

Aus der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg

Direktor: Prof. Dr. med. Ralf-Ingo Ernestus

Veränderungen im MGMT-Status von humanen Glioblastomzelllinien

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Johanna Müller-Ritz
aus Würzburg

Würzburg, Oktober 2017

Referent: Priv.-Doz. Dr. Carsten Hagemann
Koreferent: Prof. Dr. med. Matthias Eyrich
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch
Berichterstatter: Prof. Dr. med. Ingo Klein

Tag der mündlichen Prüfung: 12.06.2018

Die Promovendin ist Zahnärztin

Für meinen Mann Ulrich

Für meine Eltern Brigitte und Rudolf

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Glioblastoma multiforme	1
1.1.1 Definition und Einteilung astrozytärer Gliome	1
1.1.2 Molekulare Marker	2
1.1.2.1 IDH1 und IDH2	3
1.1.2.2 ATRX und 1p/19q	4
1.1.3 Therapie und Prognose	5
1.2.4 Wirkmechanismus von Temozolomid	7
1.2.5 DNA-Reparatur durch die O ⁶ -Methylguanin-Methyltransferase (MGMT)	8
1.2.6 Zielsetzung meiner Arbeit	10
2 Material und Methoden	12
2.1 Arbeitsmaterial	12
2.1.1 Laborgeräte	12
2.1.2 Chemikalien	13
2.1.3 Behälter, Reaktionsgefäße und Verbrauchsmaterial	14
2.1.4 Kits	15
2.1.5 Zellkulturmaterial	15
2.1.6 Größenmarker für Proteine	15
2.1.7 Zelllinien	15
2.1.8 Antikörper	16
2.1.9 Sonden	16
2.1.10 Primer für HRM	16
2.1.11 Software	16
2.1.12 Lösungen und Medien	16
2.2 Methoden	20
2.2.1 Zellkultur	20
2.2.2 Splitten der Zelllinien/Passagieren	20
2.2.3 Zellzählung in der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	20
2.2.4 Kolonietests nach Bestrahlung der Zelllinien U87 und U138	21

2.2.5 Bestrahlung der Zelllinien U87 und U138 aufgrund der Kolonietests	23
2.2.6 Fraktionierte Bestrahlung	23
2.2.7 DNA/RNA/Protein Aufreinigung mit TRIzol	24
2.2.8 gDNA Aufreinigung mit dem NucleoSpin Kit von Macherey Nagel	25
2.2.9 RNA/Protein Aufreinigung mit dem NucleoSpin Kit von Macherey Nagel	26
2.2.10 High Resolution Melting (HRM)	27
2.2.11 cDNA-Synthese	29
2.2.12 Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)	30
2.2.13 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot	32
3 Ergebnisse	34
3.1 Kolonietests der Zelllinien U87 und U138	35
3.2 Bestrahlungsversuch mit 2 Gy und 5 Gy	37
3.2.1 MGMT-Promotormethylierung nach Bestrahlung mit 2 Gy und 5 Gy	37
3.2.2 MGMT-Proteinexpression nach Bestrahlung mit 2 Gy und 5 Gy	39
3.3 Fraktionierte Bestrahlung	41
3.3.1 Morphologie der Zellen U87 und U138 nach 5 Tagen Bestrahlung	41
3.3.2 MGMT-Promotormethylierung nach 5 Tagen fraktionierter Bestrahlung mit 2 Gy	43
3.3.3 MGMT-mRNA-Expression nach 5 Tagen fraktionierter Bestrahlung mit 2 Gy	46
3.3.4 MGMT-Proteinexpression nach 5 Tagen Bestrahlung	47
4 Diskussion	49
4.1 Ausblick	52
5 Zusammenfassung	53
6 Verzeichnisse	54
6.1 Abkürzungsverzeichnis	54
6.2 Tabellenverzeichnis	56

6.3 Abbildungsverzeichnis.....	57
6.4 Literaturverzeichnis	58
Danksagung	64
Lebenslauf	65

1 Einleitung

1.1 Glioblastoma multiforme

1.1.1 Definition und Einteilung astrozytärer Gliome

Das Glioblastom (GBM) zählt zu den diffusen Gliomen und gehört zur Gruppe der Astrozytome, die für zwei Drittel aller Tumoren glialen Ursprungs verantwortlich sind. Sie entwickeln sich aus dem Zelltyp der Astrozyten, die Vertreter der zentralen Makroglia sind. Diese entstammt dem Ektoderm und beinhaltet außerdem die Oligodendrozyten sowie die Ependymzellen, welche die inneren Liquorräume auskleiden (Feiden, 11. Auflage 2008).

GBM sind die häufigsten malignen intrakraniellen Tumoren beim Erwachsenen. Die Inzidenz für GBM in der westlichen Welt variiert zwischen 0,59 und 3,69 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohnern (Ostrom et al., 2015). Erste Symptome sind Persönlichkeitsveränderungen, epileptische Anfälle und Lähmungserscheinungen, gefolgt von Hirndruckzeichen wie Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen (Ohgaki & Kleihues, 2013).

Es wird in primäre und sekundäre GBM unterschieden, da sie sich in der Altersverteilung und der Pathogenese deutlich voneinander abheben.

Das primäre GBM ist der vorherrschende GBM-Typ und bildet sich bevorzugt in den Großhirnhemisphären und im Frontotemporallappen. Dabei entsteht es mit sehr kurzer Anamnese *de novo* ohne maligne Vorstufen (Ohgaki & Kleihues, 2013). Die häufigsten Erkrankungszeiten werden in der Altersgruppe zwischen 50 und 70 (im Mittel 62) Jahren beobachtet, wobei Männer häufiger betroffen sind als Frauen und Menschen mit weißer Hautfarbe doppelt so oft, wie Schwarze oder Asiaten (Ohgaki, 2009). Beim sekundären GBM liegt das Durchschnittsalter dagegen bei 45 Jahren. Es entwickelt sich über Jahre aus einem diffusen Astrozytom Grad 2, mit dem anaplastischen Astrozytom Grad 3 als Zwischenstufe (Ohgaki & Kleihues, 2009).

Diese von der *World Health Organization (WHO)* eingeführte Graduierung sagt etwas über die Malignität des Tumors aus. Dafür werden vorwiegend histologische

Charakteristika wie die zelluläre Differenzierung des Tumorgewebes, die Tumorzelldichte, nukleäre Polymorphien, Kernatypien, mitotische Aktivität, Endothelproliferate sowie das Auftreten nekrotischer Areale berücksichtigt (Masuhr, Neumann, 6. Auflage 2007).

Den histopathologischen Eigenschaften entsprechend teilt die WHO 4 Grade ein:

Grad 1 Tumoren sind gut abgegrenzt, zeigen selten eine maligne Progression, weisen eine geringe Proliferationsrate auf und können zumeist vollständig reseziert und geheilt werden.

Grad 2 Tumoren wachsen infiltrativ und neigen trotz langsamen Wachstums zu Rezidiven und zur malignen Progression. Sie weisen eine erhöhte zelluläre und nukleäre Polymorphie auf. Das niedriggradige diffuse Astrozytom gehört dieser Gruppe an.

Grad 3 Tumoren weisen histologisch deutliche Zeichen der Malignität auf. Sie sind anaplastisch und zeigen eine starke Proliferationsrate. Dazu zählt man das anaplastische Astrozytom.

Grad 4 Tumoren sind hochmaligne, wachsen schnell infiltrativ, weisen ausgeprägte Tumorgewebsnekrosen sowie ausgeprägte Anaplasien und Gefäßproliferate auf (Louis et al., 2016). Hierzu gehört das GBM.

1.1.2 Molekulare Marker

Bei der Neuauflage der Klassifikation von Gliomen der WHO im Jahr 2016 (Louis et al., 2016) wurden auch molekulargenetische Faktoren berücksichtigt. So wird nun auch die nukleäre Expression des x-chromosomalen Alphathalassämietardierungsgens (ATRX), die Deletion der Chromosomenarme 1p und 19q, der Methylierungsstatus des O⁶-Methylguanin-Methyltransferase-(MGMT-) Genpromotors und als wichtigster Parameter der Mutationsstatus der Isocitratdehydrogenase (IDH) 1 und 2 für die Einteilung und Graduierung der Gliome herangezogen (Abbildung 1).

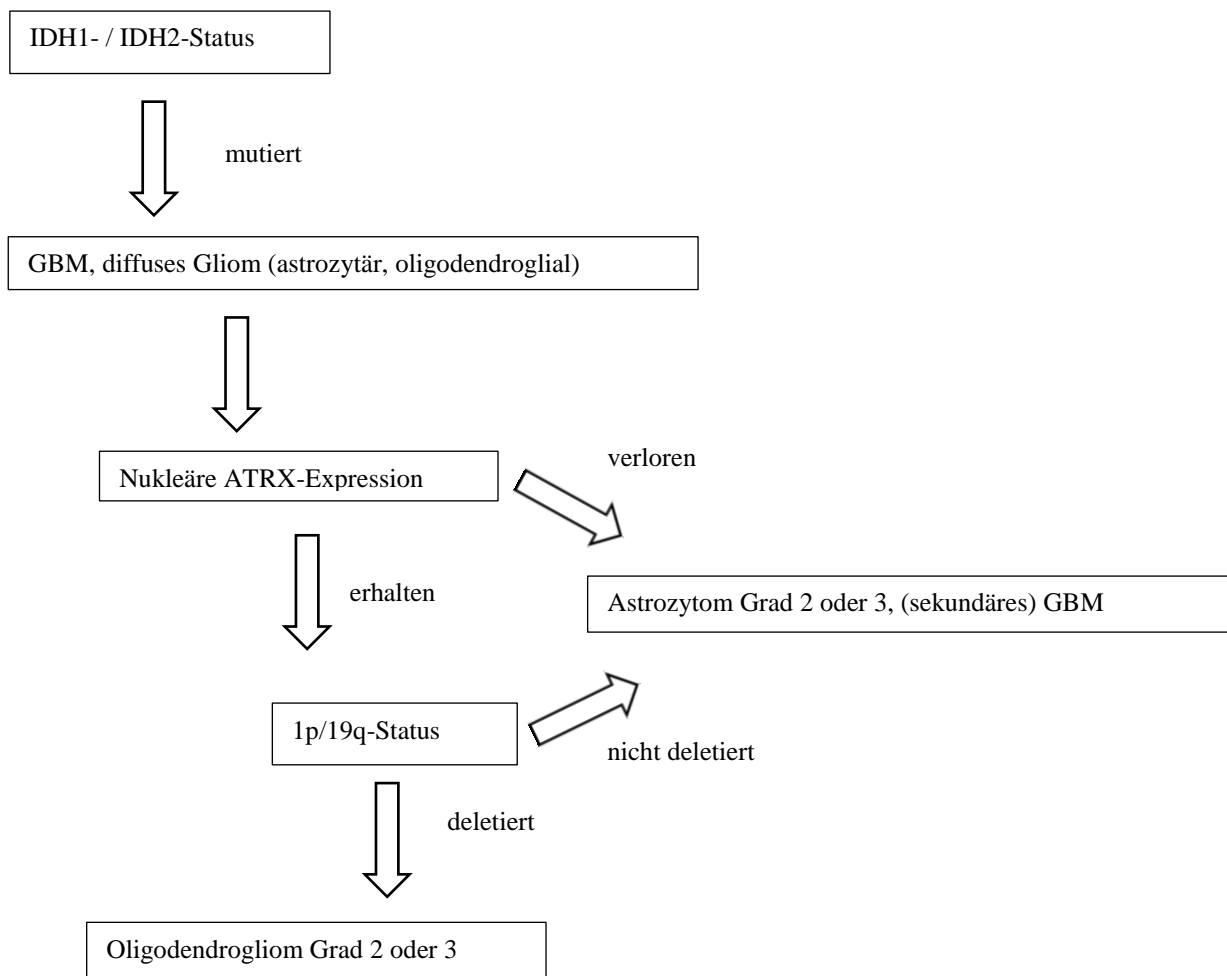


Abbildung 1: Diagnostisch wichtige Marker bei Gliomen (modifiziert nach Capper & Reifenberger, 2015)

1.1.2.1 IDH1 und IDH2

Die Isocitratdehydrogenase ist ein Stoffwechsellenzym, welches im Citratzyklus die Decarboxylierung von Isocitrat zu α -Ketoglutarat bei gleichzeitiger Gewinnung von NADPH katalysiert. Während IDH1 im Zytoplasma und in den Peroxisomen eukaryotischer Zellen vorliegt, wird IDH2 in den Mitochondrien gefunden (Karsy et al., 2017). In 12 % aller diagnostizierten GBM (Yan et al., 2009) ist IDH1 oder IDH2 mutiert, wobei die häufigste Mutation der durch IDH1 katalysierte Austausch von Arginin 132 durch Histidin (IDH1 R172H) ist.

Bei IDH2 findet sich vorwiegend die Mutation IDH2 R172K, also der Austausch von Arginin 172 durch Lysin. Interessanterweise sind von diesen Mutationen nur 5 % der

primären GBM betroffen, wogegen sie in bis zu 80 % der sekundären GBM als sehr frühe genetische Veränderungen auftreten (Dang et al., 2009).

Die Mutation führt zu einem Verlust der normalen Enzymaktivität, so dass statt α -Ketoglutarat vermehrt 2-Hydroxyglutarat gebildet wird. Dieses hemmt verschiedene Histon-Demethylasen und DNA-Hydroxylasen, wodurch es zu Hypermethylierungen Cytosin-phosphatidyl-Guanin (CpG) reicher Genpromotoren (CIMP) kommt. Methylierungen solcher CpG-Inseln bewirken epigenetisch die Stilllegung bzw. Abschaltung von Genen (Capper & Reifenberger, 2015) (Xu W et al., 2011). Darunter sind auch solche Gene, deren Verlust für die Tumorgenese essentiell ist. Daher stellen IDH-Mutationen wahrscheinlich das initiale genetische Ereignis für die Entstehung diffuser Gliome dar (Capper & Reifenberger, 2015).

1.1.2.2 ATRX und 1p/19q

Das vom ATRX-Gen codierte gleichnamige Enzym gehört zur Familie der DNA-Helikasen. Es katalysiert unter anderem den Einbau von Histon H3.3 Monomeren in Chromatinmoleküle und trägt so zur Aufrechterhaltung der Telomere am Chromatidenende bei (Karsy et al., 2017).

Telomere bestehen aus sich wiederholenden Tandemhexanukleotiden mit der Basenabfolge TTAGGG. In gesunden Zellen verkürzen sie sich mit jeder Zellteilung, bis schließlich die Apoptose eingeleitet wird. Tumorzellen dagegen haben Mechanismen entwickelt, um Telomere so lange wie möglich aufrechtzuerhalten und die Apoptose hinauszuzögern. Im GBM ist das vor allem der ALT-Phänotyp (alternative Telomerverlängerung), der hier häufig mit inaktivierenden Mutationen von ATRX assoziiert ist (Bush & Butowski, 2017). Cai et al. konnten außerdem zeigen, dass niedrige ATRX-Level eng im Zusammenhang mit dem Auftreten von CIMP und dessen oben genannten Folgen stehen (Cai et al., 2015).

ATRX-Verluste findet man bei 57 % der sekundären GBMs (Karsy et al., 2017). Es ist somit ein wichtiger Marker zur Differenzierung zwischen primären und sekundären GBMs (Bush & Butowski, 2017). Weiterhin tritt ein Verlust von ATRX fast ausschließlich in Tumoren ohne 1p19q Deletion auf. Diese Deletion beschreibt den

Verlust der Chromosomenarme 1p und 19q durch balancierte Translokation zwischen den Chromosomen 1 und 19 mit nachfolgendem Verlust eines der beiden Derivatchromosomen (Capper & Reifenberger, 2015). Sie tritt nur bei oligodendroglialen Tumoren auf und ist fast ausschließlich mit IDH-Mutationen vergesellschaftet (Reuss et al., 2015). Eine 1p/19q-Testung empfiehlt sich deshalb nicht nur für histologisch oligodendrogliale Tumoren, sondern für alle IDH-mutierten Gliome, die immunhistochemisch keinen eindeutigen Verlust der nukleären ATRX-Expression zeigen (Capper & Reifenberger, 2015).

1.1.3 Therapie und Prognose

Ohne Therapie überleben GBM-Patienten nur wenige Wochen. An erster Stelle der Behandlung steht die möglichst komplette operative Entfernung des Tumors. Obwohl dies vor allem auf eine Druckentlastung des Gehirns und die histologische Sicherung des Tumorgewebes abzielt, wird dadurch das mediane Überleben der Patienten auf wenige Monate verlängert.

Eine vollständige Entfernung des Tumorgewebes ist nahezu unmöglich, da sich GBM-Zellen über eine infiltrative Randzone diffus in die angrenzenden Hirnbereiche ausbreiten. Einzelne Tumorzellen scheinen an Strängen der weißen Gehirnmasse entlang in weitentfernte Hirnareale zu wandern, so dass GBM-Zellen über das Gehirn verteilt gefunden werden können und das GBM daher als systemische Erkrankung des Gehirns zu werten ist (Sahm et al., 2012).

Die Einführung der fluoreszierenden 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) brachte einen Fortschritt bei der OP. 5-ALA ist eine Vorstufe des Häm in der Porphyrinsynthese. Es wird präoperativ verabreicht und reichert sich, zu Protoporphyrin IX verstoffwechselt, im Tumorgewebe stärker an als in nicht tumörösem Gewebe. Unter ultraviolettem (UV) Licht ist eine rote Fluoreszenz der Tumorzellen zwischen 635 nm und 704 nm sichtbar, während gesunde Hirnmasse blau erscheint. (Stummer et al., 2000). Die Verwendung von 5-ALA führte zu signifikant höheren Raten an Kompletresektionen (Zhao et al., 2013).

An zweiter Stelle der Therapie steht die Bestrahlung des GBM. Zunächst als Ganzhirnbestrahlung mit einer Gesamtdosis von 60 Gy eingeführt (Walker et al., 1979), konnte schon bald festgestellt werden, dass eine partielle Bestrahlung des Tumorbereiches genauso wirksam ist (Garden et al., 1991). Heute wird mit 2 Gy an 5 aufeinanderfolgenden Tagen über 6 Wochen fraktioniert bestrahlt. Zusammen mit der OP konnte so eine mediane Überlebensrate von 12,1 Monaten erreicht werden (Laperriere et al, 2002).

Der letzte größere Durchbruch der Therapie des GBM war die Entdeckung des Chemotherapeutikums Temozolomid (TMZ) (Newlands et al., 1992).

In einer Phase 3 Studie mit 573 Personen zur Wirkung von TMZ bei neu diagnostizierten Gliomen gab es zwei Gruppen. Die Kontrollgruppe (286 Patienten) unterzog sich nach erfolgreicher OP einer alleinigen Radiotherapie, die aus einer fraktionierten Bestrahlung des Tumors mit 2 Gy an 5 aufeinanderfolgenden Tagen für 6 Wochen bestand, entsprechend einer Gesamtdosis von 60 Gy. Die andere Gruppe (287 Patienten) unterzog sich nach erfolgter OP einer kombinierten Radiochemotherapie mit anschließender TMZ-Monotherapie nach folgendem Schema:

Konkomitant zur fraktionierten Bestrahlung nach Vorbild der Kontrollgruppe, wurde den Patienten für 42-49 Tage TMZ in einer Dosierung von 75 mg/m² Körperoberfläche verabreicht. Vier Wochen nach Beendigung der Radiochemotherapie folgte eine TMZ-Monotherapie.

