyp zusammen, um eine bessere Vergleichbarkeit zu ermöglichen. Dabei zeigen die Abbildungen jeweils eine von zehn repräsentativen Mikrophotographien. Da bei diesen Färbungen auf eine Fibronectin-Beschichtung der Kammerobjektträger verzichtet wurde, zeigten die T1338-1-Zellklone primär ein Wachstumsmuster mit zum Teil großen, adhärennten Aggregaten (Abb. 12-14).

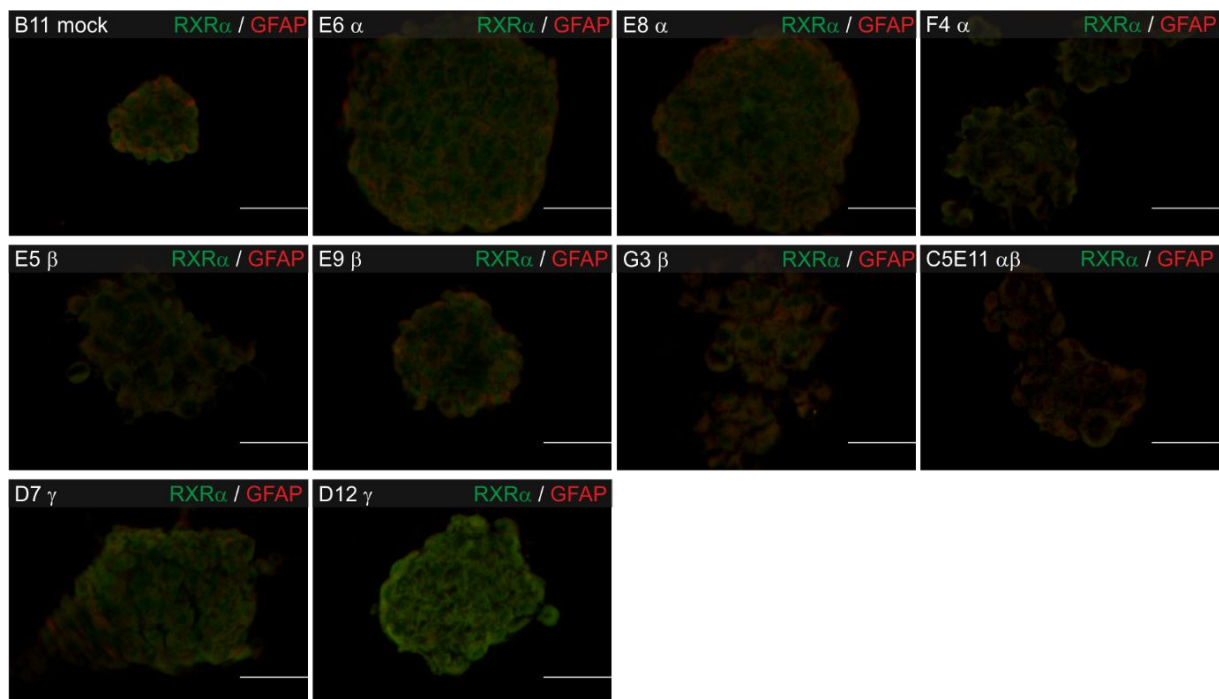


Abb. 12: Expression von RXR α in editierten Klonen der SLGC-Linie T1338-1. Immunzytochemische Analyse. Die zur Färbung verwendeten Antikörper richteten sich gegen RXR α (grün) und GFAP (rot). Die Gegenfärbung des Zellkerns mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) wurde in den Mikrophotographien ausgeblendet, da diese die ohnedies schwachen RXR α -Signale überdeckte. Balken: 50 μ m. GFAP: Saures Gliafaserprotein.

Der nicht editierte SLGC-Klon B11 *mock* zeigte in den ICC mit dem Antikörper gegen RXR α ein schwaches Signal, das homogen im Zellkern verteilt war. Die ICC der drei T1338-1-Klone mit bi-allelischer Editierung im RXRA-Gen (E6 α , E8 α , F4 α) ergaben ein ähnliches Bild (Abb. 12). Der Klon C5E11 $\alpha\beta$, bei dem es sich um einen vollständigen RXRA- und partiellen RXRB-Knockout handelt, zeigte eine vergleichbare RXR α -Färbung. Da die Editierung im ersten Zinkfinger des Rezeptors erfolgt war und der Antikörper die A/B-Domäne detektiert, legen diese Experimente die Vermutung nahe, dass eine *rxr* α -mRNA gebildet und ein mutiertes RXR α -Protein in den Zellen exprimiert wird. Die ICC der Klone mit Editierungen im RXRB-Gen (E5 β , E9 β , G3 β) und RXRG-Gen (D7 γ , D12 γ) entsprachen denen der B11-*mock*-Kontrolle (Abb. 12).

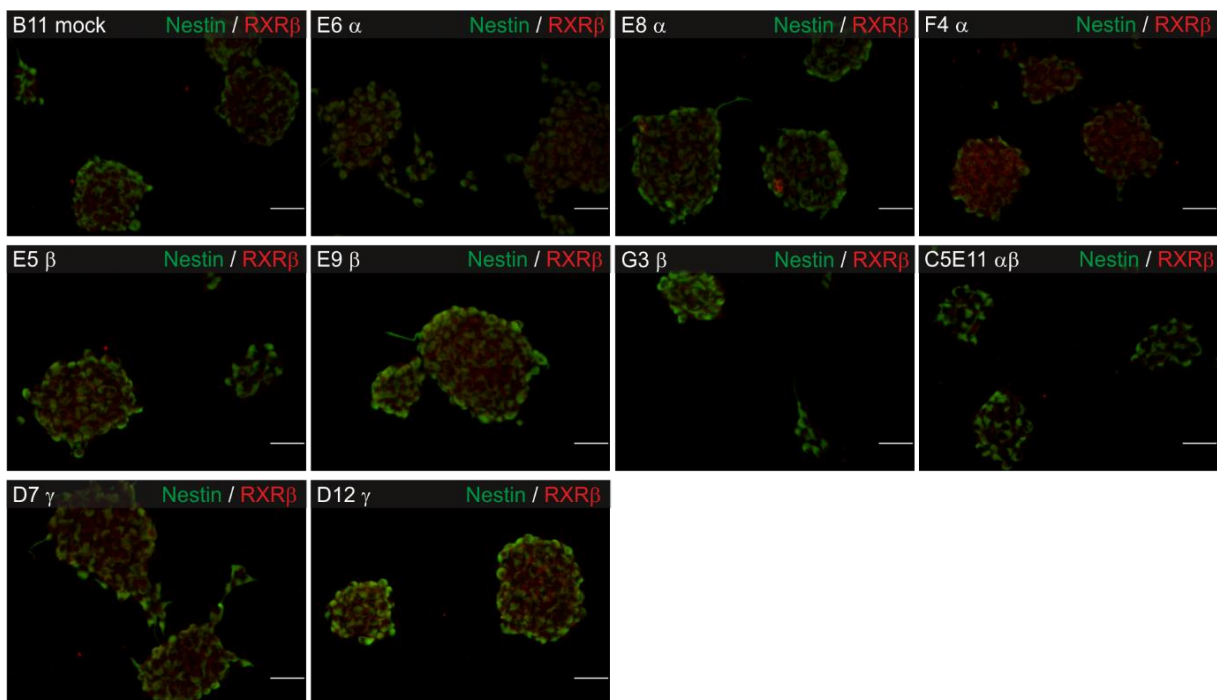


Abb. 13: Expression von RXR β in editierten Klonen der SLGC-Linie T1338-1. Immunzytochemische Analyse. Die zur Färbung verwendeten Antikörper richteten sich gegen RXR β (rot) und Nestin (grün). Die Gegenfärbung des Zellkerns mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) wurde in den Mikrophotographien ausgeblendet, da diese die ohnedies schwachen RXR β -Signale überdeckte. Balken: 50 μ m.

Mit dem Antikörper gegen den RXR β wurde im nicht editierten Klon B11 *mock* ein schwaches, aber deutlich nukleäres Signal nachgewiesen. Dieses war in den meisten Zellen am stärksten in der Peripherie des Zellkerns lokalisiert (Abb. 13). Die im RXRA-Gen editierten Klone E6 α und E8 α ergaben ein vergleichbares Ergebnis, während die RXR β -Signale im Klon F4 α deutlich stärker waren (Abb. 13). Unter den Klonen mit Editierungen im RXRB-Gen ergaben die Klone E5 β und E9 β ein zur Kontrolle vergleichbares Färberesultat, während das RXR β -Signal im Klon G3 β und dem partiell doppelt

editierten Klon C5E11 $\alpha\beta$ nahezu fehlte. Die beiden Klone mit Editierungen im RXRG-Gen (D7 γ , D12 γ) ergaben wiederum das Bild der B11-*mock*-Kontrolle (Abb. 13). Da der Hersteller die Information zu der vom Antikörper erkannten Region nicht herausgibt, ist die Bewertung dieser Ergebnisse nur eingeschränkt möglich. Da sich Zellklone, die einen identischen Typ von Editierung tragen, in der Färbung unterscheiden, kann (1) eine generelle Kompensation eines RXRA-Knockouts durch Hochregulierung von RXR β oder (2) eine generelle Reduktion des RXR β -Signals aufgrund eines RXRB-Knockouts mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

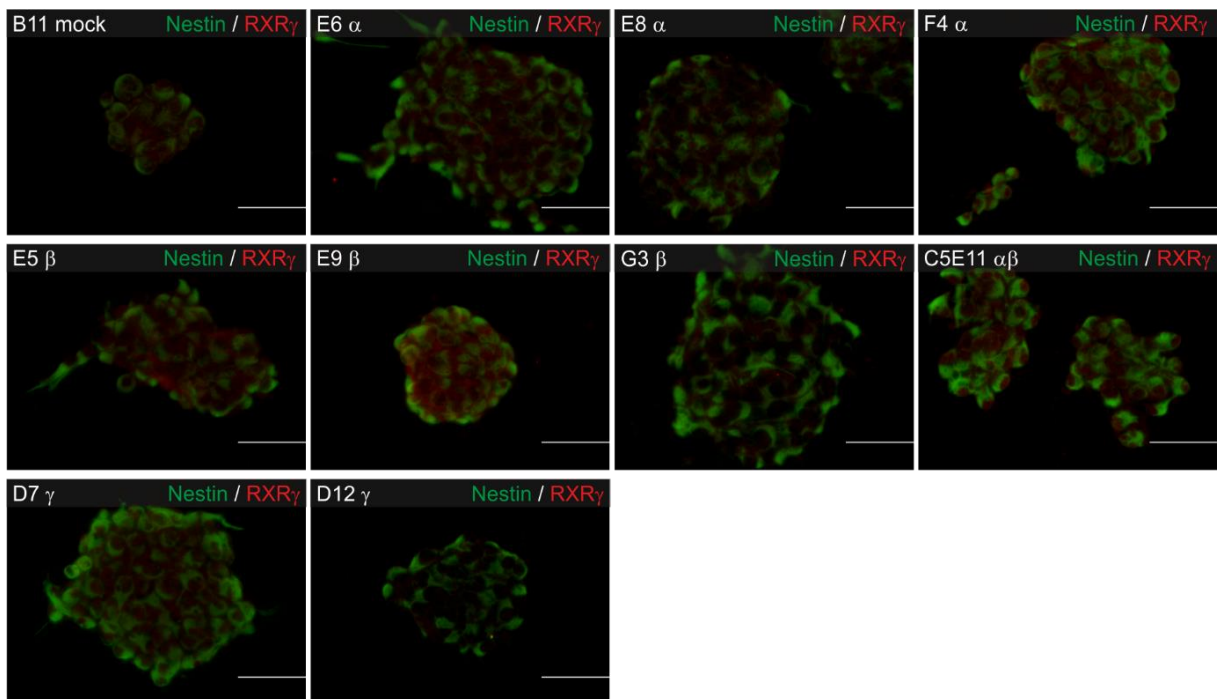


Abb. 14: Expression von RXR γ in editierten Klonen der SLGC-Linie T1338-1. Immunocytochemische Analyse. Die zur Färbung verwendeten Antikörper richteten sich gegen RXR γ (rot) und Nestin (grün). Die Gegenfärbung des Zellkerns mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) wurde in den Mikrophotographien ausgeblendet, da diese die ohnedies schwachen RXR γ -Signale überdeckte. Balken: 50 μ m.

Der Anti-RXR γ -Antikörper, der die N-terminale A/B-Domäne des Rezeptors erkennt, ergab in den ICC der B11-*mock*-Kontrolle eindeutige Signale im Zellkern (Abb. 14). Die drei Klone mit einem vollständigen RXRA-Knockout (E6 α , E8 α , F4 α) ergaben sehr ähnliche Färberegebnisse. Unter den Klonen mit einem vollständigen RXRB-Knockout waren die RXR γ -Signale in Relation zur B11-*mock*-Kontrolle in einem Fall (E5 β) vergleichbar, im zweiten Klon (E9 β) stärker und im dritten Klon (G3 β) schwächer. Die ICC des Klons mit partieller RXRB-Editierung (C5E11 $\alpha\beta$) entsprach der ICC der Kontrolle (Abb. 14). Es kann daher nicht davon ausgegangen werden, dass ein RXRA- oder RXRB-Knockout durch eine Hochregulierung der RXRG-Expression kompensiert wird. Unter den beiden Klonen mit einer

Editierung im RXRG-Gen wies einer (D7 γ) eine ähnliche RXRG-Expression wie die Kontrolle auf, während der andere (D12 γ) kaum noch RXR γ -Signale zeigte. Somit erscheinen zumindest in einem der beiden Klone (D7 γ) die Expression einer rxr γ -mRNA und die Bildung eines mutierten Rezeptors möglich.

3.2.2. Effekte von Bexaroten und Temozolomid auf editierte Klone

Zunächst wurden die Effekte verschiedener Konzentrationen des RXR-*pan*-Agonisten Bexaroten auf die Proliferation von editierten Zellklonen und der B11-*mock*-Kontrolle in An- und Abwesenheit von Temozolomid (TMZ) analysiert (Kap. 3.2.2.1). Danach wurden die Auswirkungen auf den Grad an *Stemness* (Kap. 3.2.2.2) und die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen (Kap. 3.2.2.3) ermittelt. Bei all diesen Experimenten ist zu beachten, dass T1338-1-Zellen und -Zellklone eine starke Tendenz zur Aggregatbildung besitzen, diese Aggregate Zellen untereinander austauschen können und dass der Zugang der Reagenzien zu Zellen im Inneren der Aggregate durch die zelluläre Barriere behindert wird (Dabrock *et al.*, 2023; Zechel *et al.*, 2024). Weiterhin muss dem Ablösen der Zellaggregate vom Trägermaterial entgegengewirkt werden. Dies wurde durch das Beschichten der 96-Loch-Platten und Kammerobjektträger mit Fibronectin und die Anwesenheit von FCS im N-Medium erreicht. Unterschiede zwischen den Ergebnissen von technischen Replikaten sind dennoch nicht zu verhindern, da das Ausmaß der Aggregatbildung und deren Adhärenz variable biologische Parameter sind. Dagegen war die Differenzierung der Zellen unter den gewählten Bedingungen ausgeschlossen (Raju *et al.*, 2015).

3.2.2.1. Effekte der Behandlung auf die Zellproliferation

Der Einfluss von Behandlung und Editierung auf das Proliferationsverhalten der Zellen wurde mittels BrdU-ELISA (Kap. 2.2.10) analysiert. Hierzu wurden die Klone mit absteigenden Bexaroten-Konzentrationen in An- und Abwesenheit von TMZ behandelt. Die Kontrollbehandlung erfolgte mit DMSO (Dimethylsulfoxid), da dies als Lösungsmittel für das hydrophobe TMZ und das hydrophobe Bexaroten diene. Dabei wurde sichergestellt, dass die DMSO-Konzentration 1 % nicht überstieg, da DMSO in höheren Konzentrationen zytotoxisch wirken kann (Galvao *et al.*, 2014). Um zu prüfen, ob die Klone unter den experimentellen Bedingungen die für die T1338-1-Zelllinie bekannte Retinsäure-Responsivität zeigen, wurde stets eine Zellspalte mit 1 μM *all-trans*-Retinsäure (atRA) behandelt. Auf die Effekte von 1 μM atRA wird im Folgenden nicht weiter eingegangen. Es zeigte sich jedoch, dass die Effekte von atRA heterogen waren und zwischen gering pro-proliferativ und eindeutig anti-proliferativ lagen. Dafür gibt es verschiedene Erklärungen, die zumindest zum Teil auf der 9-*cis*-Isomerisierung und der Licht-vermittelten Inaktivierung von atRA beruhen (Dabrock *et al.*, 2023, und Referenzen darin).

In den Graphen (Abb. 15) sind jeweils die arithmetischen Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der relativen optischen Dichte (OD) abgebildet. Hinsichtlich der statistischen Auswertung wurden stets nur die Werte ein und derselben 96-Loch-Platte verglichen, wobei pro Behandlung acht unabhängige Einzelwerte in die Berechnung einfließen. Jeder Graph stellt ein

unabhängiges, eigenständiges Experiment dar. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind lediglich die statistisch signifikanten Unterschiede innerhalb der einzelnen Behandlungsgruppen graphisch dargestellt. Zusätzlich erfolgten Vergleiche der höchsten Konzentration einer Behandlungsgruppe mit der DMSO-Kontrolle, auf die im Text eingegangen wird. Ein bewertender statistischer Vergleich der atRA-Behandlung mit anderen Behandlungen der Experimente erfolgte nicht. Die Abbildung zeigt jeweils eines von zwei technischen Replikaten; die Analysen wurden zu einem späteren Zeitpunkt von der Technischen Assistentin der AG wiederholt.

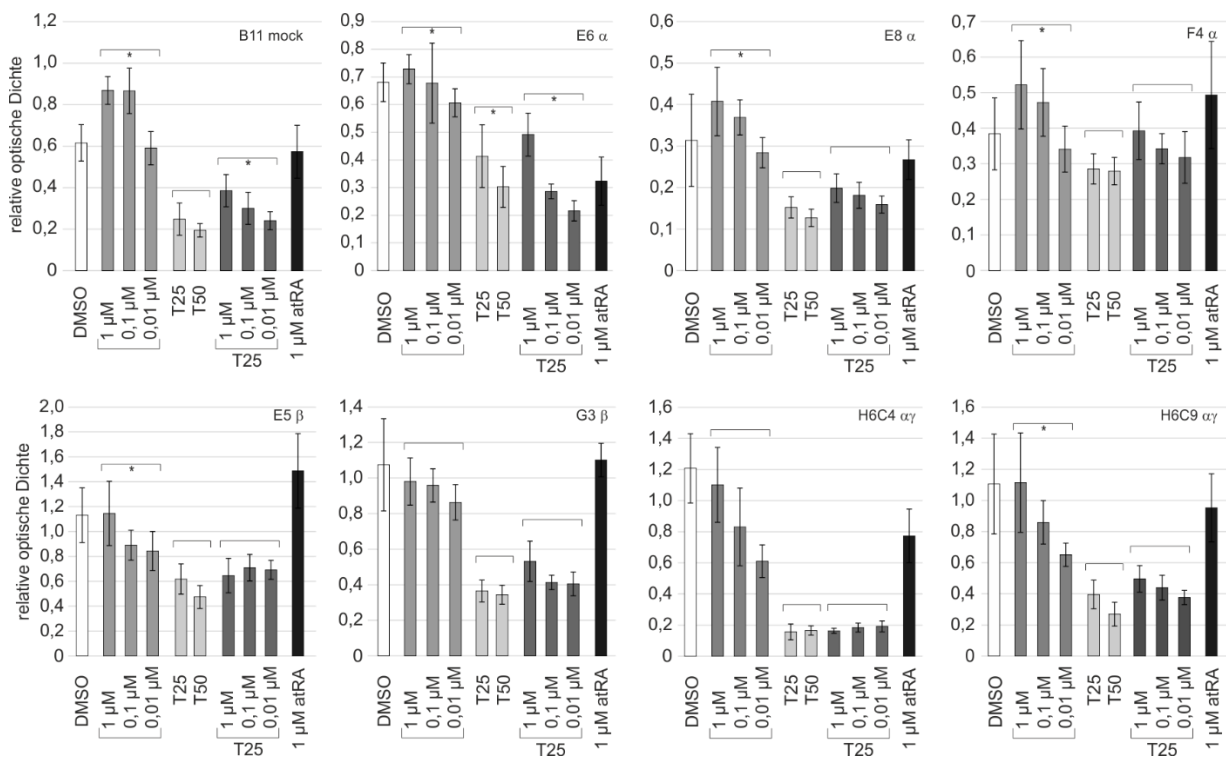


Abb. 15: Effekte von Bexaroten und/oder Temozolomid auf das Proliferationsverhalten von editierten Zellklonen. BrdU-ELISA. Die Behandlungen erfolgten mit absteigenden Bexaroten-Konzentrationen (1 μM ; 0,1 μM ; 0,01 μM) in Ab- (hellgrau) und Anwesenheit (dunkelgrau) von 25 μM TMZ (T25). Weiterhin erfolgten Behandlungen mit 1 μM atRA (schwarz), TMZ (T25: 25 μM ; T50: 50 μM) und DMSO (weiß). Es sind die arithmetischen Mittelwerte von acht unabhängigen Einzelwerten und die Standardabweichungen dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels *One-Way*-ANOVA mit Bonferroni-Korrektur für multiples Testen ermittelt. Über die Zellklone hinweg, die als unabhängige Experimente zu werten sind, wurde nicht für multiples Testen adjustiert. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden lediglich statistisch signifikante Unterschiede innerhalb der Behandlungsgruppen mit eckigen Klammern dargestellt; *: $p < 0,0071$. atRA: *all-trans*-Retinsäure; DMSO: Dimethylsulfoxid; T(MZ): Temozolomid.

Für die B11-*mock*-Kontrolle ergab sich für die Behandlung mit Bexaroten eine statistisch signifikante Steigerung der BrdU-Inkorporation relativ zur DMSO-Kontrolle, wobei dieser Effekt mit steigender Dosis signifikant höher war. Die hohen Werte der Standardabweichung beruhen auf dem

oben erläuterten Wachstumsverhalten der T1338-1-Zellen. Innerhalb der Behandlungsgruppe mit TMZ zeigte sich keine statistisch signifikante Dosisabhängigkeit; allerdings wurde eine statistisch signifikante Verminderung des BrdU-Einbaus nach Behandlung mit 25 μM und 50 μM TMZ festgestellt. Die Kombinationsbehandlung mit 25 μM TMZ und steigenden Konzentrationen von Bexaroten zeigte eine statistisch signifikante Abhängigkeit von der Bexaroten-Konzentration. Relativ zur alleinigen Behandlung mit 25 μM TMZ wurde eine statistisch signifikant höhere OD für die Doppelbehandlung mit 25 μM TMZ / 1 μM Bexaroten ermittelt. Somit hatte die Bexaroten-Behandlung einen geringen, aber signifikanten pro-proliferativen Effekt auf die B11-*mock*-Kontrolle und verminderte den anti-proliferativen Effekt von TMZ.

