

Aus dem Bereich
Innere Medizin der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes
in Homburg/Saar

Neue Interaktionen der
Notch- und p53/63/73-Signalwege beim Glioblastom:
***Jagged1* als direktes p73-Zielgen**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes
2017

vorgelegt von:

Sandra Reichrath

geb. am 22.09.1974 in Kehl

„Die Suche nach dem *Selbst* kann ungefähr so aussehen:

Man betritt das Gehirn durch das Auge,
läuft den optischen Nerv bergauf,
geht dann im Cortex herum
und schaut hinter jedes Neuron,
und dann,
bevor man es sich versieht,

erreicht man auf dem Spike eines motorischen Nervenimpulses wieder das Tageslicht, kratzt sich am Kopf
und wundert sich wo das *Selbst* ist.“

Daniel Dennett

Meiner kleinen Familie



Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
1.1 Deutsche Zusammenfassung	1
1.2 Englische Zusammenfassung (Summary)	2
2 Einleitung	3
2.1 Die Gliome	3
2.1.1 Gliazellen – viele verschiedene Zelltypen mit unterschiedlichen Aufgaben	3
2.1.2 Die Gliome – Epidemiologie und aktuelle WHO Klassifikation (2016)	3
2.1.3 Glioblastoma multiforme – Prognose und Therapie	6
2.1.4 Molekularpathologie der Glioblastome	7
2.2 Der Notch-Signalweg	7
2.2.1 Notch-Rezeptoren, -Liganden und Zielgene	7
2.2.2 Translationale und post-translationale Regulation des Notch-Signalweges	10
2.2.3 Notch, Stammzellen, Tumor-assoziierte Neo-Angiogenese und Krebs	11
2.2.4 Der Notch-Signalweg beim Glioblastom	12
2.2.5 Cross-talk zwischen Notch-Signalweg und anderen Signalwegen bei Gliomen	13
2.3 Der p53-Signalweg	16
2.3.1 p53 – der Wächter des Genoms	16
2.3.2 Die p53-Familie	18
2.3.3 p73	20
3 Fragestellungen der Arbeit	22
4 Material und Methoden	23
4.1 Zellkultur	23
4.1.1 In vitro Kultivierung eukaryotischer Zellen	23
4.1.2 Medien und Lösungen für die Zellkultur:	25
4.1.3 Zellzählung	25
4.1.4 Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen	26
4.2 Behandlung der Zelllinien	26
4.2.1 Behandlung der Zelllinien mit Doxorubicin	26
4.2.2 Behandlung der Zelllinien mit ionisierender Strahlung	26
4.3 Transfektion eukaryotischer Zellen	27
4.3.1 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen	27
4.3.2 Stabile Transfektion eukaryotischer Zellen	29
4.3.2.1 Transformation von Bakterien	30
4.3.3 Kultivierung von E. coli	30
4.3.4 Herstellung von LB-Nährmedium und Agarplatten	31
4.3.5 Herstellung kompetenter Bakterien nach der Rubidiumchlorid-Methode (RbCl ₂ -Methode)	32
4.3.6 Transformation von Bakterien	33
4.3.7 Herstellung von Bakterienstämmen	34
4.3.8 Präparative Plasmid-DNA-Isolierung (Macherey-Nagel)	34
4.3.8.1 Lösungen zur präparativen Plasmid-DNA-Isolierung	35
4.3.9 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien: Minipräparation TENS-Methode (Mini-Präp)	36
4.3.10 Spektrometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren	36
4.3.11 Modifikationen von DNA	37

Inhaltsverzeichnis

4.3.11.1	Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen	37
4.3.11.2	Dephosphorylierung von DNA-Enden	37
4.3.11.3	Ligation von DNA-Fragmenten	38
4.3.11.4	Herstellung stabil-transfizierter Zelllinien mit Hilfe der retroviralen Infektion	38
4.3.11.5	Vektorkarten die zur Herstellung der stabilen Zelllinien zum Einsatz kamen	41
4.3.12	Agarosegelelektrophorese doppelsträngiger DNA	45
4.3.12.1	DNA-Größenmarker	45
4.3.13	DNA-Isolierung aus Agarosegelen	46
4.4	Migrationsassay	46
4.5	Analyseverfahren zum Nachweis und zur Quantifizierung von Proteinen	48
4.5.1	Herstellung von Proteinextrakten und Konzentrationsbestimmung	48
4.5.1.1	Zellaufschluß unter reduzierten Bedingungen	48
4.5.1.2	Proteinkonzentrationsbestimmung	49
4.5.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	49
4.5.2.1	Prinzip der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	49
4.5.2.2	Gießen eines SDS-PAGE-Gels und anschließende Elektrophorese	50
4.5.3	Western-Blot (Immunoblot)	52
4.5.3.1	Proteintransfer (Tank-Blot-System)	52
4.5.3.2	Immunologische Detektion von Proteinen	53
4.5.3.3	Proteinnachweis mittels „Enhanced Chemoluminescence“(ECL)	54
4.5.3.4	Proteingewichtsmarker	55
4.5.3.5	Elution/Mehrfachmarkierung der Membran nach Entfernen Membran-gebundener Antikörper	56
4.5.4	Co-Immunopräzipitation von Proteinen	56
4.5.4.1	Prinzip der Co-Immunopräzipitation von Proteinen	56
4.5.4.2	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)	57
4.5.5	Durchflusszytometrie (FACS – fluorescence activated cell sorting)	68
4.6	RNA-Techniken	69
4.6.1	RNA-Isolierung	69
4.6.1.1	RNA-Isolierung mit der Phenol-Chloroform-Methode	69
4.6.1.2	DNase-Verdau der RNA	70
4.6.1.3	Bestimmung der RNA-Konzentration	71
4.6.2	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	71
4.6.2.1	cDNA-Synthese: Reverse Transkription	71
4.6.2.2	Polymerase-Kettenreaktion	72
4.6.2.3	Agarose-Gelelektrophorese	74
4.6.2.4	Herstellung von Formaldehyd-Agarosegelen; Gelelektrophorese von RNA	75
4.7	Anhang	76
4.7.1	Reagenzien	76
4.7.2	Enzyme	80
4.7.3	Kommerzelle Kits	81
4.7.4	Tabelle 6: Primerverzeichnis	81
4.7.5	Tabelle 7: Antikörperverzeichnis	83
4.7.6	Materialien	84
4.7.7	Laborgeräte	85
5	Ergebnisse	87
5.1	Expression wichtiger Komponenten des Notch-Signalwegs in Glioblastomzelllinien	87
5.1.1	Wichtige Komponenten des Notch-Signalwegs werden in Glioblastomzelllinien auf RNA-Ebene differenziell exprimiert	87

Inhaltsverzeichnis

5.1.2	Protein-Expression von wichtigen Komponenten des Notch-Signalwegs in Glioblastomzelllinien	90
5.1.2.1	Western Blot Untersuchungen der Protein-Expression von wichtigen Komponenten des Notch Signalwegs in Glioblastomzelllinien	90
5.1.2.2	Das Expressionsprofil des Rezeptors Notch-4 und des korrespondierenden Liganden Jagged2 in der Durchflusszytometrie	93
5.2	Der Effekt von ionisierender Strahlung auf Glioblastomzellen in vitro	95
5.2.1	Morphologische Veränderungen von Glioblastomzellen nach Behandlung mit ionisierender Strahlung.	95
5.2.2	Expression von Jagged1 und Notch-4 nach einmaliger Behandlung mit ionisierender Strahlung	97
5.3	Assoziation der Expression von Jagged1 und p53 nach Behandlung von Glioblastomzelllinien mit dem Radiomimetikum Doxorubicin	99
5.4	Die Induktion der Jagged1-Expression durch ionisierende Strahlung korreliert mit der Expression des Transkriptionsfaktors p73	101
5.5	Knock down von TAp73 verhindert in Glioblastomzellen die Induktion der Expression von Jagged1 durch ionisierende Strahlung	104
5.6	Nachweis der TAp73-Bindung an die Promotorregion des Jagged1 Gens nach gamma-Bestrahlung	105
5.7	Stabile Transfektion von Glioblastomzelllinien mit Jagged1	110
5.7.1	Agarose Spot Assay: Einfluss der Überexpression von Jagged1 auf die chemotaktisch bedingte Zellwanderung von Gliomzelllinien (U373 und U87)	113
5.8	Zellkulturbedingungen beeinflussen die Expression von Jagged1 und von Mitgliedern der p53 Familie in Glioblastomzellen	115
6	Diskussion	117
6.1	Differentielle Expression von wichtigen Komponenten des Notch-Signalwegs in humanen Glioblastomzelllinien	117
6.2	Wechselwirkungen zwischen Notch-Signalweg und anderen Signalwegen bei Gliomen	121
6.3	Einfluss von Strahlen- oder Chemotherapie auf die Expression wichtiger Moleküle der Notch- und p53-Signalwege in GBM-Zelllinien	123
6.4	Hemmung der durch ionisierende Strahlung induzierten Expression von p73 und von Jagged1 nach p73 knockdown	128
6.5	Nachweis der direkten Bindung von p73 an den Jagged1-Promotor durch Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)	128
6.6	Jagged1-Expression und Wachstumsverhalten/ Malignitätsgrad von Glioblastomzellen	131
6.7	Einfluss von Zellkulturbedingungen auf die Expression von Komponenten der Notch- und p53-Signalwege	132
6.8	Modulation des Notch-Signalwegs als mögliche Therapieoption beim Glioblastom – aktuelle Konzepte und Perspektiven	133
6.9	Schlussfolgerungen und Ausblick	136
7	Literaturverzeichnis	137
8	Abbildungsverzeichnis:	154

Inhaltsverzeichnis

9	Tabellenverzeichnis:	156
10	Abkürzungsverzeichnis	157
11	Veröffentlichungen	161
12	Danksagung	163

1 Zusammenfassung

1.1 Deutsche Zusammenfassung

Neue Forschungsergebnisse unterstreichen die Bedeutung der funktionell teilweise überlappenden Notch- und p53/p63/p73-Signalwege für Pathogenese, Wachstumsverhalten und Therapie des Glioblastoms. Die dafür verantwortlichen molekularen Mechanismen sind jedoch bislang weitestgehend unbekannt. Ziel dieser Arbeit war es einen möglichen cross-talk zwischen dem Notch-Signalweg und der Transkriptionsfaktorfamilie p53/p63/p73 in Glioblastomzellen zu untersuchen. Wir charakterisierten die Expression wichtiger Komponenten des Notch-Signalwegs (Notch-Rezeptoren1-4; Notch-Liganden: Dll1, 3, 4; Jagged1,2) in humanen Glioblastomzelllinien (Tx3868, Tx3095, U373, U118, U87), wobei die Proteinexpression von Notch1 und Jagged1 mit dem p53-Status der Zelle korrelierte. Notch1 wurde ausschließlich, und Jagged1 wesentlich stärker, in Zellen mit mutiertem p53 (U373) exprimiert, verglichen mit Wildtyp-p53-Zellen (U87). In U373 Zellen war p73 stark exprimiert, dagegen war dieses Protein in Zellen mit Wildtyp-p53 (U87) nicht nachweisbar. Behandlung mit ionisierender Strahlung oder Doxorubicin selektierte eine Zellpopulation mit starker Jagged1-Expression und verändertem Wachstumsverhalten. Die siRNA-vermittelte Hemmung der p73-Expression reduzierte in U373 Zellen die Proteinexpression von Jagged1. Mittels Chromatinimmunpräzipitation zeigten wir in U373-Zellen eine direkte Bindung des p73 Proteins an die Promotorregion des *Jagged1*-Gens. Deren Intensität nahm nach Behandlung mit ionisierender Strahlung deutlich ab. Unsere Ergebnisse in Glioblastomzellen stehen somit im Einklang mit folgenden Hypothesen: (I) Abhängig vom p53-Status werden wichtige Komponenten des Notch-Signalwegs (u.a. Jagged1) differentiell exprimiert. (II) Behandlung mit ionisierender Strahlung oder Doxorubicin stimuliert die Jagged1-Expression, welche mit verändertem Wachstumsverhalten assoziiert ist. (III) In Zellen mit mutiertem p53 wird die Jagged1-Expression durch das p53-verwandte p73 Protein auf Transkriptionsebene induziert. (IV) Die nach Behandlung mit ionisierender Strahlung nur schwach nachweisbare Bindung des p73 Proteins an die Jagged1-Promotorregion spricht für eine Beteiligung anderer Faktoren an der Regulation dieses Gens. Wir konnten *Jagged1* als direktes p73-Zielgen identifizieren und neue Interaktionen zwischen Notch- und p53-Signalwegen nachweisen. Die Relevanz dieser Ergebnisse für Pathogenese, Wachstumsverhalten und Therapie von Glioblastomzellen muss in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden.

1.2 Englische Zusammenfassung (Summary)

In recent years, scientific progress has convincingly demonstrated an important role of notch and p53/p63/p73 that are in part functionally overlapping, for pathogenesis, growth behaviour and therapy of glioblastomas. However, the underlying molecular mechanism are to date unknown. The aim of this work was to examine a possible cross-talk between Notch-signaling and the transcription factor family p53/p63/p73 in glioblastoma cells. We characterised the expression of important components of the Notch-signaling pathway (Notch receptors 1-4; Notch ligands: Dll1,3,4; Jagged1,2) in human glioblastoma cells (Tx3868, Tx3095, U373, U118, U87) *in vitro* and could show that the protein expression of Notch1 and Jagged1 correlated with the p53 status of the cells. Notch1 was exclusively, and Jagged1 substantially stronger, expressed in cells with mutant p53 (U373), compared to wild type p53 cells (U87). In U373 cells, p73 was strongly expressed, while this protein was not detected in cells with wild type-p53 (U87). Treatment with ionising radiation or doxorubicin resulted in a cell population with increased Jagged1 expression and modulated growth behaviour. The siRNA-induced suppression of p73 expression reduced the protein expression of Jagged1 in U373 cells. Using chromatinimmunoprecipitation (ChIP) we could prove in U373 cells a direct binding of the p73 protein to the promotor region of the *Jagged1* gene. The intensity of this binding decreased after treatment with ionising radiation clearly. Our results in glioblastoma cells are in agreement with the following hypotheses: (I) Depending on the p53 status, important components of the Notch-signaling pathway (including Jagged1) are differentially expressed. (II) Treatment with ionising radiation or doxorubicin stimulates the Jagged1 expression, which is associated with changed growth behaviour. (III) In cells with mutant p53, the Jagged1 expression is induced by p53-related p73 protein at the transcription level. (IV) After treatment with ionising radiation, only weak binding of the p73 protein to the Jagged1-promotor region was shown, indicating a participation of other factors in the regulation of this gene. In conclusion, we succeeded in identifying *Jagged1* as a direct p73-target gene and in proving new interactions between Notch- and p53/p63/p73-signaling pathways. The relevance of these results for pathogenesis and growth behaviour, as well as for the therapy of glioblastoma, must be confirmed in future investigations.

2 Einleitung

2.1 Die Gliome

2.1.1 Gliazellen – viele verschiedene Zelltypen mit unterschiedlichen Aufgaben

Gliome entstehen aus Gliazellen, die im Gehirn in verschiedenen Zelltypen vorliegen und u.a. Stütz – und Nährfunktionen ausüben (McLendon, Rosenblum und Bigner 2006). Die verschiedenen Typen von Gliazellen übernehmen unterschiedliche Aufgaben (Abb. 1) (McLendon, Rosenblum und Bigner 2006). Oligodendrozyten bilden das Myelin um die Axone, sorgen dadurch für eine Erhöhung der Leitungsgeschwindigkeit von Nervenimpulsen und schützen die Axone vor mechanischer Überanspruchung. Schwannsche Zellen übernehmen im peripheren Nervensystem die Myelinisierung der Axone. Astrozyten gewährleisten die Aufrechterhaltung der Homöostase, den Transport von Nährstoffen, sind beteiligt an der Signalübertragung und dienen als Füllgewebe nach Verletzung. Sie besitzen im Allgemeinen eine sternförmige Struktur, wodurch sie Kontakt mit vielen Neuronen aufnehmen können. Mikrogliazellen übernehmen in erster Linie Abwehr- und Immunfunktionen (Hambardzumyan, Gutmann und Kettenmann 2016) und werden daher auch als das Immunsystem des Gehirns bezeichnet. Durch Phagozytose entfernen sie Abbauprodukte und Fremdstoffe aus dem umliegenden Gewebe.

2.1.2 Die Gliome – Epidemiologie und aktuelle WHO Klassifikation (2016)

Der Begriff *Gliom* (griech. *glia* Leim) wurde erstmals am 7. Februar 1863 von Rudolf Virchow in seiner achtzehnten Vorlesung mit dem Titel „Die krankhaften Geschwülste“ verwendet – die Erstbeschreibung der *Gliazellen* geht ebenfalls auf ihn zurück. Die Bezeichnung Gliom ist ein Sammelbegriff für verschiedene Tumoren des ZNS. Sie treten meist im Gehirn auf (daneben vereinzelt auch im Bereich des Rückenmarks und der Hirnnerven) und entstehen am häufigsten aus Gliazellen (Hambardzumyan et al. 2016; McLendon, Rosenblum und Bigner 2006). Gliome

zählen zu den gefährlichsten (Corso und Bindra 2016; Mar et al. 2015) und sind die häufigsten primären Hirntumoren bei Erwachsenen (etwa 70% aller Hirntumoren) (McLendon, Rosenblum und Bigner 2006). Virchows Einteilung war lange die Grundlage für alle nachfolgenden Klassifikationen. Der jeweilige Name primärer Hirntumoren, die überwiegend neuroepithelialen Ursprungs sind, orientiert sich an dem Zelltyp, den sie am ehesten widerspiegeln (Louis et al. 2016; McLendon, Rosenblum und Bigner 2006).

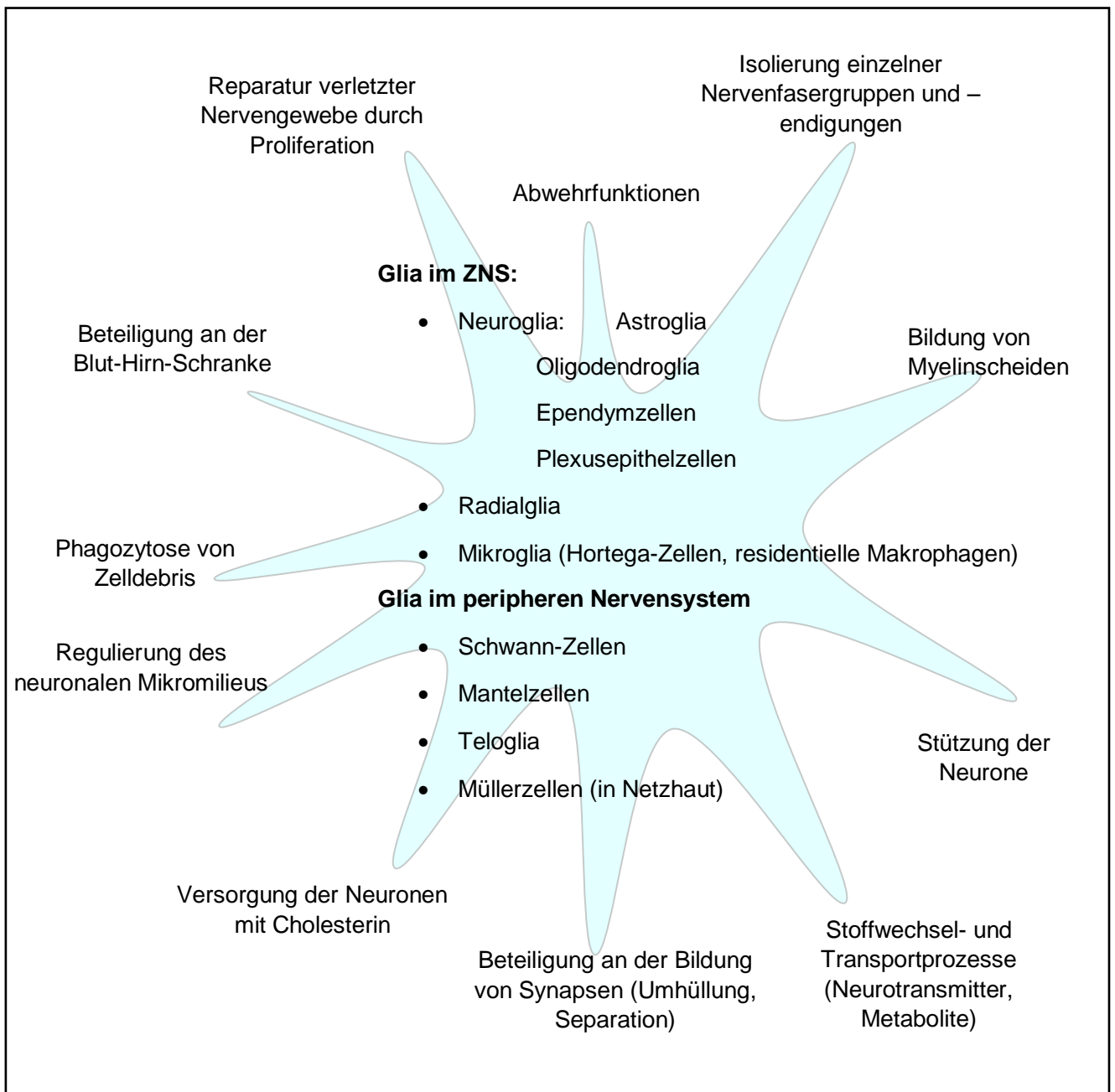


Abb.1: Die verschiedenen Arten von Gliazellen und ihre Funktionen.

Auch die Gliome werden daher nach dem glialen Zelltyp, dem sie histologisch am meisten ähneln – von dem sie allerdings nicht zwingend abstammen – benannt.

Das Glioblastom zählt man zu den astrozytären Tumoren, da diese histologisch den Zellen des Stützgewebes - also den Astrozyten - des Gehirns ähneln (McLendon, Rosenblum und Bigner 2006). Zu den Gliomen zählen neben den hochmalignen Glioblastomen auch die Astrozytome, die Oligodendrogliome und die Ependymome (Louis et al. 2016; McLendon, Rosenblum und Bigner 2006). Bis 2016 wurden die Gliome gemäß der Klassifikation der WHO überwiegend aufgrund ihrer histologischen Charakteristika, insbesondere anhand von fünf wesentlichen Merkmalen (atypische Zytologie, Anaplasie, mitotische Aktivität, mikrovaskuläre Proliferation und Nekrose), sowie aufgrund ihres Grades an Anaplasie, als niedrigmaligne (keine Anaplasie, WHO Grad 1 und II) oder hochmaligne (Anaplasie, WHO Grad III und IV), eingeordnet. Die neue WHO Klassifikation von Tumoren des zentralen Nervensystems berücksichtigt zusätzlich auch verschiedene Prognose-relevante molekulare Parameter (Louis et al. 2016). So werden aktuell Glioblastome mit einer Mutation in dem für die Isocitratdehydrogenase (IDH) kodierendem Gen von denen ohne Mutation in diesem Gen unterschieden (Louis et al. 2016).

Gliome haben in westlichen Ländern eine jährliche Inzidenz von etwa 7-11/100.000 Einwohnern (im asiatischen Raum 2-4/100.000 Einwohner) (McLendon, Rosenblum und Bigner 2006; Ohgaki und Kleihues 2005a,b;). Die Erkrankungswahrscheinlichkeit ist bei Männern etwas höher als bei Frauen (m/w: 1,2-1,9: Die Inzidenz von Glioblastomen liegt in Europa und Nordamerika bei 2,9 bis 3,5 Neuerkrankungen auf 100.000 Einwohner pro Jahr (Ohgaki und Kleihues 2005a,b). Amerikanische Daten zeigen, dass Glioblastome bei der weißen im Vergleich zur schwarzen Bevölkerung fast doppelt so häufig vorkommen. Männer sind fast doppelt so häufig davon betroffen wie Frauen (Ohgaki und Kleihues 2005a,b).

Über Faktoren, welche die Entstehung eines Glioblastoma multiforme (GBM) begünstigen können, ist nur wenig bekannt (McLendon, Rosenblum und Bigner 2006; Ohgaki und Kleihues 2005a,b). Ionisierende Strahlung und in Kunststoffen enthaltenes Vinylchlorid werden als mögliche Auslöser diskutiert. Andere Umweltfaktoren spielen anscheinend nur eine untergeordnete Rolle (Ohgaki und Kleihues 2005a,b; Ohgaki und Kleihues 2007). GBM sind meist spontan auftretende Tumoren, die keine Hinweise auf Erblichkeit liefern. Beim sehr selten auftretenden Li-

Fraumeni-Syndrom (vererbtes, mutiertes p53) wurde innerhalb betroffener Familien allerdings über ein häufigeres Auftreten von GBM berichtet (Rees JH et al. 1996 und Robertson LB et al. 2010).

2.1.3 Glioblastoma multiforme – Prognose und Therapie

Mit einer medianen Überlebenszeit von 10 bis 12 Monaten zählt das Glioblastoma multiforme (GBM) zu den Krebserkrankungen mit ausgesprochen ungünstiger Prognose (Anjum et al. 2017; Holland 2000; McLendon, Rosenblum und Bigner 2006). Im Gegensatz zu vielen anderen prognostisch ungünstigen Krebserkrankungen metastasiert das GBM allerdings sehr selten (Anjum et al. 2017). Die hohe Letalität beruht vor allem auf dem starken invasiven Wachstum in das gesunde umliegende Hirngewebe. Die Behandlung des GBM ist eine große therapeutische Herausforderung, da die Mehrzahl der Gliome aufgrund ihrer Lokalisation und des invasiven Wachstumsverhaltens entlang von präformierten neuroanatomischen Strukturen schwierig chirurgisch zu reseziieren sind und eine erhebliche Resistenz gegenüber anderen aktuellen Therapieoptionen aufweisen (Anjum et al. 2017; Corso und Bindra 2016). Da es in der Regel unmöglich ist den Tumor vollständig zu entfernen, ist eine Heilung durch eine Operation so gut wie ausgeschlossen (Anjum et al. 2017; Corso und Bindra 2016). Strahlen- und Chemotherapie sind häufig ineffektiv (Anjum et al. 2017; Corso und Bindra 2016). Die Strahlentherapie kann bei inoperablem GBM als Monotherapie indiziert sein. Oft kommt es aber zu einer Kombination von Operation und Radiotherapie (Corso und Bindra 2016). Die mittlere Überlebenszeit kann durch diese Kombination von ca. 18,5 Wochen (nach Operation alleine) auf 37,5 Wochen (nach Kombinationstherapie von Operation und Bestrahlung) erhöht werden. Bestrahlungsprotokolle mit Gesamtdosen zwischen 55 und 60 Gy zeigen dabei signifikant höhere mittlere Überlebenszeiten vgl. mit Bestrahlungsprotokollen mit Gesamtdosen unter 55 Gy. Die Kombination von chirurgischer Resektion, Strahlen- und Chemotherapie (Temozolomid) stellt den aktuellen Standard bei der Therapie des GBM dar (Anjum et al. 2017; Corso und Bindra 2016). Hierdurch konnte die mittlere Überlebenszeit allerdings nicht wesentlich verbessert werden (Corso und Bindra 2016). Rezidive sind kaum zu verhindern, weshalb das GBM bis heute als ein unheilbarer Tumor angesehen wird (Anjum et al. 2017; Corso und Bindra 2016).

2.1.4 Molekularpathologie der Glioblastome

Bei der Entwicklung des GBM wurden zwei molekularpathologisch unterschiedliche Wege beschrieben, die zu primärem oder sekundärem GBM führen (McLendon, Rosenblum und Bigner 2006). Per Definition liegen die häufiger (ca. 95%) auftretenden primären (de novo) Glioblastome vor, wenn sich kein Beweis für einen bereits vorbestehenden, niedriggradigen Tumor findet. Diese Malignome wachsen sehr schnell, die betroffenen Patienten sind tendenziell älter (Durchschnittsalter 62 Jahre) und haben eine relativ kurze Krankheitsgeschichte (Wen und Kesari 2008). Die sekundären GBMs entwickeln sich dagegen langsam fortschreitend aus einem niedriggradigen (WHO Grad II) oder anaplastischen Astrozytom (McLendon, Rosenblum und Bigner 2006). Sie treten häufiger bei jüngeren Patienten (Durchschnittsalter 45 Jahre) auf (Wen und Kesari 2008). Obgleich beide Typen des Glioblastoms in der Regel einen tödlichen Verlauf haben, hat das primäre GBM aufgrund seiner raschen Progression die ungünstigere Prognose (Ohgaki und Kleihues 2005a,b).

In umfangreichen Untersuchungen wurde gezeigt, dass primären und sekundären GBMs zahlreiche molekularpathologische und genetische Veränderungen zugeordnet werden können (Louis et al. 2016). Zu diesen Veränderungen zählen die *EGFR*-Amplifikation, Mutationen in den für *EGFR*, *p53*, *IDH*, *PTEN*, und *p16INK4A*-kodierenden Genen, sowie ein Verlust der Heterozygotie (LOH) auf den Chromosomen 9p, 10p, 10q und 17p. Mit einer Häufigkeit von 67% ist LOH von Chromosom 10 beim GBM die am häufigsten auftretende Chromosomenaberration (Mizoguchi M. et al. 2011). Das sekundäre GBM beinhaltet häufig inaktivierende Mutationen des Tumorsuppressorgens *p53*, welche auch häufig in diffusen und in anaplastischen Astrozytomen gefunden werden (England et al. 2013).

2.2 Der Notch-Signalweg

2.2.1 Notch-Rezeptoren, -Liganden und Zielgene

Zerfurchte Flügel von *Drosophila melanogaster* sind für die Namensgebung des Notch-Signalwegs verantwortlich. Namensgeber ist der Zoologe und Genetiker

Thomas Hunt Morgan (1917) der *Drosophila*-Exemplare beschrieb die, wie man später herausfand, aufgrund der „loss-of-function“ Mutation eines Gens im Notch-Signalweg Kerben (engl. notches) in ihren Flügeln besaßen (Artavanis-Tsakonas, Rand und Lake 1999).

Die kanonische Notch-Signalübertragung beginnt mit der spezifischen Bindung eines Notch-Liganden an einen an der Oberfläche einer Nachbarzelle lokalisierten korrespondierenden Notch-Rezeptor (Artavanis-Tsakonas, Rand und Lake 1999; Kwon et al. 2012). Bei Säugetieren besitzt der Notch-Signalweg vier unterschiedliche transmembranöse Rezeptoren (Notch 1 – Notch 4), welche sowohl selektive als auch überlappende Funktionen ausüben, und fünf transmembranösen Liganden, darunter drei Proteine welche als „Delta-like“ (Dll 1,2 und 4) und zwei welche als „Jagged“ (Jagged1 und Jagged2) bezeichnet werden (Artavanis-Tsakonas, Rand und Lake 1999; Kwon et al. 2012). Die Liganden besitzen ein Delta-Serrate-Lag-2 (DSL)-Motiv, welches essentiell für die Bindung an den korrespondierenden Notch-Rezeptor ist (Kwon et al. 2012). Neben den klassischen Notch-Liganden wurden in den letzten Jahren weitere Moleküle identifiziert welche an Notch-Rezeptoren binden und dadurch deren Aktivität beeinflussen (Kwon et al. 2012).

