Aus der Klinik für Neurochirurgie
der Universität zu Lübeck
Direktorin: Prof. Dr. med. Naureen Keric

Effekte der Editierung von Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPARs) auf die Responsivität von humanen Gliomstammzellen gegenüber der Behandlung mit Temozolomid und/oder Fenofibrat

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
Henry Mielke
aus Itzehoe

Lübeck 2025

1. Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Christina Zechel

Ko-Betreuer: Prof Dr. med. Markus Schwaninger

2. Berichterstatter: PD Dr. med. Frank Noack

Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2025

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 22.10.2025

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Zusammenfassung

Das Glioblastoma Multiforme (GBM) ist der häufigste primäre Hirntumor mit medianem Überleben von 15 Monaten. Zum Therapieversagen tragen stammzellähnliche Tumorzellen (*stem like glioma cells*; SLGCs) mit vielfältigen Resistenzmechanismen bei. GBM-Zellen zeigen metabolische Veränderungen: verstärkte Glykolyse, reduzierte OXPHOS-Aktivität, vermehrte Fettsäuresynthese. Die Peroxisome-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR) regulieren diese Stoffwechselwege und bieten daher ein potenzielles therapeutisches Ziel.
Die AG Zechel strebte in Vorarbeiten die Inaktivierung von PPAR-Genen mittels CRISPR/Cas9 an. In dieser Arbeit wurden vier Zellklone auf PPARA- und PPARG-Editierungen untersucht. Während alle PPARA-Klone Wildtyp-Sequenzen aufwiesen, zeigten zwei PPARG-Klone biallelisch verschiedene Deletionen. Die Mutationen trunkieren den Rezeptor in der DBD. Die Knockout-Klone wurden zusammen mit Klonen aus früheren Arbeiten für Behandlungsexperimente verwendet. BrdU-Elisa zeigten eine signifikante Proliferationshemmung durch Fenofibrat in Klonen und Mutterkulturen (T1440 & T1495). In Kombination mit TMZ ergab sich eine überwiegend additive Proliferationshemmung. Ein Zusammenhang mit dem Editierungstyp war nicht erkennbar. Western Blots zeigten hohe PPARα-Expression in Klonen und Mutterkulturen. Die TMZ-Sensitivität der MGMT-positiven T1495-Klone korrelierte mit der MGMT-Expression. Zusätzlich wurde immunzytochemisch der Einfluss von Fenofibrat und TMZ auf Zellzahl, Stammzellmarker (Sox-2) und DNA-Schäden (γH2AX) untersucht. Beide Substanzen reduzierten die Gesamtzellzahl. Der Sox2-Anteil sank nach Fenofibratbehandlung in den Klonen, stärker als nach TMZ-Gabe; synergistische Effekte fehlten. Die Wirkung auf γH2AX positive Zellen variierte, mit kooperativen und antagonistischen Wirkungen. Zur SLGC-Markierung für ein ex vivo GBM-Modell wurden ein T1464-PPARG-Klon und die T1464-Mutterkultur stabil mit einem eGFP-kodierenden lentiviralen Vektor transfiziert. Die eGFP-Expression blieb heterogen.
Die Ergebnisse zeigen ein therapeutisches Potenzial von Fenofibrat für die GBM-Therapie, jedoch auch mögliche antagonistische Effekte von Fenofibrat und TMZ. Künftige Untersuchungen sollten unterschiedliche PPAR-Subtypen, weitere SLGC-Linien mit definiertem Mutationsstatus und standardisierte *stemness*-Niveaus einbeziehen, um den Einfluss metabolischer Modulation auf Therapieresistenzen zu untersuchen.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung ..... **I**
Inhaltsverzeichnis ..... **II**
1 Einleitung **1**
1.1 Neoplasien des zentralen Nervensystems 1
1.2 Das Glioblastoma Multiforme (GBM) 3
1.3 Therapie des Glioblastoma Multiforme 4
1.4 MGMT und Temolozomid 5
1.5 Stammzellähnliche Gliomzellen 7
1.6 Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren 10
1.7 Fragestellung 14
2. Material und Methoden **16**
2.1 Material 16
2.1.1 Zelllinien 16
2.1.2 Bakterienstämme, Vektoren und HEK-Zellen 17
2.1.3 Reagenzien und Verbrauchsmaterial 18
2.2 Methoden 26
2.2.1 Charakterisierung editierter Zelllinien 26
2.2.1.1 Extraktion genomischer DNA 26
2.2.1.2 Agarose Gelelektrophorese 26
2.2.1.3 Polymerase Ketten Reaktion 27
2.2.1.4 Reinigung von PCR-Fragmenten 28
2.2.1.5. TOPO TA Cloning und Transfektion kompetenter Bakterien 29
2.2.1.6 Plasmid Minipräparation 30
2.2.1.7.Analyse der rekombinanten Plasmide 31
2.2.1.8 Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Produkten 31
2.2.2 Arbeiten mit Zellen 32
2.2.2.1 Passagieren und Plattieren von SLGC-Linien und Klonen 32
2.2.2.2 Zählen von Zellen 33

2.2.2.3 Immunzytochemische Färbung von Zellen 33

2.2.2.4 Ermittlung der Zellproliferation mittels BrdU-ELISA 35

2.2.3 Analysen zur Proteinexpression 37

2.2.4 Lentivirale Transfektion von SLGC-Zelllinien 40

2.2.5 Statistik 41

3 Ergebnisse 43

3.1 Editierungsstatus von PPAR-Genen in Klonen 43

3.1.1 Eine Editierung von PPARA ist in keinem der T1464-Klone nachweisbar 47

3.1.2 Der Zellklon T1495 B9 F4 γ weist eine Editierung im PPARG, nicht aber PPARA auf. 48

3.1.3 Der Zellklon T1495 B9 D10 γ weist eine Editierung im PPARG, nicht aber in PPARA auf. 51

3.1.4 Fazit der Sequenzanalysen 54

3.2 Einfluss von Fenofibrat und Temozolomid auf die Proliferation von SLGCs und editierten Klonen 56

3.2.1 Fenofibrat unterstützt die anti-proliferative Wirkung von TMZ 56

3.2.2 Fazit der Proliferationsanalysen 60

3.3 Die Wirkung von Fenofibrat und TMZ auf editierte Klone variiert 61

3.3.1 Einfluss von Fenofibrat und TMZ auf den Stammzellcharakter 61

3.3.2 Fenofibrat vermindert die TMZ-induzierte Phosphorylierung von H2AX 70

3.3.3 Fazit zur Effektivität der Behandlungen 78

3.4 Expression von PPARα und MGMT 80

3.4.1 Die PPARα Expression ist generell hoch 80

3.4.2 Die MGMT-Expression variiert zwischen T1495 Mutterkultur und Klonen ... 82

3.3 Lentivirale Transfektion von SLGC-Klonen zur Markierung mit eGFP 84

4. Diskussion 88

4.1 Die Editierung von PPARG, nicht aber PPARA war nachweisbar 89

4.2 Fenofibrat und TMZ zeigten ein antiproliferatives Potenzial 92

4.3 Der relative Anteil an SLGCs kann in Abwesenheit von TMZ durch Fenofibrat gesenkt werden 94

4.4 Die Induktion von γH2AX durch TMZ wurde durch Fenofibrat moduliert 96
4.5 Die Gesamtzellzahlen wurden durch Fenofibrat und TMZ gesenkt 98
4.6 Der stabil transfizierte Klon T1464 C6 β und dessen Subklone wiesen keine einheitliche eGFP-Expression auf 100
4.7 Schlussfolgerungen und Limitierungen 101
Literaturverzeichnis 104
Abkürzungsverzeichnis 118
Abbildungsverzeichnis 120
Tabellenverzeichnis 123
Anhang 124
Danksagungen 135
Versicherung an Eides statt 136

1 Einleitung

1.1 Neoplasien des zentralen Nervensystems

Tumoren des zentralen Nervensystems (ZNS) werden in primäre und sekundäre, sowie in benigne und maligne Neoplasien unterteilt (Butowski, 2015). Die häufigsten malignen Tumoren des zentralen Nervensystems sind intrazerebrale Metastasen, die zu den sekundären Neoplasien gezählt werden (Mut, 2012). Neuroepitheliale Tumoren sind die häufigsten primären Gehirntumoren und machen 75% aller primären malignen Hirntumoren aus (Ostrom et al., 2017). Bis 2016 wurden Tumore allein nach ihrem histologischen Erscheinungsbild klassifiziert und mit einem, von der WHO (Weltgesundheitsorganisation) definierten Grad versehen (Grad 1-4). Nach den neueren Vorgaben der WHO spielen neben histopathologischen auch molekulare Charakteristika eine Rolle (Abb. 33, im Anhang). Niedergradige Gliome, wie das pilozystische Astrozytom (WHO-Grad 1) oder das pleomorphe Xanthoastrozytom (WHO-Grad 2) sind benigne und häufig durch eine chirurgische Resektion heilbar (Bale & Rosenblum, 2022). Pilozystische Astrozytome treten überwiegend im Kinder- und Jugendalter auf und haben eine exzellente Prognose (Ostrom et al., 2017). Mit zunehmend diffusem Wachstum werden Gliome zusätzlich zur Resektion durch Bestrahlung und/oder adjuvante Chemotherapie behandelt (Lapointe et al., 2018). Die Gruppe der diffus wachsenden Gliome umfasst Grad 2 Oligodendrogliome, Astrozytome des Grades 2-4, das Glioblastom (GBM), sowie weitere Entitäten wie das Mittelliniengliom und das diffuse hemisphärische Gliom. Nach der früheren WHO-Klassifikation wurden letztere noch als Glioblastome klassifiziert (Louis et al., 2016), nach dem rezenten Einbezug molekularer Marker wurde eine Revidierung der Klassifizierung notwendig (Whitfield & Huse, 2022).

Zu den histologischen Kriterien, die für die Einteilung der Neoplasien in WHO-Grade herangezogen werden, zählen die Präsenz und die Häufigkeit von Kernatypien, das Auftreten von Nekrosen, der Grad der Vaskularisierung der Tumoren, sowie der mitotische Index der Tumorzellen (Van Meir et al., 2010). Innerhalb der Gruppe der diffusen Gliome wird nach den neuen WHO-Kriterien zudem zwischen Gliomen mit einer mutierten Isozitratdehydrogenase (IDH) und Gliomen mit einem IDH-Wildtyp Status unterschieden

(Louis et al., 2016, 2021). In mehr als 90% der IDH-mutierten Astrozytome liegt eine IDH1 R132H-Mutation vor, welche inzwischen über einen für diese Mutation spezifischen Antikörper nachgewiesen werden kann (Brat et al., 2020, Capper et al., 2009). IDH1-Mutationen verändern den zellulären Metabolismus und verursachen die Akkumulation von 2-Hydroxyglutarsäure, einem Onkometaboliten, welcher durch die kompetitive Hemmung von α–Ketoglutarat-abhängigen Enzymen die Tumorprogression fördert (Dang et al., 2009, Xu et al., 2011). Zur weiteren Charakterisierung von Gliomen werden zusätzliche molekulare Marker herangezogen. Dazu zählt der X-chromosomale Alpha-Thalassämie-Geistige Retardierung-Syndrom (ATRX) Status. Das Protein ATRX, das eine ATP-abhängige Helikasedomäne trägt, ist ein Regulator des Epigenoms. ATRX fördert die Bildung von Heterochromatin, kann ATP-abhängig die Position von Nukleosomen modifizieren, bindet an heterochromatische Bereiche im Bereich der Zentromere und Telomere, und interagiert mit dem Heterochromatin-Protein HP1 (Heaphy et al., 2011). Innerhalb der Gruppe IDH-mutierter Gliome bestimmt der ATRX-Status die Zuordnung zur Gruppe der Oligodendrogliome oder der Gruppe der Astrozytome (Gritsch et al., 2022). Weiterhin wird für die Gruppe der IDH-mutierten Astrozytome der Begriff GBM nach der neuesten WHO-Klassifikation nicht mehr verwendet, da IDH-mutierte Astrozytome deutliche genetische Unterschiede zu IDH Wildtyp Gliomen zeigen, obwohl ihre histologische Erscheinung ähnlich ist (Brat et al., 2020).

Für die Gruppe der Gliome mit einem IDH-Wildtyp, wird das Vorhandensein von Nekrosen sowie eine hohe mikrosvaskuläre Proliferation als ausreichend betrachtet, um die Diagnose eines IDH-Wildtyp WHO Grad 4 GBM zu stellen (Alexander & Cloughesy, 2017). In der WHO-Klassifikation von 2021 werden neben den histologischen Merkmalen auch weitere molekulare Kriterien für die Klassifizierung berücksichtigt. Diese spielen eine entscheidende Rolle bei der Diagnose eines GBM Grad 4, selbst in Fällen von IDH-Wildtyp Gliomen, die histologisch als Grad 2 oder 3 erschienen. Dies gilt unabhängig von der Anwesenheit histologischer Marker. Dazu gehören die Reaktivierung der Telomerase (TERT), die Amplifikation oder Mutation des Gens für den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR), sowie der kombinierte Zugewinn des Chromosoms 7 bei gleichzeitigem Verlust des Chromosoms 10 (Whitfield & Huse, 2022)

1.2 Das Glioblastoma Multiforme (GBM)

Das GBM gehört zu den aggressivsten Tumoren im Erwachsenenalter und bildet mit 48,6% den größten Anteil an primären malignen Gehirntumoren (Koshy et al., 2012). Unter Standardtherapie beträgt das mediane Überleben lediglich 14,6 Monate (Stupp et al., 2017). Mit einer Inzidenz von 4/100.000 gehört das GBM zu den selteneren Neoplasien des Menschen (Walker et al., 2019).

Für die Entwicklung von Neoplasien ist das zunehmende Alter einer der wichtigsten Risikofaktoren (Fane & Weeraratna, 2020). Auch die Inzidenz des GBMs steigt mit dem Alter an und erreicht im Alter von 75-84 Jahren einen Höhepunkt (Ostrom et al., 2017). Männer sind 1,6- Fach häufiger als Frauen betroffen (Brodbelt et al., 2015). Als einziger gesicherter exogener Risikofaktor für die Entwicklung eines GBMs gilt die Bestrahlung mit ionisierender Strahlung. So ist das Risiko eine ZNS-Neoplasie zu entwickeln 8- bis 52-Fach erhöht, wenn im Kindesalter eine Radiotherapie erfolgte (Bowers et al., 2013). Mehrere genetische Erkrankungen gelten als Risikofaktoren für die Entstehung von Gliomen. Dazu gehören zum Beispiel die Neurofibromatose Typ 1, bei der eine Mutation des Tumorsuppressors Neurofibromin-1 (NF1) vorliegt, und das Li-Fraumeni Syndrom, das auf Mutationen im Tumorsuppressor p53 zurückzuführen ist (Muskens et al., 2020). Sowohl für das NF1-, als auch das p53-Gen wurde im TCGA (*The Cancer Genome Atlas)* Projekt eine Assoziation mit Subtypen des GBMs festgestellt und Mutationen dieser Gene gelten als Treibermutation für die Initiation von Gliomen (Weinstein et al., 2013).

Die klinischen Symptome bei Gliomen beruhen häufig auf einem erhöhten intrakraniellen Druck; dazu gehören beispielsweise Kopfschmerzen, Übelkeit und Sehstörungen (Weller et al., 2020). Weitere Symptome, die in Abhängigkeit von der Lokalisation des Tumors auftreten, umfassen u.a. epileptische Anfälle, fokale Defizite und Persönlichkeitsveränderungen (Oberheim Bush et al., 2019). Neben der Analyse von Tumorbiopsien durch den Neuropathologen, sind Methoden der Bildgebung für die Diagnostik essenziell. Die initiale Bildgebung der Wahl erfolgt beispielsweise in Form eines Computer Tomogramms (CT) in Anwesenheit eines geeigneten Kontrastmittels, in welchem sich das GBM als unregelmäßig geformte, stark kontrastmittel-anreichernde Raumforderung präsentiert (Witwer et al., 2002). Der Goldstandard der Diagnostik des GBMs ist die Magnetresonanztomographie (MRT)

in Anwesenheit eines geeigneten Kontrastmittels. Gliome präsentieren sich im MRT als stark kontrastmittelanreichernde Raumforderungen mit hypointensem Zentrum als Folge des nekrotischen Wachstums (Shukla et al., 2017).

1.3 Therapie des Glioblastoma Multiforme

Die aktuelle Standardtherapie des GBMs besteht aus maximal möglicher chirurgischer Resektion und adjuvanter Radiochemotherapie. Trotz dieser aggressiven Therapie ist das GBM nicht heilbar und die Prognose infaust (Tykocki & Eltayeb, 2018). Ein wichtiger Fortschritt in der Therapie war die Etablierung von fraktionierter Bestrahlung in Kombination mit dem Chemotherapeutikum Temolozomid (TMZ), durch die die mittlere Überlebenszeit von 12,1 Monaten auf 14,6 Monaten gesteigert und das 2-Jahres Überleben von 10,4 % auf 26,5 % verbessert werden konnte (Stupp et al., 2005). Wegen des diffusen, infiltrierenden Wachstums ist eine Resektion des GBMs nicht möglich (Schipmann et al., 2019). Die initiale Resektion des Tumors dient daher vor allem der histologischen Sicherung des Tumors sowie der Reduktion des Tumormasseeffektes mit Entlastung angrenzender Hirnareale (Omuro & DeAngelis, 2013). Die fraktionierte Bestrahlung wird mit einer Gesamtdosis von 60 Gray (Gy) über 6 Wochen appliziert, wobei wöchentlich 5 Einzeldosen von 2 Gy verabreicht werden (Stupp et al., 2009). Die adjuvante TMZ-Therapie wird während der Strahlentherapie mit einer täglichen Dosis von 75mg/m^2 Körperoberfläche (KOF) durchgeführt. Anschließend daran erfolgt eine Erhaltungstherapie mit 6 Zyklen *à* 150-200 mg/m^2 KOF an 5 von 28 Tagen (Stupp et al., 2005). Die symptomatische Therapie des GBMs umfasst Kortikosteroide, insbesondere Dexamethason, zur Reduktion des peritumoralen Ödems und zur Linderung neurologischer Symptome (Pace et al., 2017). Da bei 23% der GBM-Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose epileptische Anfälle auftreten, bei weiteren 20% im Verlauf der Krebserkrankung, (Chang et al., 2005), wurde der prophylaktische Einsatz von Antiepileptika diskutiert; für einen daraus resultierenden Vorteil wurden bisher jedoch keine belastbaren Daten gewonnen (Forsyth et al., 2003). Eine adjuvante postoperative Therapie besteht im Einsatz von sogenannten *tumor treating fields* (TTFields). TTFields sind elektrische Felder von niedriger Intensität (1-3 V/cm) und mittlerer Frequenz (50-200 kHz), welche über Elektroden auf dem Schädel appliziert werden. Die Applikation der TTFields soll zu mitotischem Arrest und zur Induktion von

Apoptose in sich schnell teilenden Zellen führen (Giladi et al., 2015). In einer klinischen Studie konnte gezeigt werden, dass TTFields sowohl das mediane Überleben (20,9 Monate relativ zu 16 Monaten) als auch das progressionsfreie Überleben (6,7 Monate zu 4 Monaten) im Vergleich zur alleinigen Radio-/Chemotherapie verlängern (Stupp et al., 2017). Allerdings scheint die Akzeptanz von Patienten für die TTFields eher gering (Onken et al., 2018).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die derzeitige GBM-Therapie einen palliativen Charakter hat und das Versagen der Therapie und das Auftreten von GBM-Rezidiven der Regelfall ist. Mehrere kritische Faktoren tragen zur Therapieresistenz des GBMs bei (Beier et al., 2011). Dazu zählen (i) die speziellen histologischen Eigenschaften des GBMs, der Bluthirnschranke und des Mikroumfeld im Tumor, (ii) die Expression von bestimmten ABC (*ATP-binding cassette*) Transportern und des Reparaturproteins O6-Methyl-Guanyl-DNA-Methyltransferase (MGMT), sowie (iii) das Vorhandensein und die Plastizität von Gliomzellen mit Eigenschaften von Stammzellen (*stem like glioma cells; SLGCs)* (Gimple et al., 2022).

1.4 MGMT und Temolozomid

Wie oben erwähnt ist TMZ das Standardchemotherapeutikum in der Therapie des GBMs. TMZ ist ein 194 Dalton schweres, oral bioverfügbares, lipophiles Molekül, welches nach Aktivierung im Körper als DNA-alkylierende Substanz agiert (Chien et al., 2021). Die Aktivierung im Körper verläuft über mehrere Schritte. Zunächst wird TMZ im Gastrointestinaltrakt absorbiert, anschließend erfolgt der spontane Zerfall zu 5-MTIC 5-(3-*N*-methyltriazen-1-yl)-imidazol-4-carboxamid), welches mit Wasser reagiert und zu den Produkten AIC (5(4)-aminoimidazol-4(5)-carboxamid) und Methylhydrazin zerfällt. Die nun aktive Substanz Methylhydrazin alkyliert bevorzugt die Guanylreste der DNA an der N^{7-} Position (N^7-MeG); zusätzlich können Adenylreste in der N^3-Position (N^3-MeA) und Guanylreste in der 0^6-Positon (0^6-MeG) methyliert werden (Zhang et al., 2012). Die Zytotoxizität des TMZ wird vorrangig über die Methylierung der Guanylreste in der 0^6-Position vermittelt (Drabløs et al., 2004). Diese Methylierung des Guanins führt zu einer Fehlpaarung mit der Base Thymin während der DNA-Replikation. Die Fehlpaarung wiederum aktiviert den Mechanismus der DNA-Fehlpaarungsreparatur (MMR), welche die

fehlgepaarten Basen erkennt und den Thymin-Rest entfernt, das Persistieren des 0^6-MeG im kodogenen Strang der DNA führt zur wiederholten Insertion und Exzision des fehlgepaarten Thymins durch die MMR, und verursacht einen Zusammenbruch der Replikationsgabel und Brüche im DNA-Strang (Mojas et al., 2007). Die entstandenen Doppelstrangbrüche bewirken einen Arrest in der G2/M-Phase des Zellzyklus und lösen proapototische Signalwege aus (Cejka et al., 2003, D'Atri et al., 1998). Häufige Nebenwirkungen der Therapie mit TMZ sind Myelosupression, insbesondere Thrombozytopenie, Übelkeit und Einschränkungen der Leberfunktion (Rodríguez-Camacho et al., 2022).

Die Aktivität des DNA-Reparaturproteins MGMT spielt eine wichtige Rolle für das Ansprechen auf die TMZ-Therapie, da diese Transferase die Methylgruppe von der O^6-Postion des Guanylrestes entfernt. Dabei wird die Methylgruppe irreversibel auf einen Cysteinyl-Rest im aktiven Zentrum der MGMT übertragen und das Enzym inaktiviert (Kaina et al., 2007). Daraus ergibt sich der Zusammenhang, dass die Verfügbarkeit von aktiven MGMT-Molekülen direkt von der Transkription des MGMT-Gens abhängig ist, die wiederum durch epigenetische Prozesse reguliert wird. Dabei führt die Hypermethylierung von CpG-Inseln des MGMT-Promotors zu einer Verminderung der Transkription des Gens und nachfolgend zu einer geringeren Expression der MGMT (Butler et al., 2020). GBMs mit einer geringen oder fehlenden MGMT-Expression sind empfindlicher für eine Therapie mit TMZ (Hegi et al., 2005). Hegi et. al (2005) konnten zeigen, dass die mittlere Überlebenszeit von Patienten mit einem hypermethylierten MGMT-Promotor unter TMZ-Therapie 21,6 Monaten betrug. Im Vergleich dazu war der Benefit der adjuvanten TMZ-Therapie bei Patienten mit einem de- oder hypomethylierten MGMT-Promotor minimal und das mittlere Überleben betrug bei adjuvanter Gabe von TMZ 12,7 Monate, im Vergleich zu 11,8 Monaten ohne TMZ-Behandlung (Hegi et al., 2005).

Es stehen mehrere Verfahren zur Verfügung, um den MGMT-Status zu ermitteln, wobei kein Konsensus über die beste Methode existiert (Altman et al., 2012). Eine häufig angewendete Methode ist die methylierungsspezifische PCR (MSP). Bei dieser Methode werden zunächst durch eine Bisulfit-Konversion nicht-methylierte Cytosin-Reste zu Uracil-Resten umgesetzt. Anschließend erfolgt eine PCR-Amplifikation mit Primern, die spezifisch für konvertierte bzw. nicht-konvertierte Cytosine sind, und somit auf die relative Häufigkeit

von methylierten und de-methylierten MGMT-Promotorsequenzen schließen lassen (Mansouri et al., 2019).

1.5 Stammzellähnliche Gliomzellen

In adulten Geweben spielen Stammzellen eine wichtige Rolle zur Aufrechterhaltung der Homöostase und zur Regeneration des Gewebes bei Verletzungen (Bahmad et al., 2021). Eigenschaften von Stammzellen sind (i) die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, (ii) der Ursprung aus einer einzigen Zelle (Klonalität) und (iii) die Fähigkeit zur Differenzierung in verschiedene Zelltypen eines oder mehrerer Keimblätter (Kolios und Moodley, 2013).

Die Tumorstammzelltheorie beschreibt eine Subpopulation von Zellen innerhalb von Tumoren, welche die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen und die Tumorgenese fördern (Reya et al., 2001). Die Tumorstammzelltheorie wurde erstmals im Jahr 1994 postuliert, als bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) eine Fraktion von Zellen beobachtet wurde, welche nach Xenotransplantation in Mausmodelle zum Auftreten der AML führten (Bonnet & Dick, 1997). In der Folge konnten aus verschiedensten soliden Tumoren, darunter Pankreas- und Kolonkarzinome, sowie Melanome und diverse Sarkome, Populationen sich selbst erneuernder Zellen mit Eigenschaften von Stammzellen (CSC) isoliert werden (Nassar und Blanpain, 2016). Die erstmalige Isolierung von Tumorstammzellen aus GBMs gelang 2004 (Singh et al., 2004).

Bereits Bonnet und Dick (1997) postulierten für Tumorzellen eine zelluläre Hierarchie, mit der Tumorstammzelle (CSC) an der Spitze. CSCs weisen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zur Differenzierung in eine Vielzahl von Zellen auf, die die Tumormasse bilden (Visvader & Lindeman, 2008). Mit zunehmender Differenzierung verlieren CSCs ihre Stammzelleigenschaften. CSCs bilden nach Xenotransplantation in immunsupprimierte Mäuse orthotope Tumoren, die ähnliche Eigenschaften wie der humane Ursprungstumor aufweisen (Yu et al., 2012). Zum zellulären Ursprung von CSCs existieren zwei Theorien. So könnten CSCs durch De-Differenzierung aus Zellen entstehen, in denen Onkogene dereguliert und Tumorsuppressoren inaktiviert wurden. Dieser Prozess könnte durch verschiedene Ereignisse, wie zum Beispiel Infektionen, Stoffwechseleinflüsse, Toxine, Chemotherapeutika oder radioaktive Strahlung initiiert oder beschleunigt werden (Basu,

2018). Eine andere Möglichkeit wäre die neoplastische Transformation von Stammzellen und Progenitoren, welche durch genetische und/oder epigenetische Veränderungen ausgelöst werden könnte (Walcher et al., 2020). Für beide Thesen existieren Evidenzen, sodass nicht ausgeschlossen werden kann, dass beide Theorien zutreffend sind (Huse & Holland, 2010).

Die erstmalige Isolierung von CSCs aus malignen Hirntumoren erfolgte mittels FACS (*fluorescence activated cell sorting*) unter Einsatz eines gegen das Protein CD133/ Prominin 1 gerichteten Antikörpers (Singh et al., 2004). Bereits hundert dieser CD133-positiven Zellen reichten aus, um in immunsupprimierten Mäusen orthotope Tumoren zu generieren, während die CD133-negative Zellpopulation keine Tumoren erzeugte. Spätere Analysen konnten jedoch zeigen, dass auch CD133-negative Zellen in der Lage sind, orthotope Tumoren zu bilden (Wang et al., 2008; Beier et al., 2007). Die Nutzung von CD133 als Marker für Hirntumorstammzellen, die in der Literatur als GSCs (*glioma stem cells*), BTSC (*brain tumor stem cells*) oder SLGCs (*stem-like glioma cells*) bezeichnet werden (Huse & Holland, 2010; Gimple et al., 2022; Choschzick et al., 2014), ist somit problematisch. Eine Erklärung für den scheinbaren Widerspruch zwischen den Daten zur Bedeutung von CD133 für maligne Gliome, lieferte eine im Jahr 2010 publizierte Arbeit, die erstmalig das Modell zur zellulären Hierarchie (Abb. 1) beschreibt (Chen et al., 2010).

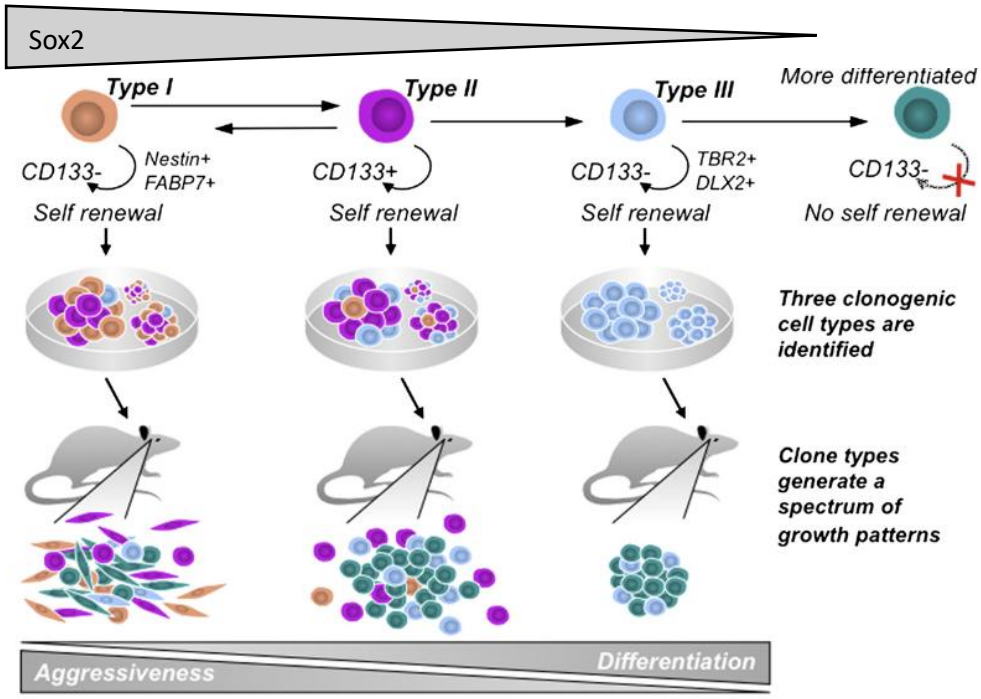

Abbildung 1: Zelluläre Hierarchie von stammzellähnlichen Gliomzellen (SLGCs) in GBMs. Das Modell zeigt die verschiedenen Differenzierungsstadien von SLGCs, sowie deren Wachstums- und Differenzierungsverhalten. Der Transkiptionsfaktor Sox2 (*sex determining region Y (SRY)- box 2*) wird in Typ I-, II- und III-Zellen exprimiert, wobei das Sox2-Level in der Typ I-Zelle am höchsten ist. Nestin wird ebenfalls in allen drei Typen von SLGCs exprimiert und erst in der *bulk* Tumor-Zelle (in grün dargestellt) herunterreguliert. FABP7: *fatty acid binding protein 7*; TBR2: *T-box brain protein 2*; DLX2: *distal-less homeobox 2*. [Quelle: Chen et al., 2010; modifiziert]

Chen und Kolleg*innen identifizierten drei verschiedene Zelltypen, die sich in ihrem Stammzellcharakter unterscheiden und durch Differenzierung auseinander hervorgehen. Mit zunehmender Differenzierung nimmt der Stammzellcharakter ab und es wird eine Hierarchie ausgebildet. An der Spitze dieser Hierarchie steht die Typ I – Zelle, welche CD133-negativ ist, und den Transkriptionsfaktor Sox-2 (*sex determining region Y (SRY)- box 2),* sowie die Proteine Nestin und FABP7 (*fatty acid binding protein* 7) exprimiert. Diese Typ I-Zelle kann sich selbst erneuern und generiert aggressive, orthotope Tumoren in Mausmodellen (Chen et al., 2010). Die weiter differenzierten Typ II – Zellen sind Sox2- und CD133-positiv, besitzen jedoch weiterhin die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, sind tumorigen, und können sowohl CD133-negative Typ III- als auch Typ I-Zellen hervorbringen. Typ III-Zellen sind CD133-negativ und weisen eine reduzierte Expression von Sox2 auf, sind aber weiterhin zur Selbsterneuerung in der Lage, und differenzieren in Sox2-negative Nicht-SLGCs, die die Masse der Tumorzellen darstellen.

Sox-2 ist ein Transkriptionsfaktor, der eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters von neuralen Stammzellen spielt (Berezovsky et al., 2014). Während der Frühphase der Entwicklung des ZNS wird Sox-2 stark exprimiert, die Expression nimmt jedoch mit fortschreitender Entwicklung des Nervensystems ab. Im adulten Gehirn wird Sox-2 nur noch von bestimmten Zellen in der subventrikulären Zone und im Gyrus Dentatus exprimiert, bei denen es sich um adulte neurale Stammzellen (adNSC) handelt (Annovazzi et al., 2011). Auch in Gehirntumoren spielt Sox-2 eine wichtige Rolle. So ist die Expression von Sox-2 mit einer höheren Malignität assoziiert und Sox-2 ist für die Erhaltung des Stammzellcharakters SLGCs notwendig (Mansouri et al., 2016; Alonso et al., 2011). Weiterhin kontrolliert Sox2 die Proliferation sowohl von adNSCs als auch von SLGCs (Gangemi et al., 2009).

1.6 Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren

Bei den Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPARs) handelt es sich um Liganden-abhängige Transkriptionsfaktoren, die zur Familie der nukleären Rezeptoren gehören (Petkovich & Chambon, 2022). Zielgene der PPARs regulieren den Kohlenhydrat- oder Lipid-Metabolismus, beeinflussen die Differenzierung von Zellen und spielen eine Rolle bei inflammatorischen Prozessen (Lamas Bervejillo & Ferreira, 2019). Es existieren drei Subtypen von PPARs (Isotypen), die sich teilweise hinsichtlich ihres Expressionsmusters und ihrer Funktion unterscheiden. So spielt PPARα eine wichtige Rolle im Energie-Metabolismus und wird vor allem im braunen Fettgewebe, sowie in der Leber, dem Herz, dem Dünndarm und in der Niere exprimiert. Dagegen wird PPARβ (auch als PPARδ oder als PPARβ/δ bezeichnet) ubiquitär exprimiert, wobei die höchsten Expressionen in der Leber, der Niere und im braunen Fettgewebe beobachtet wurden. Von PPARγ existieren vier Isoformen, die unterschiedliche Expressionsmuster aufweisen. Die Expression von PPAR$\gamma 1$ wird in fast allen Geweben beobachtet, während PPAR$\gamma 2$ und $\gamma 3$ vor allem in Adipozyten exprimiert werden, und PPARγ_4 primär in Endothelzellen nachzuweisen ist (Komar, 2005; Tyagi et al., 2011).

Wie andere nukleäre Rezeptoren bestehen alle PPARs aus vier funktionell autonomen Domänen (Abb. 2), wobei sich die PPARγ-Isoformen hinsichtlich ihres N-Terminus, d.h. in der Länge der A-Domäne unterscheiden. Die A-Domäne ist funktionell mit der B-Domäne

verknüpft, die die ligandenunabhängige Aktivierungsfunktion (AF-1) enthält. Die Aktivität der AF-1 wird durch Phosphorylierung reguliert, die durch verschiedene Kinasen, darunter die Proteinkinase A, erfolgen kann (Brunmeir & Xu, 2018). Die C-terminal der B-Domäne gelegene C-Domäne, trägt die gut konservierte DNA-Bindedomäne (DBD), die über zwei Zinkfinger vom Cys-Cys-Typ spezifisch die PPAR-responsiven Sequenzen (PPAR-REs) in Promotoren oder Enhancern von PPAR-Zielgenen erkennt (Kroker & Bruning, 2015).

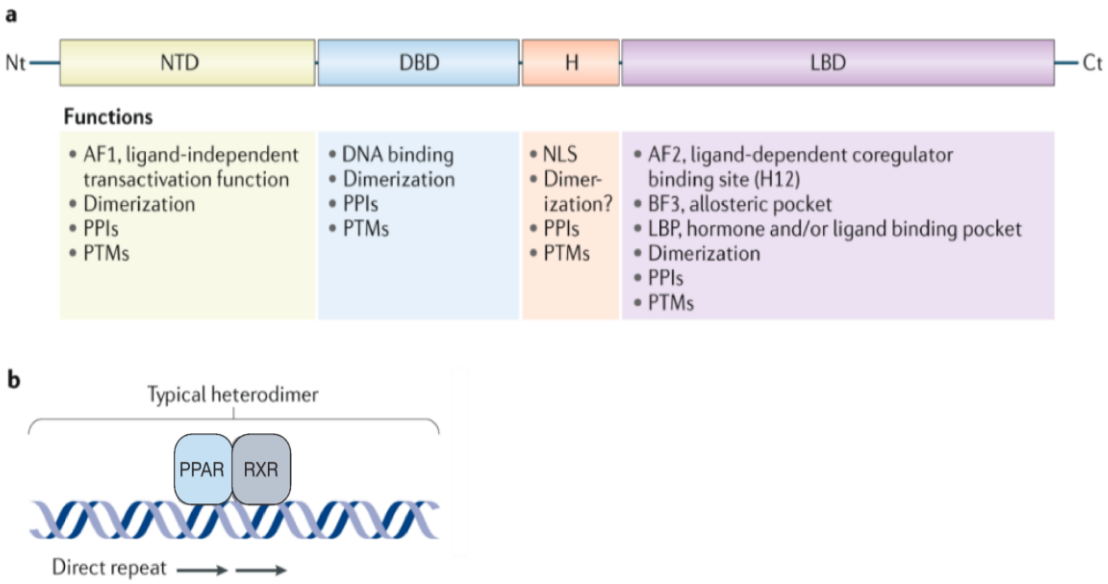

Abbildung 2: Domänenstruktur von PPAR und Bindung des PPAR/RXR Heterodimers an das zugehörige responsive Element in der DNA. A) Schematische Darstellung der Domänenstruktur: N-Terminal befindet sich die ligandenunabhängige Aktivierungsfunktion (AF-1). Die DNA-Bindedomäne (DBD) enthält zwei Zinkfinger und ist für die Bindung der PPAR-Antwortelemente in der DNA (PPAR-RE) verantwortlich. Die flexible Domäne H (in der Literatur häufig als D-Domäne bezeichnet) stellt Verbindung zwischen der DBD und der ligandenbindenden Domäne (LBD) dar. Neben der Bindung von Liganden vermittelt die LBD auch die Dimerisierung von PPARs mit RXRs. Am C-terminalen Ende der LBD befindet sich eine helikale Region (H12), die oft als Aktivierungsfunktion (AF-2) bezeichnet wird. Obwohl für die ligandenabhängige Aktivierung der Transkription essenziell, ist die H12 allein dafür nicht ausreichend B) Schematische Darstellung der Bindung eines PPAR/RXR Heterodimers an ein PPAR-RE, das aus einer direkten Wiederholung der Konsensussequenz -AGGTCA- (*direct repeat)* besteht. PPi, Prolyl-Petidyl-Iosmerasen; PTM, posttranslationale Modifizierungen; NLS, Signal für die Translokation in den Nukleus; H12, Helix 12 und zentraler Teil der Aktivierungsfunktion 2 (AF2). – (Quelle: De Bosscher et al., 2020, modifiziert).

Eine flexible Region (D-Domäne), die auch als „Scharnier“ (*hinge*) bezeichnet wird, verbindet die DBD mit der Ligandenbindenden-Domäne (LBD; Domäne E), die mehrere Funktionen erfüllt. Zum einen bindet die LBD den PPAR-Isotyp-spezifischen Liganden in einer Liganden-Bindetasche (LBP). Zum anderen trägt die LDB die Dimerisierungsfunktion, die die Heterodimerisierung mit Retinoid-X Rezeptoren (RXR) Isotypen ermöglicht; PPARs können weder als Homodimer noch als Monomer an DNA binden (Chandra et al., 2008). Im

C-terminalen Bereich der E-Domäne liegt eine Abfolge von Aminosäureresten, die häufig als Transaktivierungsdomäne AF-2 bezeichnet wird und für die Ausbildung von Oberflächen für die Interaktion mit Co-Aktivatoren (CoA) notwendig ist (Pawlak et al., 2012). In Anwesenheit eines Agonisten, kommt es zu Konformationsänderungen im PPAR/RXR-Heterodimer, die zu einer Veränderung der Position der AF-2 führen. Dabei wird einerseits die LBP verschlossen, andererseits wird eine Furche ausgebildet, in der eine helikale Struktur von CoAs binden kann. Gleichzeitig geht die Oberfläche für die Interaktion mit Co-Repressoren (CoR) verloren, sodass sich zuvor gebundene CoR von den PPARs ablösen (Chen et al., 2018; Petkovich & Chambon, 2022).

Die Bindung eines PPAR-Agonisten führt somit zu einem Austausch von CoRs gegen CoAs und somit zur Aktivierung der Transkription von PPAR-Zielgenen. Dafür ist die spezifische Erkennung und Bindung eines PPAR-REs durch ein PPAR/RXR Heterodimer die Voraussetzung. Ein typisches PPAR-RE ist ein DR1, d.h. es besteht aus einer direkten Wiederholung (*direct repeat)* der Basenabfolge 5‘-AGGTCA-3‘, unterbrochen von einem Nukleotid (Palmer et al., 1995). Der PPAR bindet an das 5‘ gelegene Motiv, während der RXR das 3‘-Motiv besetzt (IJpenberg et al., 1997). Da auch die 5‘ des PPAR-RE gelegene DNA-Region einen Einfluss auf das Binden der verschiedenen PPAR/RXR-Heterodimere hat, erkennen die verschiedenen Kombinationen von Heterodimeren verschiedene PPAR-REs mit unterschiedlicher Effizienz, wodurch die oben erläuterte präferenzielle Aktivität von PPAR-Isotypen erklärbar wird (Juge-Aubry et al., 1997).

Endogene Liganden für die PPARs sind ungesättigte Fettsäuren und sowie Derivate ungesättigter Fettsäuren, welche durch die Nahrung aufgenommen werden, oder als Produkte von Stoffwechselwegen entstehen (Montaigne et al., 2021). Es existieren verschiedene PPAR-Isotyp-spezifische synthetische Liganden. Dazu zählen die Fibrate und Glitazone. Glitazone sind PPARγ Agonisten und werden als orale Antidiabetika zur Therapie des Diabetes Mellitus genutzt (DeMarsilis et al., 2022). Momentan ist in Deutschland nur Pioglitazon zugelassen, andere Vertreter die Stoffgruppe wurden aufgrund von erhöhtem Myokardinfarktrisiko vom Markt genommen. Pioglitazon sollte aufgrund eines leicht erhöhten Risikos für Blasenkarzinome nicht mehr in der Erstlinientherapie des Diabetes Mellitus eingesetzt werden (Ferrara et al., 2011). Fibrate sind PPARα Agonisten und werden zur Behandlung von Triglycerid-Hyperlipidämien eingesetzt (Michaeli et al., 2023).

Ein Vertreter der Fibrate ist das Fenofibrat, welches nach Aufnahme zum aktiven Metaboliten Fenofibrinsäure hydrolysiert wird (Arakawa et al., 2005). Häufig beobachtete Nebenwirkungen unter der Monotherapie mit Fenofibrat sind gastrointestinale Symptome wie Bauschmerzen, Diarrhoe und Übelkeit. Weitere, seltenere Nebenwirkungen sind Kopf- und Muskelschmerzen (McKeage and Keating, 2011). Die Wirkung von Fenofibrat auf den Lipidstoffwechsel wird durch die Aktivierung von PPARα vermittelt. Durch die Aktivierung des PPARα kommt es zu einer erhöhten Aktivität der Lipoproteinlipase, der vermehrten β-Oxidation von freien Fettsäuren, und der verringerten *de novo* Synthese von Fettsäuren (Chapman, 2006). Weiterhin verändern Fenofibrate die Zusammensetzung der Lipoproteine, die LDL (*Low Density Lipoprotein*) *clearance* wird erhöht, und die Synthese von HDL (*High Density Lipoprotein*) wird gesteigert wird (Chapman, 2006).

Tumorzellen zeigen charakteristische Veränderungen im Energie-Stoffwechsel, die u.a. auf die erhöhte Proliferationsrate zurückzuführen sind, aber auch Anpassungen an das Mikroumfeld im Tumor darstellen (Shi et al., 2020). Unter aeroben Bedingungen wird in „normalen“ (nicht-transformierten) Zellen die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) bevorzugt, während Tumorzellen, trotz aerober Bedingungen, die weniger effektive Glykolyse bevorzugen und die OXPHOS herunterregulieren (Cairns et al., 2011). Auf diese Weise werden Bausteine für die Synthese von Makromolekülen und Reduktionsäquivalente generiert (Vander Heiden et al., 2009). Im Gegensatz zu normalen Zellen, welche ihren Lipid-Bedarf durch Aufnahme von extrazellulären Fettsäuren decken, ist die *de-novo* Synthese von Fettsäuren in Tumorzellen bevorzugt (Röhrig & Schulze, 2016). Aufgrund ihres Einflusses auf den Glukose- und Lipid-Stoffwechsel, womit spezielle Anpassungen des Tumormetabolismus ermöglicht werden können, stellen die PPAR-Isotypen ein interessantes Ziel für mögliche neue Therapieansätze des GBMs dar.

1.7 Fragestellung

Die Subpopulation der SLGCs trägt maßgeblich zum Versagen der Standardtherapie des GBMs bei (Beier et al., 2011; Schonberg et al., 2014; Gimple et al., 2022). Würde es gelingen die Eigenschaften von SLGCs entscheidend zu modulieren, könnte dies die Standardtherapie deutlich verbessern. Potenzielle Ansatzpunkte sind dabei die Selbsterneuerung und die Proliferation, aber auch die Entwicklung von Therapietoleranzen und Resistenzen und die metabolischen Anpassungen von SLGCs an die Veränderungen im Tumor-Mikroumfeld. Daher wurde in der Arbeitsgruppe von Frau PD. Dr. Zechel ein Projekt initiiert, das den Einfluss von PPARs auf die Proliferation, TMZ-Empfindlichkeit und den Metabolismus von SLGCs untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Projekt fortgesetzt, das 2020 von einer MLS-Masterstudentin (Frau Alison Naujack) und einer medizinischen Doktorandin (Frau Clara Trost) begonnen wurde. In der vorliegenden Arbeit sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- (1) Zunächst sollte die Anwesenheit einer Editierung des PPARα und PPARγ Gens in Zellklonen überprüft werden. Diese Klone entstammten dem CRISPR-Cas9 Editierungsansätzen von Frau Naujack und Frau Trost. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente umfassten die Isolierung von genomischer DNA, die Klonierung des targetierten Exons in den Vektor pCR™2.1 TOPO, sowie die nachfolgende Charakterisierung und Sanger-Sequenzierung der Plasmide.
- (2) Im Weiteren sollten zwei SLGC-Linien (T1495 und T1440) hinsichtlich der Sensitivität gegenüber dem PPARα–Agonisten Fenofibrat untersucht werden. Diese Analysen umfassten BrdU ELISA, immunzytochemische Färbungen und Westen Blot Analysen. Dabei sollten die immunzytochemischen Färbungen Auskunft über den Stammzellstatus, die Gesamtzellzahl und die Induktion von Läsionen in der DNA geben.
- (3) Die unter (2) beschriebenen Experimente sollten im Folgenden unter den identischen Bedingungen in Anwesenheit von TMZ durchgeführt werden, um Hinweise auf eine mögliche Kooperativität zwischen Fenofibrat und TMZ zu erhalten.

- (4) Weiterhin sollten die Untersuchungen an Fenofibrat/TMZ-behandelten Zellen auf Zellklone ausgeweitet werden, in denen eine durch CRISPR-Cas9 induzierte funktionelle Inaktivierung von PPARβ und/oder PPARγ vorlag.
- (5) Abschließend sollten ein PPARγ-editierter Klon der SLGC-Linie T1464 und die korrespondierende T1464-Mutterkultur mit Lentiviren infiziert werden, die die genetische Information für die Expression des eGFP (*enhanced green fluorescent protein*) tragen. Ziel dieses Experimentes war die Gewinnung von eGFP-positiven Zellklonen, die für Analysen in dem im Labor etablierten GBM *explant*-Modell (Raju et al., 2015) eingesetzt werden könnten.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden Zelllinien (SLGC) und Zellklone eingesetzt, die in der Arbeitsgruppe aus Tumorbiopsien angelegt wurden, beziehungsweise sich von diesen ableiten. Für die Arbeiten liegt ein positives Votum der Ethikkommission der Universität zu Lübeck vor (Votum 08-070 vom 27.06.2008 bzw. 18.03.2009). Die Patienten gaben, nach der Aufklärung durch ihren behandelnden Arzt, schriftlich ihre Einwilligung, dass das Gewebe in der Forschung verwendet werden darf. Die Bezeichnung der SLGC-Linien mit einem ‘‘T‘‘ und einer Nummer gibt an, dass die Zellen aus einem humanen Tumor stammen, dessen Herkunft durch die angegebene Codenummer anonymisiert wurde. Die SLGC-Linien entstammen primären GBMs und werden im nachfolgenden als Mutterkulturen bezeichnet. In der vorliegenden Arbeit wurden drei SLGC-Linien (T1440, T1464, T1495; Zechel et al., 2024) oder davon abgeleitete, editierte Derivate genutzt.