Für den Klon E6 α waren die Unterschiede der OD innerhalb der Bexaroten-Behandlungsgruppe nur eingeschränkt signifikant. Da diese Werte sich von denen der DMSO-Kontrolle nicht signifikant unterschieden, übte Bexaroten hier keinen pro-proliferativen Effekt aus. Die Effekte durch 50 μM TMZ waren nur geringfügig effektiver als die von 25 μM TMZ, wobei sich die Proliferation des Klons durch TMZ signifikant senken ließ. In der Doppelbehandlung mit Bexaroten/TMZ zeigte sich eine signifikante Dosisabhängigkeit für Bexaroten. Nach der Doppelbehandlung mit 25 μM TMZ / 1 μM Bexaroten waren die Mittelwerte für die BrdU-Inkorporation geringer als nach der alleinigen Behandlung mit Bexaroten, jedoch höher als nach der alleinigen Behandlung mit 25 μM TMZ. Obwohl dieser Zusammenhang aufgrund der hohen Standardabweichung nicht statistisch signifikant war, deutete sich auch hier eine teilweise Aufhebung des zytotoxischen Effekts von TMZ durch Bexaroten an.

Der Klon E8 α wies innerhalb der Behandlungsgruppe mit Bexaroten eine statistisch signifikante Abnahme der gemessenen OD auf. Im Vergleich zur DMSO-Kontrolle ergab jedoch lediglich die Behandlung mit 1 μM Bexaroten einen statistisch signifikanten Anstieg der BrdU-Inkorporation, der auf einen geringen pro-proliferativen Effekt von Bexaroten hinwies. Zwischen den beiden TMZ-Konzentrationen ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied, während im Vergleich zur DMSO-Kontrolle für beide TMZ-Konzentrationen eine statistisch signifikante Senkung der OD auftrat. In der Doppelbehandlung nahmen die Mittelwerte der OD mit absteigender Bexaroten-Konzentration ab, wobei dieser Effekt nicht statistisch signifikant war. Relativ zur alleinigen Behandlung mit 25 μM TMZ waren die OD für die Doppelbehandlung mit 25 μM TMZ / 1 μM Bexaroten signifikant höher. Somit schien Bexaroten auch im Klon E8 α den anti-proliferativen Effekt von TMZ schwächen zu können.

Die Analyse des Zellklons F4 α ergab hinsichtlich der Behandlung mit Bexaroten einen statistisch signifikanten Dosiseffekt in Ab-, nicht aber in Anwesenheit von TMZ; dabei ließen die Mittelwerte einen Trend für eine solche Abhängigkeit erkennen. Ebenso lag der Mittelwert der OD für 1 μM Bexaroten deutlich höher als der der DMSO-Kontrolle und der Mittelwert der OD für die

Kombination 25 μM TMZ / 1 μM Bexaroten lag höher als der für 25 μM TMZ allein. Somit deutete sich auch hier ein pro-proliferativer Effekt von Bexaroten an, der den anti-proliferativen Effekt von TMZ zu schwächen vermochte.

Die Situation stellte sich für die beiden Klone mit der RXRB-Editierung abweichend dar. Sowohl für den Klon E5 β als auch den Klon G3 β lagen die Mittelwerte der OD nach Behandlung mit 1 μM Bexaroten nicht höher als die Mittelwerte der DMSO-Kontrolle, im Fall des Klons G3 β sogar darunter. Eine statistisch signifikante Dosis-Wirkungs-Beziehung für Bexaroten wurde für den Klon E5 β , nicht aber den Klon G3 β ermittelt. Eine statistisch signifikante Senkung des BrdU-Einbaus wurde für beide Klone bereits mit 25 μM TMZ erreicht und durch die Verdoppelung der TMZ-Konzentration nur wenig effizienter. Der Vergleich der OD nach der alleinigen Behandlung mit 25 μM TMZ und der Kombination 25 μM TMZ / 1 μM Bexaroten ergab für den Klon E5 β keine Veränderung, für den Klon G3 β eine geringe Schwächung des TMZ-Effekts.

Auch die Analyse der Klone H6C4 $\alpha\gamma$ und H6C9 $\alpha\gamma$ ließ deutliche Ähnlichkeiten zwischen den beiden doppelt editierten Klonen erkennen, die im Unterschied zur B11-*mock*-Kontrolle und den Klonen mit RXRA-Editierung standen. So konnte in Relation zur DMSO-Kontrolle durch die Behandlung mit 1 μM Bexaroten keine statistisch signifikante Veränderung der OD erreicht werden. Eine Dosis-Wirkungs-Relation für absteigende Bexaroten-Konzentrationen wurde im Hinblick auf die Mittelwerte für beide Klone beobachtet; diese war aufgrund der hohen Standardabweichungen aber nur für H6C9 $\alpha\gamma$ statistisch signifikant. Eine statistisch signifikante Senkung der OD durch 25 μM TMZ war für beide Klone nachweisbar, konnte aber durch die Verdoppelung der TMZ-Konzentration nicht signifikant gesteigert werden. Der Vergleich der OD nach alleiniger TMZ-Behandlung und der Kombination von 25 μM TMZ / 1 μM Bexaroten ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied. Somit induzierte Bexaroten bei den beiden Klonen mit einer Editierung im RXRA- und RXRG-Gen keinen pro-proliferativen Effekt und verminderte auch nicht die anti-proliferative Wirkung von TMZ.

Zusammenfassend ergaben die BrdU-ELISA, dass Bexaroten die OD in den Klonen mit RXRA-Knockout und in der B11-*mock*-Kontrolle dosisabhängig steigerte. Dies war weder in den Klonen mit einem RXRB-Knockout noch in den Klonen mit RXRA/RXRG-Knockout zu beobachten. Dabei waren die Effekte zwischen den Klonen geringfügig verschieden. Weiterhin reduzierten bereits 25 μM TMZ statistisch signifikant den Einbau von BrdU, wobei die Effekte mit Ausnahme des Klons F4 α drastisch waren und Reduktionen der OD von 50-80 % bewirkten. Für die Klone mit einem RXRA-Knockout und die B11-*mock*-Kontrolle konnten die anti-proliferativen Effekte von 25 μM TMZ durch 1 μM Bexaroten signifikant vermindert werden. Dies konnte für die Klone mit RXRB- oder RXRA/RXRG-Knockout nicht erreicht werden.

3.2.2.2. Effekte der Behandlung auf den Stammzellcharakter

Um den Einfluss der Behandlung mit Bexaroten (Bex) und/oder Temozolomid (TMZ) auf den Stammzellcharakter (*Stemness*) zu ermitteln, wurde eine immunzytochemische Analyse (ICC) durchgeführt. Die Untersuchungen erfolgten als Doppelfärbungen. Neben einem Antikörper gegen den Transkriptionsfaktor Sox2 (SRY[*Sex-determining Region Y*]-Box 2) wurde gleichzeitig ein weiterer Antikörper gegen das Glykoprotein CD133 (*Cluster of Differentiation* 133; synonym: Prominin-1 [PROM1]) eingesetzt (Tab. 7). In den Abbildungen 16-19 wird jeweils eine von zehn repräsentativen Mikrophotographien zu jeder Behandlung und jedem analysierten Klon gezeigt. Es wurden je zwei technische Replikate untersucht, die stets parallel zu den BrdU-ELISA (Kap. 3.2.2.1) angefertigt wurden. Teilweise wurden die Experimente zu einem späteren Zeitpunkt von Kolleg/-innen im Labor wiederholt.

Die Abbildung 32A (Kap. 7.1) zeigt das typische Erscheinungsbild einer Sox2/CD133-Doppelfärbung. Dabei ist der Transkriptionsfaktor Sox2 im Zellkern an regulatorische Bereiche von *Stemness*-assoziierten Genen gebunden. Bei einem hohen Grad an *Stemness* (Typ-I-Zellen) ist Sox2 an zahlreichen Stellen im Zellkern lokalisiert; mit dem Übergang zur Typ-II- und Typ-III-Zelle nimmt die Anzahl an Bindestellen ab und der Zellkern erscheint „punktuell“ gefärbt; Nicht-SLGC (*Bulk Tumor Cells*) weisen keine Sox2-Signale im Zellkern auf (Kap. 1.3). Die Anteile von Zellen mit Sox2-Signal (SLGC) und ohne Sox2-Signal (Nicht-SLGC) wurden jeweils quantifiziert (Kap. 2.2.9) und in Abbildung 20 einander gegenübergestellt. In den Abbildungen 16-19 sind in einigen Mikrophotographien heterogene Färbungen des Nukleus oder Sox2-Signale im Zytoplasma zu erkennen. Während es sich im ersten Fall um Färbeartefakte handelt, die mit der Qualität der Präparate zusammenhängen, handelt es sich im zweiten Fall um eine Sequestrierung des Proteins im Zellplasma und/oder um einen Rücktransport des Proteins vom Kern in das Zellplasma. Aufgrund dieser teilweise heterogenen Ergebnisse war eine detaillierte Quantifizierung von Typ-I-Zellen bzw. von Typ-II- oder Typ-III-Zellen nicht sinnvoll.

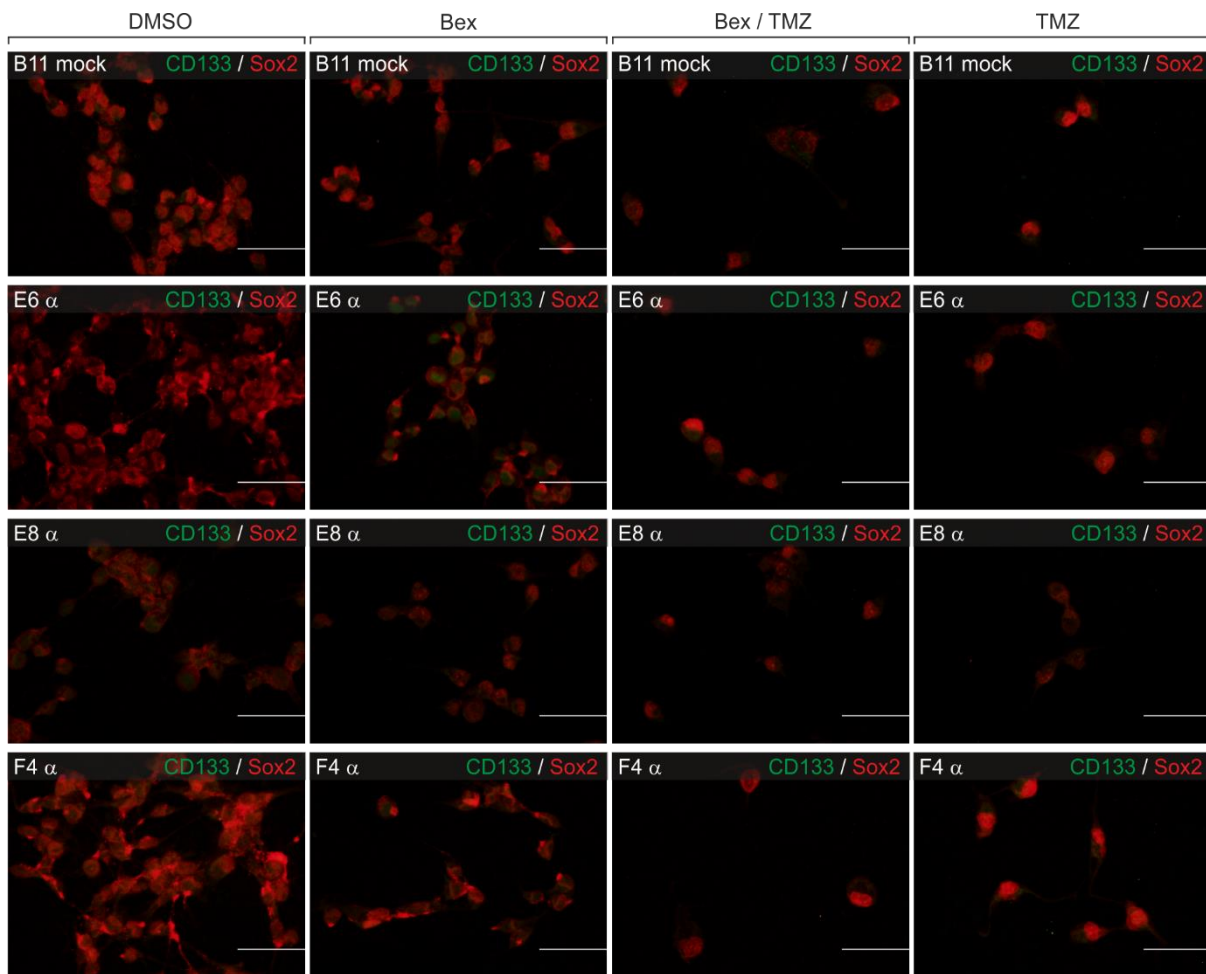


Abb. 16: Stammzellcharakter nach Behandlung mit Bexaroten in An- und Abwesenheit von Temozolomid. Immunzytochemische Analyse der im RXRA-Gen editierten Klone und der B11-*mock*-Kontrolle. Die zur Färbung verwendeten Antikörper richteten sich gegen CD133 (grün) und Sox2 (rot). Es erfolgte stets eine Gegenfärbung des Zellkerns mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol); um das nukleäre Sox2-Signal nicht zu schwächen, wurde dieser Kanal in den Bildern ausgeblendet. Bex: 0,1 μ M Bexaroten; TMZ: 25 μ M Temozolomid. Die Kontrollbehandlung erfolgte mit DMSO (Dimethylsulfoxid). Balken: 50 μ m. CD133: *Cluster of Differentiation 133*; Sox2: *SRY(Sex-determining Region Y)-Box 2*.

Die Analyse des *mock*-editierten Klons B11 zeigte in der DMSO-Kontrolle nahezu ausschließlich Zellen mit starkem Sox2-Signal und keine CD133-Signale, womit von einer Kultur auszugehen ist, die > 95 % Typ-I-Zellen enthielt. Nach der Behandlung mit 25 μ M TMZ wurde die Gesamtzellzahl drastisch gesenkt (Abb. 20), wobei das Verhältnis von Sox2-positiven zu Sox2-negativen Zellen unverändert blieb und keine Zunahme an CD133-positiven Zellen erkennbar war. Durch die alleinige Behandlung mit 0,1 μ M Bexaroten wurde die Gesamtzellzahl nicht signifikant beeinflusst. Die kombinierte Behandlung mit 25 μ M TMZ / 0,1 μ M Bexaroten ergab ebenfalls eine drastische Senkung der Gesamtzellzahl, die jedoch weniger effektiv war als mit TMZ allein (Unterschied TMZ/- und TMZ/Bex: nicht signifikant). Das Verhältnis von SLGC zu Nicht-SLGC wurde nicht verändert. Für die Zellklone mit einem RXRA-Knockout (E6 α , E8 α , F4 α ; Abb. 16, 20) wurden vergleichbare Effekte wie in B11 *mock* auf die Zellzahlen und

das Verhältnis von SLGC zu Nicht-SLGC ermittelt. Allerdings wurde insbesondere für den Klon E6 α nach der alleinigen Bexaroten-Behandlung eine stärkere CD133-Färbung beobachtet, die auf eine Zunahme des Anteils von Typ-II-Zellen hinwies (Abb. 16, 2. Reihe von oben).

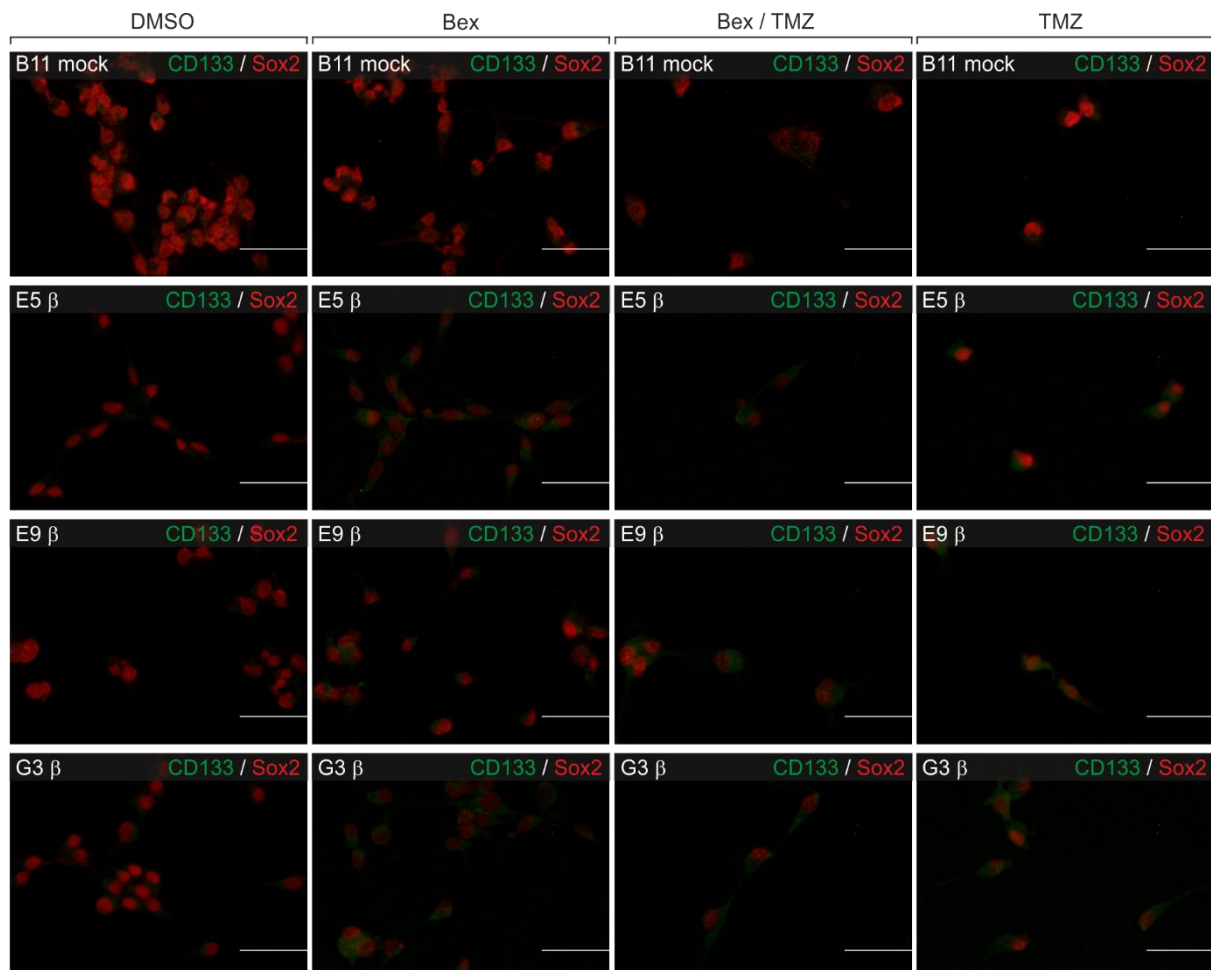


Abb. 17: Stammzellcharakter nach Behandlung mit Bexaroten in An- und Abwesenheit von Temozolomid. Immunzytochemische Analyse der im RXRB-Gen editierten Klone und der B11-*mock*-Kontrolle. Die zur Färbung verwendeten Antikörper richteten sich gegen CD133 (grün) und Sox2 (rot). Es erfolgte stets eine Gegenfärbung des Zellkerns mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol); um das nukleäre Sox2-Signal nicht zu schwächen, wurde dieser Kanal in den Bildern ausgeblendet. Bex: 0,1 μ M Bexaroten; TMZ: 25 μ M Temozolomid. Die Kontrollbehandlung erfolgte mit DMSO (Dimethylsulfoxid). Balken: 50 μ m. CD133: *Cluster of Differentiation 133*; Sox2: *SRY(Sex-determining Region Y)-Box 2*.

Die Gruppe der Klone mit einem RXRB-Knockout (E5 β , E9 β , G3 β) zeigte ein heterogeneres Verhalten als die Gruppe der RXRA-Knockout-Klone. So führte die alleinige Bexaroten-Behandlung bei zwei Klonen (E5 β , G3 β) zu einer Steigerung der Gesamtzellzahl, für den Klon E9 β zu einer Abnahme, wobei diese Effekte aufgrund der hohen Heterogenität der Präparate nicht signifikant waren (Abb. 17, 20). Die alleinige TMZ-Applikation bewirkte in allen Fällen eine signifikante Senkung der Gesamtzellzahl im Vergleich zur Kontrollbehandlung mit DMSO, ohne dass das Verhältnis von SLGC zu Nicht-SLGC

beeinflusst wurde. Im Fall der kombinierten Behandlung mit TMZ/Bexaroten lag die Gesamtzellzahl für den Klon E5 β nach der Doppelbehandlung höher als nach der alleinigen TMZ-Behandlung, was auf eine Schwächung des zytotoxischen Effekts von TMZ durch Bexaroten hinwies. Für den Klon E9 β deutete sich dieser Effekt ebenfalls an, war jedoch nicht signifikant. Die Relation zwischen SLGC und Nicht-SLGC blieb unverändert. Allerdings waren für alle RXRB-Knockout-Klone nach den Behandlungen mehr Zellen mit schwachen CD133-Signalen zu beobachten, was als Hinweis auf eine beginnende Anreicherung von Typ-II-Zellen galt.