Im 1. Zyklus dieser Monotherapie nahmen die Patienten TMZ in einer Konzentration von 150 mg/m² über fünf Tage ein, gefolgt von 23 Tagen Pause. Ab dem 2. Zyklus wurde die Dosis auf 200 mg/m² erhöht, dieser erfolgte ebenfalls über fünf Tage mit anschließenden 23 Tagen Pause. Bis zu 6 Zyklen wurden so durchgeführt. Die mediane Überlebensrate der Kontrollgruppe betrug 12,1 Monate während die andere Gruppe im Median 14,6 Monate lang überlebte. Seitdem besteht die Standardtherapie aus OP, Bestrahlung mit konkomitanter TMZ-Chemotherapie und anschließender adjuvanter TMZ-Monotherapie (Stupp et al., 2005), (Stupp et al., 2009), (van den Bent et al., 2006).

Ein vielversprechender neuer Therapieansatz sind die sogenannten Tumortheraiefelder (TTFields). Hierbei handelt es sich um elektromagnetische Wechselstromfelder mit intermediärer Frequenz (100-300 kHz) und niedriger Intensität (1-3 V/cm). Den Patienten werden die TTFields durch auf den rasierten Kopf platzierte Keramikelektroden appliziert.

Eine multizentrische internationale Studie konnte die Wirksamkeit von TTFields in Verbindung mit der Standardtherapie nachweisen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 15,1 Monaten betrug das mediane Gesamtüberleben der Behandlungsgruppe 20,5 Monate und auch die 2-Jahresüberlebensraten konnten signifikant gesteigert werden (Stupp et al., 2015).

Dabei gab es außer Hautirritationen durch den Klebstoff, mit dem die Elektroden befestigt werden, keine Nebenwirkungen. Wahrscheinlich wirken TTFields auf Moleküle, die für die Zellteilung essentiell sind und können so den Zelltod auslösen. Dabei haben sie keine Wirkung auf Zellen, die sich nicht in der Mitose befinden, lösen keine Depolarisation der Zellmembran aus und bewirken daher auch keine Muskel- oder Nervstimulation (Hottinger et al., 2016). TTFields könnten also in naher Zukunft Teil der Standardtherapie werden (Stupp et al., 2015).

1.2.4 Wirkmechanismus von Temozolomid

Wie oben beschrieben ist TMZ ein zentraler Pfeiler der GBM-Therapie. TMZ ist ein kleines, 194 Da messendes, lipophiles Molekül mit DNA alkylierenden Eigenschaften und nach oraler Gabe einer Bioverfügbarkeit von annähernd 100 %. Seine Plasmahalbwertszeit beträgt 1,8 h bei einem pH-Wert von 7,4. Es besitzt eine sehr gute Penetrationsfähigkeit der Blut-Hirn-Schranke, so dass es selbst bei intakter Blut-Hirn-Schranke gut in das Gehirn übertreten kann.

Es handelt sich um eine Prodrug, die bei physiologischem pH-Wert in das zytotoxisch wirksame 5-(3-Methyltriazin-1-yl)imidazol-4-carboxamid (MTIC) hydrolysiert wird. MTIC wiederum reagiert mit Wasser zu 5-Aminoimidazol-4-carboxamid (AIC) und das hochreaktive Methyldiazoniumkation (Abbildung 2). Dieses Kation methyliert DNA an der O⁶-Position und N⁷-Position des Guanins sowie an der N³-Position des Adenins. Der zytotoxische Effekt beruht auf der Entstehung des O⁶-Methylguanins, welches sich

während der DNA-Replikation mit der Base Thymin fehlpaart und nicht korrekt an Cytosin anlagert.

Diese Fehlpaarung alarmiert die DNA-Mismatchreparatur. Sie erkennt das falsch eingebaute Thymin im Tochterstrang und entfernt es. Das O⁶-Methylguanin verbleibt jedoch im Templatestrang, so dass erneut fälschlicherweise Thymin eingebaut wird. Folglich kommt es immer wieder zur Entfernung des Thymins aufgrund wiederholter Fehlpaarung. Nach einigen Zyklen der Basenexzisionsreparatur ist die Reparaturfähigkeit der DNA-Mismatchreparaturenzyme erschöpft. Es entstehen DNA-Doppelstrangbrüche, die schließlich zum Zelltod führen (Zhang et al., 2012).

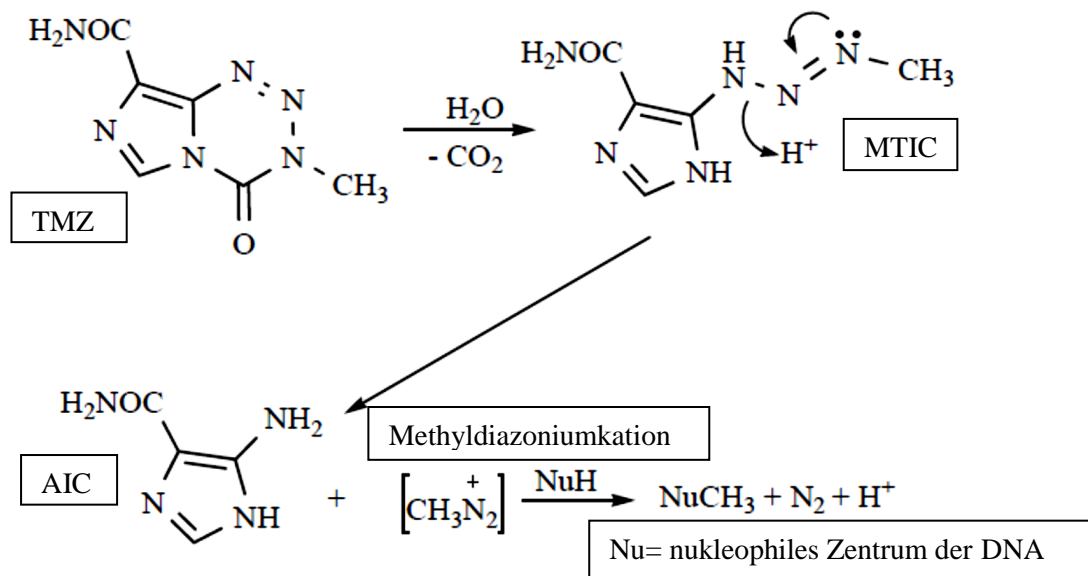


Abbildung 2: Struktur und Aktivierungsweg der Prodrug TMZ (modifiziert nach Zhang et al. 2012. TMZ = Temozolomid, MTIC = 5-(3-Methyltriazen-1-yl)imidazol-4-carboxamid, AIC = 5-Aminoimidazol-4-carboxamid

1.2.5 DNA-Reparatur durch die O⁶-Methylguanin-Methyltransferase (MGMT)

Hegi et al. konnten nachweisen, dass TMZ nicht bei allen Patienten gleich gut wirkt (Abbildung 3). Es gibt 2 Patientengruppen, die sich in der MGMT-Expression unterscheiden. Die erste Patientengruppe besitzt einen methylierten Genpromotor und exprimiert kein MGMT, während der Promotor der 2. Gruppe unmethyliert war und MGMT exprimiert wurde. Beide Gruppen unterzogen sich der Standardtherapie nach dem Stupp-Schema. Die Überlebensrate nach 18 Monaten betrug in dieser Phase 2

Studie 62 % für die Gruppe mit methyliertem MGMT-Promotor aber nur 8 % in der Gruppe mit unmethyliertem MGMT-Promotor (Hegi et al., 2005) (Hegi et al., 2004).

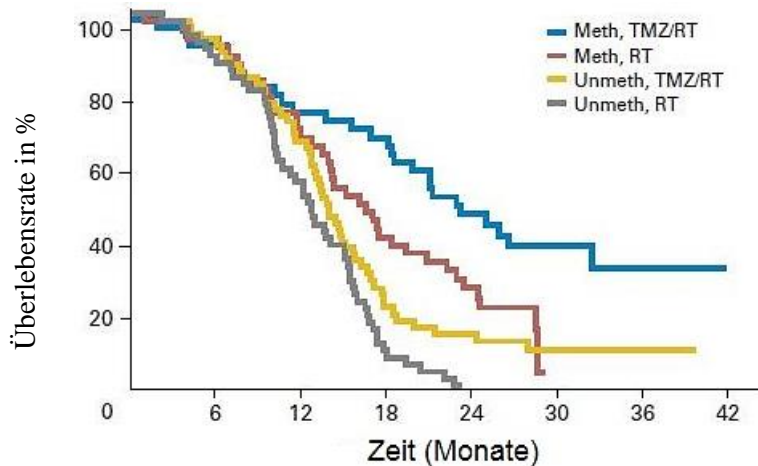


Abbildung 3: Kaplan-Meier-Analyse der Überlebensrate abhängig vom MGMT-Methylierungsstatus. Blaue Kurve: *Meth, TMZ/RT*, Patientengruppe mit methyliertem Promotor und Radiochemotherapie. Rote Kurve: *Meth, RT*, Patientengruppe mit methyliertem Promotor und alleiniger Radiotherapie. Gelbe Kurve: *Unmeth, TMZ/RT*, Patientengruppe mit unmethyliertem Promotor und Radiochemotherapie. Graue Kurve: *Unmeth, RT*, Patientengruppe mit unmethyliertem Promotor und alleiniger Radiotherapie (Hegi et al., 2008).

In einer anderen Studie wurde bestimmt, ob der Methylierungsgrad des MGMT-Promotors Einfluss auf das mediane Überleben hat. Dafür wurde bei 105 Patienten, die sich der Standardtherapie unterzogen bestimmt, zu welchem Anteil die jeweiligen CpG-Inseln des MGMT-Promotors methyliert waren. Lag der Methylierungsgrad bei 0-9 % galt der Promotor als unmethyliert. 10-29 % galten als geringgradig und 30-100 % als hochgradig methyliert. Die mediane Überlebensrate bei einem unmethylierten Promotor betrug 15,4 Monate, beim niedriggradig methylierten Promotor 12,5 Monate und bei einem hochgradig methylierten Promotor 25,2 Monate (Brigliadori et al., 2016).

MGMT ist ein 23 kDa messendes DNA-Reparaturprotein, das Alkylgruppen von der O⁶-Position des Guanins entfernt. Die entfernte Alkylgruppe wird auf den Cystein145-Rest im aktiven Zentrum der MGMT übertragen (Abb. 4). Es entsteht eine kovalente Bindung, was in einer Autoinaktivierung der MGMT resultiert. Zur Aufnahme einer weiteren Alkylgruppe muss also ein neues MGMT-Molekül synthetisiert werden. Deshalb wird MGMT auch oft als „Selbstmordenzym“ bezeichnet (Kaina et al., 2010).

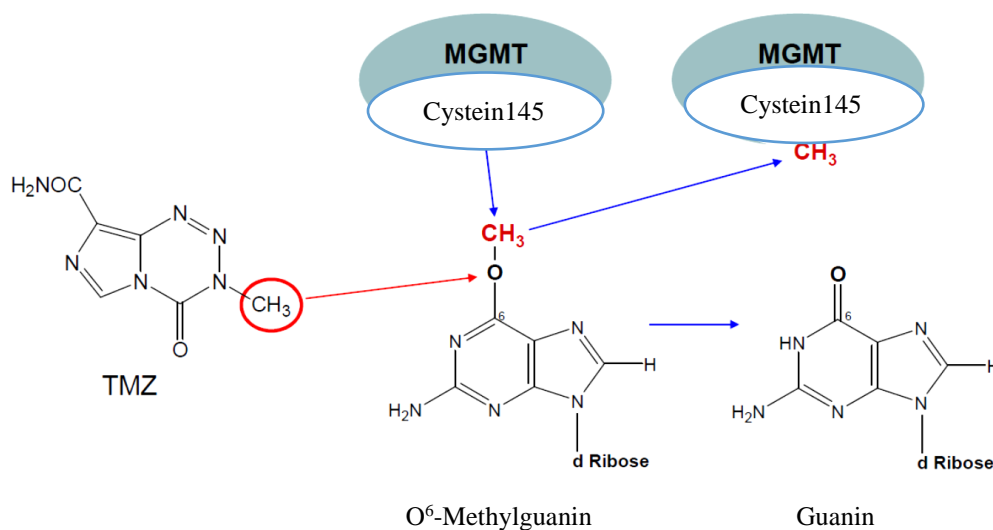


Abbildung 4: Der durch MGMT vermittelte DNA-Reparaturprozess (modifiziert nach Zhang et al. 2012)

Wird MGMT also in Glioblastomzellen exprimiert, bedeutet das eine Resistenz gegenüber alkylierenden Substanzen wie TMZ und die Patienten sprechen weniger gut auf die Therapie an (Zhang et al., 2012). Die Korrelation zwischen Promotormethylierung und das gute Ansprechen auf die Therapie ist somit ein wichtiger und unabhängiger prognostischer Faktor (Felsberg et al., 2009). Die Bestimmung des MGMT-Status ist mittlerweile standardisierter Teil der histopathologischen Staging-Untersuchungen beim GBM (Ferreira et al., 2016).

1.2.6 Zielsetzung meiner Arbeit

Dass sich der MGMT-Methylierungsgrad im Laufe des Lebens ändern kann, wurde in der GBM-Forschung in einigen Fällen beobachtet. So konnte gezeigt werden, dass sich der Primärtumor gegenüber seinem Rezidiv in der MGMT-Promotormethylierung unterscheiden kann, wobei ein Wechsel sowohl von methyliert zu unmethyliert, als auch umgekehrt vorgekommen ist (Parkinson et al., 2008).

Bei Vorarbeiten durch die Promovendin A. Stöbel wurden die GBM-Zelllinien U87 und U138 mit verschiedenen TMZ-Konzentrationen behandelt und auf ihre MGMT-Expression auf mRNA- und Proteinebene untersucht. Grundlage für diese Experimente war eine Beobachtung von Alonso et al., bei der U87-Zellen nach TMZ-Behandlung

eine MGMT-Expression zeigten, was in unbehandeltem Zustand nicht der Fall war (Alonso et al., 2007). Frau Stöbel stellte in ihrer Versuchsreihe fest, dass die Zelllinie U138 MGMT in hohen Konzentrationen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene exprimierte, während U87-Zellen dies nicht taten. Unter TMZ-Behandlung konnte die MGMT-Expression bei U138 sogar noch gesteigert werden, so dass eine Regulierbarkeit angenommen werden kann. Bei den U87-Zellen konnte unter TMZ-Behandlung allerdings keine Veränderung in der Expressionsstärke nachgewiesen werden.

Diese Befunde bildeten die Grundlage meiner Folgeversuche. Dabei stand die Frage im Mittelpunkt, ob Veränderungen im MGMT-Genmethylierungsstatus und in der MGMT-Expression auf mRNA- und Proteinebene therapieinduziert sind und ob sie experimentell in der Zellkultur nachzubilden sind. Wenn das zuträfe, würde es zeigen, dass epigenetische Genregulationen auch kurzfristig auftreten können und es würde erklären, warum es bei manchen Patienten zu einem Wechsel des MGMT-Methylierungsstatus zwischen Primärtumor und Rezidiv kommt. Zum anderen wäre ein Zellkulturmodell etabliert, mit dem man die zugrundeliegenden Mechanismen untersuchen könnte oder mit dem man sogar neue therapeutische Ansätze zur Regulation der MGMT-Expression entwickeln könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Arbeitsmaterial

2.1.1 Laborgeräte

Abzug von Köttermann

Accu Jet Pro von Brand

Accurpette von VWR

Feinwaage von Sartorius

Gefrierschrank -20°C Comfort von Liebherr

Gefrierschrank -80°C von Fryka Kältetechnik

Handzählstück von Hartenstein

Heizblock Thermo Mixer C von Eppendorf

iBlot von Invitrogen

Kühlschrank 4°C FKS 500 Index 10C von Liebherr Profiline

Linearbeschleuniger Primus L von Siemens

Macs Mix Mx001 von Miltenyi Biotec

Magnetrührer MR 3001K von Heidolph

Mikroskop und Kamera DFC 450 C von Leica

Mikroskop von Hundt Wetzlar

Pipetten von Eppendorf und Discovery Comfort

Qubit 2.0 Fluorometer von Life Technologies

Schüttler Rotamax 120 von Heidolph

Sterilwerkbänke Nuaire von Heraeus

Stickstofftank zur Zelllagerung von Messer Griesheim

Thermocycler T3000 von Biometra

Vortex Genie 2 von Scientific Industries

Wasserbad von Hartenstein

XCell Surelock Western Blot System von Invitrogen™

Zählkammer Fuchs-Rosenthal 0,0625 mm² 0,2 mm Tiefe von Hartenstein

Zellkulturschrank Heracell 240 CO₂ incubator von Thermo Scientific

Zentrifuge Biofuge pico von Heraeus

Zentrifuge Mega Star 3.0 R von VWR

Zentrifuge Micro Star 17R von VWR

2.1.2 Chemikalien

0,4 % Trypanblau von Sigma

10 x Reducing Agent NuPage™ von Invitrogen™

100 % Ethanol von Sigma

100 % Isopropanol von Sigma

100 % Methanol von Sigma

100 % methylierte DNA von Life Technologies

20 x 2-(N-Morpholino) Ethansulfonsäure (MES) Puffer von Invitrogen™

4 x Lithiumdodecylsulfat (LDS) Sample Buffer NuPage™ von Invitrogen™

Antioxidant NuPage™ von Invitrogen™

Aqua dest. von Servoprax®

Chloroform von J.T. Baker

Dimethylsulfoxid (DMSO) von Roth

Entwicklerlösung Amersham ECL Western Blotting Analysis System von GE
Healthcare

Essigsäure von Sigma

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) von Sigma

Guanidin Hydrochlorid von Roth

Kristallviolett von Sigma

Magermilchpulver von Roth

Melt Dr. HRM Master Mix von Applied Biosystems

Natriumchlorid (NaCl) von Sigma

Natrium-Citrat von Sigma

Natriumhydroxid (NaOH) von Sigma

Nicht methylierte DNA von Life Technologies

Salzsäure (HCl) von Sigma

Taq Man Gene Expression Master Mix von Applied Biosystems

Temozolomid von Sigma

TRIS-Base und TRIS-Hydrochlorid Puffer von Roth

TRIzol von Life Technologies

Tween 20 von Sigma

Ultra Pure Water von Biochrom

β -Mercaptoethanol von Sigma

2.1.3 Behälter, Reaktionsgefäße und Verbrauchsmaterial

6-Well Platten von Corning®Costar®

75 cm² Zellkulturflaschen von Corning®Costar®

96-Well Platten von Life Technologies

Amersham Hyperfilm ECL RPN 3103 K von GE Healthcare

Bechergläser 50 ml, 100 ml, 1 l, 5 l von Hartenstein

Binding Plate von Life Technologies

Deckgläser 20 x 16 x 0,4 mm von Hartenstein

Elutionsplatte von Life Technologies

iBlot® Transfer Stack, PVDF, regular size von Invitrogen™

Kryoröhrchen von Greiner

Laborfilm Parafilm M von Pechiney Plastic Packaging

Messzylinder Glas 250 ml, 1 l von Hartenstein

Nitrocellulosemembran von Schleicher & Schuell

NuPage 4-12 % Bis-Tris Gel 1 mm x 12 Well von Life Technologies

Petrischalen Nunclon™ Delta surface, Durchmesser 10 cm von Thermo Fisher
Scientific