Notch-Rezeptoren sind membrangebundene Proteine mit charakteristischen „Epidermal growth factor (EGF)-like repeats“-Elementen auf der extrazellulären Domäne (Kwon et al. 2012). Die Bindung von juxtaponierten Liganden führt zur Dimerisierung des Rezeptors mit dem Liganden und initiiert eine in zwei Schritten ablaufende Spaltung des Notch-Rezeptors (Proteolyse) in dessen juxta- und transmembranöse Domänen, welche durch die Metalloproteinase ADAM (A Disintegrin and Metalloprotease)/TACE (TNF α converting enzyme) vermittelt wird (Artavanis-Tsakonas, Rand und Lake 1999; Groot und Vooijs 2012). Die extrazelluläre Domäne des Rezeptors wird nach der Abspaltung gemeinsam mit dem Liganden als Dimer durch Endozytose internalisiert (Kwon et al. 2012). Eine weitere, durch das Enzym gamma-Sekretase vermittelte, proteolytische Spaltung der intrazellulären Domäne führt zur Freisetzung der intrazellulären aktiven Domäne von Notch (NICD) in das Zytoplasma (Artavanis-Tsakonas, Rand und Lake 1999; Kwon et al. 2012). Die NICD gelangt aufgrund einer Kern-Lokalisations-Sequenz auf direktem Weg in den Zellkern (Kwon et al. 2012). Dort assoziiert sie sich mit DNA-Bindungsproteinen und bildet dadurch einen Transkriptionskomplex, der zahlreiche weitere Proteine, darunter die CSL (CBF-1/RBPJK (recombination signal binding

protein for immunoglobulin kappa J) in Säugetieren; Su(H) in *Drosophila* und LAG-1 in Fadenwürmern), die NICD und verschiedene Co-Aktivatoren-Proteine (z.B. Mitglieder der mastermind (MAM)/Lag-3 Familie, MAML-1 (mastermind-like-1), oder p300/CBP), enthalten kann (Kwon et al. 2012). Diese Proteinbindungen bewirken Konformationsänderungen mit funktionellen Auswirkungen (Kwon et al. 2012). So verwandelt sich der Transkriptionsrepressor RBPJK in einen Aktivator. Der Notch-RBPJK-Komplex reguliert auf diese Weise die Expression zahlreicher Zielgene, darunter *Hes* (*Hairy and Enhancer of Split* in *Drosophila*), *Herp* (Hes verwandte Proteine), *Sox2*, *p21*, *Pax6*, *GFAP*, *cyclin D1* und andere Zell-Zyklus-Regulatoren, sowie Wachstumsfaktoren und Onkogene wie *c-Myc* (Kwon et al. 2012; Liu et al. 2015). Eines der wesentlichen ungelösten Probleme bei der Suche nach den präzisen Mechanismen, über die der Notch-Signalweg so viele verschiedene Wirkungen auf die Zellentwicklung ausübt, liegt in der Komplexität der Effekte auf direkte und indirekte Notch-Zielgene, über die bislang nur wenig bekannt ist (Artavanis-Tsakonas, Rand und Lake 1999; Udolph 2012).

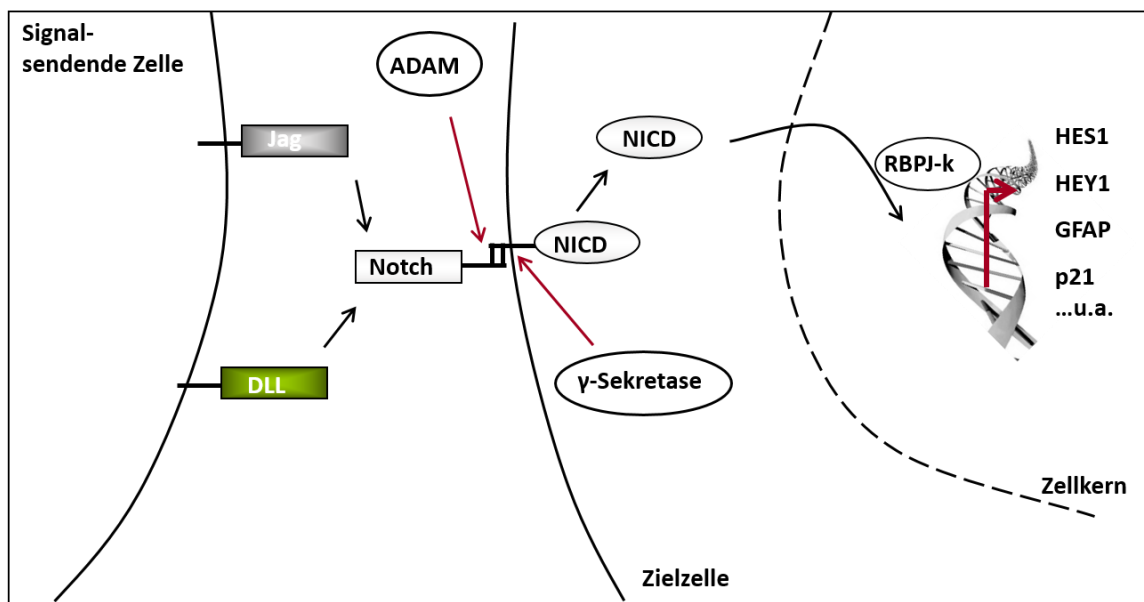


Abb.2: Schematische Darstellung des Notch-Signalwegs

Über unterschiedliche Mechanismen wirken die Produkte vieler Notch-Zielgene überwiegend als transkriptionelle Repressoren. Viele dieser Proteine unterdrücken

nachgeschaltete Gene, die für die Zelldifferenzierung erforderlich sind (Artavanis-Tsakonas, Rand und Lake 1999).

Die am Besten charakterisierten Notch-Zielgene sind Mitglieder der *Hes*-Genfamilie und verwandte Genfamilien, die Gene wie *HEY*, *HESR*, *HRT* oder *CHF* beinhalten (Iso, Kedes und Hamamori 2003). *HEY/Hes* zählt zur Familie der Basis-helix-loop-helix-O (bHLH-O)-Transkriptionsfaktoren (Udolph 2012). Bei *Drosophila melanogaster* sind derzeit 13 Mitglieder dieser Familie bekannt, darunter sieben *Enhancer-of-Split (E(Spl))*-Gene (Udolph 2012). Genom-weite Studien über Notch-Zielgene von Monastirioti und Krejci haben übereinstimmend gezeigt, dass 9 dieser 13 bHLH-O-Gene eine Rolle im Notch-Signalweg spielen (Krejci et al. 2009; Monastirioti et al. 2010). *Hey* wird unter anderem während der embryonalen und larvalen Neurogenese exprimiert, allerdings auch Notch-unabhängig (Monastirioti et al. 2010). Die *hey*-Expression ist in *Notch*-Mutanten vermindert, in *numb*-Mutanten (verstärkte Notch-Aktivität) wird *hey* dagegen verstärkt detektiert; während der Zellentwicklung ähnelt der Phänotyp von *hey*-Mutanten dem der *Notch*-Mutanten (Udolph 2012).

Zfh-1, *gcm* und *Nepro* sind weitere potentielle Notch-Zielgene (Saito 2012). *Zfh-1* und *gcm* wurden im zentralen und peripheren Nervensystem und in einigen glialen Subtypen gefunden und mit Notch in Verbindung gebracht (Saito 2012). *Nepro* wird durch Notch aktiviert, wodurch Gene unterdrückt werden, die an der Neurogenese beteiligt sind, was wiederum zur Erhaltung der neuronalen Vorläuferzellen im Neocortex (Saito 2012) führt.

2.2.2 Translationale und post-translationale Regulation des Notch-Signalweges

Ein grundlegender Mechanismus, über den der Notch Signalweg reguliert wird, besteht in der Restriktion der Verfügbarkeit von Notch-Liganden oder Notch-Rezeptoren, entweder räumlich oder zeitlich. So wird bei *Drosophila* die Embryogenese durch Veränderung der Expression von Notch-Rezeptoren und -Liganden gesteuert (Udolph et al. 2012). Es ist derzeit noch unklar, wie die mRNA Prozessierung des Notch-Signalweges bei Säugetieren reguliert wird, eine differenzielle mRNA-Prozessierung ist bei vielen Organismen für eine normale Entwicklung aber von zentraler Bedeutung.

Allerdings erklärt die differenzielle Expression der Notch-Liganden und -Rezeptoren die verschiedenen Funktionen des Notch-Signalweges in unterschiedlichen zellulären Kontext nicht vollständig. Inzwischen kennt man zahlreiche weitere Mechanismen, welche Aktivität und Funktion des Notch-Signalwegs modulieren (Kwon et al. 2012; Udolph et al. 2012). Die Endozytose der DSL-Liganden spielt eine entscheidende Rolle bei der Verstärkung der Notch-Signalaktivität (Kwon et al. 2012). Ein weiterer Mechanismus, über den dieser Signalweg moduliert werden kann, besteht in der Regulation der Proteinspaltungen durch die E3-Ligasen Neuralized und Mindbomb, welche die Endozytose von Notch-Liganden vermitteln (Liu et al. 2012).

2.2.3 Notch, Stammzellen, Tumor-assoziierte Neo-Angiogenese und Krebs

Mehrere Studien an Maus-Tumor-Modellen sprechen für eine Beteiligung des Dll-4-vermittelten Notch-Signalweges an der Tumorangio-genese (Kume 2012; Zhao et al. 2017; Zhang et al. 2015). Dabei wurde eine wichtige Rolle des Notch-Signalweges sowohl für die Koordination als auch für die Aufrechterhaltung der Tumor-assoziierten Neo-Angiogenese nachgewiesen (u.a. Regulation des Gleichgewichts und der Anzahl von sogenannten „tip and stalk cells“, welche für eine effektive Vaskularisierung und die Kontrolle der Anzahl von Verzweigungen der Tumorblutgefäße erforderlich ist) (Kwon et al. 2012). Dll-4 wird sowohl beim Nierenzellkarzinom (Patel et al. 2005) als auch beim invasiven Blasenkarzinom (Patel et al. 2006) stark exprimiert. Mehrere Arbeitsgruppen untersuchten, ob eine Hemmung des Dll-4-vermittelten Notch-Signalweges die Angiogenese und das Wachstum dieser Tumoren beeinflusst (Kume 2012). Die systemische oder lokale Verabreichung von Dll-4-neutralisierenden Antikörpern oder von Dll-4-Antagonisten zeigte eindeutig, dass die Hemmung des Dll-4-vermittelten Notch-Signalweges zu einem nachhaltigen Wachstum von Tumorgefäßen führt (Kwon et al. 2012). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass der Dll-4-vermittelte Notch-Signalweg für Selektion und Regulation des Gleichgewichts von sogenannten „tip and stalk cells“ während der Tumorangio-genese von großer Bedeutung ist (Kwon et al. 2012). Darüber hinaus zeigen einige Studien, dass der Dll-4-vermittelte Notch-Signalweg eine breite und vielfältige Interaktion mit VEGF/VEGFR-unabhängigen Signalwegen der Angiogenese ausübt (Kume 2012; Kwon et al. 2012). Im Überblick sprechen die

Ergebnisse dafür, dass die Hemmung des Dll-4-vermittelten Notch-Signalwegs eine erfolgsversprechende Strategie zur Behandlung von Tumoren darstellt, deren Neo-Vaskularisation entweder intrinsisch nicht von VEGF (vascular endothelial growth factor)-Signalwegen abhängt, oder die im Rahmen der Tumorprogression zu anderen Angiogenese-Signalwegen gewechselt haben (Kwon et al. 2012).

2.2.4 Der Notch-Signalweg beim Glioblastom

Im letzten Jahrzehnt wurde die Funktion des Notch-Signalwegs bei der neuronalen Entwicklung und im adulten Gehirn intensiv beforscht (Udolph 2012). Dieser Signalweg ist in Nervenzellen neben der Regulation von neuronalen Vorläuferzellen, von neuronaler Kommunikation, und von synaptischer Plastizität für viele weitere biologische Prozesse, darunter Lernvorgänge und Gedächtnis, von großer Bedeutung (Udolph 2012). Fehlfunktionen des Notch-Signalwegs finden sich bei ischämischer Schädigung von Nervenzellen, bei Morbus Alzheimer und bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen (Mathieu et al. 2013). Die molekularen Mechanismen, über die der Notch-Signalweg biologische Prozesse im adulten Gehirn reguliert, sind noch weitestgehend unbekannt. Das ausgereifte Gehirn besitzt eine Vielzahl an verschiedenen Signalwegen, die höhere kognitive Leistungen steuern. Der Notch-Signalweg ist hierfür ein modellhaftes Beispiel. Er ist während der gesamten Lebensspanne aktiv (Dhanesh et al. 2016), und interagiert je nach Bedarf mit unterschiedlichen anderen Signalwegen.

Notch1 wird im menschlichen Gehirn in pyramidalen Neuronen des Cortex und im Hippocampus exprimiert (Berezovska et al. 1998; Teodorczyk und Schmidt 2015). Notch2 wird ebenfalls in diesen Bereichen exprimiert, allerdings in abgeschwächter Form (Berezovska et al. 1998). Notch3 wird hauptsächlich in Astroglialen Vorläuferzellen und dem *Plexus Choroideus* exprimiert (Dang et al. 2006; Solecki et al. 2001). Im adulten Gehirn werden die Liganden Jagged1 und Jagged2 überwiegend im Vorderhirn, DLL-1 und DLL-3 dagegen hauptsächlich in Cortex und Cerebellum, exprimiert (Monsalve et al. 2014). Der Notch-Signalweg ist an der normalen Entwicklung des Gehirns und an der Erhaltung von neuronalen Vorläuferzellen beteiligt. Dadurch spielt er auch für viele der Zelltypen eine wichtige Rolle, aus denen nach heutiger Auffassung Gliome entstehen (Udolph 2012). Verschiedene Arbeitsgruppen haben eine veränderte Expression mehrerer

Komponenten des Notch-Signalwegs bei menschlichen Gliomen berichtet (Dell'albani et al. 2014). Man muss allerdings berücksichtigen, dass die Ursprungszellen der verschiedenen Gliome noch nicht mit letzter Sicherheit identifiziert werden konnten. Es ist auch möglich, dass Gliome unterschiedlicher Grade von verschiedenen Zellpopulationen abstammen, die unterschiedliche Differenzierungsstadien widerspiegeln. Veränderungen in der Expression von Komponenten des Notch-Signalweges könnten somit mit Veränderungen in der Differenzierung assoziiert sein. So wurde gezeigt, dass die Expression von *Hash-1* und Delta-like-ligand 1 (Dll)-1 mit Grad II und Grad III Gliomen und mit sekundärem GBM korreliert. Es wurde spekuliert, dass die Hash-1 Expression progressive Gliome und sekundäre GBM von primären GBM unterscheidet (Castro et al. 2006; Somasundaram et al. 2005). Des Weiteren wurde gezeigt, dass bei Astrozytomen die Expression von Notch 1,3 und 4 mit ansteigendem Malignitätsgrad assoziiert ist und dass die Expression des nachgeschalteten Notch-Zielgens *Hey-1* mit dem Malignitätsgrad von Gliomen korreliert (Castro et al. 2006). Die stärkste *Hey-1*-Expression wurde in dieser Untersuchung beim GBM gefunden, wobei allerdings nicht zwischen primären und sekundären GBM unterschieden wurde (Castro et al. 2006).

2.2.5 Cross-talk zwischen Notch-Signalweg und anderen Signalwegen bei Gliomen

Primäre GBM-Tumoren zeigen häufig eine Amplifikation und/oder eine vermehrte Expression des EGF-Rezeptors (EGFR) (Ohgaki und Kleihues 2007; Watanabe et al. 1996; Wong et al. 1987; Staberg et al. 2016). Mehrere Untersuchungen berichten über einen Crosstalk zwischen EGFR- und Notch-Signalwegen bei Krebserkrankungen (Fitzgerald et al. 2000; Miyamoto et al. 2003; Stockhausen et al. 2005; Weijzen et al. 2002; Zeng et al. 2005). Es wurde postuliert, dass der Notch-Signalweg das Überleben und die Proliferation von neuronalen Stammzellen (NSC) über die Interaktion mit Signalwegen, die dem EGFR nachgeschaltet sind, reguliert (Androutsellis-Theotokis et al. 2006). Zwei der wichtigsten, dem EGFR nachgeschaltete Signalwege sind der RAS/MEK/ERK- und der PI3-K/AKT-Signalweg, die an zellulären Prozessen wie Proliferation, Migration und Resistenz gegen Apoptose beteiligt sind (Dang 2012; Stockhausen et al. 2012). Die Notch1-Expression ist in humanen RAS-transformierten Astrozyten hochreguliert

(Stockhausen et al. 2012). Die Hemmung des Notch-Signalweges führt in diesen Zellen zur Abnahme von Proliferation und Zellaktivität und zu einer Zunahme der Differenzierung (Stockhausen et al. 2012). Somit scheint der Notch-Signalweg RAS-transformierte Astrozyten in einem undifferenzierten, proliferativen Zustand zu halten (Kanamori et al. 2007). Unabhängig von der Notch-RAS-Interaktion ist die Phosphorylierung und somit Aktivierung von AKT mit dem Notch-Signalweg in Gliomen verbunden (Xu et al. 2010; Gao et al. 2007; Zhao et al. 2010). Konstitutiv aktiviertes Notch1 führt zur Phosphorylierung von AKT und erhöht das Wachstum von Gliomen *in vitro*, wohingegen die Hemmung von Notch1 zu einer Unterdrückung der AKT-Aktivierung und zu einer verminderten Viabilität von Gliomen in *in vitro* und *in vivo* führt (Xu et al. 2010; Gao et al. 2007; Zhao et al. 2010). Desweiteren führt die Hemmung des Notch-Signalwegs in GBM-Zelllinien zu einer Blockade der AKT-Phosphorylierung, die auch mit einer geringeren Proliferation von Stammzell-artigen GBM-Zellen assoziiert ist. Da der Notch-Signalweg wahrscheinlich in der Lage ist, das Überleben von NSC über den AKT-Signalweg zu fördern, ist es somit auch möglich, dass Notch über denselben Mechanismus an der Regulation von GBM-bCSCs (cancer stem cells) beteiligt ist (Stockhausen et al. 2012).

Somit kann der Notch-Signalweg in Gliomen sowohl mit dem RAS/MEK/ERK- als auch mit dem PI3-K/AKT-Signalweg in Verbindung gebracht werden. Die Aktivität dieser Signalwege wird allerdings nicht ausschliesslich durch den EGFR-Signalweg induziert. Vielmehr können beide Signalwege auch durch eine Vielzahl von anderen Wachstumsfaktoren aktiviert werden. Allerdings konnte in Untersuchungen, bei denen Gliome in Abhängigkeit ihrer Proteinexpression in Untergruppen eingeteilt wurden, gezeigt werden, dass der Notch-Signalweg in Tumoren, die mit EGFR-Signaling assoziiert sind, aktiviert ist (Stockhausen et al. 2012). In den meisten Fällen ist dies das Ergebnis einer Amplifikation oder Mutation des EGFR (Stockhausen et al. 2012). Diese Korrelation scheint nur auf Protein-Ebene zu bestehen, was dafür spricht, dass posttranskriptionale Mechanismen an der Regulation des Notch-Signalweges beteiligt sind (Stockhausen et al. 2012). Tatsächlich induzieren RAS und AKT eine vermehrte Translation der Notch1 mRNA in einem Glioma-Maus-Modell, was zu einer vermehrten Notch1 Protein-Expression führt (Rajasckhar et al. 2003; Xu et al. 2010). Im Gegensatz zur Proteinebene (wo die Expression von wichtigen Komponenten der Notch- und EGFR-Signalwege bei Gliomen, die eine Amplifikation im EGFR-Gen aufweisen, korreliert), korreliert auf mRNA-Ebene die

Expression von Notch1 und EGFR in Gliomen, die keine EGFR-Amplifikation aufweisen (Purow et al. 2008; Seidel et al. 2010). Die Hemmung von Notch1 führt in Gliomzelllinien zur verminderten Expression von EGFR-mRNA und -Protein. Dagegen führt die Induktion der Expression von Notch1 zu einer p53-abhängigen Hochregulation der EGFR-Expression (Purow et al. 2008, Seidel et al. 2010). Diese Untersuchungsergebnisse sprechen dafür, dass sich die EGFR-Expression in Gliomen, die über ein intaktes p53-Protein verfügen und die keine EGFR-Amplifikation aufweisen, unter der transkriptionalen Kontrolle des Notch-Signalwegs befindet. Dagegen sind Komponenten des Notch-Signalwegs in Tumoren mit EGFR-Amplifikation auf posttranslationaler Ebene hochreguliert, möglicherweise durch die erhöhte Aktivität der dem EGFR nachgeschalteten Signalwege RAS/MEK/ERK und PI3K/AKT (Stockhausen et al. 2012). Da die Mehrzahl der Gliome mit EGFR-Amplifikation zur Gruppe der primären GBM gehört und den Wild-Typ des p53 Gens aufweist, könnte die vermehrte Notch-Aktivität, resultierend aus einer gesteigerten EGFR-gesteuerten Translation, zu einer erhöhten EGFR-Transkription via Notch und p53 führen, und somit einen positiven Rückkoppelungsmechanismus zwischen EGFR- und Notch-Signalwegen darstellen. Es ist bekannt, dass der EGFR die Expression seines korrespondierenden Liganden TGF alpha, dessen starke Expression in Gliomen ebenfalls mit einem hohen Malignitätsgrad korreliert, steuert (Schlegel et al. 1990, Tang et al. 1997). Zusätzlich wurde gezeigt, dass TGF alpha in Gliomzellen sowohl die Expression von *Hes1* induziert als auch die nukleäre Translokation von HES1 fördert, woraus eine verstärkte Proliferation resultiert (Zheng et al. 2008). Diese Zusammenhänge implizieren, dass der „crosstalk“ zwischen Notch- und EGFR-Signalwegen für den malignen Charakter von primären GBM von Bedeutung sein könnte. Allerdings sind diese Zusammenhänge bislang nicht bewiesen, weshalb die Relevanz des „crosstalks“ zwischen Notch- und EGFR-Signalwegen bei Gliomen weiterer Untersuchung bedarf.

2.3 Der p53-Signalweg

2.3.1 p53 – der Wächter des Genoms

Mutationen können zu genetischer Instabilität und zu Krebserkrankungen führen. Um die genomische Integrität zu bewahren, verfügen Säugerzellen über mehr als 150 DNA-Überwachungs- und Reparaturgene. Tumorzellen weisen eine hohe Heterogenität bezüglich ihrer genetischen Defekte auf. Der Tumorsuppressor p53 ist eine der wichtigsten Kontrollinstanzen der genomischen Integrität und des Zellwachstums (Vousden und Lane 2007). Maßgeblich für seine Namensgebung war das Molekulargewicht von 53 kDa. Im Jahr 1992 wurde das p53-Protein, dessen Gen sich auf dem menschlichen Chromosom 17p13.1 befindet, erstmals als „Wächter des Genoms“ bezeichnet (Lane et al. 1992). Ein Jahr später wurde es von der Fachzeitschrift Science zum „Molekül des Jahres“ gewählt. 50-60% aller menschlichen malignen Tumore besitzen Mutationen im p53-Tumorsuppressorgen (Muller und Vousden 2013; Robles und Harris 2010), während die übrigen Malignome oft andere Veränderungen in der Funktionalität des p53-Netzwerks aufweisen (Hainaut und Hollstein 2000). Der strukturelle Aufbau des p53-Proteins beinhaltet mehrere charakteristische funktionelle Domänen (Khoury und Bourdon 2011; Römer 2012): am N-terminalen Ende befinden sich zwei Transaktivierungsdomänen (Aktivierungsdomänen (AD)1 und 2), von denen AD1 die Transkription der meisten Zielgene aktiviert (Khoury und Bourdon 2011). Dieser Region folgt eine prolinreiche Domäne (PRD), welche für die p53-induzierte Apoptose von Bedeutung ist (Khoury und Bourdon 2011). An diesen Sequenzbereich schließt sich die DNA-Bindungsdomäne an, welche die sequenzspezifische Bindung des p53-Proteins an die Promotorregion seiner Zielgene vermittelt (Khoury und Bourdon 2011). In diesem Abschnitt ist auch eine 3'-5' Exonukleaseaktivität lokalisiert, über die p53 an DNA-Reparaturprozessen beteiligt sein könnte (Khoury und Bourdon 2011). Bei den in Malignomen vorliegenden p53-Mutationen handelt es sich in der Regel um missense Punktmutationen in der DNA-Bindungsdomäne (Robles und Harris 2010), die sich in etwa 30 % der Fälle auf wenige Aminosäuren konzentrieren (sogenannte „Hotspot“-Mutationen). Diese Mutationen beeinträchtigen die DNA-Bindungsfähigkeit des p53-Proteins, verhindern dadurch die Transaktivierung seiner Zielgene und führen zu einem Verlust der

Tumorsuppressorfunktion (Römer 2012). Weiter C-terminal befindet sich die Oligomerisierungsdomäne (tetramerisation domain, TD), die die Aktivierung von p53 durch die Komplexierung von vier p53 Molekülen zu einem Tetramer vermittelt (Khoury und Bourdon 2011). Am C-terminalen Ende ist eine basische Domäne (BD) lokalisiert, die unspezifisch an DNA binden kann, zum Beispiel nach DNA-Schädigung (Maltzman und Czyzyk 1984; Kastan et al. 1991). Das p53-Molekül ist wesentlich an der Erkennung des Ausmaßes der DNA-Schädigung und der darauf folgenden Entscheidung, ob transienter Zellzyklusarrest mit DNA-Reparatur, Seneszenz oder Apoptose eingeleitet werden, beteiligt (Maltzman und Czyzyk 1984; Kastan et al. 1991; Shaw et al. 1992; Yonish-Rouach et al. 1991).

Die Halbwertszeit von p53 ist relativ kurz: nach ca. 10 bis 30 Minuten wird das Protein durch Mdm2-vermittelte Ubiquitinylierung abgebaut und inaktiviert (Cuddihy und Bristow 2004; Maltzman und Czyzyk 1984). In genomisch ungeschädigten Zellen wird das p53-Protein nur gering exprimiert oder es liegt dort an seinen Inhibitor (Mdm2) gebunden und dadurch inaktiviert vor (Cuddihy und Bristow 2004; Römer 2012). Exogene (z.B. durch ionisierende oder UV-Strahlung; bestimmte Chemikalien wie polyzyklische Kohlenwasserstoffe, verschiedene Alkylanzien und Toxine) und endogene (z.B. durch reaktive Sauerstoffspezies, Fehler bei der DNA-Reparatur) Schädigung der DNA (Abb. 2) führt zu einem schnellen Anstieg der intrazellulären p53-Konzentration (Cuddihy und Bristow 2004). Dieser Konzentrationsanstieg bewirkt eine Kettenreaktion, die die Expression von vielen Genen moduliert, welche an der Regulation von Zellzyklus und DNA-Reparatur, Apoptose und Seneszenz beteiligt sind (Maltzman und Czyzyk 1984; Kastan et al. 1991; Shaw et al. 1992; Yonish-Rouach et al. 1991). Zentrale Proteine zwischen Schadenserkennung und DNA-Reparatur sind neben dem p53-Tumorsuppressorprotein ATR- und ATM (ataxia telangiectasia mutated)-Kinasen (Lane und Levine 2010). Aktiviert wird p53 u.a. über eine ATR- oder ATM-Kinase-vermittelte Phosphorylierung (Cuddihy und Bristow 2004). Wenn UV-Strahlung oder Chemikalien die DNA schädigen, führt dies in der Regel zur Aktivierung der ATR-Kinase (Cuddihy und Bristow 2004). Werden die Schäden durch ionisierende Strahlung hervorgerufen, kommt es zur Aktivierung der ATM-Kinase (Cuddihy und Bristow 2004). Die Phosphorylierung von p53 bewirkt eine Konformationsänderung, wodurch sich das als Tetramer vorliegende Protein von seinem Antagonisten Mdm2 löst und danach als aktiviertes p53 im Zellkern vorliegt. Sind die DNA-Schäden reparabel, werden sie behoben (Cuddihy und Bristow 2004).

Währenddessen wird der Zellzyklus über die p53-vermittelte Induktion des *p21*-Gens und die Hemmung der Phosphorylierung durch Checkpoint-Kinasen angehalten (Cuddihy und Bristow 2004; Lane und Levine 2010). Dadurch bleibt genug Zeit, um die Zelle zu reparieren und um zu verhindern, dass bei der nächsten Zellteilung der Fehler an die Tochterzelle weitergegeben wird. Ist die Schädigung dagegen irreparabel, wird meist Seneszenz oder Apoptose eingeleitet (Lane und Levine 2010).

Man kann zwei verschiedene Formen von Seneszenz unterscheiden: die telomerunabhängige vorzeitige und die telomerabhängige replikative. Für die Induktion der telomerabhängigen Seneszenz wird p53 eine zentrale Rolle zugeschrieben (Lane und Levine 2010).

In bis zu 60% aller malignen Tumoren kann eine Mutation im *p53*-Gen nachgewiesen werden (Robles und Harris 2010). Dadurch ist der wichtigste Mechanismus zur Kontrolle transformationsgefährdeter Zellen funktionsunfähig. Genetisch entartete Zellen können somit ungehindert proliferieren. Tumor-Patienten, die eine p53-Mutation aufweisen, sprechen oft schlecht auf Bestrahlungs- und Chemotherapie an, da die durch die Therapie genomisch geschädigten Tumorzellen nicht mehr durch den p53-vermittelten Zelltod eliminiert werden können (Cuddihy and Bristow 2004; Lane und Levine 2010). Folge sind oft Zellwucherung und Metastasierung.

Mdm2, eine sogenannte Ringfinger-Ubiquitinligase, vermittelt einen Schlüsselmechanismus über den sowohl die Funktion als auch die Aktivität von p53 reguliert werden (Dötsch et al. 2010; Lane und Levine 2010). Stimulation der Expression von Mdm2 hemmt p53 über eine direkte Bindung, wodurch die transkriptionale p53-Aktivität entfällt und/oder der Abbau des p53-Proteins durch das Proteasom induziert werden (Dötsch et al. 2010; Lane und Levine 2010).

2.3.2 Die p53-Familie

p53, p63 und p73 sind Tumorsuppressoren und Mitglieder der p53-Familie von Transkriptionsfaktoren (Cuddihy and Bristow 2004; Dötsch et al. 2010; Lane und Levine 2010; Römer 2012). Obwohl sie in ihrer Proteinstruktur ein hohes Maß an Homologie aufweisen, überlappen ihre Funktionen nur teilweise und jedes dieser Proteine hat seinen eigenen charakteristischen Funktionsbereich (Levrero et al

2000; Dötsch et al 2010). Sowohl p53 als auch p63 und p73 besitzen drei strukturelle Bereiche, die für ihre Funktion entscheidend sind: eine DNA-Bindungsdomäne (DBD), eine Oligomerisierungsdomäne (OD) (alle agieren als Tetramer) und eine Transaktivierungsdomäne (TA) (Dötsch et al. 2010; Römer 2012). Was p63/p73 von p53 vornehmlich unterscheidet, ist eine Domäne am C-Terminus, die an Protein/Protein-

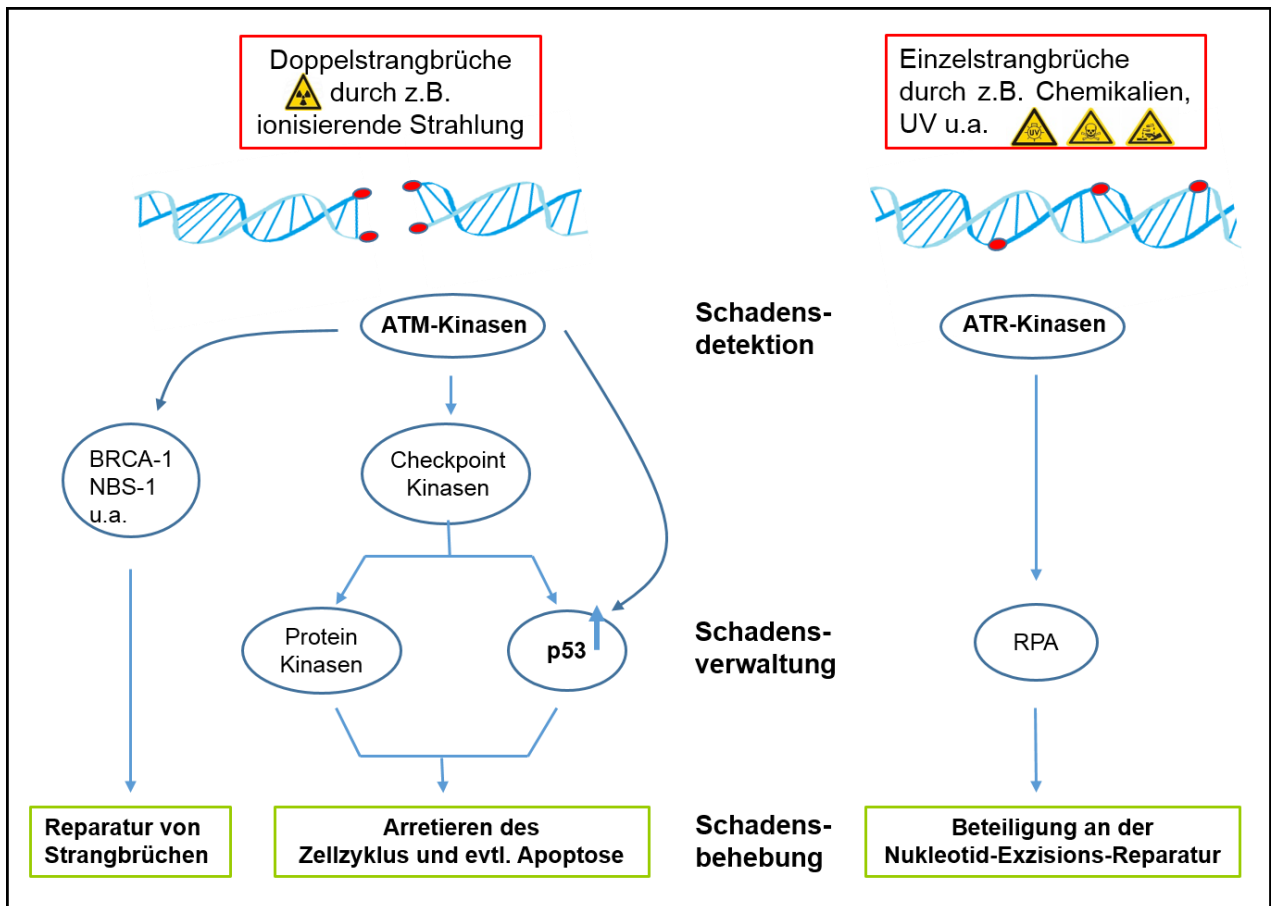


Abb.3: DNA-Schäden: von der Detektion bis zur Behebung.