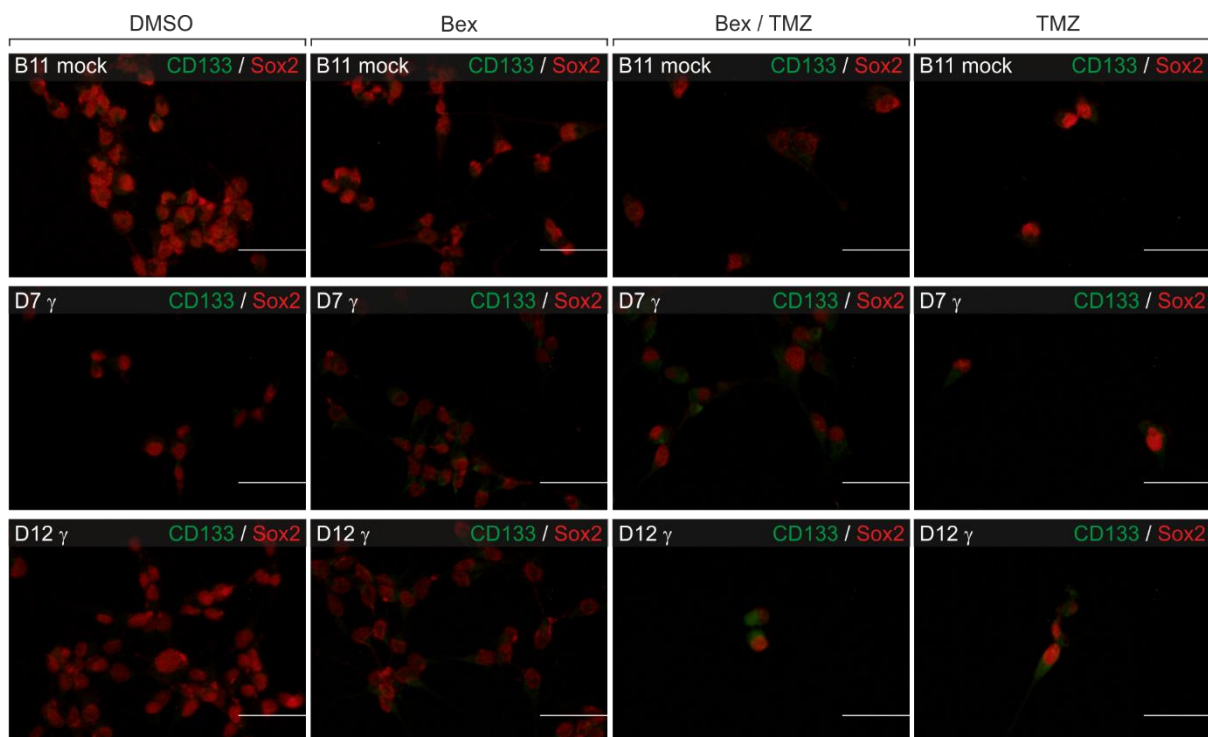


Abb. 18: Stammzellcharakter nach Behandlung mit Bexaroten in An- und Abwesenheit von Temozolomid. Immunzytochemische Analyse der im RXRG-Gen editierten Klone und der B11-*mock*-Kontrolle. Die zur Färbung verwendeten Antikörper richteten sich gegen CD133 (grün) und Sox2 (rot). Es erfolgte stets eine Gegenfärbung des Zellkerns mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol); um das nukleäre Sox2-Signal nicht zu schwächen, wurde dieser Kanal in den Bildern ausgeblendet. Bex: 0,1 μ M Bexaroten; TMZ: 25 μ M Temozolomid. Die Kontrollbehandlung erfolgte mit DMSO (Dimethylsulfoxid). Balken: 50 μ m. CD133: *Cluster of Differentiation 133*; Sox2: *SRY(Sex-determining Region Y)-Box 2*.

Die Kulturen der beiden im RXRG-Gen editierten Klone (D7 γ , D12 γ) enthielten ebenfalls fast ausschließlich Typ-I-Zellen (Abb. 18). Während die alleinige Bexaroten-Behandlung keinen signifikanten Effekt auf die Gesamtzellzahl hatte, nahm diese nach Behandlung mit TMZ und TMZ/Bexaroten drastisch ab. Während sich im Fall des Klons D12 γ eine geringe, aber signifikante Kompensation des TMZ-vermittelten Zelltods durch Bexaroten andeutete, war dies für den Klon D7 γ nicht der Fall (Abb. 20). Das Verhältnis von SLGC zu Nicht-SLGC änderte sich in keinem Fall (Abb. 20).

Wie bereits für die RXRB-Knockout-Klone beobachtet, nahm der Anteil an Zellen mit schwachem CD133-Signal nach den Behandlungen zu (Abb. 18), was wiederum auf eine beginnende Anreicherung von Typ-II-Zellen hinwies.

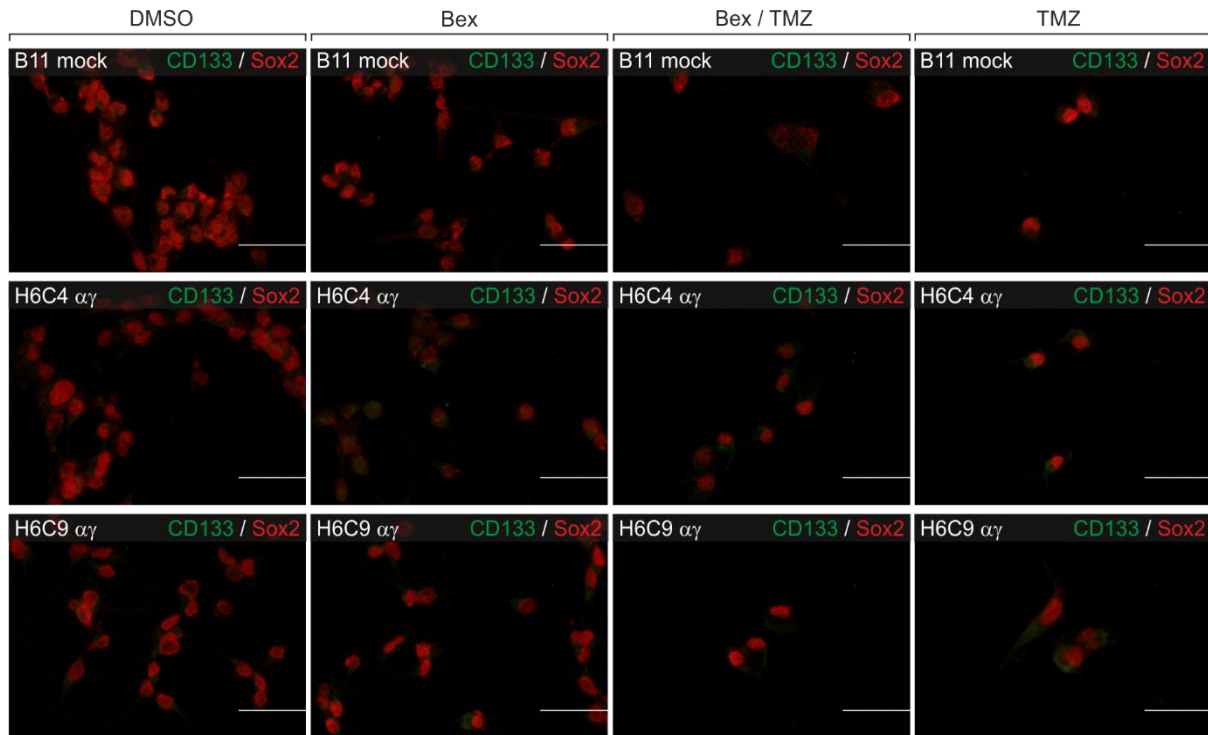


Abb. 19: Stammzellcharakter nach Behandlung mit Bexaroten in An- und Abwesenheit von Temozolomid. Immunzytochemische Analyse der Klone mit Editierung im RXRA- und RXRG-Gen sowie der B11-*mock*-Kontrolle. Die zur Färbung verwendeten Antikörper richteten sich gegen CD133 (grün) und Sox2 (rot). Es erfolgte stets eine Gegenfärbung des Zellkerns mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol); um das nukleäre Sox2-Signal nicht zu schwächen, wurde dieser Kanal in den Bildern ausgeblendet. Bex: 0,1 μ M Bexaroten; TMZ: 25 μ M Temozolomid. Die Kontroll-Behandlung erfolgte mit DMSO (Dimethylsulfoxid). Balken: 50 μ m. CD133: *Cluster of Differentiation 133*; Sox2: *SRY(Sex-determining Region Y)-Box 2*.

Von den Klonen, in denen eine Editierung des RXRA- und RXRB-Gens angestrebt worden war, waren nur im Fall des Klons C5E11 $\alpha\beta$ Mutationen nachweisbar, bei einem hohen Anteil an RXRB-Wildtyp-Sequenzen (Kap. 3.1.1). Dieser Klon wurde ebenfalls immunzytochemisch untersucht (Abb. 28 in Kap. 7.1), aufgrund des unklaren Editierungsstatus aber nicht in die Quantifizierung (Abb. 20; Abb. 25 in Kap. 3.2.2.3) einbezogen.

Die DMSO-Kontrollen von C5E11 $\alpha\beta$ und den beiden Klonen mit bi-allelischer Editierung im RXRA- und RXRG-Gen (H6C4 $\alpha\gamma$, H6C9 $\alpha\gamma$) wiesen primär Sox2-positive, CD133-negative Zellen auf. Die Sox2-Signale waren für C5E11 $\alpha\beta$ in fast allen Zellen sehr stark und stets nukleär (Abb. 28, obere Reihe), während die Kulturen der beiden RXRA/RXRG-Knockout-Klone auch einige Zellen mit verminderten oder zytoplasmatischen Sox2-Signalen enthielten (Abb. 19). Auch die Gesamtzellzahl war in den

doppelt editierten Klonen niedriger. Die alleinige Bexaroten-Behandlung bewirkte keine signifikante Änderung der Gesamtzellzahl. Mit 25 μ M TMZ hingegen wurde die Gesamtzellzahl signifikant gesenkt (Abnahme um ca. 90 %). Die simultane Applikation von 0,1 μ M Bexaroten schwächte die zytotoxische Wirkung von TMZ (Abb. 20), wobei dieser Effekt nur für den Klon H6C4 $\alpha\gamma$ statistisch signifikant war. Wie bei den RXRB- und RXRG-Knockout-Klonen waren nach den Behandlungen in den Kulturen der Klone mit einem Doppel-Knockout mehr Zellen mit einem schwachen CD133-Signal zu beobachten (Abb. 19). Somit lagen auch in diesen Fällen Hinweise auf eine beginnende Anreicherung von Typ-II-Zellen vor; die Relation zwischen SLGC und Nicht-SLGC wurde nicht beeinflusst (Abb. 20).

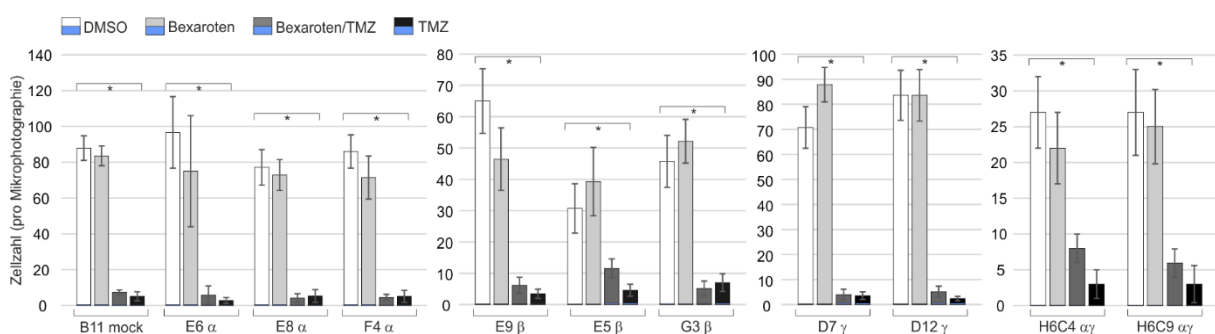


Abb. 20: Effekte der Behandlung auf die Gesamtzellzahl und das Verhältnis von SLGC zu Nicht-SLGC. Gesamtzellzahl und Quantifizierung der immunzytochemisch detektierten Expression von Sox2 in den genannten RXR-Knockout-Klonen und der B11-*mock*-Kontrolle. Der Anteil Sox2-negativer Zellen (Nicht-SLGC) an der Gesamtzellzahl ist in blau dargestellt. Abgebildet sind der Mittelwert und die Standardabweichung einer *QuPath*-Quantifizierung von 10 repräsentativen Mikrophotographien eines biologischen Replikats. Die eckige Klammer gibt an, ob für die Gesamtzellzahl im Sinne eines Globaltests statistische signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen auftraten (*One-Way-ANOVA*, Bonferroni-korrigiert; *: $p < 0,0083$). Über die Zellklone hinweg, die als unabhängige Experimente zu werten sind, wurde nicht für multiples Testen adjustiert. Eine Quantifizierung von Typ-I-, Typ-II- und Typ-III-Zellen war aufgrund von Unterschieden in der Qualität der Präparate nicht sinnvoll. DMSO: Dimethylsulfoxid; Sox2: SRY(*Sex-determining Region Y*)-Box 2; TMZ: Temozolomid.

Zusammenfassend ergab die immunzytochemische Analyse mit den Antikörpern gegen Sox2 und CD133, dass alle Klone, unabhängig vom Typ der RXR-Editierung, primär Typ-I-Zellen enthielten (> 95 %). Nach den Behandlungen wurden in den Kulturen der RXRB-, RXRG- und RXRA/RXRG-Knockout-Klone mehr Zellen mit einem schwachen CD133-Signal beobachtet, was auf eine beginnende Anreicherung von Typ-II-Zellen durch die Behandlungen hinwies. Dagegen resultierte keine Behandlung in einer Veränderung des Verhältnisses von SLGC zu Nicht-SLGC. Die Behandlung mit 25 μ M TMZ bewirkte in allen Klonen eine drastische, signifikante Reduktion der Gesamtzellzahl (Abb. 20). Jedoch wurde die zytotoxische Wirkung von TMZ im Fall von zwei Klonen (E5 β , H6C4 $\alpha\gamma$) signifikant durch Bexaroten vermindert, in drei weiteren Klonen (E9 β , D12 γ , H6C9 $\alpha\gamma$) deutete sich dieser Effekt an. Die alleinige Bexaroten-Behandlung wiederum hatte keinen signifikanten Effekt auf die

Gesamtzellzahl; mit Ausnahme der Klone E5 β , G3 β und D7 γ deutete sich jedoch tendenziell eine geringe Senkung der Gesamtzellzahl durch Bexaroten an (Abb. 20).

3.2.2.3. Effekte der Behandlung auf die Integrität der DNA

Um zu untersuchen, ob die Behandlung der Klone mit Bexaroten (Bex) und/oder Temozolomid (TMZ) Doppelstrangbrüche in der DNA induziert, wurde eine weitere immunzytochemische Analyse (ICC) durchgeführt. Da Doppelstrangbrüche durch eine Phosphorylierung der Histonvariante H2AX im Seryl-Rest S139 (sog. γ H2AX) angezeigt werden (Turinetti & Giachino, 2015), erfolgte eine Doppelfärbung mit Antikörpern gegen γ H2AX und das Intermediärfilament Nestin. Dabei diente der Nachweis des neuronalen Markers Nestin lediglich dazu, in seiner Funktion als Intermediärfilament Zellen und Zellgrenzen sichtbar zu machen (Abb. 33A in Kap. 7.1); eine Quantifizierung des Nestin-Signals erfolgte nicht. Die zwischen den Klonen etwas unterschiedlichen Nestin-Signalstärken beruhen auf leichten Variationen der Färbungen. Zusätzlich zeigten Zellen derselben Kultur zum Teil Expressionsunterschiede, was die Ergebnisse früherer immunzytochemischer Analysen der Zelllinie T1338-1 bestätigte (Choschzick *et al.*, 2014). Die Ergebnisse der Nestin-Färbungen waren für die Fragestellung zur Induktion von DNA-Läsionen nicht relevant und werden daher im Folgenden nicht weiter besprochen.

Auf die Doppelfärbungen folgte stets eine nukleäre Gegenfärbung mittels DAPI. Die DAPI-Signale wurden in den Mikrophotographien der Abbildungen 21-24 ausgeblendet, da diese die γ H2AX-Signale überdecken und schwächen können. Die Änderungen der Gesamtzellzahlen nach den Behandlungen (Abb. 25) standen in sehr guter Übereinstimmung mit den in Abbildung 20 (Kap. 3.2.2.2) erfassten Änderungen der Gesamtzellzahlen und werden daher nicht erneut erläutert.

Die γ H2AX-Signale wurden mithilfe der *QuPath-Software* quantifiziert (Kap. 2.2.9), wobei mindestens zehn deutliche, punktuelle Signale in einem Zellkern vorhanden sein mussten, bevor diese Zelle als positiv klassifiziert wurde. Wie die Abbildung 34 (Kap. 7.1) belegt, existieren in unbehandelten Kulturen stets Zellen mit schwachen γ H2AX-Signalen im Zellkern. Diese Signale stehen in starkem Kontrast zu den Signalen in behandelten Zellen mit DNA-Läsionen und wurden daher als „Rauschen“ (Hintergrundsignale) klassifiziert.

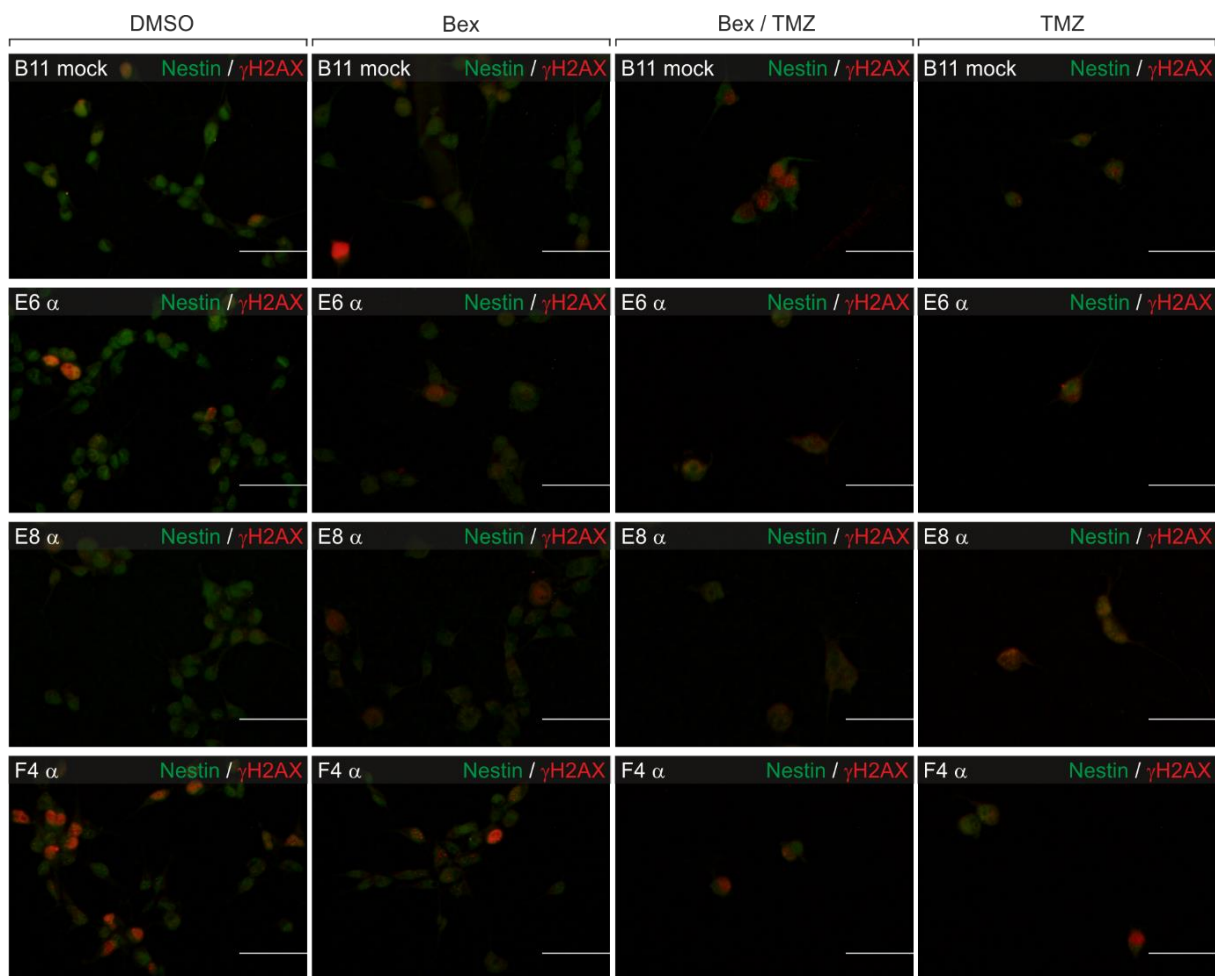


Abb. 21: Induktion der Phosphorylierung der Histonvariante H2AX (γ H2AX) durch TMZ und Modulation durch Bexaroten. Immunzytochemische Analyse der im RXRA-Gen editierten Klone und der B11-*mock*-Kontrolle. Die zur Färbung verwendeten Antikörper richteten sich gegen γ H2AX (rot) und Nestin (grün). Es erfolgte stets eine Gegenfärbung des Zellkerns mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol); um das nukleäre γ H2AX-Signal nicht zu schwächen, wurde dieser Kanal in den Bildern ausgeblendet. Bex: 0,1 μ M Bexaroten; TMZ: 25 μ M Temozolomid. Die Kontroll-Behandlung erfolgte mit DMSO (Dimethylsulfoxid). Balken: 50 μ m.

Der Anteil γ H2AX-positiver Zellen lag in der DMSO-Kontrolle und nach der alleinigen Behandlung mit 0,1 μ M Bexaroten für den *mock*-editierten Klon B11 bei < 5 % (Abb. 21, 25). Die drei Klone mit einem RXRA-Knockout (E6 α , E8 α , F4 α) ergaben ebenfalls jeweils eine sehr geringe Anzahl von γ H2AX-positiven Zellen in der DMSO-Kontrolle und nach Bexaroten-Behandlung (Abb. 21, 25). Nach der Behandlung mit 25 μ M TMZ war eine drastische Steigerung des Anteils γ H2AX-positiver Zellen zu verzeichnen (ca. 80-90 %). Nach der Doppelbehandlung mit Bexaroten und TMZ wurde ebenfalls eine sehr stark erhöhte relative Anzahl von γ H2AX-positiven Zellen ermittelt, die geringe Unterschiede zu den Werten der alleinigen TMZ-Behandlung aufwies, sich von diesen aber nicht signifikant unterschied (Abb. 21, 25).