Pipettenspitzen von Sarstedt

PureLink™ 96 Receiver Plate von Life Technologies

Qubit Assay Reaktionsgefäße von Life Technologies

Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml von Eppendorf

Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml bio-one cellstar von Falcon

Whatman Papier von Whatman

2.1.4 Kits

Cells to CpG Methylated and Unmethylated gDNA Control Kit von Life Technologies

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit von Applied Biosystems

Melt Doctor HRM Kit von Applied Biosystems

NucleoSpin DNA Kit von Macherey Nagel

NucleoSpin RNA/Protein Kit von Macherey Nagel

Qubit dsDNA HS Assay Kit von Life Technologies

Qubit Protein Assay Kit von Life Technologies

Qubit RNA Assay Kit von Life Technologies

2.1.5 Zellkulturmaterial

Dulbecco phosphate buffered saline (PBS) w/o Ca^{2+} , low endotoxin von Biochrom

Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), [+] 1g/l D-Glucose, [+] Pyruvat, [+] L-Glutamin von Gibco

Fetal calf serum (FCS) von Gibco

MEM non essential amino acids (NEAA) von Gibco

Penicillin/Streptomycin von Gibco

Trypsin-EDTA 0,25 %/0,02 % (w/v) in PBS w/o Ca^{2+} w/o Mg^{2+} von Biochrom

2.1.6 Größenmarker für Proteine

SeeBlue Plus 2 prestained Proteinmarker von Invitrogen™

Protein Plus Protein Dual Color Standards von Bio Rad

2.1.7 Zelllinien

Zelllinie	Spezies	Gewebe	Zelltyp	Alter	Geschlecht	Wachstum	Firma
U138	Homo sapiens	Gehirn	Glioblastom	47	Männlich	Monolayer	CLS
U87	Homo sapiens	Gehirn	Glioblastom	44	Weiblich	Monolayer	CLS

2.1.8 Antikörper

Anti-MGMT, monoklonal von Abcam

Anti-mouse IgG HRP from sheep von GE Healthcare

Anti-rabbit IgG HRP from goat von Santa Cruz Biotechnology

Anti- γ -Tubulin, monoklonal von Sigma

2.1.9 Sonden

18S rRNA VIC[®]-MGB von Applied Biosystems

MGMT TaqMan Gene Expression Assays von Applied Biosystems

2.1.10 Primer für HRM

Primer 1: Sequenz 5' – 3': GCGTTTCGGATATGTTGGGATAGT

Primer 2: Sequenz 5' – 3': CCTACAAAACCACTCAAACCTACCA

2.1.11 Software

Origin Version 9 von Origin Lab Corporations

Step One Software Version 2.3 von Thermofisher Scientific

Expression Suite Software Version 1.0.4 von Thermofisher Scientific

GraphPad Prism Version 6 von GraphPad Software, Inc.

2.1.12 Lösungen und Medien

Zellkulturmedium für Zelllinien

500 ml DMEM, [+] 1 g/l D-Glucose, [+] L-Glutamin, [+] Pyruvat

10 ml MEM NEAA

50 ml FCS

2 ml Penicillin/Streptomycin

Für Western-Blot

0,1% TBST:

6,05 g Tris Base

8,77 g NaCl

990 ml Aqua dest. → pH-Wert mit HCl auf 8,0 einstellen

10 ml Tween 20

Blocking solution:

5 g Magermilchpulver in 100 ml 0,1 % TBST

MES Puffer:

250 ml 20 x MES Puffer

4,75 l Aqua dest.

Laufpuffer innere Kammer:

200 ml MES Puffer

500 µl NuPage™ Antioxidant

Für TRIzol Aufreinigung

Resuspensionslösung:

8 mM NaOH

Lösung für Langzeitlagerung der DNA:

1 mM EDTA

Resuspensionslösung für Proteinaufreinigung:

1 % Natriumdodecylsulfat (SDS)

Waschlösung für Proteinaufreinigung:

0,3 M Guanidin Hydrochlorid in 95% Ethanol

Waschlösung für DNA Aufreinigung:

0,1 M Natrium-Citrat in 10% Ethanol

Mastermix für die cDNA-Synthese pro Ansatz

4 µl 10 x RT Puffer

1,6 µl 25 x dNTP Mix (100 mM)

4 µl 10 x RT Random Primer

2 µl MultiScribe Reverse Transkriptase

8,4 µl Nuclease freies H₂O

Mastermix für die quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR) pro Ansatz

10 µl Taq Man Gene Expression Master Mix

1 µl 18S rRNA VIC – MGB von Applied Biosystem (endogene Kontrolle)

1 µl MGMT Taq Man Gene Expression Assays von Applied Biosystems

4 µl H₂O

Für HRM

Bindepuffer für HRM:

50 ml 100 % Isopropanol in die Flasche mit dem Bindepuffer geben und durch invertieren mischen

Waschpuffer für HRM:

120 ml 100 % Ethanol zu jeder Flasche Waschpuffer geben und mischen

Desulfonierungsreagenz für HRM:

45 ml 100 % Ethanol zu jeder Flasche Desulfonation Reagent geben und mischen

Conversion Reagenz für HRM:

260 µl Denaturation Reagent und 8 ml Wasser zum Pulver im Conversion

Reagent zugeben und mischen

500 µl Conversion Buffer zu Conversion Reagent geben und mischen

10 min 60°C Wasserbad, damit sich das Pulver gut löst

2-3 Mal während der 10-minütigen Inkubation vortexten

Master Mix für HRM:

10 µl Melt Dr. HRM Master Mix

1,2 µl Primer 1

1,2 µl Primer 2

5,6 µl H₂O

Fixativ für den Kolonietest

Drei Teile Methanol

Ein Teil Essigsäure

125 mM TMZ Stocklösung

12,134 mg TMZ gelöst in 500 µl DMSO

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle Arbeiten in der Zellkultur wurden unter Sterilwerkbänken durchgeführt. Verwendete Medien, Lösungen und Arbeitsgeräte waren steril. Die Zelllinien wurden bei 37° C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit im Zellkulturschrank kultiviert. Die langfristige Lagerung erfolgte in Kryoröhrchen bei -196° C in flüssigem Stickstoff. Nach dem Auftauen im 37° C warmen Wasserbad wurden die Zellen in eine Zellkulturflasche mit 19 ml Zellkulturmedium überführt. Am nächsten Tag wurde das alte Zellkulturmedium abgesaugt und durch frisches ersetzt, um das als Frostschutz im Einfriermedium enthaltene aber toxisch wirkende DMSO zu entfernen.

2.2.2 Splitten der Zelllinien/Passagieren

Hatten sich die Zellen soweit geteilt, dass ein zu 80 % konfluenten Zellverband entstanden war, wurden die Zelllinien gesplittet. Die Zelllinie U87 wurde im Verhältnis 1:5 und die Zelllinie U138 im Verhältnis 1:4 umgesetzt. Dazu wurde das Medium komplett abgesaugt und verworfen. Die Zellen wurden mit 5-7 ml PBS gewaschen, um Reste des Zellkulturmediums zu entfernen. Nach Zugabe von 1,5 ml Trypsin/EDTA wurden die Zellkulturflaschen für einige Minuten in den Brutschrank gelegt, bis sich die Zellen abgekugelt hatten und einzeln im Trypsin schwammen. Der Vorgang wurde durch Zugabe von 8,5 ml Medium abgestoppt und die Zellsuspension resuspendiert. Bei der Linie U87 wurden 2 ml und bei der Linie U138 2,5 ml Zellsuspension in der Zellkulturflasche belassen, die dann jeweils mit 18 ml frischem Medium aufgefüllt wurde.

2.2.3 Zellzählung in der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer

Die zu zählenden Zellen wurden wie in 2.2.2 beschrieben von ihrem Untergrund durch Trypsin abgelöst, in 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 20 µl dieser Zellsuspension mit 80 µl (Verdünnung 1:5) bzw. 180 µl (Verdünnung 1:10) Trypanblau gut gemischt und davon 20 µl unter das Deckglaschen der vorher präparierten Zählkammer pipettiert. Daraufhin wurden die Zellen in allen 16 großen Quadraten

ausgezählt und die Zellzahl pro ml Zellsuspension wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl} \times \text{Verdünnung} \times 1000}{\text{Kammerfaktor } 3,2} = \text{Zellzahl/ml}$$

2.2.4 Kolonietests nach Bestrahlung der Zelllinien U87 und U138

Der Kolonietest diente dazu, die Überlebensrate von mit unterschiedlichen Intensitäten bestrahlten Zellen festzustellen. Er wurde auf 6-Well-Platten durchgeführt. Dazu wurden in jedem Well 100.000 Zellen in 3 ml Medium pro Well ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen wie in Tabelle 1 angegeben, mit einem Linearbeschleuniger von Siemens bestrahlt, der nicht mehr für die Patientenbehandlung verwendet wird, wobei immer eine Kontrolle mitgeführt wurde. Ob eine Hochdosisbestrahlung oder Normalbestrahlung durchgeführt wurde, hing von der Anzahl der bestrahlten Platten ab. Da das Feld bei der Hochdosisbestrahlung näher an der Strahlenquelle lag, waren weniger Monitoreinheiten notwendig und die Bestrahlungszeit reduzierte sich erheblich.

Strahlendosis	Hochdosisbestrahlung (Feld 20x20 cm)	Normaldosisbestrahlung (Feld 40x40 cm)
2 Gy	52,8 MU	168 MU
3 Gy	79,8 MU	252 MU
5 Gy	132 MU	420 MU
7 Gy	184,8 MU	588 MU
8 Gy	211,2 MU	672 MU

Tabelle 1: Bestrahlungsbedingungen für den Kolonietest. MU = monitor units

Die Hälfte der Zellen wurde unmittelbar nach der Bestrahlung wie in 2.2.2 beschrieben, abgelöst, die Zellzahl mit der Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt und pro Bestrahlungsdosis eine Stocklösung mit einem Volumen von 1 ml und einer

Konzentration von 5.000 Zellen/ml hergestellt. Von dieser Zellsuspension wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Mengen entnommen und die angegebenen Zellzahlen für den Kolonietest verwendet. Analog wurde die andere Hälfte der Zellen nach 24 h abgelöst und dann der Kolonietest angesetzt.

U87/U138

Strahlendosis	Zellzahl	Menge
Kontrolle	50	10 µl
2 Gy	50	10 µl
3 Gy	125	25 µl
5 Gy	250	50 µl
7 Gy	1000	200 µl
8 Gy	1000	200 µl

Tabelle 2: Verwendete Zellzahlen für die Kolonietests

Die adhärennten Zellen wurden nach 12-14 Tagen mit dem Fixativ behandelt, um die entstandenen Kolonien sichtbar zu machen. Dazu wurde das Medium in den Wells der 6-Well-Platten entfernt und die Zellen wurden mit 1,5 ml PBS pro Well gewaschen. Das PBS wurde abgesaugt und anschließend wurden 3 ml eiskaltes Fixativ für 20 min in jedes Well gegeben. Das Fixativ wurde dann verworfen und die fixierten Zellen wurden mit 3 ml Kristallviolett pro Well über Nacht gefärbt. Anschließend wurden die 6-Well-Platten gewaschen, indem sie im Ganzen in Aqua dest. getaucht wurden. Die Kolonien wurden mit Hilfe einer Stereolupe im Durchlicht ausgezählt. Kolonien wurden nur dann gewertet, wenn sie aus mindestens 50 Zellen bestanden. Mit der Software Origin wurden nach Dateneingabe Überlebenskurven mit halblogarithmischer Skala erstellt. Außerdem errechnete die Software die Plating Efficiency (PE), die Dosis D10 und die Überlebende Fraktion bei 2 Gy (SF 2). Die PE gibt Auskunft über das Verhältnis der Anzahl der gezählten Kolonien im Verhältnis zur Anzahl der ausgesäten Zellen. Die SF2 ist das Verhältnis der Anzahl der Kolonien nach der Bestrahlung mit 2 Gy zur

Anzahl der ausgesäten Zellen multipliziert mit der PE. D10 ist die Strahlendosis in Gy, bei der 10 % der Zellen überlebt haben.

2.2.5 Bestrahlung der Zelllinien U87 und U138 aufgrund der Kolonietests

Die Zelllinien U87 und U138 wurden aufgrund der Erkenntnisse aus den Kolonietests mit 2 Gy und 5 Gy bestrahlt, einer Kombinationsbehandlung aus Bestrahlung und TMZ unterzogen oder alleine mit TMZ behandelt. Auch dieses Mal wurde eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt. Jetzt wurden die Versuche auf Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm durchgeführt. Ausgesät wurden $1,5 \times 10^6$ Zellen pro Petrischale in 10 ml Medium. Die TMZ-Behandlung wurde mit einer Konzentration von $75 \mu\text{M}$ ($6 \mu\text{l}$ der 125 mM TMZ Stocklösung) durchgeführt. Diese Behandlung fand 2 h vor der Bestrahlung statt, da die Plasmahalbwertszeit von TMZ 1,8 h beträgt. Nach Bestrahlung wurden die Zellen 24 h im Zellkulturschrank belassen. Danach wurden die Zellen nach Entfernen des Zellkulturmediums ohne Waschschrift mittels 1 ml TRIzol vom Petrischalenboden abgelöst, um genomische DNA, mRNA und Protein zu gewinnen.

2.2.6 Fraktionierte Bestrahlung

Bei Patienten wird die fraktionierte Bestrahlung über 6 Wochen an 5 Tagen in der Woche mit einer täglichen Strahlendosis von 2 Gy durchgeführt, so dass man eine akkumulative Dosis von 60 Gy erreicht. Meist findet die Therapie als Radio-Chemotherapie statt. Hier bekommen die Patienten ca. 2 h vor der Bestrahlung das Chemotherapeutikum TMZ intravenös verabreicht.

Um die Patientenbehandlung unter Laborbedingungen nachzustellen wurden analog dazu die in Petrischalen adhären Zellen der Zelllinien U87 und U138 eine Woche lang einer täglichen Dosis von 2 Gy ausgesetzt, mit TMZ behandelt oder (wie in 2.2.5 beschrieben) einer Kombinationsbehandlung unterzogen. Die ausgesäte Zellmenge betrug 300.000 Zellen in 10 ml Medium. Eine Kontrolle wurde immer mitgeführt. Um gleiche Bedingungen zu erreichen, wurde jeden Tag zur gleichen Zeit bei den unbehandelten Proben das Zellkulturmedium abgesaugt und durch frisches ersetzt. Den zu behandelnden Kulturen wurde TMZ zugegeben. Zusätzlich wurden die Petrischalen jeden Tag über 5 Tage hinweg fotografiert, wobei darauf geachtet wurde, dass die

Zellen adhären als Monolayer am Petrischalenboden haften und sich nicht vorzeitig durch Überwachsen lösten. Nach 24 h und nach fünf Tagen wurden die Proben mittels des NucleoSpin DNA Kits und des NucleoSpin RNA/Protein Kits von Macherey Nagel aufgereinigt, um genomische DNA, mRNA und Protein zu gewinnen.

2.2.7 DNA/RNA/Protein Aufreinigung mit TRIzol

TRIzol ist ein phenol- und guanidin-isothiocyanathaltiges Reagenz zur Gewinnung von RNA, genomischer DNA und Protein. Die Probe aus 2.2.5 wurde durch Aufziehen in einer Insulinspritze homogenisiert und mit 200 µl Chloroform versetzt. Anschließend wurde sie bei 12.000 xg 15 min zentrifugiert, um eine Auftrennung in drei Phasen zu erreichen. Die obere wässrige Phase enthält RNA, die Interphase DNA und die organische Phenol-Chloroform-Phase das Protein.

Die wässrige Phase wurde abgenommen und 500 µl 100 % Isopropanol zugegeben. Dadurch wurde die RNA präzipitiert. Die Interphase und die Phenol-Chloroform-Phase wurden zusammen bei 4° C aufbewahrt. Die ausgefällte RNA wurde durch Zugabe von 1 ml 75 % Ethanol gewaschen. Es folgte eine 5 min Zentrifugation bei 7.500 xg. Anschließend wurde das Ethanol abgenommen und das RNA-Pellet kurz getrocknet bevor es in 50 µl Ultra Pure Water für 12 min bei 55° C gelöst und bei -80° C gelagert wurde.

Interphase und Phenol-Chloroform-Phase wurden nicht getrennt. Zur Weiterverarbeitung wurden die verbliebenen Reste der wässrigen Phase entfernt und es erfolgte die Zugabe von 300 µl 100 % Ethanol, sodass die genomische DNA ausfiel. Die Probe wurde anschließend bei 2.000 xg für 5 min zentrifugiert, um ein Pellet zu generieren. Der Phenol-Chloroform Überstand wurde abgenommen und für die Proteinisolation bei -80° C aufbewahrt.

Das DNA Pellet wurde mit 1 ml 0,1 M Natriumcitrat in 10 % Ethanol gewaschen. Nach Zentrifugation bei 2.000 xg für 5 min wurde die Waschlösung verworfen. Das Pellet wurde nach Zugabe von 1,5 ml 75 % Ethanol und nach anschließender Zentrifugation bei 2.000 xg für 5 min getrocknet. Mit 300 µl 8 mM NaOH wurde die DNA gelöst. Zur

Langzeitlagerung wurde 0,2 µl 1 mM EDTA dazugegeben. Die Lagerung erfolgte bei -20° C.

Um das Protein-Pellet zu gewinnen, wurde zum Phenol-Chloroform-Überstand 1,5 ml Isopropanol gegeben und bei 12.000 xg für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Proteinpellet mit 2 ml 0,3 M Guanidin Hydrochlorid in 95 % Ethanol gewaschen. Nach Zentrifugation bei 7.500 xg für 5 min und Abnahme des Überstandes, wurde erneut mit 2 ml 100 % Ethanol gewaschen. Nach Zentrifugation bei 7.500 xg für 5 min, wurde das Pellet getrocknet. Es wurde anschließend in 200 µl 1 % SDS bei 50° C für 10 min gelöst und dann bei -20° C gelagert. Durch diese Behandlung wurde das Protein denaturiert.