Zell-Derivate: Vor Beginn der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt vier SLGC-Linien mit Hilfe des CRISPR-Cas 9 Systems in den Genen editiert, die für die nukleären Rezeptoren PPARα, PPARβ bzw. PPARγ kodieren. Die Isolierung der hier verwendeten Klone erfolgte durch Frau Dr. med. C. Trost, Frau Mc.Sci. A. Naujack bzw. die Arbeitsgruppenleiterin. Bei den Klonen von Frau Trost (T1495-, T1464-Klone) und Naujack (T1440-Klone) handelte es sich um Klone aus Doppel-Editierungsansätzen, die anderen Klone stammten aus einer späteren, erneuten Editierung, in der ausschließlich das PPARA-Gen targetiert wurde. In allen Fällen wurden die Klone im Vorfeld der vorliegenden Arbeit mittels *limited dilution assay* aus einem Zellpool isoliert. Für einige Klone wurde der Editierungsstatus in der vorliegenden Arbeit untersucht, für andere Klone war dieser bereits bekannt (Tab. 1).

Für die Herstellung von lentiviralen Partikeln zum Einbringen des eGFP (enhanced green fluorescent protein) in SLGCs oder editierten Klonen wurden *human embryonic kidney cells (*HEK-Zellen, siehe 2.1.1.2) benötigt. Als Zielzellen dienten die T1464-Mutterkultur, ein editierter T1464-Klon sowie zwei nicht edierte T1464 Klone (Tab. 1).

Tabelle 1: Übersicht zu Experimenten mit editierten/nicht-editierten Zellklonen und SLGC-Linien

Zellklon	Abkürzung	Editierungs-ansatz	Editierungs-status	Experimente zur Charakterisierung
T1464 Mutterkultur	T1464 MC	Nein	α, β, γ - WT	Transduktion von eGFP
LV_2-sgPPAR αβ (T1464) C6	T1464 C6 β	PPAR αβ	PPAR β	Transduktion von eGFP
LV_2-sgPPAR α (T1464) H9 D7	T1464 H9 D7	PPAR α	PPAR α - WT #	Sequenzierung
LV_2-sgPPAR α (T1464) H9 E4	T1464 H9 E4	PPAR α	PPAR α - WT #	Sequenzierung
T1440 Mutterkultur	T1440 MC	Nein	α, β, γ - WT	Behandlungen gefolgt von BrdU-ELISA / ICC
LV_2-sgPPAR βγ (T1440) G5 E6	T1440 G5 E6 βγ	PPAR βγ	PPAR βγ	Behandlungen gefolgt von BrdU-ELISA / ICC
LV_2-sgPPAR βγ (T1440) B4	T1440 B4 γ	PPAR αγ	PPAR γ	Behandlungen gefolgt von BrdU-ELISA / ICC
T1495 Mutterkultur	T1495 MC	Nein	α, β, γ - WT	Behandlungen gefolgt von BrdU-ELISA / ICC
LV_2-sgPPAR αγ (T1495) B9 F4	T1495 B9 F4 γ	PPAR αγ	PPAR γ #	Sequenzierung, Behandlungen gefolgt von BrdU-ELISA / ICC
LV_2-sgPPAR αγ (T1495) B9 D10	T1495 B9 D10 γ	PPAR αγ	PPAR γ #	Sequenzierung, Behandlungen gefolgt von BrdU-ELISA / ICC
LV_2-sgPPAR αβ (T1495) D3 F5	T1495 D3 F5 β	PPAR αβ	PPAR β	Behandlungen gefolgt von BrdU-ELISA / ICC
LV_2-sgPPAR αβ (T1495) C4 E10	T1495 C4 E10 β	PPAR αβ	PPAR β	Behandlungen gefolgt von BrdU-ELISA / ICC
LV_2-sgPPAR αβ (T1495) C4 G8	T1495 C4 G8 β	PPAR αβ	PPAR β	Behandlungen gefolgt von BrdU-ELISA / ICC

Der Editierungsstatus der Klone wurde zum Teil durch Frau Alison Naujack und Frau Clara Trost bestimmt (C. Zechel, persönliche Mitteilung). #: Editierungsstatus in der vorliegenden Arbeit bestimmt, WT: Wildtyp

2.1.2 Bakterienstämme, Vektoren und HEK-Zellen

Für die TOPO-TA-Klonierung wurden kompetente DH5α-Bakterien eingesetzt. Der Genotyp lautet wie folgt: F- ϕ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rK–, mK+) phoA supE44 λ– thi-1 gyrA96 relA1 tonA

Die HEK293T-Zellinie ist eine menschliche embryonale Nierenzelllinie, die mit dem Adenovirus 5 stabil transformiert wurde. Außerdem besitzt die verwendete HEK293T-Zelllinie eine mutierte Version des SV40 large T-Antigen, das die episomale Replikation eines transfizierten Plasmids mit SV40 Replikationsursprung erlaubt (Lin et al., 2014). Die Zelllinie wird zur Herstellung lentiviraler Partikel verwendet und wird in F-Medium (siehe Tab. 3) kultiviert und expandiert.

Der Vektor pLJM1-EGFP zur lentiviralen Transduktion des *enhanced green fluorescent* Proteins wurde von Addgene (Cambridge, MA, USA) bezogen. Viruspartikel, die diesen Vektor tragen, sind replikationsdefizient. Der Vektor trägt einen SV40-Replikationsursprung und kodiert für eine Puromycinresistenz (s. Vektorkarte in Abb. 39, im Anhang). Für die Herstellung der Virionen in HEK293T-Zellen wurden weiterhin die Plasmide psPAX2 und pCMV-VCV-G benötigt. Das Plasmid psPAX2 trägt die Gene für das Kapsid (*group-specific-antigen*; *gag*) und den Polymerase Lokus (*pol*) (s. Vektorkarte in Abb. 37, im Anhang). Das zweite für die Virusherstellung notwendige Plasmid kodiert für das V*esicular Stomatitis Virus* Glykoprotein, das in die Lipidhülle der Viren integriert wird. Das Plasmid pCMV-VSV-G ermöglicht einen breiten Tropismus der Virionen (s. Vektorkarte Abb. 38, im Anhang).

2.1.3 Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Tabelle 2: Puffer und Lösungen

Name	**Reagenzien und Konzentrationen**
1x PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCL, 6,5 mM Na2HPO4, 1,5 mM KH2PO4
1x TBE (Agarosegele)	89 mM Tris-Base, 1mM EDTA (pH 8.0) 89 mM Borat-Salz
Sol 1	50 mM Glukose, 25 mM Tris HCL (ph 8.0), 10 mM EDTA (ph 8.0)
Sol 2	0,2 M NaOH, 1% (w/v) SDS
Sol 3	60 mL 5 M Kaliumacetat, 11,5 ml Eisessig, 28,5 mL Wasser (pH 4,5)
Coomassie-Entfärber	7,5% Essigsäure (v/v), 25% Ethanol (v/v)
Coomassie-Färbelösung	0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250 (w/v), 10% Essigsäure (v/v), 50% Ethanol (v/v)
ICC-Fixierlösung	95% Ethanol (v/v), 5% Eisessig (v/v)
BrdU-Fixierlösung (Roche-Kit)	70 % (v/v) absoluter Ethanol (p.A.), 23 % (v/v) MilliQ H2O, 7 % (v/v) 25 % HCl
BrdU-Waschlösung (Roche-Kit)	DMEM mit 10% FCS
2x HBS	280 mM NaCl, 50 mM Hepes, 1,5 mM Na_2HPO_4; pH-Wert exakt auf 7,12 mit 1 N NaOH einstellen

JLB-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 10% Glycerol (v/v), 0,5% Triton-X 100 (v/v)
Laemmli-Puffer (2x)	25 ml SDS-PAGE Sammelgelpuffer, 40 ml 10% SDS (w/v), 20 ml 85% Glycerol (v/v), 10 ml 2-Mercaptoethanol, 5 ml 2,5% Bromphenolblau (w/v)
SDS-PAGE Elektrophoresepuffer (5x)	25 mM Tris-Base, 0,2 M Glycin, 0,1% SDS (w/v)
SDS-PAGE Sammelgelpuffer	12 g Tris-Base in 160 ml H_2O dest. lösen, mit HCl konz. auf pH 6,8 einstellen, 2 ml 10% SDS (w/v) zugeben und mit H_2O dest. auf 200 ml auffüllen
SDS-PAGE Trenngelpuffer	6,3 g Tris-Base in 160 ml H2O dest. lösen, mit HCl konz. auf pH 8,8 einstellen, 2 ml 10% SDS zugeben, mit H2O dest. auf 200 ml auffüllen
TEN-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA (pH 8), 100 mM NaCl
1x TE	10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA (pH 8)
0,1 x TE	1:10 Verdünnung von 1x TE (pH 7,5) mit H_2O bidest/steril
TE/RNase	5 µl RNase-Mix (Tab. 6) in 1 ml 1x TE (pH 7,5)
Western Blot Blockpuffer	1x PBS mit 2% Trockenmilch (w/v)
Western Blot Transferpuffer	5,8 g Tris-Base + 2,9 g Glycin 10% SDS (v/v) 800 ml H_2O dest. lösen, danach 200 ml Methanol zugeben
Western Blot Waschpuffer	1x PBS, 0,5% Tween 20 (v/v)

EDTA: Ethylendiamintetraacetat; TBE: TRIS-Borat-EDTA; PBS: phosphate buffered saline; SDS: sodium dedecyl sulfate; PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis

Tabelle 3: Zellkulturmedien

Name	**Reagenzien und Konzentrationen (Hersteller)**
Basismedium (für N-Medium)	96% DMEM/Ham's F12 Medium (Biochrom, Berlin, D) 2% 200 mM L-Glutamin-Lösung (PromoCell, Heidelberg, D) 1% Penicillin/Streptomycin-Gemisch (PromoCell, Heidelberg, D) 1% Amphotericin (PromoCell, Heidelberg, D)
N-Medium (serumfreies Medium für SLGCs)	80% Basismedium 20% BIT 9500 (PELOBiotech GmbH, Planegg, D) hu rEGF (20 ng/ml) (PromoCell, Heidelberg, D) hu rbFGF (20 ng/ml) (PromoCell, Heidelberg, D)
F-Medium (Medium für HEK293T)	89 % (v/v) DMEN (Biochrom, Berlin) 10 % (v/v) FCS (Gibco, Karlsruhe) 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (PromoCell, Heidelberg)

Tabelle 4: Bakterielle Medien und Agarplatten

Name	**Hersteller**
LB-Medium	20 g LB Broth, Pulver (Lennox) / 1L MilliQ H20
LB-Medium mit Ampicillin	500 µL Ampicillin Lösung (final: 100µg /ml / 1L LB-Medium)
LB/Amp-Agar Platten (OJA) Platten	20 g LB Agar, 1 ml X-Gal Lösung (10% (w/v)), 500 µL Ampicillin (final 100 µg/ml/1 L LB-Lösung)

LB: Luria-Bertani medium; x-gal: 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid ; AMP: Ampicillin

Tabelle 5: Einmalplastikpipetten und weiteres Verbrauchsmaterial

Material	**Hersteller**
Chamber *slides*	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, D
Deckgläser	Thermo Scientific, Braunschweig, D
Einmalplastikpipetten (1, 2, 5, 10, 25 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen. D
Einmalplastikspitzen für 8-Kanalpipetten	Starlab, Ahrensburg, D
Filterpapiere	Schleicher & Schuell Bioscience, Dassel, D
PCR-Reaktionsgefäße (0,2ml)	Biozym, Oldendorf, D
Reaktionsgefäße (0,75 ml, 1,5 ml, 2,2 ml)	Eppendorf, Hamburg, D
Zellkulturgefäße (25cm^2, 75cm^2) Zellkulturplatten (96-, 24-, 6-Lochplatten) Zellkulturschalen	Greiner bio-one, Frickenhausen, D Greiner bio-one, Frickenhausen, D Greiner bio-one, Frickenhausen, D
Petrischalen	Greiner bio-one, Frickenhausen, D
Einmalplastikröhrchen Rundboden (12 ml, 50 ml)	Greiner bio-one Frickenhausen, D
Plastikröhrchen mit Schubdeckel	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, D
0,45 µm PES-Filter	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, D
Nitrozellulosemembran	BioRad, München, D

PES: Polyethersulfon

Tabelle 6: Enzyme und Kits

Name	Hersteller
BrdU – Labelling and Detection Kit III	Roche, Mannheim, D
BrdU Cell Proliferation Assay Kit #6813	Cell Signaling Technology, Danvers,USA
DNeasy	Qiagen, Hilden, D
NucleoSeq®Sequencing Reaction Clean-Up NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit	Machery-Nagel, Düren, D Machery-Nagel Düren), D
TOPO®TA Cloning®Kit	Thermo Fischer Scientific, Schwerte, D
BigDye®Terminator v3.1 cycle sequencing Kit	NimaGen, Nijmegen, NL
Proteinase K (600 U/ml)	Roche Applied Science, Mannheim, D
Taq Polymerase (5 U/µl) mit 10x Puffer	VWR International, Pennsylvania, USA
EcoRI mit 10x Puffer	Promega, Madison, USA
RNase Cocktail Enzym Mix	Thermo Fischer Scientific, Schwerte, D

EcoR1: Nuklease aus Escheria Coli Stamm R; Taq: Thermus aquaticus; TOPO: topoisomerase I;

Tabelle 7: Biochemikalien und weitere Reagenzien

Chemikalien / Reagenzien	Hersteller
6x Orange Loading DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, D
6x DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, D
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe, D
Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0,8%)	BioRad, München, D
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma-Aldrich, München, D
Ampicillin-Stammlösung (100 mg/mL)	Roth, Karlsruhe, D
Bradford-Reagenz 5x	BioRad, München, D
Chloroform	Merck, Darmstadt, D
Coomassie Brilliant Blue R-250	ICN Biomedicals, Aurora, USA
dNTP-Mix 10 mM	VWR, Haasrode, D
DAPI (4’,6-Diamidin-2-phenylindol) (50 µg/mL)	Roth, Karlsruhe, D
EDTA (Ethylendiaminintetraessigssäure)	Sigma-Aldrich, München, D
Eisessig (p.A.)	Sigma-Aldrich, München, D
Ethanol 100 % (p.A)	J.T Baker, Deventer, NL
Ethanol 70 % (p.A)	J.T Baker, Deventer, NL
Ethidium bromid (10 mg/ml)	BioRad, München, D

FCS (Fetal Calf Serum)	Gibco, Thermo Scientific, Schwerte, D
Fibronektin (1 mg/ mL)	Promocell, Heidelberg, D
Fluoromount-G®	Southern Biotech, Alabama, USA
Gene Ruler 1 kB Plus DNA Ladder	Thermo Fischer Scientific, Schwerte, D
HiDi™ Formamid	Thermo Fischer Scientific Schwerte, D
LB Broth, Powder (Lennox)	Thermo Fischer Scientific Schwerte, D
LE Agarose	Biozym, Oldendorf, D
NaOH (Natriumhydroxid)	Sigma-Aldrich, München, D
Natriumazid (0,2 %-ige Lösung)	Merk, Darmstadt, D
Nuklease freies Wasser	Ambion, Darmstadt, D
PIC (Proteinase Inhibitor Cocktail)	Roche, Mannheim, D
Polybrene	Sigma-Aldrich, München, D
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Merck, Darmstadt, D
Roti-Phenol	Roth, Karlsruhe, D
SpectraTM Multicolor Broad Range Protein Ladder	Fermentas/ThermoScientific, Schwerte, D
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Clarity MaxTM Western ECL-Substrate (Western Blot - Detektionslosung)	BioRad, München, D
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Sigma-Aldrich, München, D
Temodal (Temozolomid)	MSD Sharp & Dohme, Haar, D
Tris-Base	Sigma-Aldrich, München, D
Trockenmilchpulver	Roth, Karlsruhe, D
Trypanblau (0,4%)	Fluka Analytical, Seelze, D
Trypsin/EDTA (0,05%)	Gibco, Thermo Fischer Scientific, Schwerte, D
X-Gal	Invitrogen GmBH, Carlsbad, USA

LE: Low electroendosmosis; dNTP: desoxyribunukleotide; X-Gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactopyranoside

Weitere Chemikalien und Salze, wie HCl, KCl, NaCl, EDTA, diverse Natrium- und Kaluimphosphate, NaOH und Methanol, wurden von Merck (Darmstadt, D), Roth (Karlsruhe, D) und Fluka Analytical (Seelze, D) bezogen.

Tabelle 8: Geräte

Gerät	**Hersteller**
Mikroliter-Pipetten:	
Gilson (P20/P200/P1000)	Gilson, Middletown, WI, USA
Labmate (10µl/100µl)	High Tech, Warschau, PL
8-Kanal-Pipette (CAPP 5-50 µl, 50-300 µl)	Starlab, Ahrensburg, D
Biozero 8000 Fluoreszenzmikroskop	Keyence, Neu-Ilsenburg, D
Brutschrank Galaxy 170S	Eppendorf New Brunswick, Hamburg, D
EasyPhor Midi Gelektrophorese-Kammer & Kamm	Biozym, Oldendorf, D
Heizblock	ETG, Immenau, D
Heraeus Pico Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, D
Leica DMil Lichtmikroskop	Leica Microsystem, Wetzlar, D
Micro Zentrifuge ROTILABO	Roth, Karlsruhe, D
Molecular Imager Chemie Doc XRS	BioRad, München D
Neubauer Zählkammer	Karl Heckt KG, Sondheim, D
New Brunswick Galaxy 170 S high-capacity CO_2 Incubator	Eppendof New Brunswick, Hamburg, D
New Brunswick Innova 42 Incubator Shaker	Eppendof New Brunswick Hamburg, D
Safe 2020 S2 Bank	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, D
Sequencer (3130) Genetic Analyzer	Thermo Fischer Scientific, Schwerte, D
T100TM Thermal Cycler	Biorad, München, D
Vortex Genie 2	Bender & Hohbein AG, Zürich, CHE
VX-65 Autoklav	Systec, Osnabrück, D
Zentrifuge Rotina 380R	Hettich, Kirchlengern, D
Tecan Mikroplatten Reader	Tecan Trading AG, CHE
Mini-Protean III Cell für SDS-PAGE	Biorad, München, D
Elektrophoresekammer; Horizon 11.14 MidiLarge	Biometra, Göttingen, D
Transblot SD	Biorad, München, D

Tabelle 9: Primer für PCR und/ oder Sequenzierung

Primer	**Sequenz**	**T_A (°C)**
HuPPAR a-Int3/4-F2	5'-CCT CAG CAC TAG AAG CCT CG-3´	64
HuPPAR a-Int4/5-R2	5'-GTC AGT TTC TTA TCC GGG ACT T- 3´	64
HuPPAR b/d-Int3/4-F1	5'-CTC CAT CGT GTG TCC GCA G-3'	62
HuPPAR b/d-Int4/5-R1	5'-GCT GGG TCA CAC AGG TGC-3'	62
HuPPAR g-Int2/3-F1	5´-CAT GAA GGT GTA CTA TGG TGG-3'	62
HuPPAR g-Int3/4-R1	5`-CAG TGT GCT AGG ATA GCA CC-3'	62
GFP_F1:	5'-AAG GGC GAG GAG CTG TTCA C-3'	64
GFP_F2:	5'-ACC ACA TGA AGC AGC ACG AC-3'	62
GFP_F3:	5'-ACC ACT ACC TGA GCA CCC AG-3'	64
GFP_R1:	5'-GTG GTG CAG ATG AAC TTC AGG-3'	64
GFP_R2:	5'-CTC GAT GCG GTT CAC CAG G -3'	62
GFP_R3:	5'-CGT CCA TGC CGA GAG TGA TC -3	64
M13_62_F-ex	5'- GTT GTA AAA CGA CGG CCA GTG –3'	61
M13_62_R-ex	5'- TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA C-3'	61

T_A (°C), *annealing* Temperatur in Grad Celcius; F: Forward, R: Reverse, Int: Intron, HU: Human; PPAR: Peroxisomen-Proliferator-aktivierter-Rezeptor α (a), β/δ (b/d), γ (g); GFP, *green fluorescent protein*.

Tabelle 10: Sequenzen der Guide RNA

Gen (Exon)	**Guide-RNA / PAM**
PPAR α (Exon 4)	5'-GAG CTT CGA GCC CCT CCT CGG-3'
PPAR β/ δ (Exon 4)	5'-CAG CCT CAA CAT GGA GTGCC GGG-3'
PPAR γ (Exon 3)	5'-GCA ATT GAA TGT CGT GTCTG TGG-3'

PPAR: Peroxisomen-Proliferator-aktivierter-Rezeptor

Tabelle 11: Software und Datenbanken

Software	**Hersteller**
Chromas	Technelysium Pty Ltd, south Brisbane, AUS
Corel Draw	Corel, Ottawa, CAN
Corel Paint	Corel, Ottawa, CAN
ENSEMBL Datenbank	European Bioninformatics Insititue, Cambridge, GB
Quantity One	BioRad, München, D
MicroWin 2000	Labsis Laborsysteme GmbH, Neunkirchen-Seelscheid, D
Magellan Software	Tecan Trading AG, CHE
BZ-9000 Observation Application	Keyence, Neu-Ilsenburg, D
GraphPad Prism 9.1.2	GraphPad Software, Boston, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Charakterisierung editierter Zelllinien

2.2.1.1 Extraktion genomischer DNA

Für die Extraktion genomischer DNA wurde das DNeasy Kit von Qiagen verwendet. Zuerst wurden die Zellpellets in 200 µl PBS suspendiert. Danach wurden zu jedem der Reaktionsansätze 20 µl Proteinase K (Kit-Komponente) gegeben. Anschließend wurden zu jedem Reaktionsansatz 200 µl Puffer AL (Kit-Komponente) gegeben. Die Reaktionsansätze wurden für 1h bei 56 °C im Heizblock inkubiert und danach Raumtemperatur temperiert. Danach wurden 200 µl 100% Ethanol zu jedem Reaktionsansatz gegeben und durch Schnippen und Invertieren gemischt. Der gesamte Inhalt jedes Reaktionsansatzes wurde anschließend auf je eine DNeasy Spin Column überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 10.000 x g für 1 min bei Raumtemperatur. Der Durchfluss wurde verworfen und anschließend mit 500 µl Buffer AW1 (Kit-Komponente) je Säule gewaschen, wobei erneut 1 min bei 10.000 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert wurde. Der Durchfluss wurde verworfen und danach jede Säule 500 µl Buffer AW2 (Kit-Komponente) gewaschen. Anschließend wurden die Säulen bei 10.000 x g für 3 min bei Raumtemperatur trockenzentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Im nächsten Schritt erfolgte die Elution mit Buffer AE (Kit-Komponente). Das Volumen des Buffer AE war variabel, und wurde in Abhängigkeit der Größe des eingesetzten Zellpellets zwischen 50 und 100 µl gewählt. Nach Zugabe des Buffers AE wurden die Reaktionsansätze für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. und danach für 1 min bei Raumtemperatur und 10.000 x g zentrifugiert. Im Anschluss wurde 5 µl des Eluates zur Analyse auf einem 0,5% TBE-Agarosegel aufgetrennt (siehe 2.2.1.2). Die Lagerung der genomischen DNA (gDNA) erfolgte bei 4° Celsius.

2.2.1.2 Agarose Gelelektrophorese

Zur Analyse von gDNA, PCR-Produkten und Plasmiden wurden TBE-Gelelektrophorese angefertigt. Die Konzentration des Gels war abhängig von der Fragmentlänge (Tab. 12). Für gDNA und unverdaute Plasmide wurde Tri-Track Loading Dye (Tab. 7) eingesetzt. Für PCR-

Produkte, und Eco-R1 verdaute Plasmide wurde 6x Orange Loading Dye (Tab. 7) verwendet. Für die Herstellung der Gele wurde die benötigte Menge Agarose abgewogen und in 50ml 1x TBE-Puffer in der Mikrowelle gelöst. Die Lösung wurde auf ca. 50 Grad Celsius temperiert und anschließend 1 µl Ethidiumbromid (Tab. 7) zugegeben und in die Gelküvette gegossen. Zur Größenbestimmung wurden 5 µl bzw. 3 µl 1kb Plus DNA Ladder (Tab. 7) parallel aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte für 20 min bei 100 V, die Detektion am Chemie Doc XRS (Tab. 8).

Tabelle 12: Konzentrationen der TBE-Agarose Gele in Abhängigkeit der Fragmentlänge

DNA-Typ	**Agarosekonzentration**	**Fragmentlänge (bp)**
Genomische DNA	0,5 %	größer 50.000
Unverdaute, rekombinante Plasmid DNA	1 %	ca. 4200
Restriktionsverdautes Plasmid	1,6 %	3.900 + ca. 300
PCR-Produkte	1,6 %	ca. 300

2.2.1.3 Polymerase Ketten Reaktion

Die Polymeraseketten-Reaktion (PCR) wurde nach Green und Sambrook (2012) durchgeführt. Es wurde mit einem *Mastermix* gearbeitet, der alle Komponenten, bis auf das Template enthielt (Tab. 13). Das Endvolumen betrug für analytische Ansätze 20 µl, für präparative 50 µl. Für analytische Ansätze wurden 19 µl, für präparative Ansätze 49 µl Mastermix in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße pipettiert und danach 1 µl DNA-Template dazugegeben.

Tabelle 13: Komponenten des PCR-Mastermixes

Reagenz	**Volumen µl**	
	Analytisch	**Präparativ**
Nuklease freies Wasser	12,5	31,25
Forward Primer (10pM)	2	5
Reverse Primer (10pM)	2	5
dNTP-Mix (10mM)	0,4	1

10x Taq-puffer	2	5
Taq-Polymerase	0,2	0,5
DNA-Template	0,5-1	1

dNTP: desoxy-Nukleosidtriphosphate; Taq: thermostabile DNA-Polymerase Bakteriums Thermus aquaticus

Das PCR-Programm begann mit einer initialen Denaturierung für 3 min bei 94°C. Danach folgten 30-40 Zyklen von (I) Denaturierung (30 sec, 94°C), (II) *primer-annealing* (30 sec, 62°C), und (III) DNA-Synthese (30 sec, 72°C). Zum Schluss folgte ein finaler Syntheseschritt für 7-10 min bei 72°C, gefolgt von der Abkühlung auf 4°C.

2.2.1.4 Reinigung von PCR-Fragmenten

Zur Reinigung der PCR-Fragmente wurden diese auf einem 1,6% Elektrophorese Gel aufgetragen und danach die gewünschten DNA-Fragmente auf einem Transilluminator ausgeschnitten. Anschließend wurden die Proben mittels des NucleoSpin Gel und PCR Clean UP-Kit von Machery-Nagel nach Herstellerangaben gereinigt. Dazu wurden die Gelstücke gewogen und pro 100 mg Agarose 200 µl NTI-Puffer (Kit-Komponente) hinzupipettiert. Die Agarose wurde danach geschmolzen und auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Lösung wurde auf eine Spin Säule pipettiert und für 30 sec bei 10000 xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule zweimal mit NT3 Puffer (Kit-Komponente) gewaschen. Anschließend wurde die Säule für 1 min und 10.000 xg bei Raumtemperatur trockenzentrifugiert. Je nach Menge des auf dem Agarosegel beobachteten PCR-Produktes wurde mit 15-30 µl Elutionspuffer (Kit-Komponente) eluiert, dabei wurde nach Zugabe des Elutionspuffers für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde für 1 min bei 10.000 xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Je 1/10 der Eluate wurde auf einem 1,6% TBE-Agarosegel aufgetrennt. Die Lagerung der Eluate erfolgte bei -20°C.

2.2.1.5. TOPO TA Cloning und Transfektion kompetenter Bakterien

Für die TA-Klonierung (Green & Sambrook, 2012) wurden mit der Taq Polymerase hergestellte, gereinigte PCR-Produkte und das TOPO®TA Cloning®Kit von Thermo Fischer Scientific nach Herstellerangaben eingesetzt. Der linearisierte Vektor weist einen 3‘ T-Überhang auf, an dem die Topoisomerase des Vacciniavirus gebunden ist. Die Topoisomerase katalysiert die Bildung einer Phosphodiester-Bindung zwischen dem A‘ Überhang des PCR-Produktes und dem T-Überhang des Vektors. Der Vektor besitzt eine Ampicillin-Kanamycin-Resistenz und ermöglicht bei Transformation von DH5α Bakterien eine Blau/Weiß Selektion auf OJA-Platten. Für jeden Ansatz wurden 0,5 – 2 µl PCR-Produkt mit 1 µl *Salt Solution* und 1 µl pCR™2.1 TOPO in 6 µl Reaktionsvolumen inkubiert. Als Modifikation zum Herstellerprotokoll wurde die Inkubationszeit auf 30 min verlängert. Anschließend wurde jeder Reaktionsansatz zu einem Aliquot (100 µl) chemisch kompetenter Bakterien pipettiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte für 90 sec ein Hitzeschock bei 42°C und eine erneute Inkubation für 5 min auf Eis. Die chemisch kompetenten Bakterien wurden von Kollegen in der Arbeitsgruppe hergestellt. Die transfizierten Bakterien wurden zunächst für 45-60 min bei 37°C in 500 µl LB-Medium (ohne Antibiotika) schüttelnd inkubiert. Danach wurden die Ansätze auf OJA-Platten ausgestrichen und die Platten für 16 h bei 37°C inkubiert.

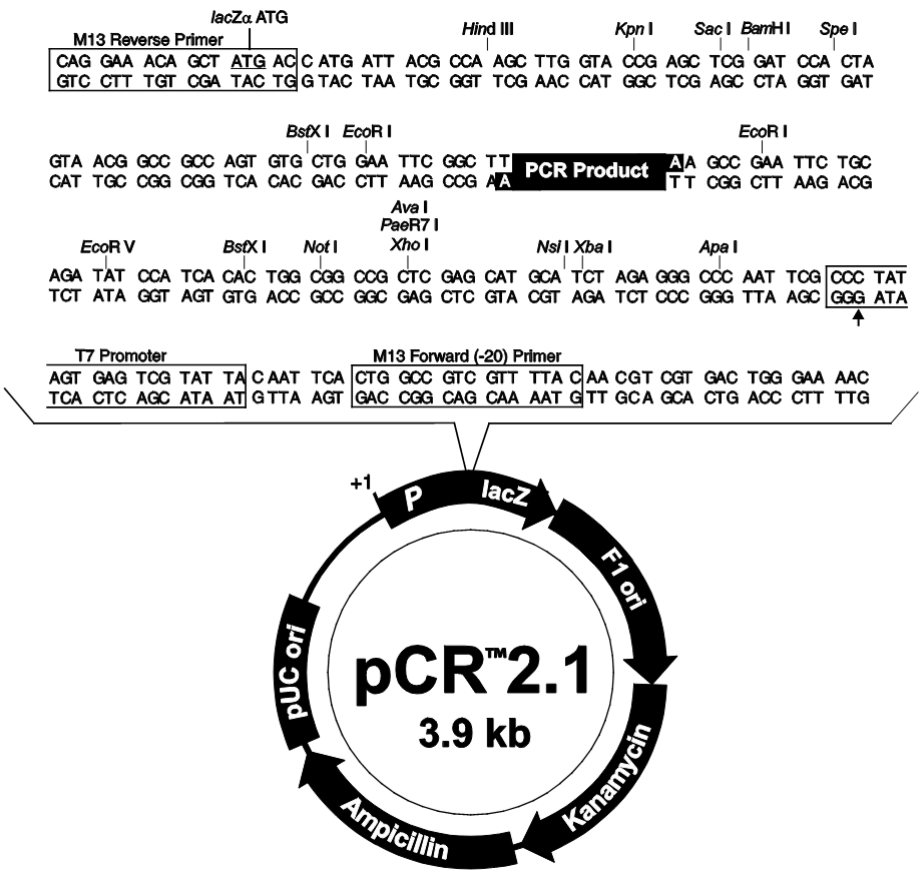

Abbildung 3: pCR™ 2.1-Vektor Der linearisierte Vektor enthält eine kovalent gebundene Topoisomerase, und ermöglicht eine Ligation mit PCR-Produkten. Die Stelle für die Insertion des PCR-Produktes wird von zwei EcoR I-Restriktionsstellen flankiert. Des Weiteren trägt der Vektor eine Kanamycin -/Ampicillin Resistenz und das LacZa-Gen, das eine Blau/Weiß Selektion in DH5α Bakterien ermöglicht. Ori: Origin of replication; M13: Sequenz aus M13-Phagen, die für die Sequenzierung genutzt wird. https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/de/de/K200001

2.2.1.6 Plasmid Minipräparation

Jeweils 3 ml ampicillinhaltiges LB-Medium wurden in sterile Röhrchen mit Schubdeckel (Tab. 5) überführt. Jede Minikultur wurde mit einer Bakterienkolonie beimpft und bei 37°C und 200 RPM im Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden je 1,4 ml Bakterienkultur in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Bakterien für 1 min bei 20.000 xg und Raumtemperatur pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 100 µl Sol 1 (Tab. 2) gelöst. Danach wurden je 200 µl Sol 2 (Tab. 2) dazugegeben und gemischt, bis die Lyse vollständig war. Danach wurden die Ansätze 10 min auf Eis gestellt. Im nächsten Schritt wurden 150 µl Sol 3 (Tab. 2) pipettiert und so lange gevortext und invertiert bis ein käsiger Niederschlag entstanden war. Es folgte eine weitere Inkubation

für 10 min auf Eis und danach eine Zentrifugation für 15 min bei 20.000 xg und Raumtemperatur. 400 µl des plasmidhaltigen Überstandes wurden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 200 µl Roti-Phenol (Tab. 7) gemischt. Anschließend wurden 200 µl Chloroform (Tab. 7) dazugeben und erneut gevortext. Zur Phasentrennung wurde für 8 min bei 10.000 xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde die wässrige Phase mit 850 µl 100% Ethanol vermischt, um die Plasmid DNA zu fällen. Zur Vervollständigung der Fällung wurden die Ansätze für 30 min bei -20 Grad Celsius inkubiert. Danach wurden die Ansätze zunächst wieder auf RT temperiert. und danach für 15 min bei 20.000 xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Plasmidpellets mit 70% Ethanol gewaschen. Anschließend wurde für 30 sec bei 20.000 xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Danach wurden die Pellets luftgetrocknet und schließlich in je 50 µl TE/RNAse (Tab. 6) gelöst. Die Lagerung der Plasmide erfolgte bei -20°C.

2.2.1.7.Analyse der rekombinanten Plasmide

Zunächst wurden 5 µl der Plasmide auf einem 1% TBE-Agarosegel aufgetrennt. Zur weiteren Charakterisierung wurde ein Restriktionsverdau mit Eco RI (Tab. 6) und eine PCR durchgeführt. Für den Restriktionsverdau wurden 5 µl Plasmid mit 12,5 µl Nuklease freiem Wasser, 2 µl 10x EcoRI-Puffer und 0,5 µl Eco RI (Tab. 6) gemischt und für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Analyse erfolgte auf einem 1,6 % TBE-Agarosegel. Weiterhin wurden analytische PCRs (2.2.1.3) durchgeführt, wozu 0,5 – 1 µl Plasmid eingesetzt wurden. Auch hier erfolgte die Analyse auf 1,6 % TBE-Agarosegelen.

2.2.1.8 Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Produkten

Die Sequenzierung erfolgte unter Verwendung des BigDye®Terminator v3.1 cycle sequencing Kit (Tab. 6). Es wurden M13 Primer (Tab. 9) verwendet, welche 5´und 3´ der Insertion im Plasmid-Vektor binden. Der Reaktionsansatz enthielt 3,5 µl Sequenzierungspuffer (Kit-Komponente), 2 µl eines Primers, 1 µl BigDye (Kit-Komponente), sowie das DNA-Template (500-1000 ng) in 20 µl. Als Template dienten rekombinante TOPO-Plasmide oder gereinigte PCR-Produkte. Im Fall der Plasmide wurden der M13-forward oder M13-reverse Primer eingesetzt (Tab. 9), im Fall von PCR-Produkten der 5‘ oder 3‘

Primer, der zuvor für die Herstellung der PCR-Produkte genutzt wurde. Die Reaktion wurde im T100 TM Thermal Cycler (Biorad, München DE) durchgeführt und umfasste folgende Schritte: Zunächst fand eine initiale Denaturierung für 3 min bei 96°C statt. Anschließend folgten 25 Zyklen Denaturierung (10 sec, 98°C), Primer annealing (10 sec, primerabhängige Temperatur) und Elongation (90 sec, 50°C). Es schloss sich ein finaler Elongationsschritt für 1 min bei 50°C an. Danach wurde auf 4°C gekühlt.

Zur Reinigung der Produkte der Sequenzreaktion wurde das Nucleo-Seq Kit von Machery und Nagel (Tab. 6) nach Herstellerangaben mit geringen Modifikationen verwendet. Am Vortag wurden die Säulen mit sterilem, bidestillierten Wasser rehydratisiert. Dabei wurde das Zucker-Resin nach der Zugabe des Wassers gevortext und anschließend die Luftblasen durch Klopfen entfernt. Am Folgetag wurde zunächst der Verschluss von den Säulen entfernt. Danach wurden die Säulen für 5 min bei 3000 RPM in der Pico Tischzentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurden die Sequenzierungsansätze mittig auf die Säulen pipettiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden die Säulen in einem sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäß wie oben beschrieben zentrifugiert. Das Eluat wurde mit 20 µl HIDI (Tab. 7) versetzt und für 2 min im Heizblock bei 92°C inkubiert. Die Proben wurden entweder unmittelbar analysiert oder bei -20 °C gelagert. Die Analyse erfolgte im Sequencer (3130) Genetic Analyzer (Tab. 8) der AG Hiort/ Werner. Die Sequenzauswertung wurde mithilfe der Software Chromas und online am ENSEMBL Genome Browser (Tab. 11) durchgeführt.

2.2.2 Arbeiten mit Zellen

2.2.2.1 Passagieren und Plattieren von SLGC-Linien und Klonen

Die Zellen wurden in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37 C und 5 % CO_2 Begasung im Brutschrank (Tab. 8) kultiviert. Die SLGC-Linien wurden in serumfreiem N-(NSC-) Medium kultiviert und die Zellen nach Bedarf passagiert. Für die Passage wurde zunächst das Medium entfernt. Bei adhärent wachsenden Zellen war dies durch Abgießen möglich, bei Suspensionskulturen wurden die Sphäroide in ein Einmalplastikröhrchen überführt und für 3 min bei 250 xg (Tab. 5) und Raumtemperatur pelletiert. Die adhärenten Zellen bzw.

die Zellpellets wurden mit 1x PBS gewaschen. Dieser Schritt entfernt Mediumreste, welche die nachfolgende Trypsinisierung inhibieren könnten. Im nächsten Schritt wurden die adhärenten Zellen bzw. Pellets mit 1 ml Trypsin/EDTA (Tab. 7) enzymatisch und mechanisch mit einer sterilen Pasteurpipette dissoziiert. Die Trypsinisierung wurde mit einer äquivalenten Menge N-Medium gestoppt. Die Suspension der zuvor adhärenten Zellen bzw. der Zellpellets wurden in ein steriles Einmalplastikröhrchen überführt und für 3 min bei 250 xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgegossen und die Zellen mittels Pasteurpipette in 1 ml N-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde daraufhin in der gewünschten Verdünnung in neue T25 Zellkulturflaschen, 96-Lochplatten oder *chamber slides* überführt. Überschüssiges Zellmaterial wurde mit 1x PBS in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gewaschen, pelletiert (1 min 10000 xg) und bei -20°C gelagert.

Mit den adhärenten HEK293T-Zellen wurde analog zu den adhärenten SLGCs verfahren, mit dem Unterschied, dass hier F-Medium (Tab. 4) zum Einsatz kam.

2.2.2.2 Zählen von Zellen

Für die Behandlungsexperimente war es erforderlich die Zellzahl zu bestimmen. Die Zellen wurden wie oben beschrieben geerntet und 20 µl der Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau in einem 1,5 ml. Reaktionsgefäß gemischt. Anschließend wurden 20 µl der Zellsuspension in der Neubauer Zählkammer und unter dem Mikroskop ausgezählt. Der Faktor der Zählkammer betrug $1x10^4$.

2.2.2.3 Immunzytochemische Färbung von Zellen

Tabelle 14: Primäre und sekundäre Antikörper für die ICC

Antikörper (Klon/Bestellnummer)	**Hersteller**	**Verdünnung**
Mouse anti-CD133 (W6B3C1) (#130-092-395)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D	1:200
Rabbit anti Sox2 (D6D9) (#3579)	Cell Signaling Technology, Cambridge, GB	1:100
Mouse anti PML (#ab96051)	Abcam, Cambridge, GB	1:400
Rabbit anti γH2AX (#9718)	Cell Signaling Technology, Cambridge, GB	1:200
Rabbit anti Tau (#pAB-A0024)	Dako, Glostrup, DK	1:100
Goat anti-rabbit Cy3 (#111-165-003)	Jackson Immunotech, Cambridge, GB	1:300
Goat anti-mouse Dy-Light ® 488 (#96871)	Thermo Scientific, Schwerte, D	1:300

Für die immuncytochemische Färbung wurden die Zellen gezählt und in einer Dichte von $1x10^4$ Zellen/cm^2 plattiert; die Analyse erfolgte auf Kammerobjekträgern (*chamer slides*, Tab. 6) mit acht Kammern. Pro Kammer wurden 500 µl N-Medium eingesetzt. Einen Tag nach Plattierung wurden die Zellen in den *chamber slides* mit Temozolomid (TMZ), Fenofibrat oder beiden Reagenzien behandelt. Dabei richtete sich die eingesetzte Konzentration an TMZ nach dem MGMT-Status der SLGC-Linie. Fenofibrat wurde dagegen stets in einer Konzentration von 10^{-4} M eingesetzt. Da die zugegebenen Reagenzien in DMSO gelöst waren, wurden die Kontrollen stets mit der identischen DMSO-Konzentration behandelt, wie die TMZ- und/oder Fenofibrat- Ansätze. An Tag 5 nach der Behandlung wurden die *chamber slides* fixiert. Dazu wurde das Medium abgegossen und einmal mit 1x PBS gewaschen. Danach wurde für 7 min bei -20°C mit Ethanol/Eisessiglösung fixiert. Es folgten drei Waschritte für 10 min mit 1x PBS bei Raumtemperatur. Nach dem letzten Waschritt verblieb das 1x PBS bis zur Färbung auf den *chamber slides*. Die Lagerung der Präparate erfolgte bei 4°C.

Für die immuncytochemische Färbung wurde das 1x PBS verworfen und einmal mit frischem 1x PBS gewaschen. Dann wurde der Plastikaufsatz der *chamber slides* entfernt und jede Kammerposition mit einem Fettstift umrahmt. Danach erfolgte die Färbung mit dem primären Antikörper. Die Färbelösung enthielt zwei primäre Antikörper aus zwei verschiedenen Spezies (Tab. 14), 10% FCS und 0,02% Na-Azid in 1x PBS. Pro Feld wurden 25 µl Färbelösung aufgetragen. Es wurden die Antikörperkombinationen Maus-anti-CD133/Kaninchen-anti-Sox2 und Maus-anti-PML/Kaninchen-anti-γH2AX eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 16h in einer Feuchtkammer bei 4°C im Kühlraum. Am Folgetag wurde der Überstand des primären Antikörpers durch Waschen mit 1x PBS entfernt. Dazu wurden die Objektträger mit ca. 100 µl 1x PBS pro Feld überschichtet und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Waschschritt wurde 3-mal wiederholt. Die Färbelösung mit den beiden Sekundärantikörpern enthielt wiederrum 10% FCS, 0,02% Na-Azid, sowie PBS und die Cy3- und Dylight-gekoppelten Sekundärantikörper in den in Tabelle 16 angegebenen Verdünnungen. Alle Arbeitsschritte mit den sekundären Antikörpern erfolgten im Dunkeln, da die Antikörper lichtsensitiv sind. Nach der Inkubation für 1h bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer erfolgten drei Waschschritte mit ca. 100 µL 1x PBS pro Feld für 10 min bei Raumtemperatur. Danach wurden pro Feld 25 µl DAPI-Lösung (1:200 verdünnt in 1x PBS; Tab. 7) dazugeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Es folgten drei Waschschritte für 10 min bei Raumtemperatur mit 1x PBS. Danach wurde pro Feld ein Tropfen Fluoromount-G™-Lösung pipettiert, die Objektträger mit einem Deckglas eingedeckt und mit kommerziellem Nagellack verschlossen. Die Lagerung der Präparate erfolgte bei -20°C.

Die mikroskopische Auswertung erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop Biozero BZ-8000 (Tab. 8) und der Software BZ-9000 (Tab. 11). Die Belichtungszeiten wurden für alle Präparate identisch gewählt und waren zuvor in der Arbeitsgruppe empirisch ermittelt worden. Pro Behandlung und Präparat wurden zehn repräsentative Mikrofotografien aufgenommen. Da die Zellen Aggregate bilden, wurde zusätzlich das Prinzip der Z-Stack Fotografie eingesetzt. Die Bewertung des relativen Anteils an Sox2- bzw. γH2AX-positiven und Sox2- bzw. γH2AX-negativen Zellen erfolgte verblindet mit der Software Q-Path (Tab. 11) an jeweils 10 repräsentativen Mikrofotografien. Eine Auswertung hinsichtlich der CD133- und PML-Signale war aufgrund der geringen Signalstärke und diffusen Verteilung der Signale nicht sinnvoll.

2.2.2.4 Ermittlung der Zellproliferation mittels BrdU-ELISA

Für die Bestimmung der Zellproliferation wurde das BrdU-Labeling and Detection Kit III von Roche (Tab. 6) eingesetzt. Der der Hersteller die Produktion des Kits während der Durchführung der Analysen einstellte, musste für einen späteren Teil der Arbeit das BrdU Cell Proliferation Assay Kit #6813 von Cell Signaling (Tab. 6) verwendet werden.

Das Prinzip beider Kits beruht darauf, dass Zellen während der S-Phase das Basenanalogon BrdU (Bromdesoxyuridin) einbauen, und dies über einen Antikörper nachgewiesen wird. Damit gibt der BrdU-Einbau Auskunft über die Replikation der DNA und indirekt über die Proliferation von Zellen (Green und Sambrook, 2012). Für beide BrdU-Assays wurden die Zellen, wie oben beschrieben, mit Trypsin/EDTA geerntet, gezählt und in einer Dichte von 1x 10^4 Zellen/cm^2 in 96 Lochplatten plattiert. Die 96 Lochplatten wurden am Tag zuvor mit Fibronektin (1:100 in 1x PBS verdünnt) beschichtet. Dazu wurde die Fibronektinlösung über Nacht bei 37°C in den Platten inkubiert und am folgenden Tag dreimal mit 1x PBS gewaschen.

Einen Tag nach dem Plattieren wurden die mit Zellen TMZ und/oder Fenofibrat behandelt. Dabei wurden stets Fenofibrat-Konzentrationen von 10^{-3}, 10^{-4} und 10^{-5} M eingesetzt. Die

Doppelbehandlung mit Fenofibrat und TMZ erfolgte je nach MGMT-Status der SLGC-Linien mit 25 µM oder 50 µM TMZ. In allen Fällen wurden zusätzlich Einzelbehandlungen mit 25, 50 und 100 µM TMZ durchgeführt. Zwei Stunden nach der Zugabe der Testreagenzien wurden die Zellen mit einer BrdU-Verdünnung (1:50 in 1x PBS) behandelt. Die Analyse erfolgte am Tag d5 nach Zugabe der Testreagenzien mithilfe der oben genannten BrdU-Labeling and Detection Kits von nach Herstellerangaben mit leichten Anpassungen. Dazu wurde zunächst das Medium aus den Vertiefungen abgesaugt. Anschließend wurden die 96- Lochplatten pro Vertiefung mit 200 µl 1x PBS (beide Kits) gewaschen. Nach diesem Schritt unterschieden sich die beiden Protokolle.

Im Fall des BrdU-Labeling and Detection Kit III von Roche wurden die Zellen mittels auf -20°C temperierter BrdU-Fixierlösung (Tab. 2) für 30 min bei -20°C fixiert. Anschließend folgten drei Waschritte mit 200 µl BrdU-Waschlösung pro Vertiefung. Danach wurden je Vertiefung 100 µl verdünnte Nuklease-Lösung pipettiert und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Nuklease-Lösung für jeweils eine komplette 96-Lochplatte setzte sich aus 100 µl Nuklease und 9,9 ml Inkubationspuffer (Kit Komponente) zusammen. Anschließend erfolgten drei Waschschritte mit BrdU-Waschlösung. Danach wurde der anti-BrdU-Antikörper dazugegeben. Die Antikörper Lösung bestand aus 100 µl Antikörper (anti-BrdU-POD), 9,9 ml 1x PBS sowie 2% FCS pro 96-Lochplatte. Je Vertiefung in der 96 Lochplatte wurden 100 µl pipettiert und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Lochplatte mit 1x PBS gewaschen. Abschließend wurden 100 µl ABTS-Substrat ((2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)) pro Position aufgetragen und bei Raumtemperatur inkubiert, bis eine erste schwache grüne Färbung auftrat, dann wurde im Tecan-ELISA-Reader (Tab. 8) die Extinktion bei λ 405 nm (Referenzwellenlänge λ 490 nm) gemessen. Je nach Signalentwicklung und Stärke wurde für 1-2h in 10 min Abständen die Extinktion gemessen.