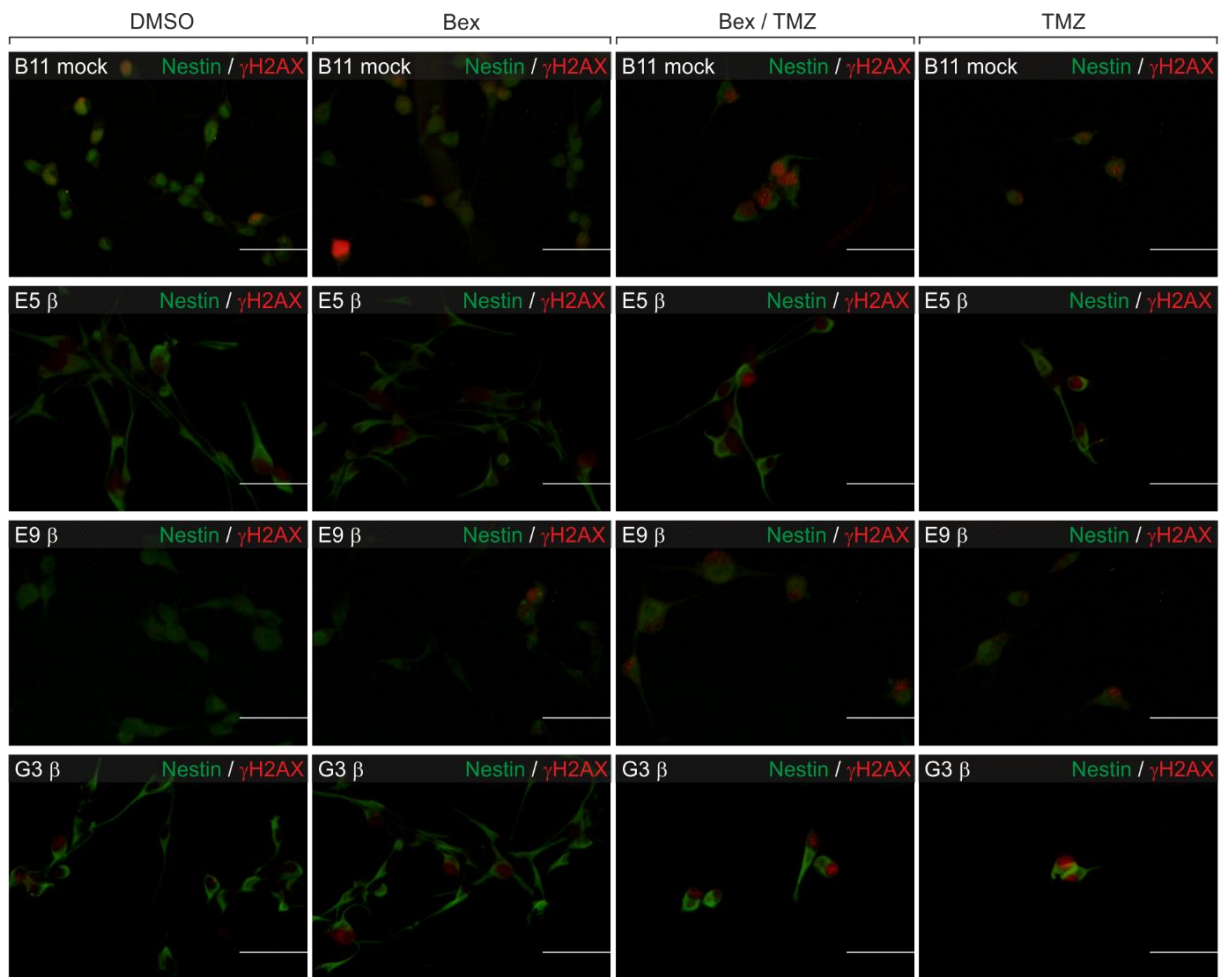


Abb. 22: Induktion der Phosphorylierung der Histonvariante H2AX (γ H2AX) durch TMZ und Modulation durch Bexaroten. Immunzytochemische Analyse der im RXRB-Gen editierten Klone und der B11-*mock*-Kontrolle. Die zur Färbung verwendeten Antikörper richteten sich gegen γ H2AX (rot) und Nestin (grün). Es erfolgte stets eine Gegenfärbung des Zellkerns mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol); um das nukleäre γ H2AX-Signal nicht zu schwächen, wurde dieser Kanal in den Bildern ausgeblendet. Bex: 0,1 μ M Bexaroten; TMZ: 25 μ M Temozolomid. Die Kontroll-Behandlung erfolgte mit DMSO (Dimethylsulfoxid). Balken: 50 μ m.

In den Zellklonen mit RXRB-Editierung (E5 β , E9 β , G3 β) wurde jeweils für die DMSO-Kontrolle und die Bexaroten-Behandlung ebenfalls nur in maximal 5 % der Zellen ein γ H2AX-Signal detektiert (Abb. 22, 25). Nach der Behandlung mit 25 μ M TMZ wurde ein Anstieg des Anteils γ H2AX-positiver Zellen festgestellt, der zwischen den Klonen deutlich variierte. So wurden für den Klon E9 β nur ca. 20 % γ H2AX-positive Zellen ermittelt, während der Klon E5 β ca. 50 % und der Klon G3 β ca. 80 % γ H2AX-positive Zellen aufwies (Abb. 25). Da alle drei Klone einen bi-allelicen RXRB-Knockout tragen, sollten die Unterschiede nicht auf der Editierung beruhen. Durch die zusätzliche Applikation von 0,1 μ M Bexaroten wurde der Anteil γ H2AX-positiver Zellen nicht signifikant verändert (Abb. 25).

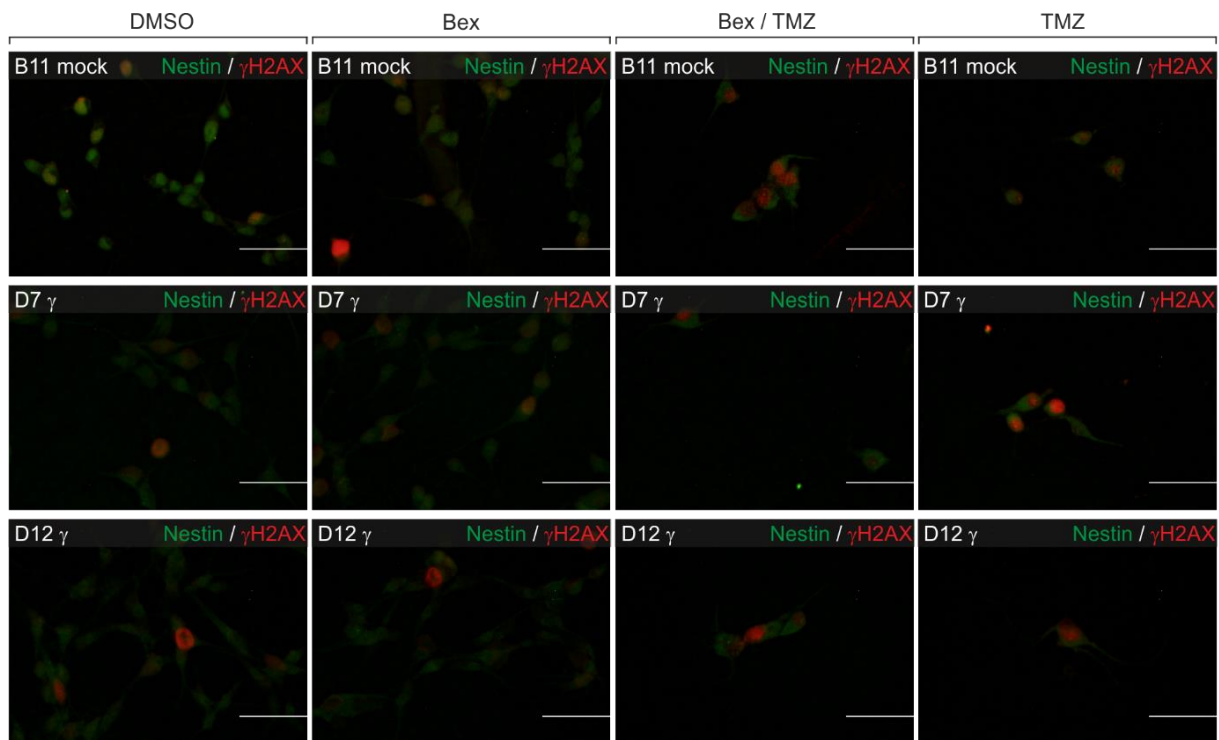


Abb. 23: Induktion der Phosphorylierung der Histonvariante H2AX (γ H2AX) durch TMZ und Modulation durch Bexaroten. Immunzytochemische Analyse der im RXRG-Gen editierten Klone und der B11-*mock*-Kontrolle. Die zur Färbung verwendeten Antikörper richteten sich gegen γ H2AX (rot) und Nestin (grün). Es erfolgte stets eine Gegenfärbung des Zellkerns mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol); um das nukleäre γ H2AX-Signal nicht zu schwächen, wurde dieser Kanal in den Bildern ausgeblendet. Bex: 0,1 μ M Bexaroten; TMZ: 25 μ M Temozolomid. Die Kontroll-Behandlung erfolgte mit DMSO (Dimethylsulfoxid). Balken: 50 μ m.

Die beiden im RXRG-Gen editierten Klone (D7 γ , D12 γ) wiesen jeweils in der DMSO-Kontrolle ca. 5-10 % γ H2AX-positive Zellen auf und lagen damit deutlich über dem Anteil γ H2AX-positiver Zellen in den RXRA- und RXRB-Knockout-Klonen und der B11-*mock*-Kontrolle (Abb. 23, 25). Durch die Bexaroten-Behandlung wurde keine signifikante Änderung in den relativen Anzahlen von γ H2AX-positiven Zellen induziert, was mit den RXRA- und RXRB-Knockout-Klonen und der B11-*mock*-Kontrolle übereinstimmte (Abb. 23, 25). Nach der TMZ-Applikation stieg jeweils der Anteil der γ H2AX-positiven Zellen an und erreichte im Fall des Klons D12 γ ca. 40-50 % und im Fall des Klons D7 γ ca. 20-30 % (Abb. 25). Die relativen Anzahlen γ H2AX-positiver Zellen wurden durch die Ko-Applikation von 0,1 μ M Bexaroten nicht signifikant beeinflusst (Abb. 25).

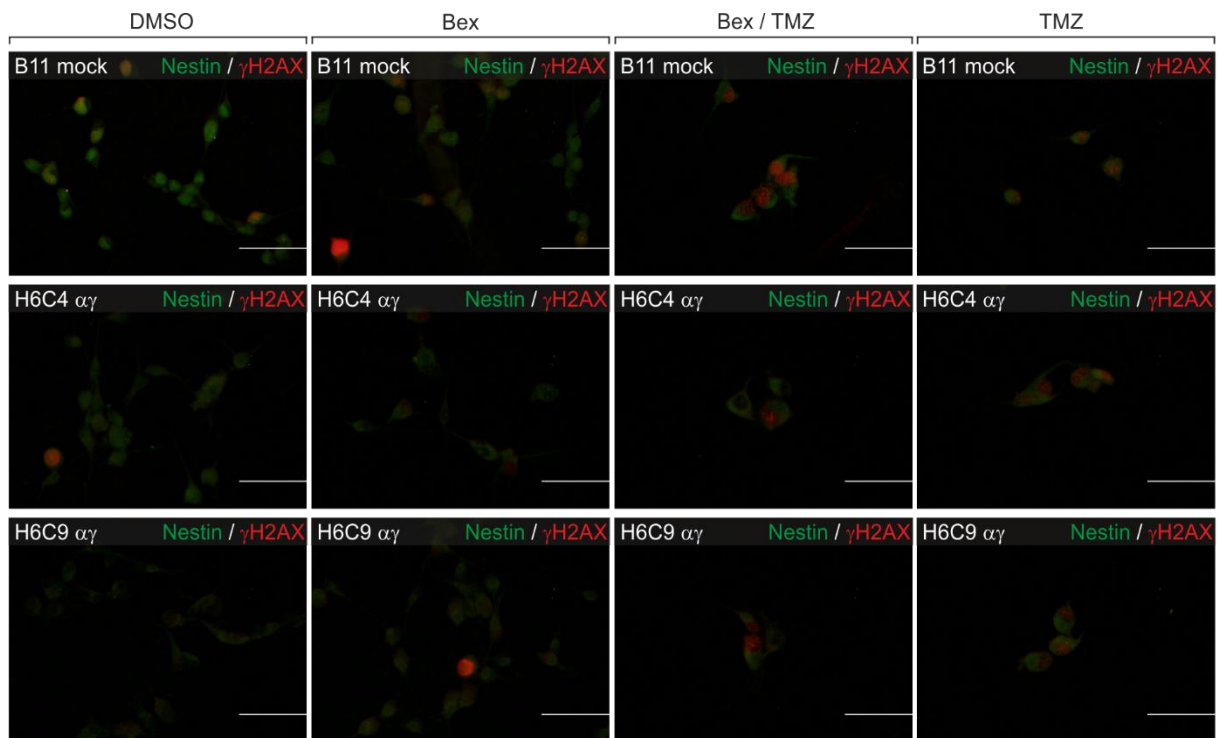


Abb. 24: Induktion der Phosphorylierung der Histonvariante H2AX (γ H2AX) durch TMZ und Modulation durch Bexaroten. Immunzytochemische Analyse der Klone mit Editierung im RXRA- und RXRG-Gen sowie der B11-*mock*-Kontrolle. Die zur Färbung verwendeten Antikörper richteten sich gegen γ H2AX (rot) und Nestin (grün). Es erfolgte stets eine Gegenfärbung des Zellkerns mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol); um das nukleäre γ H2AX-Signal nicht zu schwächen, wurde dieser Kanal in den Bildern ausgeblendet. Bex: 0,1 μ M Bexaroten; TMZ: 25 μ M Temozolomid. Die Kontroll-Behandlung erfolgte mit DMSO (Dimethylsulfoxid). Balken: 50 μ m.

Die doppelt editierten Klone H6C4 $\alpha\gamma$ und H6C9 $\alpha\gamma$ wiesen ebenso wie die RXRA- und RXRB-Knockout-Klone jeweils nur geringe Anteile γ H2AX-positiver Zellen in der DMSO-Kontrolle auf (< 5 %), die sich nach der alleinigen Bexaroten-Behandlung nicht veränderten (Abb. 24, 25). Die Anteile der γ H2AX-positiven Zellen stiegen nach der TMZ-Behandlung auf ca. 80 % an; nach der kombinierten Behandlung mit TMZ und Bexaroten wurden im Mittel ca. 25 % weniger γ H2AX-positive Zellen gezählt (Abb. 24, 25). Aufgrund der hohen Variabilität zwischen den quantifizierten Regionen waren die Unterschiede zwischen den TMZ- und den TMZ/Bexaroten-Behandlungen jedoch nicht statistisch signifikant.

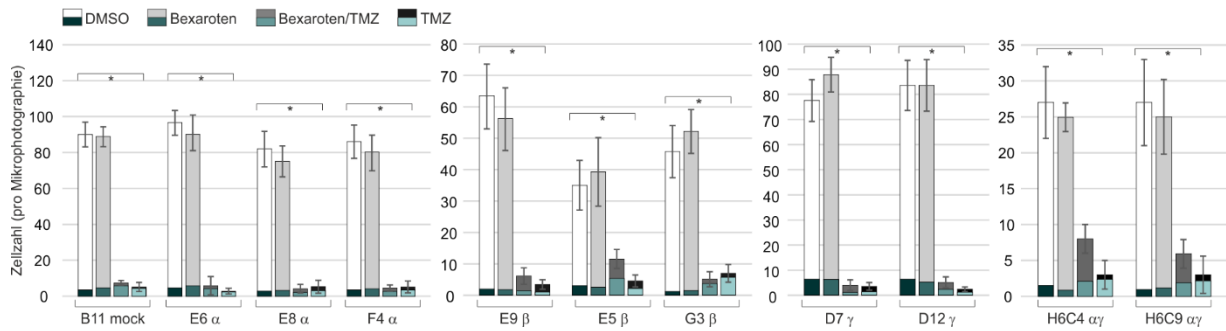


Abb. 25: Effekte der Behandlung auf die Gesamtzellzahl und die Phosphorylierung der Histonvariante H2AX (γ H2AX). Gesamtzellzahl und Quantifizierung des immunzytochemisch detektierten Anteils γ H2AX-positiver Zellen in den genannten RXR-Knockout-Klonen und der B11-*mock*-Kontrolle. Der Anteil γ H2AX-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl ist in grün dargestellt. Abgebildet sind der Mittelwert und die Standardabweichung einer *QuPath*-Quantifizierung von 10 repräsentativen Mikrophotographien eines biologischen Replikats. Die eckige Klammer gibt an, ob für die Gesamtzellzahl im Sinne eines Globaltests statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen auftraten (*One-Way-ANOVA*, Bonferroni-korrigiert; *: $p < 0,0083$). Über die Zellklone hinweg, die als unabhängige Experimente zu werten sind, wurde nicht für multiples Testen adjustiert. DMSO: Dimethylsulfoxid; TMZ: Temozolomid.

Zusammenfassend ergab die immunzytochemische Analyse mit den Antikörpern gegen γ H2AX und Nestin einen geringen Anteil γ H2AX-positiver Zellen in den DMSO-Kontrollen und nach Behandlung mit 0,1 μ M Bexaroten. Dieser lag für die beiden Klone mit RXRG-Editierung bei ca. 5-10 %, für alle übrigen Klone und die B11-*mock*-Kontrolle bei < 5 % (Abb. 25). Die Behandlung mit 25 μ M TMZ erwies sich für alle Klone als ein effizienter Auslöser für die Phosphorylierung der Histonvariante H2AX und somit für die Induktion von Doppelstrangbrüchen der DNA. Dabei stieg der Anteil der γ H2AX-positiven Zellen für die RXRA-, RXRB- und RXRA/RXRG-Knockout-Klone drastisch an. Die beiden RXRG-Knockout-Klone, die in den DMSO-Kontrollen die höchsten Anteile γ H2AX-positiver Zellen aufwiesen, zeigten den geringsten Anstieg der entsprechenden Anteile nach der TMZ-Behandlung. Übereinstimmend für alle Klone und die B11-*mock*-Kontrolle wurde durch die Ko-Applikation von 0,1 μ M Bexaroten der Anteil der γ H2AX-positiven Zellen nicht signifikant verändert. Somit hatte Bexaroten in der gewählten Konzentration keinen Einfluss auf die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen durch TMZ.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst überprüft, ob vier Subklone der SLGC-Linie T1338-1, die aus *Limiting Dilution Assays* (LDA) stammen und eine bi-allelische Editierung im RXRA-Gen tragen, zusätzlich eine Editierung im RXRB- oder RXRG-Gen aufweisen (Kap. 4.1). Für die Zellklone mit Editierungen wurden *in silico* die Proteinsequenzen abgeleitet und die möglichen Konsequenzen der Mutationen auf den korrespondierenden RXR-Isotyp abgewogen (Kap. 4.1.1). Danach wurde analysiert, ob nach der bi-allelischen Editierung von jeweils einem der drei RXR-Gene die RXR-Isotypen immunzytochemisch in den Zellklonen nachgewiesen werden können; hierfür wurden aus technischen Gründen editierte Klone von Kolleg/-innen der Arbeitsgruppe eingesetzt (Kap. 4.1.2). Im Weiteren wurde untersucht, ob der RXR-*pan*-Agonist Bexaroten einen Einfluss auf Klone mit RXR-Editierung ausübt und ob Bexaroten die Wirkung des Chemotherapeutikums Temozolomid (TMZ) moduliert; dazu wurden Klone mit Editierungen in einem RXR-Gen und Klone mit Doppel-Editierungen eingesetzt. Es wurden die Effekte auf die Proliferation (Kap. 4.2), den Stammzellcharakter (Kap. 4.3) und die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen durch TMZ (Kap. 4.4) untersucht.

4.1. Der bi-allelische Knockout von RXRG, nicht aber RXRB war erfolgreich

Wie in Kapitel 1 beschrieben, besteht der Retinoid-X-Rezeptor (RXR) aus fünf funktionellen Domänen. Dabei ermöglicht die DNA-bindende Domäne (DBD) die selektive Bindung an das Konsensusmotiv PuGGTCA in Hormonresponsiven Elementen (HRE). Die Erkennung des Konsensusmotivs erfolgt über die P-Box, die sich im C-terminalen Bereich des ersten Zinkfingers befindet (Gronemeyer & Laudet, 1995; Zhao *et al.*, 2000; Orlov *et al.*, 2012). Die drei RXR-Isotypen (RXR α , RXR β und RXR γ) werden jeweils von einem eigenen Gen (RXRA, RXRB und RXRG) kodiert, wobei in allen drei Fällen das Exon 4 für die DBD des Rezeptors kodiert (Gronemeyer & Laudet, 1995). Die *Single-Guide*-RNA für die Editierung der drei RXR-Gene war jeweils so gewählt, dass eine Editierung in dem Bereich von Exon 4 erfolgen sollte, der für die P-Box kodiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Subklone auf eine Editierung im RXRB-Gen (C5H6, C5E11) und zwei Subklone auf eine Editierung im RXRG-Gen (H6C4, H6C9) untersucht. Von diesen Klonen, die einem Doppel-Editierungsansatz einer Kollegin im Labor entstammen, war bereits bekannt, dass sie eine bi-allelische Editierung im RXRA-Gen tragen (Dabrock *et al.*, 2023).

Während für den Subklon C5H6 keine Editierungen im RXRB-Gen nachweisbar waren, wies der Subklon C5E11 neben RXRB-Wildtypsequenzen zusätzlich eine Mutation auf. Somit ist von einer mono-allelischen Editierung des RXRB-Gens in einer Subpopulation von Zellen auszugehen. Für die Subklone

H6C4 und H6C9 wurden multiple Mutationen im RXRG-Gen, jedoch keine Wildtypsequenzen nachgewiesen. Somit kann geschlussfolgert werden, dass im Fall der Subklone H6C4 und H6C9 bi-allelische Editierungen in allen Zellen vorliegen, sich die Zellen allerdings in der Kombination der Mutationen unterscheiden.