2.2.8 gDNA Aufreinigung mit dem NucleoSpin Kit von Macherey Nagel

Das Kit ist zur Gewinnung von gDNA aus bis zu 10^7 Zellen geeignet. Das Medium wurde komplett abgesaugt und die Zellen wurden mit 1,5 ml Trypsin abgelöst. Nach Zugabe von 7 ml frischem Zellkulturmedium zum Abstoppen der Reaktion wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Abzentrifugation bei 1.000 xg wurde der Überstand abgenommen und die Zellen wurden mit etwas PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation bei 1.000 xg wurde der entstandene Überstand erneut abgenommen und verworfen. Zur Lyse wurde zu den Zellen 200 µl T1, 25 µl Proteinase K und 200 µl B3 zugegeben. Die Suspension wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach kurzem Vortexen und Inkubation bei 70° C für 12 min im Heizblock wurden 210 µl 100 % Ethanol zugegeben. Nach erneutem vorsichtigem Vortexen, wurde die Probe auf eine Säule überführt und 1 min bei 11.000 xg zentrifugiert. Nun war die gDNA auf der Membran der Säule gebunden. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule auf ein neues Reaktionsgefäß gesetzt. Zum Waschen der gebundenen DNA wurde 500 µl BW zugefügt und für 1 min bei 11.000 xg zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, die Säule auf dasselbe Reaktionsgefäß gesetzt, 600 µl B5 zugefügt und 1 min bei 11.000 xg zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wiederum verworfen und die Säule getrocknet, indem sie 1 min bei 11.000 xg zentrifugiert wurde. Die Säule wurde auf ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt und 100 µl BE Puffer zugefügt. Die gDNA war nach diesem Schritt vollständig eluiert. Die Probe wurde anschließend

für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und ein letztes Mal für 1 min bei 11.000 xg zentrifugiert. Die gewonnene genomische DNA wurde bei -20° C bis zur Weiterverwendung gelagert.

2.2.9 RNA/Protein Aufreinigung mit dem NucleoSpin Kit von Macherey Nagel

Wie in 2.2.8 bereits beschrieben, wurde den Zellen nach Ablösen vom Petrischalenboden und Überführung in ein neues Reaktionsgefäß 350 µl RP1 und 3,5 µl β-Mercaptoethanol zugefügt und die Probe wurde gevortext. Die lysierte Probe wurde jetzt gefiltert, indem sie auf eine Filtereinheit übertragen und die Einheit auf ein Reaktionsgefäß gesetzt wurde. Die Zentrifugationszeit betrug 1 min bei 11.000 xg. Die Filtereinheit wurde anschließend verworfen und zum Durchfluss wurden 350 µl 70 % Ethanol zugefügt. Die Probe wurde durch auf- und abpipettieren homogenisiert, anschließend auf eine Säule gegeben (hellblauer Ring) und diese auf ein 2 ml Reaktionsgefäß gesetzt. Die Zentrifugationszeit betrug 30 s bei 11.000 xg. Das Protein befand sich im Durchfluss während DNA/RNA auf der Säulenmembran verblieb. Der Proteindurchfluss wurde bis zum Abschluss der RNA Isolation auf Eis gelagert.

RNA-Aufreinigung

Zur RNA-Aufreinigung wurde die Säule auf ein neues Reaktionsgefäß gesetzt. Ihre Membran wurde durch Zugabe von 350 µl MDB und einminütiger Zentrifugation bei 11.000 xg entsalzt und getrocknet. 95 µl rDNase Reaktionsgemisch (10 µl rDNase 1 + 90 µl Reaktionspuffer für rDNase) wurde auf die Säule gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 200 µl Puffer RA 2 hinzugegeben und es wurde 30 s bei 11.000 xg zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule auf ein neues Reaktionsgefäß gesetzt, 600 µl Puffer RA 3 hinzupipettiert und für 30 s bei 11.000 xg zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 250 µl RA 3 auf die Membran gegeben. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 11.000 xg für 2 min. Zur Elution wurde die Säule auf ein nukleasefreies Mikrozentrifugationsgefäß gesetzt und 60 µl RNase freies H₂O zugefügt. Es wurde wieder bei 11.000 xg für 1 min zentrifugiert. Die eluierte RNA befand sich nun im Durchfluss.

Proteinaufreinigung

Für die Proteinaufreinigung wurden 700 µl des vor der RNA Aufreinigung auf Eis aufbewahrten Durchflusses in ein frisches Mikrozentrifugationsgefäß überführt und es wurde eine Volumeneinheit PP hinzugefügt. Die Probe inkubierte 10 min bei Raumtemperatur und wurde dann 5 min bei 11.000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und 500 µl 50 % Ethanol zum Pellet gegeben. Die Zentrifugationszeit betrug 1 min bei 11.000 xg. Nun wurde der Überstand so gut wie möglich entfernt und das Pellet für ca. 10 min getrocknet. Danach wurde 100 µl PLB-TCEP hinzugefügt und die Probe für 3 min bei 98° C inkubiert. Nach Abkühlen der Probe wurde nochmal 1 min bei 11.000 xg zentrifugiert.

2.2.10 High Resolution Melting (HRM)

Die HRM ist eine Methode zur Bestimmung des Methylierungsgrades der DNA und beruht auf den Schmelzeigenschaften von DNA in Lösung. Dazu wurden alle Proben aus 2.2.8 mit Ultra Pure Water so angeglichen, dass 1 µg DNA in 45 µl Volumen enthalten waren. Zuerst wurde die DNA Probe denaturiert, indem 5 µl Denaturation Reagent hinzugegeben wurde. Die Denaturierung im Heizblock dauerte 10 min bei 50° C. Durch das Erhitzen wurde der DNA Doppelstrang in zwei Einzelstränge getrennt. Danach wurde die DNA mit dem natriumbisulfithaltigen Conversion Reagent, behandelt, um unmethyliertes Cytosin in Uracil umzuwandeln. Dabei bleibt das methylierte 5-Methylcytosin unverändert. Es wurden also 100 µl Conversion Reagent zu 50 µl denaturierter Probe gegeben. Durch das unterschiedliche Molekulargewicht von Uracil und Cytosin ergaben sich unterschiedliche Schmelztemperaturen, die mittels einer Schmelzkurvenanalyse der DNA bestimmt werden können. Mit der nun 150 µl umfassenden, denaturierten Probe wurde anschließend eine PCR mit folgenden Zyklen durchgeführt.

1. Schritt:	65° C	30 min
2. Schritt:	95° C	1,5 min
3. Schritt:	65° C	30 min
4. Schritt:	95° C	1,5 min
5. Schritt:	65° C	30 min
6. Schritt:	4° C	∞

Anschließend mussten die konvertierten DNA Proben (conv. DNA) entsalzt und Sulfonsäuregruppen entfernt werden. Sulfonsäuregruppen sind stark sauer und bilden mit Metallhydroxiden Salze, die bei der Schmelzkurvenanalyse hinderlich wären. Dazu wurden die jeweils 150 µl umfassenden conv. DNA Proben in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und es wurde jeweils 600 µl Bindepuffer hinzugegeben. Anschließend wurde die gemischte Probe auf die entsprechende Säule der Binding Plate gegeben und auf die PureLink™ 96 Receiver Plate gesetzt. Die Platte wurde bei 3.100 xg für 3 min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dann wurden die Proben gewaschen, indem 600 µl Waschpuffer auf die entsprechende Säule der Binding Plate gegeben wurden und wieder bei 3.100 xg für 3 min zentrifugiert wurde. Der Durchlauf wurde erneut verworfen. Nun wurden 200 µl Desulfonation Reagent auf die Säulen gegeben, die Platte wurde mit einer Klebefolie abgedeckt, 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich wieder bei 3.100 xg für 3 min zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Für den folgenden zweimaligen Waschschrift wurden jeweils 400 µl Waschpuffer auf die Säulen der Binding Plate gegeben, es wurde bei 3.100 xg für 3 min zentrifugiert und der Durchlauf wurde verworfen. Danach wurde der restliche Waschpuffer entfernt, indem bei 3.100 xg für 20 min zentrifugiert wurde und der Durchlauf erneut verworfen wurde. Für den letzten Schritt der Elution wurde die Binding Plate auf eine neue Elutionsplatte gesetzt und 100 µl Ultra Pure Water auf die Säulen gegeben. Die Platte wurde 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann bei 3.100 xg für 5 min zentrifugiert. Das Eluat befand sich jetzt im Durchfluss.

Um Vergleichsstandards für die Schmelzkurvenanalyse zu bekommen, wurden der 100 % Standard sowie der 0 % Standard für die verschiedenen Prozentsätze wie in der folgenden Tabelle dargestellt, gemischt. Wie die conv. DNA Proben wurden sie denaturiert, konvertiert und entsalzt bevor sie einsatzfähig waren.

100 % methylierte DNA	100 µl	75 µl	50 µl	25 µl	10 µl	0 µl
Nicht methylierte DNA	0 µl	25 µl	50 µl	75 µl	90 µl	100 µl
% methylierte DNA	100 %	75 %	50 %	25 %	10 %	0 %

Tabelle 3: Mischungsverhältnisse der 100 % und 0 % methylierten DNA für Quantifizierungsstandards

Es wurde eine 96 Well Platte verwendet. In jedes Well wurden 18 µl Mastermix vorgelegt und 2 µl conv. DNA Probe bzw. 2 µl Standard zugegeben. Als Negativkontrolle dienten 2 µl Ultra Pure Water. Alle Proben wurden im Triplet aufgetragen. Die PCR-Zyklen sind in Tabelle 4 dargestellt.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklus
1	95° C	10 min	Haltephase
2	95° C	15 s	45 Zyklen
3	60° C	1 min	45 Zyklen
4	95° C	10 s	Schmelzkurvenanalyse
5	60° C	1 min	Schmelzkurvenanalyse
6	95° C	15 s	Schmelzkurvenanalyse
7	60° C	15 s	Schmelzkurvenanalyse

Tabelle 4: HRM-Zyklen: Schritt 1 ist die 10-minütige Haltephase, gefolgt von den Schritten 2 und 3, die 45 mal hintereinander ablaufen müssen, bevor die Schritte 4-7 die HRM-Analyse abschließen.

2.2.11 cDNA-Synthese

Durch reverse Transkriptasen ist es möglich, die nach der Aufreinigung gewonnene messenger RNA (mRNA) in copy-DNA (cDNA) umzuschreiben. Die reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die zum Start einen Primer

benötigt. Meist sind das sechs willkürliche Nukleotide. Das Ergebnis ist ein cDNA-Strang, der mit dem ursprünglichen mRNA-Strang hybridisiert ist. Dieser Vorgang war nötig, um mit der cDNA eine anschließende quantitative PCR (qPCR) durchführen zu können, was direkt mit der mRNA nicht möglich ist.

Aus dem in 2.1.11 beschriebenen Mastermix für die cDNA- Synthese wurden 20 µl pro Reaktion entnommen. 20 µl der mRNA-Probe aus 2.2.9 bzw. 2.2.7 wurden hinzupipettiert und mit den Proben wurde eine PCR durchgeführt. Dabei wurden folgende Zyklen gefahren:

1. Schritt:	25° C	10 min
2. Schritt:	37° C	120 min
3. Schritt:	85° C	5 min
4. Schritt:	4° C	∞

2.2.12 Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Die quantitative PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die die Quantifizierung der gewonnen cDNA ermöglicht. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen vorgenommen, die während eines Zyklus durchgeführt werden. Dies funktioniert mit Hilfe fluorogener Sonden und der Taq-Polymerase, welche zusätzlich zu ihrer Polymeraseaktivität eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität besitzt.

Der Reporterfarbstoff ist kovalent an das 5'-Ende der Sonden geknüpft und meist 6-Carboxyfluorescein (FAM) oder 4,7,2-trichloro-7-phenyl-6-carboxyfluorescein (VIC[®]) markiert. Als Quencherfarbstoff dient Tetramethylrhodamin (TAMRA), das über ein Linker-Arm-Nukleotid an das 3'-Ende der Sonde gebunden ist. Die Phosphorylierung dient dazu, eine Extension des 3'-Endes während der PCR zu vermeiden. Während der PCR kommt es zur sequenzspezifischen Hybridisierung zwischen Sonde und Template. Nur dann kommt es zur Hydrolyse der Sonde durch die Taq-Polymerase (Abb. 5). Wird die intakte Sonde bei 488 nm zur Fluoreszenz angeregt, so wird die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher durch Fluoreszenz-Energietransfer (FET) unterdrückt. Während der PCR hybridisiert die Sonde zunächst

an den Matrizenstrang. In der Extensionsphase trifft die Taq-Polymerase nun auf diese Sonde und beginnt sie zu verdrängen. Es entsteht eine Y-förmige Sekundärstruktur, wodurch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase aktiviert und die Sonde geschnitten wird. Die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher wird dadurch unterbrochen und damit auch der FET. Entsprechend der Akkumulation des PCR-Produktes steigt die Fluoreszenz des Reporters also mit jedem Zyklus an. Das dabei emittierte Signal ist strikt sequenzspezifisch (Abbildung 5) (Schild, 2016).

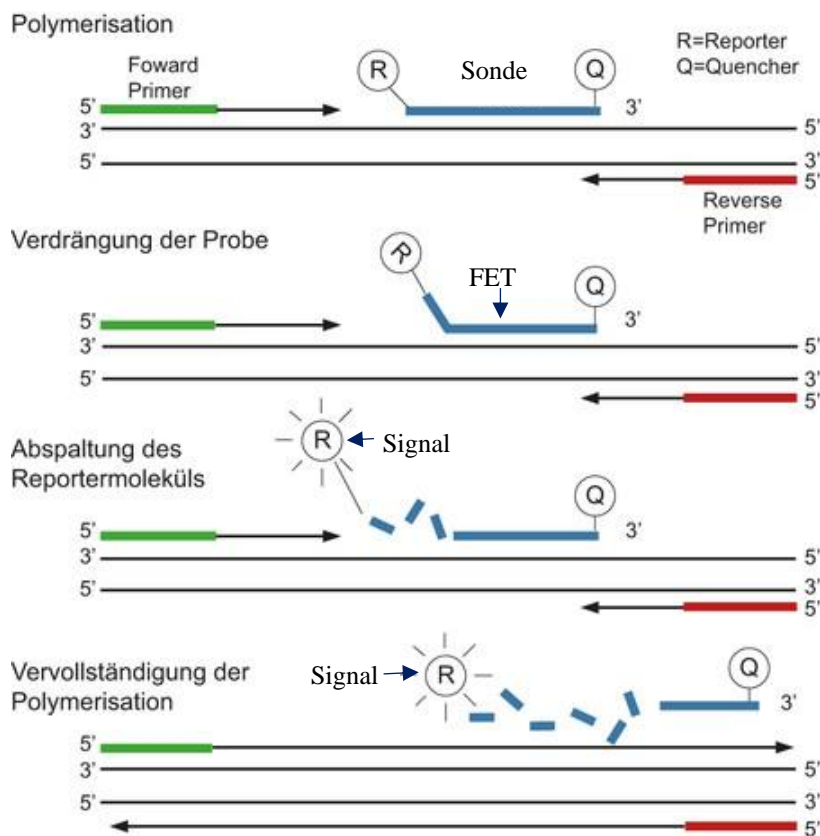


Abbildung 5: Funktionsweise TaqMan Sonden (Jacob, 2013)

Es wurde eine 96-Well-Platte verwendet, wobei in jedes Well 16 µl Master Mix vorgelegt wurden. 4 µl cDNA kamen pro Well dazu. Jede Probe wurde jeweils im Triplet aufgetragen. Als Negativkontrolle diente Ultra Pure Water, ebenfalls im Triplet aufgetragen. Vor Beginn des ersten Zyklus wurde die Temperatur für 2 min bei 50° C gehalten, um die Analysegenauigkeit zu erhöhen, es schloss sich die Denaturierungsphase bei 95° C für 10 min an. Jeder folgende Zyklus bestand aus der Denaturierungsphase für 15 s bei 95° C, sowie der Annealing-Phase kombiniert mit der

Elongationsphase für 1 min bei 60° C. Es wurden bei jedem Durchlauf 48 Zyklen gefahren.

2.2.13 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot

Zunächst wurde eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit dem XCell Surelock System durchgeführt. Als erster Schritt wurde zu 16,25 µl Probe aus 2.2.9 bzw. 2.2.7 2,5 µl 10 x NuPage Reducing Agent und 6,25 µl NuPage LDS Sample Buffer gegeben.

Anschließend wurden die Proben bei 70° C für 10 min im Heizblock inkubiert. Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteinfraction wurden NuPage 4-12 % Bis-Tris-Fertiggele aus Polyacrylamid verwendet, deren Porengröße in zwei Stufen verläuft. Ein großporiges Sammelgel am Anfang und ein folgendes feinporiges Trenngel. Die Gele wurden aus der Hülle genommen und der Papierstreifen am unteren Ende entfernt. Vor der Platzierung des Gels in der Kammer wurde der Kamm entfernt, ohne die Taschen zu beschädigen. Wenn nur ein Gel verwendet wird, muss eine Platzhalterplatte eingesetzt werden. Die innere Kammer wurde mit 200 ml MES Puffer und 500 µl Antioxidanz gefüllt und die Taschen des Gels wurden mit demselben Puffer ausgespült. Die Puffer sind mit SDS versetzt, welches die Proteine unabhängig von ihrem sauren oder basischen Charakter mit einer einheitlichen negativen Ladung versieht und die Auftrennung nach Molekülgröße erlaubt. Danach wurden die Taschen des Gels mit jeweils 20 µl inkubierter Probe beladen. Vom Größenmarker wurden 10 µl aufgetragen. Nachdem die äußere Kammer mit 700 ml MES Puffer gefüllt worden war, lief das System 50 min bei 200 V und 120 mA.

Zum Blotting wurde die Plastikhülle des Gels entfernt und das Gel auf die Transfermembran gelegt. Gel und Transfermembran wurden auf den Anodenstack gebettet. Das mit Aqua dest. angefeuchtete Whatman-Papier bedeckte das Gel bevor der Kathoden Stack daraufgelegt wurde. Dann wurden Luftblasen mit einem Plastikroller vorsichtig entfernt und es wurde 7 Minuten mit dem iBlot dry blotting System geblottet. Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden dadurch auf eine Nitrocellulosemembran übertragen, wo sie mit spezifischen Antikörpern detektiert werden können. Vor der Antikörperinkubation wurde die Membran 45 min in 5 % Magermilchpulver, das in TBST gelöst ist, gewaschen, um freie Bindungsstellen zu

blockieren. So wurde die Spezifität des Antikörpers verbessert. Als Primärantikörper wurden Anti- γ -Tubulin und Anti-MGMT verwendet. Für Anti- γ -Tubulin wurde eine Verdünnung von 1:5.000 gewählt, für Anti-MGMT von 1:1.000. Die Primärantikörper wurden in 2 ml Blockpuffer gelöst. Diese Lösung wurde zusammen mit dem Blot in ein 50 ml Reaktionsgefäß gegeben und über Nacht bei 4° C im Macs Mix Rollgerät inkubiert. Danach wurde der Blot 3 x 5 min auf einem Schüttler in TBST gewaschen, bevor er zusammen mit 2 ml in TBST verdünntem Sekundärantikörper in ein frisches Reaktionsgefäß gegeben wurde.