Interaktionen beteiligt ist und als Steriles alpha Motiv (SAM) bezeichnet wird (Dötsch et al. 2010). Durch den Einsatz von alternativen Promotoren oder durch alternatives Spleißen, ergeben sich von allen drei Mitgliedern der p53-Familie zahlreiche Isoformen, die unterschiedliche Funktionen ausüben können (Dötsch et al. 2010; Römer 2012). Allein durch alternatives Spleißen entstehen in der p53-Familie mindestens 35 verschiedene Proteine. Durch alternatives Spleißen und durch den Einsatz unterschiedlicher Promotoren entstehen mindestens 29 verschiedene p73-Isoformen mit unterschiedlichen Fähigkeiten zur Induktion oder Repression der

Apoptose (Römer 2012). So entstehen durch alternatives Spleißen am 3'Ende von p73 sieben verschiedene Varianten mit unterschiedlichen C-terminalen Enden, benannt mit griechischen Buchstaben von α bis η (Grespi et al. 2012; Tomasini et al. 2013; Marcel et al. 2012). Für diese Varianten wurden bereits zahlreiche unterschiedliche Funktionen und Aktivitäten beschrieben, allerdings fehlt derzeit noch eine vollständige Charakterisierung der genauen Aufgaben jeder dieser Spleißvarianten. Durch den Einsatz eines zweiten Promotors, der zwischen Exon 3 und 4 des p73-Gens liegt, entstehen weitere interessante Spleißvarianten. Diese Varianten, denen die Haupt-Transaktivierungsdomäne fehlt und die sich in ihrer N-terminalen Sequenz unterscheiden, werden als delta N-Isoformen bezeichnet (Dötsch et al. 2010). Von den p53- und p63-Proteinen gibt es ebenfalls TA-Isoformen (enthalten eine Transaktivierungsdomäne) und delta N-Isoformen (die Haupt-Transaktivierungsdomäne fehlt oder ist fehlerhaft, wodurch Zielgene nicht oder nur eingeschränkt transaktiviert werden können) (Dötsch et al. 2010). Oft fungieren die delta N-Isoformen von p53, p63 und p73 als Gegenspieler ihrer jeweiligen TA-Isoformen (Buhlmann et al. 2008; Fricker et al. 2010; Römer 2012; Tannapfel et al. 2008; Tissir et al. 2009).

2.3.3 p73

Das 1997 erstmals beschriebene p73-Protein besitzt zahlreiche Isoformen, die entweder pro- oder anti-apoptotisch wirken können (Dötsch et al. 2010). p73-Isoformen, welche über eine Transaktivierungsdomäne verfügen (TAp73), können ähnlich wie p53 Zellzyklus-Arrest und Apoptose einleiten (Tissir et al. 2009; Fricker et al. 2010). P73-Isoformen, denen die Transaktivierungsdomäne fehlt (Δ Np73), fungieren dagegen als Inhibitoren von TAp73 und p53 (Bailey et al. 2010; Buhlmann et al. 2008; Fatt et al. 2014; Tannapfel et al. 2008). Das Verhältnis der pro- und anti-apoptotischen p73-Isoformen ist entscheidend für die zelluläre Reaktion auf eine DNA-Schädigung (Dötsch et al. 2010). Neben der Regulation von Zellzyklus-Arrest und Apoptose, kontrolliert p73 auch die Aufrechterhaltung des neuronalen Stammzell-Charakters (Holembowski et al. 2011; Talos et al. 2010; Agostini et al. 2010, Agostini et al. 2011). Durch die Vielfalt seiner Isoformen und den daraus resultierenden teils antagonistischen Funktionen wirft p73 viele bislang ungeklärte Fragen auf. So ist die örtliche und zeitliche Expression der unterschiedlichen

Isoformen von p73 während der Embryonalentwicklung und im adulten Organismus bislang nicht vollständig bekannt. Auch die Signalwege, welche das Verhältnis von TAp73: Δ Np73 (Lucena-Araujo et al. 2015) regulieren, und die Frage, welche Rolle das Verhältnis TAp73: Δ Np73 für Tumorgenese, embryonale Entwicklung, Zelldifferenzierung, oder Apoptose spielt und wie die Modulation dieses Verhältnisses therapeutisch genutzt werden kann, sind bislang noch ungeklärt.

Möglicherweise besteht eine wichtige Aufgabe von TAp73 in der Kompensation des Verlustes von p53 in geschädigten Zellen (Dötsch et al. 2010). Forschungsberichte belegen, dass viele transkriptionale Zielgene die durch p53 transaktiviert werden, auch durch p73 aktiviert werden können (Dötsch et al. 2010). Die Inaktivierung der pro-apoptotischen Funktionen von p73 kann zur Krebsentstehung beitragen, dagegen wird die Steigerung der p73-Aktivität als Reaktion auf DNA-Schädigung benötigt, um die betroffenen Zellen gegen Tumorentstehung zu schützen (Dötsch et al. 2010; Oswald und Stiewe 2008). Trotz der Homologie in der Struktur zeigen beide Proteine Unterschiede in ihrer Funktion. Im Gegensatz zu p53 ist p73 nur selten in Tumoren mutiert, allerdings wurde erhöhte Δ Np73-Expression bei unterschiedlichen Krebsarten, wie hepatozelluläres Karzinom, Neuroblastom und Lungen-, Prostata-, Kolon-, Brust- und Ovariakarzinom, gefunden (Dötsch et al. 2010; Maas et al. 2013; Moll und Slade 2004). Die molekularen Mechanismen, welche die p73-Expression und -Aktivität in diesen Tumoren regulieren sind bislang nicht vollständig verstanden. Durch die Aktivierung von p53 kommt es zur Transaktivierung des *p21*-Gens, im Gegensatz dazu induzieren p63 und p73 vornehmlich die Expression des *CDKN1*-Gens (Dötsch et al. 2010; Stiewe und Pützer 2002). Beide Aktivierungsvorgänge führen zu einer Hypophosphorylierung von pRb1 und hemmen dadurch den Zellzyklus. Es gibt Anzeichen dafür, dass p73, in Analogie zu p53, bei Tumorentwicklungen, die durch onkogene Viren wie HPV und EBV verursacht werden, eine Rolle spielt (Park et al. 2001; Querido et al. 2001). In EBV-assoziierten Magenkarzinomen führt die Methylierung des p73-Promotors zu einer Hemmung der p73-Expression. Im Gegensatz dazu bewirkt HPV-16 (E6) die Degradation des p53- und die Inaktivierung des p73-Proteins (Park et al. 2001; Querido et al. 2001).

3 Fragestellungen der Arbeit

Glioblastome sind in ihrer molekularen Pathologie nicht vollständig verstanden. Sie stellen therapeutisch eine Herausforderung dar und gehören nach wie vor zu den letalsten aller malignen Erkrankungen. Ziel dieser Arbeit war es mit den folgenden Experimenten neue Erkenntnisse zur Funktion der Notch- und p53/p63/p73-Signalwege für die Pathogenese, das Wachstumsverhalten und das Therapieansprechen von Glioblastomzellen zu gewinnen.

- Die Expression von wichtigen Komponenten der Notch- (Notch-Rezeptoren-1-4; Notch-Liganden Dll-1, Dll-3, Dll-4, Jagged1, Jagged2) und p53- (p53, p63, p73, Mdm2) Signalwege sollte in humanen Glioblastomzelllinien (Tx3868, Tx3095, U373, U118, U87) *in vitro* auf Protein- und RNA-Ebene charakterisiert werden. Danach sollten die Expressionsprofile auf eine mögliche Korrelation mit dem p53-Status der Tumorzellen (Wildtyp oder mutiert) untersucht werden.
- Es sollten in humanen Glioblastomzelllinien die Auswirkungen der *in vitro* Behandlung mit ionisierender Strahlung oder mit dem (eine Bestrahlung simulierenden) Radiomimetikum Doxorubicin, auf die Expression von Komponenten der Notch-und p53/p63/p73-Signalwege analysiert werden.
- Es sollten die Auswirkungen der Modulation der Expression von ausgewählten Komponenten des Notch-Signalwegs (Überexpression, siRNA-knockdown) auf das Wachstumsverhalten von Glioblastomzellen untersucht werden.
- Es sollten neue Wege der Interaktion zwischen den Notch-und p53/p63/p73-Signalwegen in Glioblastomzellen identifiziert und analysiert werden.

4 Material und Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 In vitro Kultivierung eukaryotischer Zellen

Für die *in vitro* Untersuchungen dieser Arbeit wurden mehrere gut charakterisierte (Hess, Pfreunds Schuh und Gleissner 2007; Reichrath et. al. 2010; Reichrath und Reichrath 2012) Glioblastomzelllinien (TX 3095, TX 3868, U 87, U 118, U 373; Tabelle 1), sowie als Kontrolle Saos-2, HaCaT and SCL-1 Zellen (Tabelle 1) wie vorbeschrieben (Hess 2006; Hess, Pfreunds Schuh und Gleissner 2007; Reichrath et. al. 2010; Reichrath und Reichrath 2012) kultiviert.

Kurz zusammengefasst wurden tiefgefrorene Zellen im Wasserbad bei 37°C schnell aufgetaut, und in 10 ml Vollmedium (89% DMEM oder RPMI (PAA, Pasching, Österreich), 1% Penicillin/Streptomycin, 10% fetales Kälberserum (FKS)) aufgenommen. Danach wurden die Zellen für 8 min bei 200g zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 1 ml Medium resuspendiert und in Zellkulturflaschen überführt.

Tabelle 1: Kurze Beschreibung der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Malignitätsgrad (WHO 2016)	P53-Status	Referenz
Tx3868	Glioblastom	unbekannt	unbekannt	Hess, Pfreunds Schuh und Gleissner 2007; Reichrath et. al. 2010; Reichrath et Reichrath 2012
Tx3095	Glioblastom	unbekannt	unbekannt	Hess, Pfreunds Schuh und Gleissner 2007; Reichrath et. al. 2010; Reichrath et Reichrath 2012
U-373MG	Glioblastom Kaukasier/m/61	unbekannt	mt	Hess, Pfreunds Schuh und Gleissner 2007; Reichrath et. al. 2010; Reichrath et Reichrath 2012
U-118MG	Glioblastom/Astrozytom Kaukasier/m/50	IV	mt	Hess, Pfreunds Schuh und Gleissner 2007; Reichrath

				et. al. 2010; Reichrath et Reichrath 2012
U-87MG	Glioblastom/Astrozytom Kaukasier/w/44	IV	wt	Hess, Pfreundschuh und Gleissner 2007; Reichrath et. al. 2010; Reichrath et Reichrath 2012
U-138MG	Glioblastom, Kaukasier/m/47	unbekannt	mt	Hess, Pfreundschuh und Gleissner 2007; Reichrath et. al. 2010; Reichrath et Reichrath 2012
Saos-2	Osteosarkom	unbekannt	unbekannt	Hess, Pfreundschuh und Gleissner 2007; Reichrath et. al. 2010; Reichrath et Reichrath 2012
HaCaT	Keratinocyten spontan immortalisiert	nicht maligne	mt	Hess, Pfreundschuh und Gleissner 2007; Reichrath et. al. 2010; Reichrath et Reichrath 2012
SCL-1	Kutanes Plattenepithelkarzinom	unbekannt	mt	Hess, Pfreundschuh und Gleissner 2007; Reichrath et. al. 2010; Reichrath et Reichrath 2012

Der Malignitätsgrad der Glioblastomzelllinien wurde nach WHO 2016 (Louis et al. 2016) klassifiziert. m: männlich, w: weiblich, mt: mutiert, wt: Wildtyp.

Unter standardisierten Bedingungen (37°C/ 5% CO₂/ 100% Luftfeuchtigkeit) wurden die Zellen bis kurz vor Erreichen der Konfluenz im Brutschrank kultiviert. Das Splitten/Passagieren der Zellen erfolgte alle 3-4 Tage. Das Splitten/Passagieren erfolgt mit Hilfe von Trypsin/EDTA. Die Endopeptidase Trypsin löste die Zellen bei einer Inkubation bei 37°C vom Substrat. Die Protease spaltete die Proteinbrücken zwischen den Zellen und dem Untergrund. Die durch die Spaltung freiwerdenden Ca²⁺-Ionen werden durch EDTA gebunden. Die Zellen wurden resuspendiert, eine passende Menge Zellsuspension in ein frisches Kulturgefäß überführt, mit entsprechendem Medium versetzt, und für die neue Wachstumsphase bei 37°C inkubiert. Die Stammhaltung der Zelllinien erfolgte in entsprechenden Zellkulturflaschen (i.d.R. 75 cm²-Flaschen). Diese wurden mit 13 ml RPMI-Medium versetzt und bei 37°C mit einem CO₂-Gehalt von 5 % in einem Brutschrank (Hera-cell, Heraeus Instruments) kultiviert. Die Zellkultur wurde alle drei bis fünf Tage im Verhältnis 1:5 gesplittet.

4.1.2 Medien und Lösungen für die Zellkultur:

DMEM „Dulbecco's Modified Eagle Medium“ (PAA Laboratories, Pasching, Österreich)

- Glukose (4,5 mg/ml)
- Natriumpyruvat 1 %
- L-Glutamin

MEM-Medium (PAA Laboratories)

- mit „Earle's Salt“
- L-Glutamin

RPMI-1640 Medium

- NaHCO₃
- L-Glutamin
- Phenolrot

FKS (fötale Kälberserum) (PAA Laboratories)

- Wurde dem Zellkulturmedium zugesetzt (10 %)
- vor Zugabe musste das fötale Kälberserum für 30 min bei 55°C inaktiviert werden

Penicillin-Streptomycin (Gibco, Paisly, Schottland)

4.1.3 Zellzählung

Beim Einfrieren und bei verschiedenen anderen Fragestellungen mussten Zellen gezählt werden. Nach Pelletierung wurden die Zellen in 1 ml PBS aufgenommen und resuspendiert. Die Zellen wurden mit Hilfe von Trypanblau angefärbt. Dies diente der besseren Darstellung der Zellen, die nun im Mikroskop ausgezählt wurden

(Mischungsverhältnis 1:1; entspricht 50 µl Farbstofflösung + 50 µl Zellsuspension). Die Auszählung erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer, ausgezählt wurden 16 Quadranten.

4.1.4 Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen

Die Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff (-196°C), die der Langzeitlagerung von eukaryotischen Zelllinien dient, wurde wie vorbeschrieben (Hess 2006) durchgeführt. Durch die Zugabe von DMSO wird verhindert, dass die Zellen beim Wiederauftauen platzen.

Bei einer Dichte von ca. 5×10^6 Zellen wurde der Zellrasen zunächst mit Hilfe von Trypsin/EDTA abgelöst und nach Mediumzugabe 5 Minuten bei 1200 rpm pelletiert. Überstehende Lösung wurde dekantiert, das Pellet dann in 1 ml „Einfriermedium“ (70% Vollmedium, 20% FCS, 10% DMSO) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Der Einfrierschritt sollte langsam erfolgen. Vor der Langzeitlagerung bei -196°C (flüssiger Stickstoff) wurden die Zellen daher zunächst ca. 1 h bei -20°C und danach 24 h bei -70°C gelagert. Im Gegensatz zum langsamen Einfriervorgang muss das Auftauen schnell erfolgen, weshalb die Zellsuspension (Kryoröhrchen) zunächst im Wasserbad bei 37°C inkubiert und danach in 10 ml vorgewärmtes Medium überführt wurde. Danach wurden die Zellen für 5 min bei 1200 rpm pelletiert, mit 1 ml Medium resuspendiert und in ein Zellkulturgefäß mit entsprechendem Medium (25 cm²) überführt.

4.2 Behandlung der Zelllinien

4.2.1 Behandlung der Zelllinien mit Doxorubicin

Das Radiomimetikum Doxorubicin (Adriamycin) wurde in einer Konzentration von 0.34 µM über einen Zeitraum von 4, 8 und 24 h eingesetzt.

4.2.2 Behandlung der Zelllinien mit ionisierender Strahlung

Die Zellen wurden in ihrem Medium unter Verwendung einer ^{137}Cs -Quelle mit verschiedenen Dosen (30, 60, 90 und 120 Gy) von γ -Strahlen behandelt und bis zu ihrer Aufarbeitung unter Standard-Bedingungen in Kultur gehalten. Über die Expositionszeit wurden unterschiedliche Strahlendosen generiert.

4.3 Transfektion eukaryotischer Zellen

4.3.1 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

Bei einer retroviralen Infektion oder der stabilen Transfektion kommt es zu einer dauerhaften Integration von „Fremd“-DNA oder RNA in eukaryotische Zellen. Durch den Einbau in das Wirts-Genom wird ein Abbau der fremden DNA unterbunden. Im Gegensatz hierzu führt die transiente Transfektion lediglich zu einer temporären Integration des Plasmids in die Wirtszelle. Bei einer transienten Transfektion sind die eingeschleusten Nukleinsäuren nur vorübergehend aktiv. Bei einer weiteren Zellteilung gehen diese wieder verloren. In dieser Arbeit wurde das Reagenz Nanofectin (PAA) eingesetzt um die Nukleinsäuren transient einzuschleusen. Die zu behandelnden Zellen wurden am Vortag (18-24 Stunden) so ausgesät, dass sie am Transfektionstag in einer 10 cm-Schale eine Konfluenz von 50-80 % besaßen. Zwei Stunden vor Transfektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

Transiente Transfektion von siRNA (RNAiFect®; Qiagen, Hilden, Deutschland)

Die RNA-Interferenz, bei der zielgerichtet Gene abgeschaltet werden können, basiert auf einem natürlichen Mechanismus in eukaryotischen Zellen. Bei der RNA-Interferenz werden kurze (19-23) RNA-Stücke in die Zelle eingebracht, diese interagieren/interferieren dann mit der jeweiligen korrespondierenden Ziel-mRNA. Diese Interaktion führt letztendlich zum Abbau der mRNA, so dass diese nicht mehr in ein Protein translatiert werden kann. Diese indirekte „Stilllegung von Genen“ ermöglicht die Untersuchung einer Vielzahl von molekularbiologischen Fragestellungen, unter anderem zur Regulation der Expression bestimmter Gene.

Die transiente Transfektion wurde mit RNAiFect (Qiagen) laut Herstellerangaben durchgeführt. Bei dieser Methode wird der liposomale Transportmechanismus der Zelle zu Hilfe gezogen, hierdurch können spezielle siRNAs in die Zellen eingeschleust werden.

Am Tag vor dem Transfektions-Experiment wurden abhängig vom Zelltyp 1×10^5 - 2×10^5 Zellen auf 6-Lochplatten ausgesät. Die Zelldichte sollte am darauffolgenden Tag ca. 40-60 % betragen. Am Tag der Transfektion wurde ein Mediumwechsel mit 600 μ l frischem Medium pro Cavität durchgeführt.

Transfektionsansatz pro Cavität: 98 μ l RNAiFect®-Puffer

2 μ l siRNA

12 μ l RNAiFect®-Transfektionsreagenz

Die Zutaten wurden im Reaktionsgefäß durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren miteinander vermischt und bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Danach wurde das Transfektionsgemisch tröpfchenweise auf die Platten aufgetragen. Nach 5 Stunden wurden zusätzlich 1300 μ l frisches Nährmedium hinzugegeben. Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurden die Zellen mit einer Fluoreszein (FITC)-gekoppelten Kontroll-siRNA (lichtempfindlich!) transfiziert. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnte man die Transfektionseffizienz (Anzahl transfizierter vs. nicht-transfizierter Zellen) mittels Durchflusszytometrie bestimmen. Bei einer Wellenlänge von 480 nm wurden FITC-Moleküle in erfolgreich transfizierten Zellen angeregt und konnten dadurch im FACS ausgezählt werden (das Emissionsmaximum lag bei 530 nm). Bei der Durchführung dieser Methode wurde validierte siRNA der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) laut Herstellerangaben eingesetzt.

Folgende Substanzen der Firma Qiagen kamen zum Einsatz:

FlexiTube Gene Solution:

- Hs_Jag1 SI02780134 (HP validiert); Entrez gene ID 182
- Hs_Jag1 SI02780141 (HP validiert); Entrez gene ID 182

- Hs_Jag1 SI00004648 (HP GenomeWide); Entrez gene ID 182
- Hs_Jag1 SI00004655 (HP GenomeWide); Entrez gene ID 182
- Hs_TP73_2 SI00076979 entspricht im Ergebnisteil p73 siRNA 1
- Hs_TP73_5 SI03061555 entspricht im Ergebnisteil p73 siRNA 2
- Hs_Notch1_1_HP siRNA; Entrez gene ID 4851
- Hs_Notch4_1_HP siRNA; Entrez gene ID 4855

Als Kontroll-siRNA (Qiagen) wurde eingesetzt:

- Negativkontrolle: FlexiTubeControl siRNA AllStars Negative Control siRNA (1 nmol). Sequenz der Kontroll (non-silencing)-siRNA:

Sense r(UUCUCCGAACGUGUCACGU)dTdT

Antisense r(ACGUGACACGUUCGGAGAA)dTdT

- Positivkontrolle: FlexiTubeControl siRNA AllStars HS Cell Death siRNA (1 nmol). Dieser Kontrollansatz enthält eine Mischung aus spezifischen siRNA´s die sich gegen Gene richten, die für das Überleben der Zelle unentbehrlich sind. Durch den Einsatz dieser siRNA wurde die Effizienz der siRNAs/Transfektion überprüft. Bei hoher Transfektionsrate stieg die Zelltod-Rate an. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch.

4.3.2 Stabile Transfektion eukaryotischer Zellen

Die stabile Transfektion wurde mit Nanofectin unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Kits (PAA) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Neben geringer Zytotoxizität besitzt diese Methode eine hohe Transfektionseffizienz, weshalb der Einsatz vergleichsweise geringer DNA-Mengen möglich ist. Nanofectin besteht aus zwei Komponenten: einem positiv geladenen DNA-bindenden Polymer und einem Nanopartikel in den das Polymer eingebettet ist. Dadurch wird verhindert, dass die DNA durch Nukleasen abgebaut wird. Die Transfektion wurde wie vom Hersteller empfohlen durchgeführt. Die Zellen wurden dazu in Petri-Schalen (10 cm)

ausgesät und bei Konfluenz von 50-70% transfiziert.

4.3.2.1 Transformation von Bakterien

Bei einer Transformation bedient man sich der Fähigkeit kompetenter Bakterien freie („fremde“), rekombinante DNA aufzunehmen. Damit Bakterien diese Kompetenz erwerben und zugegebene DNA aufnehmen konnten, wurden sie mit bestimmten Agenzien (Salzlösungen) vorbehandelt. Für die Transformation wurden 200 µl kompetente Bakterien (E. coli. Stamm: DH5α) nach Auftauen auf Eis (ca. 30 min) mit 1 µg Plasmid-DNA vermischt, für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend einem Hitzeschock (42° C, 90 sec) ausgesetzt. Durch den Salzgehalt wurden die Abstoßungskräfte zwischen negativer DNA und negativer Zellmembran minimiert, der anschließende Hitzeschock führte zur Einwanderung der DNA durch die Poren in die Bakterien. Anschließend wurde der Transformationsansatz mit 800 µl Luria-Bertani (LB)-Medium (ohne Selektionsantibiotikum) aufgefüllt und für 45 min bei 37°C inkubiert. Diese Vorkultur wurde schließlich zur Selektion der transformierten Bakterien auf einer LB-Platte ausplattiert und bei 37°C über Nacht kultiviert.

4.3.3 Kultivierung von E. coli

Die Anzucht von E. coli (Escherichia coli) erfolgte in einer Flüssigkultur. Bei dem hier eingesetzten Bakterienstamm zur Plasmidvermehrung und Transformation handelt es sich um den E. coli-Stamm DH5α. Zur Kultivierung dieses Stammes wurde folgendes Medium eingesetzt:

LB-Medium: Luria broth base (GIBCO) 2,5 % (w/v)

LB-Agar: Luria's agar (GIBCO) 3,75 % (w/v)

Das LB (Luria-Bertani)-Medium wurde portionsweise in Erlenmeyerkolben überführt und ca. 20 min bei 120°C autoklaviert. Sollen plasmidtragende Stämme selektioniert werden (sie enthalten ein Resistenzgen), muss dem Medium noch das entsprechende Selektionsantibiotikum zugeführt werden (Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/l oder Kanamycin in einer Endkonzentration von 30 µg/ml).

Das „Animpfen“ kann auf zwei Wegen erfolgen: entweder man entnimmt 1/1000 Volumen einer entsprechenden Stammkultur oder aber man „pickt“ eine entsprechende Einzelkolonie, die zuvor auf einem Festmedium gewachsen ist.

Unter ständigem Schütteln und bei einer Temperatur von 37°C konnten die Zellen über Nacht wachsen. Danach wurden die Bakterien bei 3000xg abzentrifugiert und in gewünschtem Puffer aufgenommen. Sollte ein Bakterienstock angelegt werden, versetzte man 600 µl der Bakterienkultur mit ca. 300 µl Glycerin. Diese Bakterien-Glycerinkulturen sind bei -80 C° mehrere Jahre lang haltbar.

LB-Medium 1 Liter:	Pepton 140	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	5 g/l
	pH auf 7,4 einstellen (1M NaOH), autoklavieren	

4.3.4 Herstellung von LB-Nährmedium und Agarplatten

Zur Herstellung von Agar-Platten wurde zunächst LB-Nährmedium angesetzt. Hierzu wurden folgende Inhaltsstoffe abgewogen (10 g Tryptone, 5 g Hefeextrakt und 10 g NaCl) und in 900 ml dest. H₂O gelöst. Nach der pH-Wert-Einstellung (mit 5 M NaOH auf pH 7,0) wurde auf einen Liter aufgefüllt. Danach wurden 15 g Agar hinzugegeben und für 20 min autoklaviert (Autoklavierprogramm für Flüssigkeiten). Danach musste vor Zugabe des Antibiotikums (z.B. Kanamycin, Endkonzentration 30 µg/ml) der Ansatz auf ca. 50° abkühlen. Danach konnten die 10 cm Schalen gegossen und nach dem Erstarren des Agars bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert werden.

LB-Nährmedium:	Tryptone
	NaCl
	Hefeextrakt
	NaOH 5 M
	ad 1 l dest. H ₂ O

LB-Agar:	LB-Nährmedium
	Bacto Agar

Je nach Resistenzgen (Ampicillin-Stammlösung
100µg/ml, bzw. Kanamycin-Stammlösung 30 µg/ml)

4.3.5 Herstellung kompetenter Bakterien nach der Rubidiumchlorid-Methode (RbCl₂-Methode)

Damit Bakterien in der Lage sind DNA aus dem Medium aufzunehmen müssen sie hohen Konzentrationen bestimmter zweiwertiger Kationen ausgesetzt werden. Dadurch wird die Plasmamembran permeabel und die DNA kann aufgenommen werden. Während der logarithmischen Wachstumsphase einer Bakteriensuspension ist die Effizienz der Transformation am Höchsten.

Der Bakterienstamm wurde in 30 ml SOB-Medium (enthält 10 mM MgSO₄; 10 mM MgCl) inokuliert und über Nacht bei 37°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurden 8 ml dieser Übernachtskultur entnommen und in 200 ml frisches SOB-Medium überführt. Für die Transformation benötigte man eine bestimmte Zelldichte. Dies überprüfte man durch Messung der optischen Dichte (OD). Bei einer Wellenlänge von 550 nm sollte die OD etwa 0,3 betragen. Darauf folgend wurde die Kultur auf 4 Aliquots à 50 ml aufgeteilt und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationschritt von 3 min bei 4000 rpm. Das Bakterien-Pellet wurde in je 16 ml Transformationspuffer 1 aufgenommen, resuspendiert und erneut für 15 Minuten auf Eis gestellt und abermals für 3 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde nun in je 4 ml Transformationspuffer 2 aufgenommen und in Aliquots mit je 100 µl Bakterienkultur aufgeteilt. Diese kompetenten Bakterienstöcke wurden danach zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach bei -80°C zur Lagerung bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

SOB-Medium:	Trypton	2 %
	Hefe-Extrakt	0,5 %
	NaCl	0,06 %
	KCl	0,05 %

ad 1 l mit H₂O bidest, autoklavieren und bei 4°C aufbewahren; vor Gebrauch Zugabe von 10 ml einer Mg²⁺-Lösung: 1 M MgCl₂ x 6 H₂O, 1 M MgSO₄ x 7 H₂O

Transformationspuffer:	RbCl	1:100 mM
	MnCl ₂ x 4 H ₂ O	80 mM
	CH ₃ COOK (pH 7,5)	30 mM
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	13 mM
	Glycerol	15 %

auf pH 5,8 einstellen mit einer 0,2 M CH₃COOH-Lösung; Lagerung bei 4°C

Transformationspuffer 2:	MOPS (pH 6,5)	10 mM
	RbCl ₂	10 mM

4.3.6 Transformation von Bakterien

Bei Bedarf konnte ein Bakterien-Aliquot zur Transformation auf Eis aufgetaut werden. Den Bakterien wurden ein Ligationsansatz (5 µl) bzw. 1 µg Plasmid-DNA zugegeben, vermischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 90 sec. Nun wurden 800 µl LB-Medien (ohne Selektionsantibiotikum) zugegeben und für 45 min bei 37°C inkubiert. Dies entspricht einer Vorkultur. Zur Selektion wurde dieser Ansatz schließlich auf einer antibiotikumhaltigen LB-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert.

4.3.7 Herstellung von Bakterienstämmen

Um eine Stammhaltung der transformierten Bakterien zu gewährleisten wurden 900 µl einer dicht gewachsenen Übernacht-Kultur mit 100 µl DMSO versetzt, invertiert und bei -70°C gelagert.

4.3.8 Präparative Plasmid-DNA-Isolierung (Macherey-Nagel)

Bei größeren Mengen zu isolierender Plasmid-DNA kam ein Kit der Firma Macherey-Nagel (Hoerd) zum Einsatz. Die Aufbereitung erfolgte dabei auf der Grundlage von alkalischer Lyse und Ionenaustausch-Chromatographie an Nucleobond®-Säulen (Macherey-Nagel). Die Isolierung erfolgte nach Herstellerangaben. Mit dieser effizienten Methode konnte mit Hilfe geeigneter Säulen (Nucleobond®-Säulen AX-100) aus einer 100 ml-Bakterienkultur eine DNA-Ausbeute von 20-100 µg erzielt werden.

Bakterienkulturen die das gewünschte Plasmid enthielten wurden bei 4°C für 10 min abzentrifugiert (Sorvall RC-5B, Rotor GS 3, 5000 rpm). Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet in 4 ml S1-Puffer resuspendiert. Danach erfolgte die Inkubation (5 min, RT) mit 4 ml zugegebenem S2-Puffer (SDS-haltig), wodurch eine Auflösung der bakteriellen Zellmembran und somit die Lyse der Zellen hervorgerufen wurde. Das zugeführte NaOH denaturierte Plasmid- und chromosomale-DNA und Proteine. Puffer 3 (4 ml) neutralisierte den Ansatz (5 min auf Eis). Bei diesem wichtigen Schritt renaturierte die geschlossene Plasmid-DNA und blieb somit in Lösung. Die chromosomale Wirts-DNA wurde dagegen präzipitiert. Nach Abzentrifugation (25 min, 4°C, 13000 rpm) wurde der Überstand über einen Papierfilter gegeben und anschließend auf eine Nucleobond®-Säule überführt, die zuvor mit 2,5 ml N2-Puffer äquilibriert wurde.