4.1.1. Die Editierungen im Exon 4 führen zu einer funktionellen Inaktivierung der DBD

Im Hinblick auf die Auswirkungen der Editierungen ist elementar, dass die diversen RXR-Heterodimere bedeutsam für die Proliferation und Differenzierung sowie den Metabolismus von Zellen sind (Gronemeyer & Laudet, 1995; Dawson & Xia, 2012; Petkovich & Chambon, 2022). Für den Subklon C5E11 ergab die *In-silico*-Translation die Substitution eines Cysteinyl-Rests innerhalb der P-Box. Damit ist eine Dysfunktion des RXR β in zweierlei Hinsicht zu erwarten. Da alle vier Cysteinyl-Reste des ersten Zinkfingers an der Koordination des Zink-Ions beteiligt sind (Lee *et al.*, 1993), ist anzunehmen, dass dessen koordinative Bindung nicht aufrechterhalten werden kann, was in einer Instabilität oder fehlerhaften Faltung des ersten Zinkfingers resultieren sollte. Weiterhin war die Abfolge der Aminosäurereste in der P-Box und damit deren Integrität nicht mehr gegeben. Daher kann davon ausgegangen werden, dass das Konsensusmotiv PuGGTCA von dem mutierten Rezeptor nicht mehr erkannt und gebunden wird. Somit lässt sich schlussfolgern, dass der durch das editierte Allel kodierte RXR β seine Funktion als Heterodimerisierungspartner nicht mehr erfüllen kann. Dabei wäre jedoch nicht die Dimerisierung mit einem Partner als solche unterbunden, da diese über die LBD stattfindet (Le Maire & Bourguet, 2014), sondern die Erkennung des zugehörigen HRE, die über den ersten Zinkfinger und die P-Box vermittelt wird (Gronemeyer & Laudet, 1995). Da die Editierung in den Zellen mit großer Wahrscheinlichkeit lediglich mono-allelisch vorliegt, kann vermutet werden, dass neben dysfunktionellen auch funktionelle RXR β -Moleküle in derselben Zelle vorkommen. Dies würde bedeuten, dass mutierte und Wildtyp-RXR β -Moleküle um dieselben Heterodimerisierungspartner konkurrieren. Somit wäre zu erwarten, dass RXR β -abhängige Signalwege in den betroffenen Zellen nicht mehr effizient reguliert werden. Da der RXR α in den entsprechenden Zellen aufgrund des bi-allelischen RXRA-Knockouts fehlt, ist anzunehmen, dass lediglich der RXR γ noch funktionell aktiv ist.

Wie oben erläutert, wiesen die Sequenzierungsdaten darauf hin, dass die Subklone H6C4 und H6C9 multiple Mutationen im RXRG-Gen tragen und keine RXRG-Wildtypsequenzen mehr vorhanden sind. Da bei allen Editierungen die P-Box verändert, zum Teil sogar vollständig deletiert wurde, kann von einer kompletten funktionellen Inaktivierung des RXR γ in allen Zellen dieser Klone ausgegangen werden. Für den Subklon H6C4 wurden vier verschiedene Editierungen identifiziert. Diese Tatsache lässt den Schluss zu, dass es sich bei diesem Subklon um eine heterogene Kultur

handelt, in der mindestens zwei genotypisch verschiedene Zellpopulationen vorliegen. Eine Aussage darüber, welche Mutationen zusammen in derselben Zelle vorkommen, lässt sich auf Grundlage der vorliegenden Daten nicht treffen. Um diesen Sachverhalt zu klären, wäre entweder ein weiterer LDA notwendig oder Einzelzellen müssten aus der Kultur isoliert und dann einer Direkt-Sequenzierung zugeführt werden. Für den Subklon H6C9 verhält es sich ähnlich. In diesem Fall wurden sogar sieben verschiedene Editierungen identifiziert, von denen zwei ebenso im Subklon H6C4 vorlagen. Dies ist nicht überraschend, da beide Subklone aus einem LDA stammen, der mit dem Klon H6 erfolgt war.

Die Mutationen, die in den Subklonen H6C4 und H6C9 identifiziert wurden, betrafen alle die P-Box, schlugen sich allerdings zum Teil auch deutlich umfangreicher nieder. Auf der DNA-Ebene wurden neben verschiedenen *In-Frame*-Deletionen und kombinierten *In-Frame*-Deletionen/*In-Frame*-Insertionen auch *In-Frame*-Indels oder *Frame-Shift*-Deletionen beobachtet. Entscheidend ist, dass alle Mutationen in Defekten der P-Box resultierten, wobei in der Regel der N-terminale Cysteinyl-Rest deletiert oder durch einen abweichenden Aminosäurerest substituiert war. Im Klon H6C9 war eine Deletion von 57 Basenpaaren, die als *In-Frame*-Deletion oder durch Kombination mit zusätzlichen, kleinen Veränderungen in Form einer *In-Frame*-Indel oder *Frame-Shift*-Deletion vorkam, die häufigste Veränderung. Im Kontext der *In-Frame*-Deletion und der *In-Frame*-Indel bot sich der Verlust der P-Box und der Region zwischen erstem und zweitem Zinkfinger dar. Insofern die mutierte mRNA überhaupt stabil und translatierbar wäre, wiese ein entsprechender RXR γ eine Struktur auf, in der die D-Box direkt an den dysfunktionellen ersten Zinkfinger heranrückte. Damit wäre nicht nur die P-Box defekt, sondern auch die Möglichkeit, ein *Interface* mit einem Dimerisierungspartner über die D-Box zu bilden (Gronemeyer & Laudet, 1995), ausgeschlossen. Die Deletion von 58 Basenpaaren, die mit einem *Frame-Shift* einherging, führte aufgrund eines prämaturnen Stopp-Codons zu einer Trunkierung des Proteins nach einem dysfunktionellen ersten Zinkfinger. Unabhängig davon, welche Editierungen in der Einzelzelle vorliegen, ist anzunehmen, dass sowohl in H6C4- als auch in H6C9-Zellen keine funktionellen RXR γ -Moleküle vorhanden sind. Da in den Zellen dieser Klone auch funktionelle RXR α -Moleküle fehlen, wäre eine den Verlust partiell kompensierende Überexpression von RXR β möglich. Dabei ist jedoch zu bedenken, dass dysfunktionelle RXR α - und RXR γ -Moleküle sowie funktionelle RXR β -Moleküle um dieselben Heterodimerisierungspartner konkurrieren. Ob dysfunktionelle RXR-Isotypen durch die stärkere Expression eines anderen, funktionellen RXR-Isotyps kompensiert werden können, wurde mittels immunzytochemischer Analysen ermittelt.

4.1.2. Der Knockout eines RXR-Isotyps könnte durch einen anderen kompensiert werden

Die Expression und die subzelluläre Lokalisation der RXR-Isotypen in editierten Klonen und der B11-*mock*-Kontrolle wurde mittels Immunzytochemie analysiert. Dabei wurden ausschließlich T1338-1-Klone untersucht, die aus früheren Editierungs-Experimenten der AG stammen und im RXRA-, RXRB- oder RXRG-Gen editiert sind. Die eingesetzten Antikörper waren in zwei Fällen gegen die A/B-Domäne der Rezeptoren gerichtet (RXR α , RXR γ), im dritten Fall (RXR β) war dies wahrscheinlich, aufgrund der Restriktionen des Herstellers aber nicht überprüfbar (Kap. 3.2.1). Wie für die RXR-Wildtypproteine bekannt ist (Zhang *et al.*, 2004), zeigte sich auch im Fall der editierten Klone und der B11-*mock*-Kontrolle eine nukleäre Lokalisation des RXR α , RXR β und RXR γ . Da die Editierungen in der DBD (C-Domäne) erfolgt waren, weist dies darauf hin, dass die mutierten Proteine in den Klonen exprimiert werden. Dies ist nicht selbstverständlich, da die Editierungen zu mRNA mit einer verminderten Stabilität führen könnten, die durch den Prozess des *Nonsense-mediated mRNA Decay* (NMD) eliminiert werden (Karousis & Mühlemann, 2019). Von hoher Bedeutung für die nukleäre Lokalisation ist überdies das Kernlokalisierungssignal (NLS) in der DBD. Mit Ausnahme der Klone, die trunkierte RXR-Isotypen exprimieren (Kap. 3.1.2; Dabrock *et al.*, 2023), sollte das NLS in allen mutierten RXR α -, RXR β - und RXR γ -Proteinen vorhanden sein. Eine ausschließlich zytoplasmatische Lokalisation eines aberranten RXR kann nach Deletion oder Mutation des NLS in der DBD auftreten (Barsony & Prüfer, 2002), obwohl der Rezeptor weitere NLS trägt (Gronemeyer & Laudet, 1995).

Eine Kompensation des Verlusts eines RXR-Isotyps durch einen anderen könnte für den RXRB-Knockout-Klon E9 β vermutet werden, der im Vergleich zur B11-*mock*-Kontrolle eine höhere Expression des RXR γ zeigte. Eine relativ zur Kontrolle erhöhte RXR β -Expression wies der Klon F4 α auf, der einen bi-allelischen RXRA-Knockout trägt. Ob diese Beobachtungen von Bedeutung sind, ist nicht eindeutig zu beurteilen, da die Daten lediglich auf zwei technischen Replikaten desselben biologischen Replikats beruhen. Da zum Zeitpunkt dieser Analysen die Klone C5E11 $\alpha\beta$ sowie H6C4 $\alpha\gamma$ und H6C9 $\alpha\gamma$ noch in der Phase der Etablierung und Expansion waren, kann in der vorliegenden Arbeit zu möglichen Kompensationseffekten eines partiellen (C5E11 $\alpha\beta$) bzw. vollständigen Doppel-Knockouts (H6C4 $\alpha\gamma$, H6C9 $\alpha\gamma$) durch RXR-Wildtyp-Isotypen keine Aussage getroffen werden.

4.2. Der pro-proliferative Effekt von Bexaroten wird durch RXR β und/oder RXR γ vermittelt

Die Standardtherapie des GBM umfasst die chirurgisch maximal mögliche Reduktion der Tumormasse, gefolgt von einer fraktionierten Strahlentherapie und einer adjuvanten Chemotherapie mit TMZ (Stupp *et al.*, 2005). Die schlechte Prognose des GBM ist zumindest teilweise auf die Anwesenheit von SLGC zurückzuführen, die in Mausmodellen die TMZ-Therapie überleben und *in vitro* einer Bestrahlung gegenüber deutlich resistenter als Nicht-SLGC sind (Bao *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2012; Überblick in Schonberg *et al.*, 2014 und Gimple *et al.*, 2022). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob das Rexinoid Bexaroten die Sensitivität von SLGC gegenüber TMZ beeinflusst. Bexaroten ist ein selektiver RXR-*pan*-Agonist, welcher die Transaktivierung aller drei RXR-Isotypen gewährleistet (Krężel *et al.*, 2019). Um zusätzlich die möglicherweise unterschiedliche Bedeutung von RXR α , RXR β und RXR γ für die Effekte von Bexaroten zu ermitteln, erfolgten die Analysen an Klonen mit einem RXRA-, RXRB- oder RXRG- bzw. RXRA/RXRG-Knockout. Wie oben erläutert, stammen diese Knockout-Klone von der SLGC-Linie T1338-1 ab, die unter den im Labor verfügbaren SLGC-Linien die beste Responsivität gegenüber RAR-selektiven und RXR-selektiven Retinoiden aufweist (Choschick *et al.*, 2014; Dabrock *et al.*, 2023). Bekannt war weiterhin, dass T1338-1-Kulturen primär Typ-I-Zellen enthalten sowie eine Hypermethylierung des MGMT-Promotors vorliegt und somit das MGMT-Protein nicht exprimiert wird (Choschick *et al.*, 2014; Zechel *et al.*, 2024). Die Behandlungen mit TMZ erfolgten mit 25 μ M, die Behandlungen mit Bexaroten mit 1 μ M, 0,1 μ M und 0,01 μ M. Die Dissoziationskonstanten (K_D) für Bexaroten liegen bei 33 nM für RXR α , 24 nM für RXR β und 25 nM für RXR γ (Herstellerangaben). Folglich ist davon auszugehen, dass alle drei RXR-Isotypen ähnlich gut durch Bexaroten aktiviert werden können. Als nicht editierte Kontrolle diente der Klon B11 *mock*, der die Editierungs-Prozedur durchlaufen hatte, aber nachweislich keine Editierungen trägt.

Zunächst wurde mittels BrdU-ELISA untersucht, ob die alleinige Behandlung mit Bexaroten einen Effekt auf das Proliferationsverhalten der editierten Klone und der B11-*mock*-Kontrolle zeigt. Für die Klone mit Editierung im RXRA-Gen sowie die Kontrolle wurde durch 1 μ M Bexaroten ein pro-proliferativer Effekt vermittelt. Ein solcher Effekt wurde weder für die im RXRB-Gen noch für die doppelt im RXRA- und RXRG-Gen editierten Zellen beobachtet. Bis auf die Klone G3 β und H6C4 $\alpha\gamma$ zeigten alle Klone eine statistisch signifikante Dosis-Wirkungs-Beziehung für Bexaroten. Insgesamt erlauben die BrdU-ELISA den Schluss, dass die durch Bexaroten medierte pro-proliferative Wirkung primär über die Isotypen RXR β und RXR γ vermittelt wurde. Leider konnten aufgrund eines Lieferstopps des BrdU-ELISA-Kits durch den Hersteller keine Analysen mit den beiden Klonen mit bi-allelischer Editierung im RXRG-Gen (D7 γ , D12 γ) durchgeführt werden.

In Übereinstimmung mit dem MGMT-Status (Hypermethylierung des MGMT-Promotors, Abwesenheit des MGMT-Proteins; Zechel *et al.*, 2024) zeigten alle Klone und die B11-*mock*-Kontrolle

eine deutliche und statistisch signifikante Senkung der Proliferation nach Behandlung mit 25 μM TMZ. Für die Klone mit einem RXRA-Knockout und die Kontrolle wurde der anti-proliferative Effekt von 25 μM TMZ durch 1 μM Bexaroten gering, aber signifikant geschwächt. Dies wurde für die Klone mit RXRB- oder RXRA/RXRG-Knockout nicht erreicht. Damit scheinen die Klone, für die Bexaroten einen pro-proliferativen Effekt aufweist, die Behandlung mit 25 μM TMZ besser zu vertragen. Konsekutiv könnte angenommen werden, dass Bexaroten nicht nur einen pro-proliferativen, sondern auch einen Überleben fördernden Effekt auf T1338-1-Zellen ausüben kann. Dies steht im Kontrast zu zwei Publikationen, in denen die Responsivität einer Ratten-Gliomzelllinie (Hacioglu *et al.*, 2021) bzw. primärer humaner GBM-Zellen im *Xenograft*-Mausmodell (Heo *et al.*, 2016) gegenüber Bexaroten analysiert und anti-proliferative Effekte beobachtet wurden. Da die in GBM nachweisbaren Treibermutationen für jeden Tumor individuell sind, könnte dieser Gegensatz als ein für T1338-1-Zellen spezifisches Kriterium gewertet werden (Nakada *et al.*, 2011; Gimple *et al.*, 2022). Von der T1338-1-Zelllinie ist bekannt, dass hinsichtlich der in die Diagnostik eingeflossenen Treibermutationen (p53, PTEN, EGFR) der Tumorsuppressor p53 homozygot als Wildtyp sowie der Verlust von PTEN vorliegen und der EGFR-Wildtyp plus eine trunkierte EGFR-Variante exprimiert werden (Zechel *et al.*, 2024). Es ist nicht auszuschließen, dass Bexaroten in SLGC mit abweichenden genetischen und epigenetischen Charakteristika entsprechend andere Effekte als in T1338-1-Zellen ausübt.

4.3. Der funktionelle RXR-Knockout beeinflusst den Stammzellcharakter der SLGC nicht

SLGC besitzen Eigenschaften von Tumorstammzellen (Chen *et al.*, 2010) und die Anwesenheit von SLGC trägt maßgeblich zur schlechten Prognose des GBM bei (Beier *et al.*, 2011). Entscheidend für den Stammzellcharakter der SLGC ist der Transkriptionsfaktor Sox2 (Alonso *et al.*, 2011), dessen Expression bei zunehmender Differenzierung der Gliomstammzelle (Typ-I-Zelle) in Progenitoren (Typ-II- und Typ-III-Zellen) abnimmt und letztendlich in Nicht-SLGC (*Bulk Tumor Cells*) vollständig herunterreguliert wird (Chen *et al.*, 2010). Da lediglich der frühe Progenitor (Typ-II-Zelle) Sox2 und CD133 ko-exprimiert, die Typ-I- und Typ-III-Zellen jedoch nicht (Chen *et al.*, 2010), wurde der Grad an *Stemness* mittels immunzytochemischer Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen Sox2 und CD133 ermittelt. Dabei wurde deutlich, dass sowohl die Kulturen der editierten Klone als auch die der B11-*mock*-Kontrolle zu > 95 % aus Typ-I-Zellen bestehen, Typ-II- und Typ-III-Zellen selten sind und Nicht-SLGC nahezu fehlen (< 0,1 %). Nach den Behandlungen wurden in den Kulturen der RXRB-, RXRG- und RXRA/RXRG-Knockout-Klone mehr Zellen mit einem schwachen CD133-Signal beobachtet, was auf eine beginnende Anreicherung von Typ-II-Zellen durch die Behandlungen hinweist. Diese Daten stimmen mit einigen früheren Publikationen überein, in denen eine Selektion auf CD133-positive Zellen durch TMZ beschrieben wurde, widersprechen jedoch anderen Publikationen, in denen wiederum eine

präferenzielle Eliminierung von CD133-positiven Zellen durch TMZ beobachtet wurde (Überblick in Beier *et al.*, 2011 und Schonberg *et al.*, 2014). In der Tat ist die Frage, ob TMZ eine positive oder negative Selektion von CD133-positiven Zellen vermittelt, noch immer nicht abschließend geklärt, was auf die adaptive Plastizität der SLGC und die Heterogenität hinsichtlich der Treibermutationen zurückgeführt werden könnte (Gimple *et al.*, 2022).

Eine Veränderung der quantitativen Relation zwischen SLGC und Nicht-SLGC wurde durch keine der Behandlungen erzielt. Allerdings bewirkte die Applikation von 25 μM TMZ in allen Klonen eine drastische, statistisch signifikante Reduktion der Gesamtzellzahl. Diese zytotoxische Wirkung wurde im Fall von zwei Klonen (E5 β , H6C4 $\alpha\gamma$) signifikant durch Bexaroten vermindert, in drei weiteren Klonen (E9 β , D12 γ , H6C9 $\alpha\gamma$) deutete sich dieser Effekt des Rexinoids an. Die alleinige Bexaroten-Behandlung hatte keinen signifikanten Effekt auf die Gesamtzellzahl. Somit deuten diese Analysen, wie bereits die BrdU-ELISA (Kap. 4.2), darauf hin, dass Bexaroten die zytotoxische Wirkung von TMZ schwächen könnte. Wie auch in den Proliferationsanalysen war dieser Effekt zwar gering, jedoch reproduzierbar.

4.4. Bexaroten hat keinen Einfluss auf TMZ-induzierte DNA-Doppelstrangbrüche

Die Zytotoxizität von TMZ wird über eine Methylierung der O6-Position von Guanyl-Resten in der DNA vermittelt, die in DNA-Doppelstrangbrüchen resultiert und letztendlich die Apoptose der Zellen induziert (Schonberg *et al.*, 2014). Aufgrund der fehlenden MGMT-Expression in den Klonen der T1338-1-Zelllinie (Zechel *et al.*, 2024) bleibt eine entsprechende Reparatur der DNA-Schäden aus (Hegi *et al.*, 2005). Der Nachweis von DNA-Läsionen wiederum ist über die Phosphorylierung der Histonvariante H2AX zu γH2AX möglich (Turinetti & Giachino, 2015) und erfolgte auf dieser Grundlage in der vorliegenden Arbeit mittels immunzytochemischer Färbungen. Insgesamt ergaben diese Analysen einen geringen Anteil γH2AX -positiver Zellen in den DMSO-Kontrollen und nach der Behandlung mit 0,1 μM Bexaroten. Für die beiden Klone mit RXRG-Editierung lag dieser bei ca. 5-10 %, für alle übrigen Klone und die B11-*mock*-Kontrolle bei < 5 %. Die Behandlung mit 25 μM TMZ erwies sich für alle Klone als ein effizienter Auslöser für die Phosphorylierung der Histonvariante H2AX und somit für die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen in allen Klonen und der B11-*mock*-Kontrolle. Übereinstimmend für alle Klone und die Kontrolle wurde durch die Ko-Applikation von 0,1 μM Bexaroten der Anteil der γH2AX -positiven Zellen nicht statistisch signifikant verändert. Es kann daher geschlossen werden, dass 0,1 μM Bexaroten in T1338-1-Zellen keinen Einfluss auf die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen durch TMZ ausübt. Somit spiegelt sich der pro-proliferative, möglicherweise Überleben fördernde Effekt, der in den Proliferationsanalysen (Kap. 4.2) bzw. in den Bestimmungen der Gesamtzellzahlen (Kap. 4.3) festgestellt wurde, nicht in der Phosphorylierung der

Histonvariante H2AX wider. Dabei ist allerdings zu beachten, dass die deutlichsten Effekte des Rexinoids auf die Proliferation mit 1 μ M Bexaroten beobachtet wurden, der Einfluss des Rexinoids auf die Gesamtzellzahlen hingegen mit 0,1 μ M Bexaroten ermittelt wurde. Überdies gilt der Nachweis von γ H2AX-positiven Zellen zwar als Indiz für die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen, gibt jedoch keinen Hinweis auf die Effektivität der Aktivierung der *downstream* davon gelegenen Reparatur-Kaskaden (Chang *et al.*, 2017). Da p53 in diesen Kaskaden ein essenzieller Faktor ist (Sancar *et al.*, 2004) und die T1338-1-Zellen homozygot für den p53-Wildtyp sind (Zechel *et al.*, 2024), ist eine effiziente Reparatur der DNA-Läsionen durchaus denkbar.

4.5. Schlussfolgerungen und Limitationen

In der vorliegenden Arbeit konnte für die SLGC-Linie T1338-1 erstmals nachgewiesen werden, dass mittels CRISPR/Cas9 eine bi-allelische Editierung von RXRA und RXRG in derselben Zelle möglich ist. Hinsichtlich der Doppel-Editierung von RXRA und RXRB in den Zellen sind die Ergebnisse weniger eindeutig, da lediglich eine mono-allelische Editierung von RXRB in einem der beiden analysierten Subklone nachgewiesen wurde, die zudem wahrscheinlich nur in einem Teil der Zellen vorliegt. Da jedoch nur zwei Subklone aus diesem Ansatz untersucht wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Doppel-Editierung von RXRA und RXRB möglich ist. In Anbetracht der Tatsache, dass die Doppel-Editierungsansätze zur Isolierung zahlreicher Klone mit bi-allelischer Editierung in RXRA und einer wiederum deutlich geringeren Anzahl an Klonen mit bi-allelischen Editierungen in RXRB oder RXRG führten, ist allerdings zu vermuten, dass eine erfolgreiche Doppel-Editierung von RXRA/RXRB und RXRA/RXRG sowie RXRB/RXRG eher unwahrscheinlich ist. So war der Klon H6, der als Ausgangspunkt für den LDA zur Isolierung von H6C4 und H6C9 diente, auch einer der wenigen Kandidaten für eine mögliche Doppel-Editierung.