Die Membran wird also mit einem Primärantikörper bindenden Sekundärantikörper inkubiert, an welchen das Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist. Der Sekundärantikörper zu Anti- γ -Tubulin ist Anti-mouse IgG HRP. Der zu Anti-MGMT gehörige Sekundärantikörper ist Anti-rabbit IgG HRP. Für die Sekundärantikörper wurde eine Verdünnung von 1:1.000 gewählt. Es folgte eine weitere Inkubation von 1 h bei 4° C. Danach wurde die Nitrocellulosemembran 5 x 5 min in TBST auf dem Schüttler gewaschen. Zum Nachweis mit dem ECl-Kit wurde der Blot auf eine Folie in der Entwicklerkassette gelegt. In ein 2 ml Reaktionsgefäß wurden 1 ml Reagenz 1 und 1 ml Reagenz 2 gegeben und gevortext. Dann wurde die Lösung auf den Blots verteilt und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Entwicklerlösung entstehen mit Hilfe des darin enthaltenen Luminols Lichtimpulse, welche auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden können.

Anschließend wurde in der Dunkelkammer ein Hyperfilm zwischen 30 s und 10 min aufgelegt und entwickelt. Zum Schluss wurden die Marker auf den Film übertragen, indem der entwickelte Film deckungsgleich auf die Nitrocellulosemembran gelegt wurde und die Markerbanden mit einem Folienstift nachgefahren wurden.

3 Ergebnisse

An folgendem Patientenbeispiel der neurochirurgischen Universitätsklinik Würzburg wird deutlich, dass sich der Methylierungsgrad des MGMT-Genpromotors ändern kann. 2012 wurde der Patient mit Erstdiagnose Glioblastoma multiforme WHO Grad 4 vorgestellt. Er unterzog sich der Standardtherapie nach dem Stupp-Schema und erlitt 2013 ein Rezidiv mit der gleichen Diagnose. 2015 wurde erneut ein Rezidiv diagnostiziert, diesmal mit Anteilen eines Gliosarkoms.

Bei Erstdiagnose (Kurve OP 2012) ergab die Untersuchung des MGMT-Promotormethylierungsgrades mit Hilfe von HRM einen Wert zwischen 25 und 50 %. In beiden Rezidiven war die Promotormethylierung dann aber komplett verloren gegangen (Abbildung 6, Kurven OP 2013, 2015).

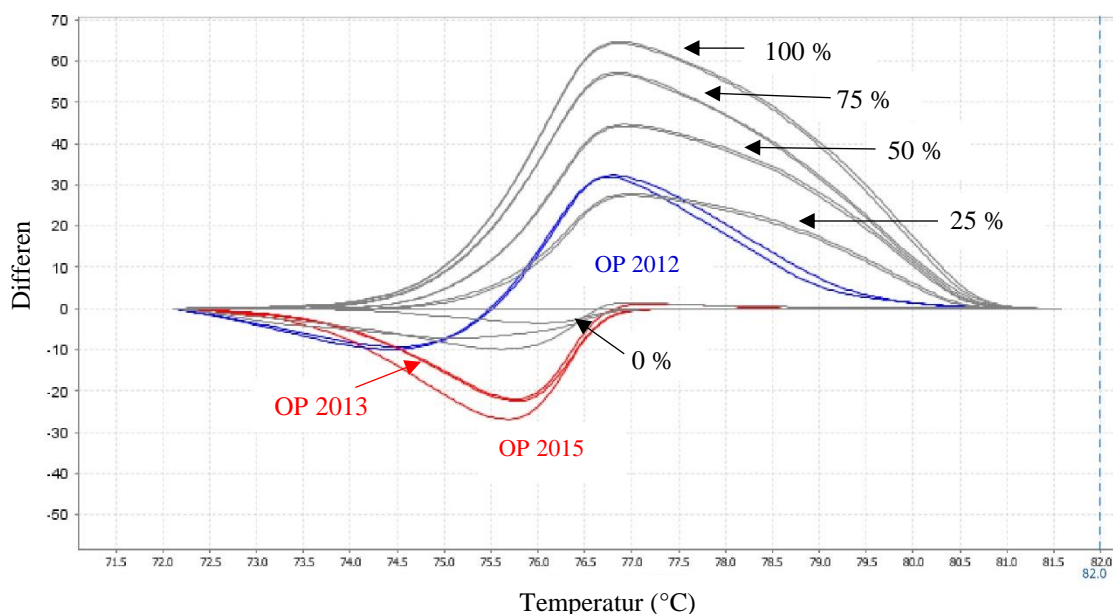


Abbildung 6: Änderung des Methylierungsgrades des MGMT-Promotors eines Patienten der neurochirurgischen Universitätsklinik Würzburg. Messung mit Hilfe von HRM. In Grau sind die Quantifizierungsstandards aufgezeichnet. Blaue Kurve OP 2012 = Erstdiagnose, Rote Kurven OP 2013, OP 2015 = Rezidive.

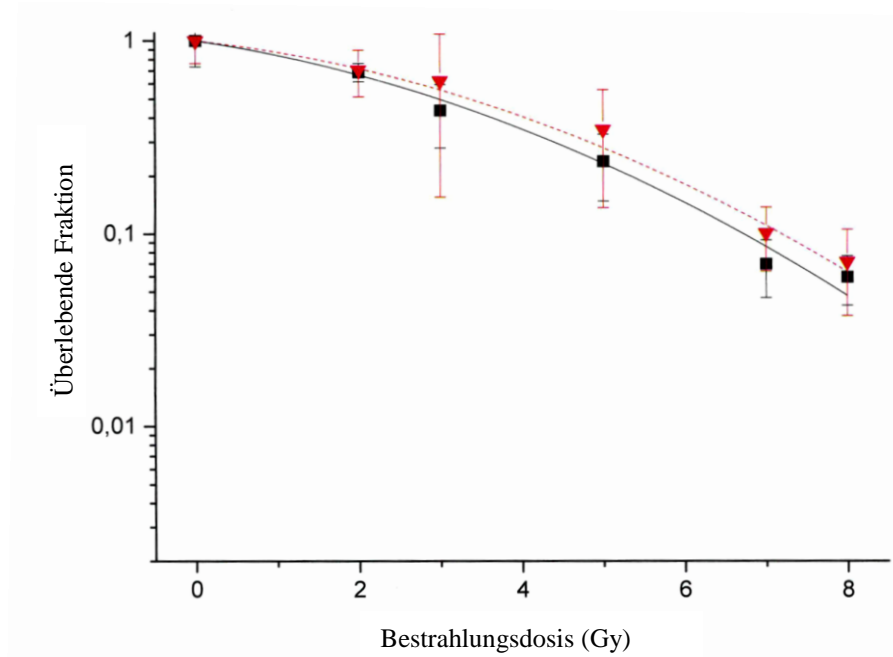
Bei solchen Veränderungen im MGMT-Promotormethylierungsstatus stellt sich die Frage, ob die Therapie dabei eine Rolle spielt. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit ein Zellkultursystem etabliert werden, mit dem unter Standardtherapiebedingungen der Methylierungsstatus sowie die mRNA- und Proteinexpression der MGMT untersucht und Veränderungen festgestellt werden können.

3.1 Kolonietests der Zelllinien U87 und U138

Da zur Patientenbestrahlung eine Dosis von 1,8 - 2 Gy angewendet wird, stellte sich zunächst die Frage, ob diese Dosis auch unter artifiziellen Bedingungen in der Zellkultur verwendet werden kann oder ob die Dosis angepasst werden muss. Zu diesem Zweck wurden Kolonietests der Zelllinien U87 und U138 durchgeführt, um festzustellen, wie viele Zellen nach verschiedenen Bestrahlungsintensitäten noch vorhanden und überlebensfähig waren. Um genügend Zellmaterial für die Folgeversuchsreihen zu haben, sollten mindestens 10 % der anfänglichen Zellzahl überleben.

Die Überlebenskurven für die Zelllinien U87 und U138 nach 30 min und 24 h sind in Abbildung 7 dargestellt.

7a)



7b)

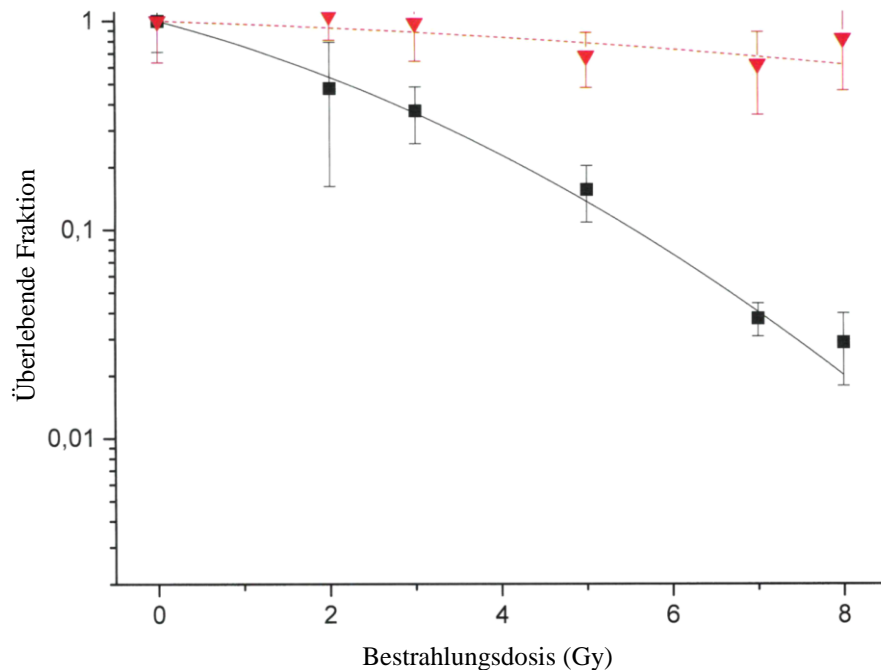


Abbildung 7: Überlebenskurven von GBM-Zelllinien. Schwarz: 30 min nach Bestrahlung, rot: 24 h nach Bestrahlung, n=3, a) U87-Zellen und b) U138-Zellen.

Die Zelllinie U87 wies 30 min nach Bestrahlung einen zu U138 sehr ähnlichen Verlauf auf. 80 % der Zellen überlebten 2 Gy, 50 % 3 Gy, 30 % 5 Gy, 8 % 7 Gy und 7,5 % 8 Gy. Es war somit eine gleichmäßige lineare Regression der Überlebensraten erkennbar. Im Unterschied zu den U138-Zellen verlief die Überlebenskurve nach 24 h Bestrahlung aber annähernd deckungsgleich zu der 30 min Kurve. Die Zelllinie U138 zeigte 30 min nach Bestrahlung eine Überlebensrate von 50 % bei 2 Gy, von 45 % bei 3 Gy, von 20 % bei 5 Gy, von 3,5 % bei 7 Gy und von 3 % bei 8 Gy. 24 h nach Bestrahlung war dagegen kaum eine Abnahme der Überlebensrate feststellbar. Erst bei 5 Gy war eine geringe Abnahme zu verzeichnen. Die Überlebensrate lag hier bei 70 % und verblieb auch bei 7 Gy und 8 Gy auf demselben Niveau.

Zusätzlich zu den Überlebenskurven wurde mittels der Software *Origin* 30 min und 24 h nach Bestrahlung die Plating Efficiency (PE), die Surviving Fraction bei 2 Gy (SF2) und die benötigte Dosis zum Überleben von 10 % der Zellen (D10) ermittelt (Tabelle 5).

Zelllinie	Zeit nach Bestrahlung	PE	SF 2	D 10
U87	30 min	26,7 %	66,4 %	6,71 Gy
	24 h	26,2 %	71,7 %	7,18 Gy
U138	30 min	26,7 %	53,7 %	5,54 Gy
	24 h	98,4 %	92,4 %	21,22 Gy

Tabelle 5: Plating Efficiency (PE), Surviving Fraction bei 2 Gy (SF 2) und die Dosis, die benötigt wird, dass 10 % der Zellen überleben (D10) der GBM-Zelllinien U87 und U138 30 min und 24 h nach Bestrahlung

Beide Zelllinien wiesen nach 30 min keine Unterschiede in PE, SF 2 und D10 auf. Während es nach 24 h bei U87 keine Veränderungen gab, war eine Zunahme der PE und der SF 2 auf über 90 % und eine massive Steigerung von D10 bei U138 auffällig.

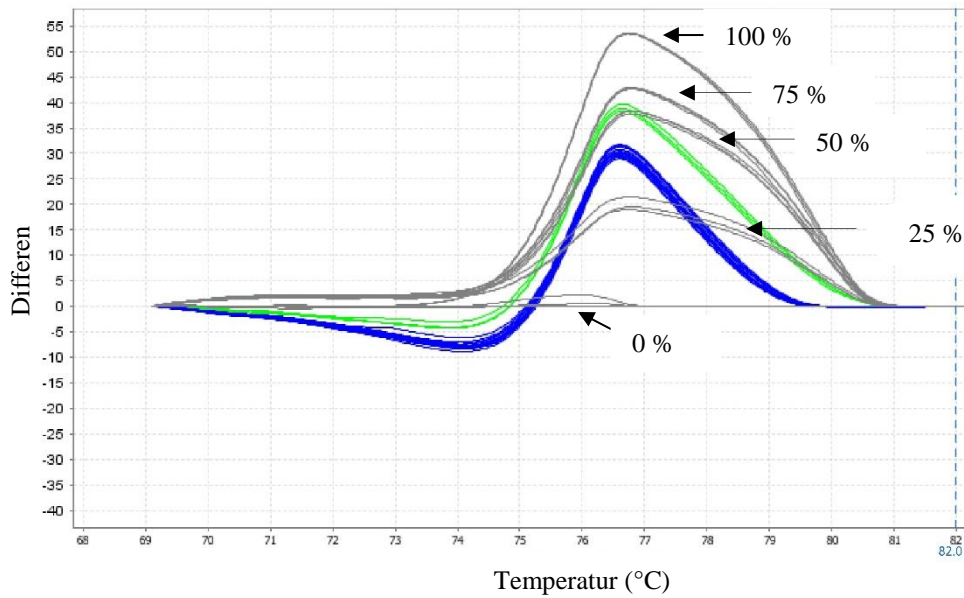
Aufgrund dieser Ergebnisse wurden 2 Gy und 5 Gy als Bestrahlungsdosen für die Folgeversuche ausgewählt. 2 Gy ist die in der Patientenbehandlung gebräuchliche Intensität, bei 5 Gy überlebten von beiden Zelllinien mehr als 10 % der Zellen (U87: 30 - 40 %, U138: 20 - 75 %). Das garantierte genügend Zellmaterial für die Isolation von DNA, mRNA, und Protein.

3.2 Bestrahlungsversuch mit 2 Gy und 5 Gy

3.2.1 MGMT-Promotormethylierung nach Bestrahlung mit 2 Gy und 5 Gy

Nach Festlegung der Strahlendosen für die Versuchsreihen in der Zellkultur, wurde der prozentuale Methylierungsgrad des MGMT-Promotors der U87- und U138-Zellen mittels HRM bestimmt, um mögliche Änderungen durch Strahlen- oder TMZ-Einfluss nachweisen zu können (Abbildung 8).

8a)



8b)

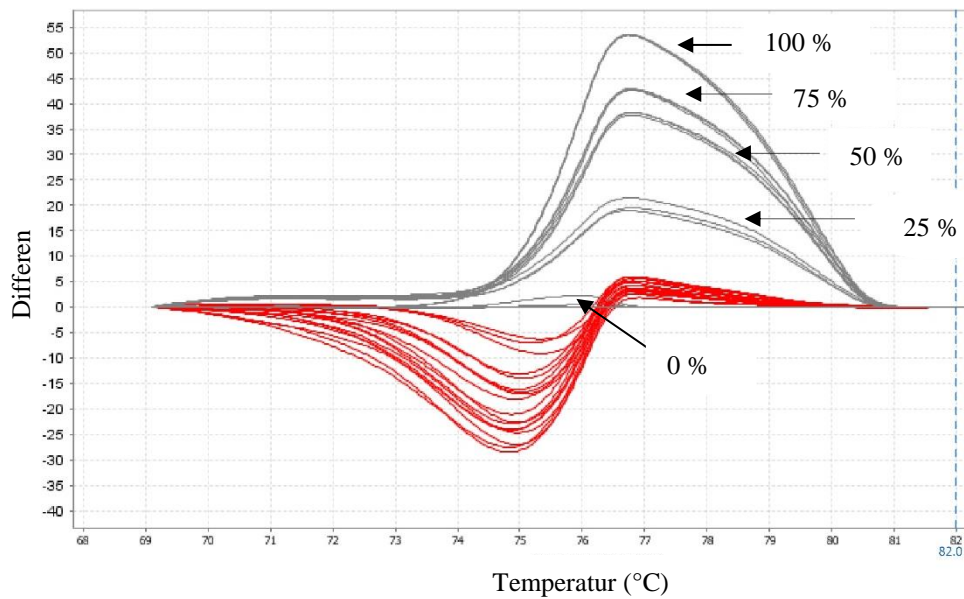


Abbildung 8: Methylierungsgrad von GBM-Zelllinien 24 h nach Bestrahlung, n=3. In Grau sind die Quantifizierungsstandards aufgezeichnet. a) U87-Zellen, blaue Kurven: Kontrolle, 2 Gy, 5 Gy, TMZ, TMZ + 2 Gy, grüne Kurven: TMZ + 5Gy. b) U 138 Zellen, rote Kurven: Kontrolle, 2 Gy, 5 Gy, TMZ, TMZ + 2 Gy, TMZ + 5 Gy.

Während U87-Kontrollzellen sowie solche, die mit 2 Gy, 5 Gy, TMZ, oder TMZ + 2 Gy behandelt wurden, einen zwischen 25 und 50 % methylierten MGMT-Promotor hatten (Abbildung 8a, blaue Kurve), lag der Methylierungsgrad von mit TMZ + 5 Gy

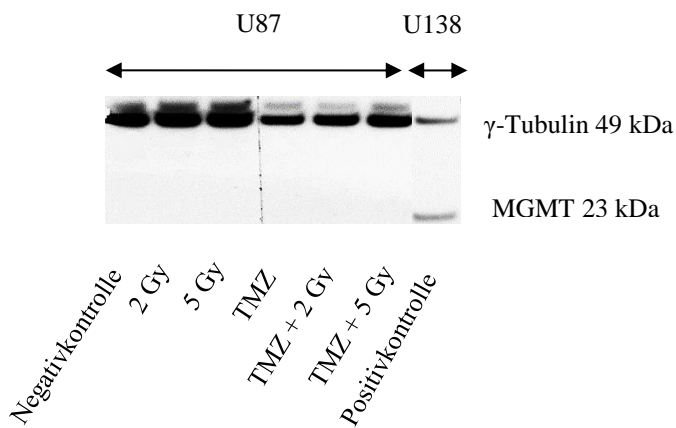
behandelten Zellen zwischen 50 und 75 %. Die Zelllinie U87 schien somit in der Kombinationsbehandlung mit TMZ und 5 Gy Bestrahlung ihren Methylierungsgrad nahezu verdoppelt zu haben.