Aufgrund der speziellen Salz- und pH-Bedingungen im Lysat band nur Plasmid-DNA an die Säule. In einem anschließendem Waschschrift (Waschpuffer N3, 2 x 5 ml) wurden Proteine von der Säule entfernt. Nach Eluation der gebundenen Plasmid-DNA mit 5 ml N5-Puffer wurde diese nach Zugabe von 3,5 ml Isopropanol (100 %) in einem Zentrifugationsschritt (13000 rpm, 1h, 4°C) gefällt. Das Pellet wurde mit 2 ml

kaltem Ethanol (70 %) gewaschen, getrocknet und in 50 µl H₂O bidest gelöst. Der Ansatz wurde für 15 Minuten zum Quellen auf Eis gestellt.

4.3.8.1 Lösungen zur präparativen Plasmid-DNA-Isolierung

Die Isolation aller Plasmide erfolgte mit Hilfe des „Plasmid DNA Purification“-Kit (Macherey-Nagel). Folgende Puffer kamen zum Einsatz:

S1-Puffer (Resuspensionspuffer; pH 8):	Tris/HCl	50 mM
	EDTA	10 mM
	RNaseA	100 µg/ml
S2-Puffer (Lysispuffer):	NaOH	200 mM
	SDS	1 %
S3-Puffer (Neutralisationspuffer):	KAc	2,8 M
N2-Puffer (Äquilibrierungspuffer):	Tris	100 mM
	Ethanol	15 %
	KCl	900 mM
	Triton X-100	0,15 %
	ad pH 6,3 mit H ₃ PO ₄	
N3-Puffer (Waschpuffer):	Tris	100 mM
	Ethanol	15 %
	KCl	1,15 M
	ad pH 6,3 mit H ₃ PO ₄	
N5-Puffer (Elutionspuffer):	Tris	100 mM
	Ethanol	15 %
	KCl	1 M
	ad pH 8,5 mit H ₃ PO ₄	

4.3.9 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien: Minipräparation TENS-Methode (Mini-Präp)

Bei dieser Methode erhält man zwar eher geringe Mengen an DNA, aber sie ist schnell und reicht zur Analyse von Klonierungsschritten aus. Bei der TENS-Methode werden die Bakterienzellen lysiert und die Zellproteine sowie die chromosomale DNA mit Natriumacetat gefällt. Durch einen anschließenden Zentrifugationsschritt wird die Plasmid-DNA von den Zellbestandteilen getrennt. Danach erfolgt eine Fällung mit Ethanol in RNase-haltigem Puffer. Aus einer über Nacht bei 37°C im Inkubationsschüttler inkubierten Kultur wurden 1,5 ml entnommen und bei 5000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das resultierende Bakterienpellet wurde in 200 µl LB Amp-Medium (100 µg/ml) resuspendiert und mit 300 µl TENS-Lösung und 150 µl 3 M Natrium-Acetat (NaAc, pH 5,2) versetzt. Dieser Ansatz wurde nun 10 x invertiert. In einem anschließenden Zentrifugationsschritt (13000 rpm, 6 min) konnte man die gefällten Proteine, die chromosomale DNA und sonstige Zelltrümmer isolieren. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt mit 800 µl eiskaltem 100 %igen Ethanol versetzt und für weitere 6 min mit 13000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet mit enthaltender DNA an der Luft bei RT getrocknet. Die anschließende Lösung erfolgte in 30 µl TE-Puffer plus RNaseA (100 µg/ml).

TENS-Puffer:	Tris/HCl (pH 8,0)	10 mM
	EDTA (pH 8,0)	1 mM
	NaOH	0,1 M
	SDS	0,5 %
	H ₂ O ad	100 ml

4.3.10 Spektrometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Mit Hilfe der Absorptionsspektroskopie können Nukleinsäurekonzentrationen einer Lösung bestimmt werden. Bei einer Wellenlänge von 260 nm besitzen Nukleinsäuren in Lösung ihr Absorptionsmaximum. Aufgrund des Hyperchromizitätseffektes absorbiert einzelsträngige DNA 104-mal stärker als doppelsträngige DNA.

Dadurch ergeben sich bei Messung der optischen Dichte bei 260 nm bei einer Schichtdicke von 1,0 (Schichtdicke der Küvette: 1 cm) unterschiedliche Konzentrationen:

- doppelsträngige DNA: 50 µg/ml
- einzelsträngige DNA und RNA: 40 µg/ml
- einzelsträngige Oligonukleotide: 33 µg/ml

Proteine besitzen ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 280 nm. Falls Verunreinigungen in einer DNA-Lösung vorhanden sind könnten sie dadurch ermittelt werden. Durch die Bildung des Quotienten OD_{260nm}/OD_{280nm} kann der „Reinheitsgrad“ einer nukleinsäurehaltigen Lösung eingeschätzt werden. Bei einer reinen DNA-Lösung sollte ein Wert zwischen 1,65-1,85 erzielt werden. Höhere Werte schließen auf einen höheren Anteil an RNA, niedrigere Werte lassen auf Proteinverunreinigung bzw. Phenolreste schließen. Die Konzentrationsbestimmung wurde mit Hilfe des Photometers „Ultrospec 3100 pro“ der Firma Amersham Biosciences durchgeführt.

4.3.11 Modifikationen von DNA

4.3.11.1 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Damit DNA gezielt gespalten werden kann um, z.B. Fragmente einzubauen, werden Restriktionsendonukleasen benutzt die bestimmte Palindrome in der DNA-Sequenz erkennen und schneiden. Diese Methode wurde unter Verwendung von geeigneten Puffer – und Temperaturbedingungen laut Herstellerangaben eingesetzt. Durch Bestimmung der DNA-Konzentration und Enzymaktivität wird die einzusetzende Enzymmenge bestimmt.

4.3.11.2 Dephosphorylierung von DNA-Enden

DNA hat das Bestreben sich wieder zu verbinden, um diese Rezirkularisierung zu verhindern wurden die zuvor mit Restriktionsenzymen linearisierten DNA Doppelstränge mit Alkalischer Phosphatase („calf intestinal phosphatase“, CIP, Roche, Mannheim) behandelt. Dabei wurde die Phosphatgruppe an den 5'-Enden der DNA abgespalten, wonach keine Rezirkularisierung mehr erfolgen konnte. Im

Anschluss konnte die Ligation mit einem phosphorylierten Insert durchgeführt werden. Die Dephosphorylierung der DNA-Enden erfolgte für 1 h bei 37°C.

4.3.11.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Eine Ligation von DNA-Fragmenten konnte z.B. mit Hilfe einer T4-DNA-Ligase durchgeführt werden. Dieses Enzym ist in der Lage die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einem 3' Hydroxy- und einem 5'-Phosphatende zu katalysieren. Hierbei werden die Enden zweier Nukleinsäuremoleküle *in vitro* miteinander verknüpft. Das Ergebnis ist eine intakte doppelsträngige DNA. Gute Ligationsergebnisse konnten erzielt werden, wenn äquimolare Mengen an CIP-behandeltem Vektor und Insert-DNA eingesetzt wurden. Des Weiteren wurde dem Ansatz ein Ligase-Puffer sowie 1µl (40 U) Ligase (New England Biolabs bzw. Fermentas) beigemischt. Die Inkubationszeit betrug 2 h bei Raumtemperatur. Mit dem Ligationsansatz wurden *E. coli*-Bakterien des Stammes DH5α transformiert.

4.3.11.4 Herstellung stabil-transfizierter Zelllinien mit Hilfe der retroviralen Infektion

Ziel war die Überexpression von Jagged 1 in ausgewählten Glioblastomzelllinien. Die den Ursprungsvektor pCRXL-Jag1 enthaltende Stabkultur (Source BioScience) wurde auf einer LB-Platte ausgestrichen (Kanamycin) und über Nacht kultiviert. Anschließend wurde eine Mini-Präp durchgeführt (siehe unter 4.3.8), von deren 1:500 verdünntem Ansatz 1 µl in einer PCR (60°C, 35 Zyklen, Elongationszeit von 3 Minuten) eingesetzt wurde, um mit Hilfe von Eco RV Primern eine BLUNT-Schnittstelle an das Volllänge-*Jag1*-Gen anzufügen, damit dieses in den nächsten Vektor inkloniert werden konnte. Um den Erfolg der PCR zu überprüfen wurden deren Reaktionsprodukte in einer Gelelektrophorese untersucht. Das Insert wurde in den pCR-BLUNT II-TOPO-Vektor ligiert und in DH5α-kompetente *E. coli*-Bakterien transformiert, die über Nacht auf Kanamycin Platten bei 37 °C bebrütet wurden.

Bei der TOPO-Klonierung macht man sich zunutze, dass man hier keine T4-DNA-Ligase für die Ligrationsreaktion benötigt. Bei diesem System ist der Plasmidvektor mit der Topoisomerase vorinkubiert. Gibt man nun zu diesem System ein PCR-

Produkt hinzu, erfolgt die Ligation innerhalb weniger Minuten bei Raumtemperatur. Die Vorbereitung der Kit-Komponenten wird laut Herstellerangaben durchgeführt.

Am darauffolgenden Tag wurden Kolonien gepickt und in LB-Medium (Kanamycin) über Nacht wieder bei 37°C auf dem Schüttler hochgezogen/vermehrt. Danach erfolgte eine Mini-Präp und es wurde ein Verdau mit dem Restriktionsenzym Eco RV/Dra I durchgeführt. Dieses Restriktionsenzym entfernt die Sequenz blunt, wodurch Überhänge vermieden werden. Dra I schneidet den Vektor, aber nicht das Insert, was es ermöglicht die relevante Bande aus dem Gel zu präparieren (ca. 3600 bp). Nach dem Ausschneiden wurde die Bande zunächst mit Hilfe eines Kits (ZymoClean; Produkt ist in 10µl H₂O) aufgereinigt und nach dem Bestimmen der DNA-Konzentration (Nano Drop) in molaren Verhältnissen (Vektor/Insert-Verhältnis: 1/3) in den ebenfalls EcoR V geschnittenen pSfi-Express-FLAG-Vektor ligiert (2 h, RT). Nach der Ligation wurde das Insert in DH5α-kompetente E. coli-Bakterien transformiert, die über Nacht auf Kanamycin Platten bei 37 °C bebrütet wurden. Am darauffolgenden Tag wurden Kolonien gepickt und in LB-Medium (Kanamycin) über Nacht wieder bei 37°C auf dem Schüttler hochgezogen/vermehrt. Danach erfolgte eine Mini-Präp (beschrieben unter 4.3.9.) und es wurde ein Richtungsverdau durchgeführt, da das Insert sowohl in sense- als auch in antisense-Richtung in den Vektor inkloniert werden kann (beide Seiten haben die gleiche Schnittstelle). Dieser Richtungsverdau wurde mit den Enzymen Bam HI und Bgl II durchgeführt. Bgl II schneidet das Insert bei Base 858 und Bam HI den Vektor bei Base 680. Diese Schnittstellen befinden sich hinter der von Eco RV, die bei 613 bp liegt. Somit sind alle Klone die eine Produktlänge von 2800 bp zeigen sense-orientiert und können somit weiterverwendet werden. Diese Klone wurden anschließend mit Sfi I/Dra I geschnitten (Dra I zerschneidet den Vektor), wodurch das Insert vom Vektor isoliert wurde. Das Insert wurde danach in den pRTS-1-Vektor (Sfi I geschnitten) ligiert und in DH5α kompetente E coli.-Bakterien transformiert. Diese wurden auf (Ampicillin) Platten über Nacht bei 37 °C bebrütet. Am nächsten Tag wurden Kolonien in LB-Medium (Ampicillin) gepickt und wieder über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler hochgezogen/vermehrt. Danach erfolgte erneut eine Mini-Präp (siehe unter Punkt 4.3.9) und es wurde mit dem Enzym Sac I (schneidet im Insert bei Base 3223 bp und hat im Vektor (pRTS-1) mehrere Schnittstellen: 13466 bp; 17899 bp; 18213 bp; 18266 bp; 18370 bp, wobei die Fragmente zwischen 17899 bp und 18370 bp auf dem Gel wegen ihrer geringen Länge nicht zu sehen sind) wieder ein Kontrollverdau

durchgeführt. In der Gelelektrophorese konnten Fragmente der folgenden Längen unterschieden werden: 473 bp („falsches“ Fragment), 4433 bp („falsches“ Fragment, konstant bei beiden Orientierungen entstehendes Vektorprodukt) und 3262 bp (Fragment identifiziert die „richtigen“ Klone). Zur weiteren Verwendung in Zellkultur wurden Midi-Präps der „richtigen Klone“ eingesetzt.

Für die Herstellung der stabilen Zelllinie wurden folgende Vektoren verwendet:

- Jag1pCRXL (Source BioScience, Nottingham, United Kingdom; Ursprungsvektor von Invitrogen, jetzt Thermo Fisher Scientific)
- pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen)
- pSfi-Express-FLAG (Invitrogen)
- pRTS-1 (Zielvektor)

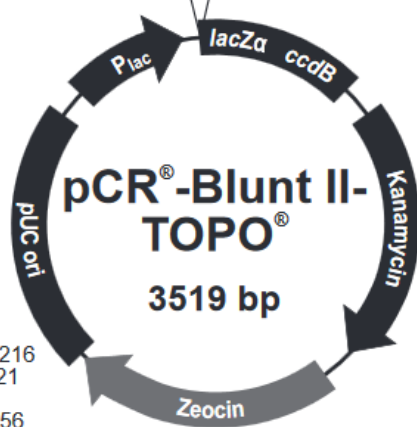
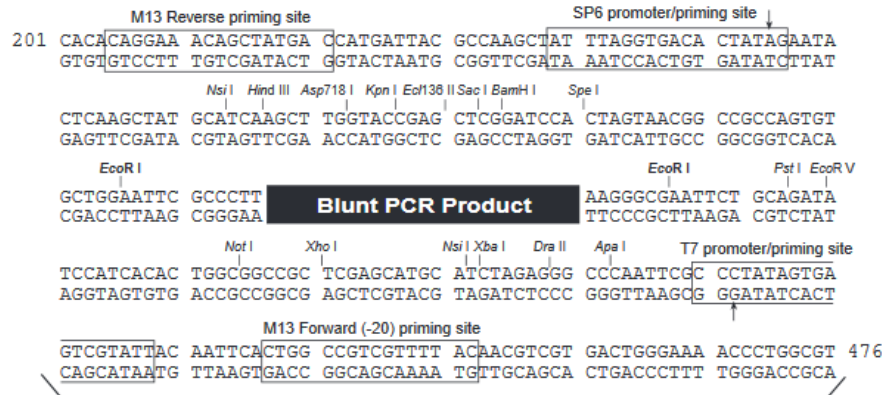
Schnittstellen der eingesetzten Enzyme (Fermentas, Hanover, USA):

- Eco RV: GAT_ATC
- Dra I: TTT_AAA
- Bam HI: G_GATCC
- Bgl II: A_GATCT
- Sfi I: GGCCNNNN_NGGCC
- Sac I: GAGCT_C

_ = an dieser Stelle schneiden die jeweiligen Enzyme

4.3.11.5 Vektorkarten die zur Herstellung der stabilen Zelllinien zum Einsatz kamen

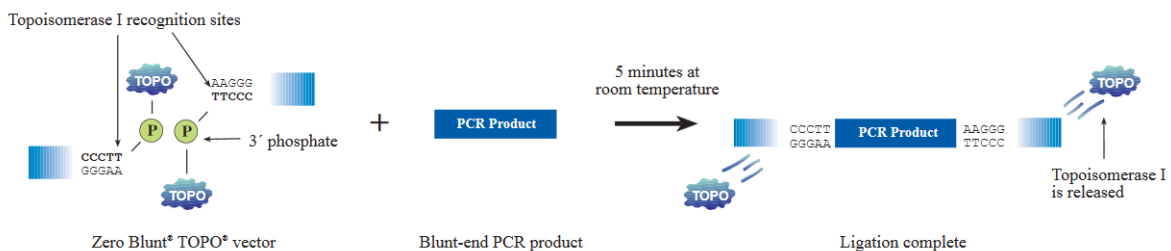
- pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen)



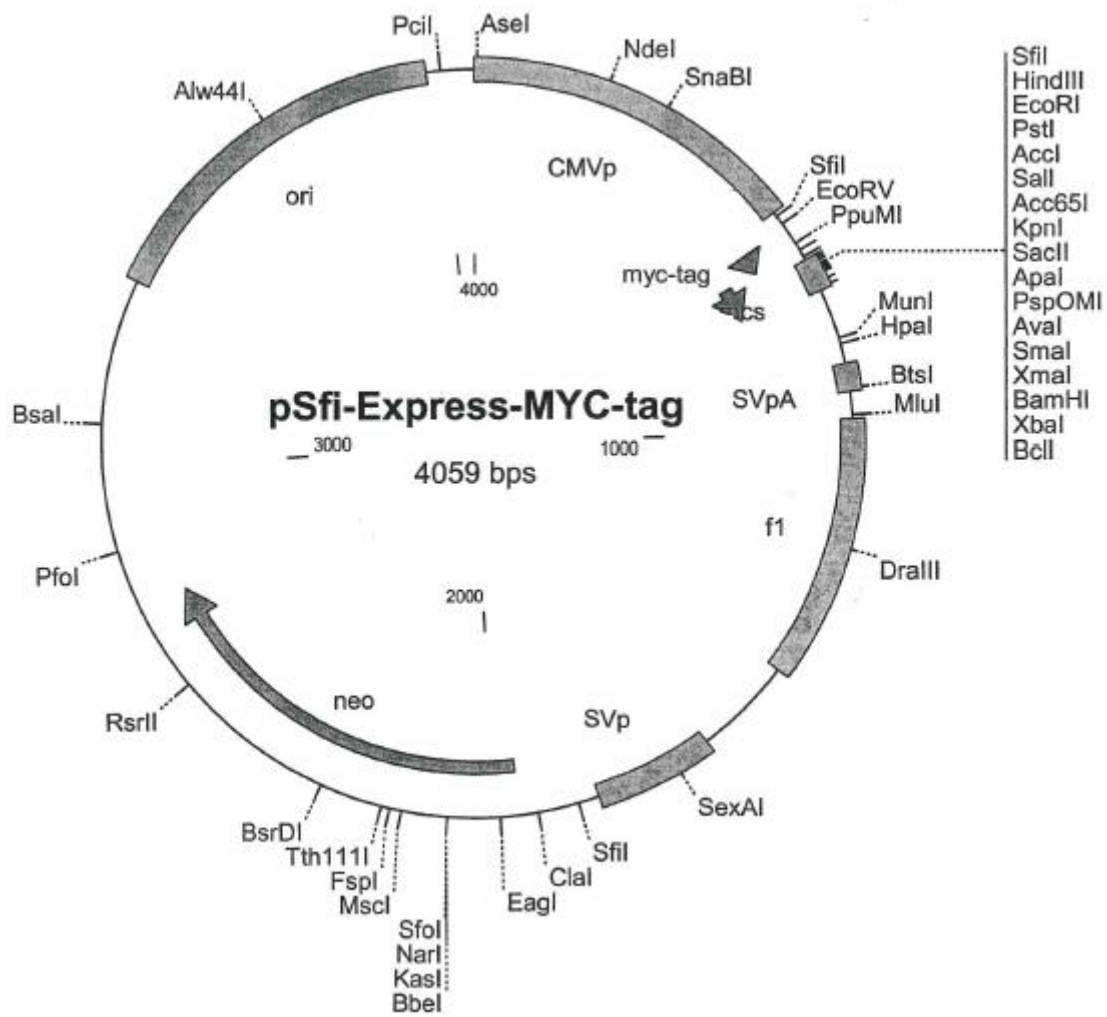
Comments for pCR[®]-Blunt II-TOPO[®]
3519 nucleotides

- lac* promoter/operator region: bases 95-216
- M13 Reverse priming site: bases 205-221
- LacZ-alpha ORF: bases 217-576
- SP6 promoter priming site: bases 239-256
- Multiple Cloning Site: bases 269-399
- TOPO[®]-Cloning site: bases 336-337
- T7 promoter priming site: bases 406-425
- M13 (-20) Forward priming site: bases 433-448
- Fusion joint: bases 577-585
- ccdB* lethal gene ORF: bases 586-888
- kan* gene: bases 1099-2031
- kan* promoter: bases 1099-1236
- Kanamycin resistance gene ORF: bases 1237-2031
- Zeocin resistance ORF: bases 2238-2612
- pUC origin: bases 2724-3397

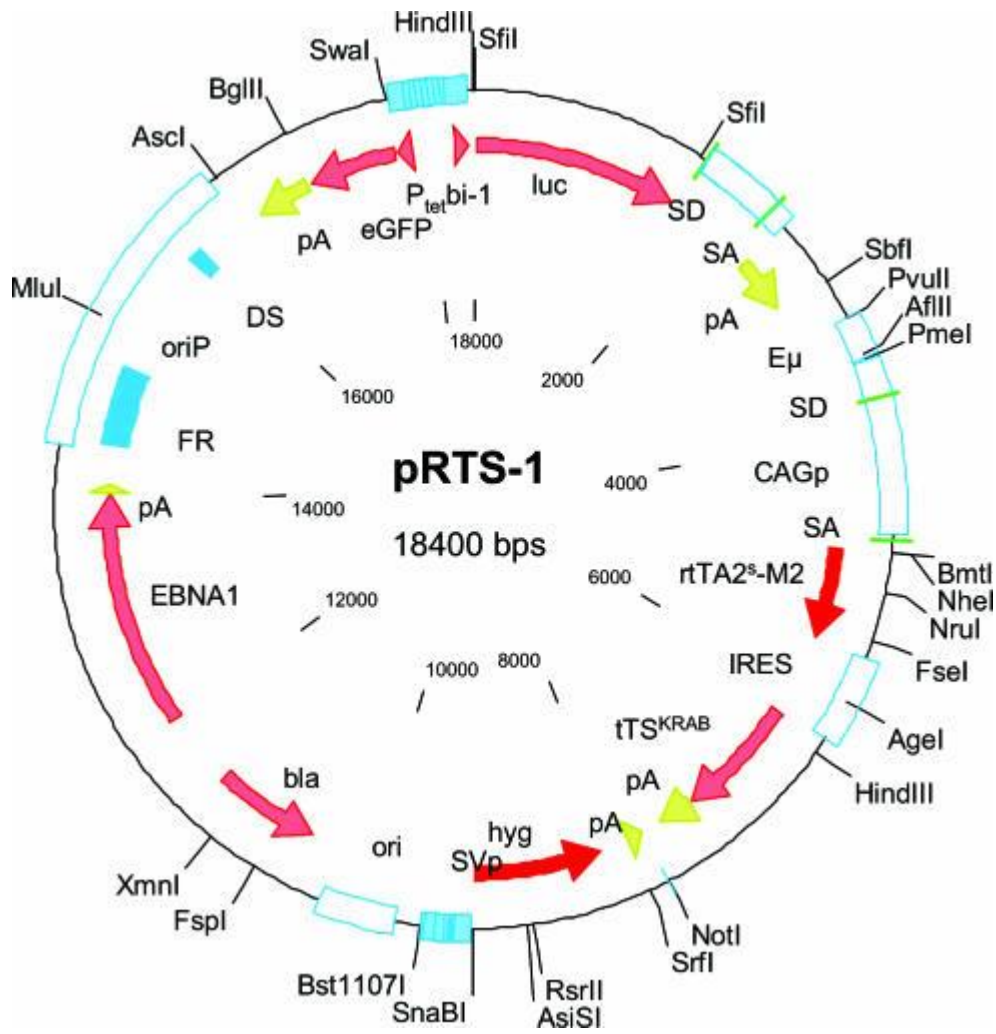
Schematischer Ablauf einer Ligation in den pCR-Blunt II-TOPO



- pSfi-Express-FLAG (Invitrogen)



- pRTS-1 (Zielvektor)



Der retrovirale Vektor pcDNA3.1 (Invitrogen)

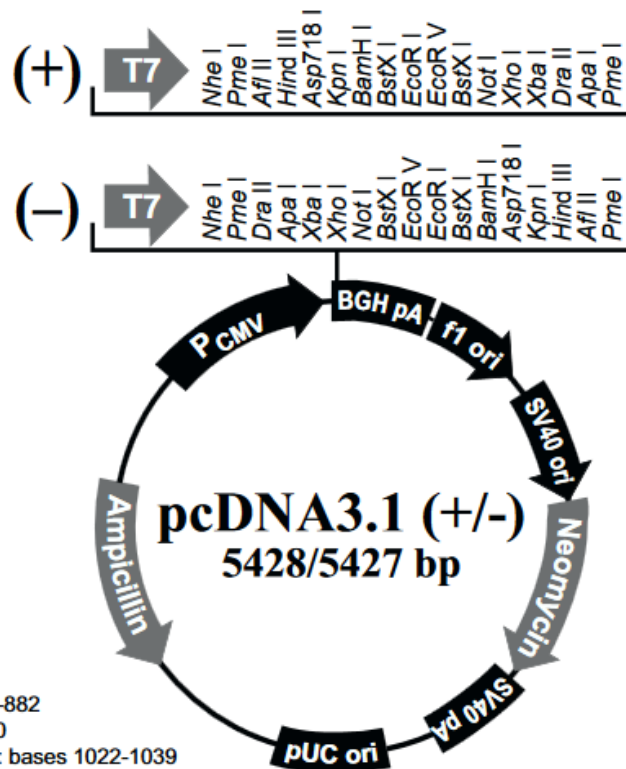
Der pcDNA3.1-Vektor verfügt über ein Neomycin-Resistenzgen, was die Selektion von eukaryotischen Zellen ermöglichte. Die Ampicillin-Resistenz benötigte man zur Selektion in Bakterienzellen. Die Jag1-Sequenz wurde über eine Schnittstelle innerhalb der MSC (Multiple Cloning Site) einkloniert.

Appendix

pcDNA3.1 Vectors

Map of pcDNA3.1(+) and pcDNA3.1(-)

The figure below summarizes the features of the pcDNA3.1(+) and pcDNA3.1(-) vectors. The complete sequences for pcDNA3.1(+) and pcDNA3.1(-) are available for downloading from our World Wide Web site (www.invitrogen.com) or from Technical Service (see page 13). Details of the multiple cloning sites are shown on page 3 for pcDNA3.1(+) and page 4 for pcDNA3.1(-).



Comments for pcDNA3.1 (+)

5428 nucleotides

- CMV promoter: bases 232-819
- T7 promoter/priming site: bases 863-882
- Multiple cloning site: bases 895-1010
- pcDNA3.1/BGH reverse priming site: bases 1022-1039
- BGH polyadenylation sequence: bases 1028-1252
- f1 origin: bases 1298-1726
- SV40 early promoter and origin: bases 1731-2074
- Neomycin resistance gene (ORF): bases 2136-2930
- SV40 early polyadenylation signal: bases 3104-3234
- pUC origin: bases 3617-4287 (complementary strand)
- Ampicillin resistance gene (*bla*): bases 4432-5428 (complementary strand)
- ORF: bases 4432-5292 (complementary strand)
- Ribosome binding site: bases 5300-5304 (complementary strand)
- bla* promoter (P3): bases 5327-5333 (complementary strand)

4.3.12 Agarosegelelektrophorese doppelsträngiger DNA

Bei dieser Methode werden DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe in einem elektrischen Feld aufgetrennt.

Die Agarosekonzentration des Gels richtete sich nach der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente. Je nach Konzentration wurde eine entsprechende Menge an Agarose in entsprechendem Volumen 1x TAE-Puffer unter Aufkochen gelöst. Erst bei einer Temperatur von 50°C konnte Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,5 µg/ml) zugegeben und in eine vorbereitete Gelkammer überführt werden. Die aufzutrennenden DNA-Proben wurden mit 5x Probenpuffer versehen und in einer horizontalen Elektrophoresekammer bei einer Feldstärke von 5-7 V/cm aufgetrennt (1x TAE-Puffer). Das zugegebene Ethidiumbromid (Fluoreszenzfarbstoff) interkaliert mit doppelsträngiger DNA, dadurch waren DNA-Fragmente nach der Elektrophorese unter UV-Licht erkennbar. Zur Auswertung präparativer Gele verwendete man UV-Licht mit einer Wellenlänge von $\lambda = 366 \text{ nm}$, für analytische Gele wurde kurzwelligeres UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) eingesetzt. Zur Dokumentation wurde folgendes System (CCD-Kamera; MWG Biotech Gel Print 200i) eingesetzt.

5x Probenpuffer:	EDTA	50 mM
	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
	Glycerin	50 % (v/v)
Agarosegel	Agarose	1-3 % (w/v)
	Ethidiumbromid	0,5 µg/ml

4.3.12.1 DNA-Größenmarker

Zur Abschätzung der Größe doppelsträngiger linearer DNA-Moleküle (in einem Bereich von 0,1 bis 12 Kbp) wurde ein „1 kb+ DNA Ladder“ der Firma Invitrogen verwendet. Sie enthält Fragmente folgender Größe (in bp): 100 / 200 / 300 / 400 / 500 / 650 / 850 / 1000 / 1650 / 2000 / 3000 / 4000 / 5000 / 6000 / 7000 / 8000 / 9000 / 10.000 / 11.000 / 12.000

4.3.13 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Die Gelextraktion ist eine bewährte biochemische Methode zur Isolierung von Molekülen wie DNA, RNA und Proteine aus Agarosegelen oder Polyacrylamidgelen. In unserem Fall musste DNA aus einem Agarosegel extrahiert werden. Dazu benutzten wir einen Kit der Firma Macherey-Nagel. Das Gelstück mit der zu untersuchenden Bande wurde per Skalpell aus dem Agarosegel mit Zuhilfenahme des UV-Lichts (366 nm) herausgeschnitten. Die Agarosegelstücke wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von einem Puffer (enthält chaotrope Salze) und Erwärmung auf etwa 55 °C aufgelöst. Durch die chaotropen Salze wurden Proteine denaturiert und die Agarose-Gelmatrix aufgelöst. Diese Lösung wurde nun über eine Säule („NucleoSpin®“-Säulen der Firma Macherey-Nagel) gegeben und laut Herstellerangaben weiter behandelt. Bei einem pH-Wert kleiner 7,5 und einer hohen Konzentration chaotroper Salze wurden die Nukleinsäuren an der Säule absorbiert. Oligonukleotide, Enzyme und Salze konnten somit durch einen darauffolgenden Zentrifugationsschritt entfernt werden. Die aufgereinigte DNA wurde nach Konzentrationsbestimmung zur Ligation eines PCR-Klonierungsvektors eingesetzt.

4.4 Migrationsassay

Die durch Konzentrationsgradienten geeigneter Stoffe vermittelte, gezielte Fortbewegung (Vor.- bzw. Rückwärtsbewegung) von Zellen nennt man Chemotaxis (Wiggins und Rappoport 2000). Chemotaxis ist eine der grundlegendsten physiologischen Zellreaktionen. Diese Eigenschaft spielt bei vielen biologischen Prozessen wie z.B. bei Wundheilung, bakteriellen Aggregationen, Krebswachstum und Metastasierung eine wichtige Rolle (Wiggins und Rappoport 2000). Chemotaktisches Verhalten ist eine der wesentlichen Eigenschaften von invasiv wachsenden Krebszellen.

Der Agarose Spot Assay (Abb. 3) ist eine leicht standardisierbare und recht einfache, aber effiziente Methode um die Migration von Zellen zu analysieren (Wiggins und

Rappoport 2000). Diese Methode wird aktuell bei unterschiedlichsten Fragestellungen erfolgreich eingesetzt, wobei ihr Repertoire von Untersuchungen zur Embryonalentwicklung bis zur Ätiologie von Krankheiten wie Krebs reicht (Wiggins und Rappoport 2000).

Zunächst wurden die humanen, stabil mit Jagged1 transfizierten, Glioblastomzelllinien U373 und U87 unter den in Material und Methoden beschriebenen Bedingungen in Kultur gehalten. Die „low melting Agarose spots“ wurden wie in Abbildung 4 gezeigt auf 10 cm Zellkulturschalen aufgetropft (Tropfenvolumen: 10 µl) und nach Aushärtung mit Zellsuspension überschichtet. Die Zellen wurden danach unter den in Material und Methoden beschriebenen Standardbedingungen weiterkultiviert. Nach 24 Stunden wurden die Zellkulturschalen mikroskopisch ausgewertet.