Die Behandlungsexperimente zur Bestimmung der Effekte von alleiniger und kombinierter TMZ- und Bexaroten-Behandlung ergaben einen pro-proliferativen Effekt von Bexaroten in Klonen mit einem RXRA-Knockout und der nicht editierten Kontrolle sowie eine geringe, jedoch signifikante Schwächung der zytotoxischen Effekte von TMZ durch das Rexinoid. Dabei konnte die TMZ-induzierte Reduktion der Gesamtzellzahl, nicht aber die Dichte TMZ-induzierter DNA-Läsionen durch Bexaroten vermindert werden. Da die BrdU-ELISA mit demselben biologischen Replikat nur im Duplikat erfolgten, ist die Aussagekraft dieser Daten limitiert. Die Ergebnisse wurden zwar später durch die Experimente der Technischen Assistentin mit einem weiteren biologischen Replikat bestätigt, jedoch ist die Gesamtzahl der Analysen gering. Überdies erfolgten auch die immunzytochemischen Analysen in Form von zwei technischen Replikaten, wobei eine Wiederholung zu einem späteren Zeitpunkt erfolgte. Dennoch ist die Aussagekraft dieser Experimente limitiert, da die Anzahl von technischen Replikaten

von demselben biologischen Replikat gering war und die Analysen an einem anderen biologischen Replikat bei SLGC zu abweichenden Ergebnissen führen können. Dies ist darin begründet, dass das quantitative Verhältnis von Typ-I zu Typ-II- und Typ-III-Zellen zwischen biologischen Replikaten variieren kann. Ein weiterer limitierender Faktor ist das Wachstumsverhalten der Zellen in Form von Sphäroiden und adhärennten Aggregaten. Neben einer begrenzten Adhärenz stellt insbesondere die Größe der Aggregate und Sphäroide ein gravierendes Problem dar, da hierdurch der Zugang von Bexaroten und TMZ zu den Zellen im Zentrum der Aggregate und Sphäroide limitiert ist (Dabrock *et al.*, 2023).

Ein zusätzlich limitierender Aspekt ist der Zeitpunkt der Analyse. So erfolgten die Messungen zu den Effekten auf die Proliferation am Tag d5 (Kap. 2.2.10); dies gilt ebenfalls für die Fixierung der Zellpräparate für die immunzytochemischen Färbungen. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die Behandlung über einen längeren Zeitraum in abweichenden Effekten resultiert. Ferner ist möglich, dass die Untersuchungen von SLGC mit anderen Treibermutationen oder Veränderungen im Epigenom zu abweichenden Ergebnissen führen. Unter Einbezug der Tatsache, dass der Grad an *Stemness* durch die Behandlungen beeinflusst wurde und ein geringer, aber messbar höherer Anteil von Typ-II-Zellen auftrat, die als Zellen im sog. *transit-amplifying Step* (Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009) klassifiziert werden könnten, ist denkbar, dass sich die Responsivität der Zellen durch die beginnende Differenzierung ändert.

Hinsichtlich einer klinischen Anwendung von Bexaroten in der Therapie des humanen *Glioblastoma multiforme* wurden bisher keinerlei Daten publiziert, sodass zum jetzigen Zeitpunkt fernab der Experimente *in vitro* allein *Xenograft*-Modelle (Kap. 4.2) Anhaltspunkte für die Effekte von Bexaroten auf das GBM *in vivo* liefern.

5. Zusammenfassung

Das *Glioblastoma multiforme* (GBM) ist die häufigste maligne Neoplasie des zentralen Nervensystems. Die Standardtherapie, bestehend aus maximal möglicher chirurgischer Resektion und adjuvanter Radiochemotherapie wird seit 15 Jahren nahezu unverändert eingesetzt. Die infauste Prognose ist auf eine insuffiziente Therapieresponsivität sowie eine hohe Rezidivrate zurückzuführen. Gründe hierfür sind das infiltrative Wachstum dieser Tumoren sowie eine hohe intra- und intertumorale Heterogenität. Eine entscheidende Rolle spielen diesbezüglich SLGC (*Stem-like Glioma Cells*), die sich durch ihren stammzellähnlichen Charakter auszeichnen und nach Xenotransplantation im Mausmodell orthotope Tumoren generieren. Ein mögliches Ziel hinsichtlich der Entwicklung neuer Therapien könnte somit die selektive Eliminierung von SLGC oder deren Differenzierung in Tumorzellen mit höherer Therapiesensitivität sein. Einige Mitglieder der Familie der nukleären Rezeptoren, dies sind ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren, greifen in diverse Entwicklungsprozesse, die Homöostase und/oder den Metabolismus ein. Unter diesen sind die Retinoid-X-Rezeptoren (RXR) aufgrund ihrer vielfältigen Heterodimerisierungspartner von besonderem Interesse. Das humane Genom kodiert für drei RXR-Isotypen (RXR α , β und γ), die wiederum in verschiedenen Isoformen vorkommen.

Um die Bedeutung von RXR-Isotypen in SLGC zu untersuchen, waren im Vorfeld der vorliegenden Arbeit mittels CRISPR/Cas9 funktionelle Knockouts in der SLGC-Linie T1338-1 generiert worden. Nachdem zunächst erfolgreich Zellklone mit bi-allelischen Knockouts in einem RXR-Gen hergestellt worden waren, war eine zweite Editierungsrunde erfolgt, um Doppel-Knockouts zu generieren. Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit war es, vier Zellklone, die aus einem *Limiting Dilution Assay* stammten, auf eine mögliche Doppel-Editierung im RXRA/RXRB (Ansatz mit zwei Subklonen) bzw. RXRA/RXR γ (Ansatz mit zwei Subklonen) zu untersuchen. Da die vollständige Editierung im RXRA-Gen bereits belegt war, wurde das Exon 4 des RXRB- bzw. RXR γ -Gens mittels PCR amplifiziert, in den Vektor *pCRTM2.1-TOPOTM* kloniert und sequenziert. Die Sequenzierungsdaten ergaben nur für einen der beiden Klone des RXRA/RXRB-Ansatzes die Anwesenheit einer Mutation, bei gleichzeitiger Anwesenheit von RXRB-Wildtypsequenzen. Somit war von einer mono-allelischen Editierung im RXRB und der möglichen Anwesenheit nicht editierter Zellen in Kulturen des Subklons C5E11 auszugehen. Dagegen wiesen beide Subklone aus dem RXRA/RXR γ -Ansatz (H6C4 und H6C9) multiple Mutationen im RXR γ auf, die zu einer Dysfunktion des ersten Zinkfingers und damit des RXR γ führen sollten. Diese Klone waren somit bi-allelisch im RXRA und RXR γ editiert, die korrespondierenden Kulturen enthielten jedoch mehr als eine vollständig editierte Zellpopulation. Kulturen der Klone wurden immunzytochemisch (ICC) auf die Anwesenheit von RXR α , RXR β und RXR γ untersucht, wobei zwei der RXR-Isotyp-selektiven Antikörper gegen die A/B-Domäne des Rezeptors gerichtet waren, der dritte

vermutlich ebenfalls. Die ICC belegten die Expression aller drei RXR-Isotypen in der editierten SLGC-Linie T1338-1 und legten die Vermutung nahe, dass auch die dysfunktionalen Rezeptoren in den Zellen exprimiert wurden. Überdies schien ein *Shuttling* zwischen dem zytoplasmatischen und dem nukleären Kompartiment in einzelnen Zellen der Kulturen möglich.

Im zweiten Teil der Arbeit erfolgten Untersuchungen zur Proliferation (BrdU-ELISA) der Klone nach Behandlung mit Temozolomid (TMZ), Bexaroten und TMZ/Bexaroten. Die Analysen ergaben, dass Bexaroten die Proliferation der Klone mit RXRA-Knockout und der nicht editierten Kontrolle dosisabhängig steigerte, während dies für die RXRB- und RXRA/RXRG-Knockout-Klone nicht der Fall war. Für alle Klone und die Kontrolle wurde ein anti-proliferativer Effekt von TMZ nachgewiesen. Für die Klone mit einem RXRA-Knockout und die Kontrolle, nicht aber RXRB- oder RXRA/RXRG-Knockout-Klone konnten die anti-proliferativen Effekte von TMZ durch Bexaroten signifikant vermindert werden.

Im dritten Teil der Arbeit wurde mittels ICC die Expression von Sox2 und CD133 in den Klonen untersucht und die Veränderungen der Anteile von SLGC und Nicht-SLGC nach Behandlung mit TMZ, Bexaroten und TMZ/Bexaroten ermittelt. Die ICC zeigten, dass alle Klone unabhängig vom Typ der RXR-Editierung primär Sox2-positive, CD133-negative Zellen enthielten, Sox2-positive, CD133-positive Zellen selten waren und Nicht-SLGC nahezu fehlten. Nach den Behandlungen wurden in den Kulturen der RXRB-, RXRG- und RXRA/RXRG-Knockout-Klone mehr Zellen mit einem schwachen CD133-Signal beobachtet, was auf eine beginnende Anreicherung von Typ-II-Zellen durch die Behandlungen hinwies. Dagegen resultierte keine der Behandlungen in einer Veränderung der quantitativen Relation zwischen SLGC und Nicht-SLGC. Die Applikation von TMZ bewirkte in allen Klonen eine drastische Reduktion der Gesamtzellzahl. Diese zytotoxische Wirkung wurde im Fall von zwei Klonen gering, aber signifikant durch Bexaroten vermindert, in drei weiteren Klonen deutete sich dieser Effekt an. Die alleinige Bexaroten-Behandlung hatte keinen signifikanten Effekt auf die Gesamtzellzahl.

Im vierten Teil der Arbeit wurde mittels ICC die Phosphorylierung der Histonvariante H2AX zu γ H2AX nach Behandlung mit TMZ, Bexaroten und TMZ/Bexaroten untersucht. Diese ICC wiesen einen geringen Anteil γ H2AX-positiver Zellen in den Kontrollen und nach Applikation von Bexaroten auf. Die Behandlung mit TMZ erwies sich für alle Klone als ein effizienter Auslöser für die Phosphorylierung von H2AX und somit für die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen. Durch die Ko-Applikation von Bexaroten und TMZ wurde für keinen der Klone der Anteil der γ H2AX-positiven Zellen signifikant verändert.

Aus den Behandlungen konnte geschlussfolgert werden, dass Bexaroten über RXR β und/oder RXR γ einen pro-proliferativen Effekt ausüben und den zytotoxischen Effekt von TMZ gering, jedoch signifikant vermindern konnte. Dies resultierte nicht in einer Zunahme des Anteils von Nicht-SLGC und hatte keinen signifikanten Effekt auf das Auftreten TMZ-induzierter DNA-Doppelstrangbrüche.

6. Literaturverzeichnis

- Alonso MM, Diez-Valle R, Manterola L, Rubio A, Liu D, Cortes-Santiago N, Urquiza L, Jauregi P, Lopez de Munain A, Sampron N, Aramburu A, Tejada-Solís S, Vicente C, Odero MD, Bandrés E, García-Foncillas J, Idoate MA, Lang FF, Fueyo J, Gomez-Manzano C: *Genetic and epigenetic modifications of Sox2 contribute to the invasive phenotype of malignant gliomas*. PLoS One 6, e26740 (2011)
- Aranda A, Pascual A: *Nuclear hormone receptors and gene expression*. Physiol Rev 81, 1269-1304 (2001)
- Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, Dombrowski Y, McArt DG, Dunne PD, McQuaid S, Gray RT, Murray LJ, Coleman HG, James JA, Salto-Tellez M, Hamilton PW: *QuPath: Open source software for digital pathology image analysis*. Sci Rep 7, 16878 (2017)
- Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN: *Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response*. Nature 444, 756-760 (2006)
- Barsony J, Prüfer K: *Vitamin D receptor and retinoid X receptor interactions in motions*. Vitam Horm 65, 345-376 (2002)
- Beier D, Hau P, Proescholdt M, Lohmeier A, Wischhusen J, Oefner PJ, Aigner L, Brawanski A, Bogdahn U, Beier CP: *CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles*. Cancer Res 67, 4010-4015 (2007)
- Beier D, Röhrl S, Pillai DR, Schwarz S, Kunz-Schughart LA, Leukel P, Proescholdt M, Brawanski A, Bogdahn U, Trampe-Kieslich A, Giebel B, Wischhusen J, Reifenberger G, Hau P, Beier CP: *Temozolomide preferentially depletes cancer stem cells in glioblastoma*. Cancer Res 68, 5706-5715 (2008)
- Beier D, Schulz JB, Beier CP: *Chemoresistance of glioblastoma cancer stem cells--much more complex than expected*. Mol Cancer 10, 128 (2011)
- Bleau A-M, Hambardzumyam D, Ozawa T, Fomchenko EI, Huse JT, Brennan CW, Holland EC: *PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells*. Cell Stem Cell 4, 226-235 (2009)
- Boehm MF, Zhang L, Badea BA, White SK, Mais DE, Berger E, Suto CM, Goldman ME, Heyman RA: *Synthesis and structure-activity relationships of novel retinoid X receptor-selective retinoids*. J Med Chem 37, 2930-2941 (1994)
- Bublak R, Wick W: *Tumortheraiefelder mit längerem Überleben bei Glioblastompatienten assoziiert*. Im Focus Onkologie 19, 26 (2016)
- Burkhard C, Di Patre P-L, Schüler D, Schüler G, Yaşargil MG, Yonekawa Y, Lütolf UM, Kleihues P, Ohgaki H: *A population-based study of the incidence and survival rates in patients with pilocytic astrocytoma*. J Neurosurg 98, 1170-1174 (2003)
- Cairns RA, Harris IS, Mak TW: *Regulation of cancer cell metabolism*. Nat Rev Cancer 11, 85-95 (2011)
- Calderon F, Kim H-Y: *Role of RXR in neurite outgrowth induced by docosahexaenoic acid*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 77, 227-232 (2007)

- Chang HHY, Pannunzio NR, Adachi N, Lieber MR: *Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair*. Nat Rev Mol Cell Biol 18, 495-506 (2017)
- Chen J, Li Y, Yu T-S, McKay RM, Burns DK, Kernie SG, Parada LF: *A restricted cell population propagates glioblastoma growth following chemotherapy*. Nature 488, 522-526 (2012)
- Chen R, Nishimura MC, Bumbaca SM, Kharbanda S, Forrest WF, Kasman IM, Greve JM, Soriano RH, Gilmour LL, Rivers CS, Modrusan Z, Nacu S, Guerrero S, Edgar KA, Wallin JJ, Lamszus K, Westphal M, Heim S, James CD, VandenBerg SR, Costello JF, Moorefield S, Cowdrey CJ, Prados M, Phillips HS: *A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma*. Cancer Cell 17, 362-375 (2010)
- Cheng L, Huang Z, Zhou W, Wu Q, Donnola S, Liu JK, Fang X, Sloan AE, Mao Y, Lathia JD, Min W, McLendon RE, Rich JN, Bao S: *Glioblastoma Stem Cells Generate Vascular Pericytes to Support Vessel Function and Tumor Growth*. Cell 153, 139-152 (2013)
- Choschzick I, Hirseland E, Cramer H, Schultz S, Leppert J, Tronnier V, Zechel C: *Responsiveness of stem-like human glioma cells to all-trans retinoic acid and requirement of retinoic acid receptor isotypes α , β and γ* . Neuroscience 279, 44-64 (2014)
- D'Alessio A, Proietti G, Sica G, Scicchitano BM: *Pathological and Molecular Features of Glioblastoma and Its Peritumoral Tissue*. Cancers (Basel) 11, 469 (2019)
- Dabrock A, Ernesti N, Will F, Rana M, Leinung N, Ehrich P, Tronnier V, Zechel C: *RAR-Dependant and RAR-Independent RXR Signaling in Stem-like Glioma Cells*. Int J Mol Sci 24, 16466 (2023)
- Dawson MI, Xia Z: *The retinoid x receptors and their ligands*. Biochim Biophys Acta 1821, 21-56 (2012)
- De Lera AR, Bourguet W, Altucci L, Gronemeyer H: *Design of selective nuclear receptor modulators: RAR and RXR as a case study*. Nat Rev Drug Discov 6, 811-820 (2007)
- Dheer Y, Chitranshi N, Gupta V, Abbasi M, Mirzaei M, You Y, Chung R, Graham SL, Gupta V: *Bexarotene modulates retinoid-X-receptor expression and is protective against neurotoxic endoplasmic reticulum stress response and apoptotic pathway activation*. Mol Neurobiol 55, 9043-9056 (2018)
- Dirks PB: *Brain tumor stem cells: The cancer stem cell hypothesis writ large*. Mol Oncol 4, 420-430 (2010)
- Esquenazi Y, Lo VP, Lee K: *Critical Care Management of Cerebral Edema in Brain Tumors*. J Intensive Care Med 32, 15-24 (2017)
- Evans RM, Mangelsdorf DJ: *Nuclear Receptors, RXR, and the Big Bang*. Cell 157, 255-266 (2014)
- Galvao J, Davis B, Tilley M, Normando E, Duchon MR, Cordeiro MF: *Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO*. FASEB J 28, 1317-1330 (2014)
- Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS, Wefel JS, Blumenthal DT, Vogelbaum MA, Colman H, Chakravarti A, Pugh S, Won M, Jeraj R, Brown PD, Jaeckle KA, Schiff D, Stieber VW, Brachman DG, Werner-Wasik M, Tremont-Lukats IW, Sulman EP, Aldape KD, Curran WJ Jr, Mehta MP: *A Randomized Trial of Bevacizumab for Newly Diagnosed Glioblastoma*. N Engl J Med 370, 699-708 (2014)
- Gilbertson RJ, Rich JN: *Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche*. Nat Rev Cancer 7, 733-736 (2007)
- Gimple RC, Yang K, Halbert ME, Agnihotri S, Rich JN: *Brain cancer stem cells: resilience through adaptive plasticity and hierarchical heterogeneity*. Nat Rev Cancer 22, 497-514 (2022)

- Green MR, Sambrook J: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 4. Auflage (2012)
- Gronemeyer H, Laudet V: *Transcription factors 3: nuclear receptors*. Protein Profile 2, 1173-1308 (1995)
- Günther HS, Schmidt NO, Phillips HS, Kemming D, Kharbanda S, Soriano R, Modrusan Z, Meissner H, Westphal M, Lamszus K: *Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria*. Oncogene 27, 2897-2909 (2008)
- Hacioglu C, Kar F, Kacar S, Sahinturk V, Kanbak G: *Bexarotene inhibits cell proliferation by inducing oxidative stress, DNA damage and apoptosis via PPAR γ /NF- κ B signaling pathway in C6 glioma cells*. Med Oncol 38, 31 (2021)
- Heddleston JM, Li Z, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN: *The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype*. Cell Cycle 8, 3274-3284 (2009)
- Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, Hamou M-F, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JEC, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R: *MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma*. N Engl J Med 352, 997-1003 (2005)
- Hemminki K, Tretli S, Sundquist J, Johannesen TB, Granström C: *Familial risks in nervous system tumors: a histology-specific analysis from Sweden and Norway*. Lancet Oncol 10, 481-488 (2009)
- Heo J-C, Jung T-H, Lee S, Kim HY, Choi G, Jung M, Jung D, Lee HK, Lee J-O, Park J-H, Hwang D, Seol HJ, Cho H: *Effect of bexarotene on differentiation of glioblastoma multiforme compared with ATRA*. Clin Exp Metastasis 33, 417-429 (2016)
- Herrlinger U, Zentner J, Grosu A-L, Pagenstecher A: *Tumoren*. In: Hufschmidt A, Lücking CH, Rauer S, Glocker FX (Hrsg.): *Neurologie compact*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 7. Auflage, 318-339 (2017)
- Hjelmeland AB, Wu Q, Heddleston JM, Choudhary GS, MacSwords J, Lathia JD, McLendon R, Lindner D, Sloan A, Rich JN: *Acidic stress promotes a glioma stem cell phenotype*. Cell Death Differ 18, 829-840 (2011)
- Huse JT, Holland EC: *Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma*. Nat Rev Cancer 10, 319-331 (2010)
- Islam MS, Leissing TM, Chowdhury R, Hopkinson RJ, Schofield CJ: *2-Oxoglutarate-Dependant Oxygenases*. Annu Rev Biochem 87, 585-620 (2018)
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E: *A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity*. Science 337, 816-821 (2012)
- Karousis ED, Mühlemann O: *Nonsense-Mediated mRNA Decay Begins Where Translation Ends*. Cold Spring Harb Perspect Biol 11, a032862 (2019)
- Kirson ED, Dbalý V, Tovaryš F, Vymazal J, Soustiel JF, Itzhaki A, Mordechovich D, Steinberg-Shapira S, Gurvich Z, Schneiderman R, Wasserman Y, Salzberg M, Ryffel B, Goldsher D, Dekel E, Palti Y: *Alternating electric fields arrest cell proliferation in animal tumor models and human brain tumors*. Proc Natl Acad Sci USA 104, 10152-10157 (2007)
- Klaholz BP, Renaud J, Mitschler A, Zusi C, Chambon P, Gronemeyer H, Moras D: *Conformational adaption of agonists to the human nuclear receptor RAR γ* . Nat Struct Biol 5, 199-202 (1998)