Die Analyse mit dem BrdU Cell Proliferation Assay Kit #6813 von Cell Signaling Technology erfolgte nach Herstellerangaben mit leichten Modifikationen. Zunächst wurde das Medium abgesaugt. Danach wurden pro Vertiefung der 96-Lochplatte 100 µl Fixierlösung (Kit-Komponente) aufgetragen und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Fixierlösung entfernt, pro Vertiefung 100 µl der 1X *Detection* Antikörper-1 Lösung (Kit-Komponente) dazugegeben und für 1h bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde dreimal mit je 100 µl Waschpuffer (Kit-Komponente) pro Vertiefung gewaschen. Im nächsten Schritt wurden pro Vertiefung 100 µl der Antikörperlösung-2 dazugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernung des Antikörpers wurde 3x mit 100 µl Waschpuffer pro Position gewaschen. Danach wurden je Vertiefung 100 µl des TMB-Substrates (Kit-Komponente) pipettiert und 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde die Reaktion mit 90 µl Stopp-Lösung pro Vertiefung gestoppt und innerhalb von 30 min bei einmal bei λ 450 nm (Referenzwellenlänge λ 490 nm) am Tecan-ELISA Reader die Extinktion gemessen.

2.2.3 Analysen zur Proteinexpression

2.2.3.1 Proteinextraktion

Parallel zu den BrdU-ELISA und ICC-Analysen wurden $1x10^4$ Zellen pro cm^2 in T25 Zellkulturflaschen plattiert. Die Kontrollen wurden mit DMSO behandelt, drei weitere T25 mit TMZ, Fenofibrat oder beiden Reagenzien. Die Konzentration an Fenofibrat betrug stets 10^{-4} M, die von TMZ 25 µM oder 50 µM, je nach MGMT-Status. Die Zellen wurden fünf Tage mit den Reagenzien inkubiert und danach mit Trypsin/EDTA geerntet (siehe oben). Danach wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, in diesem pelletiert und zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Zur Durchführung der Western Blot Analysen wurden aus den Zellpellets Gesamtzellproteinextrakte (WCE, *whole cell extract*) gewonnen. Dabei wurden die angefertigten Zellpellets in JLB-Puffer aufgenommen, wobei das Volumen des JLB-Puffers an die Größe der Zellpellets angepasst wurde. Der JLB-Puffer enthielt die Protease-Inhibitoren PIC (0,5 µl/ml JLB) und PMSF (2 µl/ml JLB). Die in JLB resuspendierten Zellen wurden für 25 min auf Eis inkubiert, danach wurden die Zellbruchstücke für 10 min bei 20.000 xg und 4° C zentrifugiert. Die Überstande mit den WCEs wurden in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die WCE bei -20°C gelagert.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein Bradford-Assay nach Standardverfahren eingesetzt (Green und Sambrook, 2012). Dabei wurden je 2 µl eines WCE mit 200 µl 5x Bradford-Reagenz (Tab. 7) und 800 µl 1x PBS gemischt, gevortext und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion der Proben

bei einer Wellenlänge von λ = 595 nm gegen einen Leerwert (200 µl 5x Bradford-Reagenz und 800 µl 1x PBS) gemessen. Mittels einer Eichgeraden, welche zuvor mit Serumalbumin erstellt wurde, wurden die Proteinkonzentrationen der WCE graphisch ermittelt.

2.2.3.2 SDS-PAGE

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteinextrakte wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Green und Sambrook, 2012) unter Verwendung des Mini-PROTEAN 3 Elektrophorese-Systems (Tab. 8) durchgeführt. Es wurden ein 4% Sammelgele sowie 10 % bzw. 15 % Trenngele verwendet. Die genaue Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 15 aufgeführt.

Tabelle 15: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele

Komponente	**Sammelgel (4%)**	**Trenngel (10%)**	**Trenngel (15%)**
H_2O	1800 µl	2000 µl	1200 µl
Sammelgelpuffer (pH 6,8) (Tab. 2)	750 µl	-	-
Trenngelpuffer (pH 8,8) (Tab. 2)	-	1250 µl	1250 µl
Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0,8%)	400 µl	1660 µl	2500 µl
10% APS	15 µl	50 µl	50 µl
TEMED	4 µl	3 µl	3 µl

APS: Ammoniumperoxodisulfat; TEMED: Tetramethylethylendiamin

Für die Westen Blot Analysen wurden 20 µg WCE pro Spur aufgetrennt. Zudem wurden 3 µl des SpectraTM Multicolor Broad Range Protein Ladder (Tab. 7) als Proteinlängenmarker parallel aufgetrennt. Anschließend an die Elektrophorese und vor dem Assemblieren des Western Blots wurden die SDS-Gele für 15 min in Transferpuffer inkubiert (Tab. 2).

2.2.3.3 Western Blot

Der Western Blot wurde im Semi-Dry Verfahren durchgeführt und das Trans-Blot System (Tab. 8) eingesetzt. Der Proteintransfer von den SDS-Gelen auf Nitrozellulosemembranen (Tab. 5) erfolgte für 1 h bei 15V. Anschließend erfolgte die Absättigung der unbesetzten Bindestellen der Nitrozellulosemembran durch eine Inkubation für 15 min mit Blockpuffer (Tab. 2). Um auf einen gleichmäßigen Transfer zu prüfen, wurden die SDS-Gele nach dem

Blotten mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt (Green und Sambrook, 2012). Die Nitrocellulosemembranen wurden über Nacht bei 4°C mit je 5 ml einer Antikörperverdünnung leicht schüttelnd inkubiert. Die Antikörperverdünnung wurde mit Blot-Blockierpuffer (enthält 2% Milchpulver (Tab. 7)) und in den in Tabelle 18 angegebenen Verdünnungen angesetzt. Vor der Zugabe der Sekundärantikörper wurden die Membranen dreimal für 10 min bei Raumtemperatur mit Waschpuffer (Tab. 2) gewaschen. Die Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper wurden 1:5000 in Blockpuffer verdünnt und für 1h bei Raumtemperatur auf der Membran inkubiert. Zuletzt wurden die Membranen erneut dreimal für 10 min mit Waschpuffer gewaschen und unter Einsatz des Detektionsreagenz Clarity MaxTM Western ECL-Substrate (Tab. 7) am ChemiDoc XRS System (Tab. 8) detektiert. Die Signalstärken der Banden wurden mit der Software *Quanitity one* ermittelt und gegen die Expression von Aktin normalisiert. Dazu wurden die Membranen mit einem pan Aktin Antikörper inkubiert und analog zu oben detektiert.

Tabelle 16: Primärantikörper für Western Blot Analysen

Antikörper (clone)	**Hersteller**	**Herkunft**	**Verdünnung**
pan Aktin (C4)	Millipore, Schwalbach, D	Maus	1:2000
SOX2 (D6D9)	Millipore, Schwalbach, D	Kaninchen	1:1000
γH2AX (20E3)	Cell Signaling, Cambridge, GB	Kaninchen	1:1000
PPARα (PA1-822A)	Thermo-Fisher Scientific, Waltham, USA	Kaninchen	1:1000
MGMT (MT3.1)	Millipore, Schwalbach, D	Maus	1:500

SOX2: *(sex determining region Y) -box 2;* der PPARα-Antikörper wurde gegen ein synthetisches Peptid generiert und erkennt das N-terminale Ende der A-Domäne des volle Länge Proteins (Hersteller-Info).

Tabelle 17: Sekundärantikörper für Western Blot Analysen

Antikörper	**Hersteller**	**Herkunft**	**Verdünnung**
Ziege-anti-Kaninchen-Peroxidase [GARPO]	Beckman Coulter, Krefeld, D	Ziege	1:5000
Ziege-anti-Maus-Peroxidase [GAMPO]	Beckman Coulter, Krefeld, D	Ziege	1:5000

2.2.4 Lentivirale Transfektion von SLGC-Zelllinien

Um mit eGFP markierte SLGC-Zellklone zu gewinnen, wurden zunächst die HEK293T-Zellen in F-Medium expandiert. Danach wurden die Hek293T-Zellen in einer Konfluenz von 60% – 70% in Zellkulturschalen (Schalen mit 10 cm Durchesser) plattiert. Noch während sich die Zellen auf dem Plattenboden absetzten, wurden die Transfektionsansätze in sterilen Plastikröhrchen mit Schubdeckel (Tab. 5) hergestellt. Die Transfektion erfolgte mithilfe der Kalzium-Phosphat-Methode (Green & Sambrook, 2012). Pro Zellkulturschale wurde ein Transfektionsansatz eingesetzt.

Jeder Transfektionsansatz enthielt 10 µg pLJM1-EGFP, 5 µg pCMV-VCV-G und 5 µg psPAX2, sowie 420 µl 0,1x TE (Tab. 2) und 60 µl 2 M Calciumchlorid. Danach wurden tropfenweise 480 µl 2x HBS (Tab. 2) zugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde anschließend tropfenweise auf die HEK293T Zellen in den Zellkulturschalen verteilt. Es folgte eine Inkubation für 16-20h bei 37°C. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und 10 ml neues F-Medium dazugegeben. Nach einem weiteren Tag wurde das Medium, das nun die freigesetzten Viren enthielt, in ein steriles 50 ml Einmalplastik-Röhrchen überführt. Um die Virus-Suspension von HEK293T-Zellen und Zell-Debris zu reinigen wurde für 5 min bei 500 xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Danach wurde der Überstand durch einen 0,45 PES-Filter (Tab. 5) filtriert und bis zur Infektion der Zielzellen bei 4° C gelagert.

Die Zielzellen (T1464 und T1464-Derivate) wurden in einer Konzentration von 2x 10^4 Zellen/ cm^2 auf 6 Lochplatten plattiert. Pro Vertiefung wurden 2 ml Virussuspension, 1 ml N-Medium und 3 µl Polybrene (Tab. 7) pipettiert. Nach einer Inkubation für 20h bei 37°C im Zellkultur-brutschrank wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA geerntet. Zur Selektion auf infizierte Zellen wurden die Zellsuspensionen in T25 Flaschen überführt, die 4 ml N-Medium und 1 µg/ml Puromycin enthielten. Zur Kontrolle wurden parallel auf 96-Lochplatten je zwei Reihen mit denselben Zielzellen ausgesät. Eine Reihe wurde ebenfalls mit Puromycin (1 µg/ml) behandelt, eine Reihe blieb unbehandelt. Es wurde überprüft, ob die Kontrollen innerhalb einer Woche unter Puromycin-Behandlung abgestorben waren.

Um eine stabile Integration des Lentiviralen Vektors in das Genom der Zielzellen zu forcieren, wurde die Puromycin Selektion dauerhaft aufrechterhalten. Zunächst erfolgten

mehrere Passagen der infizierten Zellen in T25-Flaschen. Während dieser Zeit wurden Aliquots entnommen, Tropfen mit Zellsuspension auf Objektträger übertragen und mit Fluoromount eingedeckt. Mithilfe der mikroskopischen Analyse am Biozero 8000 Fluoreszenzmikroskop (Tab. 8) wurde überprüft, ob die Zellsuspension grün fluoreszierende Zellen enthielt. Nach zwei Wochen in Kultur wurden mit 600 Zellen pro 96-Lochplatte *limited dilution assays* angesetzt; die restliche Zellsuspension wurde cryokonserviert. Die 96-Lochplatten wurden zweimal pro Woche am Leica-Lichtmikroskop (Tab. 8) überprüft und sobald als möglich Klone isoliert. Die Klone wurden mit Trypsin/EDTA geerntet und auf höhere Plattenformate (24-, 6- Lochplatten) expandiert. Klone mit eGFP-Expression wurden in T25-Flaschen expandiert.

2.2.5 Statistik

Eine bewertende statistische Analyse erfolgte für die BrdU-ELISA und einen Teil der immun-cytochemischen Färbungen. Die Darstellung der Ergebnisse der Sequenzierungen und Western Blot Analysen erfolgte rein deskriptiv.

Für die BrdU-Analysen (Abb. 17 & 18) wurden einfaktorielle Varianzanalysen (*one-way* ANOVA) mit dem Programm *GraphPad Prism* 9 (Version 9.1.2) durchgeführt. Dabei wurden nur die Werte ein- und derselben 96-Lochplatte miteinander verglichen, da jede 96-Lochplatte eine unabhängige Fragestellung repräsentiert. Alle Platten waren derart strukturiert, dass jede Behandlung acht unabhängige Werte umfasste, die sich jeweils in einer vertikalen Reihe befanden. Es wurden für die acht unabhängigen Werte einer Reihe die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Danach wurden mittels *one-way* ANOVA die Ergebnisse der Behandlungen mit verschiedenen Konzentrationen desselben Reagenzes verglichen, die jeweils drei Reihen umfassten und direkt nebeneinander lagen. Dies waren die drei Reihen mit Fenofibrat-Behandlung (10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}), die drei Reihen mit TMZ-Behandlung (25, 50, 100 µM), sowie die drei Reihen mit der Kombination 25 µM (T1440) bzw. 50 µM (T1495) TMZ plus Fenofibrat 10^{-3}, 10^{-4} bzw. 10^{-5}. Danach erfolgten für die T1440-Derivate Vergleiche des Werts für die DMSO-Kontrolle mit der Reihe Fenofibrat 10^{-3}, der Reihe 25 µM TMZ sowie der Reihe 25 µM TMZ/10^{-3} Fenofibrat. Für Die T1495-Derivate wurde analog verfahren, wegen des MGMT-Status jedoch die Werte für 50 µM TMZ verglichen. Somit wurden für jeden Graphen insgesamt sieben Tests durchgeführt. Unter Berücksichtigung des multiplen Testens bei der Durchführung dieser sieben Varianz-

Analysen wurde das globale Signifikanzniveau von 0.05 Bonferroni-korrigiert und auf 0.05/7 = 0,00714286 gesetzt. Entsprechend wurden in den Abbildungen alle p-Werte, die < 0,0071 sind mit einem „*“ als signifikant gekennzeichnet. Über die Zelllinien hinweg, die als unabhängige Experimente zu werten sind, wurde nicht für multiples Testen adjustiert.

Bei den immunzytochemischen Analysen wurden von den Doppelfärbungen anti-CD133/anti-Sox2 und anti-PML/anti-γH2AX lediglich die Sox2- und γH2AX –Signale mit der QPath-Software gezählt und bewertet. Dabei wurde in beiden Fällen die Gesamtzellzahl ermittelt und zwischen den für die Färbung positiven und negativen Zellen unterschieden. Für die Bestimmung der Gesamtzellzahl wurden 10 repräsentative Mikrofotografien herangezogen. Es wurden die Mittelwerte der Gesamtzellzahl und die Standardabweichungen berechnet. Danach erfolgte im Fall der T1440-Derivate der statistische Vergleich der Werte für die Kontrolle (DMSO-Behandlung), mit den Werten für die Behandlungen mit 10^{-4} Fenofibrat, 25 µM TMZ und 10^{-4} Fenofibrat/25 µM TMZ. Für die T1495-Derivate wurde analog verfahren; wegen des MGMT-Status wurden hier jedoch 50 µM TMZ in den Behandlungen eingesetzt. Insgesamt wurden pro Zelllinie/Klon drei Tests mittels *GraphPad Prism* 9 (Version 9.1.2) durchgeführt. Unter Berücksichtigung des multiplen Testens bei der Durchführung dieser drei paarweisen Vergleiche wurde das Signifikanzniveau mittels *Dunnetts multiple comparison test* korrigiert und auf 0.05/3 = 0,01666 gesetzt. Entsprechend wurden in den Abbildungen alle p-Werte, die < 0,016 sind mit einem „*“ als signifikant gekennzeichnet. Da die Anzahl der Sox2- bzw. γH2AX –positiven Zellen an der Gesamtzellzahl teilweise sehr gering war, erfolgte hierfür nur eine deskriptive statistische Bewertung; dabei wurden in die Graphen mit den Gesamtzellzahlen die Mittelwerte der relativen Anteile an Sox2- bzw. γH2AX–positiven Zellen in Form eines farbigen Balkens eingetragen. Über die Zelllinien hinweg, die als unabhängige Experimente zu werten sind, wurde nicht für multiples Testen adjustiert.

3 Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in drei experimentelle Teile: Im ersten Teil (3.1) wurde der Editierungsstatus der PPAR-Gene in vier Klonen aus zwei verschiedenen Editierungsansätzen analysiert. Im zweiten Teil (3.2) wurden mehrere editierte Klone, die sich von den SLGC-Linien T1440 bzw. T1495 ableiten hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber einer Behandlung mit TMZ und/oder Fenofibrat untersucht. Dazu wurden immunzytochemische Färbungen, BrdU-Elisa und Western Blot Analysen durchgeführt, durch die Erkenntnisse über den Stammzellcharakter und die Effektivität der Behandlungen gewonnen werden sollten. Im dritten Teil (3.3) wurden die SLGC-Linie T1464 und ein T1464-Klon mit PPAR-Editierung stabil mit einem Plasmid transfiziert, das für eGFP (*enhanced green fluorescent protein*) kodiert. Für dieses Experiment wurde ein lentiviraler Ansatz gewählt.

3.1 Editierungsstatus von PPAR-Genen in Klonen

Vor Beginn dieser Arbeit wurden vier verschiedene SLGC-Zelllinien unter Anwendung des CRISPR/Cas9 Systems im Exon 4 des PPARA-Gens, dem Exon 4 des PPARB/D-Gens oder dem Exon 3 des PPARG-Gens editiert. Im Fall des PPARA-, PPARB/D- und PPARG-Gens kodieren die betreffenden Exons für den ersten Zinkfinger der DNA-Bindedomäne (DBD), und eine Editierung würde den Bereich des N-terminalen Cysteinyl-Paars im ersten Zink-Finger betreffen. Da bereits der Verlust eines Zink-komplexierenden Cysteinyl-Restes den ersten Zink-Finger von nukleären Rezeptoren destabilisiert (Gronemeyer & Laudet, 1995), ist davon auszugehen, dass eine Mutation in diesem Bereich zu einem funktionellen Knockout führt.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Editierungsstatus von vier Klonen untersucht, von denen zwei aus einem PPAR A-Editierungsansatz stammen, die beiden anderen aus einem PPARA/G Doppel-Editierungsansatz. Nach der Isolierung von gDNA aus Zellpellets der vier Kandidaten-Klonen wurden das Exon 4 des PPARA-Gens und das Exon 3 des PPARG-Gens erfolgreich mit den für diese Gene spezifischen Primern amplifiziert (Beispiel in Abb. 4). Die Primer binden an intronische Bereichen 5‘ und 3‘ der zu untersuchenden Exons und generieren PCR-Produkte spezifischer Länge. Die PPAR A-spezifischen Primer binden 87 bp 5‘ bzw. 96 bp 3‘ des Exons 4 in den flankierenden Introns und generieren ein PCR-Produkt

von 423 Basenpaaren (bp). Dieses konnte sowohl für T1464 H9 D7, T1464 H9 E4, T1495 B9 D10 und T1495 B9 F4 nachgewiesen werden (Beispiele in Abb. 4A). Die PPARG-spezifischen Primer binden 86 bp 5‘ bzw. 144 bp 3‘ des Exon 3 und generieren ein PCR-Produkt mit einer erwarteten Länge von 423 bp. Ein Produkt dieser Länge wurde für die PCR auf gDNA aus T1495 B9 D10 γ und T1495 B9 F4 γ erhalten (Beispiel in Abb. 4C).

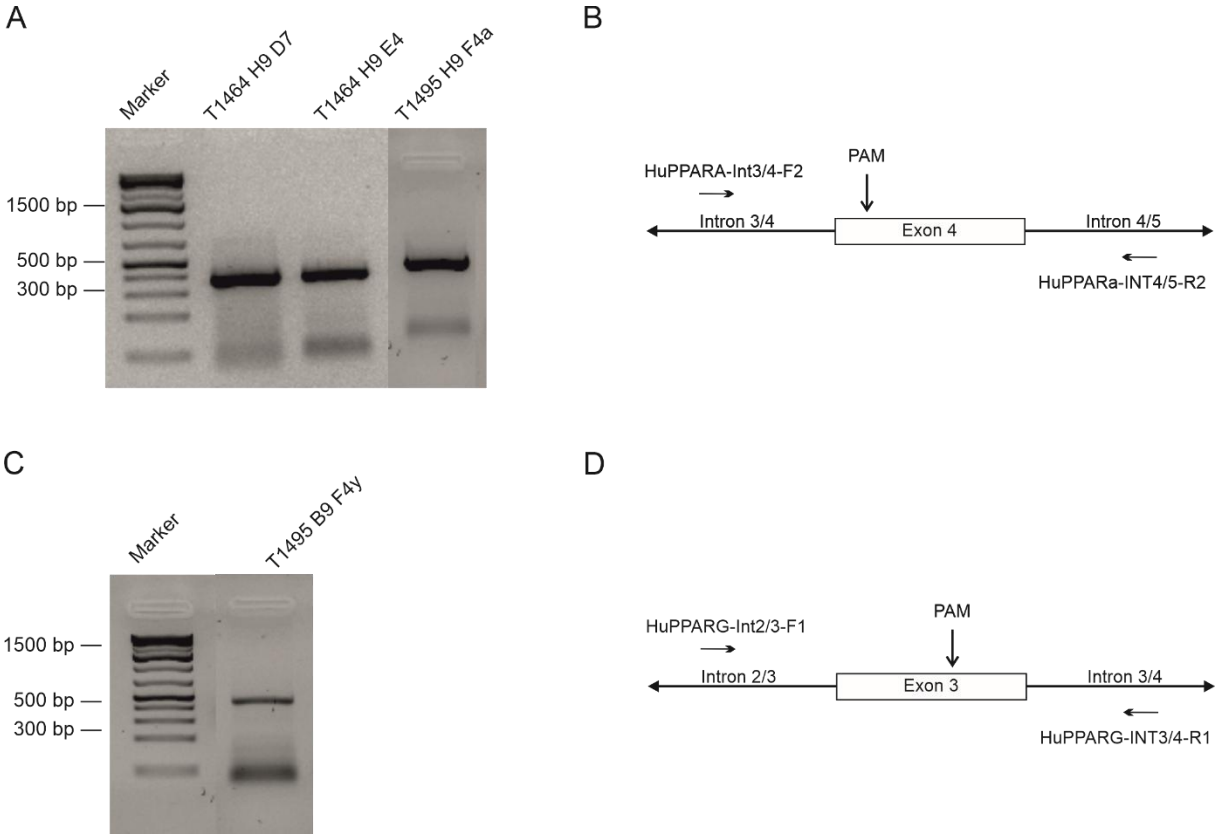

Abbildung 4: PCR-Produkte und schematische Darstellung der Primer-bindenden Regionen. Auftrennung von PCR-Produkten auf 1,6% TBE-Agarosegelen. (A) PCR mit PPARA Primern und gDNA aus T1464 H9 D7, T1464 H9 E4 und T1495 B9 F4 γ. (A) PCR mit PPARG Primern und gDNA aus T1495 B9 F4 γ. (D) Schematische Darstellung der primerbindenden-Regionen des PPARA- und PPARG-Gens. bp: Basenpaare, F: f*orward*, R: r*everse*, Hu; *Human*, Int: *Intron*, PAM*: protospacer adjacent motif*, PPAR: Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor

Die PCR-Produkte wurden nach der Reinigung mittels TA-Klonierung in den Vektor pCR ™ 2.1 TOPO kloniert und 12-16 Plasmide pro Klonierungsansatz isoliert und analysiert. Beispiele für die Analyse der rekombinanten Plasmide mittels Eco R1-Verdau und analytischer PCR sind in den Abbildungen 5 und 6 dargestellt. Durch die Restriktion mit der Endonuklease EcoR1, für die der Vektor pCR ™ 2.1 TOPO-Vektor zwei Erkennungsstellen für EcoR1 aufweist (Abb. 3), wurde die klonierten DNAs freigesetzt. Da die EcoR1-Schnittstellen die Klonierungsstelle 11bp 5‘ bzw. 6bp 3‘ flankieren, war das freigesetzte

DNA-Fragment nur geringfügig größer, als das klonierte PCR-Produkt und migrierte etwas schneller als die 500 bp-Bande des Markers. In Abbildung 5 sind exemplarisch die Ergebnisse der Eco R1-Verdaue von Plasmiden dargestellt, die sich für T1495 B9 F4 γ, T1464 H9 E4 und T1464 H9 D7 ableiten. Durch das parallele Auftrennen von unverdauten und verdauten Plasmiden wurde eine eindeutige Interpretation der Ergebnisse möglich.

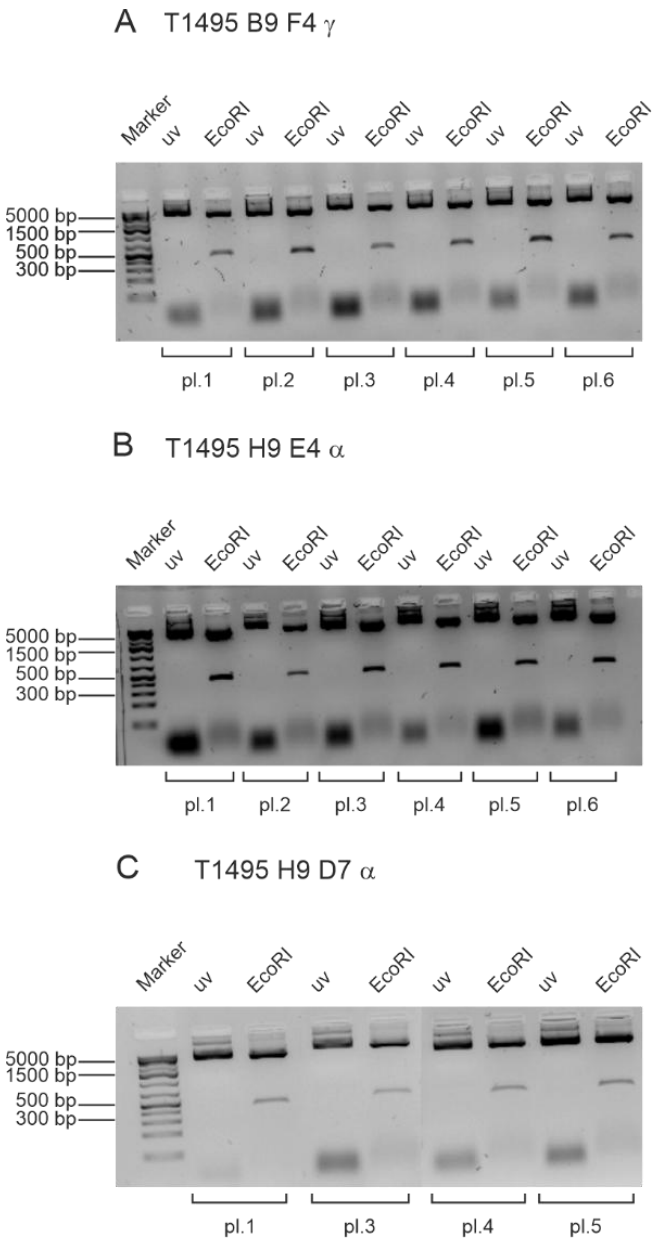

Abbildung 5: Auftrennung verdauter und unverdauter rekombinanter pCR$^{2.1}$ TOPO-Plasmide auf einem 1,6%-TBE-Agarosegel (A) Analyse des klonierten PPARG Amplifikats aus T1495 B9 F4 γ; Plasmide (pl.) 1-6. (B) Analyse des klonierten PPARA Amplifikats aus T1495 H9 E4; Plasmide (pl.) 1-6. (C) Analyse des klonierten PPARA Amplifikats aus T1495 H9 D7; Plasmide (pl.) 1, 3-5. *Bp, Basenpaare; EcoR1: Restriktionsansatz mit EcoR1; uv: unverdaute Plasmid-DNA*

Um zu prüfen, ob es sich bei den Insertionen der Plasmide um die klonierten PPARA- bzw. PPARG-Amplifikate handelt, wurde eine analytische PCR durchgeführt. Dazu wurden die identischen Primer verwendet, die auch für die ursprüngliche Herstellung der PCR-Produkte genutzt wurden. Abbildung 6 zeigt exemplarisch die Bestätigung für die Insertion des PPARG-Amplifikats für Plasmide, die sich von der Zelllinie T1495 B9 F4 γ ableiten. Die Identität der Insertionen wurde für alle rekombinanten Plasmide bestätigt (Beispiel in Abb. 6).

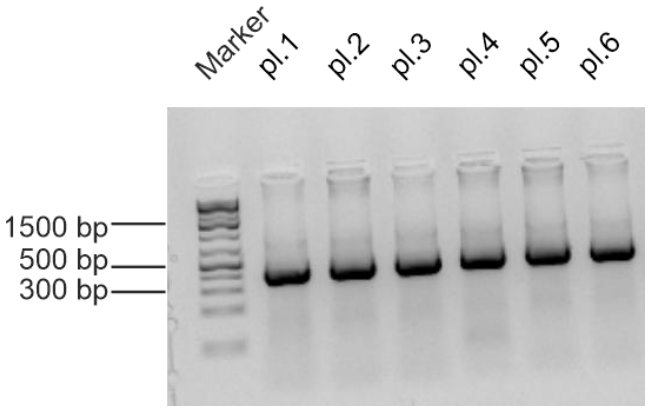

Abbildung 6: Nachweis von PPARG-Insertionen in rekombinanten pCR ™ 2.1 TOPO-Vektoren. Auftrennung der PPARG-Amplifikate aus analytischen PCR-Ansätzen auf einem 1,6% TBE-Agarosegel für Plasmide, die sich von T1495 B9 F4 γ ableiten. Abkürzungen siehe Legende zu Abbildung 4.

Nach der erfolgreichen Klonierung der PPARA- und PPARG-Amplifikate erfolgte die Sequenzierung der rekombinanten Plasmide mit dem M13-*forward* oder M13-*reverse* Primer. Tabelle 18 fasst zusammen, welche Analysen durchgeführt wurden. Im Folgenden (3.1.1 – 3.1.3) werden die Ergebnisse der Sequenzanalysen für die vier Zellklone besprochen.

Tabelle 18: Klone und Sequenzierungen von PPAR-Isotyp-Genen

Zellklon	Abkürzung	PPAR A	PPAR B/D	PPAR G
LV_2-sgPPAR α (T1464) H9 D7	T1464 H9 D7	7	n.d.	n.d.
LV_2-sgPPAR α (T1464) H9 E4	T1464 H9 E4	10	n.d.	n.d.
LV_2-sgPPAR $\alpha\gamma$ (T1495) B9 F4	T1495 B9 F4 γ	11	n.d.	9
LV_2-sgPPAR $\alpha\gamma$ (T1495) B9 D10	T1495 B9 D10 γ	17	n.d.	10

PPAR: Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor; ''+'' Sequenzanalyse; n.d.; keine Sequenzierung.

3.1.1 Eine Editierung von PPARA ist in keinem der T1464-Klone nachweisbar

Die Zellklone T1464 H9 D7 und T1464 H9 E4 stammten aus einem PPAR α-Editierungsansatz, der ausschließlich das Exon 4 des PPARA-Gens targetierte. Die Vergleiche der gewonnenen Sequenzen (Insertionen der rekombinanten Plasmide) mit dem humanen Genom mithilfe der *Ensembl Genome Browsers* ergaben in allen Fällen die Wildtypsequenz des PPARA-Gens verglichen. (Abbs. 7,8). Somit war für diese Klone keine Editierung im PPARA-Gen nachweisbar.

Abbildung 7: Auswertung der Sequenzen der Insertionen von pTOPO PPARA H9 D7 und pTOPO PPARA H9 E4 (A). Sequenzen-Alignment der Plasmid-Insertionen mit dem humanen PPARA-Gen. Das *protospacer adjacent motif* (PAM) ist blau, die sgRNA-bindende Region grün umrahmt. Abweichungen von der Wildtyp Sequenz sind in Rot dargestellt. (B) Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenzen im Ein-Buchstaben-Code mit dem humanen PPARα. Die Region des ersten Zinkfingers (ZFD) ist schwarz eingerahmt. Die vier Cysteinyl-Reste, die das Zink-Ion komplexieren, sind Rot hervorgehoben.

Abbildung 8: Schematische Darstellung der von Exon 4 des PPARA-Gens kodierten Aminosäure-Sequenz Schematische Darstellung der von Exon 4 des PPARA-Gens kodierten Aminosäure-Sequenz. – Die kodierte Region umfasst Teile der B-Domäne und den kompletten ersten Zinkfinger; die koordinierte Bindung des Zink-(Zn) Ions erfolgt über vier Cysteinyl-Reste. - Die Aminosäurereste von PPARα sind im Ein-Buchstaben-Code dargestellt. Der Aminosäurerest 87 ist markiert. Für die Zellklone T1464 H9 D7 und T1464 H9 E4 war keine Editierung im PPARα nachweisbar.

3.1.2 Der Zellklon T1495 B9 F4 γ weist eine Editierung im PPARG, nicht aber PPARA auf.

Der Zellklon T1495 B9 F4 γ stammt aus dem PPAR αγ-Doppeleditierungsansatz und könnte daher sowohl im Exon 4 des PPARA-Gens als auch im Exon 3 des PPARG-Gens editiert sein. Zur Untersuchung des Editierungsstatus im PPARA-Gen wurden 11 Plasmide untersucht, die alle ausschließlich die Exon 4 PPARA Wildtyp-Sequenz enthielten (Abbs. 9 und 10).

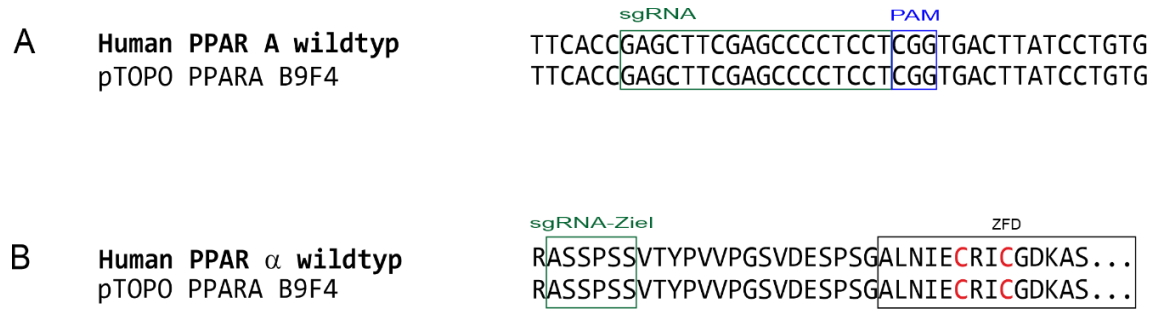

Abbildung 9: Sequenzen der Insertionen von pTOPO PPARA B9 F4 γ (PPARA-Amplifikate). (A) Sequenzen-Alignment der Plasmid-Insertionen mit dem humanen PPARA-Gen. Das *protospacer adjacent motif* (PAM) ist blau, die sgRNA-bindende Region grün umrahmt. Abweichungen von der Wildtyp Sequenz sind in Rot dargestellt. (B) Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenzen im Ein-Buchstaben-Code mit dem humanen PPARα. Die Region des ersten Zinkfingers (ZFD) ist schwarz eingerahmt. Die vier Cysteinyl-Reste, die das Zink-Ion komplexieren, sind Rot hervorgehoben.

Abbildung 10: Schematische Darstellung der von Exon 4 des PPARA-Gens kodierten Aminosäure-Sequenz . Die kodierte Region umfasst Teile der B-Domäne und den kompletten ersten Zinkfinger; die koordinierte Bindung des Zink- (Zn) Ions erfolgt über vier Cysteinylreste. - Die Aminosäurereste von PPARα sind im Ein-Buchstaben-Code dargestellt. Der Aminosäurerest 87 ist markiert. Für den Zellklon T1495 B9 F4 γ war somit keine Editierung im PPARα nachweisbar.

Zur Untersuchung des Editierungsstatus im PPARG-Gen wurden insgesamt neun Plasmide untersucht, von denen sieben eindeutig auswertbar waren. Durch das Alignment mit dem

humanen PPARG-Gen wurden drei verschiedene Mutationen nachgewiesen (Abb. 11A). Dabei wiesen die Insertionen der Plasmide pTOPO PPARG B9 F4 pl. 1, pl. 6 und pl. 11 jeweils die identische Deletion von 4 Nukleotiden auf (Abb. 11A). Diese führt zu einer Verschiebung des Leserasters und einem prämaturen Stopp-Codon. Entsprechend wies die abgeleitete Aminosäuresequenz (Abb. 11B), beginnend mit dem Arginylrest R140, verschiedene Veränderungen auf. So wurde R140 durch einen Prolylrest ersetzt (R140P). Weiterhin resultierte die Mutation im Verlust der drei Cysteinylreste C142, C160 und C163, sodass das Zink-Ion nicht mehr komplexiert werden kann (Abbs. 11B, 12B). Da das prämature Stopp-Codon erst nach 60 Nukleotiden auftritt, wird ein aberranter C-Terminus von 20 Aminosäureresten kodiert, der keinerlei Ähnlichkeiten mit der PPARγ-Sequenz aufweist (Abbs. 12B, und vergleiche 12A und 12B).

Die Insertionen der Plasmide pTOPO PPARG pl. 2 und pl. 3 wiesen ebenfalls eine Deletion von vier Nukleotiden auf. Relativ zu der oben beschriebenen 4-bp-Deletion, war diese Deletion um zwei Basenpaare in Richtung der PAM verschoben (Abb. 11A). Wie die oben beschriebene 4-bp-Deletion, resultierte auch die in den Plasmiden pl. 2 und pl. 3 identifizierte Deletion, in einer Leserasterverschiebung und einem prämaturen Stopp-Codon (Abb. 11A). Allerdings blieben die Aminosäurereste R140 und V141 noch erhalten und der aberrante C-Terminus begann mit dem mutierten Rest C142E (Abb. 11B). Ansonsten entsprach der aberrante C-Terminus exakt demjenigen der durch die Insertionen der Plasmide pl. 1, pl. 6 und pl. 11 kodiert wurde; dies schloss auch den Verlust der Cysteinylreste C142, C160 und C163 ein (Abbs. 11B, 12B und 12C).

A

```
                                   sgRNA                PAM
Human PPAR G wildtyp          CTCATGGCAATTGAATGTCGTGTCTGTGGAGATAAAGCTTCTG
pTOPO PPARG B9F4 Pl.1,6,11    CTCATGGCAATTGAATGTC----CTGTGGAGATAAAGCTTCTG
pTOPO PPARG B9F4 Pl.2,3       CTCATGGCAATTGAATGTCGT----GTGGAGATAAAGCTTCTG
pTOPO PPARG B9F4 Pl.5,8       CTCATGGCAATTGAATGTCGT--CTGTGGAGATAAAGCTTCTG
```

B

```
                                   ZFD
Human PPAR γ wildtyp          LMAIECRVCGDKASGFHYGVHACEGCK
pTOPO PPARG B9F4 Pl.1,6,11    LMAIECPVEIKLLDFTMEFMLVKDAR*
pTOPO PPARG B9F4 Pl.2,3       LMAIECRVEIKLLDFTMEFMLVKDAR*
pTOPO PPARG B9F4 Pl.5,8       LMAIECRLWR*
```

Abbildung 11: Sequenzen der Insertionen von pTOPO PPARA B9 F4 γ (PPARG-Amplifikate). (A). Sequenzen-Alignment der Plasmid-Insertionen mit dem humanen PPARA-Gen. Das *protospacer adjacent motif* (PAM) ist blau, die sgRNA-bindende Region grün umrahmt. ,,-``zeigt ein fehlendes Nukleotid an. (B) Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenzen im Ein-Buchstaben-Code mit dem humanen PPARα. Die Region des ersten Zinkfingers (ZFD) ist schwarz eingerahmt. Die vier Cysteinyl-Reste, die das Zink-Ion komplexieren, sind Rot hervorgehoben. Abweichungen von der Wildtyp-Sequenz sind Fett-Druck hervorgehoben. ,*`` zeigt einen Abbruch aufgrund eines prämaturen Stopp-Codons an.

Die Insertionen der Plasmide pTOPO PPARG pl. 5 und pl. 8 wiesen eine Deletion von zwei Nukleotiden auf. Diese Deletion resultierte in einer Leserasterverschiebung und einem prämaturen Stopp-Codon (Abb. 11A). Die aberrante Aminosäuresequenz umfasste nur drei Aminosäurereste und begann mit dem Valyl-Rest V141, der durch einen Leucyl-Rest (V141L) ausgetauscht wurde. Die Mutation führt somit zu einem deutlich trunkierten Protein, in dem nur noch ein Cysteinyl-Rest vorhanden ist (Abb. 12D).

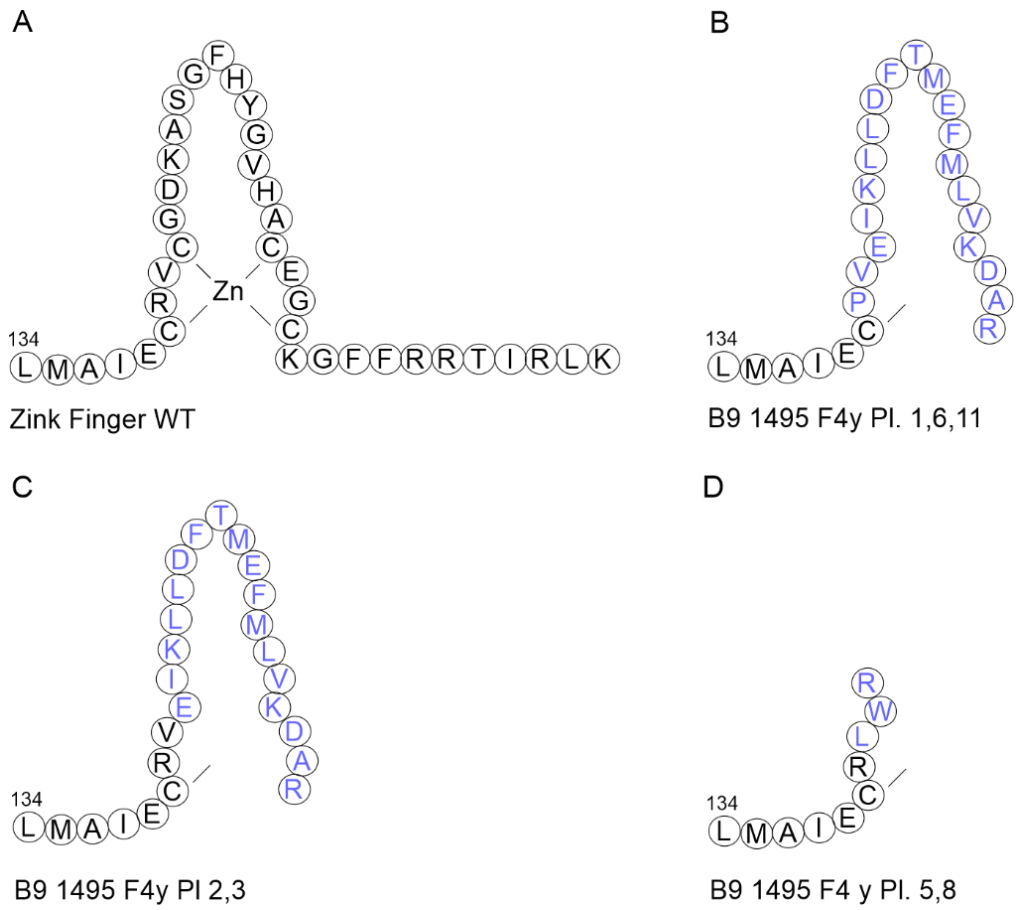

Abbildung 12: Schematische Darstellung der Aminosäure-Sequenz (PPARγ) im Bereich des ersten Zinkfingers und koordinierte Bindung des Zink- (Zn) Ions. Die Aminosäurereste sind im Ein-Buchstaben-Code dargestellt. (A) PPARγ Wildtypsequenz. (B), (C), (D) veränderte PPARγ Aminosäuresequenzen, die für die Insertionen der rekombinanten pTOPO B9 F4-Plasmide abgeleitet wurden. Die Zuordnung zu den Plasmiden ist als „Pl." gefolgt von einer Nummer angegeben.

Insgesamt ergaben die Sequenzanalysen, dass der Zellklon T1495 B9 F4 γ keine Editierung im PPARα aufweist, für den PPARγ jedoch ein kompletter, funktioneller Knockout vorliegen sollte. Der Nachweis von drei verschiedenen Mutationen im Exon 3 des PPARG-Gens weist daraufhin, dass die Kulturen des Klons mindestens zwei verschiedene Zellpopulationen enthalten sollten.

3.1.3 Der Zellklon T1495 B9 D10 γ weist eine Editierung im PPARG, nicht aber in PPARA auf.

Der Zellklon T1495 B9 D10 γ stammt ebenfalls aus dem PPAR αγ-Doppeleditierungsansatz und könnte daher sowohl im Exon 4 des PPARA-Gens als auch im Exon 3 des PPARG-Gens

editiert sein. Weiterhin sei an dieser Stelle angemerkt, dass sich die Zellklone T1495 B9 D10 γ und T1495 B9 F4 γ von dem Zellklon T1495 B9 ableiten, der vor Beginn der vorliegenden Arbeit einem *limited dilution assay* unterzogen wurde. Somit sind T1495 B9 D10 γ und T1495 B9 F4 γ Klone und Subklone von T1495 B9.

Zur Untersuchung des Editierungsstatus im PPARA-Gen wurden zunächst sieben und nachfolgend noch einmal 10 Plasmide untersucht, die alle die Exon 4 PPARA Wildtyp-Sequenz enthielten. Aus Gründen der Vollständigkeit sind diese Ergebnisse in den Abbildungen 13 und 14 erfasst.

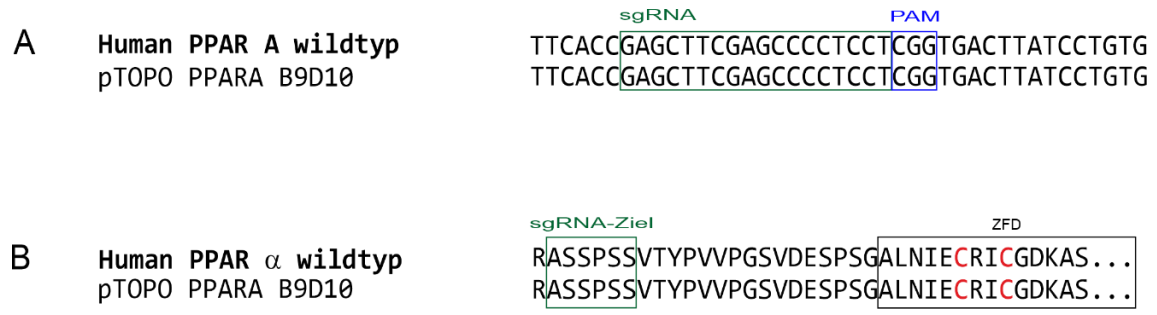

Abbildung 13: Sequenzen der Insertionen von pTOPO PPARA B9 D10 γ (PPARA-Amplifikate). (A) Sequenzen-Alignment der Plasmid-Insertionen mit dem humanen PPARA-Gen. Das *protospacer adjacent motif* (PAM) ist blau, die sgRNA-bindende Region grün umrahmt. Abweichungen von der Wildtyp Sequenz sind in Rot dargestellt. (B) Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenzen im Ein-Buchstaben-Code mit dem humanen PPARα. Die Region des ersten Zinkfingers (ZFD) ist schwarz eingerahmt. Die vier Cysteinyl-Reste, die das Zink-Ion komplexieren, sind Rot hervorgehoben

Abbildung 14: Schematische Darstellung der von Exon 4 des PPARA-Gens kodierten Aminosäure-Sequenz Die kodierte Region umfasst Teile der B-Domäne und den kompletten ersten Zinkfinger; die koordinierte Bindung des Zink- (Zn) Ions erfolgt über vier Cysteinylreste. - Die Aminosäurereste von PPARα sind im Ein-Buchstaben-Code dargestellt. Der Aminosäurerest 87 ist markiert. Für den Zellklon T1495 B9 F4 γ war somit keine Editierung im PPARα nachweisbar.