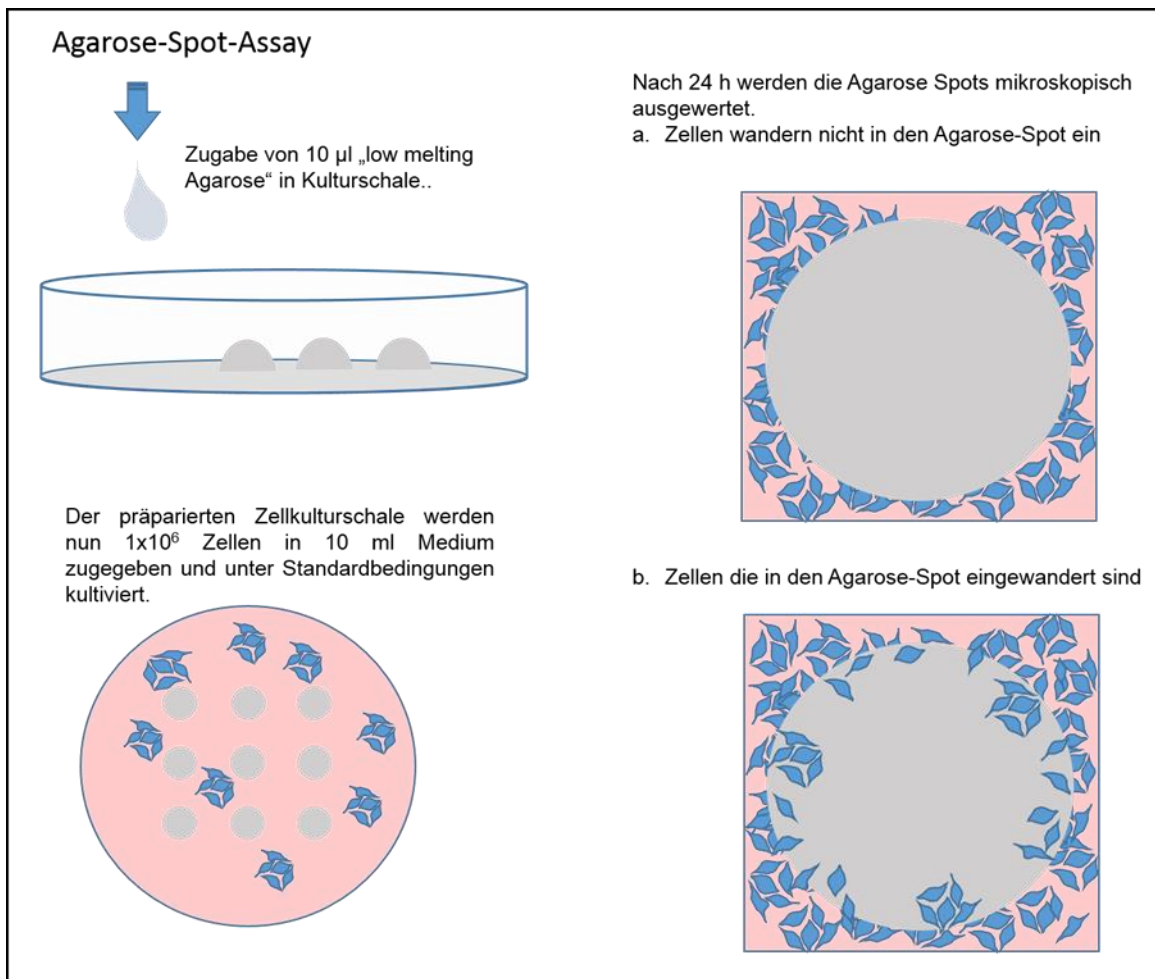


Abb. 4: Schematische Darstellung eines Agarose-Spot-Assays.

4.5 Analyseverfahren zum Nachweis und zur Quantifizierung von Proteinen

4.5.1 Herstellung von Proteinextrakten und Konzentrationsbestimmung

4.5.1.1 Zellaufschluß unter reduzierten Bedingungen

Unter denaturierenden Bedingungen wurden Gesamtzellextrakte gewonnen indem Zellen zunächst mit PBS gewaschen und mit einem Zellschaber vom Boden des Gefäßes abgekratzt wurden. Die Zelllösung wurde in ein Eppendorf Gefäß überführt und 1 Minute bei 13000 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Abhängigkeit von seiner Größe mit 100 – 400 µl einer Pufferlösung (bei 100°C erhitzter 2xSDS-Gel-Ladepuffer) versetzt und resuspendiert. Danach wurde dieser Ansatz für 10 Minuten bei 100°C erhitzt, was zur Reduktion von Disulfidbrücken und zur Zerstörung der Tertiärstruktur der Proteine führt. Dadurch ist es möglich die Proteine anhand des Molekulargewichts und nicht nach der Ladung aufzutrennen.

Um die enthaltene chromosomale DNA zu entfernen wurde die Probe durch eine 23-gauge-Kanüle geschert. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt (13000 rpm, 30 min) wurde der Überstand entnommen und das Pellet mit enthaltener DNA verworfen. Um gleiche Proteinmengen einsetzen zu können wurde eine Proteinkonzentrationsbestimmung (s.u.) durchgeführt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C.

2x SDS-Gel-Ladepuffer:	Tris/HCl, pH 6,8	100 mM
	DTT	200 mM
	SDS	4%
	Bromphenolblau	0,2%
	Glycerol	20% (v/v)

4.5.1.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 2 µl des Proteinextraktes in 198 µl 0,1 M NaOH verdünnt und die optische Dichte bei 280 nm (OD_{280nm}) in einem Photometer (Ultrospec 3100 pro, Amersham Biosciences) gemessen. Die Proteinmenge wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$6,4 / OD_{280nm} = x \mu l$, die 15 µg Protein enthalten

4.5.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

4.5.2.1 Prinzip der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ermöglicht die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülmasse. Als Matrix (Trennmedium) dient ein Gel auf Polyacrylamidbasis. Die Proben wurden mit einem Überschuss an SDS auf 95°C erhitzt, durch diesen Vorgang wurden die Wasserstoffbrücken aufgelöst und somit die Quartär- und Tertiärstruktur des Proteins zerstört. Das Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) wird eingesetzt um die Eigenladung der Proteine zu überlagern. Die Proteine erlangen dadurch eine konstant negative Ladungsverteilung, was zunächst das Abstoßen der Seitenketten und als weitere Folge nach Denaturierung das Entstehen von linearen Proteinen bewirkt. Die lineare Struktur erlaubt eine Auftrennung nach der Kettenlänge, die sich proportional zur Molekülmasse verhält. Disulfidbrückenbindungen zwischen Cysteinen werden durch Zugabe einer reduzierenden Thiolverbindung wie Dithiothreitol (DTT), aufgespalten, das führt zur Auflösung der Quartärstruktur. Das Protein liegt nun in einer gestreckten, denaturierten, linearen Form vor. Dadurch wird erreicht, dass allein die Größe (molare Masse) des Proteins als Trennkriterium wirkt.

Die Elektrophorese erfolgt in einem, von U.K. Laemmli (Laemmli 1970) eingeführten diskontinuierlichem Tris-HCl/Tris-Glycin Puffersystem. Ein weitporiges Sammelgel (Tris-Glycin-Puffer pH 6.8; 3-4% Acrylamid) dient der Aufkonzentrierung der Proteine um eine definierte Bande zu erhalten. Mit Hilfe eines engmaschigen Trenngels (Tris-Glycin-Puffer pH 8.8, 8-13% Acrylamid) werden die Proteine in Abhängigkeit ihres

Molekulargewichts aufgetrennt.

Durch eine Co-Polymerisation von Acrylamid und quervernetzendem N,N'-Methylenbisacrylamid entsteht eine Gelmatrix. Als Reaktionsstarter dient Ammoniumpersulfat (APS), als Katalysator N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED). Das Gel wird aus zwei unterschiedlichen Komponenten hergestellt; einem grobporigen Sammelgel und einem feinporigen Trenngel. Bei der SDS-PAGE handelt es sich um eine diskontinuierliche Gelelektrophorese, bei der unterschiedliche Porengrößen und pH-Werte das Laufverhalten der Proteinextrakte bestimmen. Im Sammelgel werden die Proteine aufkonzentriert um sich dann im Trenngel aufzutrennen. Über das Verhältnis der verwendeten Acrylamid- und Bisacrylamidkonzentrationen wurde die Auftrennungseigenschaft sowie die Porengröße des Gels bestimmt. Zur relativen Molekulargewichtsbestimmung der aufgetrennten Proteine werden vorgefärbten Markerproteine bekannter Größen mit aufgetragen.

1x Laufpuffer (SDS-PAGE):	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
	Ad pH 8,3	

4.5.2.2 Gießen eines SDS-PAGE-Gels und anschließende Elektrophorese

Bei dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Systemen an Flachbettgelen eingesetzt. Bei beiden wurden Glasplatten verwendet die bei Beginn mit Ethanol (70%) und abschließend mit Aceton gründlich gereinigt wurden. Als Abstandshalter dienten 1 mm dicke „Spacer“. Nach dem Abdichten der zusammengebauten Gelkammern konnte das Trenngel gegossen und in die Kammer überführt werden. Die Porengröße des Gels wurde je nach abhängig vom Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins gewählt. Je nach Protein wurden Gele unterschiedlichster Vernetzungsgrade erstellt (7,5% - 12 %; siehe Tabelle 2). Zur Gewährleistung einer sauberen Phasengrenze wurde das Trenngel mit 1 ml Wasser überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation des Gels wurde das Wasser mit Hilfe eines saugfähigen Papiers entfernt und mit Sammelgel überschichtet (Zusammensetzung des

Sammelgels Tabelle 2). Für die Herstellung der Ladungstaschen führte man in das Sammelgel einen 1 mm dicken Kamm ein der als Platzhalter diente und entfernte diesen nach vollständigen Polymerisation wieder. Dann erfolgte die Beladung des Gels mit den Zelllysaten. Die Proben wurden zuvor mit 1% DTT und Bromphenolblau versetzt und 5 Minuten bei 95°C inkubiert (Reduktion der vorhandenen Disulfidgruppen; Linearisierung der Proteine). Beim Beladen war es wichtig auf gleiche Mengen an Gesamtprotein jeder zu untersuchenden Probe zu achten. Es wurden Proteinmengen zwischen 15 µg und 30 µg Protein eingesetzt. Zusätzlich wurde ein Molekulargewichtsmarker eingesetzt, der eine Mischung aus unterschiedlichen standardisierten Proteinen enthält. Die Proteine dieses Markers sind kovalent an einen blauen Farbstoff gekoppelt. Für 7,5%ige Gele wurde ein Marker verwendet der ein Proteingemisch in einem Größenbereich zwischen 10 kDa -180 kDa enthält. Der Marker diente der Abschätzung des Molekulargewichts der zu untersuchenden Proteine. Die jeweils Lysat beladenen Taschen wurden mit Elektrophoresepuffer überschichtet. Danach wurde die Elektrophoreseapparatur zusammgebaut und mit Elektrophoresepuffer befüllt. Um eine gute Auftrennung zu erreichen wurden die Proteine bei 40 mA aufgetrennt. Die Laufzeit bei einem 7,5% Gel betrug ungefähr 2½ Stunden. Die Lauffront konnte mit Hilfe des zugegebenen Bromphenolblaus sichtbar gemacht und somit abgeschätzt werden.

Tabelle 2: Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen:

Komponenten	Trenngel				Sammelgel
	8%	10%	12%	13%	5%
1M Tris pH 6,8	-	-	-	-	750 µl
1M Tris pH 8,8	4,5 ml	6 ml	6 ml	6 ml	-
10% SDS	240 µl	320 µl	320 µl	320 µl	120 µl
AA-Stock (30%)	3,2 ml	5,3 ml	7,4 ml	8 ml	1 ml
Bis-AA-Stock (2%)	1,28 ml	2,12 ml	2,96 ml	3,2 ml	400 µl
H ₂ O _{dest.}	2,72 ml	2,26 ml	1,7 ml	-	3,67 ml
APS	50 µl	140 µl	140 µl	140 µl	50 µl
TEMED	10 µl	14 µl	14 µl	14 µl	10 µl

AA-Stock: Acrylamid-Stock

Bis-AA-Stock: Bis- Acrylamid-Stock

4x Trenngelpuffer pH8,8:	Tris-HCL (pH8,8)	1,5 M
	SDS	0,4%
4x Sammelgelpuffer pH 6,8:	Tris/Hcl	0,3 M
	SDS	0,4%

4.5.3 Western-Blot (Immunoblot)

Um die bei der SDS-Page aufgetrennten Proteine „sichtbar“ zu machen bedient man sich der Western Blot Methode. Hierbei werden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Membran übertragen. Das aufgetrennte Proteinmuster überträgt sich deckungsgleich auf die Membran. Die Bindung der Proteine an die Membran erfolgt über hydrophobe Wechselwirkungen. Mit speziellen Färbetechniken können danach unter Verwendung von spezifischen Antikörpern ausgewählte Proteine identifiziert werden. Durch Waschschriffe werden unspezifisch gebundene Antikörper entfernt. Die Antikörper-vermittelte Immunreaktivität kann sowohl qualitativ als auch quantitativ ausgewertet werden.

4.5.3.1 Proteintransfer (Tank-Blot-System)

Die in dieser Arbeit eingesetzte hydrophobe PVDF-Membran (Immobilon-Membran, Millipore) wurde zunächst mittels Methanol 30 Sekunden äquibriert. Danach wurde die nun hydrophile Membran bis zur weiteren Verwendung in einer speziellen Pufferlösung (Western-Transfer-Puffer) gelagert. Der Aufbau des Blots erfolgte nach folgendem Schema:

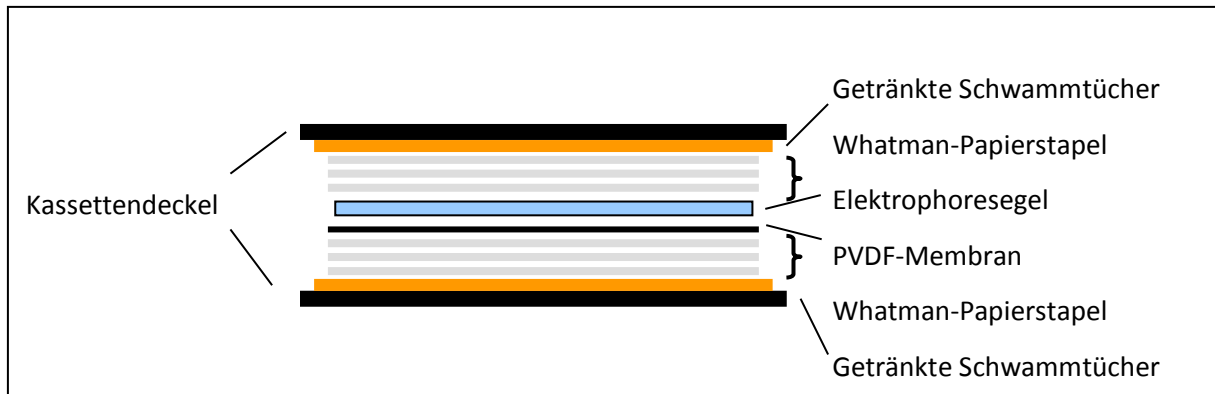


Abb. 5: Schematische Darstellung des Sandwich-Aufbaus eines Western-Blots

Beim Aufbau des Blots wurden Schwammtücher und Whatman-Papier in Western-Transfer-Puffer getränkt. Dieser Sandwich-Aufbau (Abb.5) wurde so in den mit Western-Transfer-Puffer gefüllten und an eine Spannungsquelle angeschlossenen Tank gestellt. Negativ geladene Proteine aus dem Gel wandern so in Richtung Anode und binden an die Membran. Der Protein-Transfer wurde 3 h bei 330 mA durchgeführt. Danach wurde die proteingebundene-PVDF-Membran zum „Blocken“ für 30 min in 5% Magermilchpulver inkubiert. Bei diesem Vorgang wurden unspezifische Bindungen blockiert bzw. abgesättigt. Nach dem Blocken der Membran erfolgte unter Verwendung von spezifischen Antikörpern die immunologische Detektion von bestimmten Proteinen.

Western-Transferpuffer:	Glycin	192 mM
	Tris	25 mM
	Methanol	20 % (v/v)

4.5.3.2 Immunologische Detektion von Proteinen

Die Detektion der Proteine auf der Membran wurde mit den in Tabelle 6 aufgeführten spezifischen Antikörpern durchgeführt (u.a. gegen Notch 1/EPITOMICS, Burlingame, #1935-1; Jagged 1/clone H-114, Santa Cruz Biotechnology, Inc., sc-8303; oder GAPDH/(clone FL-335, Santa Cruz Biotechnology, Inc., sc-25778; u.a.). Die

markierten Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern markiert um sie dann mit Hilfe einer Peroxidase-katalysierten chemischen Reaktion mittels Chemolumineszenz sichtbar zu machen. Nach Inkubation der Membran mit einem spezifisch gegen das jeweils gesuchte Protein gerichteten Primärantikörper folgte ein zweiter Inkubationsschritt mit einem gegen den Primärantikörper gerichteten, horse radish peroxidase (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper. Nach einem 20-minütigen Waschschrift in TBS-T wurden die Membranen dazu auf einem Taumler mit dem Primärantikörper inkubiert. Die Inkubationszeiten unterschieden sich je nach eingesetztem Primärantikörper zwischen 2 und 24 h (bei 4°C). Die Membranen wurden anschließend 3 x 15 Minuten in TBS-T gewaschen. Um die spezifische Bindung der Antikörper an Epitope des Antigens nachzuweisen, erfolgte eine einstündige Inkubation mit einem Spezies-spezifischen sekundären HRP-gekoppelter Antikörper (engl.: Horseradish Peroxidase). Der Sekundärantikörper wurde für 2 h bei RT inkubiert. Im Anschluss daran folgte erneut ein Waschschrift über 3 x 15 Minuten in TBS-T. Der HRP-gekoppelte Sekundärantikörper vermittelt eine chemische Reaktion in der Luminol umgesetzt wird (ECL-Methode, Pierce) und bei der die freiwerdende Lumineszenz mittels Röntgenfilm (ECL-Hyperfilm, GE Healthcare) detektiert werden kann.

4.5.3.3 Proteinnachweis mittels „Enhanced Chemoluminescence“(ECL)

Bei der in dieser Arbeit eingesetzten sensitiven „enhanced Chemoluminescence“-Methode (Pierce) werden an enzymgekoppelte Antikörper gebundene Proteine detektiert, indem enzymkatalysierte Lichtreaktionen mit Hilfe eines Röntgenfilms eingefangen werden. Bei der durch den Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper vermittelten Chemolumineszenz-Reaktion werden H_2O_2 reduziert und Luminol oxidiert, was zur Freisetzung von Photonen und zu einer Lichtemission bei 428 nm führt. Die freigesetzten Photonen werden dann durch einen Röntgenfilm „aufgefangen“. Die Detektion wurde gemäß den Angaben des Herstellers (Pierce) durchgeführt. Die Membran wurde entsprechend ihrer Größe mit einem bestimmten Volumen Detektionsreagenz 1 Minute überschichtet, mit Frischhaltefolie umwickelt und in eine Filmkassette überführt. Dort wurde ein Röntgenfilm (ECL-Hyperfilm, GE Healthcare) aufgelegt wurde, der anschließend entwickelt, fixiert und getrocknet

wurde. Es besteht die Möglichkeit eine Membran mehrfach zu verwenden. Hierzu bedient man sich der Methode des „Strippens“, bei der unter Erhaltung der Proteinauftrennungsmuster gebundene Antikörper (Primär- und Sekundärantikörper) von der Membran entfernt werden. Die Membran kann danach für weitere immunologische Nachweisreaktionen verwendet werden.

Um zu gewährleisten, dass der eingesetzte Primärantikörper spezifisch an die Membran bzw. Proteine band wurden Negativkontroll-Blots durchgeführt. In diesem Fall wurden die Proteine zweimal auf das Gel aufgetragen. Die ganze Prozedur wurde wie oben beschrieben durchgeführt lediglich die Inkubation mit dem spezifischen Primärantikörper entfiel hier wurde lediglich TBS-T eingesetzt. Die weitere Behandlung der beiden Membranteile war gleich entsprechend der o.a. Beschreibung.

PBS-Puffer:	NaCl	140 mM
	KCl	25 mM
	MgCl ₂	0,5 mM
	CaCl ₂	1 mM
	Na-K-Phosphat	10 mM
TBS-T (1x)	1x TBS	
	0,1% Tween 20	

4.5.3.4 Proteingewichtsmarker

Zur Bestimmung der aufgetrennten Proteine anhand ihres Molekulargewichts wurde ein vorgefärbter Marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder) der Firma Fermentas verwendet. Dieser Marker setzt sich aus zehn aufgereinigten Proteinen zusammen. Diese Proteine wurden aus, in E. coli rekombinant zusammengesetzten Proteinen gewonnen. An diese Proteine wurde ein blauer Farbstoff gekoppelt, Ausnahme stellt hier das 70 kDa-Protein dar, das einen orangenen Farbstoff enthält und als Größenreferenz dient. Der Marker enthält folgende „Proteingewichte“:

~170 / ~130 / ~100 / ~70 / ~55 / ~40 / ~35 / ~25 / ~15 / ~10 [kD]

4.5.3.5 Elution/Mehrfachmarkierung der Membran nach Entfernen Membran-gebundener Antikörper

Dieses Verfahren wurde eingesetzt um zuvor gebundene Antikörperkomplexe von der Membran zu lösen. Danach kann die Membran erneut verwendet werden um andere Proteine mit spezifischen Antikörpern zu detektieren. Die Membran wurde in einem Elutionspuffer bei 55°C für 30 Minuten inkubiert. Die Membran wurde in 100 ml Puffer eluiert, das β -2-Mercaptoethanol wurde erst kurz vor Gebrauch zugegeben (690 μ l auf 100 ml Elutionspuffer). Bei diesem Schritt wurden mit Hilfe von SDS und β -Mercaptoethanol die kovalenten Protein-Antikörper-Bindungen gelöst. Danach wurde die Membran unter fließendem Leitungswasser gewaschen, die zwei darauf folgenden Waschschrte wurden jeweils für 10 Minuten in TBS-T durchgeführt. Danach wurde die Membran erneut für zwei Stunden in Blockierungs-Lösung (Roti-Block) inkubiert. Eine Wiedermarkierung mit anderen Antikörpern war nun möglich.

Elutionspuffer:	Tris/HCL pH 6,8	62,5 mM
	SDS	2%
	β -2-Mercaptoethanol	14,4 M
	ddH ₂ O	

4.5.4 Co-Immunopräzipitation von Proteinen

4.5.4.1 Prinzip der Co-Immunopräzipitation von Proteinen

Diese biochemische Methode dient zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen. Mit Hilfe dieses sogenannten Pulldown-Assays werden Antigene mit Hilfe eines Antikörpers herausgefischt und aufkonzentriert. Antikörper (konstante Abschnitte) besitzen eine hohe Affinität zu Protein G-Sepharose, die auf ihrer Oberfläche das Protein G von *Staphylococcus aureus*, trägt. Dieses Protein ist in der Lage das Fc-Fragment des Antikörpers zu binden. Durch die Zugabe von spezifischen Antikörpern

und danach von Protein G-Sepharose lassen sich gezielt Immunkomplexe aus den Zellextrakten präzipitieren.

An die Immunkomplexe binden nicht nur spezifische Proteine sondern auch deren möglichen Interaktionspartner die somit ebenfalls isoliert werden können. Die Pufferbedingungen bei einer Co-Immunopräzipitation müssen so gewählt werden, dass die Bindung des Proteins an den Antikörper gewährleistet wird und dass ebenso die Protein-Protein-Interaktion erhalten bleibt.

In dieser Arbeit wurde eine p53-Variante, die ein mutiertes DO-1-Epitop trägt, mit einer p53-Variante, die diese Mutation nicht trägt, co-immunpräzipitiert. Dazu wurden die Zellen 24 h nach der Transfektion mit Hilfe des RIPA-Puffers (supplementiert mit Protease-Inhibitoren) aufgebrochen. Die Zellen wurden abgeschabt, kurz abzentrifugiert, in 800 µl RIPA-Puffer aufgenommen und 60 min auf Eis inkubiert. Nach der Lyse wurde 30 min bei 13000 rpm abzentrifugiert.

In der Zwischenzeit wurde die Sepharose gewaschen und 1:1 in PBS aufgenommen. Nun wurden 100 µl 1:1-Sepharose-PBS-Gemisch mit 4 µg Antikörper versetzt und 45 min auf einem Drehrad bei 4°C inkubiert, damit eine Anlagerung der Antikörper an die Sepharose stattfinden konnte. Nach dieser Inkubation wurden ungebundene Antikörper in 3 bis 5 aufeinander folgenden Waschschritten mit PBS entfernt.

Nach der Zentrifugation der lysierten Zellen wurde der Überstand entnommen, mit 50 µl Antikörper-Sepharose-PBS-Gemisch (entspricht 4 µg Antikörper und 25 µl reiner Sepharose pro Reaktion) versetzt und für 5 h bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Nach dieser Inkubation und 4 folgenden Waschschritten mit kaltem PBS wurde der Überstand komplett entnommen und nach Zugabe von 30 µl 100°C heißem 1x SDS-Gel-Ladepuffer bei 100°C für 10 min inkubiert. Der Überstand wurde danach zur SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese eingesetzt.

4.5.4.2 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) ist eine experimentelle *in vivo*-Methode zur Bestimmung von Protein-DNA-Interaktionen. Es stellt quasi eine Momentaufnahme der Protein-Chromatin-Interaktionen dar. Mit dieser Methode können unterschiedliche Bindungspartner detektiert werden; z.B. Transkriptionsfaktoren an Promotoren, Enhancer oder Repressoren und Silencer. Auch bei epigenetischen Genregulations

Fragestellungen ist es ein wichtiges Instrument, hier kann die Verteilung der verschiedenen Histonmodifikationen untersucht werden (H.Kimura 2013).

Durch einen Fixierungsschritt mit Formaldehyd werden aktuell bestehende Wechselwirkungen zwischen DNA und Protein fixiert. In einem anschließenden Schritt wird die Zelle zerstört und das Protein-DNA-Konstrukt kann aus der Zelle isoliert werden. Damit die DNA weiter untersucht werden kann, muss sie mit Hilfe von Ultraschall in 500-1000 Basenpaar-Stücke zerkleinert werden. Nun kann man mit spezifischen Antikörpern die zu untersuchenden Proteine mit ihrer dazugehörigen anhaftenden DNA „herausgefischt“ (immunpräzipitiert) werden. Nicht gebundene Antikörper werden durch Waschen entfernt. Die nun aufgereinigten DNA-Protein-Komplexe konnten jetzt aufgelöst und die freigesetzten DNA-Fragmente unter Verwendung spezifischer Primer durch PCR bestimmt werden.

4.5.4.2.1 Fixierung und Ernten der Zellen

Zellen wurden in 75 cm² Kulturflaschen kultiviert. Beim Zeitpunkt des Erntens sollte eine optimale Zellzahl von 1×10^7 erreicht sein. Überstehendes Medium wurde abgesaugt. Der Zellrasen wurde für 10 min auf einem Schüttler bei RT mit 37% Formaldehyd fixiert. Mit 1,25 M Glycin (entspricht einer Endkonzentration von 0,125 M) wurde die Reaktion abgestoppt (5 min bei RT auf einem Schüttler). Danach wurde 3-mal mit PBS gewaschen. Der noch anhaftende Zellrasen musste noch von der Flasche gelöst und vereinzelt werden. Dazu wurden die Flaschen für 15 Minuten bei 37°C inkubiert, anschließend mit einem Zellschaber abgekratzt und bei 1200g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das Vereinzeln der Zellen erreichte man durch resuspendieren des Pellets mit eiskaltem PBS, erneut wurde 1200g für 5 min bei 4°C abzentrifugiert (Waschschritt wurde insgesamt 3-mal durchgeführt). Beim letzten Waschschritt wurde dem PBS ein Proteaseinhibitor (PMSF; Endkonzentration: 10 µg/ml), der den Abbau der Proteine verhindert, hinzugefügt. Nach Pelletierung wurde der Überstand verworfen.

4.5.4.2.2 Lyse und Beschallung der Zellen

Der Zellaufbruch erreichte man durch einen Zell-Lysis-Puffer. Dazu wurde das Pellet in 1 ml Zell-Lysis-Puffer (enthält weiterhin Protease-Inhibitoren) resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellkerne in einem Zentrifugationsschritt (4000 rpm für 5 min und bei 4°C) pelletiert. Nachdem die Zellmembran nun aufgelöst wurde, musste nun noch mit Hilfe eines Kernlysis-Puffers die Zellkerne aufgelöst werden um die DNA freizulegen. Dazu wurde das Pellet in 1,5 ml Kernlysis-Puffers (enthält weiterhin Protease-Inhibitoren) aufgenommen, resuspendiert und in ein 15 ml Polystyren-Röhrchen überführt danach wurde dieser Ansatz für 15 min auf Eis inkubiert. Die freigelegte DNA musste nun noch in die gewünschten Längen zwischen 500 und 1000 bp gesichert werden („Bioruptor“ der Firma „diagenode“, Stufe M, 7,5 Zyklen, Intervall von 30 sek.).

Um Zellschrott zu entfernen wurde der Ansatz in ein frisches 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt und für 10 min mit 13000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in 2 Aliquots portioniert. Jetzt durfte der Überstand nicht verworfen werden. Ein Teil (1 ml) wurde schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -70°C gelagert. Um die Qualität der DNA zu überprüfen wurde das zweite Aliquot (400 µl) als Kontrolle weiter verarbeitet. Zuerst musste die RNA mit Hilfe von 8 µl RNaseA [10 mg/ml] und 24 µl 5 M NaCl entfernt werden (über Nacht bei 65°C inkubieren). Durch Zugabe von 8 µl 0,5 M EDTA, 16 µl 1 M Tris pH 6,5 und 1 µl 20 mg/ml konzentrierter Proteinase K wurde die DNA aufgereinigt. Bei diesem Schritt wurden die an die DNA-gebundenen Proteine entfernt. Der Ansatz wurde für 1 h bei 45°C inkubiert. Die nun „freie“ DNA musste nun aus dem Ansatz extrahiert werden. Dies erfolgte mit der „klassischen“ Phenol-Chloroform-Extraktions-Methode.

Zell-Lysis-Puffer:	PIPES pH 8.0	5 mM
	KCl	85 mM
	NP-40	0,5 %
	Leupeptin	10 µg/ml
	PMSF	10 µg/ml
	Aprotinin	10 µg/ml

Kern-Lysis-Puffer:	Tris-HCl pH 8	10 mM
	NaCl	0,4 M
	EDTA	20 mM
	IGEPAL	0,5 %
	Desoxycholinsäure	0,5 %
	Leupeptin	10 µg/ml
	PMSF	10 µg/ml
	Aprotinin	10 µg/ml

4.5.4.2.3 „Klassische“ Phenol-Chloroform Methode zur Extraktion von DNA

Dem Ansatz wurden 400 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Sigma) zugegeben für 30 sek gevortext und anschließend zentrifugiert (10 min, 13000 rpm 4°C). Die obere wässrige Phase wurde in ein neues 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt, mit 1 Volumen 3 M Na-Acetat pH 5,2 aufgefüllt und 20-mal invertiert. Zur Fällung der DNA wurde 20 µg Glykogen (entspricht 5 µl einer 2 mg/ml Stock-Lösung) und das zweifache Volumen eiskaltes Ethanol (100 %ig) zugegeben. Der Ansatz wurde für 2 h bei -20°C inkubiert. Daraufhin folgte ein 20-minütiger Zentrifugationsschritt bei 13000rpm und Raumtemperatur. Das Pellet wurde nun mit 1 ml Ethanol (70%ig) gewaschen und abermals zentrifugiert (10 min bei RT). Danach wurde der Überstand verworfen und das Pellet getrocknet.

Das aufgereinigte Pellet musste nun wieder in Lösung gebracht werden. Hierzu wurden dem Pellet 50 µl dest. Wasser zugegeben. Dieser Quellvorgang dauerte ca. 30 min. Die Qualität der gescherten DNA wurde jetzt in diesem Ansatz überprüft. Hierzu wurde eine DNA-Konzentrationskinetik (1 µl, 2 µl, 5 µl und 10 µl DNA-Lösung) aufgetragen die dann mit Hilfe eines 1 %-igem Agarosegels aufgetrennt wurde. Interpretation des Gels im Bezug auf die Qualität der gescherten DNA.