Der MGMT-Promotor von U138 Zellen dagegen war unmethyliert, was sich auch durch die Behandlungen nicht änderte (Abbildung 8b, rote Kurven).

3.2.2 MGMT-Proteinexpression nach Bestrahlung mit 2 Gy und 5 Gy

Um festzustellen, ob sich die Ergebnisse aus den MGMT-Promotormethylierungsanalysen auch auf Proteinebene widerspiegeln, wurden Western-Blots durchgeführt. Während bei U87-Zellen keine MGMT-Proteinexpression nachweisbar war (Abbildung 9a), exprimierten U138-Zellen unter allen Behandlungsbedingungen große Konzentrationen an MGMT (Abbildung 9b). Ein Einfluss der Behandlung auf die Expressionsstärke war nicht feststellbar.

9a)



9b)

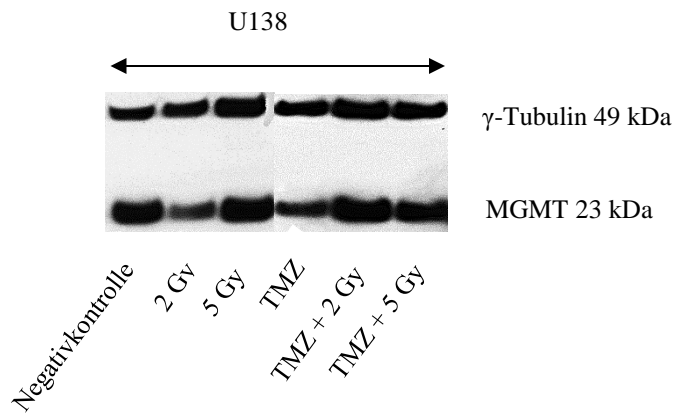


Abbildung 9: MGMT-Proteinexpression von GBM-Zelllinien im Western-Blot nach 24 h Bestrahlung. Das Haushaltsgen γ -Tubulin (49 kDa) fungierte als Ladekontrolle. U138-Zelllysate diente als Positivkontrolle für die MGMT-Proteinexpression (23 kDa). Die Negativkontrolle wurde keinerlei Behandlung ausgesetzt. a) U87-Zellen und b) U138-Zellen

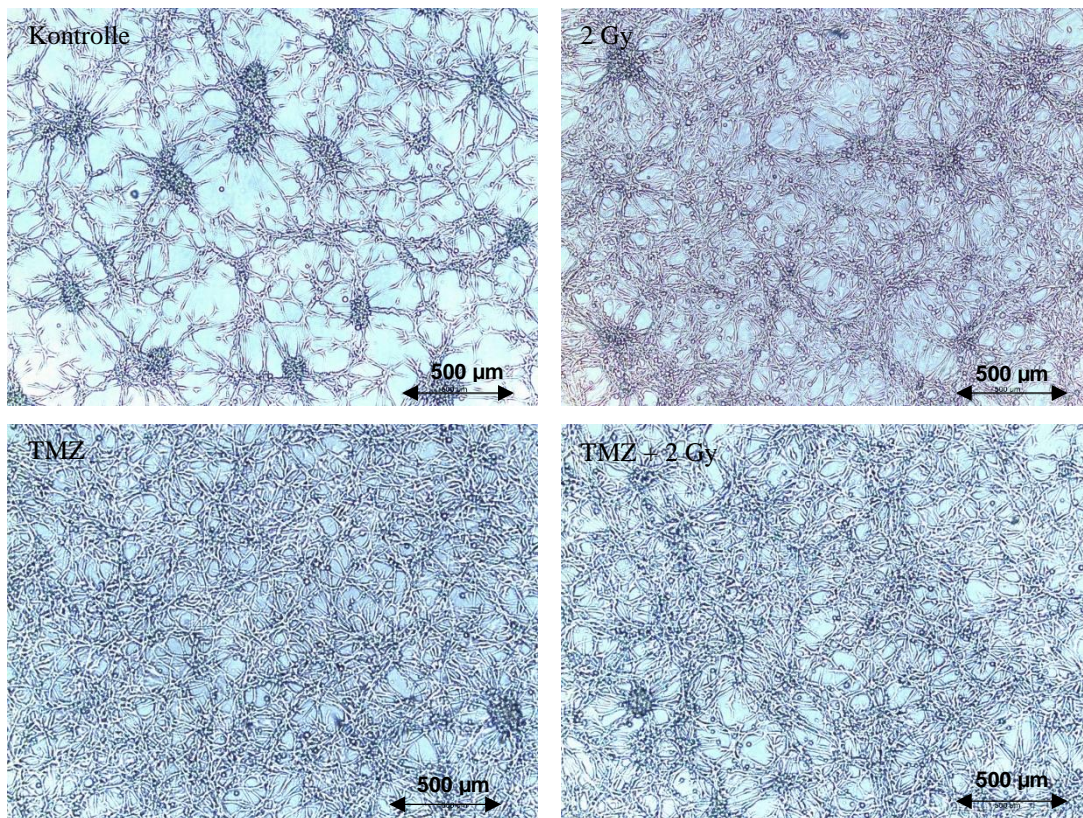
3.3 Fraktionierte Bestrahlung

Nachdem sich eine einmalige Kurzzeitbehandlung nicht nennenswert auf die MGMT-Expression auszuwirken schien, stellte sich die Frage, ob eine fraktionierte Bestrahlung über 5 Tage analog zur Standardtherapie eine Wirkung haben würde.

3.3.1 Morphologie der Zellen U87 und U138 nach 5 Tagen Bestrahlung

Das Aussehen der Zellkulturen von U87 und U138 wurde nach 5 d fraktionierter Bestrahlung in Kombination mit TMZ-Behandlung fotografisch dokumentiert.

10a)



10b)

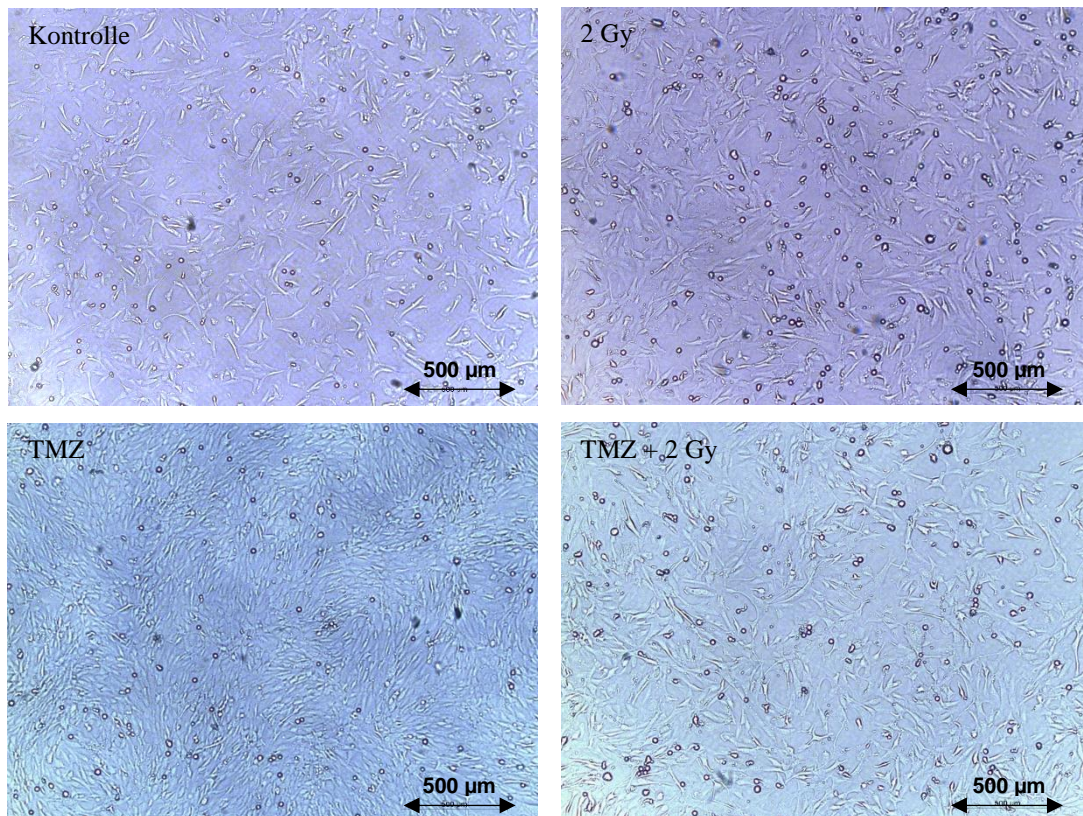


Abbildung 10: Lichtmikroskopische Aufnahmen von GBM-Zelllinien nach 5 d fraktionierter Bestrahlung, n=3, a) U87 und b) U138

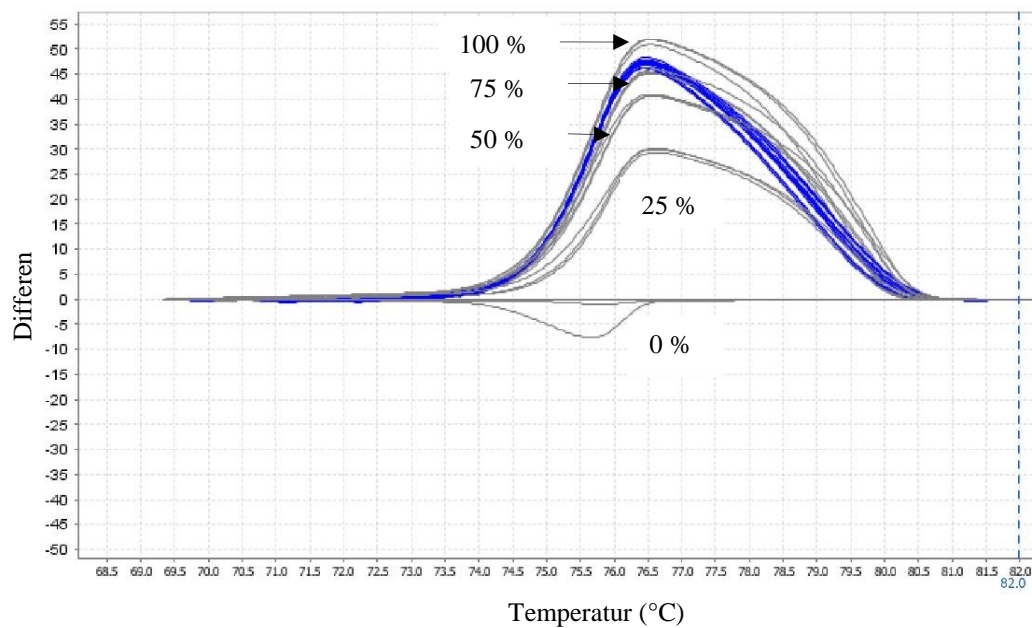
Die Zelllinie U87 wies eine epitheliale Morphologie auf, wuchs adhärent und bildete dreidimensionale, sphäroidähnliche Zellanhäufungen an der Oberfläche aus. Der morphologische Vergleich der unterschiedlich behandelten Zellen zur Kontrolle ließ einen Verlust des dreidimensionalen Wachstums erkennen (Abbildung 10a). Die Ausbildung sphäroidähnlicher Strukturen reduzierte sich nach 5 Tagen fraktionierter Bestrahlung mit 2 Gy um 66 %. Die TMZ- und die TMZ + 2 Gy-Kombinationsbehandlung führten nahezu zum kompletten Verlust des dreidimensionalen Wachstums. Außerdem begann sich das Vernetzungsmuster der Zellkörper untereinander unter TMZ-Einfluss und Kombinationsbehandlung stark zu verändern. Es wurde zunehmend chaotisch.

Im Gegensatz dazu wuchsen U138-Zellen in polygonaler Form adhärent als Monolayer und veränderten ihre Morphologie und ihr Wachstumsverhalten unter der Behandlung nicht (Abbildung 10b).

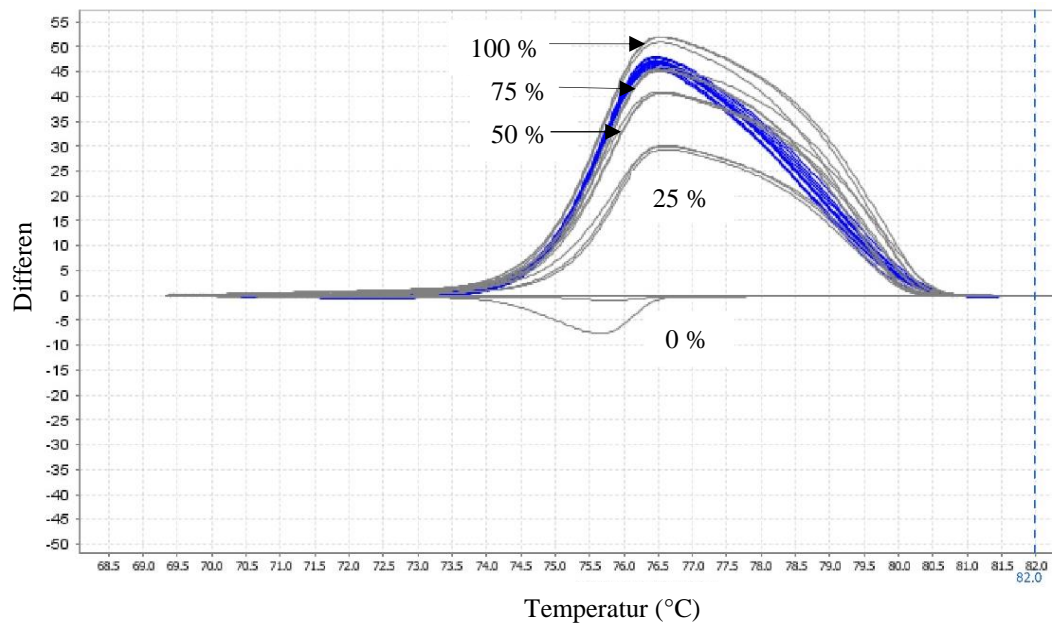
3.3.2 MGMT-Promotormethylierung nach 5 Tagen fraktionierter Bestrahlung mit 2 Gy

Zunächst wurde auch diesmal mit HRM untersucht, ob sich am Methylierungsgrad des MGMT-Promotors durch die verschiedenen Behandlungen etwas ändern würde. U87-Zellen wiesen sowohl nach 24 h (Abbildung 11a), als auch nach 5 d (Abbildung 11b) einen Methylierungsgrad zwischen 75 % und 100 % auf, wogegen der Promotor in U138-Zellen mit 0 % - 8 % zu beiden Zeitpunkten als unmethyliert gewertet werden konnte (Abbildung 11c, d). Die verschiedenen Behandlungen hatten bei beiden Zelllinien keine Auswirkungen auf den MGMT-Promotormethylierungsgrad.

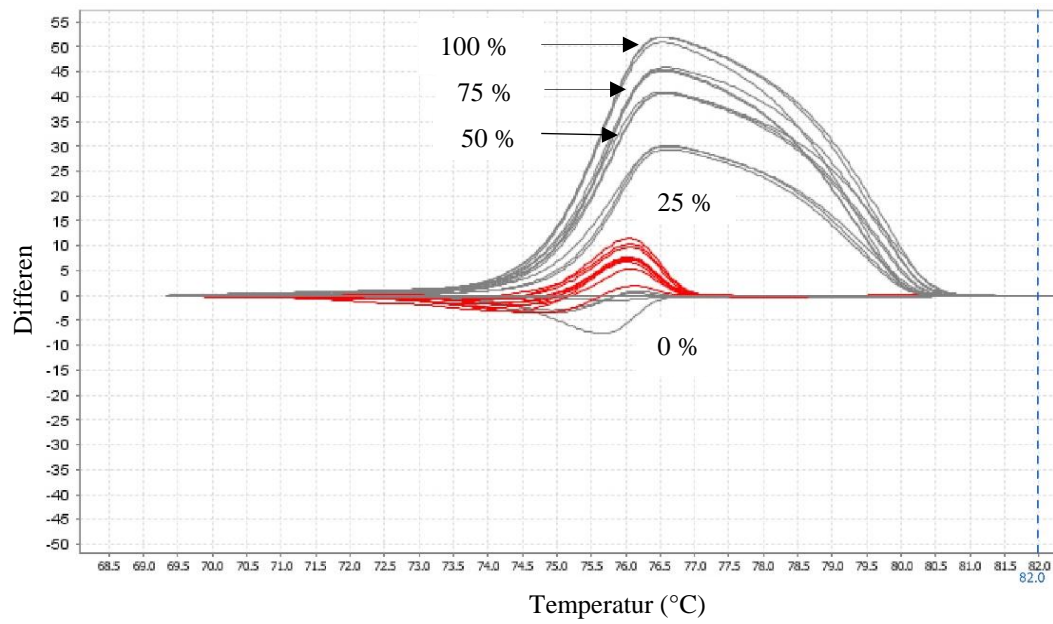
11a)



11b)



11c)



11d)

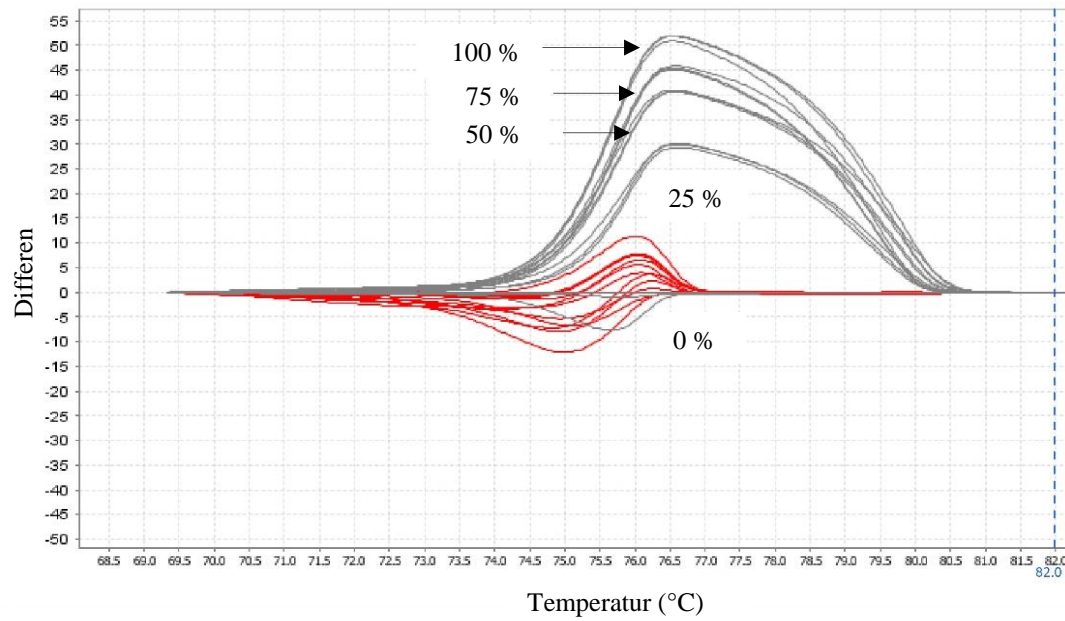


Abbildung 11: Methylierungsgrad von GBM-Zelllinien nach fraktionierter Bestrahlung mit 2 Gy, n=3. In Grau sind die Quantifizierungsstandards aufgezeichnet. a) U87 nach 24 h und b) nach 5 d. c) U138 nach 24 h und d) nach 5 d. Die blauen bzw. roten Kurven setzten sich jeweils aus Kontrolle, 2 Gy, 5 Gy, TMZ, TMZ + 2 Gy, TMZ + 5 Gy zusammen.