Zur Untersuchung des Editierungsstatus im PPARG-Gen wurden insgesamt zehn Plasmide untersucht, von denen vier eindeutig auswertbar waren. Durch das Alignment mit dem

humanen PPARG-Gen wurden zwei verschiedene Mutationen nachgewiesen (Abb. 15). Dabei wiesen die Insertionen der Plasmide pTOPO PPARG B9 D10 pl. 2 und pl. 11 jeweils die identische Deletion von 4 Nukleotiden auf, die zu einer Verschiebung des Leserasters und einem prämaturen Stopp-Codon führt (Abb. 15A). Diese Deletion stimmt exakt mit derjenigen überein, die für den Klon T1495 B9 F4 γ in den Plasmiden pl. 1, pl. 6 und pl. 11 identifiziert wurde (Abbs. 11A und 15A). Die Veränderung im Rezeptor PPARγ beginnt mit der Mutation R140P. Weiterhin kommt es zum Verlust der Cysteinylreste C142, C160 und C163 und ein aberranter C-Terminus von 20 Aminosäureresten entsteht (Abbs. 15B und 16B).

```
                                        sgRNA                PAM
A   Human PPAR γ wildtyp          CTCATGGCAATTGAATGTCGTGTCTGTGGAGATAAAGCTTCTG
    pTOPO PPARG B9D10 Pl.2,11     CTCATGGCAATTGAATGTC----CTGTGGAGATAAAGCTTCTG
    pTOPO PPARG B9D10 Pl.7,8      CTCATGGCAATTGAATGTCGT----GTGGAGATAAAGCTTCTG

                                              ZFD
B   Human PPAR γ wildtyp          LMAIECRVCGDKASGFHYGVHACEGCKGFFRRTIRLK
    pTOPO PPARG B9D10 Pl.2,11     LMAIECPVEIKLLDFTMEFMLVKDAR*
    pTOPO PPARG B9D10 Pl.7,8      LMAIECRVEIKLLDFTMEFMLVKDAR*
```

Abbildung 15: Sequenzen der Insertionen von pTOPO PPARA B9 D10 γ (PPARG-Amplifikate).(A). Sequenzen-Alignment der Plasmid-Insertionen mit dem humanen PPARA-Gen. Das *protospacer adjacent motif* (PAM) ist blau, die sgRNA-bindende Region grün umrahmt. ,,-``zeigt ein fehlendes Nukleotid an. (B) Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenzen im Ein-Buchstaben-Code mit dem humanen PPARα. Die Region des ersten Zinkfingers (ZFD) ist schwarz eingerahmt. Die vier Cysteinyl-Reste, die das Zink-Ion komplexieren, sind Rot hervorgehoben. Abweichungen von der Wildtyp-Sequenz sind Fett-Druck hervorgehoben. ,,*`` zeigt einen Abbruch aufgrund eines prämaturen Stopp-Codons an.

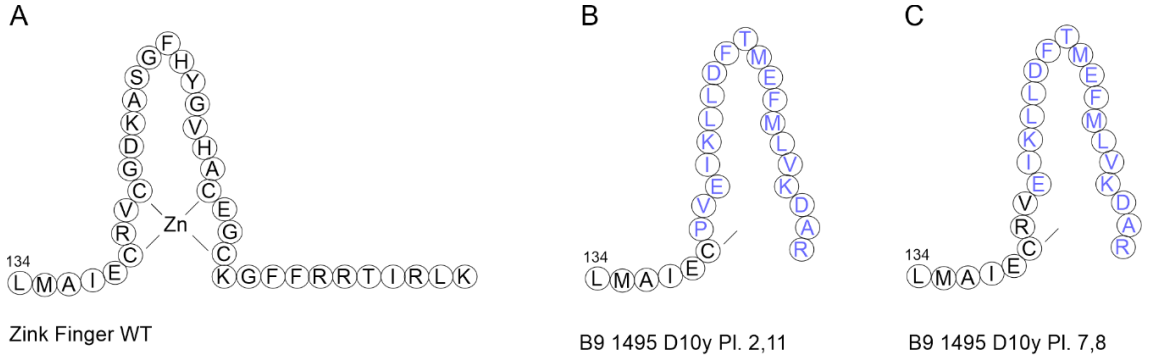

Abbildung 16: Schematische Darstellung der Aminosäure-Sequenz (PPARγ) im Bereich des ersten Zinkfingers und koordinierte Bindung des Zink- (Zn) Ions. Die Aminosäurereste sind im Ein-Buchstaben-Code dargestellt. (A) PPARγ Wildtypsequenz. (B), (C), (D) veränderte PPARγ Aminosäuresequenzen, die für die Insertionen der rekombinanten pTOPO B9 D10-Plasmide abgeleitet wurden. Die Zuordnung zu den Plasmiden ist als „Pl." gefolgt von einer Nummer angegeben.

Die Plasmide pTOPO PPAR G B9 D10 pl. 7 und pl. 8 wiesen ebenfalls eine Deletion von vier Nukleotiden auf, die in einer Leserasterverschiebung und einem prämaturen Stopp-Codon resultierte (Abb. 15A). Die aberrante Aminosäuresequenz begann mit dem Cysteinylrest C142, der durch einen Glutamatrest (C142E) ersetzt wurde. Ab dem mutierten Aminosäurerest C142E war der aberrante C-Terminus identisch mit dem der von den Insertionen der Plasmide pTOPO PPAR B9 D10 pl. 2 und pl. 11 kodiert wurde. Diese Veränderung war weiterhin identischen mit derjenigen die für dir Plasmide pTOPO PPAR B9 F4 pl. 2 und pl. 3 identifiziert wurde (Abbs. 11B und 15B, sowie 12C und 16C).

3.1.4 Fazit der Sequenzanalysen

Insgesamt wurde in keinem der T1464- und T1495-Klone eine Editierung im PPARA-Gen identifiziert. Beide T1495-Klone, die aus dem PPARαγ-Editierungsansatz stammen und sich beide vom Klon T1495 B9 ableiten, trugen Editierungen im PPARG-Gen. Dabei waren die beiden im Klon T1495 B9 D10 γ detektierten Editierungen auch im Klon T1495 B9 F4 γ anwesend. Der Klon T1495 B9 F4 γ trug jedoch zusätzlich eine weitere Editierung, die im Klon T1495 B9 D10 γ nicht nachweisbar war. Beide T1495-Klone sollten somit funktionelle Knockouts des PPARγ-Rezeptors sein. Im Fall des Klons T1495 B9 D10 γ könnte es sich um eine homogene Zellpopulation handeln, wobei jedes PPARG-Allel eine andere Editierung trägt. Im Fall von T1495 B9 F4 γ ist, aufgrund der drei verschiedenen Editierungen von einer heterogenen Zellpopulation auszugehen.

Beide Klone, T1495 B9 D10 γ und T1495 B9 F4 γ wurden für weitere Experimente (Kapitel 3.2.1 – 3.2.4; Tab. 1) eingesetzt. Mit den beiden nicht-editierten T1464-Klonen wurden in der vorliegenden Arbeit keine weiteren Analysen durchgeführt.

3.2 Einfluss von Fenofibrat und Temozolomid auf die Proliferation von SLGCs und editierten Klonen

3.2.1 Fenofibrat unterstützt die anti-proliferative Wirkung von TMZ

Um den Einfluss von Fenofibrat auf die Proliferation von SLGC-Linien und abgeleiteten Klonen zu ermitteln, wurden BrdU-ELISA auf 96-Lochplatten durchgeführt. Es wurden zwei biologische Replikate untersucht, wobei jeweils zwei identische Platten (technische Replikate) in die Analyse einflossen. In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse von einer repräsentativen 96-Lochplatte erläutert. Ein direkter Vergleich verschiedener Platten war aufgrund des variierenden Wachstumsverhalten der SLGC-Linien und Klone nicht sinnvoll. Es wurden drei verschiedene Konzentrationen von Fenofibrat (10^{-3} M, 10^{-4} M, 10^{-5} M) untersucht, wobei sich die ausgewählten Konzentrationen an publizierten Daten orientierten (Binello et al., 2014). Die Wirkung von Fenofibrat wurde zusätzlich in der Anwesenheit von 25 µM TMZ (T1440 und Klone) bzw. 50 µM (T1495 und Klone) ermittelt. Zudem wurde die Wirkung von 25 µM TMZ (T25), 50 µM TMZ (T50) und 100 µM TMZ (T100) untersucht. Die Kontroll-behandlungen erfolgten mit 1% DMSO, da sowohl TMZ als auch Fenofibrat in DMSO gelöst werden.

Für die Berechnung statistisch signifikanter Unterschiede ($p < 0,05$) erfolgten sieben verschiedene Tests (*one-way* ANOVA mit Boferroni-Korrektur; siehe Kapitel 2.2.5). Drei Tests betrafen die Werte innerhalb der drei Behandlungsgruppen [Fenofibrat (FF 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} M), TMZ (25, 50, 100 µM), Doppelbehandlung FF (10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} M) + TMZ]. Drei weitere Test erfolgten zwischen der DMSO-Kontrolle sowie FF 10^{-3} M, TMZ und FF 10^{-3} M/TMZ. Der siebte Test erfolgte zwischen FF 10^{-3} M und FF 10^{-3} M/TMZ. Über die Zelllinien hinweg, die als unabhängige Experimente zu werten sind, wurde nicht für multiples Testen adjustiert.

Für die SLGC-Linie T1440 wurden zwei editierte Klone und die nicht-editierte Mutterkultur (T1440 MC) untersucht. Einer der Klone (T1440 G5 E6 $\beta\gamma$) ist ein funktioneller Doppel-Knockout von PPAR$\beta\delta$ und PPARγ, der andere Klon (T1440 B4 γ) ein funktioneller Knockout des PPARγ (Tab. 1). Die Mutterkultur zeigte eine signifikante, dosis-abhängige Reduktion des BrdU Einbaus bei steigenden Fenofibrat-Konzentrationen (Abb. 17A). Ein verminderter, dosisabhängiger Einbau von BrdU nach der Fenobfibrat-Behandlung wurde ebenfalls für

den Klon T1440 B4 γ festgestellt, war in diesem Fall aber nicht statistisch signifikant (Abb. 17C). Dagegen wurden für den Klon T1440 G5 E6 βγ nach den Behandlungen mit steigenden Fenofibrat-Konzentrationen, teilweise höhere optische Dichten (ODs) gemessen, als in der DMSO-Kontrolle. Dabei waren die ODs für 10^{-3} M Fenofibrat nicht signifikant von der DMSO-Kontrolle verschieden (Abb. 17B).

Im Fall der Mutterkultur führte die Behandlung mit 25 µM TMZ (T25) relativ zur DMSO-Kontrolle zu einer signifikanten Reduktion der ODs um 72,9%, die durch eine Erhöhung der TMZ-Konzentration auf 50 µM bzw. 100 µM TMZ nicht signifikant verändert werden konnte (Abb. 17A). Für die Klone T1440 B4 γ und T1440 G5 E6 βγ nahmen die ODs nach der Gabe von 25 µM TMZ ebenfalls ab (29% für T1440 B4 γ; 21% für T1440 G5 E6 βγ). Aufgrund der hohen Standardabweichungen der Messwerte des Klons T1440 G5 E6 βγ, die auf der geringeren Adhärenz dieser Zellen an das Substrat beruhen, waren die TMZ-vermittelten Effekte jedoch nicht signifikant verschieden (Abb. 17 B und C). Auch diese Daten wurden durch die Replikate bestätigt, wobei sich die absoluten Messwerte unterschieden. Die hohen Standardabweichungen für den Klon T1440 G5 E6 βγ wurden auch in den Replikaten evident.

Die Doppelbehandlung der T1440 MC-Zellen mit 25 µM TMZ plus Fenofibrat führte relativ zur DMSO-Kontrolle zu einer von der Fenofibratdosis abhängigen Senkung der ODs. Mit 25 µM TMZ plus 10^{-3} M Fenofibrat betrug die Senkung 84,9% und war somit effizienter als die alleinige Behandlung mit 10^{-3} M Fenofibrat (Abb. 17A). Relativ zur alleinigen Behandlung mit 25 µM TMZ ergab sich für 25 µM TMZ/10^{-3} M Fenofibrat ein Mittelwert, der 60% niedriger war, als der Mittelwert für die alleinige TMZ-Behandlung. Für den PPARγ-Knockout T1440 B4 γ ergab sich ein ähnliches Bild, wie für die Mutterkultur. So war nach der Doppelbehandlung mit 25 µM TMZ und Fenofibrat eine signifikante, Dosis-abhängige Senkung der ODs festzustellen und die ODs für die 25 µM TMZ/10^{-3} M Fenofibrat-Doppelbehandlung lagen signifikant unter denen der Einzelbehandlungen. Auch der PPARβδ/γ-Doppel-Knockout T1440 G5 E6 βγ zeigte nach der Doppelbehandlung mit 25 µM TMZ/10^{-3} M Fenofibrat eine deutlich stärkere Senkung der ODs, als nach den Einzelbehandlungen sowie eine stärkere Reduktion des ODs mit ansteigender Fenofibratdosis. Weiterhin war festzustellen, dass die ODs der Fenofibrat-/TMZ-Doppelbehandlung nahezu additiv waren (Abb. 17 A-C).

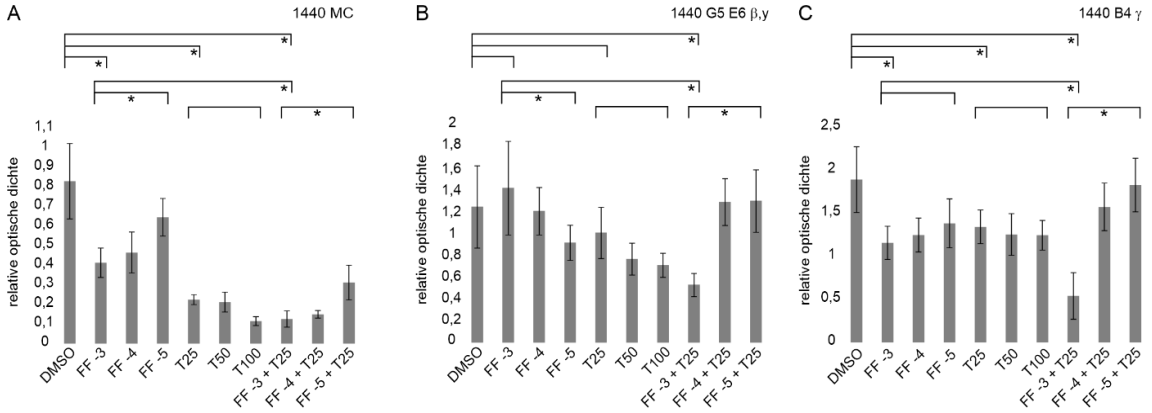

Abbildung 17: Effekt von Einzel- und Doppelbehandlungen mit Fenofibrat und Temozolomid auf die Proliferation der SGLC-Zelllinie T1440 und abgeleiteter Klone (BrdU ELISA am Tag d5 nach der Behandlung.) Dargestellt sind die Mittelwerte von acht unabhängigen Einzelwerten sowie die Standardabweichungen; alle Werte eines Graphen wurden auf derselben 96-Lochplatte erhoben. Bei den in A, B und C gezeigten Daten handelt es sich um verschiedene Fragestellungen und verschiedene Platten, weshalb zwischen diesen kein statistischer Vergleich erfolgte. Statistisch signifikante Abweichungen innerhalb der Behandlungsgruppen und relativ zur DMSO-Kontrolle wurden mittels *one-way* ANOVA mit anschließender Bonferroni-Korrektur für multiples Testen ermittelt. Unter Berücksichtigung des multiplen Testens bei der Durchführung dieser sieben Varianz-Analysen wurde das Signifikanzniveau ($p < 0.05$) Bonferroni-korrigiert und auf 0.05/7 = 0,00714286 gesetzt. Entsprechend wurden in den Abbildungen alle p-Werte, die < 0,0071 sind mit einem „*“ als signifikant gekennzeichnet. - FF -3 = 10-3 M Fenofibrat; FF -4 = 10-4 M Fenofibrat; 10-5 = 10-5 M Fenofibrat; T25 = 25 µM Temozolomid; T50 = 50 µM Temozolomid; T100 = 100 µM Temozolomid.

Für die T1495-Linie wurden fünf editierte Klone und die nicht-editierte Mutterkultur (T1495 MC) untersucht. Die drei Klone T1495 D3 F5 β, T1495 C4 E10 β und T1495 C4 G8 β sind funktionelle PPARβ-Knockouts, die beiden anderen Klone (T1495 B9 F4 γ, T1495 B9 D10 γ) sind funktionelle PPARγ-Knockouts (Tab. 1). Die Behandlung der T1495 Mutterkultur mit 10^{-3} M Fenofibrat ergab relativ zur DMSO-Kontrolle eine statistisch signifikante Senkung der ODs um 55%. Aufgrund der hohen Standardabweichung waren die Unterschiede zwischen den ODs für die ansteigenden Fenofibrat-Konzentrationen nicht signifikant (Abb. 18A). Die drei PPARβ-knockout-Klone (Abb. 18 D – E) zeigten relativ zur DMSO-Kontrolle eine Senkung der ODs, wobei diese nur für den Klon T1495 D3 F5 β statistisch signifikant war. Innerhalb der Behandlungsgruppen mit ansteigenden Konzentrationen an Fenofibrat wurden ebenfalls nur für den Klon T1495 D3 F5 β statistisch signifikante Unterschiede ermittelt, obwohl in allen drei Klonen Unterschiede zwischen den Mittelwerten der ODs der Fenofibrat-Konzentrationen 10^{-3} M und 10^{-5} M festgestellt wurden und die ODs für 10^{-3} M Fenofibrat unter denen für 10^{-5} M lagen. Die beiden PPARγ-Knockout Klone (T1495 B9 F4 γ, T1495 B9 D10 γ) verhielten sich ähnlich zueinander. So wurde in beiden Fällen mit 10^{-3} M Fenofibrat relativ zur DMSO-Kontrolle eine Annahme der Mittelwerte der ODs ermittelt. Dabei waren weder die Senkung der ODs relativ zur Kontrolle noch die

Unterschiede zwischen den ODs der drei Fenofibrat-Konzentrationen signifikant. Somit war die Fenofibrat-Responsivität der Mutterkultur am höchsten und die Responsivität von Zellklonen mit demselben PPAR-Isotyp Knockout war verschieden. Diese Beobachtungen wurden durch die Replikate bestätigt, wobei zwischen den Replikaten Unterschiede in den ODs auftraten.

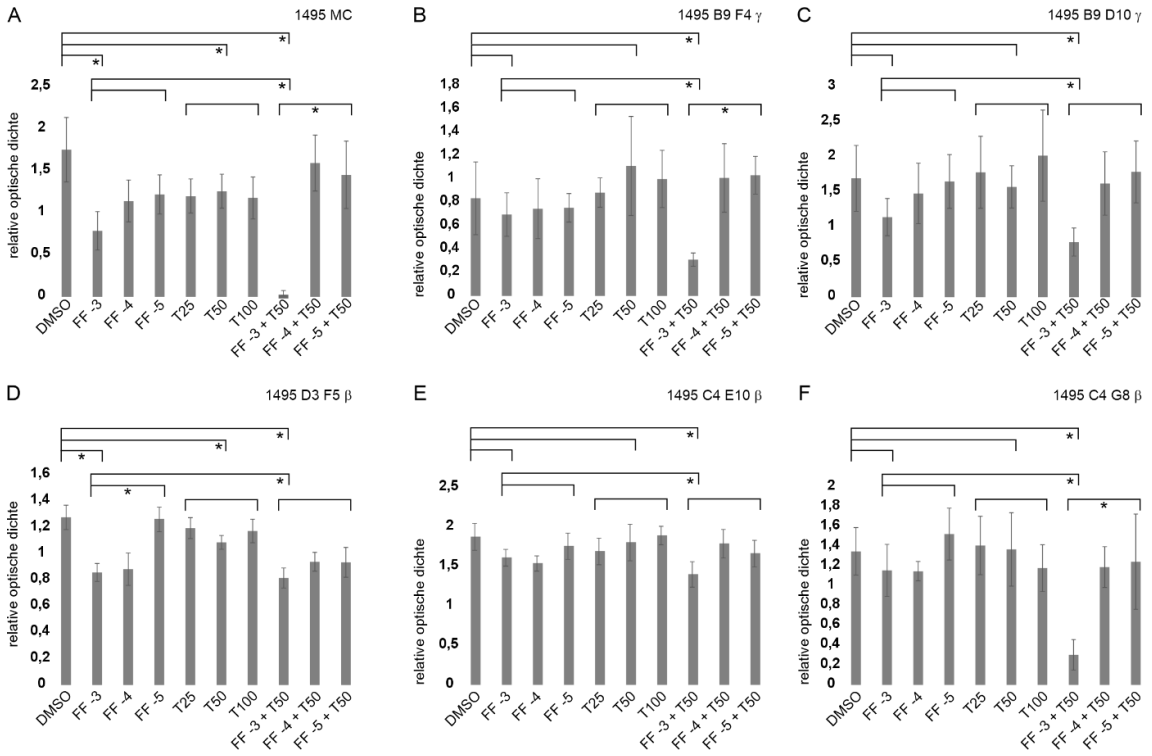

Abbildung 18: Effekt von Einzel- und Doppelbehandlungen mit Fenofibrat und Temozolomid auf die Proliferation der SGLC-Zelllinie T1495 und abgeleiteter Klone (BrdU ELISA am Tag d5 nach der Behandlung.) Dargestellt sind die Mittelwerte von acht unabhängigen Einzelwerten sowie die Standardabweichungen; alle Werte eines Graphen wurden auf derselben 96-Lochplatte erhoben. Bei den in A, B, C, D, E und F gezeigten Daten handelt es sich um verschiedene Fragestellungen und verschiedene Platten, weshalb zwischen diesen kein statistischer Vergleich erfolgte. Statistisch signifikante Abweichungen innerhalb der Behandlungsgruppen und relativ zur DMSO-Kontrolle wurden mittels *one-way* ANOVA mit anschließender Bonferroni-Korrektur für multiples Testen ermittelt. Unter Berücksichtigung des multiplen Testens bei der Durchführung dieser sieben Varianz-Analysen wurde das Signifikanzniveau ($p < 0.05$) Bonferroni-korrigiert und auf 0.05/7 = 0,00714286 gesetzt. Entsprechend wurden in den Abbildungen alle p-Werte, die < 0,0071 sind mit einem „*“ als signifikant gekennzeichnet. - FF -3 = 10-3 M Fenofibrat; FF -4 = 10-4 M Fenofibrat; 10-5 = 10-5 M Fenofibrat; T25 = 25 µM Temozolomid; T50 = 50 µM Temozolomid; T100 = 100 µM Temozolomid.

Nach der Behandlung mit 25, 50 oder 100 µM TMZ wurde lediglich für die T1495 Mutterkultur und den Klon T1495 D3 F5 β eine signifikante Senkung der ODs durch 50 µM TMZ ermittelt. In allen übrigen PPARβ- (T1495 C4 E10 β, T1495 C4 G8 β) und PPARγ- (T1495 B9 F4 γ, T1495 B9 D10 γ) Knockout-Klonen wurde keine signifikante Senkung der ODs durch 50 µM TMZ erreicht. Auch die Steigerung der TMZ-Konzentration auf 100 µM hatte keine

signifikanten Effekte auf die ODs; dies gilt auch für die Mutterkultur und den Klon T1495 D3 F5 β (Abb. 18 A-F).

Die Doppelbehandlung mit 50 µM TMZ und 10^{-3} M Fenofibrat hatte in allen Fällen relativ zur DMSO-Kontrolle eine signifikante Senkung der ODs zur Folge, allerdings mit unterschiedlich Effektivität. So reduzierte die Doppelbehandlung mit 10^{-3} M Fenofibrat und 50 µM TMZ die ODs relativ zur DMSO-Kontrolle um 98 %, relativ zur alleinigen Fenofibrat-Behandlung um 55% und relativ zur alleinigen TMZ-Gabe um 29 % (Abb. 18 A). Im Fall des Klons T1495 D3 F5 β, der wie die Mutterkultur eine Abhängigkeit von der Fenofibrat-Dosis zeigte, konnte die gleichzeitige Gabe von 50 µM TMZ den Effekt von 10^{-3} M Fenofibrat nur minimal steigern (Abb. 18 D). Ähnlich verhielt sich der Klon T1495 C4 E10 β für den die Senkung der ODs relativ zur DMSO-Kontrolle mit 10^{-3} M Fenofibrat 14% und mit 50 µM TMZ/10^{-3} M Fenofibrat bei 26 % lag (Abb. 19 E). Der andere PPARβ-Knockout (T1495 C4 G8 β) und die beiden PPARγ-Knockouts (T1495 B9 F4 γ, T1495 B9 D10 γ) wiesen eine deutliche Verstärkung des Effekts von 10^{-3} M Fenofibrat durch 50 µM TMZ auf (Abb. 18 B, C, F). So führte im Fall von T1495 B9 D10 γ die Doppelbehandlung relativ zur Kontrolle um eine Senkung der ODs um 53%, während 10^{-3} M Fenofibrat und 50 µM TMZ allein keine signifikante Reduktion bewirkten. Der zweite PPARγ-Knockout (T1495 B9 F4 γ) verhielt sich ähnlich wie T1495 B9 D10 γ und zeigte eine statistisch signifikante Reduktion der ODs nach der Doppelbehandlung, nicht aber den Einzelbehandlungen. Dabei war die prozentuale Senkung der ODs relativ zur DMSO-Kontrolle und den Einzelbehandlungen etwas weniger effizient (Senkung relativ zu DMSO: 10^{-3} M FF: 33%, T50: 8%, 10^{-3} M FF/T50: 59%; Abb. 18 C). Auch beim Klon T1495 C4 G8 β wurde erst durch die Co-Applikation von 10^{-3} M Fenofibrat und 50 µM TMZ eine signifikante Senkung der ODs erzeugt, die eine Verminderung der ODs um 80% ermöglichte.

3.2.2 Fazit der Proliferationsanalysen

Die BrdU-ELISA belegten, dass 10^{-3} M Fenofibrat die ODs im Fall von beiden SLGC-Linien signifikant senken. Dabei waren die Effekte in der T1440- und T1495-Mutterkultur deutlicher als in den abgeleiteten Knockout-Klonen. Auch die Abhängigkeit der Senkung von der Fenofibrat-Dosis war in den Mutterkulturen stärker. Obwohl die Effekte der eingesetzten Konzentrationen von TMZ in den meisten Fällen gering waren, war die Senkung der ODs durch TMZ/10^{-3} M Fenofibrat höher als durch 10^{-3} M Fenofibrat allein. Ein

deutlicher Unterschied zwischen PPARβ-, PPARβ/γ- oder PPARγ-Knockout Klonen wurde nicht evident.

3.3 Die Wirkung von Fenofibrat und TMZ auf editierte Klone variiert

3.3.1 Einfluss von Fenofibrat und TMZ auf den Stammzellcharakter

Um den Einfluss der Behandlung von SGLCs mit Fenofibrat und Temozolomid auf den Stammzellcharakter zu untersuchen, wurden immunzytochemische Analysen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zunächst expandiert und anschließend in einer definierten Dichte von $1x10^4$ Zellen/ cm^2 plattiert. Einen Tag nach der Plattierung wurden die *chamber slides* mit TMZ, Fenofibrat oder beiden Reagenzien behandelt. Da TMZ in DMSO gelöst vorlag, erfolgte eine Kontrollbehandlung mit DMSO. Fünf Tage nach der Behandlung erfolgten die Fixierung und die immunzytochemischen Färbungen der *chamber slides*. Es wurden Doppelfärbungen mit einem Kaninchen-Antikörper gegen Sox-2 und einem Maus-Antikörper gegen CD133 durchgeführt, gefolgt von einer Kernfärbung mit DAPI.

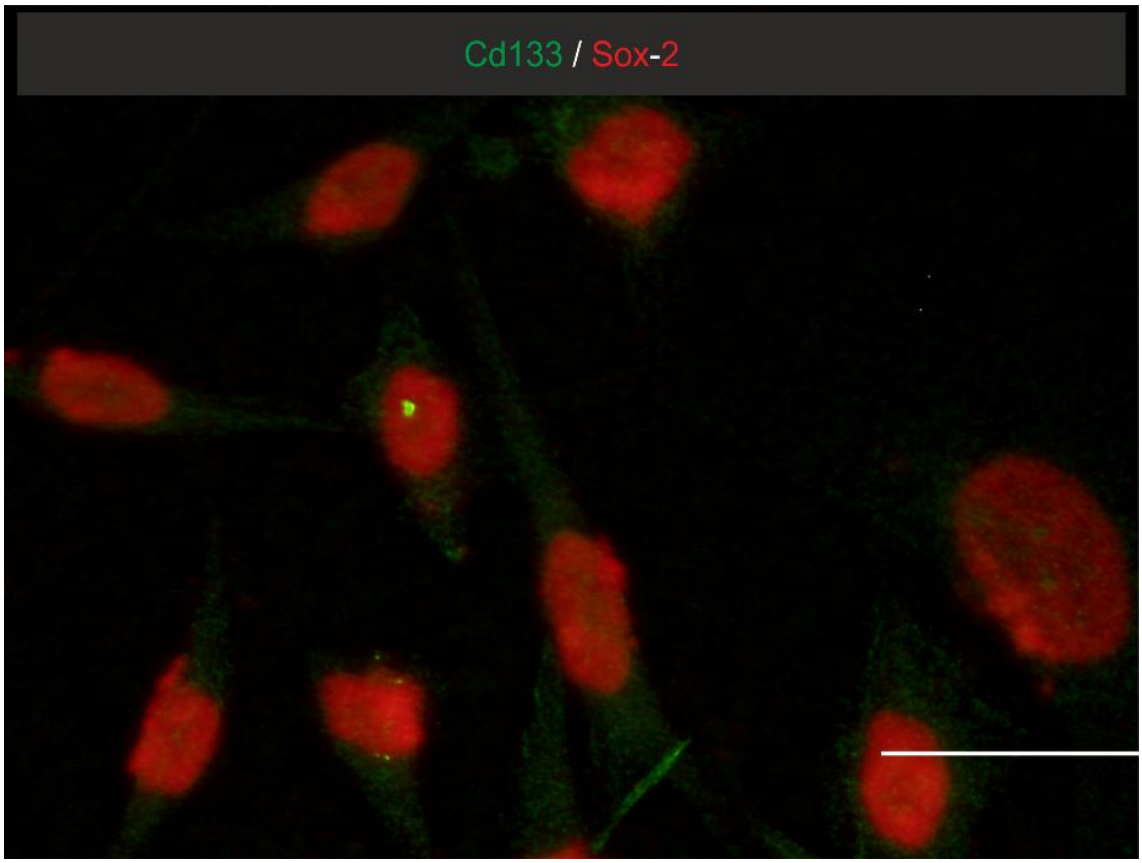

Abbildung 19: Analyse des Stammzellcharakters. Immunzytochemische Analyse mit der Antikörperkombination Maus-Anti CD133/ Ziege-anti-Maus-Dylight (Grün) und Kaninchen-anti-Sox2/Ziege-anti-Kaninchen Cy3 (rot). Das membranständige Protein CD133 wird als punktförmiges Muster an den Oberflächen der T1495 C4E10-Zellen sichtbar. Der Sox2-Antikörper weist die Bindung von Sox2 an Promotoren und Enhancern von Sox2-Zielgenen nach. Die Belichtungszeit wurde zuvor in der Arbeitsgruppe empirisch ermittelt. CD: *cluster of differentiation*; Sox2: SRY (*sex determining region* Y)-box 2. Balken: 50 µm.

Die mikroskopische Auswertung mithilfe des Fluoreszenzmikroskopes Biozero BZ-8000 und der Software BZ-9000. Es wurden pro Behandlung zehn repräsentative Mikrofotografien angefertigt, welche anschließend verblindet mit der Software Q-Path ausgewertet wurden. Abbildung 19 zeigt eine typische Mikrofotografie einer solchen Analyse. Um das Sox2-Signal deutlich zu erkennen, wurde der DAPI-Kanal in den Abbildungen 20 und 22 ausgeblendet.

Wie in der Einleitung beschrieben, ist Sox-2 ein Transkriptionsfaktor, der eine zentrale Rolle für die Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters von SLGCs spielt (Alonso et al., 2011; Chen et al., 2010; Zechel et al., 2024). Das Protein ist im Zellkern lokalisiert, wo es an Promotoren und Enhancer der Transkription von Sox2-Zielgenen bindet. Entsprechend ist die Färbung mit dem Sox2-Antikörper nicht homogen (siehe Beispiel in Abb. 19), da es nur eine limitierte Anzahl an Zielgenen gibt, die zudem mit zunehmender Differenzierung der SLGCs abgeschaltet werden und dann für Sox2 nicht mehr zugängig sind. Differenzierte GBM-Zellen sind Sox2-negativ, die Typ I-Zelle (Gliomstammzelle) stark positiv, die

intermediären Progenitorstadien (Typ II- und III-Zellen) weisen intermediäre Signalstärken auf. Das CD133-Signal ist nur in Typ II-Zellen deutlich, in Typ I- und Typ III-Zellen jedoch nur gering ausgeprägt oder abwesend (Chen et al., 2010). Im Beispiel (Abb. 19) ist eine hohe Sox2-Expression mit einer sehr geringen CD133-Expression assoziiert. Die Abbildung zeigt auch, dass die Klassifizierung einer Zelle als Typ I- bzw. Typ II-Zelle in der Praxis problematisch ist, weshalb in der vorliegenden Arbeit eine Einteilung in Sox2-positive (SLGC) versus Sox2-negative Zellen vorgezogen wurde.

Die Behandlungen der T1440 MC und editierten T1440-Klone erfolgten mit 25 µM TMZ und 10^{-4} M Fenofibrat. In der T1440 MC (Abbs 20, 21) wiesen in der DMSO-Kontrolle 43 % der Zellen ein Sox-2 Signal auf, wobei die Signalintensität eher gering war. Nach der Fenofibrat-Behandlung reduzierte sich der Anteil von Sox-2 positiven Zellen auf 32 %; gleichzeitig führte die Behandlung mit Fenofibrat führte zu einer signifikanten Reduktion der Gesamtzellzahl im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Abb. 21A). In der Doppelbehandlung reduzierte sich die Anzahl der Sox-2 positiven Zellen auf 24 %, wobei gleichzeitig eine signifikante Reduktion der Gesamtzellzahl im Vergleich zur DMSO-Kontrolle festgestellt wurde. In der Einzelbehandlung mit TMZ wiesen 37 % der Zellen ein Sox-2 Signal auf und es kam relativ zur DMSO-Kontrolle zu einer signifikanten Reduktion der Gesamtzellzahl.

In Kulturen des PPARB-Knockout Klons T1440 G5 E6 β (Abbs. 20, 21B) wiesen lediglich 2 % die Zellen in der DMSO-Kontrolle eindeutig ein positives Sox-2 Signal auf. Weiterhin wurde das CD133-Signal teilweise im Zellkern sichtbar. Zusammen weist dies auf ein abnormes Verhalten des Klons hin, sodass die Interpretation der Sox2-Quantifizierung nur mit Einschränkungen erfolgen kann. Nach der alleinigen Fenofibrat-Behandlung stieg der Anteil an Sox-2 positiven Zellen auf 10 % an. Die Gesamtzellzahl reduzierte sich im Vergleich zur DMSO-Kontrolle um 20%, wobei dieser Wert aufgrund der Variabilität der Präparate nicht signifikant war. Nach der Doppelbehandlung stieg der relative Anteil an Sox-2 positiven Zellen auf 15 % an und die Gesamtzellzahl reduzierte sich im Vergleich zur DMSO-Kontrolle signifikant (Abnahme 83%). Die alleinige TMZ-Behandlung führte zum Anstieg des Anteils an Sox-2 positiven Zellen auf 25% an, wobei es gleichzeitig zu einer signifikanten Reduktion der Gesamtzellzahl im Vergleich zur DMSO-Kontrolle kam (Abnahme 85%).

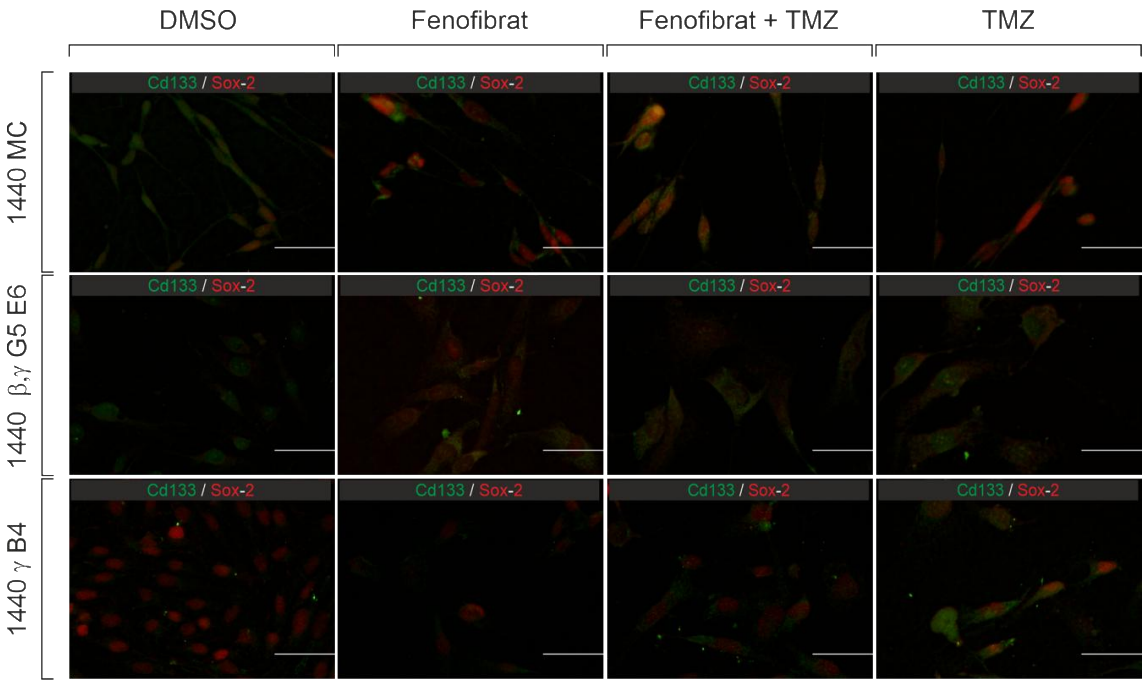

Abbildung 20: Sox-2 und CD133 Expression nach der Behandlung mit DMSO, Fenofibrat und TMZ in der T1440 MC und korrespondierenden Klonen Immunzytochemische Analysen mit der Antikörperkombination Maus-Anti CD133/Ziege-anti-Maus-Dylight (Grün) und Kaninchien-anti-Sox2/Ziege-anti-Kaninchien Cy3 (rot). Die Zellen wurden am Tag d5 nach der Behandlung mit DMSO, 10^{-4} M Fenofibrat, 10^{-4} M Fenofibrat + 25 µM TMZ und 25 µM TMZ., fixiert. Für weitere Infos siehe Legende zur Abb. 19 - Balken: 50 µm.

Für den PPARG-Knockout Klon T1440 B4 γ (Abbs. 20, 21C) wurden in der DMSO-Kontrolle 74 % Sox2-positive Zellen ermittelt. Nach der Fenofibrat-Behandlung war der relative Anteil an Sox-2 positiven Zellen auf 32 % reduziert und die Gesamtzellzahl im Vergleich nahm im Vergleich zur DMSO-Kontrolle signifikant ab (Reduktion um 60%). Nach der Doppelbehandlung reduzierte sich der Anteil an Sox-2 positiven Zellen auf 44 %, führte jedoch zu keiner signifikanten Reduktion der Gesamtzellzahl, obwohl die Zellzahl im Mittel um 25% geringer war als in der DMSO-Kontrolle. Nach der alleinigen TMZ-Behandlung reduzierte sich der Anteil an Sox-2 positiven Zellen auf 47 % und es kam zu einer signifikanten Reduktion der Gesamtzellzahl im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Abnahme um 70%; Abb. 21C).

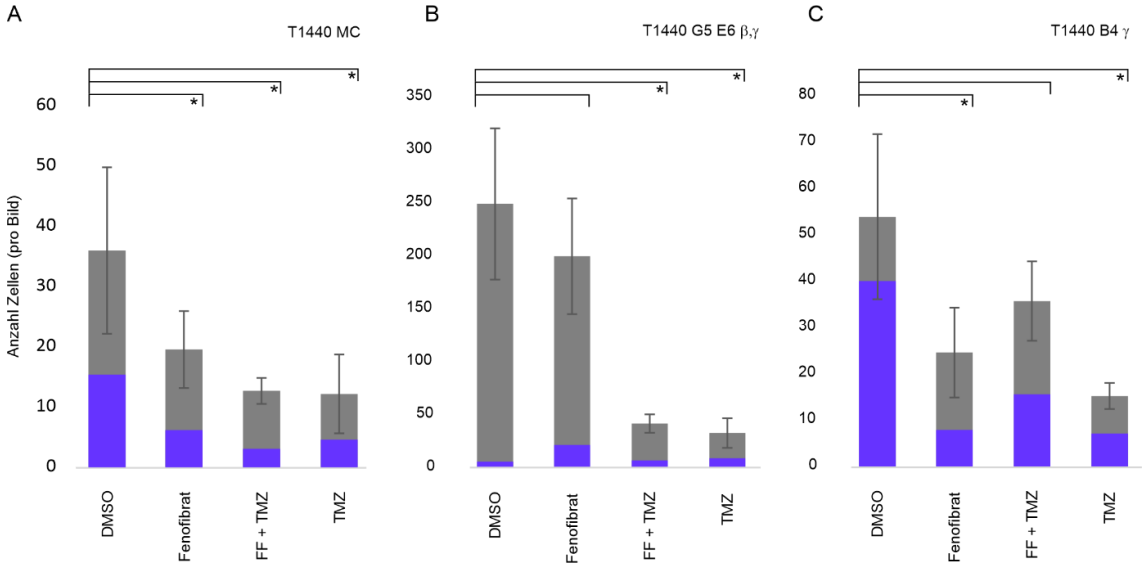

Abbildung 21: Gesamtzellzahl und relativer Anteil an Sox2-positiven Zellen der T1440 Mutterkultur und korrespondierenden Klonen Die Gesamtzellzahl wurde anhand von jeweils zehn repräsentativen Mikrofotografien ermittelt, die sich aus Experimenten mit demselben biologischen Replikat ableiten. In Blau dargestellt der Anteil an Sox-2 positiven Zellen. (A) T1440 MC; (B) T1440 G5 E6 βγ; (C) T1440 B4 γ. - Statistisch signifikante Abweichungen der Gesamtzellzahl innerhalb der Behandlungsgruppen und relativ zur DMSO-Kontrolle wurden mittels *one-way* ANOVA mit anschließender *Dunnetts* Korrektur für multiples Testen ermittelt; eine vergleichende statistische Bewertung der Anteile an Sox2-positiven Zellen erfolgte aufgrund der zum Teil sehr niedrigen Zahlen nicht. Unter Berücksichtigung des multiplen Testens bei der Durchführung der drei paarweisen Vergleiche wurde das Signifikanzniveau ($p < 0,05$) mittels *Dunnetts multiple comparison test* korrigiert und auf 0.05/3 = 0,01666 gesetzt. Entsprechend wurden in den Abbildungen alle p-Werte, die < 0,016 sind mit einem „*“ als signifikant gekennzeichnet. Fenofibrat 10^{-4} M; FF: Fenofibrat 10^{-4} M M TMZ: 25 µM; MC: Mutterkultur; DMSO; Dimethylsulfoxid; Sox2: SRY (sex determining region Y)-box 2.

Die Behandlungen der T1495 MC und editierten T1495-Klone erfolgten ebenfalls mit 10^{-4} M Fenofibrat; aufgrund des MGMT-Status (Zechel et al., 2024) wurden jedoch 50 µM TMZ eingesetzt. Wie im Kontext der BrdU-ELISA wurden drei T1495 Klone mit PPARβ und zwei Klone mit PPARγ Knockout untersucht.

In der DMSO-Kontrolle der T1495 Mutterkultur (Abb. 22, 23A) lag der Anteil an Sox-2 positiven Zellen bei 18 %. Durch die Behandlung mit Fenofibrat reduzierte sich der relative Anteil an Sox-2 positiven Zellen auf 10 %. Die Gesamtzahl der Zellen nahm im Vergleich zur DMSO-Kontrolle um 22% ab, die Änderung war jedoch aufgrund der hohen Variabilität zwischen den Präparaten nicht signifikant. Durch die Doppelbehandlung mit Fenofibrat und TMZ reduzierte sich die Anzahl der Sox-2 positiven Zellen auf 9% und es wurde eine signifikante Reduktion der Gesamtzellzahl um 55% ermittelt (Abb. 23A). Nach der alleinigen TMZ-Behandlung stieg der Anteil an Sox-2 positiven Zellen auf 25 % an. Die Gesamtzellzahl war signifikant geringer als in der DMSO-Kontrolle (Reduktion um 50%), lag dabei aber über der Gesamtzellzahl in der Doppelbehandlung und unter derjenigen nach der Fenofibrat-

Behandlung (Abb. 23A). Somit reduzierte die Doppelbehandlung die Zellzahl effizienter als die Einzelbehandlungen und unterschied sich damit von den Ergebnissen der editierten Klone.

Für die drei Klone mit funktionellem Knockout im PPARB/D, T1495 D3 F5 β, T1495 C4 G8 β, und T1495 C4 E10 β, ergaben sich unterschiedliche Werte nach den Quantifizierungen (Abbs. 22, 23 B-D). So reduzierte die Fenofibrat-Behandlung die Gesamtzellzahl im Fall der Klone T1495 D3 F5 β und T1495 C4 E10 β signifikant, während im Fall T1495 C4 G8 β, sogar ein nicht-signifikanter Anstieg des Mittelwerts um 15% ermittelt wurde. Dabei lag die Fenofibrat-vermittelte Reduktion der Gesamtzellzahl relativ zu den jeweiligen DMSO-Kontrollen für den Klon T1495 D3 F5 β deutlich höher (Abnahme 60%) als für den Klon T1495 C4 E10 β (Abnahme 40%). Nach der Doppelbehandlung war die Gesamtzellzahl relativ zur Kontrolle im Fall von T1495 C4 E10 β (Abnahme 60%) signifikant reduziert, während im Fall von T1495 D3 F5 β und T1495 C4 G8 β keine Senkung ermittelt wurde. TMZ (25 µM) senkte die Gesamtzellzahl lediglich im Fall von T1495 C4 E10 β, wobei die alleinige TMZ-Gabe und die Fenofibrat-/TMZ-Doppelbehandlung nahezu identische Werte ergaben.

Hinsichtlich der relativen Anteile an Sox2-positven Zellen war festzustellen, dass diese in den DMSO-Kontrollen von T1495 D3 F5 β bei 71%, von T1495 C4 G8 β bei 39% und von T1495 C4 E10 β bei 53% lagen (Abbs. 22, 23 B-D). Durch die Fenofibrat-Behandlung nahm der relative Anteil an Sox2-positven Zellen für T1495 D3 F5 β und T1495 C4 G8 β geringfügig ab (D3 F5 β: Senkung von 71% auf 65%; C4 G8 β: Senkung von 39% auf 32%), im Fall von T1495 C4 E10 β sank der Anteil an Sox2-positiven Zellen dagegen von 53% auf 19%. Die Doppelbehandlung führte zur Steigerung des relativen Anteils Sox2-positver Zellen im Fall von T1495 D3 F5 β, wobei eine nahezu identische Steigerung auch mit TMZ allein erreicht wurde (DMSO: 71%; FF: 65%; TMZ/FF: 82%; TMZ: 84%). Die geringfügige Anreicherung von Sox2-positiven Zellen war somit im Klon T1495 D3 F5 β auf die Wirkung des TMZ zurückzuführen.

Im Fall des Klons T1495 C4 G8 β, wurden nach der Doppelbehandlung 40% Sox2-positive Zellen ermittelt, nach der alleinigen TMZ-Gabe jedoch nur 24% (DMSO: 39%; FF: 32%). Somit wirkte die Anwesenheit von Fenobfibrat bei diesem Klon der TMZ-vermittelten Senkung des relativen Anteils an Sox2-Positven Zellen entgegen. Der dritte PPARB/D-Knockout-Klon (T1495 C4 E10 β) zeigte nach allen Behandlungen eine Senkung der relativen

Anteile an Sox2-positiven Zellen, die nach den Einzelbandlungen stärker waren als nach der Doppelbehandlung (DMSO: 53%; FF: 19%; TMZ/FF: 34%; TMZ: 28%), womit es zu einer partiellen Aufhebung der Fenofibrat-Wirkung durch TMZ gekommen sein könnte.

Die beiden T1495-Klone mit dem funktionellen Knockout von PPARG verhielten sich ähnlich, obwohl die Werte etwas unterschiedlich waren. So nahmen in beiden Fällen die Mittelwerte der Gesamtzellzahlen nach der Fenofibrat-Behandlung um 25% (T1495 B9 F4 γ) bzw. 20% (T1495 B9 D10 γ) ab (Abbs. 22, 23 E-F); aufgrund der hohen Variabilität zwischen den Präparaten waren diese Änderungen jedoch nicht statistisch signifikant. Dagegen wurden weder mit TMZ allein noch in der Doppelbehandlung deutliche Abweichungen von den Mittelwerten der zugehörigen DMSO-Kontrollen ermittelt.

Hinsichtlich des relativen Anteils an Sox2-positiven Zellen wurden für den Klon T1495 B9 F4 γ 82% und für den Klon T1495 B9 D10 γ 72% ermittelt. Während die relativen Anteile an Sox2-positiven Zellen im Fall von T1495 B9 F4 γ durch Fenofibrat geringfügig auf 62% gesenkt wurden, zeigte der Klon T1495 B9 D10 γ einen Anstieg auf 76%. Die alleinige TMZ-Behandlung senkte den relativen Anteil Sox2-positiver beim Klon T1495 B9 F4 γ auf 59%, die Doppelbehandlung auf 73%. Somit könnte die Anwesenheit von Fenofibrat die Wirkung von TMZ zumindest teilweise aufgehoben haben, was ebenfalls für den Klon T1495 B9 D10 γ beobachtet wurde (DMSO: 71%; FF: 76%; TMZ: 74%; FF/TMZ 90%).