4.5.4.2.4 Preclearing und Verdünnung der Proben

Nach Qualitätsprüfung konnten die schockgefrorenen Proben weiter bearbeitet werden. Hierzu wurden nun die Proben langsam auf Eis aufgetaut. Im darauffolgenden Schritt sollten störende Proteine ausgewaschen werden. Das erreichte man durch Zugabe von 80 µl gewaschenen 1:1-Protein G-Sepharose-PBS-Mix. Dieser Schritt ist wichtig, da sonst diese Proteine an die Beads (Sepharose binden würden. Diesen Ansatz sollte man für mindestens 4 h (auch über Nacht möglich) bei 4°C auf einem rotierenden Drehrad inkubieren. Danach wurden die Proben bei 3000 rpm und 4°C für 2 min abzentrifugiert. Anschließend wurde die Probe in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und mit 4 ml ChIP-Dilution-Puffer (enthält Protease-Inhibitoren) versetzt und vorsichtig resuspendiert. Von diesem Ansatz wurden 100 µl des Überstandes als Input-Kontrolle entnommen.

ChIP-Dilution-Puffer:	Aprotinin	10 µg/ml
	SDS	0,01 %
	EDTA	1,2 mM
	Leupeptin	10 µg/ml
	NaCl	167 mM
	PMSF	10 µg/ml
	Tris-HCl pH 8,1	16,7 mM
	Triton X-100	1,1 %

4.5.4.2.5 Immunpräzipitation und Bindung der Protein-Antikörper-Komplexe

Von jeder Probewurde nun je 1 ml zur Weiterverarbeitung entnommen und mit jeweils mit 2,5 µg Antikörper versetzt und über Nacht auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert. Alle weiteren Schritte werden auch mit der Input-Kontrolle durchgeführt, ihr wird aber kein Antikörper zugesetzt. Danach wurde die DNA gewaschen und durch Zugabe von konzentriertem Heringssperma abgesättigt werden; das sollte verhindern, dass unspezifische DNA an die Sepharose bindet. Dazu wurde in einem Verhältnis von 1:1 ein gewaschener Protein G-Sepharose-PBS-Mix 40 min mit 10

mg/ml konzentriertem BSA und 10 mg/ml konzentrierter Heringssperma-DNA inkubiert (pro 250 µl 1:1-Sepharose-Mix je 20 µl BSA + 10 mg/ml Heringssperma-DNA). Auf jeden Ansatz wurden nun ca. 100 µl der gewaschenen Protein G-Sepharose zugegeben und für 4 h (ist auch über Nacht möglich) bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Dieser relativ lange Inkubationsschritt ist notwendig damit die jeweiligen Antikörper an ihre korrespondierenden Sepharose-gekoppelten Antigene (DNA) binden. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (2 min, 3000 rpm, 4°C), wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Bei dem nächsten Schritt muss man sehr vorsichtig sein, da das Pellet sehr wässrig ist. In dieser Lösung bilden Proteine, DNA und Antikörper mit den Beads einen Komplex der in den folgenden Schritten mehrmals gewaschen wurde.

4.5.4.2.6 Waschen der Beads

Das Waschen der Beads ist sehr zeitaufwendig aber sehr wichtig. Hier sollen unspezifische Proteine und DNA von den Beads entfernt werden. Alle unten aufgeführten Wasch-Puffer mussten bei 4°C vorgekühlt werden. Die Proben (außer Input-Kontrolle) wurden mit je 1 ml der unterschiedlichen Waschpuffer mehrmals gewaschen (siehe Waschschemata unten) und abzentrifugiert (3000 rpm, 4°C, 1 min); danach erneute Pufferzugabe, Inkubation auf dem Drehrad (5 min bei 4°C), danach ein erneuter Zentrifugationsschritt und Abnahme des „alten“ Puffers.

Schema zum Waschen der Beads:

- 5x mit ChIP Dilution-Puffer (nur dieser enthält Protease-Inhibitoren)
- 3x mit „Low-Salt“ Wasch-Puffer
- 3x mit „High-Salt“ Wasch-Puffer
- 3x mit Lithiumchlorid-Immun-Komplex-Wasch-Puffer
- 5x mit TE-Puffer

Wasch-Puffer „Low-Salt“:	EDTA	2 mM
	NaCl	150 mM
	Tris-HCl pH 8,1	20 mM

Wasch-Puffer „High-Salt“:	Triton X-100	1 %
	SDS	0,1 %
	EDTA	2 mM
	NaCl	500 mM
	Tris-HCl pH 8,1	20 mM
	Triton X-100	1 %
	SDS	0,1 %

Lithiumchlorid-Immun-

Komplex-Wasch-Puffer:	LiCl	0,25 M
	IGEPAL	1 %
	Desoxycholinsäure	1%
	EDTA	1 mM
	Tris-HCl pH 8,1	10 mM

TE-Puffer:	Tris-HCl pH 8,1	10 mM
	EDTA pH 8	1 mM

4.5.4.2.7 Elution und reverses Cross-linking

Nach dem letzten Waschschrift wurden der Puffer sorgfältig entfernt und 250 µl Elutionspuffer zu den übriggebliebenen Protein-DNA-AK-Beads gegeben. Die Proben wurden nun für 30 min auf einen Rüttler gestellt und anschließend für 15 min bei Raumtemperatur auf dem Drehrad inkubiert. Danach erfolgte abermals ein Zentrifugationsschritt (2 min; 3000 rpm; RT). Der dabei entstehende Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Dieser Vorgang wurde wiederholt. Der neu entstandene Überstand wurde zu dem letzten bereits zuvor abgenommen Überstand dazugegeben.

Zu den 100 µl Input-Kontrolle wurden 400 µl Elutionspuffer zugegeben, damit

entsprechend zu den Proben ein Gesamtvolumen von 500 µl erreicht wurde. Um die Protein-DNA-Fixierung lösen wurden beim nächsten Schritt 30 µl 5 M NaCl und 10 µl RNaseA (10 mg/ml) zugegeben und über Nacht bei 65°C inkubiert.

Elutionspuffer:	SDS	1%
	NaHCO ₃	100 mM
	ddH ₂ O	

4.5.4.2.8 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die 1983 von Kary Mullis publizierte Polymerase-Kettenreaktion (engl. **P**olymerase **C**hain **R**eaktion, **PCR**), wird dazu benutzt um DNA-Abschnitte definierter Länge und Sequenz *in vitro* zu vervielfältigen.

Ausgangsmaterial ist hier ein DNA-Einzelstrang, der als Template (Vorlage, Matritze) benutzt wird um einen neuen komplementären DNA-Strang zu synthetisieren. Dazu wird ein thermostabiles Enzym, die Taq-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus* (Temperaturoptimum bei 72°C; aber auch für kurze Zeit stabil bei 95°C). Zuerst wird die doppelsträngige DNA bei 94°C denaturiert (Enzyme erhalten ihre Polymerase-Aktivität und denaturieren nicht), man erhält nun Einzelstrang-DNA. Durch einen darauffolgenden Abkühlungsschritt auf die entsprechende Annealing-Temperatur (diese Temperatur ist Primer-abhängig) können sich nun spezifische Primer an den DNA-Einzelstrang anlagern. Die Primer begrenzen den zu amplifizierenden Sequenzabschnitt indem sie Start- und Endpunkte flankieren. Durch Zugabe von Oligonukleotide bilden sich kurze doppelsträngige DNA-Abschnitte mit einem freien 3'-Hydroxy-Ende. Dies dient als Ansatzstelle für die Polymerase und verlängert dadurch mit Hilfe der beigefügten Desoxynukleotiden (dNTP`s) den komplementären DNA-Strang (Extension).

Die dadurch entstehenden neuen DNA-Stränge besitzen am Anfang unterschiedliche Längen. Mit Hilfe der Primer wird jedoch der zu amplifizierenden Sequenzbereich festgelegt. Die Mehrzahl der Endprodukte besitzt dann die gleiche Länge

Die sich wiederholenden Erwärmungs- und Abkühl-Zyklen führen dazu, dass immer mehr DNA-Doppelstränge entstehen. Die Zielsequenz wird somit exponentiell

amplifiziert.

Um eine höhere Spezifität (weniger unspezifische PCR-Produkte und weniger Hintergrund) zu erreichen, wurde in dieser Arbeit eine Polymerase (HotStarTaq-Polymerase von Qiagen) eingesetzt, an die ein Enzym gekoppelt ist das die Polymerase zunächst in einem inaktiven Zustand hält. Durch einen 15-minütigen Inkubationsschritt bei 95°C wird die Polymerase aktiviert.

Die eingesetzten Primer wurden lyophilisiert geliefert (Qiagen). Durch Zugabe einer definierten Menge an sterilem Wasser konnten die Primer quellen. Alle eingesetzten Primer wurden in einer Endkonzentration von 1 µM in die PCR eingesetzt.

Der PCR-Ansatz wurde nach folgendem Schema in 500 µl-PCR-Gefäße pipettiert:

Tabelle 3: 50 µl Standard-PCR-Ansatzes für RNA-Analysen

Komponente	Menge / Volumen	Endkonzentration
10x Reaktionspuffer	5 µl	1x
dNTP`s	je 1µl	0,2 mM
Primer-forward-	1 µl	0,5 µM
Primer-reverse-	1 µl	0,5 µM
cDNA	1 µl	-
Taq Polymerase	0,5 µl	0,05 U
ddH₂O	ad 50 µl	

Als Template diente die RNA, die nach der RNA-Isolierung in cDNA umgeschrieben wurde.

Der ChIP-Assay ist eine Methode, um DNA-bindende Proteine *in vivo*, an ihre genomische DNA gebunden, nachzuweisen. Er stellt somit eine Momentaufnahme des Zustands dar, in der sich die „aktive“ Zelle zum Zeitpunkt der Fixierung mit Formaldehyd befunden hat. Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten ChIP-Assays wurden U373 und U87 Zellen unter definierten Wachstumsbedingungen angezogen, entweder scheinbestrahlt oder mit 60 Gy bestrahlt und anschließend für

weitere 20 h kultiviert. Durch Zugabe von Formaldehyd wurden die Zellen derart fixiert, dass DNA-gebundene Proteine mit ihrer DNA kovalent verknüpft vorlagen. Nach Aufbrechen der Zellen, Waschen und anschließender Ultraschall-Zerkleinerung des präparierten Chromatins erhielt man entsprechend Protein mit daran gebundenen DNA-Fragmenten einer durchschnittlichen Größe von 100 bis 1000 bp. Die Komplexe wurden dann mittels spezifischer Antikörper (HRS-3, p73/E-15, p73/IMG-246, p53/Do-1) immunopräzipitiert. Durch Waschen und Lösen der Protein-Antikörper Komplexe von der kopräzipitierten DNA erhielt man schließlich DNA-Fragmente, deren Identität in der Folge mit Hilfe spezifischer Primer durch PCR bestimmt werden konnte.

Für die hier vorgenommenen Analysen wurden zwei spezifische Primerpaare für p53-bindende Promoterregionen aus den *p21*- und *MDM2*-Genen sowie ein spezifisches Paar für eine Region aus dem *Jagged1* Gen (Abb. 6) verwendet, welche eine putative TAp73-Bindestelle enthält (Abb. 6). Primer für den *U6*-Genpromoter, der weder von p53 noch von TAp73 gebunden wird, dienten als Kontrolle.

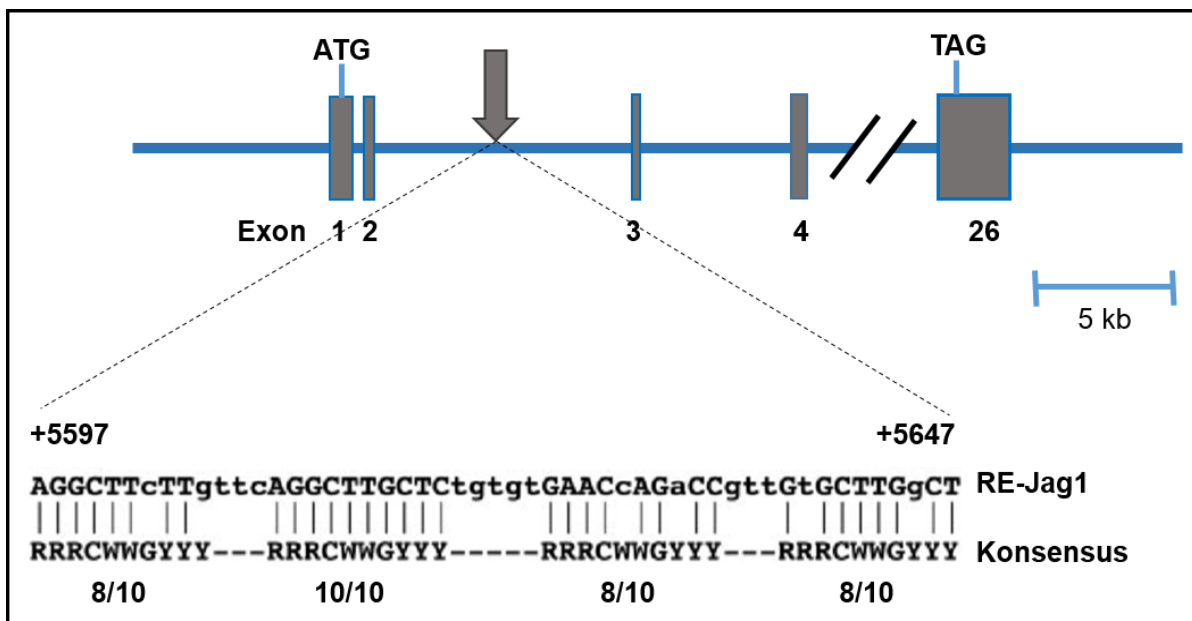


Abb. 6: Regulation der Jagged1-Expression durch p73. Schematische Darstellung eines Ausschnitts des *Jagged1*-Gens (modifiziert nach Yasushi Sasaki et al.). Das potentielle **Responsive Element**, **Re-Jag1**, befindet sich im zweiten Intron

des *Jagged1*-Gens und besteht aus vier Kopien des 10-bp-Motivs der p53-Bindungssequenz. Abweichungen von der Konsensussequenz sind als tiefgestellte Buchstaben dargestellt. R, Purin; Y, Pyrimidin; und W, Adenin or Thymin.

Es zeigte sich, dass mit dem irrelevanten Antikörper HRS-3, der das nicht-DNA-bindende Protein CD30 präzipitiert, weder p53- noch TAp73-bindende Promotorsequenzen kopräzipitiert werden konnten. Dies indizierte, dass die Waschschriffe während der ChIP Prozedur effektiv und die zu untersuchenden DNA-Sequenzen nicht unspezifisch mitgefällt worden waren. In U87 Zellen konnte mit den beiden p73-Antikörpern keinerlei detektierbares ChIP-Signal erzeugt werden.

Tabelle 4: 20 µl Standard-PCR-Ansatz für ChIP-Analysen

Komponente	Menge / Volumen	Endkonzentration
10x Reaktionspuffer	2 µl	1x
dNTP`s	0,3 µl	0,15 mM
Primer-forward-	0,3 µl	0,38 µM/µl
Primer-reverse-	0,3 µl	0,38 µM/µl
DNA	2 µl	-
Taq Polymerase	0,1 µl	0,025 U
H₂O_{bidest}	ad 20 µl	

4.5.4.2.9 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Um DNA-Fragmente aus PCR-Reaktionen oder Restriktionsverdauen aufzureinigen wurden „NucleoSpin®“-Säulen der Firma Macherey-Nagel gemäß den Angaben des Herstellers eingesetzt. Durch den Einsatz dieser Säulen wurden die DNA-Fragmente

von Primern, Desoxynukleosidtriphosphaten, Taq-Polymerase, Restriktionsenzymen und Salzen befreit.

Die Prozedur wurde unter einer langwelligen UV-Licht-Lampe (366 nm) durchgeführt. Die zu bestimmenden DNA-Fragmente wurden möglichst präzise aus dem Gel herausgeschnitten, damit möglichst wenig Gelmaterial mitextrahiert wurde. Die Säulen haben die Eigenschaft Nukleinsäuren (ab einer Größe von ca. 100 bp) in Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze und bei einem pH-Wert < 7,5 (max. Bindungskapazität pro Säule: 10 µg) zu absorbieren. Andere Bestandteile wie Oligonukleotide, Enzyme und Salze wurden abzentrifugiert und rausgewaschen. Die gereinigte DNA war nun für weitere Versuche aufgearbeitet und konnte für unterschiedliche Fragestellungen Verwendung finden.

4.5.5 Durchflusszytometrie (FACS – fluorescence activated cell sorting)

Durchflusszytometrie (FACS; „fluorescence activated cell sorting“) ist eine Analysemethode, bei der Zellen auf unterschiedlichste Eigenschaften untersucht werden können. Es hat eine hohe Bedeutung sowohl in der medizinischen Diagnostik als auch in der zytologischen Grundlagenforschung. Übersetzt kann man die Durchflusszytometrie als eine Art Zell-Vermessung beschreiben. Hierbei werden Zellen in einem relativ hohen Tempo einzeln an einer elektrischen Spannung oder einem Lichtstrahl vorbeigeführt.

Jede Zelle wird einzeln durch den Messbereich eines Laserstrahls geführt. Dabei entsteht ein Streulicht/Fluoreszenzsignal welches dann von einem Detektor aufgefangen und ausgewertet wurde. Je nach, Struktur, Form oder Färbung werden unterschiedliche Signale erzeugt, aus denen dann bestimmte Eigenschaften der Zelle abgeleitet werden können. Das Ergebnis sind quantitative Informationen über jede einzelne Zelle, die durch den Lichtstrahl erfasst wurde. Durch den Einsatz dieser Methode konnte eine große Anzahl an Zellen innerhalb eines kurzen Zeitintervalls erfasst werden. Dadurch erhält man schnell repräsentative Informationen über Zell- Populationen.

Die zu untersuchenden Zellen können auch mit einem spezifischen Fluoreszenzgekoppelten Antikörper markiert werden. Die Einzelzellsuspensionen emittieren beim Wandern durch einen Laserstrahl Licht, dessen Intensität proportional zur

Menge ihrer gebundenen spezifischen fluoreszierenden Antikörper ist. Das so in Einparameterdarstellung entstehende Histogramm zeigt die Häufigkeitsverteilung der Messsignale eines bestimmten Parameters. Die y-Achse zeigt die Intensität der Einzelmessungen und die x-Achse gibt die Anzahl der Zellen wieder.

Wir untersuchten die Zelllinien, Tx3868, Tx3095, U373, U87, HaCaT und SCL-1, auf den Notch-4-Rezeptor und den Liganden Jagged2. Beide Primärantikörper wurden entsprechend den Hersteller-Angaben eingesetzt.

4.6 RNA-Techniken

4.6.1 RNA-Isolierung

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen wurden zwei unterschiedliche Techniken eingesetzt: die etwas aufwendigere klassische Phenol-Chloroform-Methode (Chomczynski und Sacchi) und die RNA-Aufreinigung über Säulen von Qiagen.

4.6.1.1 RNA-Isolierung mit der Phenol-Chloroform-Methode

Die Isolierung von RNA wurde, wie vorbeschrieben (Hess, 2006) nach der Guanidinthiocyanat-Phenol-Chloroform Methode (Chomczynski and Sacchi 1987) durchgeführt. Die je nach Fragestellung vorbehandelten Zellen (1×10^6) wurden in 10 cm Kulturschalen kultiviert und zu einem Zeitpunkt x gestoppt. Diesen Schritt erreichte man durch Waschen der Zellen mit kaltem PBS und sofortiger Zugabe von Guanidinthiocyanat-Puffer (GTC-Puffer; enthält 1% β -Mercaptoethanol). GTC bewirkt zusammen mit β -Mercaptoethanol und N-Guanosyl-Sarcosin die Lyse der Zellen und Denaturierung der Proteine. Um eine mögliche Degradation der RNA zu verlangsamen wurden alle nachfolgenden Schritte auf Eis durchgeführt. Der Zellrasen wurde mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch wiederholtes Aufziehen durch eine Nadel (22G) wurde der Ansatz homogenisiert. Danach wurden folgende Lösungen zugegeben: Natriumacetatpuffer (2 M, pH 4.0, im Verhältnis 1:10), Phenol (im Verhältnis 1:1) und Chloroform/Isoamylalkohol (49:1). Durch Zusatz von Phenol wurde eine Ansäuerung erreicht, die der Isolation der RNA diente (Phenolisation). Danach wurde der Ansatz für einen Zeitraum von 30 Sekunden gevortext. Bei einem anschließendem

Zentrifugationsschritt wurden die Phasen getrennt (30 min, 13000, 4°C). Danach konnten drei Phasen unterschieden werden, die obere wässrige Phase enthält RNA, in der Interphase und Phenol-Phase befinden sich DNA und Proteine. Die obere Phase wurde sehr vorsichtig abgenommen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt mit gleichem Volumen Isopropanol versetzt und über Nacht bei -20°C gefällt. Danach erfolgte eine Zentrifugationsschritt über 30 min bei 4°C und 13000 rpm. Der Überstand wurde verworfen. Mit 75% Ethanol wurde das Pellet gewaschen und unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Danach musste das Pellet, das die RNA enthält, für ca. 10 Minuten bei RT getrocknet werden. Je nach Größe des Pellets wurden 50-100 µl Wasser (RNase-frei) hinzugegeben. Zum quellen/lösen der RNA wurde das Reaktionsgefäß für 30 Minuten auf Eis gestellt (Hess 2006).

GTC-Puffer:	Guanidinthiocyanat	4 M
	Natriumcitrat, pH 7.0	25 mM
	Natriumlauroylsarcosin	0,5%

4.6.1.2 DNase-Verdau der RNA

Der DNase-Verdau wurde durchgeführt um die Qualität der isolierten RNA zu erhöhen (Hess 2006). Der RNA-Lösung wurden 3 µl (30 Units) RNase-freier DNase zugegeben und bei 37°C für 45 min inkubiert. Danach wurde der Ansatz für 15 min bei 70°C inkubiert wobei die DNase wieder inaktiviert wurde.

Zur Überprüfung der Qualität und semiQuantität wurde eine PCR mit einem housekeeping-Gen (GAPDH-PCR) durchgeführt. Bei Verunreinigung mit genomischer DNA hätte das „housekeeping“ Gen amplifiziert werden können.

10x DNase Puffer:	Natriumacetat	0,1 M
	MgSO ₄	5 mM

4.6.1.3 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Messung der RNA-Konzentration wurde mit einem Spectralphotometer durchgeführt. Hierzu wurde 1 µl RNA Probe in 99 µl H₂O gelöst und dessen Extinktion im Photometer gemessen. Die Messung erfolgt bei monochromatischem Licht mit einer Wellenlänge von 260 nm (dies entspricht dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren). Damit die Reinheit bestimmt werden kann benötigt man einen zweiten Wert der OD von Proteinen die ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm haben. Der Quotient 260/280 nm gibt Aufschluss über die Reinheit der Gesamt-RNA in den Proben. Der Wert sollte bei 2 liegen (OD₂₆₀/OD₂₈₀ Ratio Toleranzgrenzen 1.7 und 2.0). Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht einer RNA Konzentration von 40 µg/ml.

4.6.2 Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

4.6.2.1 cDNA-Synthese: Reverse Transkription

Zum Nachweis von mRNA-Abschnitten wurde die mRNA (Boten-Ribonukleinsäure) auf Grund der besseren Handhabung mittels einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase wie vorbeschrieben (Hess 2006) in eine DNA transkribiert. Die cDNA kann für Genexpressionsanalysen eingesetzt werden. Ziel war es, aus mRNA einzelsträngige cDNA (copy-DNA) zu generieren. Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) wird die mRNA, die als Vorlage dient, in cDNA umgeschrieben. Zusätzlich benötigt man noch Oligo-(dT)-Primer, welche komplementär zu dem 3'PolyA-Ende der mRNA sind und als Startsequenz dienen.

Pro Ansatz wurden 2-4 µg DNase- verdaute RNA mit UP-H₂O zu einem Gesamtvolumen von 16,3 µl aufgefüllt. Diesem Ansatz wurde 1 µl Random Primer (0,5 µg/µl) zugegeben (Gesamtvolumen 17,3 µl) und für 10 min bei 70°C inkubiert (Anlagerung der Primer), anschließend auf Eis. Die Eingesetzten Random Primer (Gemisch aus Hexanukleotiden) binden zufällig an die RNA so dass ein Pool unterschiedlich langer cDNAs erzeugt wurde.

Desweiteren benötigt man das Enzym Reverse Transkriptase (Superscript III von Invitrogen, ein Nukleotidgemisch (dNTPs) und einen Ribonuklease Inhibitor. Die Komponenten wurden als Gesamtansatz für 60 min bei 37°C inkubiert, danach

erfolgte ein Inaktivierung der RT bei 95°C. Dieser RT-Reaktionsansatz (7,7 µl) wurde dann zu dem RNA-Random-Primergemisch (17,3 µl) gegeben (ergab ein Endvolumen von 25 µl). Dieser Ansatz wurde für 60 Minuten bei 37°C inkubiert, anschließend daran kam ein 15-minütiger Inaktivierungsschritt der RT bei 70°C. Die Generierung der cDNA ist nach diesem Schritt abgeschlossen und kann bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C gelagert werden.

Um sicher zu gehen, dass die RNA nicht mit genomischer DNA verunreinigt ist, wurde je Probe ein 1 µl RNA in 25 ml UP-H₂O gelöst und bei -20°C gelagert. Mit diesem Ansatz wurde keine RT-Reaktion durchgeführt.

Tabelle 5: PCR-Standardprogramm für die Amplifikation von cDNA

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95°C	15 min.
Denaturierung	94°C	1 min.
Annealing	63°C	1 min.
Extension	72°C	3 min.
Letzte Extension	72°C	10 min.

} 30 Zyklen

4.6.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Ein wichtigstes Instrument zur Untersuchung der Genexpression ist die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction; PCR) die wie vorbeschrieben (Hess 2006) durchgeführt wurde. Diese molekulargenetische Methode ermöglicht es, bestimmte DNA-Abschnitte zu amplifizieren. Die DNA-Neusynthese wird komplementär von einem DNA-Strang generiert der durch zwei spezifische Primer (Oligonukleotide) flankiert ist. Mit Hilfe des Enzyms DNA-Polymerase erhält man eine exponentielle Anreicherung des „flankierten“ Produkts. Die amplifizierten DNA-Abschnitte können anschließend mittels einer Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden.

Alle nachfolgenden Schritte sollten auf Eis durchgeführt werden. In einem PCR-Reaktionsgefäß wurden zunächst 35,7 µl U.P. H₂O vorgelegt, zu diesem Ansatz wurde 1 µl cDNA hinzugegeben. Je nach Anzahl der Proben wurde ein Master-Mix angesetzt der dann in die einzelnen Reaktionsgefäße aufgeteilt wurde.

Mastermix-Ansatz: Nukleotidgemisch (Desoxyribonukleotidtriphosphate; dATP, dTTP, dCTP, dGTP)

Spezifische Primer

Taq Polymerase (thermostabile DNA-Polymerase)

Magnesiumchlorid

Puffer

Diese Komponenten wurden entsprechend der Anzahl an Reaktionen angesetzt, in PCR-Reaktionsgefäße aufgeteilt und cDNA zugegeben. Abschließend wurde der Ansatz mit gleichem Gesamtvolumen Mineralöl überschichtet um eine Verdampfen zu verhindern.

Die PCR wird mit einem Thermocycler durchgeführt der folgende Zyklen durchläuft:

- ein initialer Denaturierungsschritt bei 94°C
- dem folgt ein Schritt bei dem die Primer an die DNA anlagern (Annealingtemperatur ist abhängig vom Primer)
- danach ein Extensions-Schritt bei 72°C

Dauer und Anzahl der Zyklen variierten je nach Zielsequenz-Größe. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz der Anstelle cDNA, H₂O enthielt (H₂O-Kontrolle). Als weitere Kontrolle wurde ein sogenanntes „*Housekeeping-Gen*“ eingesetzt. Hierzu wird ein Primer-Paar benutzt das eine Gensequenz generiert welches in der Zelle konstitutiv exprimiert wird und „keiner“ Regulation unterliegt. Mit Hilfe dieses *Gens* kann man dann Rückschlüsse auf das Ergebnis des zu untersuchenden *Gens* gezogen werden. Auch mit der nicht Transkribierten gelagerten RNA wurde das angewendet, um eine Verunreinigung mit genomischer DNA auszuschließen. Bei einer Kontamination würde man hier ein Produkt erhalten. Diese „*Housekeeping-Gen*“ wurden käuflich erworben. Die eingesetzten Primer wurden mit Hilfe des Internetdienstes NCBI Blast Search auf ihr Spezifität hin überprüft. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.

Master Mix für einen PCR-Ansatz (49 μ l):

10xPCR-Puffer	5 μ l
MgCl (25 mM)	3 μ l
dNTPs	1 μ l
Forward Primer (5 μ M)	2 μ l
Reverse Primer (5 μ M)	2 μ l
Taq Polymerase (5 U/ μ l)	0,3 μ l
U.P. H ₂ O	35,7 μ l

Die PCR wurde mit folgender Einstellung in einem Thermocycler durchgeführt:

1. 94°C 60 s
2. 94°C 45 s
3. spez. T_A 45 s
4. 72°C 45 s
5. 72°C 10 min
6. 4°C ∞

Die Schritte 2 bis 4 variieren in der Zyklenzahl zwischen 30 – 40 Zyklen.

4.6.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die amplifizierten PCR-Produkte wurden anschließend über eine gelelektrophoretische Auftrennung wie vorbeschrieben (Hess 2006) hinsichtlich ihrer Größe charakterisiert. Je nach Größe des zu erwartenden Produktes (DNA-Amplifikat) wurde ein 1-2%iges Agarose-Gel gegossen. In das Gel wurde ein DNA-interkalierender Farbstoff (Ethidiumbromid) gegeben, dadurch wurde es ermöglicht die aufgetrennte DNA unter UV-Bestrahlung zu dokumentieren. Um die Größe der PCR-Produkte abzuschätzen wurde ein DNA-Molekulargewichtsmarker (s.o.) im gleichen Agarosegel aufgetrennt.

Zur Herstellung eines 2%igen Agarosegels wurden in einem Weithals-Erlenmeyerkolben 6 g Agarose in 300 ml 1x TBE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht. Bevor das Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) zugegeben wurde musste das Gel auf ca. 60 °C abgekühlt sein. Das Gel wurde in eine entsprechende Gelkammer überführt mit einem Taschenkamm versehen und bis zur vollständigen Polymerisation zur Seite gestellt. Danach wurde das Gel in eine mit 1x TBE-Puffer befüllte Gelkammer überführt. Die PCR-Proben wurden mit 2 µl DNA-Loading-Dye versetzt, homogenisiert und 25 µl davon in die Taschen des Gels pipettiert. Auch hier wurde zur Größenabschätzung ein entsprechender Marker (100 bp Marker) aufgetragen. Das Gel wurde an eine Spannungsquelle angeschlossen und bei 400 mA nach dem Prinzip der Elektrophorese aufgetrennt. Zur Dokumentation diente uns ein UV-Licht-Dokumentationsgerät.

TBE-Puffer:	Borsäure	0,9 M
	Tris	0,9 M
	EDTA, pH 8.0	0,02 M
DNA-Loading-Dye:	Bromphenolblau	40 mg
	Glycerin (98%)	5 ml
	U.P. H ₂ O	5 ml
	EDTA (0,5 M)	20 µl

4.6.2.4 Herstellung von Formaldehyd-Agarosegelen; Gelelektrophorese von RNA

Mit Hilfe eines 1 %-igen denaturierendem Agarosegels wurde zelluläre Gesamt-RNA wie vorbeschrieben (Hess 2006) aufgereinigt. Um ein derartiges Gel herzustellen benötigte man für einen 50 ml Ansatz, 0,5 g Agarose in 37,5 ml sterilem H₂Odest. und 10 ml sterilem 5x MSE-Puffer. Das Ganze wurde zum Lösen in der Mikrowelle aufgekocht bis eine klare Flüssigkeit entstanden ist. Damit 37 % Formaldehyd tropfenweise dazugegeben werden konnte musste der Ansatz auf 50 °C abgekühlt werden. Danach wurde in eine dafür geeignete horizontale Elektrophoreskammer gegossen und bis zur Polymerisation zur Seite gestellt. Die Kammer wurde nun mit

einem sterilen 1x MSE-Puffer gefüllt. Den RNA Proben (10-15 µg RNA-Lösung) wurden 25 µ RNA-Ladepuffer zugeführt und für 15 min bei 65°C inkubiert (Denaturierung der Proteine). Die Proben wurden nun mit 1 µl Ethidiumbromid (Endkonzentration: 1 µg/µl) angefärbt, und in die Geltaschen aufgetragen. Nun konnte die RNA durch Anlegen einer konstanten Spannung von 100 V aufgetrennt werden. Auch hier konnte das Gel unter UV-Licht (254 nm) dokumentiert werden. Bei dieser Auftrennung sollten zwei Banden pro Spur zu sehen sein: die bei 1,6 kb laufende 18S rRNA und die bei 4,4 kb laufende 28S rRNA.