- Krežel W, Rühl R, de Lera AR: *Alternative retinoid X receptor (RXR) ligands*. Mol Cell Endocrinol 491, 110436 (2019)
- Kriegstein A, Alvarez-Buylla A: *The glial nature of embryonic and adult neural stem cells*. Annu Rev Neurosci 32, 149-184 (2009)
- Lah TT, Novak M, Breznik B: *Brain malignancies: Glioblastoma and brain metastases*. Semin Cancer Biol 60, 262-273 (2020)
- Lai A, Kharbanda S, Pope WB, Tran A, Solis OE, Peale F, Forrest WF, Pujara K, Carrillo JA, Pandita A, Ellingson BM, Bowers CW, Soriano RH, Schmidt NO, Mohan S, Yong WH, Seshagiri S, Modrusan Z, Jiang Z, Aldape KD, Mischel PS, Liao LM, Escovedo CJ, Chen W, Nghiemphu PL, James CD, Prados MD, Westphal M, Lamszus K, Cloughesy T, Phillips HS: *Evidence for sequenced molecular evolution of IDH1 mutant glioblastoma from a distinct cell of origin*. J Clin Oncol 29, 4482-4490 (2011)
- Lan X, Jörg DJ, Cavalli FMG, Richards LM, Nguyen LV, Vanner RJ, Guilhamon P, Lee L, Kushida MM, Pellacani D, Park NI, Coutinho FJ, Whetstone H, Selvadurai HJ, Che C, Luu B, Carles A, Moksa M, Rastegar N, Head R, Dolma S, Prinos P, Cusimano MD, Das S, Bernstein M, Arrowsmith CH, Mungall AJ, Moore RA, Ma Y, Gallo M, Lupien M, Pugh TJ, Taylor MD, Hirst M, Eaves CJ, Simons BD, Dirks PB: *Fate mapping of human glioblastoma reveals an invariant stem cell hierarchy*. Nature 549, 227-232 (2017)
- Lathia JD, Heddleston JM, Venere M, Rich JN: *Deadly teamwork: neural cancer stem cells and the tumor microenvironment*. Cell Stem Cell 8, 482-485 (2011)
- Le Maire A, Bourguet W: *Retinoic acid receptors: structural basis for coregulator interaction and exchange*. Subcell Biochem 70, 37-54 (2014)
- Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, Li A, Su Q, Donin NM, Pastorino S, Purow BW, Christopher N, Zhang W, Park JK, Fine HA: *Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines*. Cancer Cell 9, 391-403 (2006)
- Lee MS, Kliewer SA, Provencal J, Wright PE, Evans RM: *Structure of the retinoid X receptor alpha DNA binding domain: a helix required for homodimeric DNA binding*. Science 260, 1117-1121 (1993)
- Lefebvre P, Benomar Y, Staels B: *Retinoid X receptors: common heterodimerization partners with distinct functions*. Trends Endocrinol Metab 21, 676-683 (2010)
- Lobo NA, Shimono YS, Qian D, Clarke MF: *The biology of cancer stem cells*. Annu Rev Cell Dev Biol 23, 675-699 (2007)
- Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW: *The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary*. Acta Neuropathol 131, 803-820 (2016)
- Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, Hawkins C, Ng HK, Pfister SM, Reifenberger G, Soffietti R, von Deimling A, Ellison DW: *The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary*. Neuro Oncol 23, 1231-1251 (2021)
- Lundy P, Domino J, Ryken T, Fouke S, McCracken DJ, Ormond DR, Olson JJ: *The role of imaging for the management of newly diagnosed glioblastoma in adults: a systematic review and evidence-based clinical practice guideline update*. J Neurooncol 150, 95-120 (2020)

- Macoritto M, Nguyen-Yamamoto L, Huang DC, Samuel S, Yang XF, Wang TT, White JH, Kremer R: *Phosphorylation of the human retinoid X receptor α at serine 260 impairs coactivator(s) recruitment and induces hormone resistance to multiple ligands*. J Biol Chem 283, 4943-4956 (2008)
- Malmström A, Grønberg BH, Marosi C, Stupp R, Frappaz D, Schultz H, Abacioglu U, Tavelin B, Lhermitte B, Hegi ME, Rosell J, Henriksson R: *Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial*. Lancet Oncol 13, 916-926 (2012)
- Melin BS, Barnholtz-Sloan JS, Wrensch MR, Johansen C, Il'yasova D, Kinnersley B, Ostrom QT, Labreche K, Chen Y, Armstrong G, Liu Y, Eckel-Passow JE, Decker PA, Labussière M, Idbaih A, Hoang-Xuan K, Di Stefano A-L, Mokhtari K, Delattre J-Y, Broderick P, Galan P, Gousias K, Schramm J, Schoemaker MJ, Fleming SJ, Herms S, Heilmann S, Nöthen MM, Wichmann H-E, Schreiber S, Swerdlow A, Lathrop M, Simon M, Sanson M, Andersson U, Rajaraman P, Chanock S, Linet M, Wang Z, Yeager M, GliomaScan Consortium, Wiencke JK, Hansen H, McCoy L, Rice T, Kosel ML, Sicotte H, Amos CI, Bernstein JL, Davis F, Lachance D, Lau C, Merrell RT, Schildkraut J, Ali-Osman F, Sadetzki S, Scheurer M, Shete S, Lai RK, Claus EB, Olson SH, Jenkins RB, Houlston RS, Bondy ML: *Genome-wide association study of glioma subtypes identifies specific differences in genetic susceptibility to glioblastoma and non-glioblastoma tumors*. Nat Genet 49, 789-794 (2017)
- Nakada M, Kita D, Watanabe T, Hayashi Y, Teng L, Pyko IV, Hamada J-I: *Aberrant signaling pathways in glioma*. Cancers (Basel) 3, 3242-3278 (2011)
- Natrajan MS, de la Fuente AG, Crawford AH, Linehan E, Nuñez V, Johnson KR, Wu T, Fitzgerald DC, Ricote M, Bielekova B, Franklin RJM: *Retinoid X receptor activation reverses age-related deficiencies in myelin debris phagocytosis and remyelination*. Brain 138, 3581-3597 (2015)
- Newlands ES, Stevens MF, Wedge SR, Wheelhouse RT, Brock C: *Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials*. Cancer Treat Rev 23, 35-61 (1997)
- Ohgaki H, Kleihues P: *The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma*. Clin Cancer Res 19, 764-772 (2013)
- Orlov I, Rochel N, Moras D, Klaholz BP: *Structure of the full human RXR/VDR nuclear receptor heterodimer complex with its DR3 target DNA*. EMBO J 31, 291-300 (2012)
- Ostrom QT, Patil N, Cioffi G, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS: *CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2013-2017*. Neuro Oncol 22, iv1-iv96 (2020)
- Petkovich M, Chambon P: *Retinoic acid receptors at 35 years*. J Mol Endocrinol 69, T13-T24 (2022)
- Raju ENS, Kuechler J, Behling S, Sridhar S, Hirseland E, Tronnier V, Zechel C: *Maintenance of Stemlike Glioma Cells and Microglia in an Organotypic Glioma Slice Model*. Neurosurgery 77, 629-643 (2015)
- Rastinejad F, Wagner T, Zhao Q, Khorasanizadeh S: *Structure of the RXR-RAR DNA-binding complex on the retinoic acid response element DR1*. EMBO J 19, 1045-1054 (2000)
- Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, Todaro M, Invernici G, Cenci T, Maira G, Parati EA, Stassi G, Larocca LM, De Maria R: *Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells*. Nature 468, 824-828 (2010)
- Rochette-Egly C: *Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation*. Cell Signal 15, 355-366 (2003)

- Rosen JM, Jordan CT: *The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm*. Science 324, 1670-1673 (2009)
- Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kaçmaz K, Linn S: *Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints*. Annu Rev Biochem 73, 39-85 (2004)
- Schonberg DL, Lubelski D, Miller TE, Rich JN: *Brain tumor stem cells: Molecular characteristics and their impact on therapy*. Mol Aspects Med 39, 82-101 (2014)
- Sever R, Glass CK: *Signaling by nuclear receptors*. Cold Spring Harb Perspect Biol 5, a016709 (2013)
- Seystahl K, Wick W, Weller M: *Therapeutic options in recurrent glioblastoma--An update*. Crit Rev Oncol Hematol 99, 389-408 (2016)
- Sharma S, Shen T, Chitranshi N, Gupta V, Basavarajappa D, Sarkar S, Mirzaei M, You Y, Krezel W, Graham SL, Gupta V: *Retinoid X Receptor: Cellular and Biochemical Roles of Nuclear Receptor with a Focus on Neuropathological Involvement*. Mol Neurobiol 59, 2027-2050 (2022)
- Spathis AD, Asvos X, Ziavra D, Karampelas T, Topouzis S, Cournia Z, Qing X, Alexakos P, Smits LM, Dalla C, Rideout HJ, Schwamborn JC, Tamvakopoulos C, Fokas D, Vassilatis DK: *Nurr1:RXR α heterodimer activation as monotherapy for Parkinson's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A 114, 3999-4004 (2017)
- Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht CJ, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross JG, Mirimanoff R-O: *Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial*. Lancet Oncol 10, 459-466 (2009)
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO: *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. N Engl J Med 352, 987-996 (2005)
- Stupp R, Taillibert S, Kanner A, Read W, Steinberg D, Lhermitte B, Toms S, Idubai A, Ahluwalia MS, Fink K, Di Meco F, Lieberman F, Zhu J-J, Stragliotto G, Tran D, Brem S, Hottinger A, Kirson ED, Lavy-Shahaf G, Weinberg U, Kim C-Y, Paek S-H, Nicholas G, Bruna J, Hirte H, Weller M, Palti Y, Hegi ME, Ram Z: *Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma*. A Randomized Clinical Trial. JAMA 318, 2306-2316 (2017)
- Tanaka T, De Luca LM: *Therapeutic potential of "rexinoids" in cancer prevention and treatment*. Can Res 69, 4945-4947 (2009)
- Turinetto V, Giachino C: *Multiple facets of histone variant H2AX: A DNA double-strand-break marker with several biological functions*. Nucleic Acids Res 43, 2489-2498 (2015)
- Van Meir EG, Hadjipanayis CG, Norden AD, Shu H-K, Wen PY, Olson JJ: *Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma*. CA Cancer J Clin 60, 166-193 (2010)
- Wang W, Nakashima K-I, Hirai T, Inoue M: *Neuroprotective effect of naturally occurring RXR agonists isolated from Sophora tonkinensis Gagnep. on amyloid- β -induced cytotoxicity in PC12 cells*. Journal of Natural Medicines 73, 154-162 (2019)

- Ward RJ, Dirks PB: *Cancer stem cells: at the headwaters of tumor development*. *Annu Rev Pathol* 2, 175-189 (2007)
- Weikum ER, Liu X, Ortlund EA: *The nuclear receptor superfamily: A structural perspective*. *Protein Sci* 27, 1876-1892 (2018)
- Wen PY, Weller M, Lee EQ, Alexander BM, Barnholtz-Sloan JS, Barthel FP, Batchelor TT, Bindra RS, Chang SM, Chiocca EA, Cloughesy TF, DeGroot JF, Galanis E, Gilbert MR, Hegi ME, Horbinski C, Huang RY, Lassman AB, Le Rhun E, Lim M, Mehta MP, Mellinghoff IK, Minniti G, Nathanson D, Platten M, Preusser M, Roth P, Sanson M, Schiff D, Short SC, Taphoorn MJB, Tonn J-C, Tsang J, Verhaak RGW, von Deimling A, Wick W, Zadeh G, Reardon DA, Aldape KD, van den Bent MJ: *Glioblastoma in adults: a Society for Neuro-Oncology (SNO) and European Society of Neuro-Oncology (EANO) consensus review on current management and future directions*. *Neuro Oncol* 22, 1073-1113 (2020)
- Wick W, Platten M, Meisner C, Felsberg J, Tabatabai G, Simon M, Nikkhah G, Papsdorf K, Steinbach JP, Sabel M, Combs SE, Vesper J, Braun C, Meixensberger J, Ketter R, Mayer-Steinacker R, Reifenberger G, Weller M: *Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial*. *Lancet Oncol* 13, 707-715 (2012)
- Wick W, Weller M, van den Bent M, Sanson M, Weiler M, von Deimling A, Plass C, Hegi M, Platten M, Reifenberger G: *MGMT testing--the challenges for biomarker-based glioma treatment*. *Nat Rev Neurol* 10, 372-385 (2014)
- Wojtowicz JM, Kee N: *Brdu assay for neurogenesis in rodents*. *Nature Protocols* 1, 1399-1405 (2006)
- Xu EH, Lambert MH: *Structural insights into regulation of nuclear receptors by ligands*. *Nucl Recept Signal* 1, e004 (2003)
- Yang Z, Wang KKW: *Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker*. *Trends Neurosci* 38, 364-374 (2015)
- Yuan X, Curtin J, Xiong Y, Liu G, Waschsmann-Hogiu S, Farkas DL, Black KL, Yu JS: *Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme*. *Oncogene* 23, 9392-9400 (2004)
- Zechel C, Loy M, Wegner C, Dahlke E, Soetje B, Baehr L, Leppert J, Ostermaier JJ, Lueg T, Nielsen J, Elßner J, Willeke V, Marzahl S, Tronnier V, Madany Mamlouk A: *Molecular signature of stem-like glioma cells (SLGCs) from human glioblastoma and gliosarcoma*. *PLoS One* 19, e0291368 (2024)
- Zhang Z, Burch PE, Cooney AJ, Lanz RB, Pereira FA, Wu J, Gibbs RA, Weinstock G, Wheeler DA: *Genomic analysis of the nuclear receptor family: new insights into structure, regulation, and evolution from the rat genome*. *Genome Res* 14, 580-590 (2004)
- Zhao Q, Chasse SA, Devarakonda S, Sierk ML, Ahvazi B, Rastinejad F: *Structural basis of RXR-DNA interactions*. *J Mol Biol* 296, 509-520 (2000)

7. Anhang

7.1. Ergänzende Abbildungen

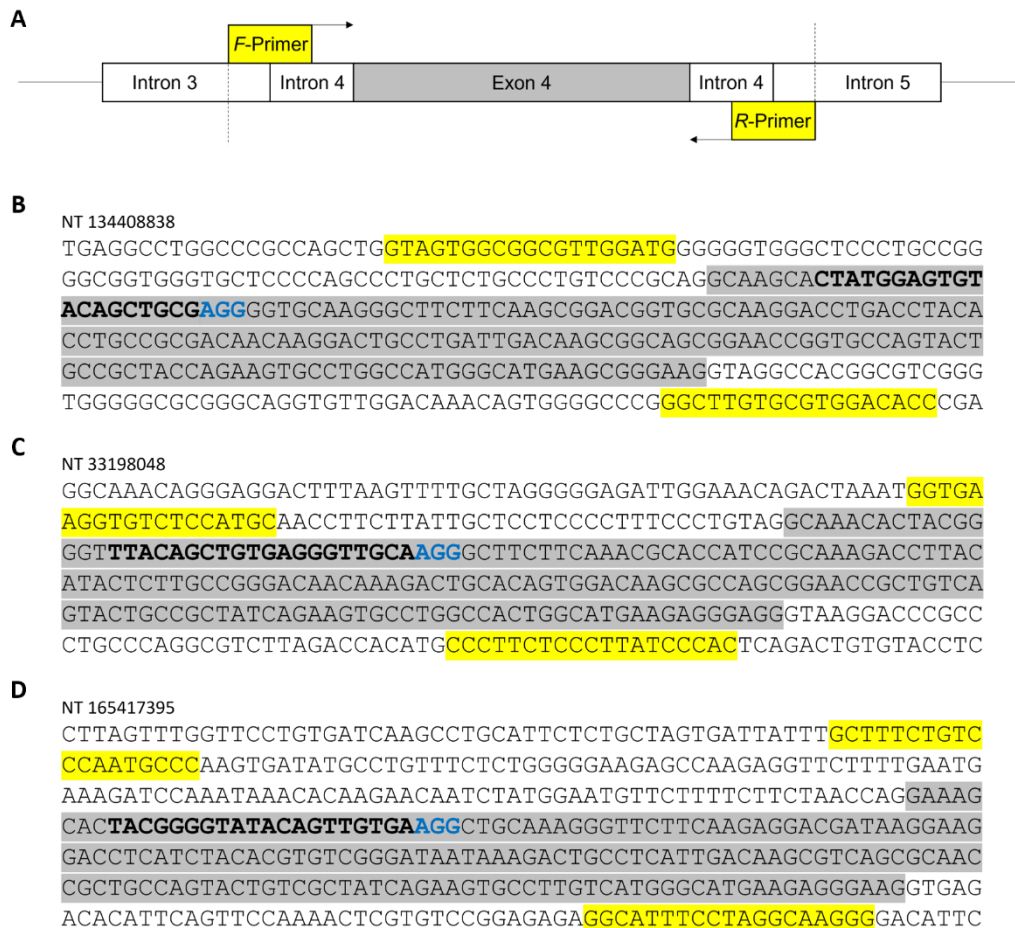


Abb. 26: Exon 4 des humanen RXR-Gens und flankierende Intronsequenzen. (A) Schematische Darstellung des für die DBD (DNA-bindende Domäne) des RXR kodierenden Exons und Position des F(*Forward*)- sowie des R(*Reverse*)-Primers, die für die Amplifikation der Exon-4-Sequenz eingesetzt wurden. **(B, C, D)** Nukleotidsequenzen des Exons 4 des humanen RXRA- **(B)**, RXRB- **(C)** und RXRG-Gens **(D)** und flankierende Intronsequenzen. Die beiden *Primer*-Bindestellen sind gelb, das Exon 4 ist grau markiert. Die für die CRISPR/Cas9-vermittelte Editierung relevante PAM(*Protospacer-adjacent Motif*)-Sequenz ist in blau und Fettdruck hervorgehoben, die Bindestelle der sgRNA (*Single-Guide-Ribonukleinsäure*) ist fett gedruckt.

A	NT 134408940
Human RXR α WT	GCAAGCACTATGGAGTGTACAGCT-GCGAGGGGTGCAAGGG
C5	GCAAGCACTATGGAGTGTACAGCT <u>T</u> GCGAGGGGTGCAAGGG
H6	GCAAGCACTATGGAGTGTACAGCT <u>T</u> GCGAGGGGTGCAAGGG
B	AS 135
Human RXR α WT	CAICGDRSSGKHYGVYSCEGCKGFFKRTVRKDLTYT CRDNKD CLIDKQRNRCQYCRYQKCLAMGM
C5	CAICGDRSSGKHYGVYS <u>LRGVQGLLQADGAQGPLHLPRQQGLPD*</u>
H6	CAICGDRSSGKHYGVYS <u>LRGVQGLLQADGAQGPLHLPRQQGLPD*</u>

Abb. 27: Editierung von RXR α in den Klonen C5 und H6. (A) Nukleotidsequenz des RXRA-Gens (Exon 4) und Vergleich mit den Insertionen sequenzierter Plasmide. Die sgRNA-bindende Region ist fett gedruckt, die PAM-Sequenz ist in blau angegeben. Abweichungen von der Wildtypsequenz (WT) sind rot dargestellt und unterstrichen; „-“ symbolisiert einen „Platzhalter“ im WT. **(B)** Aminosäuresequenz (Einbuchstabencode) der RXR α -DBD im Vergleich mit den abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Plasmid-Insertionen. Die Sequenzen der beiden Zinkfinger sind grau markiert, die vier das Zink-Ion komplexierenden Cysteinyl-Reste sind jeweils in grün dargestellt und fett gedruckt. Die Bereiche der P-Box (CEGCKG) und D-Box (CRDNKD) sind ebenfalls fett gedruckt. Abweichungen von der Wildtypsequenz sind rot eingefärbt und unterstrichen; die Anwesenheit eines prämaternen Stopp-Codons wird durch * symbolisiert. (Zusammenstellung nach: Dabrock *et al.*, 2023)

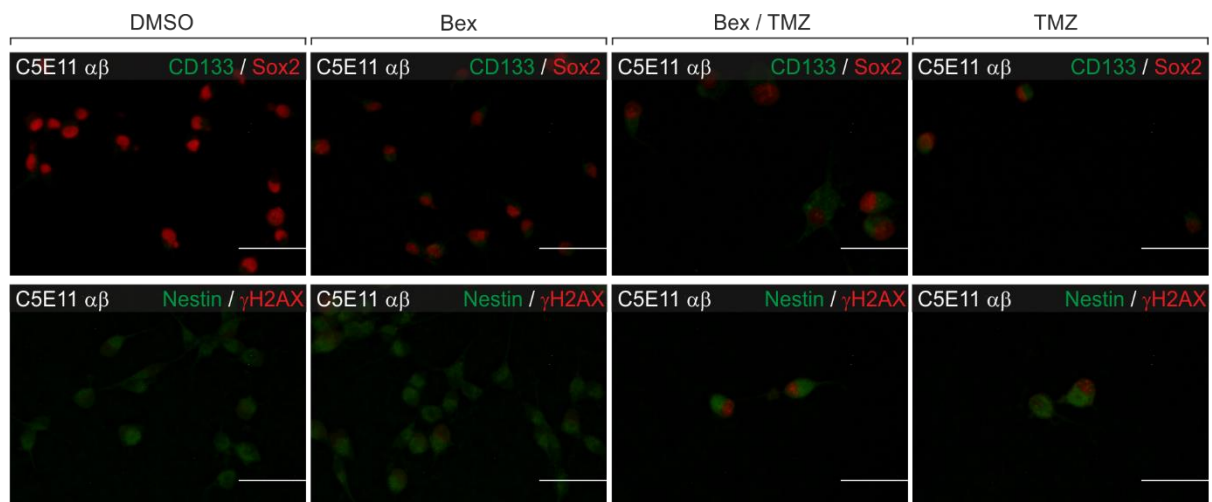


Abb. 28: Effekte der Behandlungen auf den Klon C5E11 $\alpha\beta$. Immunzytochemische Analyse. **Obere Reihe:** Stammzellcharakter nach Behandlung mit Bexaroten in An- und Abwesenheit von TMZ. Die zur Färbung verwendeten Antikörper richteten sich gegen CD133 (grün) und Sox2 (rot). **Untere Reihe:** Induktion der Phosphorylierung der Histonvariante H2AX (γ H2AX) durch TMZ und Modulation durch Bexaroten. Die zur Färbung verwendeten Antikörper richteten sich gegen γ H2AX (rot) und Nestin (grün). Es erfolgte stets eine Gegenfärbung des Zellkerns mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol); um das nukleäre Sox2- bzw. γ H2AX-Signal nicht zu schwächen, wurde dieser Kanal in den Bildern ausgeblendet. Bex: 0,1 μ M Bexaroten; TMZ: 25 μ M Temozolomid. Die Kontroll-Behandlung erfolgte mit DMSO (Dimethylsulfoxid). Balken: 50 μ m. CD133: Cluster of Differentiation 133; Sox2: SRY(Sex-determining Region Y)-Box 2.