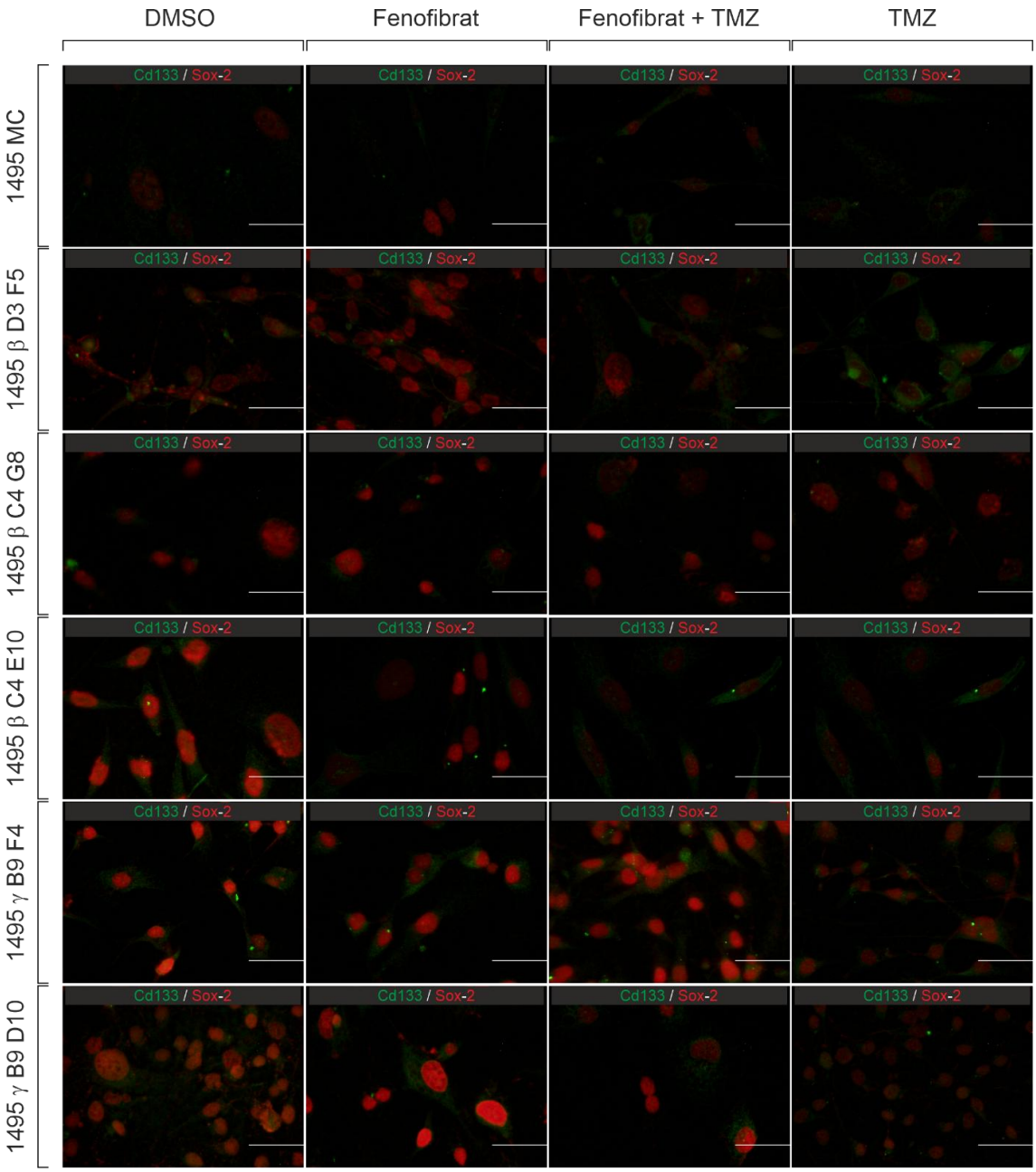

Abbildung 22: Sox-2 und CD133 Expression nach der Behandlung mit DMSO, Fenofibrat und TMZ in der T1495 MC und korrespondierenden Klonen Immunzytochemische Analysen mit der Antikörperkombination Maus-Anti CD133/ Ziege-anti-Maus-Dylight (Grün) und Kaninchien-anti-Sox2/Ziege-anti-Kaninchen Cy3 (rot). Die Zellen wurden an d5 nach der Behandlung mit DMSO, 10^{-4} M Fenofibrat, 10^{-4} M Fenofibrat /50 µM TMZ oder 50 µM TMZ fixiert. Für Details siehe Legende Abb. 19. Balken 50 µm.

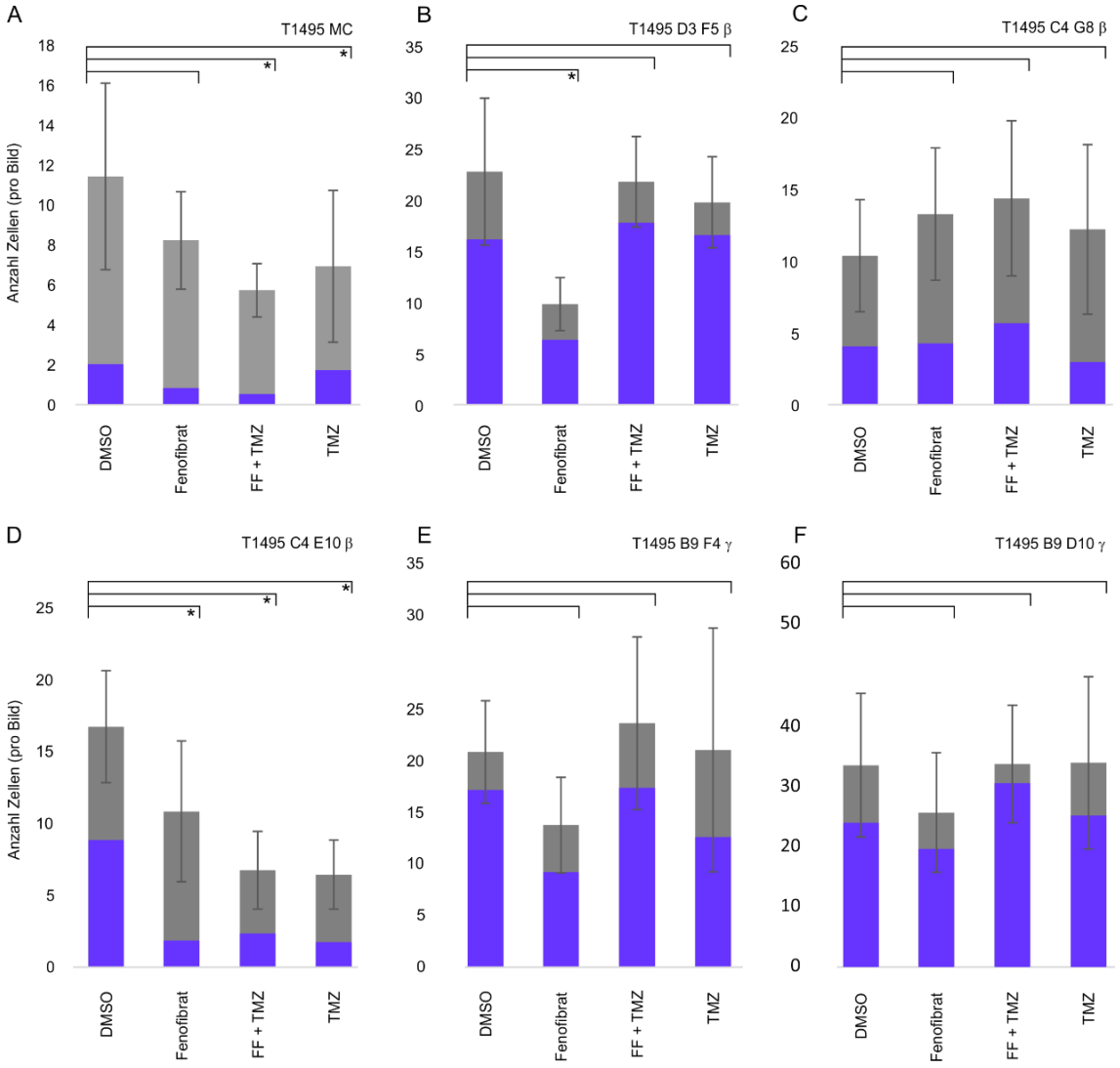

Abbildung 23: Gesamtzellzahl und relativer Anteil an Sox2-positiven Zellen in der T1495 Mutterkultur und korrespondierenden Klonen. Die Gesamtzellzahl wurde anhand von jeweils zehn repräsentativen Mikrofotografien ermittelt, die sich aus Experimenten mit demselben biologischen Replikat ableiten. In Blau dargestellt der Anteil an Sox-2 positiven Zellen. (A) T1495 MC; (B) T1495 D3 F5 β; (C) T1495 C4 G8 β; (D) 1495 C4 E10 β; (E) T1495 B9 F4 γ; (F) 1495 B9 D10 γ. - Statistisch signifikante Abweichungen der Gesamtzellzahl innerhalb der Behandlungsgruppen und relativ zur DMSO-Kontrolle wurden mittels *one-way* ANOVA mit anschließender *Dunnetts* Korrektur für multiples Testen ermittelt; eine vergleichende statistische Bewertung der Anteile an Sox2-positiven Zellen erfolgte aufgrund der zum Teil sehr niedrigen Zahlen nicht. Unter Berücksichtigung des multiplen Testens bei der Durchführung der drei paarweisen Vergleiche wurde das Signifikanzniveau ($p < 0{,}05$) mittels *Dunnetts multiple comparison test* korrigiert und auf 0.05/3 = 0,01666 gesetzt. Entsprechend wurden in den Abbildungen alle p-Werte, die < 0,016 sind mit einem „*“ als signifikant gekennzeichnet. Fenofibrat 10^4 M; FF: Fenofibrat 10^4 M TMZ: 50 µM; MC: Mutterkultur; DMSO; Dimethylsulfoxid; Sox2: SRY (*sex determining region* Y)-box 2.

3.3.2 Fenofibrat vermindert die TMZ-induzierte Phosphorylierung von H2AX

Die Phosphorylierung der Histonvariante H2AX zu γH2AX kann durch Bestrahlung, zytotoxische Agenzien und Zellstress ausgelöst werden (Sharma et al., 2012). Die Anwesenheit von γH2AX signalisiert das Vorhandensein von Doppelstrangbrüchen. Weiterhin induziert γH2AX die Aktivierung von DNA-Reparaturkaskaden, die zur Reparatur der Läsion führen, oder die Apoptose einleiten. Durch die immuncytochemische Analyse mit einem Antikörper gegen γH2AX sollte geprüft werden, ob durch TMZ-Läsionen in der DNA erzeugt werden, und ob dieser Vorgang durch 10^{-4} M Fenofibrat beeinflusst wird. Die TMZ-Behandlungen erfolgen mit 25 µM (T1440 MC und Klone) bzw. 50 µM (T1495 MC und Klone). Es wurden Doppelfärbungen mit einem Kaninchen-anti-γH2AX- und einem Maus-anti-PML (Promyelozyten-Leukämie-Protein) Antikörper, gefolgt von einer DAPI-Färbung des Zellkerns durchgeführt. PML wurde als Markerprotein für den Zellkern verwendet.

Abbildung 24 zeigt eine typische Doppelfärbung mit den Antikörpern gegen γH2AX und PML. Um die Darstellung der kernständigen Proteine zu optimieren wurde der DAPI-Kanal in den Abbildungen 25 und 27 ausgeblendet. Es wurden pro Behandlung zehn repräsentative Mikrofotografien angefertigt und anschließend verblindet mit der Software Q-Path ausgewertet; die Ergebnisse der Quantifizierung sind in Abbildung 26 und 28 dargestellt.

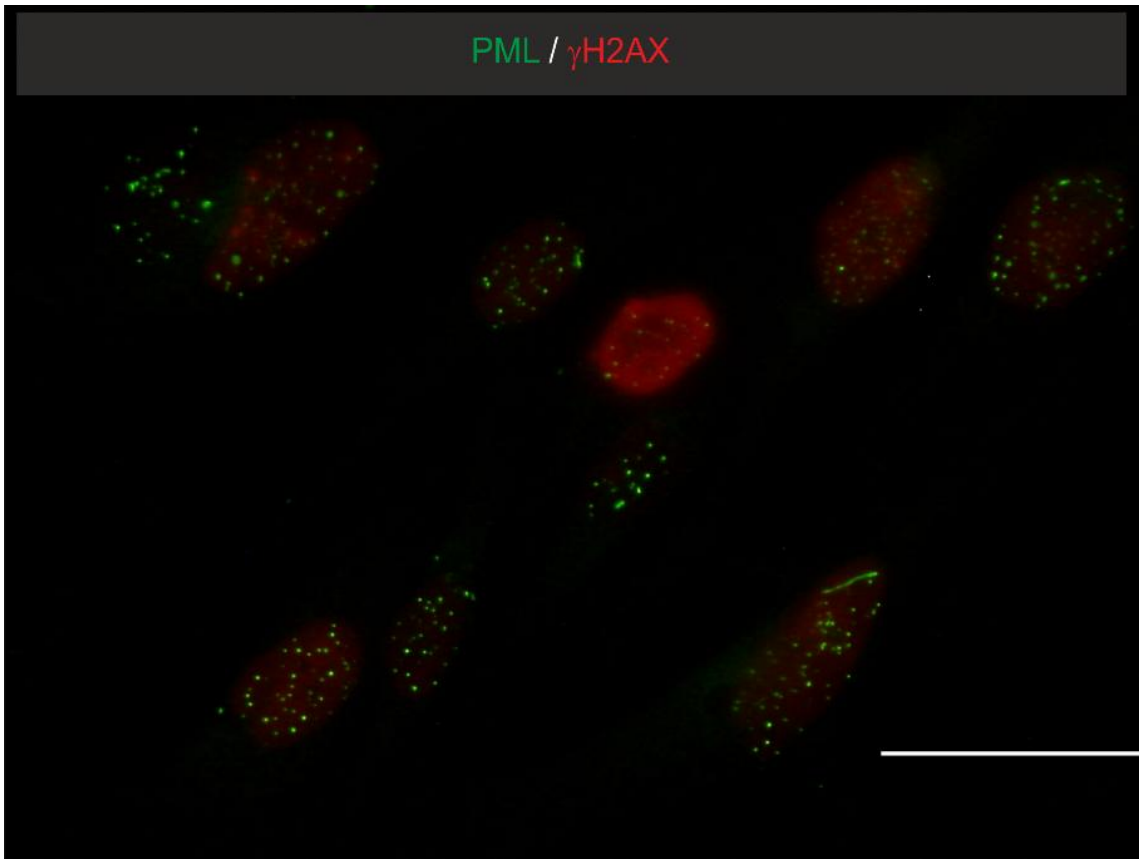

Abbildung 24: Analyse der Phosphorylierung von H2AX zu γH2AX. Immunzytochemische Analyse mit der Antikörperkombination Maus-Anti-PML/Ziege-anti-Maus-Dylight (Grün) und Kaninchen-anti-γH2AX/Ziege-anti-Kaninchen Cy3 (rot). Das kernständige Protein PML wird als punktförmiges Muster im Zellkern sichtbar. Der γH2AX-Antikörper weist die Phosphorylierung der Histonvariante H2AX nach, die als Nachweis für die Anwesenheit von DNA-Läsionen gilt (Bonner et al., 2008). Die Belichtungszeit wurde zuvor in der Arbeitsgruppe empirisch ermittelt. PML, Promyelozyten-Leukämie-Körper-Protein. - Balken: 50 µm.

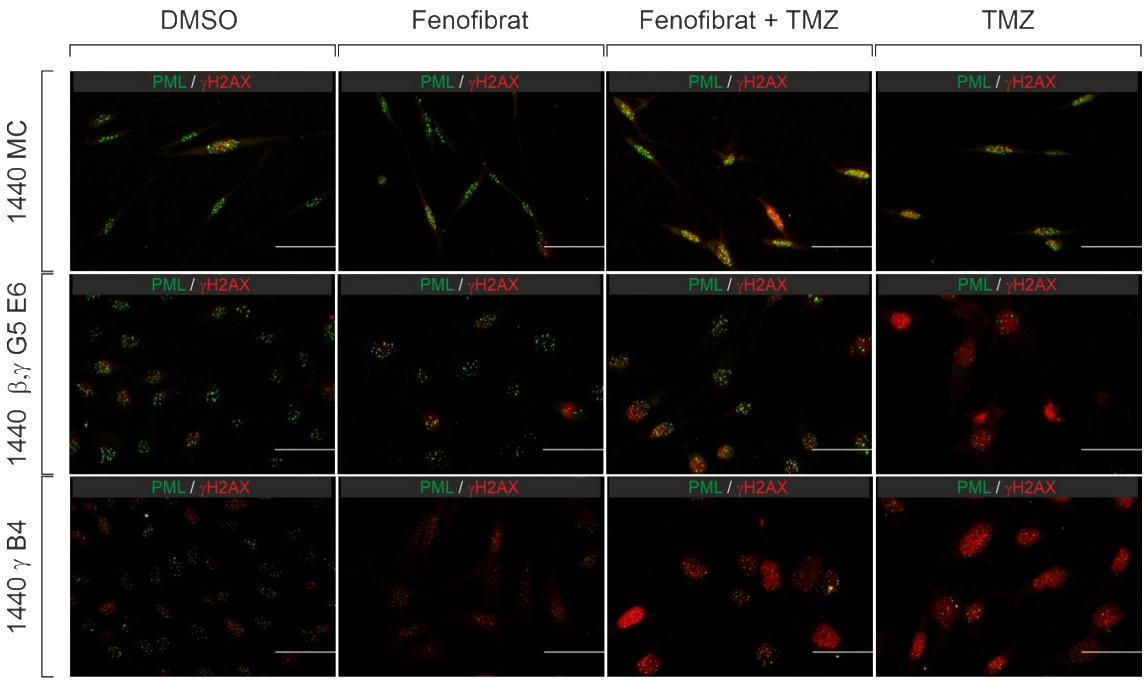

Abbildung 25: Nachweis von γH2AX und PML in behandelten und unbehandelten Kulturen von T1440 und abgeleiteten Klonen. Immunzytochemische Analysen mit der Antikörperkombination Kaninchen-anti-γH2AX/Ziege-anti-Kaninchien-cy3 (rot) und Maus-anti-PML/Ziege-anti-Maus-Dylight (grün) Die Zellen wurden an d5 nach der Behandlung mit DMSO, 10^{-4} M Fenofibrat, 10^{-4} M Fenofibrat/25µM TMZ bzw. 25µM TMZ fixiert. Für weitere Details siehe Legende zur Abb. 24. MC, Mutterkultur - Balken: 50 µm.

Für die T1440 MC (Abbs. 25, 26A) wurden in der DMSO-Kontrolle in 10 % der Zellen γH2AX-Signale detektiert. Nach der Behandlung mit Fenofibrat betrug der relative Anteil an γH2AX-positiven Zellen 9%, nach der TMZ-Behandlung 34%. Nach der Co-Applikation von TMZ und Fenofibrat waren 21% der Zellen γH2AX-positiv. Dies weist auf eine Reduktion der TMZ-vermittelten Induktion durch Fenofibrat hin. Für den Klon T1440 G5 E6 βγ (Abb. 25; 26B) betrug der Anteil an γH2AX-positiven Zellen in der DMSO-Kontrolle 20 %, in den Fenofibrat behandelten Kulturen 17%. Nach der TMZ-Behandlung war der relative Anteil an Zellen mit deutlichen γH2AX-Signalen auf 67% gestiegen, während dieser nach der alleinigen TMZ-Behandlung 84% betrug. Somit wirkte auch bei dem PPARβγ-Knockout die Fenofibrat-Behandlung der TMZ-induzierten Anwesenheit von γH2AX-positiven Zellen entgegen. Für den PPARγ-Knockout-Klon T1440 B4 γ ergab sich eine abweichende Situation. In diesem Fall waren bereits in der DMSO-Kontrolle 40% der Zellen γH2AX-positiv (Abbs. 25, 26C). Der

relative Anteil an γH2AX-positiven Zellen wurde in der Abwesenheit von TMZ, nicht aber in der Anwesenheit von TMZ gesenkt (DMAO: 40%; FF: 7%; TMZ: 84%; FF/TMZ: 83%).

Hinsichtlich der Gesamtzellzahlen führte die Fenofibrat-Behandlung in der Mutterkultur und den beiden editierten Klonen zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Zellzahl. So betrug die Fenofibrat-vermittelte Senkung der Zellzahl relativ zur DMSO-Kontrolle für die T1440 Mutterkultur 54%, für den Klon T1440 G5 E6 βγ 51% und für den Klon T1440 B4 γ: 32% (Abb. 26 A-C). Die Behandlung mit TMZ allein bewirkte ebenfalls eine signifikante Reduktion der Gesamtzellzahl, die effektiver war als mit Fenofibrat. Die TMZ-vermittelte Senkung erreichte relativ zur DMSO-Kontrolle 61% für T1440 MC, 81% für T1440 G5 E6 βγ und 91% für T1440 B4 γ (Abb. 26 A-C). Die Co-Applikation von Fenofibrat und TMZ induzierte ebenfalls eine statistisch signifikante Reduktion der Gesamtzellzahl, diese war jedoch im Fall der T1440 Mutterkultur und des Klons T1440 G5 E6 βγ weniger effektiv als mit TMZ allein. Im Fall des Klons T1440 B4 γ waren die Effekte von TMZ in An- und Abwesenheit von Fenofibrat sehr ähnlich (Reduktion durch TMZ: 91%; durch TMZ/FF: 93%).

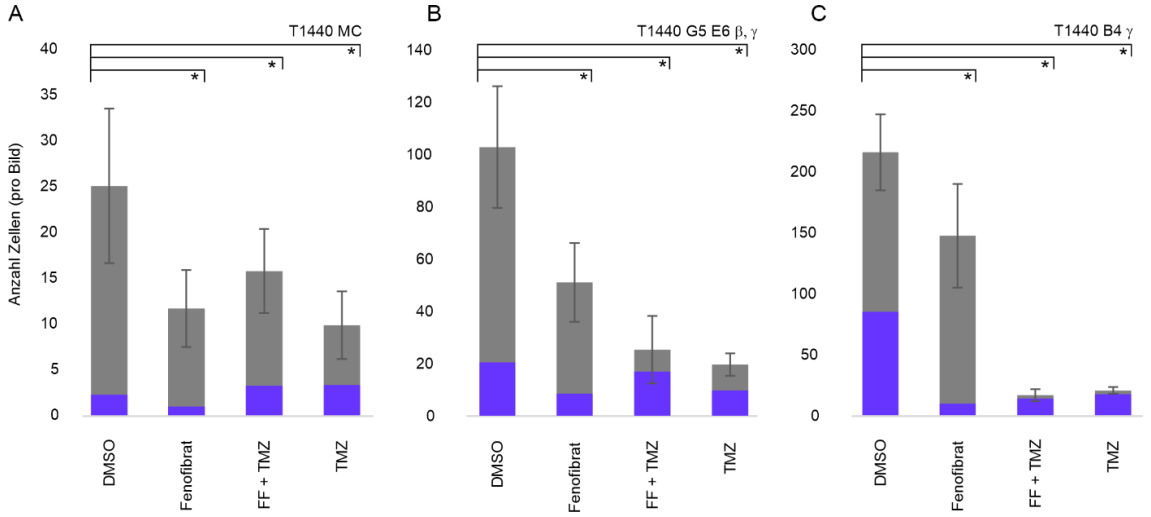

Abbildung 26: Gesamtzellzahl und relativer Anteil an γH2AX-positiven Zellen der T1440 Mutterkultur und korrespondieren Klone. Die Gesamtzellzahl wurde anhand von jeweils zehn repräsentativen Mikrofotografien ermittelt, die sich aus Experimenten mit demselben biologischen Replikat ableiten. In Blau dargestellt der Anteil an γH2AX positiven Zellen. (A) T1440 MC; (B) T1440 G5 E6 βγ; (C) T1440 B4 γ. - Statistisch signifikante Abweichungen der Gesamtzellzahl innerhalb der Behandlungsgruppen und relativ zur DMSO-Kontrolle wurden mittels *one-way* ANOVA mit anschließender *Dunnetts* Korrektur für multiples Testen ermittelt; eine vergleichende statistische Bewertung der Anteile an γH2AX-positiven Zellen erfolgte aufgrund der zum Teil sehr niedrigen Zahlen nicht. Unter Berücksichtigung des multiplen Testens bei der Durchführung der drei paarweisen Vergleiche wurde das Signifikanzniveau ($p < 0,05$) mittels *Dunnetts multiple comparison test* korrigiert und auf 0.05/3 = 0,01666 gesetzt. Entsprechend wurden in den Abbildungen alle p-Werte, die < 0,016 sind mit einem „*“ als signifikant gekennzeichnet. Fenofibrat 10^4 M; FF: Fenofibrat 10^4 M TMZ: 25 µM; MC: Mutterkultur; DMSO; Dimethylsulfoxid; γH2AX, phosphoryliertes H2AX.

Damit wirkte die gleichzeitige Gabe von Fenofibrat der TMZ–vermittelten Senkung der Zellzahl und der TMZ-vermittelten Induktion von γH2AX in der T1440 Mutterkultur und dem Klon T1440 G5 E6 βγ entgegen, während dies für den Klon T1440 B4 γ nicht der Fall war (Abb. 26 A-C).

In der DMSO-Kontrolle der T1495 Mutterkultur (Abbs. 27, 28A) waren an Tag d5 20 % der Zellen γH2AX positiv. Nach der Behandlung mit 10^{-4} M Fenofibrat reduzierte sich der Anteil an γH2AX-positiven Zellen auf 13%. Die alleinige Behandlung mit 50 µM TMZ resultierte in einem relativen Anteil an γH2AX-positiven Zellen von 36%, während nach der Doppelbehandlung mit 10^{-4} M Fenofibrat und 50 µM TMZ 24% der Zellen ein γH2AX-Signal aufwiesen.

Von den drei T1495-Klonen mit PPARB/D-Editierung wies einer ebenfalls eine Verminderung des TMZ-vermittelten Effekts durch Co-Applikation von Fenofibrat auf. So wurden im Fall des Klons T1495 D3 F5 β (Abb. 27, 28B) in der Kontrolle 57% γH2AX-positive Zellen ermittelt, nach der alleinigen Behandlung mit Fenofibrat 20%, nach alleinige TMZ-

Gabe 63% und nach der Doppelbehandlung mit Fenofibrat und TMZ 29% (Abb. 28B). Die beiden anderen PPARB/D-Knockouts zeigten dagegen eine Verstärkung des TMZ-vermittelten Effekts durch Fenofibrat. Im Fall des Klons T1495 C4 G8 β (Abbs. 27, 28C) wurden in der DMSO-Kontrolle 31% γH2AX-positive Zellen ermittelt, nach Fenofibrat-Gabe 24%, nach der TMZ-Behandlung 31% und nach der Doppelbehandlung mit Fenofibrat/TMZ 42%. Somit verminderte Fenofibrat den relativen Anteil an γH2AX-positiven Zellen in Abwesenheit von TMZ, jedoch nicht in Anwesenheit von TMZ. Im Fall des Klons T1495 C4 E10 β (Abbs. 27, 28D) wurden in der DMSO-Kontrolle 44% γH2AX-positive Zellen ermittelt, nach Fenofibrat-Gabe 49%, nach der TMZ-Behandlung 48% und nach der Doppelbehandlung mit Fenofibrat/TMZ 58%. Somit konnte Fenofibrat im Fall des Klons T1495 C4 E10 β den relativen Anteil an γH2AX-positiven Zellen weder in An- noch in Abwesenheit von TMZ reduzieren (Abb. 28D).

Die beiden T1495-Klone mit einem PPARG-Knockout verhielten sich ähnlich wie die T1495-Mutterkultur (Abbs. 27, 28 A, E, F). So betrug der relative Anteil an γH2AX-positive Zellen in den DMSO-Kontrollen des Klons T1495 B9 F4 γ 22%, nach der Fenofibrat-Behandlung 14%, nach der TMZ-Behandlung 30% und nach der Co-Applikation von Fenofibrat und TMZ 15%. Für den Klon T1495 B9 D10 γ lagen die relativen Anteile an γH2AX-positiven Zellen bei 30 % in der DMSO-Kontrolle, 24% nach Fenofibrat-Gabe, 43% nach TMZ-Behandlung und bei 27% nach Co-Applikation von TMZ und Fenofibrat.

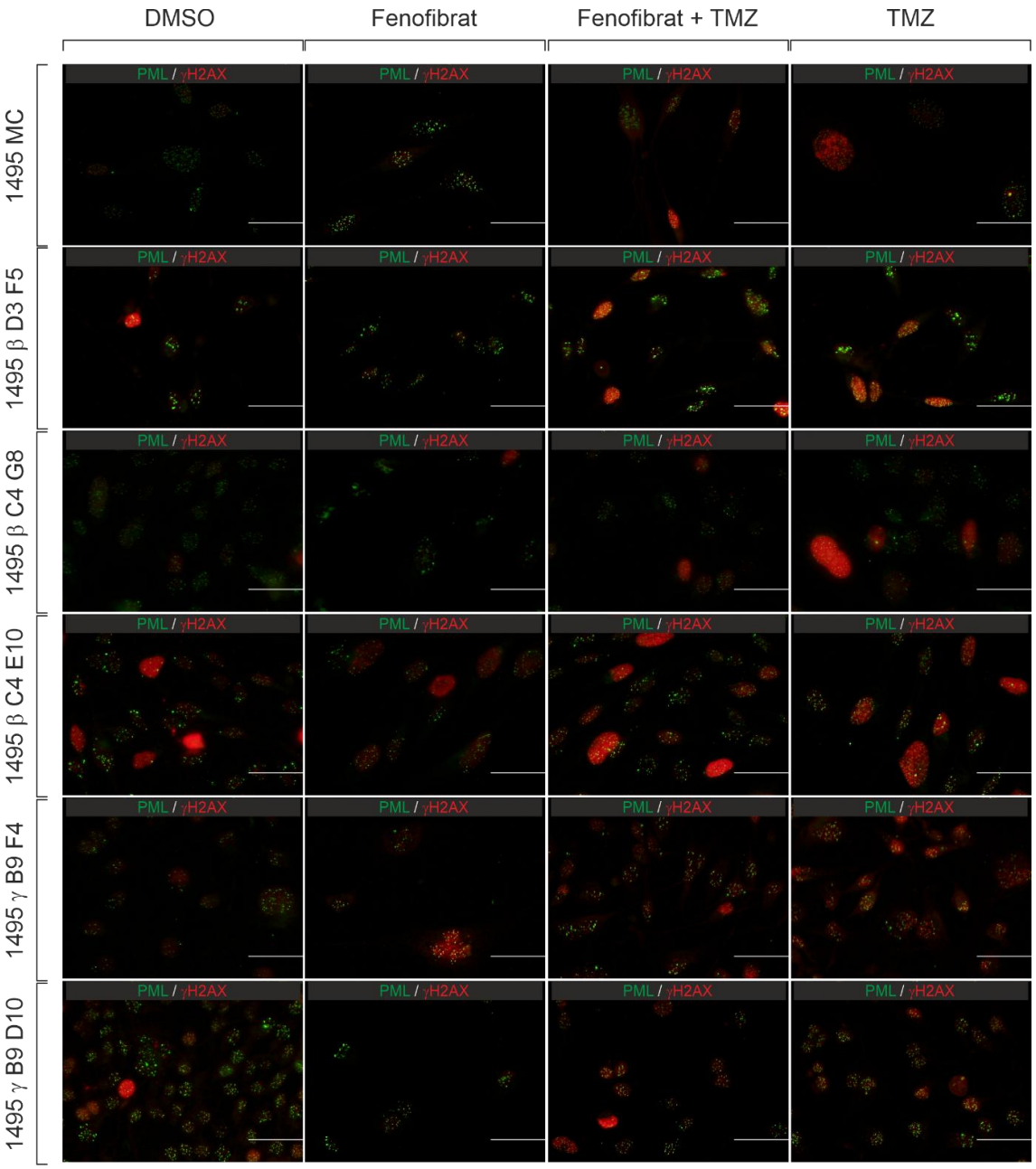

Abbildung 27: Nachweis von γH2AX und PML in behandelten und unbehandelten Kulturen von T1495 und abgeleiteten Klonen. Immunzytochemische Analysen mit der Antikörperkombination Kaninchen-anti-γH2AX/Ziege-anti-Kaninchien-cy3 (rot) und Maus-anti-PML/Ziege-anti-Maus-Dylight (grün) Die Zellen wurden an d5 nach der Behandlung mit DMSO, 10^{-4} M Fenofibrat, 10^{-4} M Fenofibrat/25µM TMZ bzw. 25µM TMZ fixiert. Für weitere Details siehe Legende zur Abb. 24. MC, Mutterkultur. Balken: 50 µm.

Auch hinsichtlich der Effekte auf die Gesamtzellzahlen wurden in der Gruppe der T1495-Klone Unterschiede festgestellt, die jedoch nicht in einem Zusammenhang mit dem Typ der Editierung standen. So bewirkte Fenofibrat in der T1495 Mutterkultur, sowie den Klonen T1495 C4 G8 β, T1495 C4 E10 β und T1495 B9 D10 γ eine statistisch signifikante Senkung der Gesamtzellzahl (Senkung relativ zu den Kontrollen: 41% MC; 88% C4 G8 β, 71% C4 E10 β und 66% B9 D10 γ). In diesem Zusammenhang ist festzustellen, dass auch in den Fällen

der beiden anderen Klone die Mittwerte deutlich abnahmen (19% D3 F5 β und 39% B9 F4 γ), jedoch eine hohe Variabilität zwischen den Präparaten bestand.

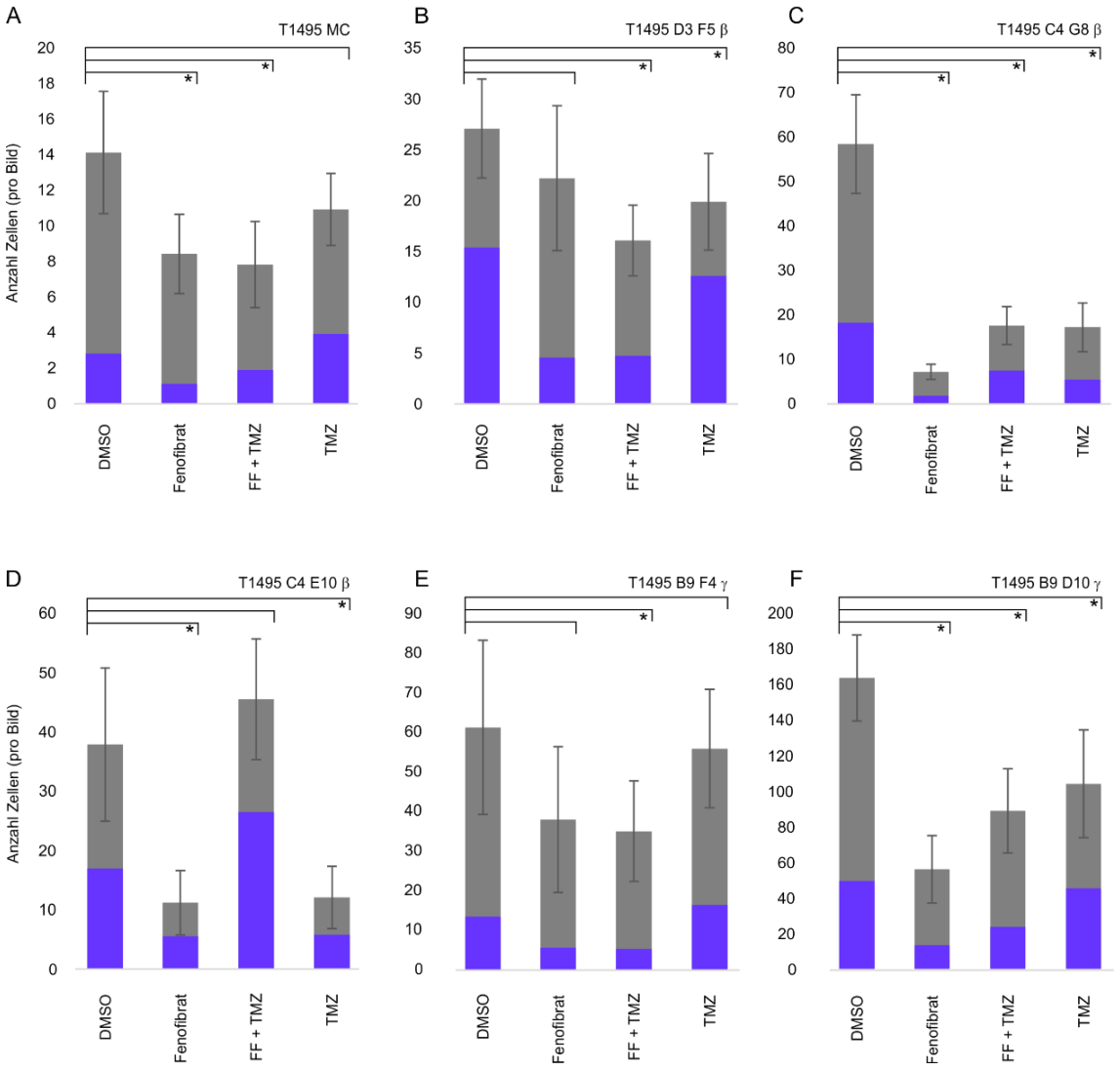

Abbildung 28: Gesamtzellzahl und relativer Anteil an γH2AX-positiven Zellen der T1495 Mutterkultur und korrespondieren Klone. Die Gesamtzellzahl wurde anhand von jeweils zehn repräsentativen Mikrofotografien ermittelt, die sich aus Experimenten mit demselben biologischen Replikat ableiten. In Blau dargestellt der Anteil an γH2AX positiven Zellen. (A) T1495 MC; (B) T1495 D3 F5 β; (C) T1495 C4 G8 β; (D) 1495 C4 E10 β; (E) T1495 B9 F4 γ; (F) 1495 B9 D10 γ. - Statistisch signifikante Abweichungen der Gesamtzellzahl innerhalb der Behandlungsgruppen und relativ zur DMSO-Kontrolle wurden mittels *one-way* ANOVA mit anschließender *Dunnetts* Korrektur für multiples Testen ermittelt; eine vergleichende statistische Bewertung der Anteile an γH2AX-positiven Zellen erfolgte aufgrund der zum Teil sehr niedrigen Zahlen nicht. Unter Berücksichtigung des multiplen Testens bei der Durchführung der drei paarweisen Vergleiche wurde das Signifikanzniveau ($p < 0{,}05$) mittels *Dunnetts multiple comparison test* korrigiert und auf 0.05/3 = 0,01666 gesetzt. Entsprechend wurden in den Abbildungen alle p-Werte, die < 0,016 sind mit einem „*“ als signifikant gekennzeichnet. Fenofibrat 10^4 M; FF: Fenofibrat 10^4 M TMZ: 25 µM; MC: Mutterkultur; DMSO; Dimethylsulfoxid; γH2AX, phosphoryliertes H2AX.

Mit 50 µM TMZ allein wurden Senkungen der Gesamtzellzahl um 10% für T1495 B9 F4 γ und um 20-25% für T1495 MC und T1495 D3 F5 β beobachtet (Abb. 28 A, B, E). Eine deutliche Senkung der Zellzahl um 37% wurde für B9 D10 γ, und eine drastische Reduktion um 70-75% für T1495 C4 G8 β und T1495 C4 E10 β beobachtet. Dabei wurde für den Klon T1495 C4 E10 β, nicht aber den Klon T1495 C4 G8 β die TMZ-vermittelte Senkung der Gesamtzellzahl durch die gleichzeitige Gabe von Fenofibrat aufgehoben (Abb. 28C und D). In allen übrigen Fällen, einschließlich der Mutterkultur, war die Reduktion der Zellzahl durch Fenofibrat/TMZ effektiver als durch TMZ allein. Relativ zur Senkung der Zellzahl durch Fenofibrat allein ergab die gleichzeitige Applikation von TMZ keine Verstärkung des Fenofibrat-vermittelten Effekts (Abb. 28 A-F).

3.3.3 Fazit zur Effektivität der Behandlungen

Die Untersuchungen zu den Effekten der Behandlungen auf die Gesamtzellezahl umfassten insgesamt vier technische Replikate, von denen jeweils zwei Replikate parallel bearbeitet wurden. Im Fall der T1440 Mutterkultur und T1440-Klone wurde übereinstimmend eine deutliche Reduktion der Zellzahl durch 25 µM TMZ erreicht, während die Effektivität der Behandlung der T1495 Mutterkultur und Klone mit 50 µM TMZ deutlich variierte. Im Fall der T1440 Mutterkultur und T1440-Klone bewirkten 10^{-4} M Fenofibrat eine Reduktion der Zellzahl, was ebenfalls auf die T1495 Mutterkultur und T1495-Klone zutraf. Hinsichtlich der Auswirkungen der Fenofibrat-/TMZ-Co-Applikation ergaben sich für die T1440 Mutterkultur und T1440-Klone, aber auch die T1495 Mutterkultur und T1495-Klone Unterschiede. So wurde in einigen Fällen eine partielle Aufhebung der TMZ-vermittelten Senkung der Zellzahl durch Fenofibrat beobachtet, in anderen dagegen nicht. Da die beobachteten Effekte auch zwischen den technischen Replikaten variierten, ist eine generelle Aussage über die Effekte der Doppelbehandlung nicht möglich.

Für den Nachweis von Sox2-positiven Zellen wurden jeweils zwei technische Replikate desselben biologischen Replikats genutzt. Im Fall der T1440 Mutterkultur und eines T1440-Klons wurde für Kulturen, die einen hohen Anteil an Sox2-positiven Zellen in den Kontrollen aufwiesen, eine Reduktion der Anteile an Sox2-positiven Zellen nach der TMZ-, Fenofibrat- und TMZ/Fenofibrat-Behandlung festgestellt. Ein additiver oder synergistischer Effekt wurde nicht beobachtet. Im Fall des anderen T1440-Klons, der einen geringen Anteil an Sox2-positiven Zellen in den Kontrollen aufwies, bewirkten alle drei Behandlungen einen

Anstieg des relativen Anteils an Sox2-positiven Zellen, der mit 25 µM TMZ am höchsten war; ein additiver oder synergistischer Effekt wurde nicht beobachtet. Im Fall der T1495 Mutterkultur und T1495-Klone ergab sich eine andere Situation. Hier wurde in den meisten Fällen eine Verringerung des Anteils an Sox2-positiven Zellen durch 50 µM TMZ erreicht, unabhängig davon, ob die Kontrollen hohe, mittlere oder geringe Anteile an Sox2-positiven Zellen enthielten. Fenofibrat senkte in allen Fällen den relativen Anteil an Sox2-positiven Zellen, wobei die Effizienz zwischen gering (<10%) und intermediär (25%) variierte und vom Typ der Editierung unabhängig war. Die gleichzeitige Gabe von TMZ konnte den Fenofibrat-vermittelten Effekt nur in der T1495 Mutterkultur und einem T1495-Klon geringfügig verstärken. Ebenso war eine Steigerung des TMZ-vermittelten Effekts durch Fenofibrat nicht evident.

Für den Nachweis von γH2AX-positiven Zellen wurden jeweils zwei technische Replikate desselben biologischen Replikats genutzt. Es wurde festzustellt, dass die Kontrollen einiger T1440- und T1495-Klone bereits hohe Anteile (bis zu 30% - 40%) an γH2AX-positiven Zellen enthielten. In diesen Fällen änderte sich der Anteil an γH2AX-positiven Zellen nach der TMZ-Gabe nicht oder nahm geringfügig ab. In allen übrigen T1440- und T1495-Präparaten bewirkten 25 µM bzw. 50 µM TMZ eine Steigerung des relativen Anteils an γH2AX-positiven Zellen. Fenofibrat bewirkte generell (T1440 sowie T1495 Mutterkulturen und Klone) eine Senkung der Anzahl an γH2AX-positiven Zellen, wobei die Effektivität zwischen den Klonen variierte. Die Effekte der Doppelbehandlungen waren verschieden. So zeigten einige Präparate eine Schwächung des TMZ-vermittelten Effekts in der Anwesenheit von Fenofibrat, während andere keinen Effekt oder eine moderate Steigerung des TMZ-Effekts aufwiesen. Ein Zusammenhang zwischen den Effekten und dem Typ der Editierung wurde nicht evident.

3.4 Expression von PPARα und MGMT

Wie in den Kapiteln 3.2 und 3.3 beschrieben unterschied sich die Responsivität der SLGC-Linien und Klone. Daher wurden mittels Western Blot-Analyse die Expression von PPARα (bindet Fenofibrat) und MGMT (bestimmt die Responsivität gegenüber TMZ) ermittelt. Die Analysen wurden mit Gesamtzell-Proteinextrakten (WCE) durchgeführt, die parallel zu den BrdU-ELISA und immunzytochemischen Analysen aus demselben biologischen Replikat gewonnen wurden. Beide Analysen erfolgten im Duplikat mit 20 µg WCE.

3.4.1 Die PPARα Expression ist generell hoch

Die Western Blot Analysen mit dem gegen PPARα gerichteten Antikörper detektierten in allen Proben eine starke Bande bei ca. 50 – 55 kDa, die dem volle Länge Protein von 52,225 kDa entspricht (Abb. 42, Anhang). Zusätzlich wurde in allen Proben eine schwächere Bande <35 kDa nachgewiesen (Abb. 29A). Im Fall der T1495 MC und T1495-Klone wurden zwei zusätzliche Banden bei niedrigen Molekulargewichten (< 30 kDa) und 1-2 Banden bei höheren Molekulargewichten (ca. 60 kDa) detektiert. Laut der ENSEMBL-Datenbank wurden bis dato zahlreiche PPARα Transkripte identifiziert, von denen mindestens fünf für Proteine bzw. Peptide kodieren sollten (Abb. 42, Anhang). Zwei dieser Transkripte kodieren für ein Protein von 468 Aminosäureresten, das den volle Länge PPARα repräsentiert. Ein weiteres kodiert für ein Protein von 133 Aminosäure-resten und umfasst die A/B-Domäne, sowie den ersten Zinkfinger mit der P-Box. Dieses könnte mit der Bande < 35 kDa korrespondieren. Von den beiden anderen Banden von < 30 kDa könnte eine mit dem Protein von 69 Aminosäurereste korrespondieren, das nur noch die A-Domäne und den N-terminalen Bereiche der B-Domäne umfasst; der verwendete Antikörper detektiert den N-Terminus der A-Domäne. Ob es sich bei den Banden >60 kDa um posttranslational modifizierte volle Länge PPARα oder bis dato unbekannte Isoformen handelt, ist unklar.

Die Normalisierung gegen das pan-Actin Signal ergab für die T1440 Mutterkultur und den Klon T1440 G5 E6 βγ eine nahezu identisch starke PPARα-Expression. Für den Klon T1440 B4 γ erreichte die PPARα Expression nur noch 5% - 7% der Expression in der Mutterkultur (Abb. 29B). Die Blots mit den T1495 Klonen ergaben für T1495 D3 F5 β weder mit dem PPARα- noch dem pan-Actin-Antikörper Signale. Die relative PPAR-Expression der T1495 Mutterkultur und der Klone T1495 C4 G8 β, B9 F4 γ und B9 D10 γ war sehr ähnlich. Im

Vergleich zur Mutterkultur war die relative PPARα-Expression im Klon T1495 C4 E10 β und den Klonen um das 1,8-Fache erhöht (Abb. 29B).

Auf den PPARα-Blots (Abb. 29A) erfolgte anschließend eine Inkubation mit einem anti-Sox2-Antikörper. Dieser detektierte eine Doppelbande, die teilweise sogar als Triplett erschien. Das Sox2 Protein umfasst 317 Aminosäurereste und weist ein rechnerisches Molekulargewicht von 34,31 kDa auf (https://www.uniprot.org/uniprotkb/P48431/entry). Die gegen pan-Actin normalisierte Sox2-Expression war in der T1440 Mutterkultur und dem Klon T1440 G5 E6 βγ niedrig und für den Klon T1440 B4 γ an der Nachweisgrenze (Abb. 29A). Auch die T1495 Mutterkultur wies eine niedrige relative Sox2-Expression auf, während vier der fünf T1495 Klone eine 4 – 5-Fach (T1495 C4 E10 β) bzw. 7 – 8-Fach (T1495 C4 G8 β, B9 F4 γ, B9 D10 γ) höhere relative Sox2-Expression zeigten. Diese Ergebnisse reflektieren mehrheitlich gut die Signalstärken und die relativen Häufigkeiten von Sox2+ Zellen in der immuncytochemischen Analyse (Abb. 21).