5x MSE-Puffer:	MOPS (pH 7,0)	0,2 M
	Na-Acetat	50 mM
	EDTA (pH 8,0)	5 mM

Ladepuffer für RNA-

Agarosegelelektrophorese:	Formamid (deionisiert)	0,75 ml
	5x MSE-Puffer	0,15 ml
	Formaldehyd (37%)	0,24 ml
	50% Glycerin (v/v)	0,2 ml
	Bromphenolblau	0,025% (w/v)

4.7 Anhang

4.7.1 Reagenzien

0,45 µM-Filter	Renner
100 Basenpaar Marker	Amersham Pharmacia Biotech
100 Basenpaar Marker	Invitek
100 Basenpaar Marker	PEQLAB GmbH
30% Acrylamid/Bis (29:1)	Biorad Laboratories
35S MP	Biomedicals
5-Fluorouracil (5-FU)	Sigma
Aceton	Merck, Darmstadt
Acrylamid	Roth

Adriamycin	Sigma
Agarose	Biozym
Amersham Hyperfilm ECLTM	GE Healthcare
Ammoniumpersulfat	Merck
Ampicillin (BinotalTM)	Ratiopharm
Annexin V	BD Biosciences
Aprotinin	Sigma
Biotinylierter Molekulargewichtsmarker	Cell Signaling Technology / New England Biolabs
Bisacrylamid	Roth
Bis-maleimidohexan (BMH)	Pierce
Blotting Detection System (ECLTM)	Pierce
Borsäure	Merck
Bovines Serum Albumin (BSA)	PAA Laboratories
Bovines Serumalbumin (BSA)	New England Biolabs
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid	Merck
Chloroform	Merck
Cycloheximid	Sigma
DAPI	Sigma
Desoxycholinsäure (DOC)	Sigma
Diethyl Pyrocarbonate (DEPC)	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka Chemie
Di-Natrium-Hydrogen-Phosphat	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Merck
dNTP Mix	Invitrogen
Doxorubicin (Adriamycin)	Sigma
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco Life Technologies
EDTA (Titrplex III)	Merck
Essigsäure (Eisessig)	Merck
Ethanol	J.T. Baker
Ethidiumbromid	Merck
Etoposid	Sigma
Fetales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech
Ficoll 400	Sigma
Formaldehyd 37 %	Merck

Formamid	Applichem
G418	PAA Laboratories GmbH
Glutaraldehyd	Sigma
Glycerin (98%)	Merck
Glycin	Carl Roth GmbH
Guanidinthiocyanat	Carl Roth GmbH
Guanidin Hydrochlorid	Merck
Harnstoff	Merck
Hefeextrakt	BD
Heringssperma-DNA	Roche
Humanserum	PAA Laboratories
Immobilon-Membran	Millipore
Isoamylalkohol	Merck
Isopropanol	Merck
JC-1	Molecular Probes
Kaliumacetat	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Kaltwasserfisch-Gelatine	Sigma
Kristallviolett	Sigma
Kupfer (II)-Sulfat	Merck
Leupeptin	Sigma
L-Glutamin	Gibco Life Technologies
Lithiumchlorid	Sigma
Lowikryl K4M	Polysciences
Low Melting Point Agarose (UltraPure)	Invitrogen
Magermilchpulver	Töpfer
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	Merck
Manganchlorid	Merck
MEM Vitamine 100x	Gibco Life Technologies
Methanol	Merck
Methylcellulose	Sigma
Microcon® Centrifugal Filter Devices YM-10	Millipore
Mineralöl	Sigma-Aldrich
MitoTracker® Green	FM Molecular Probes
M-MLV-RT	Promega

MOPS	Sigma
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Sigma
Nanofectin I	PAA
Natrium Orthovanadat	Sigma-Aldrich
Natrium Pyruvat	PAA Laboratories
Natriumacetat	Merck
Natriumacid	Sigma
Natriumchlorid	Roth
Natriumcitrat	Merck
Natrium-dihydrogen-Phosphat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Natriumlauroylsarcosin	Sigma
Natriumlaurylsulfat	Roth
Natriumphosphat	Merck
Natriumsalicylat	Merck
nicht-essentielle MEM Aminosäuren (100x)	Gibco Life Technologies
Nitrocellulose-Membran	Schleicher & Schuell
N-Lauroyl-sarcosin (Sarcosyl-L)	Sigma
NP-40 (Igepal)	Sigma
Nukleotide (dNTPs)	Roche
Nutrient Mixture F-10 (HAM)	Gibco Life Technologies
Nylon-Membran	Scheicher & Schuell
Paraformaldehyd (PFA)	Merck
PBS Dulbecco's Cell	PAA
Penicillin-Streptomycin	PAA
Phenol (wasser-gesättigt)	Roth
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	Sigma
PMSF	Sigma
Polybrene	Sigma
Polyvinylalkohol (Elvanol)	Roth
Polyvinylpyrrolidon	Sigma
Propidiumiodid	Sigma
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma
Protein G-Sepharose (4 Fast Flow™)	GE Healthcare

Puromycin	Calbiochem
Random Primer	Qiagen
Ribonuklease Inhibitor (RNasin)	Promega
Roti Block	Carl Roth GmbH
RPMI Medium 1640	Gibco Life Technologies
Rubidiumchlorid	Sigma
Saturated Phenol II	Amresco
Schwefelsäure 37%, rauchend	Merc
β-Mercaptoethanol	Merck
Streptomycinsulfat 761 U/mg	Sigma
Taq Polymerase	Promega
Tetramethylethylendiamid (TEMED)	Sigma-Aldrich
Trichloressigsäure	Merck
Tri-Natrium-Citrat-2'-Hydrat	Merck
Tris Base	Sigma-Aldrich
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Applichem
Triton X-100	Sigma
Trizol LS Reagenz	Invitrogen
Trypsin/EDTA Lösung	PAA Laboratories
Trypton	BD
Tween-20	Serva
Ultra Pure H ₂ O (U.P. H ₂ O)	Biochrom AG
Uranyl-Acetat	IMS
Western Blotting Detektionsreagenz (ECL)	Amersham Pharmacia Biotech
Zellulosefilter Whatman™#1	Schleicher & Schuell
α-Amanitin	Sigma
β-Mercaptoethanol	Sigma
ε-Aminocaprinsäure	Sigma

4.7.2 Enzyme

AmpliGold Taq	Applied Biosystems
DNase I, Rnase-frei	Roche
High Prime	Roche
HotStar-Taq-DNA-Polymerase	Qiagen
RNaseA (aus Rinderpankreas)	Roche
RNaseH	Roche

Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Fermentas
SuperScript™ III reverse Transkriptase	Invitrogen
Taq-DNA- Polymerase	Sigma
T4-DNA-Ligase	Fermentas
Viralex Trypsin/EDTA	PAA Laboratories GmbH
Trypsin/EDTA 100x	Gibco

4.7.3 Kommerzelle Kits

BCA Protein Assay Kit	Pierce
CellTiter-Glo Zellviabilitätsassay	Promega
Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research

4.7.4 Tabelle 6: Primerverzeichnis

Oligo-Name	for/ rev	Sequenz in 5'-----3' Richtung
Primer für RNA-Analysen		
<i>Notch1</i>	for	CAG GCA ATC CGA GGA CTA TG
	rev	CAG GCG TGT TGT TCT CAC AG
<i>Notch2</i>	for	CAC TGG GTC GAT GAT GAA GG
	rev	ATC TGG AAG ACA CCT TGG GC
<i>Notch3</i>	for	TCT TGC TGC TGG TCA TTC TC
	rev	TGC CTC ATC CTC TTC AGT TG
<i>Notch4</i>	for	CAC TGA GCC AAG GCA TAG AC
	rev	ATC TCC ACC TCA CAC CAC TG
<i>Jagged1</i>	for	TCG CTG TAT CTG TCC ACC TG
	rev	AGT CAC TGG CAC GGT TGT AG
<i>Jagged2</i>	for	GAT TGG CGG CTA TTA CTG TG
	rev	AGG CAG TCG TCA ATG TTC TC

<i>Delta1/DII1</i>	for	AGA AAG TGT GCA ACC CTG GC
	rev	GCT CCC TCC GTT CTT ACA AG
<i>Delta4/DII4</i>	for	TGA CCA CTT CGG CCA CTA TG
	rev	AGT TGG AGC CGG TGA AGT TG
<i>p53-dinp1_</i>	for	TTGTGGGTGAAGTCAGTTCTTC
	rev	GAGCTTCCACTCTGGGACTACT
deltaNp73	for	CAAACGGCCCCGCATGTTCCC
	rev	TGGTCCATGGTGCTGCTCAGC
Trp73deltaTA	for	GTGGGGGTGGGATTAGATAAATGCCTG
	rev	CTGCCCTCTCAGCTTGTGCCACTTC
TRPp73	for	CTGGTCCAGGAGGTGAGACTGAGGC
	rev	CTGCCCTCTCAGCTTGTGCCACTTC
β -Aktin	for	GCTGTGCTATGTTGCTCTAGACTTC
	rev	CTCAGTAACAGTCCGCctAGAAGC
GAPDH	for	TGGTATCGTGAAGGACTCATGAC
	rev	AGTCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC
Primer für Klonierung des Jag1-Gens in pRTS-1		
Jag1Korsak_Start_ EcoRV-s	for	GATATCGCCGCCACCATGCGTTCACCGGACGCG
Jag1_Stop_EcoRV	rev	GATATCTACGATGTACTC
Primer für den GST-Pull down		
Jag1pGEX4T1Bam H1	for	GGATCCCGTTCACCGGACCGCGC
Jag1pGEX4T1Xho 1	rev	GAGCTATACGATGTACTCCAT
Jag1pcDNA3.1Flag BamH1		GGATCCTTATTTATCCATCATCATCTTTATAATCTACG ATGTACTCCATTTCG
Primer für die CHIP-Analysen		
u6-Promotor	for	GGCCTATTTCCCATGATTCC
	rev	ATTTGCGTGTCATCCTTGC

<i>mdm-2Promotor</i>	for	CGGGAGTTCAGGGTAAAGGT
	rev	AGCAAGTCGGTGCTTACCTG
<i>p21-Promotor</i>	for	ACCTTTCACCATTCCCCTAC
	rev	GCCCAAGGACAAAATAGCCA
Jag1 +5597	for	ACCTTTCACCATTCCCCTAC
	rev	GCCCAAGGACAAAATAGCCA
Jag1 +5983	for	CCATTGTGCACAGTCAGTCG
	rev	CCACTCGCATTGTGTGCATG

4.7.5 Tabelle 7: Antikörperverzeichnis

Antikörper	Catalog #	Clone	Verd.	kDa	Firma
Primäre Antikörper					
Anti-GAPDH	ab9484	mAbcam 9484 -	1:10000	40.2	Abcam
β-Actin Antikörper	sc-47778	C4	1:10000	43	SantaCruz
Anti-β-Aktin	A5441	AC-15mouse	1:10000		Sigma
Notch2	BZL07043	rabbit HU			Biozol
Notch3	sc5593	M-134 rabbit polyclonal	1:200	>250	Santa Cruz
Notch4	2423	L5C5 mouse mAb	1:1000	80-230	CellSignaling
Jagged1	2620s	28H8 rabbit mAb	1:1000	180	CellSignaling
Jagged1	sc-6011	C20	1:200	180	Santa Cruz
Jagged2	2210s	C23D2 rabbit mAb	1:1000	180	CellSignaling
Hes1	sc-13844	H-20	1:200	ca. 34	Santa Cruz
p53	DO1	IgG Maus	1:2000	53	Calbiochem
p53	OP43	Ab-6 mouse mAb Do-1	1:1000	53	Calbiochem
Mdm2	SMP14	Anti-Mdm2 monoclonal Maus	1:1000		Santa Cruz

Material und Methoden

Mdm2	OP46	Ab-1 mouse mAb IF-2	1:1000	ca. 90	Calbiochem
p73	sc-17823	E-4 mouse monoclonal IgG _{2a}	1:200	73	Santa Cruz
p73 Ab-2	OP109- 100UG	ER15 mouse mAb	1:1000	73	Neo Markers Fremont
p73	NBP2-24737	5B429 mouse monoclonal	1:200	73	IMGENEX
p73	AB7824	rabbit polyclonal	1:400	73	Merckmillipore
ΔNp73	IMG-313A	mouseIgG1 kappa	1:1000	73	IMGENEX
Nestin	5326	10C2 Human specific mAb	1:2000	220-240	Millipore
p21		monoclonal IgG Maus	1:1000	21	BD Pharmingen
p21	Ab-1	Ab-1 mouse mAb EA10	1:1000	21	Calbiochem

Sekundäre Antikörper

Anti-Kaninchen- POX			1:2000		Sigma
Anti-rabbit IgG	7074	HRP-linked Ab	1:3000		CellSignaling
Anti-Maus-POX			1:2000		Sigma

4.7.6 Materialien

Zellkulturflaschen 75 cm ²	Greiner Bio-One
Zellkulturschalen (10 cm Durchmesser)	Greiner Bio-One
Multiwell 6-well Zellkulturplatten	Falcon, BD Biosciences
Multiwell 24-well Zellkulturplatten	Falcon, BD Biosciences
Mikrotest 96-well Zellkulturplatten	Falcon, BD Biosciences
96-well Platten schwarz	Greiner Bio-One

Cell Strainer 70 µM Nylon	Falcon, Becton Dickinson Biosciences
50 ml PP-Test-Röhrchen, steril	Greiner Bio-One
15 ml PP-Test-Röhrchen, steril	Greiner Bio-One
2 ml Reaktionsgefäße Greiner	Bio-One
1,5 ml Eppendorfgefäße	Biozym
0,5 ml PCR-Reaktionsgefäße	Biozym
ECL-Hyperfilm	Amersham Pharmacia Biotech
Immobilon-P Transfer (PDVF) Membran	Millipore
Cell Scraper	Greiner Bio-One

4.7.7 Laborgeräte

Steril-Werkbanken

Sterilbank Hera Safe (vertikaler Luftstrom)	Heraeus Instruments
---	---------------------

Inkubator

Forma Scientific CO ₂ Incubator	ThermoQuest
Hera cell	Heraeus Instruments

Mikroskope

Leica DM IRBE	Leica Mikrosysteme
Leica MZ 6 Binokular	Leica Mikrosysteme

Heizblock

Thermomixer 5436	Eppendorf AG
------------------	--------------

Zentrifugen

Centrifuge 5415D/Rotor F-45-24-11	Eppendorf AG
Centrifuge 5403 /Rotor F-16-24-11	Eppendorf AG
Centrifuge 5415C /Rotor F-38-24-8	Eppendorf AG
Centrifuge 5415C/Rotor F-45-18-11	Eppendorf AG
Centrifuge 5415R	Eppendorf AG
Centrifuge 5810R	Eppendorf AG
Megafuge 3.0 RS /Rotor 8078	Heraeus Sepatech

Z 383 K

Hermle

Western Blot-Geräte

Vertical Slab Gel Unit SE 400

Hoefer Sci. Instruments

Hoefer Semiphor Blotting System

Hoefer Sci. Instruments

Electrophoresis Power Supply EPS-601

Amersham Pharmacia Biotech

Power Pac 200/300

Bio Rad

Agarosegelelektrophorese

GNA 200

Pharmacia Biotech

Power Supply EPS-600

Hoefer Sci. Instruments

Thermocycler

Thermal Cycler Veriti

Applied Biosystem

Trio Thermoblock

Biometra

Gel-Dokumentation

Herolab UVT 2035

Heraeus Instruments

Biodoc Camera

Biometra

Biodoc Controller Unit

Biometra

Filmentwicklung

Röntgenfilmentwickler

Protec Medizintechnik

Spektralphotometer

Ultrospec 3100 pro UV/Visible

Amersham Pharmacia Biotech

Autoklav und Trockenschrank

V-75

Systec

Trockenschrank

Heraeus

5 Ergebnisse

5.1 Expression wichtiger Komponenten des Notch-Signalwegs in Glioblastomzelllinien

Neuere Forschungsergebnisse unterstreichen die bedeutende Rolle des Notch-Signalwegs für die Pathogenese, das Wachstumsverhalten und das Therapieansprechen der von Gliazellen abgeleiteten malignen Glioblastomzellen. Die genauen molekularen Mechanismen, die diese Funktionen vermitteln, sind bislang allerdings noch nicht vollständig verstanden. Wirkung und Funktion der Notch-Signalwege hängen ganz entscheidend von der Expression der an diesen Signalwegen beteiligten Rezeptoren und ihren Liganden ab. Daher untersuchten wir zunächst die Expression von Komponenten der Notch-Signalwege in einer Reihe von ausgewählten humanen Glioblastomzelllinien. Die für die vorliegende Arbeit besonders wichtigen Charakteristika dieser Zelllinien sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Als Kontrollen wurden die spontan immortalisierte humane Keratinozytenzelllinie HaCaT (ATCC) und die humane kutane Plattenepithelkarzinomzelllinie SCL-1 (ATCC) untersucht. Bei ihnen waren die Expressionsmuster der Notch-Rezeptoren und Liganden bekannt (Reichrath und Reichrath 2012). Die p53-negative Osteosarkomzelllinie Saos-2 diente als eine weitere Kontrolle.

5.1.1 Wichtige Komponenten des Notch-Signalwegs werden in Glioblastomzelllinien auf RNA-Ebene differenziell exprimiert

Zunächst untersuchten wir in unseren Glioblastomzelllinien und in Saos-2- Zellen die Expression der Transkripte der folgenden Komponenten der Notch-Signalwege:

Notch-Rezeptoren: Notch1, Notch2, Notch3, Notch4

Notch-Liganden: Dll1, Dll3, Dll4, Jagged1, Jagged2

Hierzu wurde semi-quantitative RT-PCR mit gesamt-RNA aus den Glioblastomzelllinien Tx3868, Tx3095, U373, U118, U87 sowie der Osteosarkomzelllinie Saos-2 durchgeführt. Abb. 5 und Tabelle 2 fassen die Resultate zusammen. Es zeigte sich, dass von den vier Notch-Rezeptoren (*Notch1-4*) die Rezeptoren 1, 2 und 4 in allen untersuchten Zelllinien einschließlich der nicht-Glioblastomzelllinie Saos-2 in etwa gleicher Ausprägung auf RNA-Ebene exprimiert wurden. Im Gegensatz dazu wurde der Rezeptor Notch-3 nur in den Glioblastomzellen U373, U118, U87 und in Saos-2, nicht aber in den Zelllinien Tx3868 und Tx3095, exprimiert.

Vergleicht man nun die transkriptionelle Expression der Liganden *Jagged1/2 Dll1* und 4 in den genannten Zelllinien miteinander so fällt auf, dass nur *Jagged1* Transkripte - ebenso wie die Notch1, 2 und 4 Rezeptor-Transkripte - hochgradig uniform exprimiert werden. Im Gegensatz dazu zeigen die Liganden *Jagged2 Dll1* und *Dll 4* eine deutliche differentielle Expression zwischen den Zelllinien. Bemerkenswerterweise waren die Expressionen der *Jagged2, Dll1 Dll4* Transkripte jeweils korreliert. Die differentielle Expression der Notch-Rezeptoren und Liganden korrelierte auf RNA-Ebene nicht mit dem Status des p53-Transkriptionsfaktors: Tx3095, Tx3868 und Saos-2 p53-Status unbekannt; U373 und U118 mtp53; U87 wtp53.

Unsere ersten Untersuchungen zeigten also eine vom p53-Status der Glioblastomzellen unabhängige, differentielle Expression von Transkripten wichtiger Komponenten des Notch-Signalweges. Darauf aufbauend charakterisierten wir als nächstes die Proteinexpression.

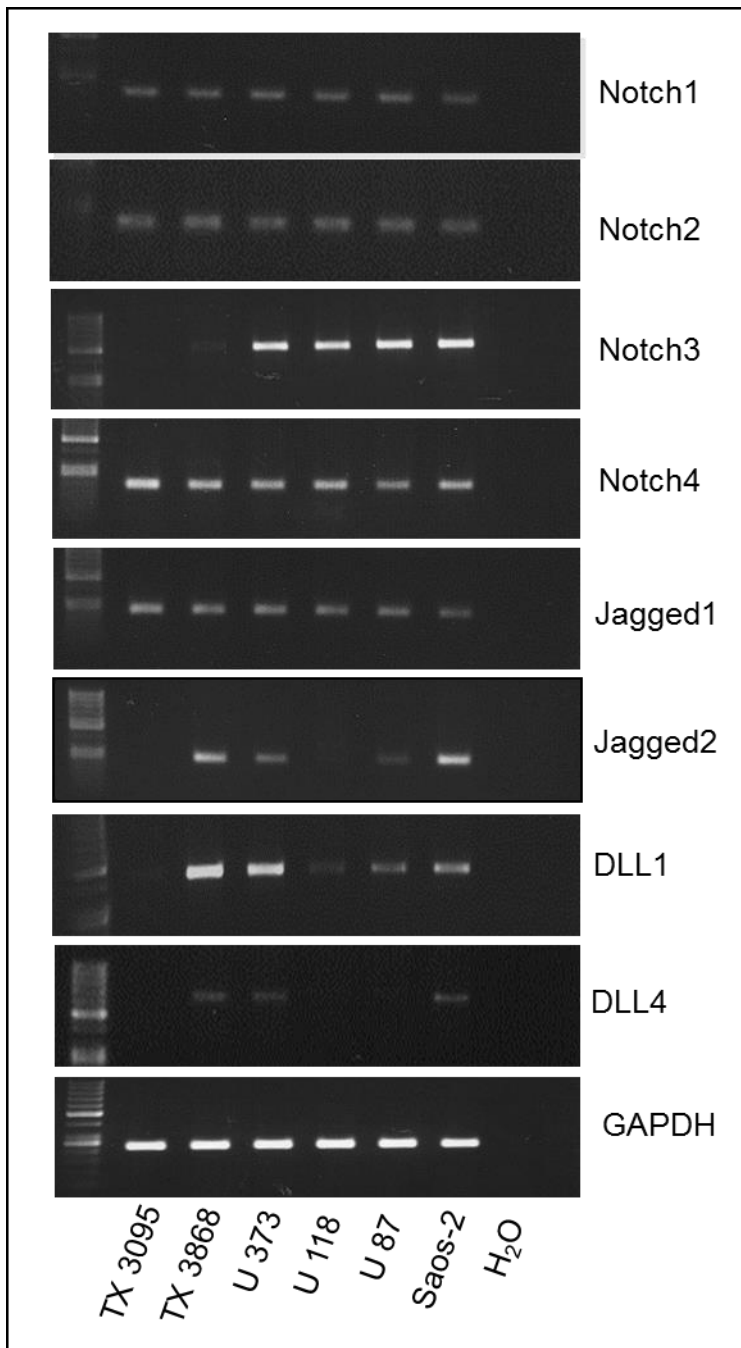


Abb. 7: RNA-Expression ausgewählter Notch-Rezeptoren und –Liganden in Glioblastomzelllinien und in Saos-2-Zellen. Bei diesem ersten Vorversuch wurde RNA aus folgenden Zelllinien (TX3095, TX3868, U373, U118, U87 und Saos-2) isoliert, und eine konventionelle PCR durchgeführt. Hier sollten die Expressionsprofile der Notch-Rezeptoren (Notch1,2,3 und 4) und einiger ihrer Liganden (Jagged1, Jagged2, DLL1 und DLL4) untersucht werden. Als Housekeeping-Gen wurde GAPDH eingesetzt.

Ergebnisse

Zelllinien	<i>Notch1</i>	<i>Notch2</i>	<i>Notch3</i>	<i>Notch4</i>	<i>Jag1</i>	<i>Jag2</i>	<i>DII1</i>	<i>DII3</i>
Tx3095	+	+	-	+	+	-	-	-
Tx3868	+	+	-	+	+	+	+	+
U373	+	+	+	+	+	+	+	+
U118	+	+	+	+	+	-	+	-
U87	+	+	+	+	+	+	+	-
Saos-2	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabelle 8: RNA-Expression von Notch-Rezeptoren (Notch1-4) und korrespondierenden Liganden (Jagged1, -2; DII-1, -3) in ausgewählten Glioblastomzelllinien.

5.1.2 Protein-Expression von wichtigen Komponenten des Notch-Signalwegs in Glioblastomzelllinien

Die Protein-Expression ausgewählter Komponenten des Notch-Signalwegs wurde mittels Western-Blot (Immunoblotting), Durchflusszytometrie und Immunzytochemie untersucht.

5.1.2.1 Western Blot Untersuchungen der Protein-Expression von wichtigen Komponenten des Notch Signalwegs in Glioblastomzelllinien

Die Analyse des Notch-Signalwegs mittels Western blotting war nur eingeschränkt möglich, da nicht für alle Komponenten geeignete Antikörper zur Verfügung standen. Es konnte eine starke Proteinexpression von Notch-3 und Notch-4 in den Glioblastomzelllinien U 87, U 373, TX 3095, und TX3868 nachgewiesen werden (Abb. 8). Dieses Resultat war insofern überraschend, als auf der Ebene der mRNA weder

in Tx3095 noch in Tx3868 signifikante Notch-3 RNA-Level nachgewiesen werden konnten (siehe Abb.5). Es deutet darauf hin, dass Notch 3 in diesen Zellen womöglich effizienter translatiert und auf Proteinebene stabiler ist, unterstreicht aber in jedem Fall, dass man von Transkriptleveln nicht immer auf Proteinlevel rückschließen kann. Dagegen wurden sowohl die aktive als auch die Vollängen-Form des Notch-1 Rezeptors lediglich in zwei (U373, TX3095) der vier untersuchten Glioblastomzelllinien in signifikanter Menge nachgewiesen, wobei die aktive Form stärker exprimiert wurde. In einer Zelllinie (TX 3868) war lediglich die aktive Form des Notch-1 Rezeptors detektierbar, in der Gliomzelllinie U87 war keine Notch-1 Expression darstellbar. Die Diskrepanz der Proteinexpressions- zu den RNA-Expressionsdaten in Abb.5 könnte z.B. Ausdruck der Erkennung spezifischer Spleißvarianten durch den Antikörper sein. Die Proteinexpression von Notch1 korrelierte mit dem p53-Status. Im Gegensatz zu U87-Zellen (p53-wt), in denen Notch1 nicht feststellbar war wurde es in Zellen mit mutiertem p53 (U373) detektiert.

Die Expression der Notch-Rezeptoren auf RNA-Ebene (Abb. 7 und Tabelle 7) korrelierte demnach nicht mit der Expression auf Proteinebene (Abb. 6). Während die RNA-Expression weitgehend gleichförmig war, erwies sich die Expression der Rezeptoren auf Proteinebene als stärker variabel.

Starke Unterschiede wurden auch in der Protein-Expression der Liganden der Notch-Rezeptoren gefunden (Abb. 8). Interessanterweise wurden die Liganden Jagged1 und Jagged2, obwohl auf Transkriptebene nachweisbar, in den von uns untersuchten Glioblastomzelllinien auf Proteinebene nie simultan exprimiert. Der Ligand Jagged1 wurde in drei (U 87, U 373, TX 3095) der vier untersuchten GBM Zelllinien bei 180 kDa detektiert, aber nicht in der Glioblastomzelllinie TX 3868. Hingegen wurde Jagged2 ausschliesslich von der Gliomzelllinie Tx 3868 exprimiert. Bemerkenswert war auch, dass die Proteinexpression von Jagged1 in U373 Zellen und von Jagged2 in TX 3868 Zellen um ein Vielfaches stärker war als in den Glioblastomzelllinien U 87 und TX 3095. Die als Kontrolle eingesetzten HaCaT Zellen zeigten eine starke Expression von sowohl Jagged1 als auch Jagged2, was impliziert, dass eine Koexpression der beiden Liganden nicht grundsätzlich ausgeschlossen ist. Die Proteinexpression von Jagged1 korrelierte mit dem p53-Status. Jagged1 wurde wesentlich stärker in Zellen mit mutiertem p53 (U373) exprimiert, verglichen mit p53-wt-Zellen (U87).

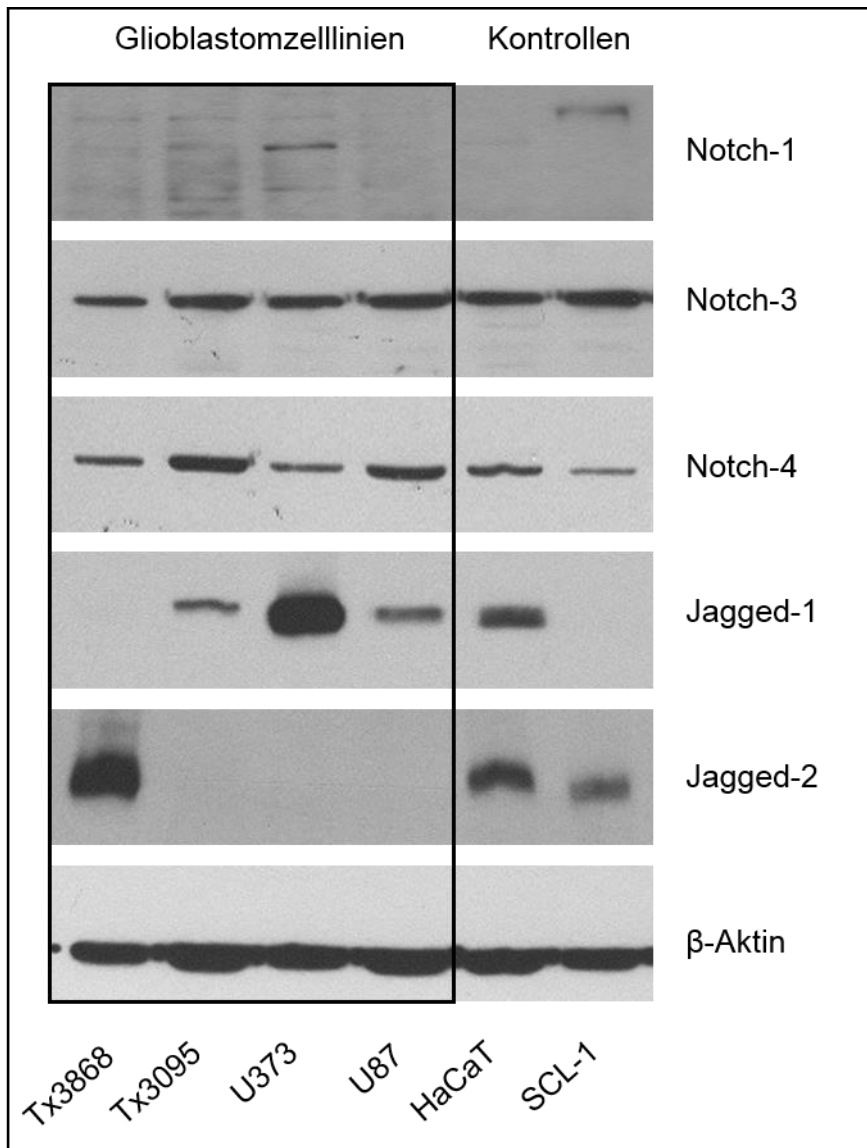


Abb. 8: Protein-Expression ausgesuchter Notch-Rezeptoren und Liganden bei Glioblastomzelllinien. Die Glioblastomzelllinien Tx3868, Tx3095, U373, U87 und die als Kontrolle eingesetzten Zelllinien HaCaT und SCL-1 wurden auf Expression der Rezeptoren Notch-1, -3 und -4 sowie deren Liganden Jagged1 und Jagged2 untersucht. Es wurde 15µg Gesamtprotein geladen. Der Notch-1 Antikörper wurde 1:1000 eingesetzt, der Notch-3 Antikörper 1:1000, Notch-4 Antikörper 1:1000, Jagged1 Antikörper 1:1000, Jagged2 Antikörper 1:1000, β-Aktin Antikörper 1:10000.