3.3.3 MGMT-mRNA-Expression nach 5 Tagen fraktionierter Bestrahlung mit 2 Gy

Da die HRM-Untersuchungen keine therapieinduzierten Veränderungen im MGMT-Promotorstatus erkennen ließen, der U87-Promotor stark methyliert war, während der U138-Promotor unmethyliert blieb, wurde für U87-Zellen keine und für U138-Zellen eine starke MGMT-mRNA-Expression erwartet.

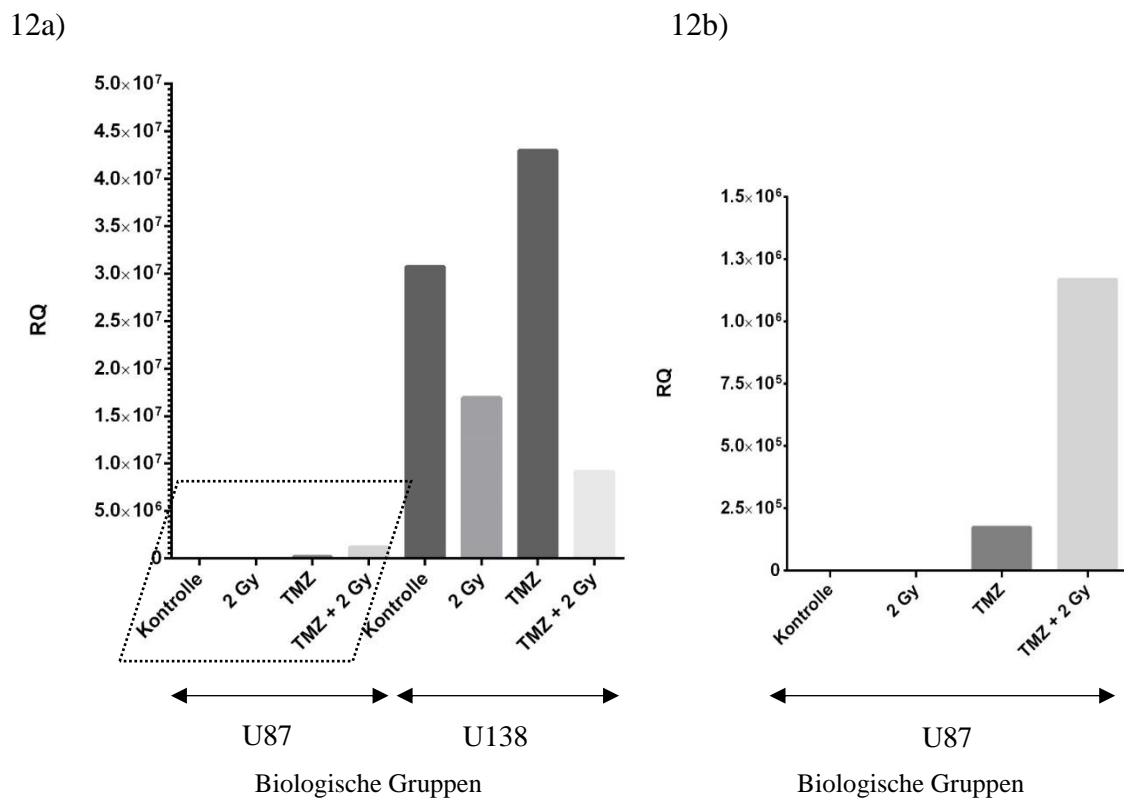


Abbildung 12: Quantitative PCR zum Nachweis der MGMT-mRNA-Expression von GBM-Zelllinien. a) Vergleich von U87- und U138-Zellen. b) Ausschnittsvergrößerung (Kasten in a) von U87 zur Verdeutlichung des MGMT-mRNA-Anstiegs unter TMZ- und Kombinationsbehandlung.

Diese Erwartung wurde in den qPCR-Untersuchungen auch zunächst bestätigt (Abbildung 12). Ein genauerer Blick ergab dann aber eine Überraschung. Während bei U87-Kontrollzellen und den mit 2 Gy über 5 Tage fraktioniert bestrahlten Zellen keine MGMT-mRNA nachweisbar war, induzierte die TMZ-Behandlung eine Expression von MGMT-mRNA, und in der Kombinationsbehandlung war sogar eine Zunahme von 571 % gegenüber der alleinigen TMZ-Behandlung beobachtbar (Abbildung 12b). Im

Vergleich zur MGMT-mRNA-Expression bei U138-Zellen blieb diese Expression aber marginal (Abbildung 12a).

Während die TMZ-Behandlung bei U138-Zellen ebenfalls zu einer Steigerung der MGMT-mRNA-Expression um 39,93 % im Vergleich zur Kontrolle führte, bewirkte die alleinige Bestrahlung eine Verringerung um 44,88 % und in der Kombinationsbehandlung sogar um 70,26 % (Abbildung 12a).

3.3.4 MGMT-Proteinexpression nach 5 Tagen Bestrahlung

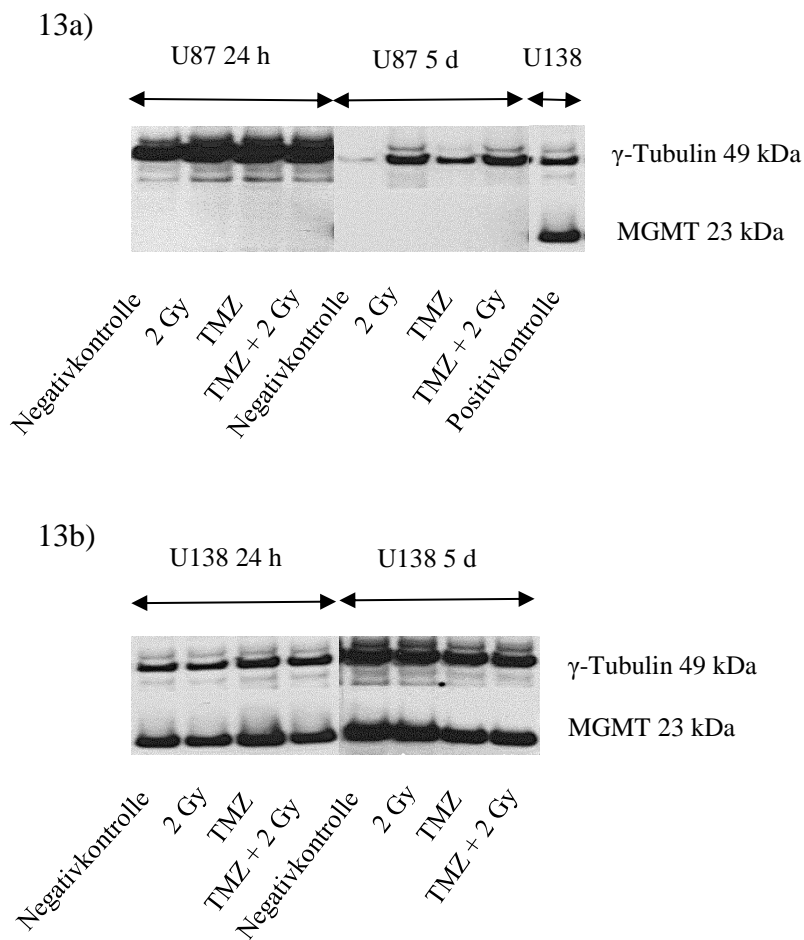


Abbildung 13: MGMT-Proteinexpression von GBM-Zelllinien im Western-Blot nach 24 h und 5 d fraktionierter Bestrahlung. Das Haushaltsgen γ -Tubulin fungierte als Ladekontrolle (49 kDa). U138-Zelllysate diente als Positivkontrolle für die MGMT-Proteinexpression (23 kDa). Die Negativkontrollen wurden keinerlei Behandlung ausgesetzt. a) U87-Zellen und b) U138-Zellen.

Die überraschenden behandlungsinduzierten Veränderungen in der MGMT-mRNA-Expression sowohl bei U87- als auch bei U138-Zellen führten zu der Frage, ob sich dies auch auf Proteinebene widerspiegeln würde. Daher wurden nach 24 h und 5 d fraktionierter Bestrahlung Western-Blots durchgeführt (Abbildung 13). U87-Zellen exprimierten keine, U138-Zellen hohe Konzentrationen an MGMT-Protein. Bei beiden Zelllinien konnten keine Veränderungen in der Expressionsstärke festgestellt werden, egal wie und wie lange die Zellen zuvor behandelt worden waren.

4 Diskussion

Das GBM ist der aggressivste Hirntumor des Erwachsenen. Aufgrund seines invasiven Wachstums ist eine makro- und mikroskopische Abgrenzung von gesunder Hirnmasse schwierig, so dass trotz bestmöglicher Resektionsbemühungen eine komplette Entfernung des Tumors nicht möglich ist.

Die der OP folgende Radiochemotherapie und anschließende adjuvante TMZ-Gabe nach dem Stupp-Schema führen nur zu einer Verlängerung des Überlebens, aber nicht zu einer Heilung. Die Prognose für Patienten mit einem GBM bleibt daher äußerst ungünstig. Nur 3 - 5 % der Patienten überleben als Langzeitüberleber mehr als 3 Jahre nach der Diagnosestellung (Krex et al., 2007).

Die Methylierung des MGMT-Genpromotors ist ein wichtiger prognostischer Faktor für das Ansprechen des Patienten auf DNA-alkylierende Chemotherapeutika wie TMZ (Smrdel et al., 2016), (Stupp et al., 2005), (Parkinson et al., 2008). Zusammen mit einer möglichst kompletten Tumorresektion ist sie der wichtigste Faktor für ein positives Therapieansprechen des Patienten (Felsberg et al., 2009). Allerdings ist der MGMT-Genpromotor in 80 % aller diagnostizierten GBM unmethyliert (Gerson et al., 2002). Diese Patienten profitieren von den bisherigen Behandlungsfortschritten nahezu gar nicht (Smrdel et al., 2016), so dass die Forschung unter anderem hier ansetzt, um die infauste Prognose zu verbessern.

Der MGMT-Genpromotormethylierungsstatus kann sich im Krankheitsverlauf ändern. Ein solches Beispiel ist in Abbildung 6 gezeigt, wo ein ursprünglich methylierter MGMT-Promotor im Rezidivfall ein Jahr später unmethyliert war. Ein anderes Beispiel wird von Tanaka et al. beschrieben. Ein Patient hatte ursprünglich ein Epitheloidzell-GBM mit methyliertem Promotor. Nach Entfernung des Tumors mit Hilfe von 5-ALA rezidierte er nach 5, 13, 15 und 23 Monaten. Nach 15 Monaten war das 4. Rezidiv dann unmethyliert. Auch änderte sich das zelluläre Erscheinungsbild des Tumors und er wurde histopathologisch nun als reguläres GBM klassifiziert (Tanaka et al., 2011).

Dies sind jedoch keine anekdotischen Einzelfälle. Von 16 Patienten, die nach Tumorresektion, Radiotherapie und adjuvanter Chemotherapie ein Rezidiv entwickelten, waren die Tumoren von 5 Patienten bei der Erstdiagnose unmethyliert und 11 waren methyliert. Von den 5 unmethylierten Tumoren wechselte einer im Rezidivfall zum methylierten Status, während von den 11 anfangs methylierten Tumoren drei im Rezidiv zum unmethylierten Zustand wechselten (Jung et al., 2010).

Eine weitere Studie mit 38 Teilnehmern ergab bei Erstdiagnose 13 methylierte Tumoren, die in 8 Fällen im Rezidiv zum unmethylierten Zustand wechselten. Von 25 ursprünglich unmethylierten Tumoren wiesen 6 im Rezidiv eine Methylierung auf. Ein MGMT-Genpromotormethylierungsstatuswechsel ist also in beide Richtungen möglich, wobei der Wechsel von unmethyliert zu methyliert bei 20 - 24 % der Fälle auftritt, im Gegensatz zum umgekehrten Fall, der mit 27 - 62 % wesentlich häufiger ist (Brandes et al., 2010).

Der Grund für diesen Wechsel ist bislang noch unbekannt, könnte aber behandlungsinduziert sein und in einer Anpassung des Tumors an die TMZ-Behandlung mit Resistenzbildung liegen. Hier setzen die Untersuchungen meiner Arbeit an. Es wurde an der humanen GBM-Zelllinie U87 und U138 untersucht, ob sich der Methylierungsgrad des MGMT-Genpromotors und die Expression der MGMT-mRNA und des Proteins durch Radiochemotherapie verändert. Vorarbeiten hatten gezeigt, dass U87-Zellen einen methylierten MGMT-Promotor aufwiesen und keine MGMT exprimierten, während U138-Zellen einen unmethylierten Promotor hatten und das MGMT-Protein in großen Mengen nachweisbar war (A. Stöbl, persönliche Mitteilung), (Costello et al., 1994).

In keinem meiner Experimente war eine Veränderung der MGMT-Promotormethylierung oder der mRNA- bzw. Proteinexpression nachweisbar. Lediglich nach 5 Tagen fraktionierter Bestrahlung mit konkomitanter TMZ-Chemotherapie gab es bei U87-Zellen auf mRNA-Ebene eine leichte Erhöhung, die sich aber nicht in einer Änderung des MGMT-Promotormethylierungsgrades oder der Proteinexpression widerspiegelte und die im Vergleich zur MGMT-mRNA-Expression durch U138-Zellen

auch nur marginal ausfiel. Diese Ergebnisse konnten mittlerweile unabhängig reproduziert werden (A. Sasse, persönliche Mitteilung).

Meine Daten stehen im Einklang mit Untersuchungen zur GBM-Zelllinie U343, die einen methylierten MGMT-Promotor haben und weder MGMT-mRNA noch MGMT-Protein exprimieren. Auch hier wurden nach Radiochemotherapie mittels Methylierungsspezifischer PCR (MSP) keine Änderungen des MGMT-Promotormethylierungsstatus festgestellt (Jung et al., 2010).

Im Gegensatz zu diesen Behandlungen konnte in U87- und U138-Zellen eine TMZ-Resistenz durch oxidativen Stress induziert werden, die auf einem anderen Mechanismus beruhte. Der Transkriptionsfaktor NRF2 beeinflusst unter anderem die Bildung von antioxidativen Enzymen zur Synthetisierung des freien Radikalfängers Glutathion. Sowohl die NRF2-, als auch die Glutathionkonzentrationen konnten durch TMZ-Behandlung um das Zwei- bis Dreifache gesteigert werden, wodurch die GBM-Zellen sowohl *in vitro* in der Zellkultur, als auch *in vivo* im Mausmodell unempfindlicher gegenüber TMZ-Behandlungen wurden (Rocha et al., 2016).

Bei solchen transkriptionsfaktorvermittelten Expressionsänderungen handelt es sich um sehr schnelle Regulationsereignisse, wogegen Veränderungen der epigenetischen Regulation, wie sie die Methylierung bzw. Demethylierung des MGMT-Promotors darstellt, längere Zeiträume zu beanspruchen scheinen. Wahrscheinlich waren einfach die Versuchszeiträume zu kurz, um die bei Patienten beobachteten Veränderungen des MGMT-Methylierungsstatus experimentell nachbilden zu können. In Folgeversuchen wird dieser Aspekt aufgegriffen werden.

4.1 Ausblick

Der therapeutische Eingriff in die MGMT-Expression oder -Aktivität könnte GBM-Patienten zu Gute kommen, die einen unmethylierten MGMT-Promotor haben und bislang nur wenig von der TMZ-Chemotherapie profitieren.

O⁶-Benzylguanin ist ein Inhibitor der MGMT. Es bindet an das aktive Zentrum der MGMT und wird zu S-Benzylcystein umgesetzt. Dadurch wird die MGMT daran gehindert Alkylgruppen von der DNA zu entfernen. O⁶-Benzylguanin befindet sich in einer Phase 2 Studie (Pegg et al., 1993), (Quinn et al., 2005), (Weingart et al., 2007), (Quinn et al., 2009).

Ein weiterer MGMT-Inhibitor ist Disulfiram, welches mit Cysteinen im reaktiven Zentrum der MGMT interagiert und das Enzym inhibiert (Abb. 2). In der GBM-Zelllinie UW228 konnte so eine MGMT-Inhibition von über 90 % erreicht werden (Paranjpe et. al, 2014).

Für die Entwicklung und Evaluierung solcher neuen Therapieansätze wären experimentelle Resistenzmodelle, wie sie in der vorliegenden Arbeit in einem ersten Schritt initiiert wurden, sehr hilfreich.

5 Zusammenfassung

Aufgrund seiner infausten Prognose und des häufigen Auftretens nimmt das GBM unter den Hirntumoren eine besondere Rolle ein. Viele intrazelluläre Signalwege und Tumormarker sind bereits gut erforscht und verstanden. Hierzu gehört auch der epigenetisch determinierte Methylierungsgrad des MGMT-Genpromotors. Die Bestimmung des MGMT-Status gehört bei allen Patienten mittlerweile zur Standarddiagnostik, um den Effekt der Radiochemotherapie auf den Tumor zu prognostizieren. Ist der MGMT-Genpromotor unmethyliert, haben alkylierende Substanzen wie TMZ nur einen geringen Effekt auf die Tumorzellen. Solche Patienten profitieren kaum von der Standardtherapie nach dem Stupp-Schema. Es sind jedoch Fälle aufgetreten, bei denen sich der Methylierungsgrad des MGMT-Genpromotors im Behandlungsverlauf der Patienten verändert hat.

Aufgrund dessen untersuchte ich in meiner Arbeit, ob man Änderungen im MGMT-Genmethylierungsstatus und in der MGMT-Genexpression auf mRNA- und Proteinebene unter Nachahmung der Standardtherapie experimentell auslösen kann. Mit den verwendeten Versuchsansätzen konnte ich in der Zellkultur keine Veränderungen feststellen. Lediglich auf mRNA-Ebene konnte nach 5 Tagen fraktionierter Bestrahlung bei der methylierten Zelllinie U87 eine leichte Steigerung der MGMT-mRNA-Expression verzeichnet werden. Diese Expressionssteigerung stand allerdings nicht im Zusammenhang mit einer Änderung des MGMT-Methylierungsstatus und spiegelte sich auch nicht auf Proteinebene wider.

Dieses Ergebnis lässt weitere Forschungen in die Richtung der therapieinduzierten Änderungen am MGMT-Genpromotor sinnvoll erscheinen, um letztendlich die Therapie am Patienten effektiver und individueller zu gestalten und das mediane Überleben sowie die Lebensqualität unter der Behandlung vor allem für Patienten mit unmethyliertem MGMT-Genpromotor zu verbessern.