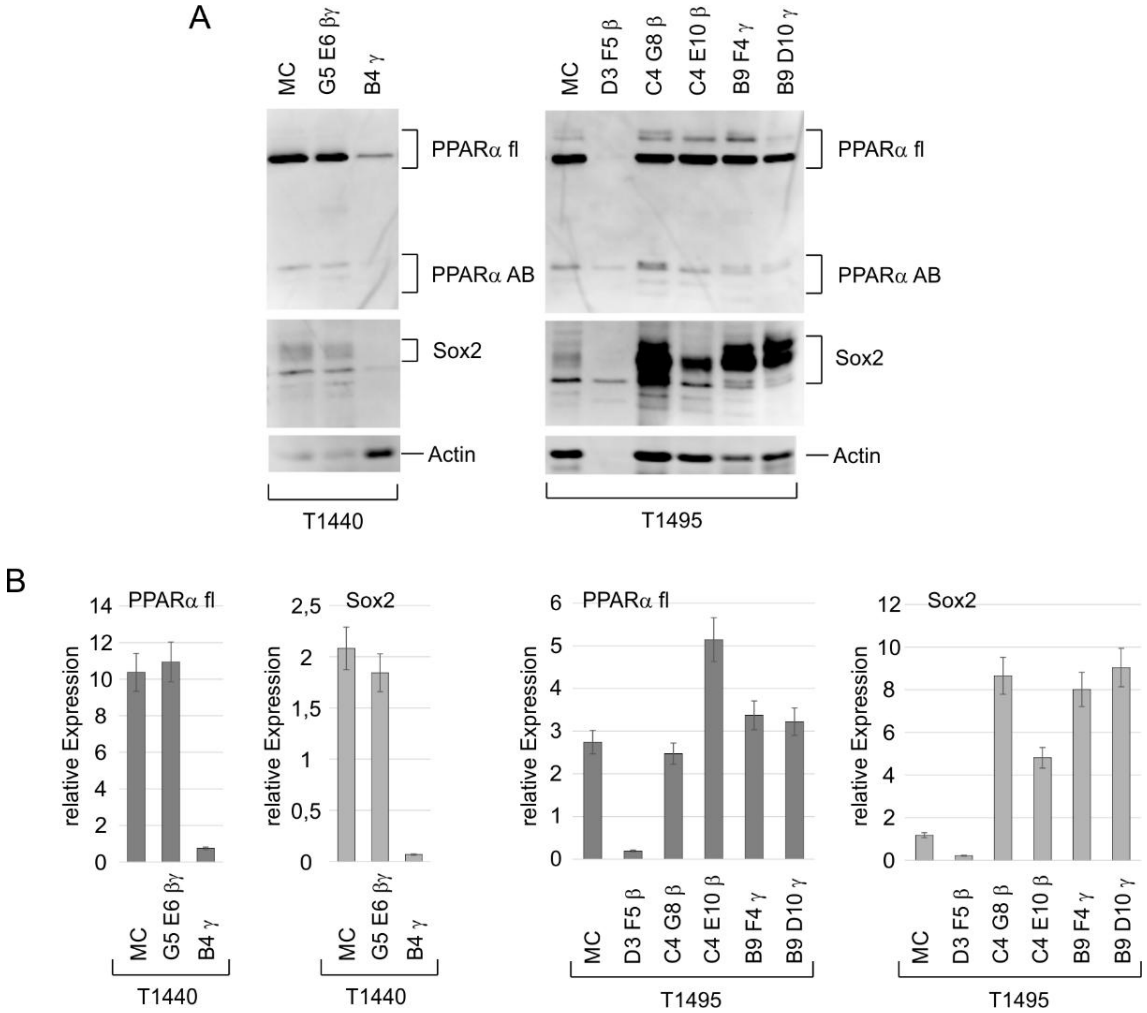

Abbildung 29: Nachweis der Expression von PPARα und Sox2 in T1440 und T1495 Mutterkulturen (MC) und abgeleiteten Zellklonen. (**A**) Fotografische Darstellung eines von zwei technischen Replikaten an Western Blots. Die Auftrennung der WCE erfolgte auf 10% SDS-Polyacrylamidgelen. Die Detektion von Sox2 erfolgte auf derselben Nitrozellulosemembran, wie der Nachweis von PPARα, fl, volle Länge; AB, AB Domäne. Abschließend wurde mit einem anti-pan-Actin Antikörper inkubiert. **(B**) Grafische Darstellung der Quantifizierung der Western Blots. Die Balken geben die Mittelwerte der gegen die Actin-Signale normalisierten relativen Expressionen an; die Fehlerbalken geben die Variation zwischen den beiden Replikaten an, die bei ≤ 10% lagen. Es wurde lediglich die starke PPARα-Bande quantifiziert, da die übrigen Banden nicht zweifelsfrei PPARα zugeordnet werden können (siehe Text). Im Fall von Sox2 wurde die Doppelbande quantifiziert.

3.4.2 Die MGMT-Expression variiert zwischen T1495 Mutterkultur und Klonen

Die Western Blots mit dem gegen die MGMT (O6-Methyl-Guanyl-DNA-Methyltransferase) gerichteten Antikörper detektieren in den T1495- nicht aber den T1440-Proben eine Bande (Abb. 30A). Da die SLGC-Linie T1440, nach allen bisher in der AG durchgeführten Analysen, einen hypermethylierten *mgmt*-Promoter (M-Status) hat (Zechel et al., 2024) entspricht dies früheren Daten. Weiterhin zeigten die Western Blots, dass in den beiden editierten T1440 Klonen keine Aktivierung der MGMT-Expression vorlag. Die SLGC-Linie T1495 hat

nach den bisherigen Daten einen M/U-Status, d.h. neben hyper-methylierten liegen auch hypo-methylierte *mgmt*-Promotoren vor. Warum die MGMT-Bande bei der T1495 Mutterkultur und den Klonen T1495 C4 G8 β und C4 E10 β als Doppelbande erscheint, ist unklar. Es sind zwar Spleißvarianten bekannt, aber nur eines der Transkripte kodiert nach heutigen Erkenntnissen für ein Protein (download: 05.06.2024: https://grch37.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Splice?g=NSG00000170430;r=10:131265448-131566271).

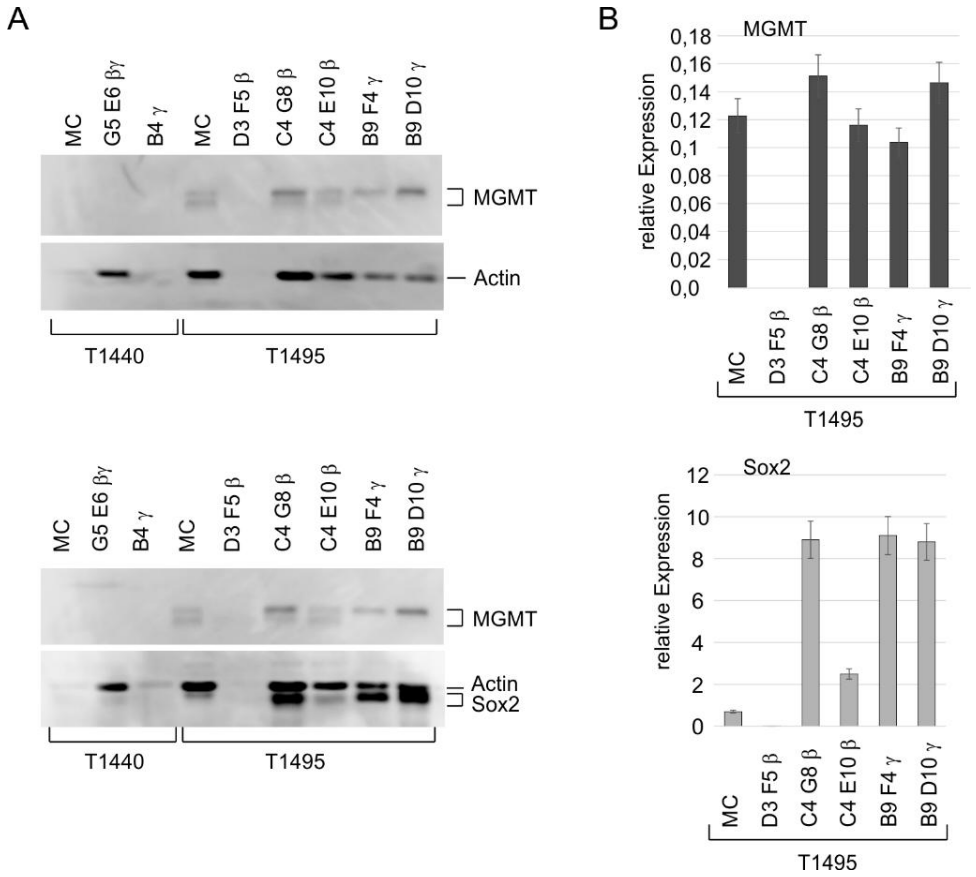

Abbildung 30: Analyse der Expression von MGMT in T1440 und T1495 Mutterkulturen (MC) und abgeleiteten Zellklonen. (A) Fotografische Darstellung der Western Blots. Die Auftrennung der WCE erfolgte auf 15% SDS-Polyacrylamidgelen. Nach der Detektion von MGMT wurde mit einem anti-pan-Actin Antikörper, gefolgt von einem anti-Sox2-Antikörper inkubiert; aus Gründen der Übersichtlichkeit wird der obere Blot nur nach der Actin-Detektion gezeigt. (B) Grafische Darstellung der Quantifizierung der in (A) gezeigten Western Blots. Die Balken geben die Mittelwerte der gegen die Actin-Signale normalisierten relativen Expressionen an; die Fehlerbalken geben die Variation zwischen den beiden Replikaten an, die bei ≤ 10% lagen. Die beiden MGMT-Banden wurden zusammen quantifiziert (siehe Text). Im Gegensatz zum Western Blot in Abb. 29 (10% SDS-PAGE) erscheint Sox2 hier (A; 15% SDS-PAGE) nicht als Doppelbande.

Die beiden in Abbildung 30 gezeigten Western Blot Replikate ergaben sehr ähnliche Resultate. In diesen Analysen wurden keine Banden für die pan-Actin-Kontrolle der WCE aus den Klonen T1440 B4 γ und T1495 D3 F5 β nachgewiesen, weshalb keine Aussage zur MGMT-Expression getroffen werden kann. MGMT wurde in den meisten T1495 Klonen als

Doppelbande nachgewiesen, wobei die untere Bande dem 207 Aminosäurereste umfassenden Protein (21,646 kDa) entsprechen könnte, die darüber liegende Bande einer *in silico* identifizierten Isoform (238 Aminosäurereste; https://www.uniprot.org/uniprotkb/P16455/entry). Für die T1440 Mutterkultur und den Klon T1440 G5 E6 βγ wurden keine MGMT-Signale nachgewiesen. Für die T1440 Mutterkultur bestätigt dies frühere Analysen des Labors, die das Fehlen einer MGMT-Expression zeigten (Zechel et al., 2024). Aus früheren Untersuchungen war weiterhin bekannt, dass das MGMT-Protein in T1495 auf geringem Expressionsniveau nachweisbar ist (Zechel et al., 2024). In der vorliegenden Arbeit wurde eine geringe relative MGMT-Expression für die T1495-Mutterkultur bestätigt. Relativ zur T1495 Mutterkultur wiesen die Klone T1495 C4 G8 β und B9 D10 γ eine 1,2 – 1,3-Fach höhere relative MGMT-Expression auf; im Fall von C4 E10 β und B9 F4 γ war die Expression um 5% bzw. 15% reduziert (Abb. 30B). Damit könnten die Unterschiede in der TMZ-Responsivität im BrdU ELISA für die T1495 nicht aber die T1440 Mutterkultur und Klone mit unterschiedlichen MGMT-Leveln erklärbar sein.

Die Western Blot Filter in Abbildung 30A wurden nach der Inkubation mit dem anti-MGMT- und anti-pan-Actin-Antikörper mit dem anti-Sox2-Antikörper inkubiert. Da es sich hier um Filter einer 15%-SDS-PAGE handelte, wurde Sox2 als eine singuläre Bande detektiert und die räumliche Trennung von der Actin-Bande war ungünstiger (Abb. 30A), wodurch die Quantifizierung weniger eindeutig wurde. Trotz der Limitierungen bei der Quantifizierung wurde die niedrigste relative Sox2-Expression wiederum in der T1495 Mutterkultur und dem Klon C4E10 β festgestellt; eine Quantifizierung der Sox2-Banden wurde für T1440 (MC und Klone) wegen der geringen Signalstärken nicht durchgeführt.

3.3 Lentivirale Transfektion von SLGC-Klonen zur Markierung mit eGFP

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Gewinnung Zellklonen mit PPAR-Editierung, die zusätzlich stabil das fluoreszierende Protein eGFP exprimieren. Die Markierung mit eGFP sollte die Möglichkeit eröffnen, das Verhalten von SLGCs mit PPAR-Editierung in GBM *ex-Vivo* Modellen zu beobachten. Die in dieser Arbeit durchgeführten

Experimente sind als Vorexperimente zu verstehen, die die Eigenschaften des Lentiviralen Vektors und den Nachweis der eGFP-Fluoresenzenz in den Zielzellen testen sollten.

Aufgrund des vorwiegend adhärenten Wachstums und der guten Proliferationseigenschaften wurden die SLGC-Linie T1464 und der im PPARB/D-Gen editierte Klon T1464 C6 β ausgewählt. Nach der Produktion von rekombinanten Lentiviren in HEK239T-Zellen, der Infektion der Zielzellen mit den Virionen und einem *limited dilution Assay* wurden mehrere Kandidatenklone pro Ansatz isoliert und weiterbearbeitet. Um die Chance der stabilen Integration des Vektors in das Genom der Wirtzellen zu erhöhen, wurde die Puromycin-Selektion dauerhaft aufrechterhalten.

Von den T1464-Kandidatenklonen gingen alle aufgrund eines experimentellen Problems verloren. Von den beiden überlebenden T1464 C6 β-eGFP-Kandidatenklonen wurde derjenige selektiert, der in den Kulturen die höchste Expression von eGFP aufwies. Dieser Nachweis erfolgte ohne vorherige Fixierung mit einem kleinen Aliquot an Zellen, das auf Objektträger getropft und ohne Fixierung mit Fluoromount (Tab. 7) eingedeckt wurde. Eine fotografische Dokumentation dieser Tests am Fluoreszenzmikroskop erfolgte nicht. Die Experimente führten zur Isolierung des Klons T1464 C6 β-eGFP-2, der im Folgenden als T1464 C6 bezeichnet wird.

Im Weiteren wurde überprüft, ob das für eGFP kodierende Gen stabil in das Genom des Klons T1464 C6 integriert worden war. Dazu wurde gDNA isoliert und mit mehreren Primer-Kombinationen PCRs durchgeführt. Die Primer-Kombinationen GFP-F1/R1 und GFP-F1/R3 ergaben die besten Ergebnisse. Ein Beispiel dieser PCR-Analysen ist in Abbildung 31 dargestellt. Bei diesen PCRs diente das Plasmid pLJM1-EGFP, das zuvor für die lentivirale Transduktion eingesetzt worden war, als Positivkontrolle. Abschließend wurden die Amplifikate Sanger sequenziert. Diese Analysen erfolgten mit Zellen aus zwei verschiedenen Passagen. Insgesamt erlaubten die Experimente die Isolierung eines PPARβ-Knockout Klons, der eine stabile Integration des eGFP-Gens aufwies.

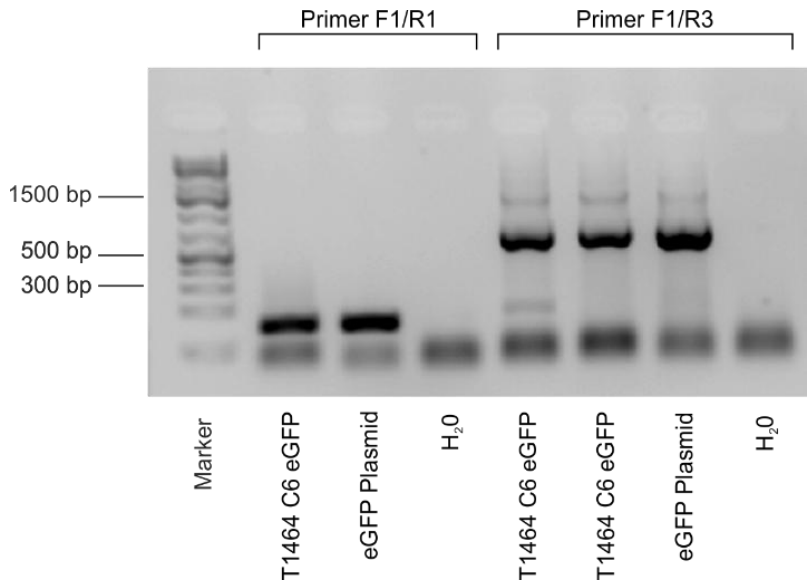

Abbildung 31: Nachweis der EGFP-kodierenden Sequenz in stabil transfizierten Zellklonen. Auftrennung der Amplifikate aus analytischen PCR-Ansätzen auf einem 1,6% TBE-Agarosegel. Es wurden die Primerpaare GFP F1/R1 und GFP F1/R3 eingesetzt (Tab. 9; Abb. 40 Anhang). Als Template diente gDNA aus verschiedenen Passagen des Zellklons T1464 C6. Die PCR auf dem eGFP-Plasmid diente als Positiv-Kontrolle, die PCR mit H_2O als Negativ-Kontrolle.

Die Überprüfung der grünen Fluoreszenz des Klons T1464 C6 zeigte in den nicht-fixierten Präparaten über nacheinander folgende Passagen eine Heterogenität, d.h. neben Zellen mit starken Signalen wurden stets Zellen mit intermediären oder geringen Signalen nachgewiesen. Da verschiedene Ursachen für die Unterschiede in der Signalstärke verantwortlich sein könnten, wurde mit dem Klon ein weiterer *limited dilution Assay* gestartet. Aus diesem Ansatz wurden mehrere Klone isoliert, von denen drei Klone expandiert und weiter untersucht wurden. Diese werden im Folgenden als T1464 C6 D8, T1464 C6 D7 und T1464 C6 C5 bezeichnet. Alle drei Kandidatenklone zeigten im nicht-fixierten Zustand eine Fluoreszenz, die in verschiedenen Zellen desselben Klons unterschiedlich war.

Um die Klone T1464 C6 D8, T1464 C6 D7 und T1464 C6 C5 genauer zu charakterisieren, wurden die Zellen dieser Klone in einer Dichte von 1x 10^4 Zellen/cm^2 auf *chamber slides* plattiert und am Tag d3 fixiert. Es folgte eine Färbung mit einem Antikörper gegen Sox2 und eine weitere mit einem Antikörper gegen das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau, sowie die Färbung des Zellkerns mit DAPI (Beispiele in Abb. 32). Zur Kontrolle wurde parallel die T1464 Mutterkultur untersucht, die gleichzeitig als Kontrolle für die Zellmorphologie und die Abwesenheit von Fluoreszenz im „grünen Kanal“ diente. Abbildung 32 belegt die Anwesenheit von Sox2-positiven Zellen in den fixierten Präparaten. Dabei wurden Zellen

mit unterschiedlich starken Sox2-Signalen in der T1464 Mutterkultur und den drei Klonen nachgewiesen. Die Anwesenheit von Tau im Zytoplasma wurde ebenfalls in T1464 und den drei Klonen nachgewiesen, was eine Eigenschaft von T1464-Zellen ist (Zechel et al., 2024). In allen drei Klonen, die aus der eGFP-Transduktion stammten, wurden grüne Zellen nachgewiesen. Dabei war die Stärke der Fluoreszenz zwischen den Zellen verschieden (Abb. 32). Unter denselben Bedingungen wurden in der T1464 Mutterkultur keine Signale im „grünen“ Kanal detektiert (Abb. 32, links).

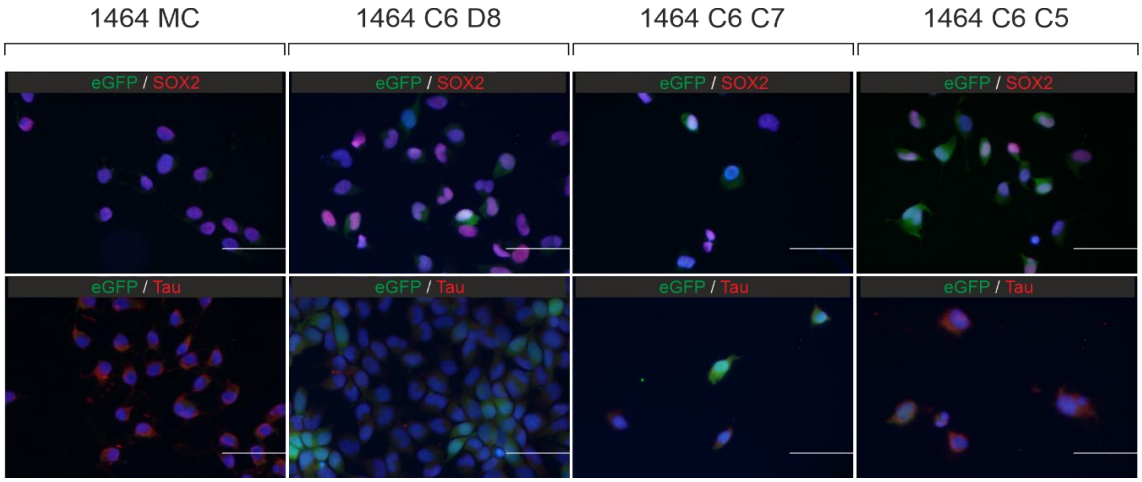

Abbildung 32: eGFP-Expression in transduzierten T1464-Klonen. Immunzytochemische Analyse der drei mit eGFP transduzierten T1464 Klone; die nicht-behandelte T1464 Mutterkultur diente als Positiv-Kontrolle für die Expression von Tau und Sox2 und als Negativ-Kontrolle für Signale im „grünen“ Kanal. Die immunzytochemischen Färbungen erfolgten mit einem Kaninchien-anti-Sox2 beziehungsweise Kaninchen-anti-Tau Primärantikörper und einem Ziege-anti-Kaninchen-Cy3-Sekundärantikörper; DAPI wurde für die Kernfärbung eingesetzt. eGFP, *enhanced green fluorescent protein*; Tau, *tubulin associated unit* Sox2, *sex determining region Y (SRY)- box 2* – Balken 50 µm.

Insgesamt belegte die Analyse, dass die gewählte experimentelle Strategie zur Isolierung von Klonen mit stabiler eGFP-Integration führte und dabei die Stammzelleigenschaften (Sox2-Expression) und der neurale Charakter (Tau-Expression) der Zellkone erhalten blieben. Die Experimente zeigen aber auch, dass trotz erneuter Selektion von Klonen mittels *limited dilution* Assay weiterhin eine heterogene eGFP-Expression bestand.

4. Diskussion

Das GBM ist der häufigste primäre Tumor des Zentralen Nervensystems und weist trotz aggressiver Therapie, bestehend aus maximal möglicher Resektion, Chemotherapie und Strahlentherapie, eine infauste Prognose auf (Stupp et al., 2017). Eine Rezidivbildung ist unausweichlich und geht mit der Ausbildung von Resistenzen einher (Beier et al., 2011; Prager et al., 2020). Eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Therapieresistenzen spielen GBM-Zellen mit Eigenschaften von neuralen Stammzellen oder Progenitoren, die als SLGCs des Typs I (Gliomstammzelle) bzw. des Typs II (früher Progenitor) oder Typs III (später Progenitor) bezeichnet werden (Chen et al., 2010; Choschzick et al., 2014; Gimple et al., 2022; Zechel et al., 2024).

Trotz der intensiven klinischen und experimentellen Forschung während der letzten beiden Jahrzehnte konnten keine signifikanten Verbesserungen in der GBM-Therapie erreicht werden. Daher sind die mögliche Bedeutung der Tumormikroumgebung und die Anpassungen der Tumorzellen an diese Mikroumgebung stärker in den Fokus der Arbeiten gerückt (Lathia et al., 2015; Gimple et al., 2022). So zeigen Tumorzellen charakteristische Veränderungen im Energie-Stoffwechsel, die zum Teil als Adaptationen der Tumorzellen an die Verfügbarkeit von Sauerstoff und Nährstoffen zu verstehen sind, zum Teil aber auch von den Tumorzellen induziert werden (Cairns et al, 2011; Shi et al., 2020). Da die drei PPAR-Rezeptoren (PPARα, PPARβ/δ und PPARγ) eine wichtige Rolle bei der Regulation des Lipid- und Kohlenhydrat-Stoffwechsels spielen und zudem auf inflammatorische Prozesse und die Induktion von Apoptose Einfluss nehmen können (Lamas Bervejillo & Ferreira, 2019), erscheint es von großem Interesse den Einfluss von PPAR-Rezeptoren auf SLGCs zu untersuchen.

Um diese Fragestellung zu bearbeiten, wurden in der Arbeitsgruppe (AG) Zechel zwei Strategien gewählt. So wurden im Vorfeld der vorliegenden Arbeit vier SLGC-Linien (T1371, T1440, T1464, T1495) mithilfe des CRISPR-Cas9-Systems in den Genen PPARA, PPARB und PPARG editiert. Die Isolierung und Charakterisierung von Klonen aus diesen Editierungsansätzen ist noch nicht abgeschlossen. In der vorliegenden Arbeit wurden Zellklone auf die Anwesenheit von Editierungen im PPARA-Gen bzw. PPARG-Gen untersucht (4.1). Die zweite Strategie sieht die Behandlung von SLGC-Linien mit PPARα–, PPARβ– und PPARγ-selektiven Agonisten vor. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei

SLGC-Linien (T1440, T1495) und davon abgeleitete Klone mit einem funktionellen PPARβ/δ oder PPARγ Knockout mit dem PPARα-Agonisten Fenofibrat behandelt. Diese Untersuchungen wurden in identischer Weise in An- und Abwesenheit von Temozolomid (TMZ) durchgeführt, um Hinweise auf eine mögliche Kooperativität zwischen Fenofibrat und TMZ zu gewinnen. Dabei wurden zunächst die Effekte auf die Proliferation untersucht (4.2). Danach wurde mittels einer immunzytochemischen Analyse die relative Anzahl an Sox2+ Zellen in denselben Mutterkulturen und Klonen bestimmt und ermittelt, ob sich die Anzahl an Sox2+ Zellen nach den Behandlungen ändert (4.3). Da TMZ Läsionen in DNA auslösen kann, (Zhang et al., 2012) und die Phosphorylierung der Histonvariante H2AX zu γH2AX als ein Maß für die Anwesenheit von DNA-Läsionen gilt (Kuo and Yang, 2008), wurde das Auftreten von γH2AX nach TMZ-Behandlung in An- und Abwesenheit von Fenofibrat untersucht (4.4). Anhand der immuncytochemischen Färbungen, die in den Kapiteln 4.3 und 4.4 diskutiert werden, wurden weiterhin die Effekte der Behandlungen auf die Gesamtzellzahl ermittelt, die im Kapitel 4.5 besprochen werden. Es sei angemerkt, dass die Präparate der Färbeserien mit 10^{-4} M Fenofibrat behandelt wurden, um eventuelle kooperative Effekte von Fenofibrat und TMZ besser erkennen zu können. In einem weiteren Teilprojekt wurden die T1464 SGLC-Mutterkultur und ein T1464-Klon mit einem funktionellen PPARγ-Knockout, der aus den Arbeiten einer Kollegin stammte, mit einem lentiviralen Vektor infiziert, welcher die genetische Information für das eGFP-Protein trug. Ziel war die Gewinnung von eGFP-positiven Zellklonen, die in einem im Labor etablierten *explant* Modell eingesetzt werden könnten (4.6).

4.1 Die Editierung von PPARG, nicht aber PPARA war nachweisbar

Wie oben erläutert wurden in der AG Zechel vier verschiedene SGLC-Zelllinien mit mithilfe des CRISPR-Cas9-Systems in den Genen PPARA, PPARB und PPARG editiert, darunter zwei Zelllinien mit Tp53-Wildtyp (T1464, T1440) und zwei Zelllinien (T1371, T1495) mit Tp53 *gain of function* (GOF: Yamamoto & Iwakuma, 2018) Mutationen. Dabei erfolgten die Experimente zunächst als Doppel-Editierungen, d.h. es wurden die Gene PPARA+PPARB (Ansatz PPAR α/β), PPARA+PPARG (Ansatz PPAR α/γ) sowie PPARB+PPARG (Ansatz PPAR β/γ) im selben Ansatz targetiert. Ziel war es neben Editierungen in einem PPAR-Gen im selben Ansatz Editierungen in zwei PPAR-Genen zu generieren. Da bis zum Beginn der

vorliegenden Arbeit keine Klone mit einer stabilen Editierung des PPARA-Gens isoliert werden konnten, wurden zwei weitere Editierungen im PPARA allein (Ansätze PPAR α) versucht. Die vier in der vorliegenden Arbeit untersuchten Klone entstammten dem zweiten PPAR α-Ansatz (Klone: T1464 H9 D7; T1464 H9 E4) bzw. dem Ansatz PPAR α/γ (Klone: T1495 B9 F4 γ; T1495 B9 D10 γ). Infolgedessen wurden die beiden Klone T1464 H9 D7 und T1464 H9 E4 auf eine Editierung im PPARA untersucht, die Klone T1495 B9 F4 γ und T1495 B9 D10 γ auf Editierungen im PPARA und PPARG. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass die Nummerierung der Exons der PPAR-Gene in der Literatur und den Datenbänken nicht einheitlich erfolgt und das Exon 4 von PPARA auch als Exon 5, sowie das Exon 3 von PPARG auch als Exon 4 definiert wird. In der vorliegenden Arbeit werden die Definitionen von (Khuchua et al., 2018) für PPARA und Wei et al. (2012) für PPARG angewendet.

Das Ziel der Editierung im PPARA war das Exon 4, das für den ersten Zinkfinger und den C-terminalen Bereich der B-Domäne kodiert (Khuchua et al., 2018). Da die PAM des für die Editierung eingesetzten Vektors NGG lautet (N kann die Base C, G, A oder T sein) und die *single guide* RNA (sgRNA) für die Editierung keine „off-targets“ (Guo et al., 2023) erkennen sollte, wurde für die Positionierung der sgRNA ein Bereich identifiziert, der für Aminosäurereste in der B-Domäne kodiert (siehe Abb. 34 und Abb. 36 im Anhang). Alle vier Klone (T1464 H9 D7, T1464 H9 E4, T1495 B9 F4 γ und T1495 B9 D10 γ), die in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich einer Editierung im PPARA-Gen untersucht wurden, ergaben lediglich Wildtyp-Sequenzen. Damit bestätigten diese Arbeiten die früheren Erfahrungen der AG, dass eine Editierung im PPARA mit der designten sgRNA nicht möglich ist. Es wäre denkbar, dass eine andere sgRNA zu besseren Erfolgen würde (Doench et al., 2016). Da in den vorherigen Arbeiten der AG jedoch auch einzelne, editierte PPARA-Sequenzen in Klonen identifiziert wurden, diese jedoch nach ein oder zwei Passagen verschwanden (pers. Mitteilung PD. Dr. C. Zechel), erscheint eine andere Erklärung wahrscheinlicher. So könnte der geringe Editierungserfolg im PPARA-Gen mit einer geringen Proliferationsrate von PPARα-defizienten Zellen (Haynes et al., 2019) in ursächlichen Zusammenhang stehen.

Das Ziel der Editierung im PPARG war das Exon 3, das für den ersten Zinkfinger der DNA-bindenden Domäne kodiert. Der erste Zinkfinger enthält die P-Box, welche für das

Erkennen und Binden an das Konsensusmotiv PuGGTCA des PPAR *response elements* (PPRE) verantwortlich ist (Kroker & Bruning, 2015). Die Erkennung des PPRE erfolgt über zwei C_4-Zinkfinger, wobei die Aminosäuresequenz CEGCKG im Bereich des ersten Zinkfingers essenziell ist (Chen et al., 2024). Die Bindung des Konsensusmotivs erfolgt über den ersten Zinkfinger, dessen Struktur durch vier Cysteinylreste und ein komplex gebundenes Zink-Ion charakterisiert ist (Gronemeyer & Laudet, 1995). Bereits die Substitution eines Cysteinylrestes verhindert die Komplexierung des Zink-Ions und damit die Ausbildung der für die DNA-Bindung notwendigen Struktur (Temple et al., 2005). Daher führen Mutationen, die mit einem Verlust eines oder mehrerer Cysteinylreste einhergehen zum Funktionsverlust des Zinkfingers und der Fähigkeit des Rezeptors an PPREs zu binden.

In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Deletionen im Exon 3 von PPARG identifiziert, welche mit dem Verlust mehrerer Cysteinylreste und einer Trunkierung der abgeleiteten Aminosäuresequenz einhergingen. Dabei trug der Klon T1495 B9 F4 γ zwei verschiedene, vier Nukleotide lange Deletionen, sowie eine dritte Mutation, bei der zwei Nukleotide deletiert waren. Alle Deletionen befanden sich in der sgRNA-bindenden Region und resultierten in einer Leserasterverschiebung sowie einem prämaturen Stopp-Codon. Dies hatte den Verlust der drei terminalen Cysteinylreste des ersten Zinkfingers zur Folge. Weiterhin folgte auf den erhalten gebliebenen, N-terminalen Cysteinylrest ein 20 Aminosäurereste langer, aberranter C-Terminus. Es kann davon ausgegangen werden, dass diese Mutationen zu einem funktionellen Knockout des PPAR γ führen. Da PPARG Wildtyp-sequenzen fehlten, kann geschlussfolgert werden, dass alle Zellen des Klons funktionelle PPAR γ Knockouts sind. Da jedoch drei verschiedene Deletionen identifiziert wurden, sollten die Kulturen des Klons T1495 B9 F4 γ mindestens zwei verschiedene Zellpopulationen enthalten. Im Klon T1495 B9 D10 γ wurden zwei der Deletionen identifiziert, die auch im Klon T1495 B9 F4 γ nachgewiesen wurden. Da beide Klone mittels *limited dilution* Assay aus der Klonkultur T1495 B9 gewonnen wurden, sind identische Mutationen möglich. Da der Klon T1495 B9 D10 γ nur zwei verschiedene Mutationen trägt, kann für T1495 B9 D10 γ geschlussfolgert werden, dass es zu einer biallelischen Inaktivierung des PPARG-Gens kam, wobei die Mutationen heterozygot vorliegen.

Wie oben erläutert, ist davon auszugehen, dass die DNA-abhängige Aktivierung oder Repression von Transkription durch PPAR/RXR Heterodimere bei Verlust von mindestens

einem Cysteinylrest nicht mehr möglich sind. PPARs können jedoch auch Funktionen ausüben, die von der Bindung an PPREs unabhängig sind und durch PPAR-Monomere ausgeübt werden. Ein Beispiel hierfür ist die Regulation von BCL-6. So binden PPAR-Rezeptoren in Abwesenheit eines Liganden an den Repressor BCL-6 (B-Zell-Lymphom Protein 6) und können so die Transkription von Genen erlauben, die ansonsten durch BCL-6 reprimiert werden. Bindet ein Agonist an den PPAR, führt dies zum Ablösen des Rezeptors vom BCL-6, was dann die Repression der BCL6-regulierten Genen erlaubt (Chen et al., 2018). Voraussetzung für diese DNA-unabhängige Funktion von PPARs ist jedoch die Erhaltung der grundlegenden molekularen Struktur des Rezeptors und der Liganden-bindenden Domäne. Dieses Szenario kann auf die Klone T1495 B9 F4 γ und T1495 B9 D10 γ nicht zutreffen, da die PPAR γ–Rezeptoren trunkiert sind. Dies wäre jedoch im Fall der Klone möglich, die von Kolleg*Innen isoliert wurden und in der vorliegenden Arbeit für Behandlungsexperimente eingesetzt wurden. So wurden in den Klonen T1495 D3F5 β, T1495 C4G8 β und T1495 C4E10 β u.a. Mutationen im PPARB-Gen nachgewiesen, die zu einem Verlust der DNA-Bindung, nicht aber zu einem trunkierten Protein führen sollten. Dasselbe gilt für die Klone T1440 G5E6 β und T1440 B4 γ. (nichtpublizierte Daten der Arbeitsgruppe; pers. Mitteilung von PD. Dr. C. Zechel). Des Weiteren könnten PPARs, die lediglich eine Mutation in der P-Box aufweisen trotzdem mit RXR heterodimerisieren und somit in Konkurrenz zu intakten PPAR-Rezeptoren der anderen Isotypen treten. Da die verschiedenen PPAR-Isotypen häufig gleichzeitig in einem Gewebe vorkommen, könnte die Dysfunktionalität eines Rezeptors die Aktivität der anderen PPAR-Isotypen vermindern. Umgekehrt ist aber auch denkbar, dass der Verlust eines PPAR-Isotyps durch die beiden anderen PPAR-Isotypen kompensiert wird.

4.2 Fenofibrat und TMZ zeigten ein antiproliferatives Potenzial

Die Standardtherapie des GBMs besteht aus maximal möglicher chirurgischer Resektion, gefolgt von einer kombinierten Radiochemotherapie mit TMZ (Stupp et al., 2005). Trotz dieser aggressiven Therapie ist die Prognose des GBMs infaust (Tykocki & Eltayeb, 2018). Auf der Suche nach möglichen Adjuvanzien sind u.a. PPAR-Agonisten in den Fokus gerückt. Präklinische Studien haben erste Hinweise auf vorteilhafte Wirkungen von PPAR-Agonisten

im Rahmen der GBM-Therapie ergeben (Basilotta et al., 2022). Fenofibrat erlangte in diesem Zusammenhang die höchste Beachtung, da diese Substanz die Fähigkeit hat die Blut-Hirn-Schranke zu passieren und zudem antiinflammatorisch wirken kann (Gallucci et al., 2022). In der vorliegenden Arbeit wurden SLGC-Zelllinien mit und ohne Editierung in PPAR-Genen auf ihre Responsivität gegenüber einer Behandlung mit Fenofibrat analysiert. Dazu wurde die Wirkung von 10^{-3}, 10^{-4} und 10^{-5} M Fenofibrat auf die Proliferation der editierten und nicht-editierten Kulturen mittels BrdU ELISA ermittelt. Um weiterhin zu evaluieren, ob Fenofibrat ein geeignetes Adjuvans in einer Kombinationstherapie mit TMZ sein könnte, wurde untersucht, wie Fenofibrat mit TMZ zusammenwirkt. Dazu wurde eine TMZ-Konzentration eingesetzt, die dem MGMT-Status der Mutterkulturen (Zechel et al., 2024) angepasst war. Zur Kontrolle erfolgte die alleinige Behandlung mit TMZ.

Im Falle der T1440 Mutterkultur und des Klons T1440 B4 γ reduzierte 10^{-3} M Fenofibrat signifikant die Proliferation. Im Fall der T1440 Mutterkultur hatten auch 10^{-4} M und 10^{-5} M und Fenofibrat einen Effekt. Eine effizientere Reduktion der Proliferation mit höheren Fenofibrat-Konzentrationen wurde auch für den Klon T1440 B4 γ beobachtet, war aber weniger deutlich. Für den Klon T1440 G5 E6 $\beta\gamma$ war die Situation invertiert, da hier die höheren Fenofibrat-Konzentrationen eine höhere Proliferation bedingten. Diese Beobachtungen korrelieren nicht mit den Expressionsanalysen, da eine ähnlich hohe relative PPARα Expression in der T1440 Mutterkultur und im Klon T1440 G5 E6 $\beta\gamma$ vorlag, die relative Expression im Fall von T1440 B4 γ jedoch nur 5% - 7% dieser Werte erreichte. Auch für die T1495 Mutterkultur und die T1495-Klone lässt sich die Reduktion der Proliferation durch Fenofibrat nur eingeschränkt mit den Expressionsleveln von PPARα in Einklang bringen. So wurde eine statistisch signifikante Senkung der Poliferation mit 10^{-3} M Fenofibrat nur für die Mutterkultur festgestellt, obwohl die PPARα Expression in den Klonen ähnlich hoch (T1495 C4 G8 β, B9 F4 γ und B9 D10 γ) oder noch höher (T1495 C4 E10 β) war.

Hinsichtlich der alleinigen Behandlung mit 25 µM TMZ wurde in der T1440-Mutterkultur und den T1440-Klonen, nicht aber der T1495-Mutterkultur und den T1495-Klonen eine Senkung der Proliferation beobachtet. Dies passt zu den Expressionsanalysen, die zeigten, dass T1495 (Mutterkultur und Klone) das MGMT-Protein exprimieren, während dies in T1440 (Mutterkultur und Klone) fehlte. MGMT ist in der Lage die durch die aktive Form des

TMZ übertragene Methylgruppe von der O6-Position in den Guanosyl-Resten der DNA zu entfernen und damit die Wirkung des TMZ aufzuheben (Zhang et al., 2012; Kaina et al., 2007). Die Steigerung der TMZ-Dosis von 25 µM auf 50 oder 100 µM hatte auf die T1495 Mutterkultur und die T1495-Klone nur wenig Effekt und ein Dosis-Wirkungs-Beziehung war nicht erkennbar. Somit ist davon auszugehen, dass die Behandlung der T1495 Mutterkultur und Klone mit TMZ-Konzentrationen erfolgte, die aufgrund der MGMT-Expression suboptimal waren. In der Kombination mit Fenofibrat änderte sich dies in einigen Fällen. So wurde ein kooperativer Effekt zwischen 10^{-3} M Fenofibrat und 50 µM TMZ für die T1495-Mutterkultur und die Klone T1495 B9 F4 γ, B9 D10 γ und C4 G8 β deutlich. Für die Klone T1495 D3 F5 β und C4 E10 β war die Senkung der Proliferation durch Fenofibrat/TMZ ebenfalls signifikant stärker als durch Fenofibrat allein, wobei die zusätzliche prozentuale Senkung gering war. Auch für die T1440 Mutterkultur und die beiden T1440 Klone wurde eine signifikant stärkere Reduktion der Proliferation durch Fenofibrat/25 µM TMZ beobachtet als durch Fenofibrat allein. In all diesen Fällen wurde, mit Ausnahme der T1440 Mutterkultur, der Effekt lediglich mit der höchsten Fenofibrat-Konzentration erreicht. Weiterhin konnte aus dem Verhalten der verschiedenen Klone kein Hinweis darauf erhalten werden, dass die funktionelle Inaktivierung von PPARβ, PPAR$\beta\gamma$ oder PPARγ hinsichtlich der Fenofibrat-Responsivität eine Rolle spielten könnte.

4.3 Der relative Anteil an SLGCs kann in Abwesenheit von TMZ durch Fenofibrat gesenkt werden

Ein wichtiger Faktor in der Entwicklung von Therapieresistenzen ist das Vorkommen von GBM-Zellen mit Eigenschaften von neuralen Stammzellen oder Progenitoren, die erstmals 2010 von Chen und Kollegen als Typ I-, II- und III-Zellen beschrieben wurden und in der vorliegenden Arbeit unter dem Begriff SLGCs zusammengefasst werden. Typ I-, II- und III-Zellen zeigen mehrere gemeinsame, aber auch unterschiedliche Eigenschaften: (i) alle drei Zelltypen exprimieren den Transkriptionsfaktor Sox-2, wobei die Sox2-Expression von der Typ I- zur Typ III-Zelle abnimmt; (ii) alle drei Zelltypen zeigen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und generieren orthotope Tumoren in Maus-Modellen; (iii) ausschließlich Typ II-Zellen exprimieren das Glykoprotein CD133 (Chen et al., 2010).

Weiterhin wurde in der Literatur beschrieben, dass die SLGCs im Vergleich zu Nicht-SLGCs resistenter gegenüber der Behandlung mit TMZ (Garros-Regulez et al., 2016). Hinsichtlich der TMZ-Sensivität von SLGCs sind die publizierten Daten noch nicht konsistent. So gibt es Hinweise darauf, dass TMZ vor allem Typ II-Zellen eliminiert, aber auch Publikationen, die ein präferentielles Überleben von Typ II-Zellen beschreiben (Beier et al., 2007; Beier et al., 2011; Schonberg et al., 2014). In der vorliegenden Arbeit wurden Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen Sox2 und CD133 durchgeführt. Da eine Quantifizierung des CD133-Signals in der Plasmamembran aufgrund der teilweise geringen Signalstärke und inhomogenen Verteilung nicht möglich war, wurden lediglich die relativen Anteile an Zellen mit Sox2-Expression (SLGCs) und Zellen ohne Sox2-Expression (Nicht-SLGCs) ermittelt.

Die Western Blot-Analysen mit WCE aus den Kontrollbehandlungen der T1440 und T1495 Klone sowie T1440 und T1495 Mutterkulturen ergaben eine hohe Sox2-Expression in den T1495 Klonen C4 G8 β, C4 E10 β, B9 F4 γ und B9 D10 γ. Dagegen war die Expression im Klon T1440 G5 E6 βγ sowie in der T1440 und T1495 Mutterkultur niedrig. Für die Klone T1440 B4 γ und insbesondere T1495 D3 F5 β (hier fehlte sogar das Actin-Signal) war die Konzentration der Proteine in den WCEs zu niedrig, um Aussagen zu treffen. Im Fall des Klons T1440 G5 E6 βγ sowie der T1495-Klone C4 G8 β, C4 E10 β, B9 F4 γ und B9 D10 γ spiegelten die Ergebnisse der Western Blots gut die Quantifizierung des relativen Anteils an Sox2+ Zellen in den immuncytochemischen Analysen wider. Bei T1440 Mutterkultur waren zwar 43% der Zellen Sox2-positiv, die Intensität der Sox2-Signale war jedoch niedrig, was zu der geringen Intensität der Banden im Western Blot passt. Aufgrund dieser Beobachtungen und der Tatsache, dass wenige stark positive Zellen ein ähnliches Sox2-Signal im Western Blot ergeben wie viele schwach positive, wurde die Wirkung von Fenofibrat und/oder TMZ ausschließlich über den immuncytochemischen Nachweis von Sox2+ Zellen evaluiert.

Im Fall der T1440 Mutterkultur und Klone verringerte die Behandlung mit 10^{-4} M Fenofibrat den Anteil an Sox-2 positiven Zellen, mit Ausnahme des Klons T1440 G5 E6 βγ, der in der Kontrolle wenig Sox2+ Zellen aufwies. Obwohl 25 µM TMZ ebenfalls den relativen Anteil an Sox2+ Zellen reduzierte, wurde die TMZ-vermittelte Eliminierung von SLGCs durch 10^{-4} Fenofibrat nicht eindeutig gefördert. Im Fall der T1495 Mutterkultur und Klone konnte durch 10^{-4} M Fenofibrat der relative Anteil an Sox2+ Zellen in vier von fünf Klonen und der

Mutterkultur reduziert werden. Wie im Kontext der Proliferationsanalysen besprochen, erwies sich die eingesetzte Konzentration von 50 µM TMZ auch in immuncytochemischen Analysen als ungünstig, sodass deutliche anti-proliferative Effekte nur bei der Mutterkultur und dem Klon T1495 C4 E10 β auftraten. Eine deutliche Senkung des relativen Anteils an Sox2+ Zellen wurde lediglich für die Klone T1495 C4 G8 β, T1495 C4 E10 β und T1495 B9 F4 γ beobachtet, die durch die zusätzliche Applikation von 10^{-4} M Fenofibrat nicht verstärkt, sondern partiell aufgehoben wurde. Dieses Verhalten wurde auch für die anderen T1495-Klone, nicht aber die Mutterkultur festgestellt. Die Analysen erlauben daher die Schlussfolgerungen, dass eine Senkung des relativen Anteils an SLGCs durch 10^{-4} M Fenofibrat möglich ist, es dabei aber zu einer Interferenz mit den durch TMZ-vermittelten Effekten kommen kann und die relativen Anteile an SLGCs nach der Doppelbehandlung höher sind als nach den Einzelbehandlungen mit Fenofibrat oder TMZ.

4.4 Die Induktion von γH2AX durch TMZ wurde durch Fenofibrat moduliert

Die Induktion von Doppelstrangbrüchen in der DNA wurde in der vorliegenden Arbeit immuncytochemisch durch Färbungen mit einem Antikörper gegen die phosphorylierte Form der Histonvariante H2AX durchgeführt. Die Bildung von γH2AX tritt nach der Behandlung von Zellen mit ionisierender Strahlung oder bestimmten zytotoxischen Reagenzien auf, kann aber auch ein Indiz für zellulären Stress unter normalen physiologischen Bedingungen sein (Bonner et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit wurden in den Kontrollbehandlungen mit DMSO in einigen Kulturen hohe relative Anteile an γH2AX+ Zellen nachgewiesen. Betroffen waren vor allem die Klone T1440 B4 γ, T1495 D3 F5 β, und T1495 C4 E10 β. Da es sich bei T1495 (Mutterkulturen und Derivate) um Zellen mit einer Tp53-GOF-Mutation handelt (Zechel et al., 2024) in denen die Schadensantwort auf Doppelstrangbrüche aufgrund der Tp53-Mutation eingeschränkt oder gar inaktiv ist (Yamamoto and Iwakuma, 2018), könnte der hohe Anteil an γH2AX+ Zellen in den Kontrollen auf der Tp53-Mutation beruhen. Da aber auch einer der beiden T1440-Klone einen sehr hohen relativen Anteil an γH2AX+ Zellen aufwies und T1440-Zellen den Tp53 Wildtyp tragen, scheinen weitere Faktoren eine Rolle zu spielen. Ob Tp53 in dem

betreffenden T1440-Klon dereguliert vorliegt, oder genetische bzw. epigenetische Veränderungen auftraten, wurde nicht überprüft.