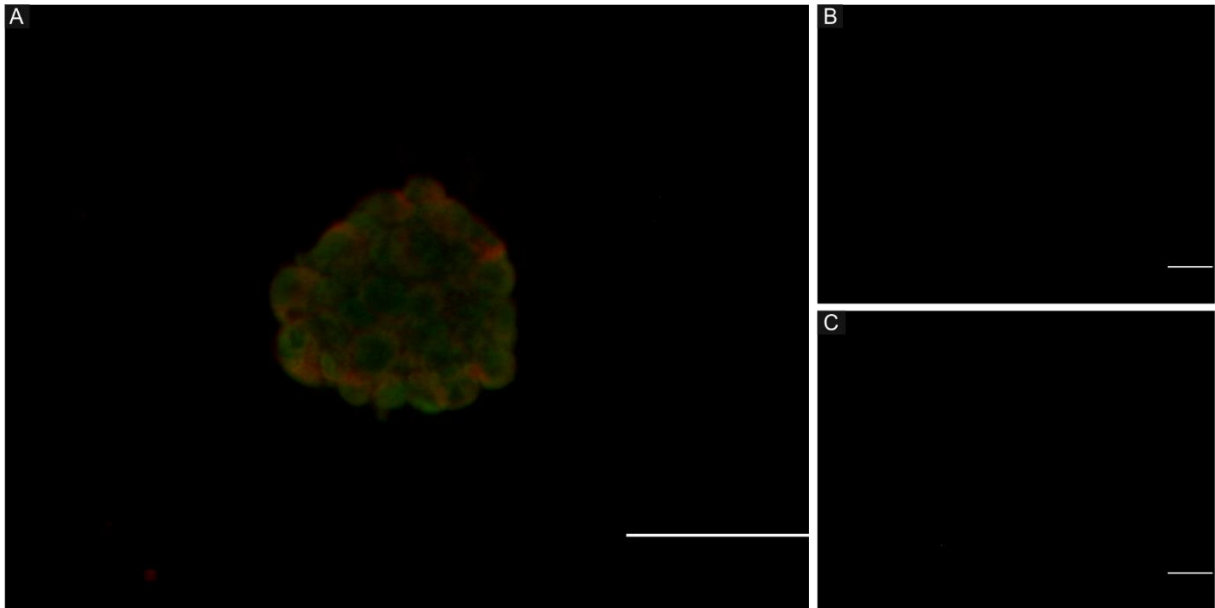


Abb. 29: Kontrollfärbung für die gegen RXR α (grün) und GFAP (rot) gerichteten Antikörper. Immunzytochemische Analyse. **(A)** Färbung mit primären und sekundären Antikörpern (Kap. 2.2.9). Die Gegenfärbung des Zellkerns mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) wurde in den Mikrophotographien ausgeblendet, da diese die ohnedies schwachen RXR α -Signale überdeckte. **(B)** Färbung ausschließlich mit primären Antikörpern (Tab. 7). **(C)** Färbung ausschließlich mit sekundären Antikörpern (Tab. 8). Balken: 50 μ m. GFAP: Saures Gliafaserprotein.

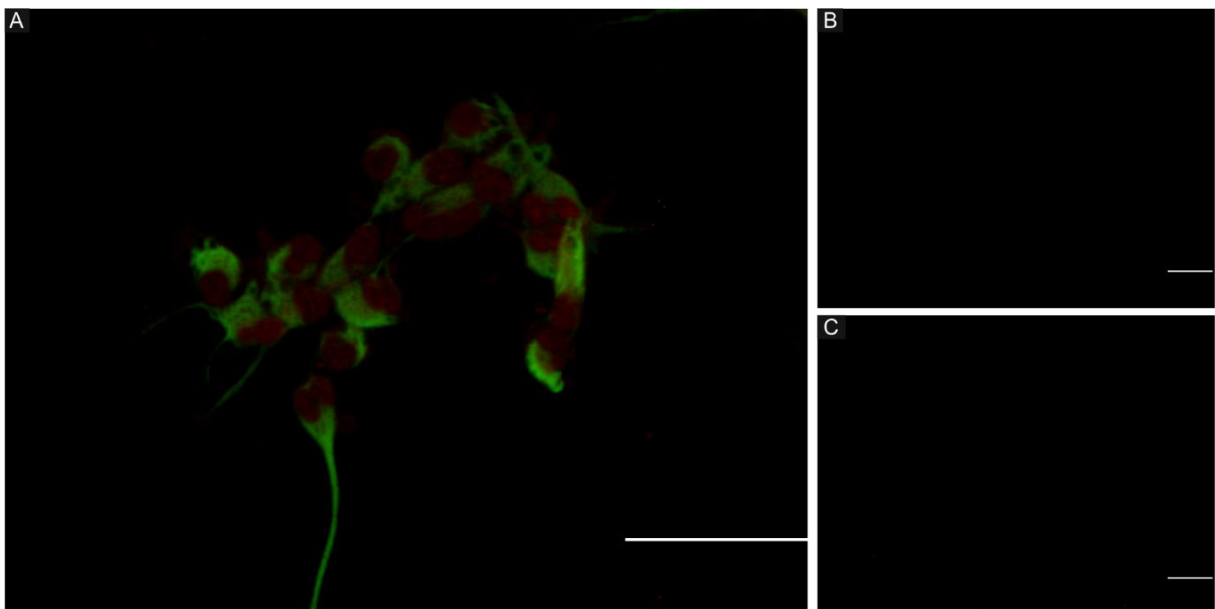


Abb. 30: Kontrollfärbung für die gegen RXR β (rot) und Nestin (grün) gerichteten Antikörper. Immunzytochemische Analyse. **(A)** Färbung mit primären und sekundären Antikörpern (Kap. 2.2.9). Die Gegenfärbung des Zellkerns mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) wurde in den Mikrophotographien ausgeblendet, da diese die ohnedies schwachen RXR β -Signale überdeckte. **(B)** Färbung ausschließlich mit primären Antikörpern (Tab. 7). **(C)** Färbung ausschließlich mit sekundären Antikörpern (Tab. 8). Balken: 50 μ m.

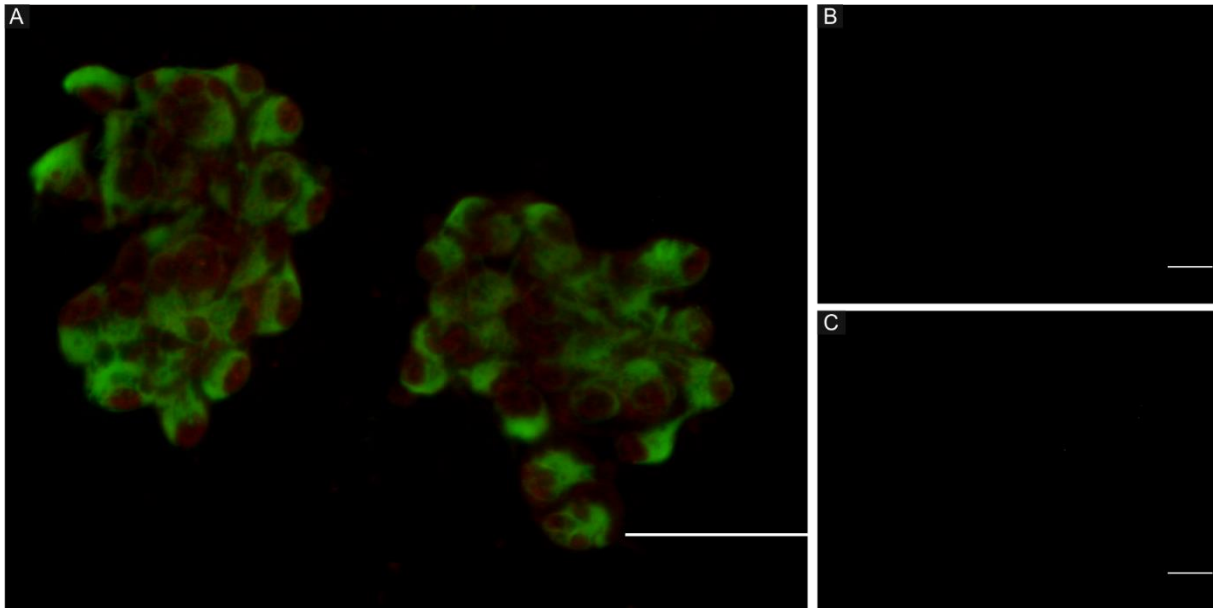


Abb. 31: Kontrollfärbung für die gegen RXR γ (rot) und Nestin (grün) gerichteten Antikörper. Immunzytochemische Analyse. **(A)** Färbung mit primären und sekundären Antikörpern (Kap. 2.2.9). Die Gegenfärbung des Zellkerns mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) wurde in den Mikrophotographien ausgeblendet, da diese die ohnedies schwachen RXR γ -Signale überdeckte. **(B)** Färbung ausschließlich mit primären Antikörpern (Tab. 7). **(C)** Färbung ausschließlich mit sekundären Antikörpern (Tab. 8). Balken: 50 μ m.

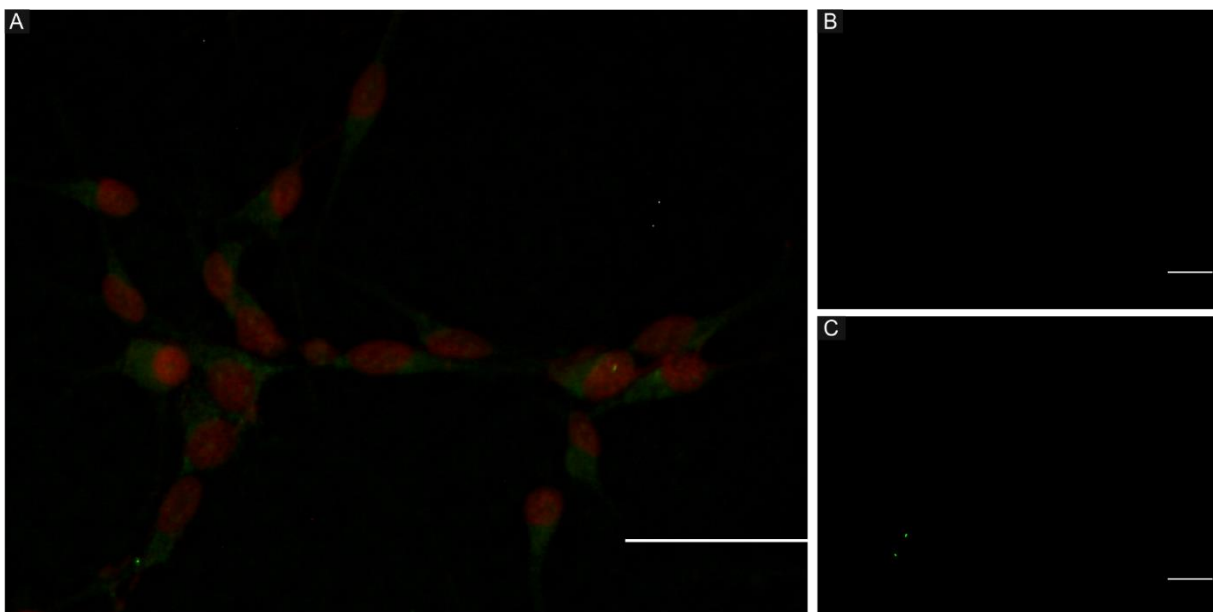


Abb. 32: Kontrollfärbung für die gegen CD133 (grün) und Sox2 (rot) gerichteten Antikörper. Immunzytochemische Analyse. **(A)** Färbung mit primären und sekundären Antikörpern (Kap. 2.2.9). Die Gegenfärbung des Zellkerns mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) wurde in den Mikrophotographien ausgeblendet, um das nukleäre Sox2-Signal nicht zu schwächen. **(B)** Färbung ausschließlich mit primären Antikörpern (Tab. 7). **(C)** Färbung ausschließlich mit sekundären Antikörpern (Tab. 8). Balken: 50 μ m. CD133: *Cluster of Differentiation 133*; Sox2: *SRY(Sex-determining Region Y)-Box 2*.

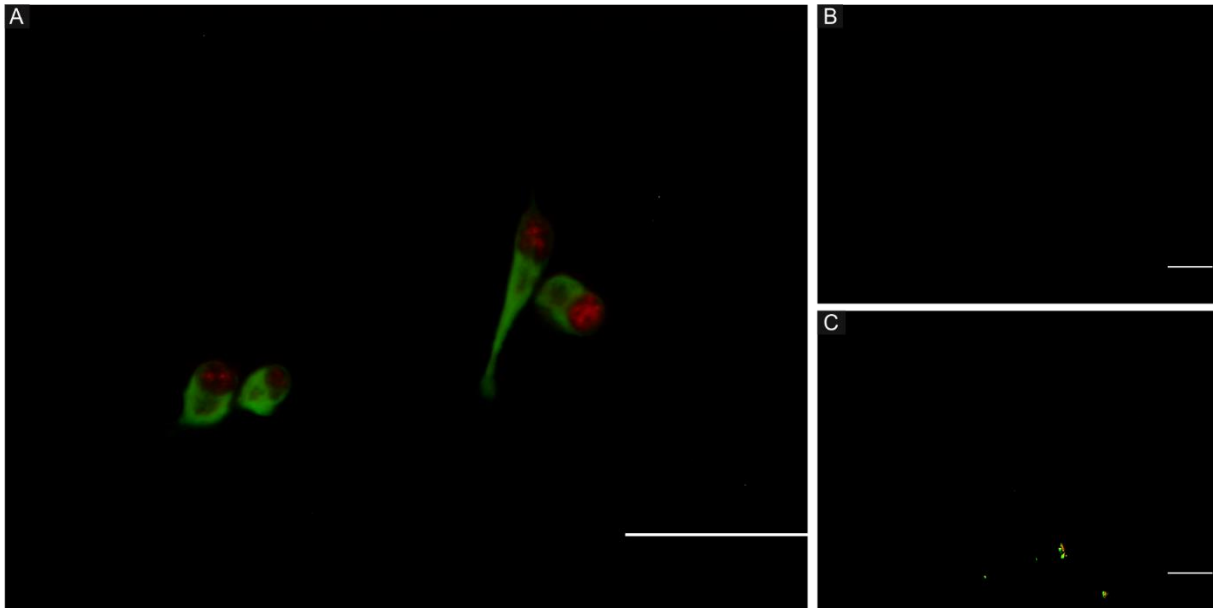


Abb. 33: Kontrollfärbung für die gegen γ H2AX (rot) und Nestin (grün) gerichteten Antikörper. Immunzytochemische Analyse. **(A)** Färbung mit primären und sekundären Antikörpern (Kap. 2.2.9). Die Gegenfärbung des Zellkerns mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) wurde in den Mikrophotographien ausgeblendet, um das nukleäre γ H2AX-Signal nicht zu schwächen. **(B)** Färbung ausschließlich mit primären Antikörpern (Tab. 7). **(C)** Färbung ausschließlich mit sekundären Antikörpern (Tab. 8). Balken: 50 μ m. γ H2AX: phosphorylierte Histonvariante H2AX.

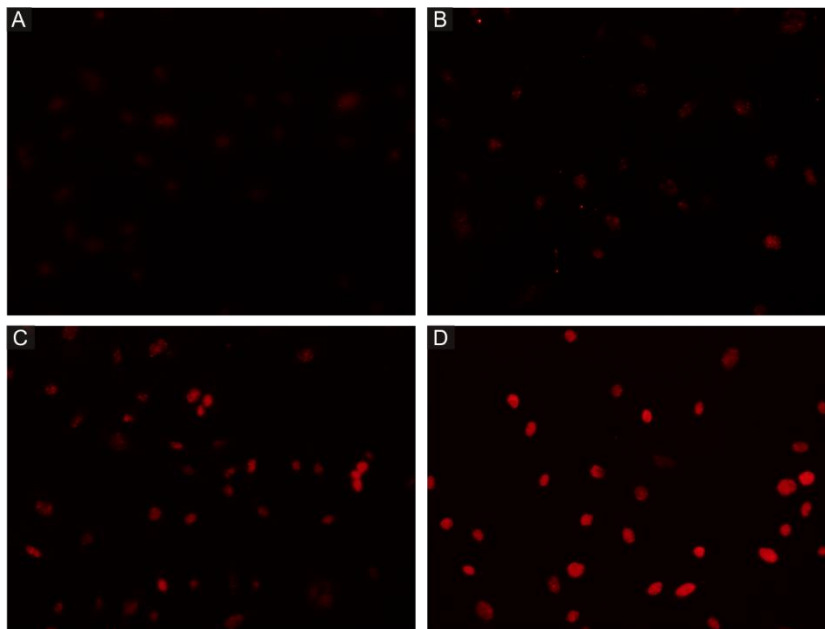


Abb. 34: Referenzaufnahmen zur Klassifizierung der γ H2AX-Signale (rot). Immunzytochemische Analyse. **(A)** Hintergrundsignale. **(B)** Schwache Signale. **(C)** Überwiegend intermediäre Signale. **(D)** > 90 % starke Signale. Aus Gründen der Darstellung wurden der grüne (Nestin) und der blaue (DAPI) Kanal ausgeblendet. DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol; γ H2AX: phosphorylierte Histonvariante H2AX. (zur Verfügung gestellt von PD Dr. rer. nat. C. Zechel, modifiziert)

7.2. Ethikantrag



Universität zu Lübeck

Medizinische Fakultät - Der Vorsitzende der Ethikkommission

Dekanat der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160, D-23538 Lübeck

Frau
Dr. med. Zechel
Klinik für Neurochirurgie

Bearbeiter: Frau Erdmann
Telefon: (0451) 500-4639
Fax: (0451) 500-3026
email:
janine.erdmann@medizin.uni-luebeck.de

im Hause

Datum: 27.06.2008

nachrichtlich:
Herrn Prof. Tronnier
Direktor der Klinik für Neurochirurgie

Aktenzeichen: **08-070**
(Immer angeben!)

Ihr Antrag an die Ethik-Kommission 20. Mai 2008 – Ihr Schreiben vom 20. Juni 2008

Antragsteller: Frau Dr. Zechel / Herr Prof. Tronnier

Titel: Zell- und molekularbiologische Untersuchungen an Hirntumoren und davon abgeleiteten Zellkulturen

Sehr geehrte Frau Dr. Zechel,

der Antrag wurde unter berufsethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und berufsrechtlichen Gesichtspunkten geprüft.


Die Kommission hat keine Bedenken mehr.

Bei Änderung des Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden. Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, muß die Kommission umgehend benachrichtigt werden.

Nach Abschluß des Projektes bitte ich um Übersendung eines knappen Schlussberichtes (unter Angabe unseres Aktenzeichens), aus dem der Erfolg/Misserfolg der Studie sowie Angaben darüber, ob die Studie abgebrochen oder geändert bzw. ob Regressansprüche geltend gemacht wurden, ersichtlich sind.

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Studie und der an der Studie teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß und besten Wünschen
für den weiteren Verlauf Ihrer Forschung bin ich

Ihr

Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe
Vorsitzender

anwesende Kommissionsmitglieder:

Prof. Dr. Dr. H.-H. Raspe
(Sozialmedizin, Vorsitzender der EK)
Prof. Dr. Schweiger
(Psychiatrie)
Prof. Dr. Dendorfer
(Pharmakologie)
Frau Prof. E. Stubbe
(Theologie)
Prof. Dr. Borck
(Medizin- und Wissenschaftsgeschichte)

Frau H. Müller
(Pflege)
Prof. Wessel
(Kinderchirurgie, Stellv. Vorsitzender der EK)
Herr Dr. Fieber
(Richter am Landgericht Ahrensburg)
Prof. Schwinger
(Humangenetik)

Herr Prof. Dr. Klein
(Medizinische Klinik I)
Frau Prof. Dr. M. Schrader
(Plastische Chirurgie)
Herr Dr. Schultz
(Pädiatrie)
Herr D. Stojan
(Präsident des Amtsgerichtes Lübeck)



Im Fokus des Lebens
Universität zu Lübeck

Medizinische Fakultät

Ethik-Kommission

Vorsitzender:

Herr Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe

Stellv. Vorsitzende

Frau Prof. Dr. med. M. Schrader

Universität zu Lübeck

Ratzeburger Allee 160

23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Frau Janine Erdmann

Tel.: +49 451 500 4639

Fax: +49 451 500 3026

janine.erdmann@medizin.uni-luebeck.de

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Frau

PD Dr. C. Zechel

Klinik für Neurochirurgie

im Hause

Aktenzeichen: 08-070

Datum 18.03.2009

Zell- und molekularbiologische Untersuchungen an Hirntumoren und davon abgeleiteten Zellkulturen

Hier: Optimierte Aufklärung – Ihr Schreiben vom 12.03.2009

Sehr geehrte Frau Dr. Zechel,

die optimierte Aufklärung habe ich zustimmend zur Kenntnis genommen.

Es bedarf keiner weiteren Begutachtung durch die Kommission.

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Prüfung und der an der Prüfung teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß und besten Wünschen
für den weiteren Verlauf Ihrer Forschung bin ich

Ihr

Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe
Vorsitzender

8. Danksagungen

Zunächst gilt mein Dank Frau PD Dr. rer. nat. Christina Zechel (Leitung der Experimentellen Neuroonkologie) für die Bereitstellung der interessanten und herausfordernden Thematik. Insbesondere möchte ich mich bei Ihnen herzlich für die engmaschige und umfassende Betreuung bei der Einarbeitung in die Methoden und dem Umgang mit den Ergebnissen bedanken. Zudem bin ich Ihnen für die kontinuierlichen, eingehenden Rückmeldungen bei der Anfertigung der schriftlichen Arbeit sehr dankbar.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Jens Mittag (Direktor des Instituts für Endokrinologie und Diabetes) möchte ich in seiner Funktion als Ko-Betreuer der vorliegenden Arbeit für die konstruktive Kritik und die anregenden Diskussionen danken.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Volker Tronnier (ehem. Direktor der Klinik für Neurochirurgie) für die Bereitstellung des Tumormaterials und die Unterstützung des Labors der Experimentellen Neuroonkologie.

Ferner danke ich der AG Hiort/Werner (Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie und Diabetes) für die Bereitstellung des *Applied Biosystems 3130 Genetic Analyser* zur Sequenzierung der Proben.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Frau Univ.-Prof. Dr. rer. biol. hum. Inke R. König (Leitung des Instituts für Medizinische Biometrie und Statistik) für die ausführliche biometrische Beratung bedanken.

Für die Unterstützung im Labor, den konstruktiven Austausch und das angenehme Arbeitsklima bedanke ich mich bei Frau Edith Pawlak (Technische Assistentin) sowie allen weiteren Mitgliedern der AG Zechel.

Abschließend gilt mein Dank meiner Familie, meiner Partnerin und meinen Freunden. Bei Euch möchte ich mich herzlichst für die unerschütterliche Unterstützung über die Jahre des Studiums und die Zeit der Forschung bedanken.