6 Verzeichnisse

6.1 Abkürzungsverzeichnis

AIC	5-Aminoimidazol-4-carboxamid
BCNU	1,3-Bis-(2-chloroethyl)-1-nitrosoharnstoff
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
conv. DNA	konvertierte Desoxyribonukleinsäure
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
D10	Dosis, um 10 % überlebende Zellen zu generieren
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAM	6-Carboxyfluorescein
FCS	Fetales Kälberserum
FET	Fluoreszenz-Energie-Transfer
GBM	Glioblastoma multiforme
HCl	Salzsäure
HRM	High Resolution Melting
kb	Kilobasen
LDS	Lithiumdodecylsulfat
MES	2-(n-morpholino)-Ethansulfonsäure
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MTIC	5-(3-Methyltriazin-1-yl)-imidazol-4-carboxamid
MU	Monitoreinheiten
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NEAA	nicht essentielle Aminosäuren
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Plating Efficiency
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat

SF2	Überlebende Fraktion bei 2 Gy
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TMZ	Temozolomid
VIC®	4,7,2-trichloro-7-phenyl-6-carboxyfluorescin

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bestrahlungsbedingungen für den Kolonietest.....	21
Tabelle 2: Verwendete Zellzahlen für die Kolonietests	22
Tabelle 3: Mischungsverhältnisse der 100 % und 0 % methylierten DNA für Quantifizierungsstandards	29
Tabelle 4: HRM Zyklen.....	30
Tabelle 5: PE, SF 2, D10 der GBM-Zelllinien U87 und U138	37

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Diagnostisch wichtige Marker bei Gliomen (modifiziert nach Capper & Reifenberger, 2015).....	3
Abbildung 2: Struktur und Aktivierungsweg der Prodrug TMZ (modifiziert nach Zhang et al. 2012)	8
Abbildung 3: Kaplan-Meier-Analyse der Überlebensrate abhängig vom MGMT-Methylierungsstatus (Hegi et al., 2008).....	9
Abbildung 4: Der durch MGMT vermittelte DNA-Reparaturprozess (modifiziert nach Zhang et al. 2012)	10
Abbildung 5: Funktionsweise TaqMan-Sonden (Jacob, 2013)	31
Abbildung 6: Änderung des Methylierungsgrades des MGMT-Promotors eines Patienten der neurochirurgischen Universitätsklinik Würzburg	34
Abbildung 7: Überlebenskurven von GBM-Zelllinien.....	36
Abbildung 8: Methylierungsgrad von GBM-Zelllinien 24 h nach Bestrahlung.....	39
Abbildung 9: MGMT-Proteinexpression von GBM-Zelllinien im Western Blot nach 24 h Bestrahlung	40
Abbildung 10: Lichtmikroskopische Aufnahmen von GBM-Zelllinien nach 5 d fraktionierter Bestrahlung	42
Abbildung 11: Methylierungsgrad von GBM-Zelllinien nach fraktionierter Bestrahlung mit 2 Gy.....	44
Abbildung 12: Quantitative PCR zum Nachweis der MGMT-mRNA-Expression von GBM-Zelllinien	46
Abbildung 13: MGMT-Proteinexpression von GBM-Zelllinien im Western-Blot nach 24 h und 5 Tagen fraktionierter Bestrahlung	47

6.4 Literaturverzeichnis

- Alonso et al. (2007). Adenovirus based strategies overcome temozolomide resistance by silencing the O6-Methylguanine-DNA-Methyltransferase Promoter. *Cancer Research*, Vol. 67, S. 11499-11504.
- Brandes et al. (2010). O6-methylguanine-DNA-methyltransferase methylation status can change between first surgery for newly diagnosed glioblastoma and second surgery for recurrence: clinical implications. *Journal of Neuro-Oncology*, Vol 12, S. 283-288.
- Brigliadori et al. (2016). Defining the cutoff value of MGMT gene promoter methylation. *Journal of Neurooncology*, Vol. 128, S. 333-339.
- Bush & Butowski. (2017). The Effect of Molecular Diagnostics on the Treatment of Glioma. *Current Oncology Reports*, Vol. 19, S. 1-9.
- Cai et al. (2015). Loss of ATRX, associated with DNA methylation pattern of chromosome end, impacted biological behaviors of astrocytic tumors. *Oncotarget*, Vol. 6, S. 18105-18115.
- Cairncross et al. (2013). Phase III Trial of Chemoradiotherapy for Anaplastic Oligodendroglioma: Long-Term Results of RTOG 9402. *Journal of Clinical Oncology*, Vol. 31, S. 337-343.
- Capper, & Reifenberger. (2015). Klassifikation von Gliomen: Aktuelle Fortschritte und Perspektiven. *Der Nervenarzt*, Vol. 86, S. 672-683.
- Costello et al. (1994). Graded methylation in the promoter and body of the MGMT Gene correlates with MGMT expression in human glioma cells. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 269, S. 17228-17237.
- Dang et al. (2009). Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*, Vol. 462, S. 739-757.
- Douglas, & Kirkpatrick. (1984). The first primary brain tumor operation. *Journal of Neurosurgery*, Vol. 61, S. 809-813.
- Feiden. (11. Auflage 2008). Nervensystem und Sinnesorgane. In Grundmann, *Allgemeine Pathologie* (S. 503ff.). Elsevier Urban & Fischer.
- Felsberg et al. (2009). Prognostic significance of molecular markers and extent of resection in primary glioblastoma patients. *Clinical Cancer Research*, Vol. 15, S. 6683-6693.
- Ferreira et al. (2016). An update on the epigenetics of glioblastoma. *Epigenomics*, Vol. 10, S. 2217-2226.

- Garden et al. (1991). Outcome and patterns of failure following limited-volume irradiation for malignant astrocytomas. *Radiotherapy and Oncology*, Vol. 20, S. 99-110.
- Gerson et al. (2002). Clinical Relevance of MGMT in the Treatment of Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, Vol. 20, S. 2388-2399.
- Hadziahmetovic et al. (2011). Recent advancements in multimodality treatment of gliomas. *Future Oncology*, Vol. 7, S. 1169-1183.
- Hartmann et al. (2010). Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas. *Acta neuropathologica*, Vol. 12, S. 707-718.
- Hegi et al. (2004). Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. *Clinical Cancer Research*, Vol. 10, S. 1871-1874.
- Hegi et al. (2005). MGMT Gene Silencing and Benefit from TMZ in GBM. *The New England Journal of Medicine*, Vol. 352, S. 997-1003.
- Hegi et al. (2008). Correlation of O6-methylguanine-methyltransferase promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate mgmt activity. *Journal of Clinical Oncology*, Vol. 28, S. 4189-4199.
- Hess et al. (1994). Malignant glioma: patterns of failure following individually tailored limited volume irradiation. *Radiotherapy and Oncology*, Vol. 30, S. 146-149.
- Hottinger et al. (2016). Tumor treating fields: a novel treatment modality and its use in brain tumors. *Journal of Neuro-Oncology*, Vol. 18, S. 1338-1349.
- Hundsberger. (2003). Temozolomid in der Behandlung maligner Gliome. *Aktuelle Neurologie* Vol. 4, S. 184-187.
- Jacob. (2013). Erkennung von Regulationssequenzen für die Transkription in heterologen Systemen. *Dissertation*, S. 53.
- Jung et al. (2010). Changes of the O6-methylguanine-DNA-methyltransferase promoter methylation and MGMT protein expression after adjuvant treatment in glioblastoma. *Oncology Reports* Vol. 23, S. 1269-1276.
- Kaina et al. (2010). Targeting O6-methylguanine-DNA methyltransferase with specificinhibitors as a strategy in cancer therapy. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Vol. 67, S. 3663-3681.

- Karsy et al. (2017). New Molecular considerations for glioma: IDH, ATRX, BRAF, TERT, H3K27M. *Cuerrent Neurology and Neuroscience Reports*, Vol. 17, S. 1-13.
- Krex et al. (2007). Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brainstorm*, Vol. 130, S. 2596-2606.
- Laperriere et al. (2002). Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. *Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* Vol. 64, S. 259-273.
- Lorentz, & Rittmeyer. (Oktober 2012). Relationship between allergy and cancer: an overview. *International Archives of Allergy and Immunology* Vol. 159, S. 216-225.
- Louis et al. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors. *Acta neuropathologica*, Vol. 131, S. 803-820.
- Masuhr, Neumann. (6. Auflage 2007). Neurologie. MLP Duale Reihe, Thieme.
- Moskowitz et al. (2006). Role of M1B1 in predicting survival of patients with glioblastomas. *Journal of Neuroonkology*, Vol. 76, S. 193-200.
- Neglia et al. (1991). Second neoplasms after acute lymphoblastic leukemia in childhood. *The New England Journal of Medicine* Vol. 325, S. 1330-1336.
- Newlands et al. (1992). Phase I trial of temozolomide (CCRG 81045: M&B 39831: NSC 362856). *Britisch Journal of Cancer*, Vol. 65, S. 287-291.
- Noushmer et al. (2010). Identification of a CpG Island Methylator Phenotype that Defines a Distinct Subgroup of Glioma. *Cancer Cell*, Vol. 17, S. 510-522.
- Ohgaki. (2009). Epidemiology of Brain Tumors. In Verma, & Mukesh, *Methods of Molecular Biology*, Vol. 472 (S. 323-342). Springer.
- Ohgaki, & Kleihues. (2009). Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Science*, Vol. 100, S. 2235-2241.
- Ohgaki, & Kleihues. (2013). The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma. *Clinical Cancer Research*, Vol. 19, S. 764-773.
- Ostrom et al. (Juli 2014). The epidemiology of glioma in adults: a state of science review. *Journal of Neuro Oncology*, Vol. 16, S. 896-913.
- Ostrom et al. (2015). Epidemiology of Gliomas. In J. Raizer, & A. Parsa, *Current Understanding and Treatment of Gliomas*, *Cancer Treatment and Research* (S. 1-14). Springer International Publishing Switzerland.

- Paranjpe et al. (2014). Disulfiram is a direct and potent inhibitor of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in brain tumor cells and mouse brain and markedly increases the alkylating DNA damage. *Carcinogenesis*, Vol. 35, S. 692-702.
- Parkinson et al. (2008). Variation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation in serial samples in glioblastoma. *Journal of Neurooncology*, Vol. 87, S. 71-78.
- Parsons et al. (2008). An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. *Science Magazine*, Vol. 321, S. 1807-1812.
- Pegg et al. (1993). Mechanism of Inactivation of human MGMT by O6-Benzylguanine. *Journal of Biochemistry*, Vol. 32, S. 11998-12006.
- Perry, & Wesseling. (2016). Histologic classification of gliomas. *Handbook of Clinical Neurology*, Vol. 124, S. 71-95.
- Quinn et al. (2005). Phase I trial of temozolomide plus O6-benzylguanine for patients with recurrent or progressive malignant glioma. *Journal of Clinical Oncology*, Vol. 23, S. 7178-7187.
- Quinn et al. (2009). Phase II Trial of Temozolomide Plus O6-Benzylguanine in Adults With Recurrent, Temozolomide-Resistant Malignant Glioma. *Journal of Clinical Oncology*, Vol. 27, S. 1262-1267.
- Reuss et al. (2015). ATRX and IDH1-R132H immunohistochemistry with subsequent copy number analysis and IDH sequencing as a basis for an integrated diagnostic approach for adult astrocytoma, oligodendroglioma and glioblastoma. *Acta Neuropathologica*, Vol. 129, S. 133-146.
- Reuss et al. (2015). ATRX and IDH1-R132H immunohistochemistry with subsequent copy number analysis and IDH sequencing as a basis for an „integrated“ diagnostic approach for adult astrocytoma, oligodendroglioma and glioblastoma. *Acta neuropathologica*, Vol. 129, S. 133-146.
- Rocha et al. (2016). NRF2 and Glutathione are key resistance mediators to temozolomide in glioma and melanoma cells. *Oncotarget*, Vol. 7, S. 48081-48092.
- Sahm et al. (2012). Addressing Diffuse Glioma as a Systemic Brain Disease With Single-Cell Analysis. *Archives of Neurology*, Vol. 69, S. 523-526.
- Schild. (21. August 2016). Einführung in die Real Time TaqMan PCR-Technologie, Version 2.1. *7700 SDS Workshop, Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt*, S. <https://www.core-facility.uni-freiburg.de/qpcrddpcr/lc480obj/sdsman>.

- Schwartzbaum et al. (2012). Association between prediagnostic IgE levels and risk of glioma. *Journal of National Cancer Institute*, Vol. 104, S. 1251-1259.
- Smrdel et al. (2016). Long-term survival in glioblastoma: MGMT promoter methylation as independent favourable prognostic factor. *Radiology and Oncology*, Vol. 50, S. 394-401.
- Stummer et al. (2000). Fluorescence guided resectin of gbm by using 5-ALA induced porphyrins: a prospective study in 52 consecutive patients. *Journal of Neurosurgery*, Vol. 93, S. 1003-1013.
- Stupp et al. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *New England Journal of Medicine* Vol. 352, S. 987-996.
- Stupp et al. (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*, Vol. 10, S. 434-435.
- Stupp et al. (2015). Maintenance Therapy With Tumor-Treating Fields Plus Temozolomide vs Temozolomide Alone for Glioblastoma, a randomised Clinical Trial. *Journal of the American Medical Association*, Vol. 314, S. 2535-2543.
- Tanaka et al. (2011). Epitheloid GBM changed to typical GBM: the methylation status of mgmt promoter and 5-ALA fluorescence. *The Japan Society of Brain Tumor Pathology*, Vol. 28, S. 59-64,.
- Tate. (2015). Surgery for Gliomas. In J. Raizer, & A. Parsa, *Current Understanding and Treatment of Gliomas* (S. 31-47). Springer.
- Thermofisher. (22. August 2016). Von <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/gallery/high/4919.jpg> abgerufen
- Ullrich et al. (2008). Neuroimaging in patients with gliomas. *Seminars in Neurology*, Vol. 28, S. 484-494.
- van den Bent et al. (2006). Phase II study of first-line chemotherapy with temozolomide in recurrent oligodendroglial tumors: the European Organization for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Group Study 26971. *Journal of Clinical Oncology* Vol. 21, S. 2525-2528.
- Walker et al. (1978). Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. *Journal of Neurosurgery* Vol. 49, S. 333-343.

- Walker et al. (1979). An analysis of dose-effect relationship in the radiotherapy of malignant gliomas. *International Journal of Radiation Oncology-Biology-Physics*, Vol. 5, S. 1725-1731.
- Weingart et al. (2007). Phase I trial of polifeprosan 20 with carmustine implant plus continuous infusion of intravenous O6-benzylguanine in adults with recurrent malignant glioma: New Approaches to Brain Tumor Therapy CNS Consortium trial. *Journal of Clinical Oncology*, Vol. 25, S. 399-404.
- Weller et al. (2006). Diagnostik des GBM: Standards und neue Entwicklungen. *Der Onkologe*, Vol. 12, S. 500-507.
- Wiestler. (1998). Pathologische Anatomie und WHO Klassifikation der Tumoren des Nervensystems. In U. Schlegel, & M. Westphal, *Neuroonkologie* (S. 4-20). Thieme.
- Wirkung TMZ. (24. August 2016). Von <http://blogs.shu.edu/cancer/files/2016/07/TMZ-to-MTIC-to-apoptosis.png> abgerufen
- Xu W et al. (2011). Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of alpha-ketoglutarate-dependant dioxygenases. *Cancer Cell*, Vol. 19, S. 17-30.
- Yan et al. (2009). IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *New England Journal of Medicine*, Vol. 360, S. 765-773.
- Zanella. (1998). Bildgebung. In U. Schlegel, & M. Westphal, *Neuroonkologie* (S. S.56-59). Thieme.
- Zhang et al. (2012). Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance. *Current Molecular Pharmacology*, Vol. 5, S. 102-114.
- Zhang et al. (2013). IDH1/2 mutations target a key hallmark of cancer by deregulating cellular metabolism in glioma. *Journal of Neuroonkology*, Vol. 15, S. 1114-1126.
- Zhao et al. (2009). Glioma-Derived Mutations in IDH1 Dominantly Inhibit IDH1 Catalytic Activity and Induce HIF-1 α . *Science*, Vol. 324, S. 261-265.
- Zhao et al. (2013). Intraoperative Fluorescence-Guided Resection of High-Grade Malignant Gliomas Using 5-Aminolevulinic Acid-Induced Porphyrins: A Systematic Review and Metaanalysis of Prospective Studies. *PLOS One*, Vol. 8, S. 1-10.

Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei allen bedanken, ohne die das Fertigstellen dieser Arbeit unmöglich gewesen wäre.

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ralf-Ingo Ernestus für die Möglichkeit zur Erstellung einer experimentellen Dissertation an der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. Carsten Hagemann für die Übernahme der Doktorvaterschaft, die Überlassung des Themas dieser Dissertation und die engagierte Betreuung sowie Korrektur des Manuskripts. Seine wissenschaftliche Versiertheit und Erfahrung sowie die konstruktiven Ratschläge haben diese Arbeit wesentlich geprägt.

Ein ebenso großer Dank sei Herrn Prof. Dr. Matthias Eyrich für die Übernahme des Koreferats angediehen.

Vor allem möchte ich auch Frau Siglinde Kühnel und Frau Elisabeth Karl danken. Sie brachten mir die Grundlagen der Laborarbeit bei und begleiteten mit ihrer Erfahrung und Hilfsbereitschaft die Durchführung meiner experimentellen Versuche.

Vielen Dank auch an Frau Dr. Gisela Wohlleben, die mir bei der Zellbestrahlung, der Durchführung der Kolonietests und deren Auswertung tatkräftig zur Seite stand.

Nicht hoch genug einzuschätzen ist die Leistung meiner Eltern. Sie haben mir das Studium der Zahnheilkunde und die anschließende Dissertation erst ermöglicht und sind der Rückhalt und die Unterstützung in allen Lebenslagen. Im selben Atemzug danke ich auch meinem Mann für seine permanent geduldige Motivation und Unterstützung.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Müller-Ritz, geb. Ritz
Vorname: Johanna
Geburtsort: Schweinfurt
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung

Schulische Bildung

September 1997-Juli 2001 Grundschole Poppenlauer
September 2001-Juni 2010 Olympia-Morata-Gymnasium Schweinfurt
Neusprachlicher Zweig
Abitur Schnitt 1,5

Akademische Bildung

Oktober 2010-November 2015 Studium der Zahnheilkunde an der Julius-
Maximilians-Universität Würzburg
November 2015 Zahnärztliche Prüfung mit der Gesamtnote „gut“
abgeschlossen, Erlangung der Approbation

Dissertation

Januar 2016-Juni 2018 „Änderung des MGMT-Status in humanen
Glioblastomzelllinien“

Doktorvater: Herr Priv.-Doz. Dr. C. Hagemann

Berufliche Tätigkeit

Oktober 2016-November 2016 Assistenz Zahnärztin in niedergelassener
Praxis in Bergtheim
Seit November 2016 Assistenz Zahnärztin in niedergelassener
Praxis in Karlstadt