Bei der Bewertung der immunzytochemischen Analyse sind zwei Aspekte wichtig. Erstens erfolgte die Analyse mit dem PML-Antikörper ausschließlich, um eine optimierte Darstellung des Zellkerns bei mikroskopischen Aufnahmen bei Ausblendung des DAPI-Kanals zu ermöglichen; der PML-Nachweis wird entsprechend nicht bewertet. Zweitens ist bei der Intensität der γH2AX-Signale zu beachten, dass die Phosphorylierung von H2AX nach der Schädigung einer Region zu einer Ausbreitung des γH2AX-Signals in die Nachbarbereiche führen kann, ein Prozess der als „*spreading*“ bezeichnet wird (Bewersdorf et al., 2006). Daher kann von der Signalstärke nicht unbedingt auf das Ausmaß der DNA-Schädigung geschlossen werden. Nach der Behandlung mit TMZ nahm in allen Zelllinien der relative Anteil an γH2AX+ Zellen zu, wobei die Steigerung in den Klonen mit einem hohen Anteil von γH2AX-Signalen in den Kontrollen weniger deutlich war. Dies weist auf das Auftreten von DNA-Doppelstrangbrüchen nach der Applikation von TMZ hin, die als eine Konsequenz der Methylierung der Guanylreste in der 0^6-Positon durch die aktivierte Form des TMZ zu interpretieren ist (Zhang et al., 2012). Die Einzelbehandlung mit Fenofibrat führte in der T1440 Mutterkultur und beiden Klonen relativ zur Kontrollbehandlung mit DMSO zu einer Verringerung des relativen Anteils an γH2AX+ Zellen. Dabei war die Reduktion besonders in dem Klon zu beobachten, der in der Kontrolle hohe Anteile an γH2AX+ Zellen aufwies. Auch in der T1495 Mutterkultur und den abgeleiteten Klonen senkte Fenofibrat den relativen Anteil an γH2AX+ Zellen, wobei die Senkung wieder in den Klonen am effizientesten war, die in den Kontrollen die höchsten Anteile an γH2AX+ Zellen aufwiesen. Dabei ist unklar, ob Fenofibrat dem Auftreten von Läsionen in der DNA entgegenwirkt oder, ob die Phosphorylierung von H2AX vermindert ist. In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass Fenofibrat zytotoxische Effekte reduzieren kann. So wurde beobachtet, dass die zytotoxische Wirkung von cis-Platin auf bestimmte Nierenzellen durch Fenofibrat vermindert wurde und dabei der cJun-Kinase- und p38-Signalweg involviert waren (Thongnuanjan et al., 2016). Diese mögliche das Überleben von Zellen fördernde Wirkung von Fenofibrat war jedoch nicht mehr nach der Doppelbehandlung mit Fenofibrat und TMZ zu beobachten. In beiden T1440-Klonen war der relative Anteil an γH2AX+ Zellen nach der Doppelbehandlung mit Fenofibrat und TMZ genauso hoch, wie nach der alleinigen

TMZ-Gabe. Nur in der T1440 Mutterkultur war der relative Anteil an γH2AX+ Zellen nach der Doppelbehandlung geringer (Reduktion um 1/4 – 1/3) als nach der alleinigen TMZ-Gabe. Ein der T1440 Mutterkultur vergleichbares Verhalten wurde für die T1495 Mutterkultur und drei Klone (T1495 D3 F5 β, B9 F4 γ, B9 D10 γ) beobachtet. Dagegen steigerte Fenofibrat den durch TMZ-induzierten Anteil an γH2AX+ Zellen in zwei T1495 Klonen (T1495 C4 E10 β und C4 G8 β). Somit könnte vermutet werden, dass Fenofibrat den zytotoxischen Effekt von TMZ in einigen aber nicht allen Kulturen vermindern kann, wobei die in dieser Arbeit erhobenen Daten keinen Zusammenhang zwischen dem Tp53-Status, der PPAR-Editierung und der Überleben-fördernden Wirkung von Fenofibrat erkennen lassen.

4.5 Die Gesamtzellzahlen wurden durch Fenofibrat und TMZ gesenkt

Die in Abschnitten 4.3 und 4.4 besprochenen immunzytochemischen Analysen ergaben Hinweise darauf, dass Fenofibrat zumindest teilweise die Wirkung von TMZ schwächen kann. Die BrdU ELISA deuteten dagegen auf eine Verstärkung des TMZ-Effekts durch Fenofibrat hin. Daher wurde die Wirkung von Fenofibrat und TMZ auf die Gesamtzellzahl anhand der immuncytochemischen Analysen ermittelt. Diese Analysen umfassten vier unabhängige technische Replikate, die sich von demselben biologischen Replikat ableiten. Es sei an dieser Stelle angemerkt, dass auch die BrdU ELISA mit demselben biologischen Replikat erfolgten. Weiterhin wurden aus demselben biologischen Replikat die Zellpellets gewonnen, aus denen die WCE für die Western Blot Analysen stammten.

Vergleicht man die Gesamtzellzahlen der beiden Färberserien, so sind Übereinstimmungen aber auch deutliche Unterschiede festzustellen. Hinsichtlich der T1440 Mutterkultur und T1440-Klone wurde übereinstimmend eine deutliche Reduktion der Zellzahl durch 25 µM TMZ festgestellt, wobei sich die absoluten Werte der Senkungen unterschieden. Weiterhin bewirkte Fenofibrat (10^{-4} M) in beiden Serien eine Reduktion der Zellzahl, mit Unterschieden in den absoluten Werten. Die maßgeblichen Unterschiede betrafen jedoch die Auswirkungen der Fenofibrat-/TMZ-Doppelbehandlung. Hier wurden für die T1440 Mutterkultur und den Klon T1440 B4 γ in einem Experiment eine partielle Aufhebung des TMZ-vermittelten Effekts durch Fenofibrat beobachtet, im anderen dagegen nicht. Für den

Klon T1440 G5 E6 βγ wurden in beiden Experimenten für die Doppelbehandlung Werte ermittelt, die zwischen den Werten der alleinigen TMZ- und Fenofibrat-Behandlung, aber näher am Wert der TMZ-Behandlung lagen. Letzteres passt zu den Daten der BrdU ELISA. Diese belegten eine signifikante Senkung der Proliferation mit 10^{-4} M Fenofibrat und 25 µM TMZ für die T1440 Mutterkultur und den Klon T1440 B4 γ und eine Steigerung des Effektes in der Doppelbehandlung. Das Verhalten des Klons T1440 G5 E6 βγ im BrdU ELISA und in der Färbeserie mit dem gH2AX-Antikörper stimmte ebenfalls gut überein.

Hinsichtlich der T1495 Mutterkultur und Klone ergaben die beiden Färbeserien zueinander eine gute Übereinstimmung dahingehend, dass 10^{-4} M Fenofibrat die Gesamtzellzahl senkte. Allerdings war die Effektivität der Senkung im Fall der Klone T1495 D3 F5 β, T1495 C4 G8 β und T1495 C3 E10 β sehr unterschiedlich. Bei der Behandlung mit 50 µM TMZ erwiesen sich in beiden Fällen die Klone T1495 D3 F5 β, T1495 B9 F4 γ und T1495 B9 D10 γ als wenig sensitiv; auch die Ergebnisse zur TMZ-vermittelten Senkung der Zellzahl in der Mutterkultur und dem Klon T1495 B9 D10 γ folgten demselben Trend. Völlig konträre Effekte wurden dagegen für den Klon T1495 C4 G8 β ermittelt. So vermittelten in einem Experiment (γH2AX-Nachweis) die Doppelbehandlung, sowie TMZ und Fenofibrat allein eine 70% -85% Senkung der Zellzahl, während im anderen Experiment (Sox2-Nachweis) weder TMZ noch Fenofibrat oder die Doppelbehandlung eine Senkung der Zellzahl induzierten. Im Vergleich der Färberserien mit den BrdU ELISA fällt auf, dass 10^{-4} M Fenofibrat und 50 µM TMZ im BrdU ELISA keine kooperativen Effekte erkennen ließen. In den beiden Färbeserien erfolgte keine stärkere Senkung der Zellzahl durch die Doppelbehandlung (10^{-4} M Fenofibrat/50 µM TMZ) im Vergleich zu 50 µM TMZ allein. Allerdings deutete sich in einigen Präparaten eine partielle Aufhebung der durch 50 µM TMZ-vermittelten Senkung der Zellzahl durch 10^{-4} M Fenofibrat an, die jedoch durch die anderen Präparate nicht eindeutig bestätigt wurde. Zusammen mit den Ergebnissen der Färbeserie zum Nachweis von γH2AX, lassen die Daten die Vermutung zu, dass Fenofibrat die Wirkung von TMZ möglicherweise schwächen könnte. Aus den Analysen zur Gesamtzellzahl somit kann geschlussfolgert werden, dass es Unterschiede zwischen den Klonen gab, diese Unterschiede aber nicht mit dem Typ des PPAR-Knockouts in Zusammenhang gebracht werden können. So waren die Unterschiede zwischen T1495-

Klonen mit demselben Typ von Knockout zum Teil größer waren als zwischen T1495 Klonen mit PPARβ bzw. PPARγ Knockout.

4.6 Der stabil transfizierte Klon T1464 C6 β und dessen Subklone wiesen keine einheitliche eGFP-Expression auf

In einem weiteren Teilprojekt der vorliegenden Arbeit wurden die SLGC-Linie T1464 und ein T1464 Klon mit PPARγ Knockout mit einem lentiviralen Vektor transfiziert, der die genetische Information für die Expression des *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) trug (pLJM1-EGFP; Sancak et al., 2008). Ziel war die stabile Integration des Vektors in das Genom der Wirstzellen, um eGFP-markierte Zellklone zu gewinnen, die in einem GBM *ex-plant* Modell eingesetzt werden könnten.

Die Experimente führten zur Isolierung eines Klons mit einer stabilen Integration der eGFP-kodierenden Sequenz, was durch PCR-Technologie und Sanger-Sequenzierung nachgewiesen wurde. Dieser Klon, der sich von dem PPARγ Knockout ableitete wurde T1464 C6 bezeichnet. Die immunzytochemische Analyse belegte die Expression von Sox2 und Tau und damit den Stammzellcharakter und die neurale Identität. Allerdings variierten die eGFP-Signale zwischen stark bis sehr schwach. Um Klone mit einer hohen eGFP-Expression zu isolieren, erfolgte eine erneute Runde an *limited dilution* Assay, aus dem drei Subklone isoliert wurden. In den Kulturen dieser Subklone wiesen die Zellen jedoch ebenfalls starke bis schwache eGFP-Signale auf. Es kann vermutet werden, dass die uneinheitliche Expression des eGFP-Proteins auf eine verstärkte Methylierung des CMV-(Zytomegalievirus) Promoters zurückzuführen ist, der die eGFP-Expression reguliert. Die Methylierung von viralen Promotoren in humanen Zellen wurde mehrfach beschrieben und erfolgt in verschiedenen Zelllinien in unterschiedlichem Ausmaß (Marx et al., 2021; Herbst et al., 2012). Alternativ wäre dankbar, dass der Vektor pLJM1-EGFP nicht in das Wirtsgenom integriert und episomal verbleibt. In diesem Fall könnte die Kopienzahl einen Einfluss auf die eGFP-Expression haben. Die PCR-Analysen zum Nachweis der eGFP-Sequenz ergaben jedoch keinen Hinweis auf eine variable Kopienzahl.

Insgesamt kann geschlussfolgert werden, dass eine Expression von eGFP in SLGC-Linien und abgeleiteten Klonen möglich ist, eine stabile, starke Expression jedoch nicht erreicht werden kann. Damit könnten derart markierte Zellen in sogenannten *tracking* Experimenten (Emami et al., 2021) in GBM-Gewebeschnitten nicht sicher aufgespürt werden.

4.7 Schlussfolgerungen und Limitierungen

In der vorliegenden Arbeit konnten zwei Klone mit einer bi-allelischen Editierung im PPAR G-Genen identifiziert und als funktionelle PPARγ Knockouts klassifiziert werden. Weiterhin ergaben die Analysen von zwei T1464- und zwei T1495-Klonen, dass eine Editierung in den PPAR A-Allelen nicht erfolgt war. Dies bestätigte die früheren Versuche der Arbeitsgruppe Klone PPARα Knockouts zu isolieren, die ebenfalls fehlgeschlagen waren. Die Ursachen für die Fehlschläge könnten einerseits in einer Abhängigkeit der eingesetzten SLGC-Linien von einem funktionellen PPARα liegen, andererseits könnte auch die eingesetzte sgRNA ungeeignet sein. Eine hohe PPARα–Expression in den untersuchten SLGC-Linien und abgeleiteten Klonen wurde in der vorliegenden Arbeit durch Western Blot Analysen belegt. Dagegen wurde nicht überprüft, ob eine andere sgRNA oder der gleichzeitige Einsatz mehrerer sgRNAs einen PPARα–Knockout ermöglichen könnten.

Weiterhin wurden in der vorliegenden Arbeit die Effekte des PPARα-Agonisten Fenofibrat auf die SLGC-Linien T1440 und T1495 untersucht. Eine Untersuchung möglicher Effekte von PPARβ/δ-Agonisten oder PPARγ-Agonisten erfolgte jedoch nicht. Stattdessen wurden T1440- und T1495-Klone mit Editierungen im PPARB- und/oder PPARG-Gen für Untersuchungen eingesetzt. Es zeigte sich, dass Fenofibrat in den beiden Mutterkulturen und den abgeleiteten Klonen antiproliferativ wirkt und die Gesamtzellzahl senken kann. Ebenso wurde im Fall von T1440 (Mutterkultur und Klone) ein antiproliferativer Effekt von TMZ belegt; im Fall von T1495 (Mutterkultur und Klone) war die am MGMT-Status orientierte TMZ-Konzentration von 50 µM TMZ zu gering, um deutliche Effekte zu induzieren und eine Wiederholung der Experimente mit höheren TMZ-Konzentrationen wäre sinnvoll. Dennoch erwies sich die Konzentration von 50 µM TMZ als geeignet, um kooperative Effekte zwischen Fenofibrat und TMZ aufzudecken.

Die Daten der immunzytochemischen Analysen ergaben in einigen Klonen eine Schwächung des Effektes von TMZ durch Fenofibrat. Dies betraf die TMZ-vermittelte Eliminierung von Sox2+ Zellen und die Induktion der Phosphorylierung von H2AX, die ein Indiz für das Auftreten von DNA-Läsionen ist. Die Herstellung der Präparate für diese Analysen erfolgte parallel zu den BrdU-ELISA und den Behandlungen von Proben für Western Blot Analysen, die von einer Kollegin für die Analyse der Expression metabolischer Enzyme eingesetzt wurden. Um dies zu ermöglichen war es notwendig durch die Expansion von Kulturen große Mengen an Zellen zu gewinnen. Letztendlich wurden für die Präparate aller Analysen im Duplikat hergestellt; da die Bestimmung der Gesamtzellzahl an zwei verschiedenen Färberserien erfolgen konnte, gingen in diese Analyse vier technische Replikate ein. Somit basieren die Aussagen auf einer geringen Anzahl an technischen Replikaten. Da eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse der verschiedenen Analysen jedoch nur dann möglich ist, wenn diese parallel mit derselben Passage derselben Kultur erfolgen, war eine alternative Vorgehensweise mit einer höheren Anzahl an technischen Replikaten nicht durchführbar. Eine Wiederholung der BrdU ELISA erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit einem biologischen Replikat. Alle übrigen Analysen wurden zu späteren Zeitpunkten mit biologischen Replikaten von Kolleg*Innen wiederholt. Insgesamt bestätigen diese Ergebnisse die früheren Erfahrungen der AG, dass die Vergleichbarkeit biologischer Replikate eingeschränkt ist. Dazu zählen nicht nur mögliche Änderungen im Grad an *stemness*, sondern auch deren Tendenz Aggregate verschiedenster Größe zu bilden (Dabrock et al, 2023; Zechel et al., 2024).

Die hier durchgeführten Experimente stützen sich im Fall von T1440 auf die Mutterkultur und je einen T1440 Klon mit einem funktionellen PPARβγ bzw. PPARγ Knockout. Im Fall von T1495 wurden drei Klone mit PPARβ Knockout und zwei Klone PPARγ mit Knockout untersucht. Dabei handelte es sich bei den beiden PPARγ Knockouts um Subklone des ursprünglich isolierten Klons T1495 B9; auch zwei der T1495 Klone sind Subklone eines Klons (T1495 C4). Somit können die untersuchten Klone nur eingeschränkt eine Aussage darüber ermöglichen, ob der Typ der Editierung einen Effekt auf das Verhalten der Klone hatte. Da die Ergebnisse der BrdU ELISA und immuncytochemischen Analysen Unterschiede zwischen den Subklonen ergaben, kann vermutet werden, dass epigenetische Unterschiede eine Rolle spielen. So scheint es Unterschiede im Grad an *stemness* (gemessen an der Sox2-Expression) zwischen den Klonen zu geben; dies gilt auch für die

T1495 Mutterkultur, da diese nur eine geringe Sox2-Expression aufweist. Es wäre daher wichtig die Experimente mit weiteren biologischen Replikaten zu wiederholen und vorher auf einen identischen Grad an *stemness* zu prüfen. Auch könnte der genetische Hintergrund der SLGC-Linien eine Rolle spielen. So unterschieden sich die beiden hier untersuchten SLGC-Linien (und Klone) in Hinblick auf den Tumor-suppressor Tp53 (Zechel et al., 2024). SLGCs unterscheiden sich aber auch hinsichtlich der Deregulierung weiterer Tumorsuppressoren und Rezeptortyrosinkinasen (RTKs). Solche Unterschiede sind Kriterien bei der diagnostischen und prognostischen Bewertung von GBMs (Louis et al., 2016, 2021; Gimple et al., 2022). Wenn die hier durchgeführten *in vitro* Experimente eine Relevanz für die Klinik des GBMs erreichen sollen, wäre es wichtig ein breiteres Spektrum an Treiber-Mutationen abzudecken. SLGC-Linien mit einem unterschiedlichen PTEN-Status oder einer Deregulierung verschiedener RTKs sind in der AG vorhanden (Raju et al., 2015; Zechel et al., 2024) und könnten getestet werden.

Die Versuche zur stabilen Transfektion des eGFP-kodierenden Vektors führten zur Isolierung von drei Klonen, die jedoch keine einheitliche eGFP-Expression aufwiesen. Wie im Kapitel 4.6 besprochen könnte die Methylierung des CMV-Promotors eine Ursache hierfür sein. Um dies zu erhärten, könnten alternative Vektoren getestet werden.

Abschließend sei angemerkt, dass die vorliegende Arbeit erstmals die Fenofibrat Responsivität von SLGCs mit bzw. ohne funktionelle PPARβ/δ Knockouts und PPARγ Knockouts untersucht und dabei den Aspekt der möglichen Kooperativität zwischen TMZ und Fenofibrat beleuchtet. Diese Arbeiten lassen Fenofibrat in einiger Hinsicht als ein geeignetes, potenzielles Adjuvans in der GBM-Therapie erscheinen. Andererseits belegen die Ergebnisse aber auch, dass die Wirkung von TMZ durch Fenofibrat geschwächt werden könnte. Es wäre denkbar, dass PPAR-Agonisten den Metabolismus im GBM und insbesondere in SLGCs beeinflussen; eine Evaluierung hierzu könnte in *in vitro* Analysen mit den in der vorliegenden Arbeit untersuchten PPAR Knockout-Klonen erfolgen.

Literaturverzeichnis

Alexander, B.M., Cloughesy, T.F., 2017. Adult Glioblastoma. J Clin Oncol 35, 2402–2409.

Alonso, M.M., 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, M.D., Bandrés, E., García-Foncillas, J., Idoate, M.A., Lang, F.F., Fueyo, J., Gomez-Manzano, C., 2011. Genetic and epigenetic modifications of Sox2 contribute to the invasive phenotype of malignant gliomas. PLoS One 6, e26740.

Altman, D.G., McShane, L.M., Sauerbrei, W., Taube, S.E., 2012. Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK): explanation and elaboration. PLoS Med 9, e1001216.

Annovazzi, L., Mellai, M., Caldera, V., Valente, G., Schiffer, D., 2011. SOX2 Expression and Amplification in Gliomas and Glioma Cell Lines. Cancer Genomics & Proteomics 8, 139–147.

Arakawa, R., Tamehiro, N., Nishimaki-Mogami, T., Ueda, K., Yokoyama, S., 2005. Fenofibric acid, an active form of fenofibrate, increases apolipoprotein A-I-mediated high-density lipoprotein biogenesis by enhancing transcription of ATP-binding cassette transporter A1 gene in a liver X receptor-dependent manner. Arterioscler Thromb Vasc Biol 25, 1193–1197.

Bahmad, H.F., Elajami, M.K., Daouk, R., Jalloul, H., Darwish, B., Chalhoub, R.M., Assi, S., Chamaa, F., Abou-Kheir, W., 2021. Stem Cells: In Sickness and in Health. Curr Stem Cell Res Ther 16, 262–276.

Bale, T.A., Rosenblum, M.K., 2022. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: An update on pediatric low-grade gliomas and glioneuronal tumors. Brain Pathology 32, e13060.

Basu, A.K., 2018. DNA Damage, Mutagenesis and Cancer. Int J Mol Sci 19, 970.

Beier, D., Hau, P., Proescholdt, M., Lohmeier, A., Wischhusen, J., Oefner, P.J., Aigner, L., Brawanski, A., Bogdahn, U., Beier, C.P., 2007. CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-

derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. Cancer Res 67, 4010–4015.

Beier, D., Schulz, J.B., Beier, C.P., 2011. Chemoresistance of glioblastoma cancer stem cells - much more complex than expected. Mol Cancer 10, 128.

Berezovsky, A.D., Poisson, L.M., Cherba, D., Webb, C.P., Transou, A.D., Lemke, N.W., Hong, X., Hasselbach, L.A., Irtenkauf, S.M., Mikkelsen, T., deCarvalho, A.C., 2014. Sox2 Promotes Malignancy in Glioblastoma by Regulating Plasticity and Astrocytic Differentiation. Neoplasia 16, 193-206.e25.

Bewersdorf, J., Bennett, B.T., Knight, K.L., 2006. H2AX chromatin structures and their response to DNA damage revealed by 4Pi microscopy. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 18137–18142.

Binello, E., Mormone, E., Emdad, L., Kothari, H., Germano, I.M., 2014. Characterization of fenofibrate-mediated anti-proliferative pro-apoptotic effects on high-grade gliomas and anti-invasive effects on glioma stem cells. J Neurooncol 117, 225–234.

Bonner, W.M., Redon, C.E., Dickey, J.S., Nakamura, A.J., Sedelnikova, O.A., Solier, S., Pommier, Y., 2008. γH2AX and cancer. Nat Rev Cancer 8, 957–967.

Bonnet, D., Dick, J.E., 1997. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nat Med 3, 730–737.

Bowers, D.C., Nathan, P.C., Constine, L., Woodman, C., Bhatia, S., Keller, K., Bashore, L., 2013. Subsequent neoplasms of the CNS among survivors of childhood cancer: a systematic review. The Lancet Oncology 14, e321–e328.

Brat, D.J., Aldape, K., Colman, H., Figrarella-Branger, D., Fuller, G.N., Giannini, C., Holland, E.C., Jenkins, R.B., Kleinschmidt-DeMasters, B., Komori, T., Kros, J.M., Louis, D.N., McLean, C., Perry, A., Reifenberger, G., Sarkar, C., Stupp, R., van den Bent, M.J., von Deimling, A., Weller, M., 2020. cIMPACT-NOW update 5: recommended grading criteria and terminologies for IDH-mutant astrocytomas. Acta Neuropathol 139, 603–608.

Brodbelt, A., Greenberg, D., Winters, T., Williams, M., Vernon, S., Collins, V.P., (UK) National Cancer Information Network Brain Tumour Group, 2015. Glioblastoma in England: 2007-2011. Eur J Cancer 51, 533–542.

Brunmeir, R., Xu, F., 2018. Functional Regulation of PPARs through Post-Translational Modifications. Int J Mol Sci 19, 1738.

Butler, M., Pongor, L., Su, Y.-T., Xi, L., Raffeld, M., Quezado, M., Trepel, J., Aldape, K., Pommier, Y., Wu, J., 2020. MGMT status as a clinical biomarker in glioblastoma. Trends Cancer 6, 380–391.

Butowski, N.A., 2015. Epidemiology and Diagnosis of Brain Tumors: CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology 21, 301–313.

Cairns, R.A., Harris, I.S., Mak, T.W., 2011. Regulation of cancer cell metabolism. Nat Rev Cancer 11, 85–95.

Capper, D., Zentgraf, H., Balss, J., Hartmann, C., von Deimling, A., 2009. Monoclonal antibody specific for IDH1 R132H mutation. Acta Neuropathol 118, 599–601.

Cejka, P., Stojic, L., Mojas, N., Russell, A.M., Heinimann, K., Cannavó, E., di Pietro, M., Marra, G., Jiricny, J., 2003. Methylation-induced G(2)/M arrest requires a full complement of the mismatch repair protein hMLH1. EMBO J 22, 2245–2254.

Chandra, V., Huang, P., Hamuro, Y., Raghuram, S., Wang, Y., Burris, T.P., Rastinejad, F., 2008. Structure of the intact PPAR-γ–RXR-α nuclear receptor complex on DNA. Nature 456, 350–356.

Chang, S.M., Parney, I.F., Huang, W., Anderson, F.A., Asher, A.L., Bernstein, M., Lillehei, K.O., Brem, H., Berger, M.S., Laws, E.R., Glioma Outcomes Project Investigators, 2005. Patterns of care for adults with newly diagnosed malignant glioma. JAMA 293, 557–564.

Chapman, M.J., 2006. Review: Fibrates: therapeutic review. Diabetes & Vascular Disease 6, 11–19.

Chen, J., Montagner, A., Tan, N.S., Wahli, W., 2018. Insights into the Role of PPARβ/δ in NAFLD. Int J Mol Sci 19, 1893.

Chen, R., Nishimura, M.C., Bumbaca, S.M., Kharbanda, S., Forrest, W.F., Kasman, I.M., Greve, J.M., Soriano, R.H., Gilmour, L.L., Rivers, C.S., Modrusan, Z., Nacu, S., Guerrero, S., Edgar, K.A., Wallin, J.J., Lamszus, K., Westphal, M., Heim, S., James, C.D., VandenBerg, S.R., Costello, J.F., Moorefield, S., Cowdrey, C.J., Prados, M.,

Phillips, H.S., 2010. A Hierarchy of Self-Renewing Tumor-Initiating Cell Types in Glioblastoma. Cancer Cell 17, 362–375.

Chen, X., Chen, W., Zhao, N., Shao, M., Zhang, Y., Yuan, T., Liu, K., Li, M., Wang, X., 2024. PPAR is a positive transcription factor of the Δ5 fatty acyl desaturase gene in abalone *Haliotis discus hannai* Ino. Aquaculture Reports 36, 102144.

Chien, C.-H., Hsueh, W.-T., Chuang, J.-Y., Chang, K.-Y., 2021. Dissecting the mechanism of temozolomide resistance and its association with the regulatory roles of intracellular reactive oxygen species in glioblastoma. J Biomed Sci 28, 18.

Choschzick, I., Hirseland, E., Cramer, H., Schultz, S., Leppert, J., Tronnier, V., Zechel, C., 2014. 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.

D'Atri, S., Tentori, L., Lacal, P.M., Graziani, G., Pagani, E., Benincasa, E., Zambruno, G., Bonmassar, E., Jiricny, J., 1998. Involvement of the mismatch repair system in temozolomide-induced apoptosis. Mol Pharmacol 54, 334–341.

Dabrock, A., Ernesti, N., Will, F., Rana, M., Leinung, N., Ehrich, P., Tronnier, V., Zechel, C., 2023. RAR-Dependent and RAR-Independent RXR Signaling in Stem-like Glioma Cells. International Journal of Molecular Sciences 24, 16466.

Dang, L., White, D.W., Gross, S., Bennett, B.D., Bittinger, M.A., Driggers, E.M., Fantin, V.R., Jang, H.G., Jin, S., Keenan, M.C., Marks, K.M., Prins, R.M., Ward, P.S., Yen, K.E., Liau, L.M., Rabinowitz, J.D., Cantley, L.C., Thompson, C.B., Vander Heiden, M.G., Su, S.M., 2009. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. Nature 462, 739–744.

De Bosscher, K., Desmet, S.J., Clarisse, D., Estébanez-Perpiña, E., Brunsveld, L., 2020. Nuclear receptor crosstalk — defining the mechanisms for therapeutic innovation. Nat Rev Endocrinol 16, 363–377.

DeMarsilis, A., Reddy, N., Boutari, C., Filippaios, A., Sternthal, E., Katsiki, N., Mantzoros, C., 2022. Pharmacotherapy of type 2 diabetes: An update and future directions. Metabolism - Clinical and Experimental 137.

Doench, J.G., Fusi, N., Sullender, M., Hegde, M., Vaimberg, E.W., Donovan, K.F., Smith, I., Tothova, Z., Wilen, C., Orchard, R., Virgin, H.W., Listgarten, J., Root, D.E., 2016. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. Nat Biotechnol 34, 184–191.

Drabløs, F., Feyzi, E., Aas, P.A., Vaagbø, C.B., Kavli, B., Bratlie, M.S., Peña-Diaz, J., Otterlei, M., Slupphaug, G., Krokan, H.E., 2004. Alkylation damage in DNA and RNA—repair mechanisms and medical significance. DNA Repair 3, 1389–1407.

Emami, N., Sedaei, Z., Ferdousi, R., 2021. Computerized cell tracking: Current methods, tools and challenges. Visual Informatics 5, 1–13.

Fane, M., Weeraratna, A.T., 2020. How the ageing microenvironment influences tumour progression. Nat Rev Cancer 20, 89–106.

Ferrara, A., Lewis, J.D., Quesenberry, C.P., Peng, T., Strom, B.L., Van Den Eeden, S.K., Ehrlich, S.F., Habel, L.A., 2011. Cohort study of pioglitazone and cancer incidence in patients with diabetes. Diabetes Care 34, 923–929.

Forsyth, P.A., Weaver, S., Fulton, D., Brasher, P.M.A., Sutherland, G., Stewart, D., Hagen, N.A., Barnes, P., Cairncross, J.G., DeAngelis, L.M., 2003. Prophylactic anticonvulsants in patients with brain tumour. Can J Neurol Sci 30, 106–112.

Gangemi, R.M.R., Griffero, F., Marubbi, D., Perera, M., Capra, M.C., Malatesta, P., Ravetti, G.L., Zona, G.L., Daga, A., Corte, G., 2009. SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity. Stem Cells 27, 40–48.

Giladi, M., Schneiderman, R.S., Voloshin, T., Porat, Y., Munster, M., Blat, R., Sherbo, S., Bomzon, Z., Urman, N., Itzhaki, A., Cahal, S., Shteingauz, A., Chaudhry, A., Kirson, E.D., Weinberg, U., Palti, Y., 2015. Mitotic Spindle Disruption by Alternating Electric Fields Leads to Improper Chromosome Segregation and Mitotic Catastrophe in Cancer Cells. Sci Rep 5, 18046.

Gimple, R.C., Yang, K., Halbert, M.E., Agnihotri, S., Rich, J.N., 2022. Brain cancer stem cells: resilience through adaptive plasticity and hierarchical heterogeneity. Nat Rev Cancer 22, 497–514.

Green, M. und Sambrook, J. (2012) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4th Edition, Vol. II, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Green, M.R., Sambrook, J., (2021). Cloning Polymerase Chain Reaction (PCR) Products: TOPO TA Cloning. Cold Spring Harb Protoc 2021.

Gritsch, S., Batchelor, T.T., Gonzalez Castro, L.N., 2022. Diagnostic, therapeutic, and prognostic implications of the 2021 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system. Cancer 128, 47–58.

Gronemeyer, H., Laudet, V., 1995. Transcription factors 3: nuclear receptors. Protein Profile 2, 1173–1308.

Guo, C., Ma, X., Gao, F., Guo, Y., 2023. Off-target effects in CRISPR/Cas9 gene editing. Front. Bioeng. Biotechnol. 11.

Guo, D., Hildebrandt, I.J., Prins, R.M., Soto, H., Mazzotta, M.M., Dang, J., Czernin, J., Shyy, J.Y.-J., Watson, A.D., Phelps, M., Radu, C.G., Cloughesy, T.F., Mischel, P.S., 2009. The AMPK agonist AICAR inhibits the growth of EGFRvIII-expressing glioblastomas by inhibiting lipogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A 106, 12932–12937.

Heaphy, C.M., de Wilde, R.F., Jiao, Y., Klein, A.P., Edil, B.H., Shi, C., Bettegowda, C., Rodriguez, F.J., Eberhart, C.G., Hebbar, S., Offerhaus, G.J., McLendon, R., Rasheed, B.A., He, Y., Yan, H., Bigner, D.D., Oba-Shinjo, S.M., Marie, S.K.N., Riggins, G.J., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Hruban, R.H., Maitra, A., Papadopoulos, N., Meeker, A.K., 2011. Altered Telomeres in Tumors with *ATRX* and *DAXX* Mutations. Science 333, 425–425.

Hegi, M.E., Diserens, A.-C., Gorlia, T., Hamou, M.-F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J.M., Hainfellner, J.A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J.E.C., Hau, P., Mirimanoff, R.O., Cairncross, J.G., Janzer, R.C., Stupp, R., 2005. MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. N Engl J Med 352, 997–1003.

Huse, J.T., Holland, E.C., 2010. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. Nat Rev Cancer 10, 319–331.

IJpenberg, A., Jeannin, E., Wahli, W., Desvergne, B., 1997. Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X

receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. J Biol Chem 272, 20108–20117.

Juge-Aubry, C., Pernin, A., Favez, T., Burger, A.G., Wahli, W., Meier, C.A., Desvergne, B., 1997. DNA Binding Properties of Peroxisome Proliferator-activated Receptor Subtypes on Various Natural Peroxisome Proliferator Response Elements. Journal of Biological Chemistry 272, 25252–25259.

Kaina, B., Christmann, M., Naumann, S., Roos, W.P., 2007. MGMT: Key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. DNA Repair, MGMT: REVERSAL OF FORTUNE 6, 1079–1099.

Khuchua, Z., Glukhov, A.I., Strauss, A.W., Javadov, S., 2018. Elucidating the Beneficial Role of PPAR Agonists in Cardiac Diseases. International Journal of Molecular Sciences 19, 3464.

Kolios, G., Moodley, Y., 2013. Introduction to Stem Cells and Regenerative Medicine. RES 85, 3–10.

Komar, C.M., 2005. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and ovarian function – implications for regulating steroidogenesis, differentiation, and tissue remodeling. Reproductive Biology and Endocrinology 3, 41.

Koshy, M., Villano, J.L., Dolecek, T.A., Howard, A., Mahmood, U., Chmura, S.J., Weichselbaum, R.R., McCarthy, B.J., 2012. Improved survival time trends for glioblastoma using the SEER 17 population-based registries. J Neurooncol 107, 207–212.

Kroker, A.J., Bruning, J.B., 2015. Review of the Structural and Dynamic Mechanisms of PPARγ Partial Agonism. PPAR Res 2015, 816856.

Kuo, L.J., Yang, L.-X., 2008. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. In Vivo 22, 305–309.

Lamas Bervejillo, M., Ferreira, A.M., 2019. Understanding Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: From the Structure to the Regulatory Actions on Metabolism, in: Trostchansky, A., Rubbo, H. (Eds.), Bioactive Lipids in Health and Disease, Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer International Publishing, Cham, pp. 39–57.

Lapointe, S., Perry, A. und Butowski, N.A. (2018) 'Primary brain tumours in adults', *The Lancet*, 392(10145), pp. 432–446.

Lathia, J.D., Mack, S.C., Mulkearns-Hubert, E.E., Valentim, C.L.L., Rich, J.N., 2015. Cancer stem cells in glioblastoma. Genes Dev 29, 1203–1217.

Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P., Ellison, D.W., 2016. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Acta Neuropathol 131, 803–820.

Louis, D.N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D.J., Cree, I.A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H.K., Pfister, S.M., Reifenberger, G., Soffietti, R., von Deimling, A., Ellison, D.W., 2021. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Neuro-Oncology 23, 1231–1251.

Mansouri, A., Hachem, L.D., Mansouri, S., Nassiri, F., Laperriere, N.J., Xia, D., Lindeman, N.I., Wen, P.Y., Chakravarti, A., Mehta, M.P., Hegi, M.E., Stupp, R., Aldape, K.D., Zadeh, G., 2019. MGMT promoter methylation status testing to guide therapy for glioblastoma: refining the approach based on emerging evidence and current challenges. Neuro Oncol 21, 167–178.

Mansouri, S., Nejad, R., Karabork, M., Ekinci, C., Solaroglu, I., Aldape, K.D., Zadeh, G., 2016. Sox2: regulation of expression and contribution to brain tumors. CNS Oncol 5, 159–173.

Marx, N., Dhiman, H., Schmieder, V., Freire, C.M., Nguyen, L.N., Klanert, G., Borth, N., 2021. Enhanced targeted DNA methylation of the CMV and endogenous promoters with dCas9-DNMT3A3L entails distinct subsequent histone modification changes in CHO cells. Metab Eng 66, 268–282.

McKeage, K., Keating, G.M., 2011. Fenofibrate. Drugs 71, 1917–1946.

Michaeli, D.T., Michaeli, J.C., Albers, S., Boch, T., Michaeli, T., 2023. Established and Emerging Lipid-Lowering Drugs for Primary and Secondary Cardiovascular Prevention. Am J Cardiovasc Drugs 23, 477–495.

Mojas, N., Lopes, M., Jiricny, J., 2007. Mismatch repair-dependent processing of methylation damage gives rise to persistent single-stranded gaps in newly replicated DNA. Genes Dev 21, 3342–3355.

Montaigne, D., Butruille, L., Staels, B., 2021. PPAR control of metabolism and cardiovascular functions. Nat Rev Cardiol 18, 809–823.

Muskens, I.S., de Smith, A.J., Zhang, C., Hansen, H.M., Morimoto, L., Metayer, C., Ma, X., Walsh, K.M., Wiemels, J.L., 2020. Germline cancer predisposition variants and pediatric glioma: a population-based study in California. Neuro Oncol 22, 864–874.

Mut, M., 2012. Surgical treatment of brain metastasis: A review. Clinical Neurology and Neurosurgery 114, 1–8.

Nassar, D., Blanpain, C., 2016. Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. 11, 47–76.

Oberheim Bush, N.A., Hervey-Jumper, S.L., Berger, M.S., 2019. Management of Glioblastoma, Present and Future. World Neurosurgery 131, 328–338.

Omuro, A., DeAngelis, L.M., 2013. Glioblastoma and Other Malignant Gliomas: A Clinical Review. JAMA 310, 1842–1850.

Onken, J., Staub-Bartelt, F., Vajkoczy, P., Misch, M., 2018. Acceptance and compliance of TTFields treatment among high grade glioma patients. J Neurooncol 139, 177–184.

Ostrom, Q.T., Gittleman, H., Liao, P., Vecchione-Koval, T., Wolinsky, Y., Kruchko, C., Barnholtz-Sloan, J.S., 2017. CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010–2014. Neuro-Oncology 19, v1–v88.

Ostrom, Q.T., Gittleman, H., Liao, P., Vecchione-Koval, T., Wolinsky, Y., Kruchko, C., Barnholtz-Sloan, J.S., 2017. CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010–2014. Neuro-Oncology 19, v1–v88.

Pace, A., Dirven, L., Koekkoek, J.A.F., Golla, H., Fleming, J., Rudà, R., Marosi, C., Le Rhun, E., Grant, R., Oliver, K., Oberg, I., Bulbeck, H.J., Rooney, A.G., Henriksson, R., Pasman, H.R.W., Oberndorfer, S., Weller, M., Taphoorn, M.J.B., European Association of

Neuro-Oncology palliative care task force, 2017. European Association for Neuro-Oncology (EANO) guidelines for palliative care in adults with glioma. Lancet Oncol 18, e330–e340.

Palmer, C.N., Hsu, M.H., Griffin, H.J., Johnson, E.F., 1995. Novel sequence determinants in peroxisome proliferator signaling. J Biol Chem 270, 16114–16121.

Pawlak, M., Lefebvre, P., Staels, B., 2012. General molecular biology and architecture of nuclear receptors. Curr Top Med Chem 12, 486–504.

Petkovich, M., Chambon, P., 2022. Retinoic acid receptors at 35 years. J Mol Endocrinol 69, T13–T24.

Prager, B.C., Bhargava, S., Mahadev, V., Hubert, C.G., Rich, J.N., 2020. Glioblastoma Stem Cells: Driving Resilience through Chaos. Trends Cancer 6, 223–235.

Raju, E.N.S., Kuechler, J., Behling, S., Sridhar, S., Hirseland, E., Tronnier, V., Zechel, C., 2015. Maintenance of Stemlike Glioma Cells and Microglia in an Organotypic Glioma Slice Model. Neurosurgery 77, 629–643; discussion 643.

Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., Weissman, I.L., 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature 414, 105–111.

Rodríguez-Camacho, A., Flores-Vázquez, J.G., Moscardini-Martelli, J., Torres-Ríos, J.A., Olmos-Guzmán, A., Ortiz-Arce, C.S., Cid-Sánchez, D.R., Pérez, S.R., Macías-González, M.D.S., Hernández-Sánchez, L.C., Heredia-Gutiérrez, J.C., Contreras-Palafox, G.A., Suárez-Campos, J. de J.E., Celis-López, M.Á., Gutiérrez-Aceves, G.A., Moreno-Jiménez, S., 2022. Glioblastoma Treatment: State-of-the-Art and Future Perspectives. Int J Mol Sci 23, 7207.

Röhrig, F., Schulze, A., 2016. The multifaceted roles of fatty acid synthesis in cancer. Nat Rev Cancer 16, 732–749.

Sancak, Y., Peterson, T.R., Shaul, Y.D., Lindquist, R.A., Thoreen, C.C., Bar-Peled, L., Sabatini, D.M., 2008. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. Science 320, 1496–1501.

Schonberg, D.L., Lubelski, D., Miller, T.E., Rich, J.N., 2014. Brain tumor stem cells: Molecular characteristics and their impact on therapy. Mol Aspects Med 39, 82–101.

Sharma, A., Singh, K., Almasan, A., 2012. Histone H2AX Phosphorylation: A Marker for DNA Damage, in: Bjergbæk, L. (Ed.), DNA Repair Protocols. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 613–626.

Shi, R., Tang, Y., Miao, H., 2020. Metabolism in tumor microenvironment: Implications for cancer immunotherapy. MedComm (2020) 1, 47–68.

Shukla, G., Alexander, G.S., Bakas, S., Nikam, R., Talekar, K., Palmer, J.D., Shi, W., 2017. Advanced magnetic resonance imaging in glioblastoma: a review. Chinese Clinical Oncology 6, 40–40.

Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., Dirks, P.B., 2004. Identification of human brain tumour initiating cells. Nature 432, 396–401.

Stupp, R., Hegi, M.E., Mason, W.P., Bent, M.J. van den, Taphoorn, M.J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., Hau, P., Brandes, A.A., Gijtenbeek, J., Marosi, C., Vecht, C.J., Mokhtari, K., Wesseling, P., Villa, S., Eisenhauer, E., Gorlia, T., Weller, M., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Mirimanoff, R.-O., 2009. 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. The Lancet Oncology 10, 459–466.

Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J.B., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R.O., 2005. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. N Engl J Med 352, 987–996.

Stupp, R., Taillibert, S., Kanner, A., Read, W., Steinberg, D.M., Lhermitte, B., Toms, S., Idbaih, A., Ahluwalia, M.S., Fink, K., Di Meco, F., Lieberman, F., Zhu, J.-J., Stragliotto, G., Tran, D.D., Brem, S., Hottinger, A.F., Kirson, E.D., Lavy-Shahaf, G., Weinberg, U., Kim, C.-Y., Paek, S.-H., Nicholas, G., Bruna, J., Hirte, H., Weller, M., Palti, Y., Hegi, M.E., Ram, Z., 2017. 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.

Taplitz, R.A., Kennedy, E.B., Bow, E.J., Crews, J., Gleason, C., Hawley, D.K., Langston, A.A., Nastoupil, L.J., Rajotte, M., Rolston, K.V., Strasfeld, L., Flowers, C.R., 2018. Antimicrobial Prophylaxis for Adult Patients With Cancer-Related Immunosuppression: ASCO and IDSA Clinical Practice Guideline Update. JCO 36, 3043–3054.

Temple, K.A., Cohen, R.N., Wondisford, S.R., Yu, C., Deplewski, D., Wondisford, F.E., 2005. An Intact DNA-binding Domain Is Not Required for Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPARγ) Binding and Activation on Some PPAR Response Elements*. Journal of Biological Chemistry 280, 3529–3540.

Thongnuanjan, P., Soodvilai, Sirima, Chatsudthipong, V., Soodvilai, Sunhapas, 2016. Fenofibrate reduces cisplatin-induced apoptosis of renal proximal tubular cells via inhibition of JNK and p38 pathways. The Journal of Toxicological Sciences 41, 339–349.

Tyagi, S., Gupta, P., Saini, A.S., Kaushal, C., Sharma, S., 2011. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. J Adv Pharm Technol Res 2, 236–240.

Tykocki, T., Eltayeb, M., 2018. Ten-year survival in glioblastoma. A systematic review. Journal of Clinical Neuroscience 54, 7–13.

Van Meir, E.G., Hadjipanayis, C.G., Norden, A.D., Shu, H.-K., Wen, P.Y., Olson, J.J., 2010. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. CA Cancer J Clin 60, 166–193.

Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., Thompson, C.B., 2009. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. Science 324, 1029–1033.

Visvader, J.E., Lindeman, G.J., 2008. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. Nat Rev Cancer 8, 755–768.

Walcher, L., Kistenmacher, A.-K., Suo, H., Kitte, R., Dluczek, S., Strauß, A., Blaudszun, A.-R., Yevsa, T., Fricke, S., Kossatz-Boehlert, U., 2020. Cancer Stem Cells—Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies. Front Immunol 11, 1280.

Walker, E.V., Davis, F.G., CBTR founding affiliates, 2019. Malignant primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in Canada from 2009 to 2013. Neuro Oncol 21, 360–369.

Wang, J., Sakariassen, P.Ø., Tsinkalovsky, O., Immervoll, H., Bøe, S.O., Svendsen, A., Prestegarden, L., Røsland, G., Thorsen, F., Stuhr, L., Molven, A., Bjerkvig, R., Enger, P.Ø., 2008. CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. Int J Cancer 122, 761–768.

Watanabe, M. und Kakuta, H. (2018) 'Retinoid X Receptor Antagonists', International Journal of Molecular Sciences, 19(8), p. 2354.

Wei, J., Bhattacharyya, S., Jain, M., Varga, J., 2012. Regulation of Matrix Remodeling by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ: A Novel Link Between Metabolism and Fibrogenesis. Open Rheumatol J 6, 103–115.

Weinstein, J.N., Collisson, E.A., Mills, G.B., Shaw, K.R.M., Ozenberger, B.A., Ellrott, K., Shmulevich, I., Sander, C., Stuart, J.M., 2013. The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. Nat Genet 45, 1113–1120.

Whitfield, B.T., Huse, J.T., 2022. Classification of adult-type diffuse gliomas: Impact of the World Health Organization 2021 update. Brain Pathol 32, e13062.

Whitfield, B.T., Huse, J.T., 2022. Classification of adult-type diffuse gliomas: Impact of the World Health Organization 2021 update. Brain Pathol 32, e13062.

Witwer, B.P., Moftakhar, R., Hasan, K.M., Deshmukh, P., Haughton, V., Field, A., Arfanakis, K., Noyes, J., Moritz, C.H., Meyerand, M.E., Rowley, H.A., Alexander, A.L., Badie, B., 2002. Diffusion-tensor imaging of white matter tracts in patients with cerebral neoplasm. J Neurosurg 97, 568–575.

Xu, W., Yang, H., Liu, Y., Yang, Y., Wang, Ping, Kim, S.-H., Ito, S., Yang, C., Wang, Pu, Xiao, M.-T., Liu, L., Jiang, W., Liu, J., Zhang, J., Wang, B., Frye, S., Zhang, Y., Xu, Y., Lei, Q., Guan, K.-L., Zhao, S., Xiong, Y., 2011. Oncometabolite 2-Hydroxyglutarate Is a Competitive Inhibitor of α-Ketoglutarate-Dependent Dioxygenases. Cancer Cell 19, 17–30.

Yamamoto, S., Iwakuma, T., 2018. Regulators of Oncogenic Mutant TP53 Gain of Function. Cancers (Basel) 11, 4.

Yu, Z., Pestell, T.G., Lisanti, M.P., Pestell, R.G., 2012. Cancer Stem Cells. Int J Biochem Cell Biol 44, 2144–2151.

Zechel, C., Loy, M., Wegner, C., Dahlke, E., Soetje, B., Baehr, L., Leppert, J., Ostermaier, J.J., Lueg, T., Nielsen, J., Elßner, J., Willeke, V., Marzahl, S., Tronnier, V., Madany Mamlouk, A., 2024. Molecular signature of stem-like glioma cells (SLGCs) from human glioblastoma and gliosarcoma. PLoS One 19, e0291368.

Zhang, J., Stevens, M.F.G., Bradshaw, T.D., 2012. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. Curr Mol Pharmacol 5, 102–114.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung
0^6-MeG	an Position 6 methylierter Guaninrest
5-MTIC	5-(3-*N*-methyltriazen-1-yl)-imidazol-4-carboxamid
Abb.	Abbildung
ABC	*ATP-binding-cassette*
adNSC	adulte neuronale Stammzellen
AF-1	ligandenunabhängige Aktivierungsfunktion
AIC	(5(4)-aminoimidazol-4(5)-carboxamid)
AML	akute myeloische Leukämie
AMP	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATRX	X-chromosomale Alpha-Thalassämie-Geistige Retardierung-Syndrom
Bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BTSC	*brain tumor stem cell*
CD133	*cluster of differentiation 133 /* Prominin-1
CoA	Co-Aktivatoren
CoR	Co-Repressoren
CSC	Tumorstammzelle
CT	Computer Tomogramm
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DLX2	*distal-less homeobox 2*
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphate
DR	*direct repeat*
EcoR1	Nuklease aus Escheria Coli Stamm R
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	*enhanced green fluorescent protein*
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor
F	*forward*
FABP7	*fatty acid binding protein 7*
FACS	*fluorescence activated cell sorting*
Gag	*group specific antigen*
GBM	Glioblastoma Multiforme
gDNA	genomische DNA
GFP	*green florescent protein*
Gof	*gain of function*
Gy	Gray
HDL	*high densitiy lipoprotein*
HEK	*human embryonic kidney cells*
Hu	*human*
IDH	Isozitratdehydrogenase
Int	Intron
KOF	Körperoberfläche
LB	Luria-Bertani medium
LBD	ligandenbindende Domäne
LBP	Liganden-Bindungstasche
LDL	*low density lipoprotein*

LE	*low electroendosmosis*
M13	Sequenz aus M13 Phagen
MC	Mutterkultur
MGMT	O6-Methyl-Guanyl-DNA-Methyltransferase
MMR	DNA-Fehlpaarungsreparatur
MRT	Magnetresonanztomographie
MSP	methylierungsspezifische PCR
N^3-MeA	an Position 3 methylierter Adeninrest
N^7-MeG	an Position 7 methylierter Guaninrest
NLS	Signal für die Translokation in den Nukleus
OD	Optische Dichte
Ori	*origin of replication*
OXPHOS	oxidative Phosphorylierung
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PAM	*protospacer adjacent motif*
PBS	*phosphate buffered saline*
PCR	Polymeraseketten-Reaktion
PES	Polyethersulfon
Pl.	Plasmid
PML	Promyelozyten-Leukämie-Protein
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
PPAR-Res	PPAR-responsiven Sequenzen
PPI	Prolyl-Petidyl-Iosmerasen
PTEN	*Phosphatase and Tensin homolog*
PTM	posttranslationale Modifizierungen
R	*reverse*
RTK	Rezeptortyrosinkinase
RXR	Retinoid-X Rezeptoren
SDS	*sodium dedecyl sulfate*
SLGC	*stem like glioma cells*
Sox2	*sex determining region Y (SRY)- box 2*
Taq	thermostabile DNA-Polymerase des Bakteriums Thermus aquaticus
Tau	*tubulin associated unit*
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBR2	*T-box brain protein*
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TERT	Telomerase
TMZ	Temozolomid
TOPO	Topoisomerase I
TTfields	*Tumor treating fields*
Uv	unverdaute Plasmid DNA
WCE	*whole cell extract*
WHO	Weltgesundheitsorganisation
x-gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
ZFD	Zinkfinger
ZNS	zentrales Nervensystem
λ	Symbol für die Wellenlänge

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zelluläre Hierarchie von stammzellähnlichen Gliomzellen (SLGCs) in GBMs. . 9

Abbildung 2: Domänenstruktur von PPAR und Bindung des PPAR/RXR Heterodimers an das zugehörige responsive Element in der DNA. 11

Abbildung 3: pCR™ 2.1-Vektor 30

Abbildung 4: PCR-Produkte und schematische Darstellung der Primer-bindenden Regionen. 44

Abbildung 5: Auftrennung verdauter und unverdauter rekombinanter pCR$^{2.1}$ TOPO-Plasmide auf einem 1,6%-TBE-Agarosegel 45

Abbildung 6: Nachweis von PPARG-Insertionen in rekombinanten pCR ™ 2.1 TOPO-Vektoren. 46

Abbildung 7: Auswertung der Sequenzen der Insertionen von pTOPO PPARA H9 D7 und pTOPO PPARA H9 E4 47

Abbildung 8: Schematische Darstellung der von Exon 4 des PPARA-Gens kodierten Aminosäure-Sequenz 47

Abbildung 9: Sequenzen der Insertionen von pTOPO PPARA B9 F4 γ (PPARA-Amplifikate). 48

Abbildung 10: Schematische Darstellung der von Exon 4 des PPARA-Gens kodierten Aminosäure-Sequenz 48

Abbildung 11: Sequenzen der Insertionen von pTOPO PPARA B9 F4 γ (PPARG-Amplifikate). 50

Abbildung 12: Schematische Darstellung der Aminosäure-Sequenz (PPARγ) im Bereich des ersten Zinkfingers und koordinierte Bindung des Zink- (Zn) Ions. 51

Abbildung 13: Sequenzen der Insertionen von pTOPO PPARA B9 D10 γ (PPARA-Amplifikate). 52

Abbildung 14: Schematische Darstellung der von Exon 4 des PPARA-Gens kodierten Aminosäure-Sequenz 52

Abbildung 15: Sequenzen der Insertionen von pTOPO PPARA B9 D10 γ (PPARG-Amplifikate). 53

Abbildung 16: Schematische Darstellung der Aminosäure-Sequenz (PPARγ) im Bereich des ersten Zinkfingers und koordinierte Bindung des Zink- (Zn) Ions. 54

Abbildung 17: Effekt von Einzel- und Doppelbehandlungen mit Fenofibrat und Temozolomid auf die Proliferation der SGLC-Zelllinie T1440 und abgeleiteter Klone (BrdU ELISA am Tag d5 nach der Behandlung.) 58
Abbildung 18: Effekt von Einzel- und Doppelbehandlungen mit Fenofibrat und Temozolomid auf die Proliferation der SGLC-Zelllinie T1495 und abgeleiteter Klone (BrdU ELISA am Tag d5 nach der Behandlung.) 59
Abbildung 19: Analyse des Stammzellcharakters. 62
Abbildung 20: Sox-2 und CD133 Expression nach der Behandlung mit DMSO, Fenofibrat und TMZ in der T1440 MC und korrespondierenden Klonen 64
Abbildung 21: Gesamtzellzahl und relativer Anteil an Sox2-positiven Zellen der T1440 Mutterkultur und korrespondierenden Klonen 65
Abbildung 22: Sox-2 und CD133 Expression nach der Behandlung mit DMSO, Fenofibrat und TMZ in der T1495 MC und korrespondierenden Klonen 68
Abbildung 23: Gesamtzellzahl und relativer Anteil an Sox2-positiven Zellen in der T1495 Mutterkultur und korrespondierenden Klonen. 69
Abbildung 24: Analyse der Phosphorylierung von H2AX zu γH2AX. 71
Abbildung 25: Nachweis von γH2AX und PML in behandelten und unbehandelten Kulturen von T1440 und abgeleiteten Klonen. 72
Abbildung 26: Gesamtzellzahl und relativer Anteil an γH2AX-positiven Zellen der T1440 Mutterkultur und korrespondieren Klone. 74
Abbildung 27: Nachweis von γH2AX und PML in behandelten und unbehandelten Kulturen von T1495 und abgeleiteten Klonen. 76
Abbildung 28: Gesamtzellzahl und relativer Anteil an γH2AX-positiven Zellen der T1495 Mutterkultur und korrespondieren Klone. 77
Abbildung 29: Nachweis der Expression von PPARα und Sox2 in T1440 und T1495 Mutterkulturen (MC) und abgeleiteten Zellklonen. 82
Abbildung 30: Analyse der Expression von MGMT in T1440 und T1495 Mutterkulturen (MC) und abgeleiteten Zellklonen. 83
Abbildung 31: Nachweis der EGFP-kodierenden Sequenz in stabil transfizierten Zellklonen. 86
Abbildung 32: eGFP-Expression in transduzierten T1464-Klonen. 87

Abbildung 33: Histomolekulare Klassifikation der häufigsten Gliome im Erwachsenenalter. 124
Abbildung 34: partielle Nukleotidsequenz des PPARA-Gens. 125
Abbildung 35: partielle Nukleotidsequenz des PPARG-Gens. 126
Abbildung 36: Vergleich der Aminosäuresequenzen des humanen PPARα, PPARβδ und PPARγ im Einbuchstaben-Code. 127
Abbildung 37: Schematische Darstellung des psPAX2-Vektors. 128
Abbildung 38: Schematische Darstellung des pCMV-VSV-G-Vektors. 129
Abbildung 39: Schematische Darstellung des pLMJ1-EGFP-Vektors..... 130
Abbildung 40: Nukleotidsequenz des EGFP..... 131
Abbildung 41: Aminosäuresequenz des EGFP. 132
Abbildung 42: Zusammenstellung von bekannten PPARA Transkripten, die für Proteine kodieren..... 132

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht zu Experimenten mit editierten/nicht-editierten Zellklonen und SLGC-Linien 17
Tabelle 2: Puffer und Lösungen 18
Tabelle 3: Zellkulturmedien 19
Tabelle 4: Bakterielle Medien und Agarplatten 20
Tabelle 5: Einmalplastikpipetten und weiteres Verbrauchsmaterial 20
Tabelle 6: Enzyme und Kits 21
Tabelle 7: Biochemikalien und weitere Reagenzien 21
Tabelle 8: Geräte 23
Tabelle 9: Primer für PCR und/ oder Sequenzierung 24
Tabelle 10: Sequenzen der Guide RNA 24
Tabelle 11: Software und Datenbanken 25
Tabelle 12: Konzentrationen der TBE-Agarose Gele in Abhängigkeit der Fragmentlänge . 27
Tabelle 13: Komponenten des PCR-Mastermixes 27
Tabelle 14: Primäre und sekundäre Antikörper für die ICC 33
Tabelle 15: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele 38
Tabelle 16: Primärantikörper für Western Blot Analysen 39
Tabelle 17: Sekundärantikörper für Western Blot Analysen 39
Tabelle 18: Klone und Sequenzierungen von PPAR-Isotyp-Genen 46

Anhang

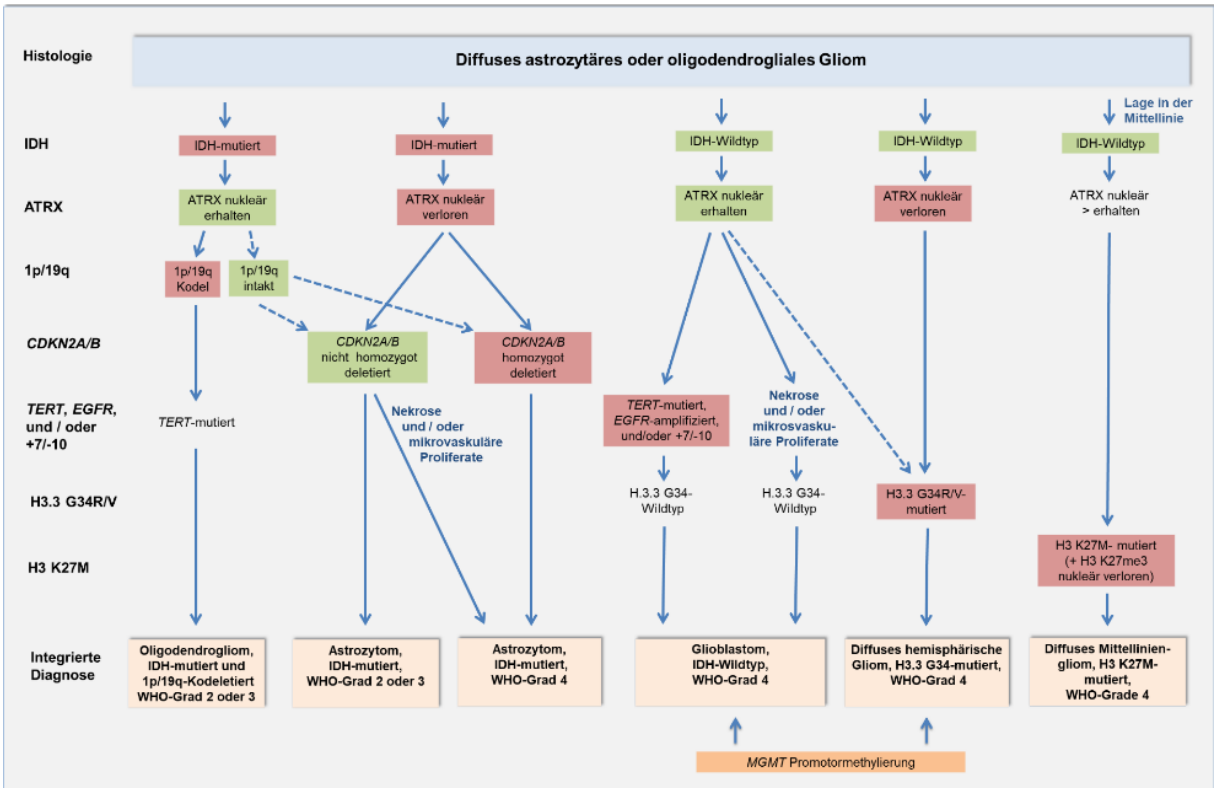

Abbildung 33: Histomolekulare Klassifikation der häufigsten Gliome im Erwachsenenalter. Basierend auf der WHO-Klassifikation von 2016 und nachfolgenden cIMPACT *(the Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumor Taxonomy)* Empfehlungen. Aus der AWMF S2k Leitlinie Gliome, adaptiert nach Weller et al 2020.

attttcaattgagttgtttgttttaagacctctttgtatattaccacatgtgtattgaa
aatattttctcccagtctgtggcttgtctttaattttcttagcaatgtcttttgcagagc
agaaggtttcattagctttcatagattccaacttatattttctctttcatggattgtgca
tttggtgttgcccacacagatttttatactgtattctggtgccatttactgagttaacaa
ttgcggaagaactggaagaaaggaagcaaacaaaacgagttctgcgtggcactgtcagtg
cgggggcatggggagtcctgcagggtgaggtatgggcggtatggcaaggcgcgggcccat
agatgtgcaggtctggagatgtgtgcagcggagatgtgcgggcccgagatgtgcgggtcc
gatgtgtgggtccggagatgtgcgcgtacccagaggtgcagatcggaaatgtgggggtcc
ggaggaaatgtgcggatcaggagaagtgccagtcccgagatgtgcggatcggagatgtgg
agggctaggagatgcgtgggtccggagatgcgcagatcaggagatgggcgaatcggagat
gcgcgggtccggaaatgtgcagagcggagatgtgtggatcaggagatgttgggggtcag
gagatgcgggggtccagagatgtgggggtccggagatgtgcgggtctggagatgtgcaga
gcagagcaaagatgagctgatcggagatgcccaggtccggggatccacgggtccggagac
gcgcgggtccggagatgcgtgggtccagagatgtgcgggtccaaagatgtgcaaatctga
agatgtgtggatgggagatgtgcaggtccggagatgcgcggggcggagatgtgtggatcg
gagatgctcagatcgaagatgtgggaatgaggagatgtgcggggcgggatgtgtggatgg
gagacgcgcgggcccggagatatgcggggcggagatgtgcgggtccagggatgtgtgatc
tgaggtgtgtgggtccggagctcggggtcagctcagcagcagtgagagcgagcatgctgg
ctttgggagcacagcacaatggcagctgtaggagtgcaagagggtgtgacccagaggcag
ggcccggccccgcatgggtgttctgaggtttatgcctcagcactagaagcctcgtatgcg
aaatcacatcctcatagacccggttcagacacaggatagtgatgcctggactattcatcc
gtctctcctcttttccccag

Intron 3/4

ACACGCTTTCAC**GAGCTTCGAGCCCCTCCTCGG**TGACTTATCCTGTGGTCCCCGGCAGCG
TGGACGAGTCTCCCAGTGGAGCATTGAACATCGAATGTAGAATCTGCGGGGACAAGGCCT
CAGGCTATCATTACGGAGTCCACGCGTGTGAAGGCTGCAAG

Exon 4

gtagaggggagctggaacagggcctggtggccgccaccatcaactacttatggtcacttt
tatagcaaatggcagtcattactgagagattgcagaaagtcccggataagaaactgactt
caggccaggcgcggtatctcatgcctataattccagcactttgggagaccgagatgggtg
gatcacctgagatcaggagttcgataccagcctggccaacatgatgaaaccctgtctcta
ctaaaaataccaaaaaaaattagccaggcgtggtggtgggcgcctgtaagcccagctact
cgagaggcaaagacaggagaattgcttgaacccaggagccagaggttgcagtgagccaag
attgcgccactgcactccagcctgggcaacaagagtgagactccatcttaaaaaaaaaga
aagaaaaaaagaaaaagaaaaagaaactgacctcagtgatagattagcctctctttatag
cacagaacccctgagagcgtaagccctgttgtgaactgcgtatttgaggaatctagcttg
tacgccccttatgagaatctaatacttgatgttccaaggtggaacactttcatcctgaaa
ctatccctccccacccccatctgtggaaaaattgtcttccatgaaaccggtccctggtgg
caaaaaggttggggattgctgctttagagagtctaggacaaatggttcctctgtgctttg
taaatacttagagaagtgcattctttaaaagaaaataagtcacattggaccgggtgcagt
ggctcacgcctataatctcagcactttgggaggccgaggcggctggatcacctgaggtca
ggagttcaagaccagcctggccaacatggtgaaaccctgtctctactaaaaatacaaaaa
ttagccaggtgtggtggtgggtgcctgtaatcccagctacttgggaggctgaagcaggag
aattgcttgaactcaggaggcggaggttgcagtgagctgagatcgagccatttcactcca
gcctaggcgacaagagtaaaacttcatctcaaaaaaaaaaaaaaagagagaaaagaaaata
agccacattaagaacatcacttcattcgaatacaagacagagagctgttaccgttgatct
ctggagcctccctgaaggccaggtggggcaggtgttctcatgctcctgccagggaaattg
gccatcagagacacagagtatcttgcttagggtcccacagcccccagcagcagggactgg
aaccagagactggctgctcctgctccccagcagttccttcctgcacatcaggggcttctc
cacctgattcaagcgacaggaacccccctgtgcatcttcatcctcctgctggctcagcctg
ccctaaacagatgtgacctgggccaggagtgcatgaaggcaggccctgttgtcctgcatg
…

Intron 4/5

Abbildung 34: partielle Nukleotidsequenz des PPARA-Gens. Das Exon 4 (blaue Schrift) kodiert für den ersten Zink-Finger (Aminosäure-Reste 102 - 122); intronische Sequenzen sind in grau dargestellt. Die Sequenzen für die Bindung des *forward* und *reverse* Primers sind in rot dargestellt. Die sgRNA (*single guide RNA*) bindende Region ist unterstrichen, die PAM ist in lila dargestellt.

gtatgatgtttattttcacttttcagactactaggactagaattggactcatctctcagt
aaccctgtaataaataatgctccagagactagaaatctaatagagaaggcattcaccatt
catttattcacccatttatccatgaaatattaggtatctatgaaatgccaggaagggagc
tggcacgaggtcaatcttgccttccccgcccccctccttccttcctctcttctttcctttc
ttgcttacttccttcttagggacattttctaccttgattacactgtcagttgtatctcag
gctaagagtccatcatccaaactttgaattattttggcccccttataagttaataagtaac
aattccaagtcactttgtattatataacttatcttcactatattactgctactacagtac
atttttctagtatgtcctttcaggagtttatactgaaacctacttttaagcacaaattt
gttttaacattgtagcctattgataaattttcatgccattaactaaatcaacatcaaaac
atcagactcaagaaaaactagaactgcactttttgagataaaatgtatttctgtgatgct
atttccttgatttttatcatgtgtgggctgacatgctggttttccaaagccaccactatg
taattggcaatcattacttgacaagtaagaacttcctgtatttctagtggcttttaaaga
taaataatatgcttagttatatttatctatgcggttttcagttagagcctaatatggaaa
tttagtagccctgagcccaactagtaaaaggtagggcttacttccataagttccgccacg
ctctgtcaaagattatttcacaaaccacctcctttgactgaacactaatggtaacctggg
ctcatatttttcatgcacctcaagctaggcataccatgaccttttcacagtggtgttcct
tctgtggttcttttgcaagttgtttcaaagtacttataaaatggaatatttaaataaaat
gtataatttaatattgtgatgaataccaaagacagaacatttcctagcaaaataagcttc
cttgtctcaaatcctctatgttgtctgttacagctgtagtattgcaggctactgggggtc
atagaaccacagacttaattctcattcccattttatatttacaggtgaggcttagagatg
ttataacttgcctgtgattacaaacctttctttttcttgccttaactccagtgtttttc
atgttccactgtgcttttacactgaaacaatacaaatacagcatgaaggtgtactatggt
ggcttgccctgttgccttttaggactgttttcatgggataattatcctctcacatgtct
ccatacacag

Intron 2/3

GTGCAATCAAAGTGGAGCCTGCATCTCCACCTTATTATTCTGAGAAGACTCAGCTCTACA
ATAAGCCTCATGAAGAGCCTTCCAACTCCCTCATG**GCAATTGAATGTCGTGTCTGTGG**AG
ATAAAGCTTCTGGATTTCACTATGGAGTTCATGCTTGTGAAGGATGCAAG

Exon 3

gtaattaaaaaaaaagtcttcaaagaaattgttgaaactttattatttcatttcagcaga
accccttttttaggtgatacaatatatgaatttttttcttcatggaagagtatcttgct
ctgtcacccagaccagagtgcagtggtgctatcctagcacactgcagccttgagcttctg
ggctcaagtgatcctcccacctcagcctcccaaaggatgatataagatttgaaagcctaa
gaaagtggataaaagttgggctgctttgccccacatttgtttctccaaattgattctttg
agacactgatctaatttaatccttgcatcttgcagatttttacaaaaaggtgacttctcc
aaggtgtcatggcaagacagtgatgacctggaaccaggatgcagatttcctgcattctct
agttgtttatttatttatttatttatttattttgctataccgtgtaatattgtatagaca
gaagattttacagattatttatatatgcatatctttggatccctagagcaatcctataag
attggacttctttatggccacattgcagatgtagaaattacaggttagtaaaacttgcca
aggtcatcccttagtaagtggcagaccgcagtctagaccctgactccttaggtggtgttg
gctctcaaagcagtgcctcatgtttccttattccagcatcaatgtgagccacatacacgg
acaggtaaggaggtataacagtgtgggaaaggagatactatttatcctcatctctttcct
ttgtgaaaagggtattttggaaaattcagacgtttagtaatttattgcttaattattaag
aaaatatgtgaatccactcatattttgatatgcagtcttttaagataattttaatataca
caatgcaaaaatagtactaatttattatatacgcattgcacagaataaactgttcataaa
tattcactttataaaataaatacctgcttattgggctttttattcaacgtaaagatacag
aacaacagttaggaaagttttaggacatcttggttcctaaatggatggtgggccaaaaaa
ggaaactgatttttattgaattcttactacatgccaaatactgtatgaggtaacgttttc
atacatcagtatttaaccacatcctacccaggttttctcatctataaaatgattgtggct
gagtgtggtggctcacgcctctaatcccaacactttgggaggccaaggcaggaggatcac
ttgagcccaggggttcaagaccagtctgggcagcatagtgagaccccatccctacaaaat
ttttaaaaaattaaccaggcatggtggcacatgcctgtagtcctagcttcttgggaggtt
taggtaagaggatcccttgatcccagaagttcaaggctgcagtgagctatgatcatacca
ctgcactccagcctgggtcacaaaagcaagaccctaactccaaaaataaataaataaata
agtaaataaataaaatgacactgaattacatgatctctaaagtcccttcaattgaaacag

Intron 3/4

…

Abbildung 35: partielle Nukleotidsequenz des PPARG-Gens. Das Exon 3 (blaue Schrift) kodiert für den ersten Zink-Finger (Aminosäure-Reste 139 - 159); intronische Sequenzen sind in grau dargestellt. Die Sequenzen für die Bindung des *forward* und *reverse* Primers sind in rot dargestellt. Die sgRNA (*single guide RNA*) bindende Region ist unterstrichen, die PAM ist in lila dargestellt.

```
PPARA_HUMAN     1     ------------------------------MVDTESPLCPLSPLEAGDLESPLSEEF-LQ     29
PPARD_HUMAN     1     ------------------------------------------------MEQPQEEAPEVR     12
PPARG_HUMAN     1     MGETLGDSPIDPESDSFTDTLSANISQEMTMVDTEMPFWPTNFGI---------------     45

PPARA_HUMAN     30    EMGNIQEISQSIGEDSSGSFGFT-------------EYQ---YLGSCPG-SD--------     64
PPARD_HUMAN     13    EEEEKEEVAEAEG--------AP-------------E------LNGGPQHAL--------     37
PPARG_HUMAN     46    -----SSVDLSVMEDHSHSFDIKPFTTVDFSSISTPHYEDIPFTRTDPVVADYKYDLKLQ     100
                           ..:  :                          .          *   :
                                                                     ZFD
PPARA_HUMAN     65    GSVITDTLSPASSPSSVTYPV-VPGSVDESPSGALNIECRICGDKASGYHYGVHACEGCK     123
PPARD_HUMAN     38    PSSSYTDLSRSSSPPSLLD-Q-LQMGCDGASCGSLNMECRVCGDKASGFHYGVHACEGCK     95
PPARG_HUMAN     101   EYQSAIKVEPASPPYYSEKTQLYNKPHEEPSNSLMAIECRVCGDKASGFHYGVHACEGCK     160
                            :. :* *            :     . : :***:*******:***********
                         DBD                ZFD
PPARA_HUMAN     124   GFFRRTIRLKLVYDKCDRSCKIQKKNRNKCQYCRFHKCLSVGMSHNAIRFGRMPRSEKAK     183
PPARD_HUMAN     96    GFFRRTIRMKLEYEKCERSCKIQKKNRNKCQYCRFQKCLALGMSHNAIRFGRMPEAEKRK     155
PPARG_HUMAN     161   GFFRRTIRLKLIYDRCDLNCRIHKKSRNKCQYCRFQKCLAVGMSHNAIRFGRMPQAEKEK     220
                      ********:** *::*: .*:*:**.*********:***::*************.:** *

PPARA_HUMAN     184   LKAEILTCEHDIEDSETADLKSLAKRIYEAYLKNFNMNKVKARVILSGKASNNPPFVIHD     243
PPARD_HUMAN     156   LVAGLTANEGSQYNPQVADLKAFSKHIYNAYLKNFNMTKKKARSILTGKASHTAPFVIHD     215
PPARG_HUMAN     221   LLAEISS-DIDQLNPESADLRALAKHLYDSYIKSFPLTKAKARAILTGKTTDKSPFVIYD     279
                      * * : : : .  : : ***::::*::*::*:*.* :.* *** **:**::.. ****:*

PPARA_HUMAN     244   METLCMAEKTLVAKLVANGIQ-NKEAEVRIFHCCQCTSVETVTELTEFAKAIPGFANLDL     302
PPARD_HUMAN     216   IETLWQAEKGLVWKQLVNGLPPYKEISVHVFYRCQCTTVETVRELTEFAKSIPSFSSLFL     275
PPARG_HUMAN     280   MNSLMMGEDKIKFKHITPLQEQSKEVAIRIFQGCQFRSVEAVQEITEYAKSIPGFVNLDL     339
                      :::*  .*. :  * :.      **  :::*  **  :**:* *:**:**:**.* .* *
                                                   LBD
PPARA_HUMAN     303   NDQVTLLKYGVYEAIFAMLSSVMNKDGMLVAYGNGFITREFLKSLRKPFCDIMEPKFDFA     362
PPARD_HUMAN     276   NDQVTLLKYGVHEAIFAMLASIVNKDGLLVANGSGFVTREFLRSLRKPFSDIIEPKFEFA     335
PPARG_HUMAN     340   NDQVTLLKYGVHEIIYTMLASLMNKDGVLISEGQGFMTREFLKSLRKPFGDFMEPKFEFA     399
                      ***********:* *::**:*::****:*:: *.**:*****:****** *::****:**

PPARA_HUMAN     363   MKFNALELDDSDISLFVAAIICCGDRPGLLNVGHIEKMQEGIVHVLRLHLQSNHPDDIFL     422
PPARD_HUMAN     336   VKFNALELDDSDLALFIAAIILCGDRPGLMNVPRVEAIQDTILRALEFHLQANHPDAQYL     395
PPARG_HUMAN     400   VKFNALELDDSDLAIFIAVIILSGDRPGLLNVKPIEDIQDNLLQALELQLKLNHPESSQL     459
                      :***********:::*:*.** .******:**  :* :*: :::.*.::*: ***:   *

PPARA_HUMAN     423   FPKLLQKMADLRQLVTEHAQLVQIIKKTESDAALHPLLQEIYRDMY                   468
PPARD_HUMAN     396   FPKLLQKMADLRQLVTEHAQMMQRIKKTETETSLHPLLQEIYKDMY                   441
PPARG_HUMAN     460   FAKLLQKMTDLRQIVTEHVQLLQVIKKTETDMSLHPLLQEIYKDLY                   505
                      * ******:****:****.*::* *****:: :*********:*:*
```

DBD

LBD

Abbildung 36: Vergleich der Aminosäuresequenzen des humanen PPARα, PPARβδ und PPARγ im Einbuchstaben-Code. DBD: DNA-bindende Domäne; LBD: Liganden-bindende Domäne; ZFD: Zink-Finger (lila Box mit weißer Schrift); die P-Box umfasst die Aminosäurereste -CEGCK- am C-terminalen Ende des ersten Zink-Fingers. – modifiziert nach Khuchua et al., 2018.

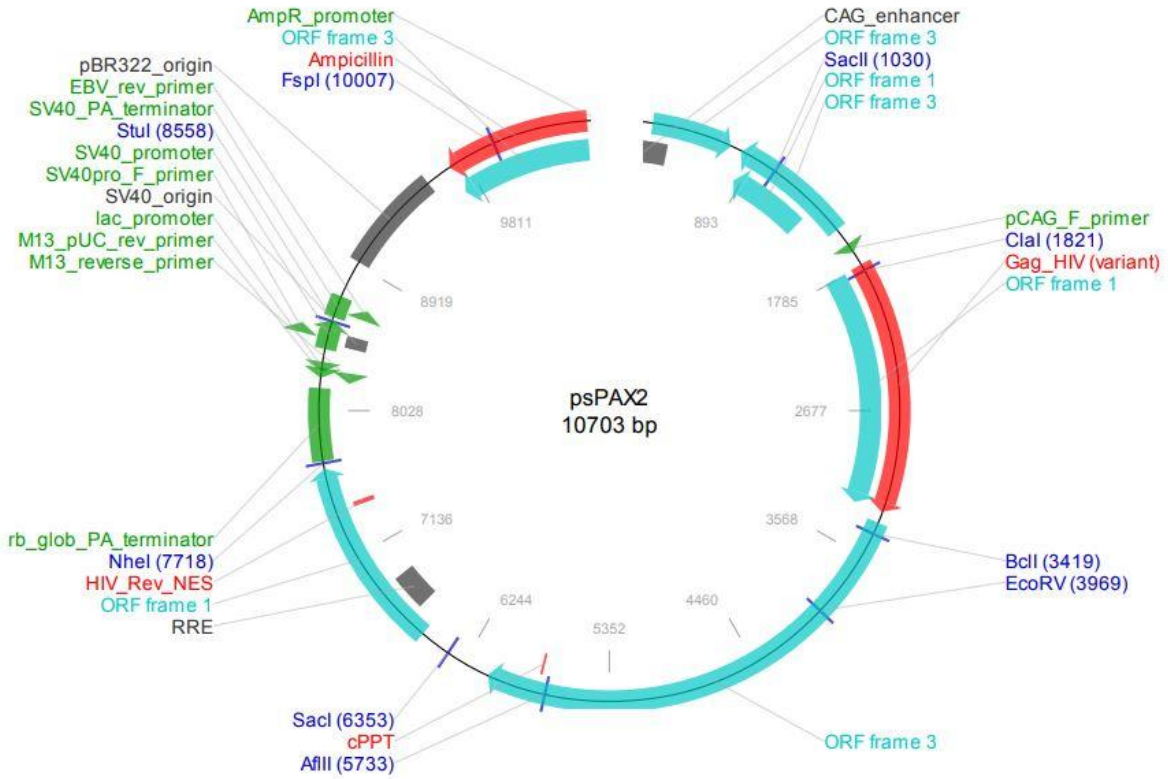

Abbildung 37: Schematische Darstellung des psPAX2-Vektors. Die Expression des HIV-1 gag und pol wird durch den SV40 Promotor, die Expression der AmpR durch den AmpR Promotor kontrolliert. Um das Plasmid sind die Restriktionstellen mit dem Namen der entsprechenden Enzyme dargestellt. AmpR: Ampicillin-, Carbenicillin und andere verwandte Antibiotika-Resistenzen; CMV: Zytomegalievirus; HIV: Humanes Immundefizienz-Virus; cPPT/CTS: zentraler Polypurintrakt und zentrale Terminationssequenz von HIV-1: HIV-1 pol: HIV-1 DNA-Polymerase; lac: β-Galactosidase; RRE: *rev response element*; SSV40 ori: Simian-Virus 40; HIV-1 gag: HIV-1 gruppenspezifisches Antigen. Quelle: https://www.addgene.org/63586/

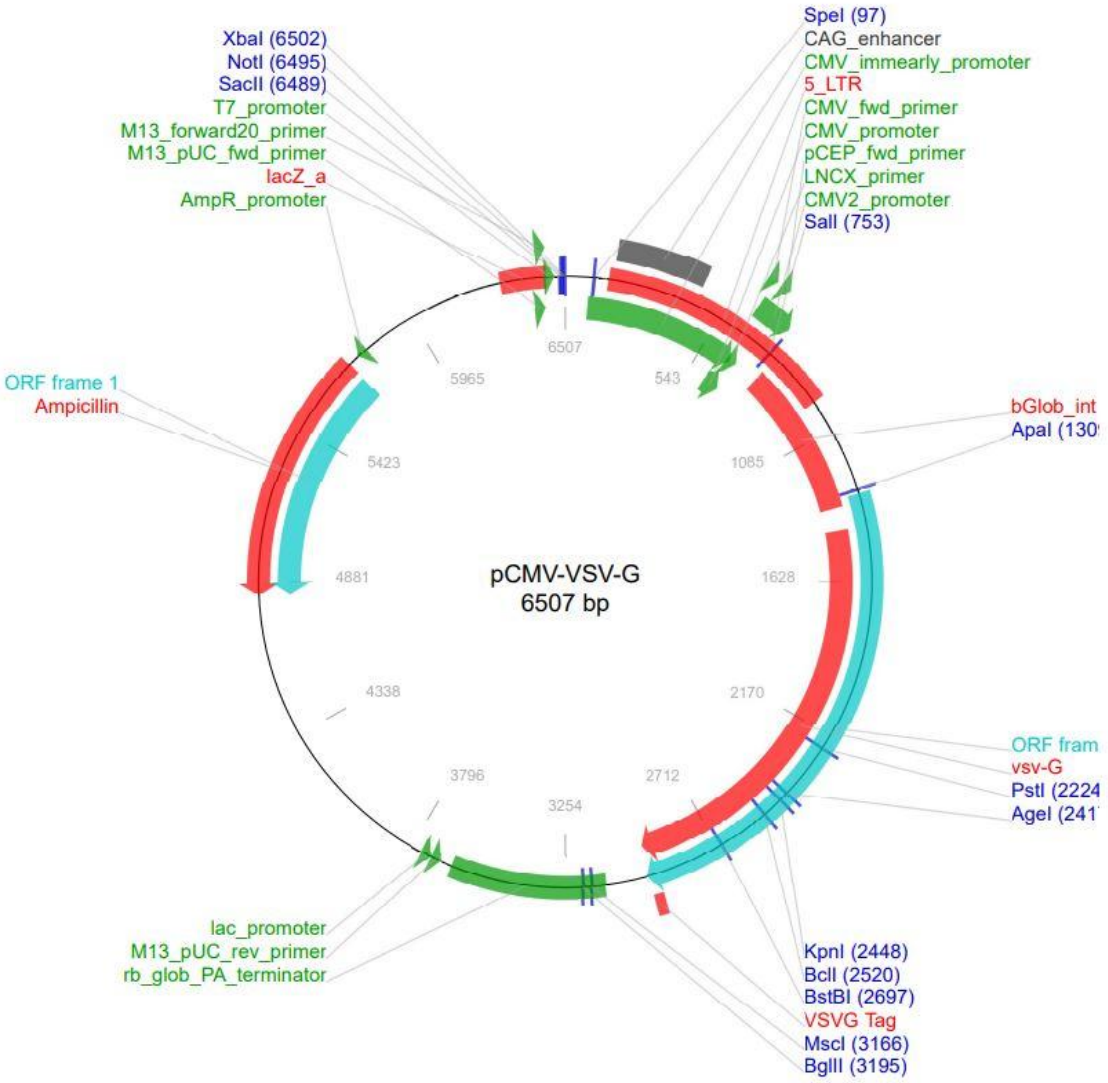

Abbildung 38: Schematische Darstellung des pCMV-VSV-G-Vektors. Die Expression von VSV-G wird durch den CMV und T7 Promotor kontrolliert. Die Expression der Ampicillin Resistenz wird durch den AmpR-Promotor kontrolliert. Um das Plasmid sind die Restriktionsstellen mit dem Namen der entsprechenden Enzyme dargestellt. AmpR: Ampicillin-, Carbenicillin und andere verwandte Antibiotika-Resistenzen; CAP: Katabolieaktivatorprotein; CMV: Zytomegalievirus; lac: β-Galactosidase; ori: Replikationsursprung (=*origin of replication*); VSV-G: *Vesicular stomatitis virus Glykorprotein.* Quelle: https://www.addgene.org/8454/

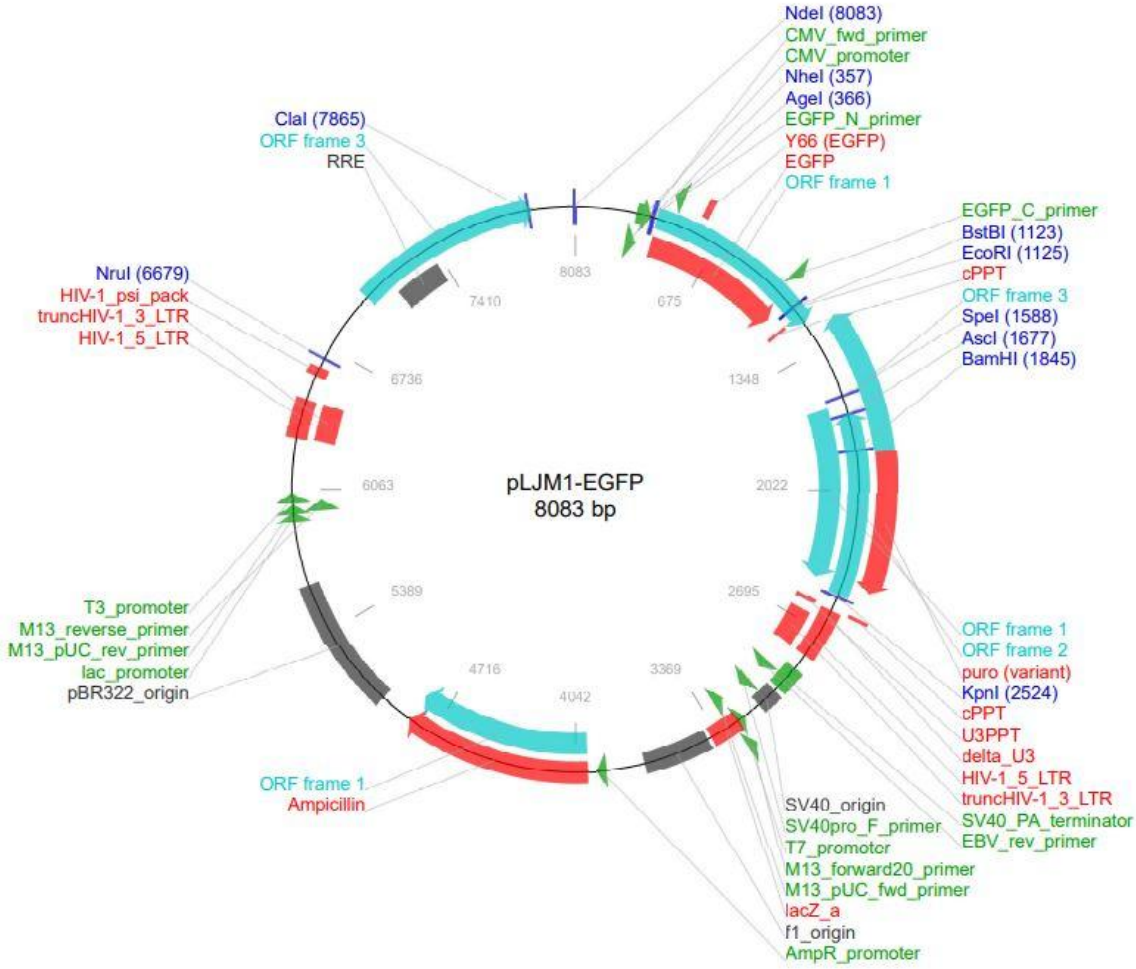

Abbildung 39: Schematische Darstellung des pLMJ1-EGFP-Vektors. Die Expression von pLJM1-eGFP wird durch ein laktose operon kontrolliert. M13 *forward und reverse*: Sequenz aus M13-Phagen, die für die Sequenzierung genutzt wird; Ampicilin: Ampicillin Resistenz; puro (*variant):* Puromycin Resistenz.
Quelle: https://www.addgene.org/78629/

CGCCATTCTGCCTGGGGACGTCGGAGCAAGCTTGATTTAGGTGACACTATAGAATACAAGCTACTTGTT
CTTTTTGCAGGATCCCATCGATTCGAATTCAAGGATCAACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGGACCA
TGGTGAGC
Primer GFP F1 →
AAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACG
GCCACAA
← Primer GFP R1
GTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCT
GCACCAC

CGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCA
GCCGCTAC
Primer GFP F2 →
CCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCG
CACCATCT

TCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTG
AACCGCA

TCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACT
ACAAC

AGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCC
ACAACA

TCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCC
CCGTGCTGC
Primer GFP F3 →
TGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGAT
CACATGGT
← Primer GFP R3
CCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGGCGGTG
GAAGATC

TGGGAATTCAAGGCCTCTCGAGCCTCTAGATTCTGCAGCCCTATAGCACCCAGCTTTCTTGTACAAAGT
GGGGGATCCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACTAGAATGCAGTGAAAAAA
ATGCTTTATTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACA
ACAACAATTGC

Abbildung 40: Nukleotidsequenz des EGFP. Dargestellt ist die EGFP (enhanced green fluorescent protein) kodierende Region (schwarz) des Addgene-Plasmids pLJM1-EGFP. Andere Sequenzen des Vektors sind in grau dargestellt. Die Bindestellen für die Primer GFP F1, F2 und F3 (rot) sowie R1 und R3 (blau) sind angegeben. - Download 17.05.2024: https://www.addgene.org/176015/sequences/

10	20	30	40	50
MVSKGEELFT	GVVPILVELD	GDVNGHKFSV	SGEGEGDATY	GKLTLKFICT
TGKLPVPWPT	LVTTLTYGVQ	CFSRYPDHMK	QHDFFKSAMP	EGYVQERTIF
FKDDGNYKTR	AEVKFEGDTL	VNRIELKGID	FKEDGNILGH	KLEYNYNSHN
VYIMADKQKN	GIKVNFKIRH	NIEDGSVQLA	DHYQQNTPIG	DGPVLLPDNH
YLSTQSALSK	DPNEKRDHMV	LLEFVTAAGI	TLGMDELYK	

Abbildung 41: Aminosäuresequenz des EGFP. (Einbuchstaben-Code). EGFP: *enhanced green fluorescent protein*. Download 17.05.2024: https://www.fpbase.org/protein/egfp/

PPARa – 468 AA – Transkript 10118 NT

MVDTESPLCPLSPLEAGDLESPLSEEFLQEMGNIQEISQSIGEDSSGSFGFTEYQYLGSCPGSDGSVIT
DTLSPASSPSSVTYPVVPGSVDESPSGALNIE**CRIC**GDKASGYHYGVHA**CEGCK**GFFRRTIRLKLVYDK
CDRSCKIQKKNRNKCQYCRFHKCLSVGMSHNAIRFGRMPRSEKAKLKAEILTCEHDIEDSETADLKSLA
KRIYEAYLKNFNMNKVKARVILSGKASNNPPFVIHDMETLCMAEKTLVAKLVANGIQNKEAEVRIFHCC
QCTSVETVTELTEFAKAIPGFANLDLNDQVTLLKYGVYEAIFAMLSSVMNKDGMLVAYGNGFITREFLK
SLRKPFCDIMEPKFDFAMKFNALELDDSDISLFVAAIICCGDRPGLLNVGHIEKMQEGIVHVLRLHLQS
NHPDDIFLFPKLLQKMADLRQLVTEHAQLVQIIKKTESDAALHPLLQEIYRDMY

PPARa – 468 AA – Transkript 1558 NT

MVDTESPLCPLSPLEAGDLESPLSEEFLQEMGNIQEISQSIGEDSSGSFGFTEYQYLGSCPGSDGSVIT
DTLSPASSPSSVTYPVVPGSVDESPSGALNIE**CRIC**GDKASGYHYGVHA**CEGCK**GFFRRTIRLKLVYDK
CDRSCKIQKKNRNKCQYCRFHKCLSVGMSHNAIRFGRMPRSEKAKLKAEILTCEHDIEDSETADLKSLA
KRIYEAYLKNFNMNKVKARVILSGKASNNPPFVIHDMETLCMAEKTLVAKLVANGIQNKEAEVRIFHCC
QCTSVETVTELTEFAKAIPGFANLDLNDQVTLLKYGVYEAIFAMLSSVMNKDGMLVAYGNGFITREFLK
SLRKPFCDIMEPKFDFAMKFNALELDDSDISLFVAAIICCGDRPGLLNVGHIEKMQEGIVHVLRLHLQS
NHPDDIFLFPKLLQKMADLRQLVTEHAQLVQIIKKTESDAALHPLLQEIYRDMY

PPARa - 133 AA – Transkript 572

MVDTESPLCPLSPLEAGDLESPLSEEFLQEMGNIQEISQSIGEDSSGSFGFTEYQYLGSCPGSDGSVIT
DTLSPASSPSSVTYPVVPGSVDESPSGALNIE**CRIC**GDKASGYHYGVHA**CEGCK**VEGSWNRAWW

PPARa – 69 AA – Transkript 531 NT

MVDTESPLCPLSPLEAGDLESPLSEEFLQEMGNIQEISQSIGEDSSGSFGFTEYQYLGSCPGSDGSVIT

PPARa – 9 AA – Transkript 368 NT

MVDTESPLC

Abbildung 42: Zusammenstellung von bekannten PPARA Transkripten, die für Proteine kodieren.AA, Anzahl der Aminosäurereste; NT, Anzahl der Nukleotide. Der Bereich mit den vier Cysteinyl-Paaren, die das Zink-Ion komplex binden sind fett gedruckt, die Region des ersten Zinkfingers ist unterstrichen. Die P-Box ist Gelb hervorgehoben; Aminosäurereste sind im Einbuchstaben-Code angegeben. Quelle ENSEMBL *genome browser* Download: 05.06.2024 https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence_Protein?db=core;g=ENSG00000186951;r=22:46150552-46198591;t=ENST00000407236

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

im Hause

nachrichtlich:
Herrn Prof. Tronnier
Direktor der Klinik für Neurochirurgie

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

Datum: 27.06.2008
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
(Theologin)
☒ Prof. Dr. Borck
(Medizin- und Wissenschaftsgeschichte

☒ Frau H. Müller
(Pflege)
☒ Prof. Wassel
(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)

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

Danksagungen

Zuallererst gebührt mein Dank Frau Privatdozentin Dr. rer. nat. Christina Zechel für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung dieser Dissertation. Ich bedanke mich für die Unterstützung, sowohl in den theoretischen als auch praktischen Phasen dieser Arbeit.

Außerdem bedanke ich mich bei Prof. Dr. med. Volker Tronnier, ehemaliger Direktor der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Lübeck, dafür, dass ich meine Dissertation im Labor für experimentelle Neuroonkologie durchführen konnte.

Bei allen Mitarbeitern des Neuroonkologischen Labors bedanke ich mich für die herzliche Aufnahme und gute Zusammenarbeit. Außerdem bedanke mich bei Frau Edith Pawlak und Frau Susanne Behling für die technische Unterstützung bei der Arbeit im Labor.

Ich möchte mich ebenfalls bei Prof. Dr. Hiort und Dr. Werner für die Bereitstellung des Genetic Analyzers zur Durchführung der Sanger-Sequenzierung bedanken.

Zuletzt danke ich meinen Eltern, meinem Bruder und meinen Freunden für die Begleitung und Unterstützung während meines akademischen Werdeganges.

Versicherung an Eides statt

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich diese Dissertation eigenständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen als die in der Arbeit genannten Hilfen oder Hilfsmittel in Anspruch genommen habe. Textabschnitte und Zitate, die ich wörtlich oder inhaltlich übernommen habe, wurden von mir nach bestem Wissen und Gewissen als solche gekennzeichnet.
Ich versichere, dass ich an keiner anderen Stelle einen Antrag auf Zulassung zur Promotion gestellt, diese Dissertation vorgelegt oder mich einem Promotionsverfahren unterzogen habe.

Hamburg, den 16.08.2025