5.1.2.2 Das Expressionsprofil des Rezeptors Notch-4 und des korrespondierenden Liganden Jagged2 in der Durchflusszytometrie

In Ergänzung zu den Western Blot Untersuchungen analysierten wir die Expressionsprofile von Notch4 und dem korrespondierenden Liganden Jagged2 auch mit Hilfe der Durchflusszytometrie, da hierfür geeignete Antikörper zur Verfügung standen. Beide Primärantikörper wurden entsprechend den Herstellerangaben und in einer Verdünnung von 1:50 eingesetzt. In Übereinstimmung mit unseren vorangegangenen Untersuchungen (PCR-Analyse der RNA-Expression und Western-Blot-Analyse der Proteinexpression) zeigte sich in allen untersuchten Zelllinien (Tx3868, Tx3095, U373, U87, HaCaT und SCL-1) eine im Gegensatz zur jeweiligen Kontrolle (Eigenfluoreszenz); in allen Histogrammen Abb.9 deutliche (spezifische) Fluoreszenzmarkierung für Notch4. Interessanterweise zeigten sich in mehreren Zelllinien (Tx3868, U87, HaCaT und SCL-1) zwei-gipfelige Peaks, die auf das Vorhandensein von mindestens zwei Zellpopulationen mit schwächerer oder stärkerer Notch4 Expression hindeuteten.

Auch die FACS-Analyse des Liganden Jagged2 korrelierte mit der Detektion im Western-Blot. Eine deutliche Fluoreszenzmarkierung für Jagged2 fand sich lediglich in der Zelllinie Tx 3868, die übrigen untersuchten Glioblastomzelllinien Tx 3095, U373 und U87 zeigten keine Jagged2-Expression. Bei den beiden Kontrollzelllinien (HaCaT, SCL-1) war hingegen eine Fluoreszenzfärbung deutlich nachweisbar.

Die Ergebnisse der FACS-Analyse zur Expression von Notch4 und Jagged2 bestätigten also die Ergebnisse aus den Western Blots und deuteten darüber hinaus darauf hin, dass es Subpopulationen von Zellen gibt, die Notch4 in stark unterschiedlichem Maße exprimieren.

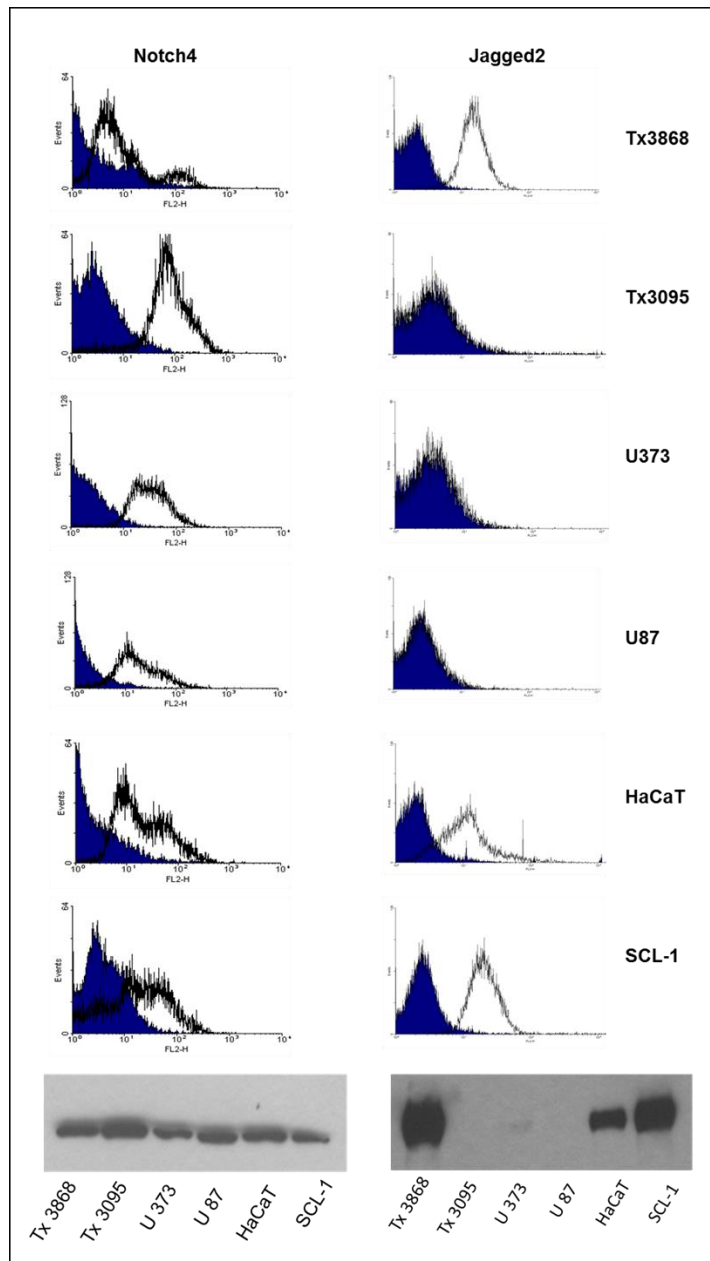


Abb. 9: FACS-Analysen der Notch-Signalwegkomponenten Notch4 und Jagged2. Die Glioblastomzelllinien Tx3868, Tx3095, U373, und U87 wurden unter Standardbedingungen kultiviert. Mit Hilfe eines Durchflusszytometers (FACS) wurden die mit Antikörpern gegen Notch4 oder Jagged2 markierten und nicht-markierten (hier blau dargestellt) Zellen gezählt (siehe Material und Methoden) und vergleichend als Einparameterdiagramm dargestellt. Die x-Achse zeigt die Fluoreszenzintensität als \log_{10} ; die y-Achse die Zellzahl. Im unteren Abschnitt ist die Expression der beiden Proteine nochmals im Western Blot dargestellt. Der Notch4 Antikörper wurde 1:1000 eingesetzt, der Jagged2 Antikörper 1:1000. Es wurden 15 μg Protein geladen.

5.2 Der Effekt von ionisierender Strahlung auf Glioblastomzellen in vitro

Da Glioblastome in der Regel mit ionisierender Strahlung behandelt werden war es für uns interessant das Notch-System unter diesen Gesichtspunkten zu untersuchen. Als wichtiger Regulator der Stressantwort nach DNA-Schädigung ist der Notch- Signalweg entscheidend an der Steuerung von zellulären Prozessen beteiligt, die das weitere Schicksal von Zellpopulationen nach ionisierender Bestrahlung festlegen. Ein zentrales Anliegen unserer Untersuchungen war daher die Beantwortung der Frage, inwieweit Veränderungen in der Expression und Funktion von Komponenten des Notch-Systems mit der Entwicklung von strahlenresistenten Glioblastomzellen assoziiert sind. Die Detektion solcher Veränderungen könnte Möglichkeiten zur Überwindung der Strahlenresistenz aufzeigen.

5.2.1 Morphologische Veränderungen von Glioblastomzellen nach Behandlung mit ionisierender Strahlung.

Für diese Untersuchungen wurden Zellen eingesetzt, die neben Notch3, Notch4 und Jagged1 entweder mutiertes p53 (U373) oder Wildtyp-p53 (U87) exprimieren. Wie erwartet, führte die Behandlung von U373 und U87 Zellen mit hochdosierter ionisierender Strahlung (30-120 Gy) zu einer Zeit- und Dosis-abhängigen Verringerung der Population an vitalen Zellen. Bereits nach einem Tag kam es zu einer deutlichen Verringerung der Population von U373- und U87-Zellen. Dieser Effekt war am stärksten nach 4 Tagen ausgeprägt (Abb. 10 zeigt bestrahlte Zellen nach 4 Tagen) und nicht vom Status des p53-Proteins abhängig. Zwischen Tag 4 und Tag 7 nach Bestrahlung fanden sich hingegen keine weiteren Veränderungen in der Zahl und Morphologie der überlebenden Zellpopulationen. Bemerkenswerterweise zeigten die überlebenden Zellen spezifische Änderungen ihrer morphologischen Merkmale. So traten in dieser Zellpopulation vermehrt Dendriten-ähnliche somatische Ausläufer auf (Abb. 10, Pfeil).

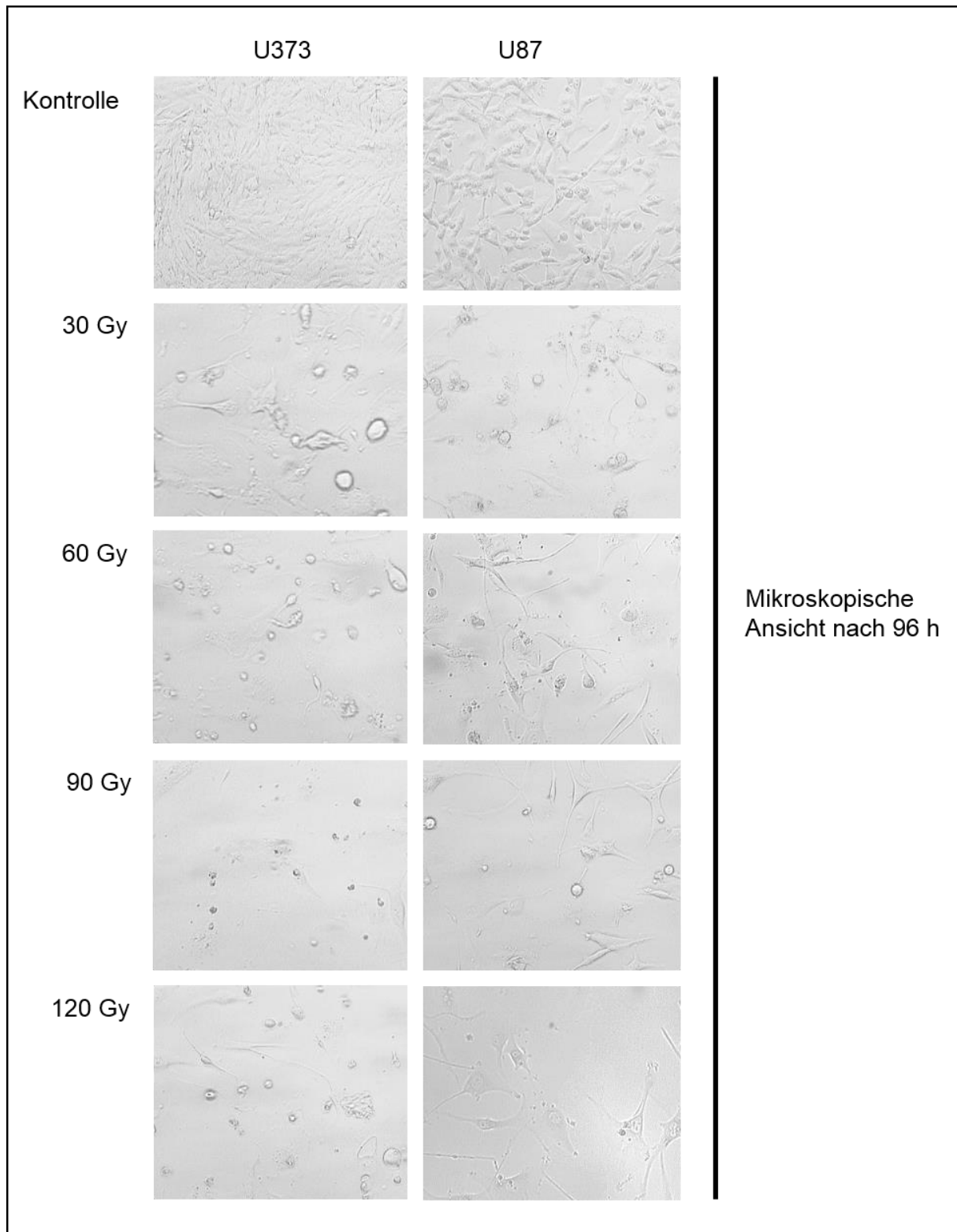


Abb. 10: Durchlichtmikroskopische Aufnahmen von U373 und U87 Kulturen nach Behandlung mit ionisierender γ -Strahlung.

Die Zellen wurden mit Dosen von 30, 60, 90 oder 120 Gy bestrahlt, für 96 h unter standardisierten Zellkulturbedingungen in Kultur gehalten und danach mittels Durchlichtmikroskopie analysiert.

Beide Zelllinien zeigten unbestrahlt den für sie typischen Zellrasen mit einer Konfluenz von etwa 90%. Nach Bestrahlung korrelierte die Zahl an vitalen Zellen mit der Höhe der Strahlendosis. Nach 96 h hatte sich die Zahl der vitalen Zellen drastisch reduziert. Bemerkenswert ist aber, dass selbst bei hohen Strahlendosen (90 oder 120 Gy) noch lebende Zellen sichtbar waren.

Bei beiden Zelllinien fanden sich nach Bestrahlung charakteristische morphologische Veränderungen. Die humane Gliomzelllinie U373 verlor ihre typische spindelförmige Struktur, bildete vermehrt Verzweigungen (Dendriten) aus und zahlreiche Zellen zeigten eine Größenzunahme.

Der p53-Status hatte keinen sichtbaren Einfluss auf die morphologischen Veränderungen nach Behandlung mit ionisierender Strahlung. Diese unterschieden sich in U87 Zellen (p53 wt) nur wenig von denen in U373 Zellen (p53 mut). Bei beiden Zelllinien nahmen die Größe der Zellkörper („Riesenzellen“) und die Zahl der Verzweigungen (Dendriten) zu.

Auch nach Behandlung selbst mit sehr hohen Strahlendosen konnte die Vitalität der verbliebenen Zellen unter standardisierten Kulturbedingungen über mehrere Wochen aufrechterhalten werden. Analysen der Spätfolgen nach Behandlung mit hochdosierter ionisierender Strahlung waren allerdings nicht Gegenstand unserer Untersuchungen.

Wir schlußfolgern, dass die Behandlung mit ionisierender Strahlung unabhängig vom p53-Status eine Population von Glioblastomzellen mit charakteristischen morphologischen Veränderungen hervorbrachte.

Als nächstes wollten wir das Expressionsprofil von wichtigen Komponenten des Notch Signalwegs in den nach Bestrahlung (Zeitraum 96h) verbleibenden Zellpopulationen charakterisieren.

5.2.2 Expression von Jagged1 und Notch-4 nach einmaliger Behandlung mit ionisierender Strahlung

Bei den Zelllinien U373, U87 und TX3868 führte die einmalige Behandlung mit ionisierender Strahlung nach 96 h zu einer vermehrten Proteinexpression des Notch-Liganden Jagged1.

Die Jagged1 Proteinexpression erreichte in U373 und Tx3868 Zellen bereits nach Bestrahlung mit 30 Gy ihr Maximum, wogegen sie in U87 Zellen dosisabhängig (Abb. 11) weiter anstieg.

Dagegen zeigte die Proteinexpression von Notch4 nach Behandlung mit ionisierender Strahlung keine Dosis-abhängige Veränderung. Notch4 wurde konstant exprimiert.

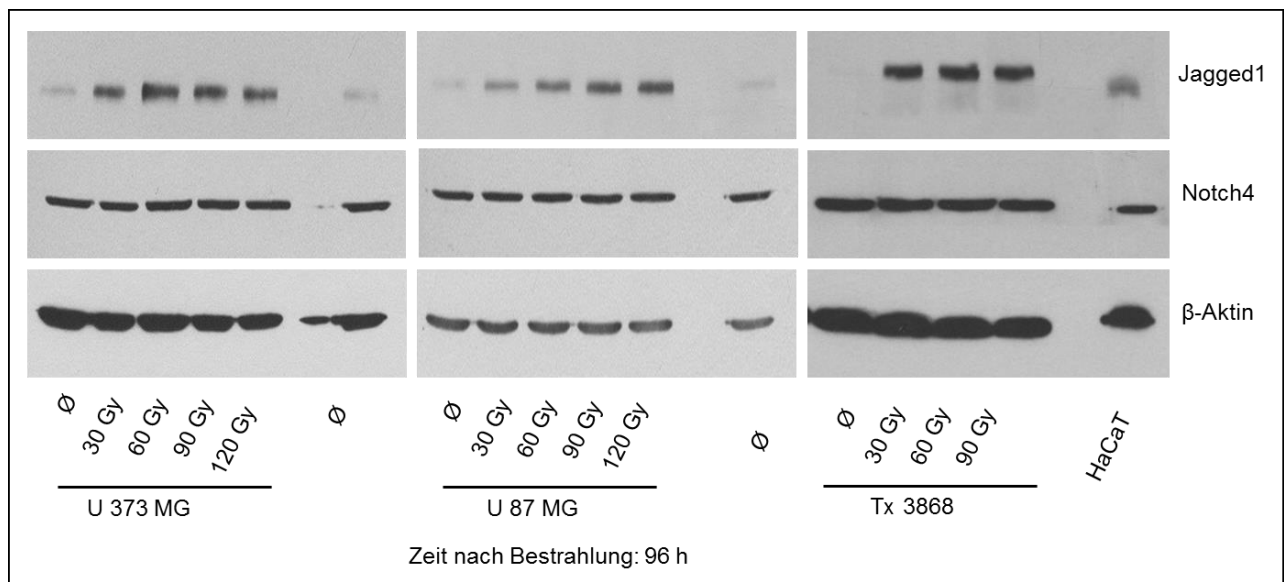


Abb. 11 Stimulation der Expression des Notch-Liganden Jagged1 in Glioblastomzelllinien durch Behandlung mit ionisierender Strahlung.

Die Zellen wurden mit Einzeldosen von 30, 60, 90 oder 120 Gy (außer Tx3868) bestrahlt und danach für 4 Tage unter Standardbedingungen in Kultur gehalten. Es wurde jeweils 15 µg Gesamtprotein aufgetragen. Jagged1- und Notch4-Antikörper wurden jeweils mit einem Verdünnungsfaktor von 1:1000 eingesetzt. Als Ladekontrolle wurde ein β-Aktin-Antikörper (1:10000) eingesetzt.

Die Stimulation der Expression von *Jagged1* nach Bestrahlung konnte auch in der semi-quantitativen RT-PCR nachgewiesen werden (Abb). Sie war bei U373 Zellen deutlicher ausgeprägt als bei U87 Zellen (Abb. 12).

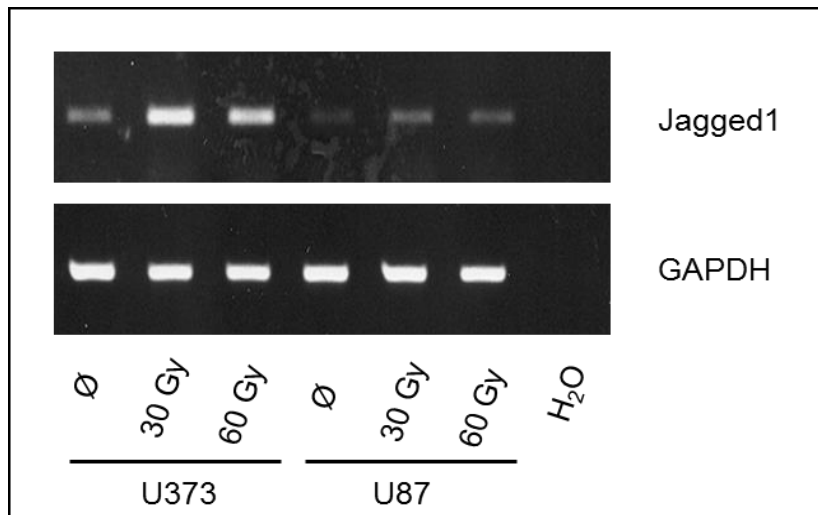


Abb. 12: Ionisierende Strahlung stimuliert die Transkription von *Jagged-1*. U373 und U87 Zellen wurden entweder „scheinbehandelt“ oder bestrahlt (30 oder 60 Gy) und nach 24 h analysiert. Die *GAPDH*-Expression diente als Referenz. Die als Kontrolle eingesetzte Probe H₂O enthielt keine cDNA.

Insgesamt zeigten diese Untersuchungen also, dass hochdosierte ionisierende Strahlung zur Selektion einer Population von Glioblastomzellen führt, die u.a. charakteristischen Veränderungen in der Expression von Komponenten des Notch-Signalwegs zeigt, insbesondere einer vermehrten Expression von Jagged1 auf Protein- und RNA-Ebene. Die Unterschiede in der Jagged1 Expression scheinen demnach auf transkriptioneller- (oder RNA-stabilitäts-) Ebene und nicht etwa auf der Ebene einer veränderten Proteinstabilität reguliert zu werden. Die Stimulation der Expression von *Jagged1* nach Bestrahlung war in p53mt-Zellen (U373) deutlicher ausgeprägt als in p53wt-Zellen (U87). Bislang ist nur wenig über die molekularen Mechanismen, die die Expression dieses Notch-Liganden regulieren, bekannt.

5.3 Assoziation der Expression von Jagged1 und p53 nach Behandlung von Glioblastomzelllinien mit dem Radiomimetikum Doxorubicin

Wir untersuchten als nächstes, inwieweit die Veränderungen in der Expression von Jagged1 auch nach Behandlung mit dem (die Bestrahlung simulierenden) Radiomimetikum Doxorubicin (Adriamycin) nachweisbar sind und wenn ja, inwieweit diese mit Veränderungen in der Expression von Mitgliedern der p53-Familie

korrelieren. Adriamycin bewirkt wie ionisierende Strahlung charakteristische DNA-Schädigungen, vor allem DNA-Doppelstrangbrüche. Es ist bekannt, dass p53 bei Vorliegen von DNA-Doppelstrangbrüchen als Transkriptionsfaktor wichtige Funktionen der zellulären Antwort reguliert, darunter Zellzyklus-Arrest und/oder die Induktion des programmierten Zelltods (Apoptose).

Um die Auswirkungen des p53 Status auf die Expression von Jagged1 untersuchen zu können, verwendeten wir auch hier wie bei den Experimenten zuvor, je eine Zelllinie mit mutiertem p53 (U373) und mit p53 Wildtyp (U87). Nach Behandlung der Wildtyp-p53-profizienten Glioblastomzelllinie U87 mit Doxorubicin (Konzentration: 0,34 μ M) unter Standard-Kulturbedingungen fanden wir wie erwartet im Western Blot eine zeitabhängige Induktion der Expression von Jagged1, die in ihrer Intensität mit der Induktion nach Behandlung mit ionisierender Strahlung vergleichbar war (Abb. 13). Somit konnten wir also die Relevanz von DNA-Schädigung für die Induktion von Jagged1 in Glioblastomzellen bestätigen.

Wir konnten weiterhin zeigen, dass die erhöhte Expression von Jagged1 zeitabhängig mit einer Stimulation der Expression von p53 und zwei seiner Targetgene, Mdm2 und p21, korrelierte. Die stärkste Expression von Jagged1 fand sich nach 8 h, von p21 und Mdm2 nach 24 h. p21 wirkt als Inhibitor von Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK1-Inhibitor) und blockiert so den Zellzyklus (Römer et al. 2012). Mdm2 ist der Hauptgegenspieler von p53 und begrenzt dessen Aktivität (Römer et al. 2012).

In U373 Zellen zeigte sich bereits vor Behandlung eine für mutiertes p53 typische starke p53- Protein-Expression, die durch Behandlung mit Doxorubicin noch etwas verstärkt werden konnte. Auch die Expression von Jagged1 und Mdm2 war bereits vor Behandlung mit Doxorubicin stark ausgeprägt. Nach 24 h nach Behandlung war die Expression von Jagged1 deutlich reduziert und die Expression von Mdm2 nicht mehr nachweisbar. P21-Protein konnte nur 24 h nach Behandlung klar detektiert werden.

Unter Behandlung mit Doxorubicin fanden sich in Glioblastomzelllinien folglich deutliche Veränderungen in der Expression von Jagged1 sowie von p53 und seinen Zielgenen Mdm2 und p21, die mit dem p53 Status korrelierten. Mutiertes p53 (U373) korrelierte nicht mit einer Induktion sondern mit der Reduktion von Jagged1, wogegen wt p53 mit der Induktion von Jagged1 sowie seiner Zielgene p21 und

Mdm2 korrelierte. Allerdings können Tumorzellen neben p53 auch Varianten seiner Verwandten p63 und p73 enthalten, die teilweise identische Zielgene regulieren.

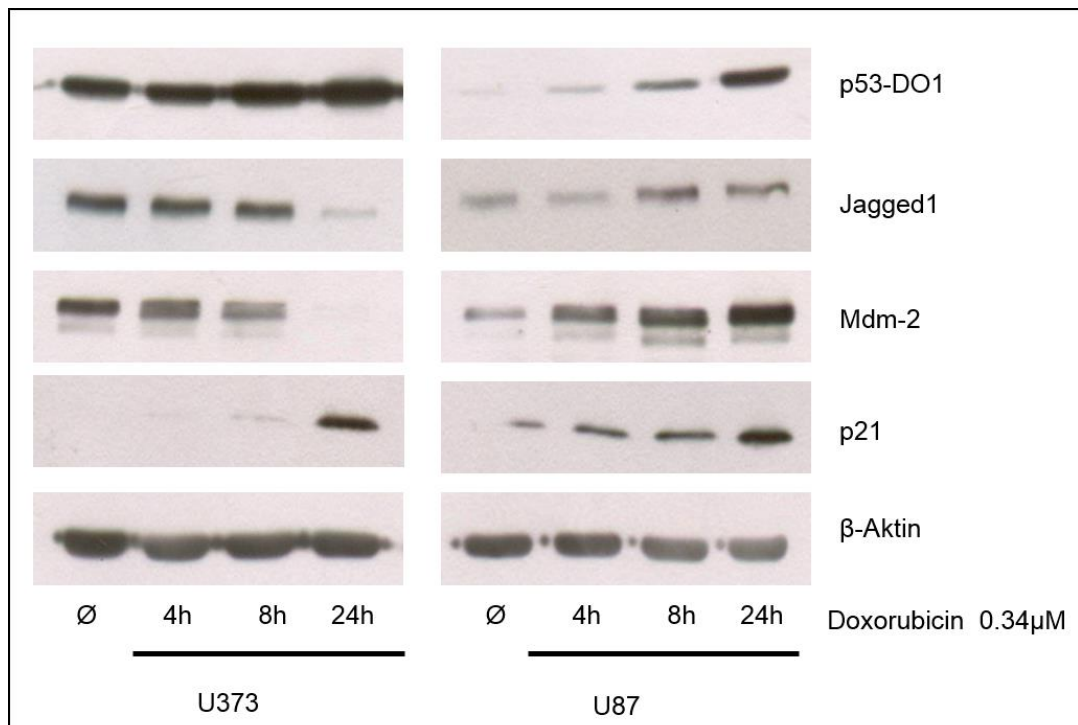


Abb. 13: Behandlung der Gliomzelllinie U87 mit Doxorubicin induziert die Expression des Tumorsuppressors p53. Das Radiomimetikum Doxorubicin wurde in einer Konzentration von 0.34 μM über einen Zeitraum von 4, 8 und 24 h eingesetzt. Western blot. Es wurden jeweils 15 μg Gesamtprotein aufgetragen. Verdünnung der Antikörper gegen Jagged1 (1:1000); p53 (DO-1) 1:2000; Mdm2 (1:1000), p21 (1:1000). Ein gegen β -Aktin gerichteter Antikörper diente als Ladekontrolle (1:10.000).

5.4 Die Induktion der Jagged1-Expression durch ionisierende Strahlung korreliert mit der Expression des Transkriptionsfaktors p73

Wie nach DNA-Schädigung durch Doxorubicin beobachteten wir nach Behandlung mit ionisierender Strahlung eine Zeit- und Dosis-abhängige Veränderung in der Expression wichtiger Komponenten der p53-Familie. Nach Bestrahlung mit 30 oder

60 Gy zeigte sich in den Glioblastomzelllinien U373 mit mutiertem p53 und Tx3868 (p53 Status unbekannt) eine starke Induktion der RNA und Protein-Expression des Transkriptionsfaktors TAp73 (Abb. 14 und 15), die mit der Expression von Jagged1 korrelierte. Lediglich bei der wt p53 Zelllinie U87 konnte kein p73 detektiert werden.

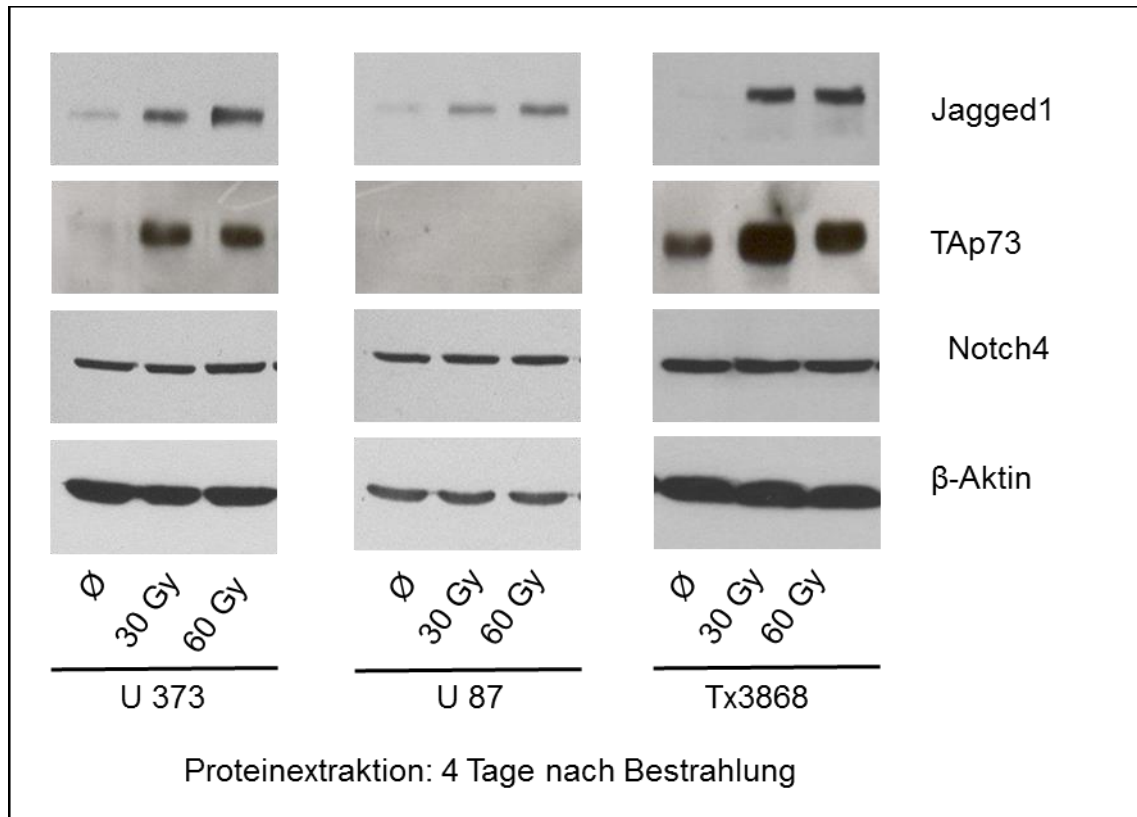


Abb. 14: Hochdosierte γ -Strahlung stimuliert die Protein-Expression von Jagged1 und TAp73. U373, U87 und Tx3868 Zellen wurden scheinbehandelt oder mit 30 und 60 Gy bestrahlt und für 4 Tage unter Standardbedingungen kultiviert. Es wurden jeweils 15 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Die Antikörper wurden wie folgt verdünnt: Jagged1 (1:1000), p73 (1:100); Notch-4 (1:1000). Ein gegen β -Aktin gerichteter Antikörper wurde als Ladekontrolle eingesetzt.

Der Nocht-Ligand Jagged1 wurde allerdings auch in U87 Zellen nach Behandlung mit ionisierender Strahlung dosisabhängig verstärkt exprimiert, hier könnte also p53 kompensatorisch für das Fehlen von p73 wirken. Notch4 war wiederum nicht reguliert.

Es zeigte sich also, dass nach Behandlung mit ionisierender Strahlung eine Population von Glioblastomzellen selektiert wurde die sowohl Jagged1 als auch p53 oder p73 verstärkt exprimierte. Das Fehlen von wt p53 konnte dabei offenbar durch

die Anwesenheit von p73 kompensiert werden. Wir untersuchten deshalb als nächstes, ob Jagged1 womöglich durch TAp73 transaktiviert wird. Dazu bedienten wir uns zwei verschiedenen methodischen Ansätzen: dem siRNA-vermittelten knockdown von TAp73 und dem Nachweis einer möglichen Bindung von TAp73 an den Jagged1-Promotor durch Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP).

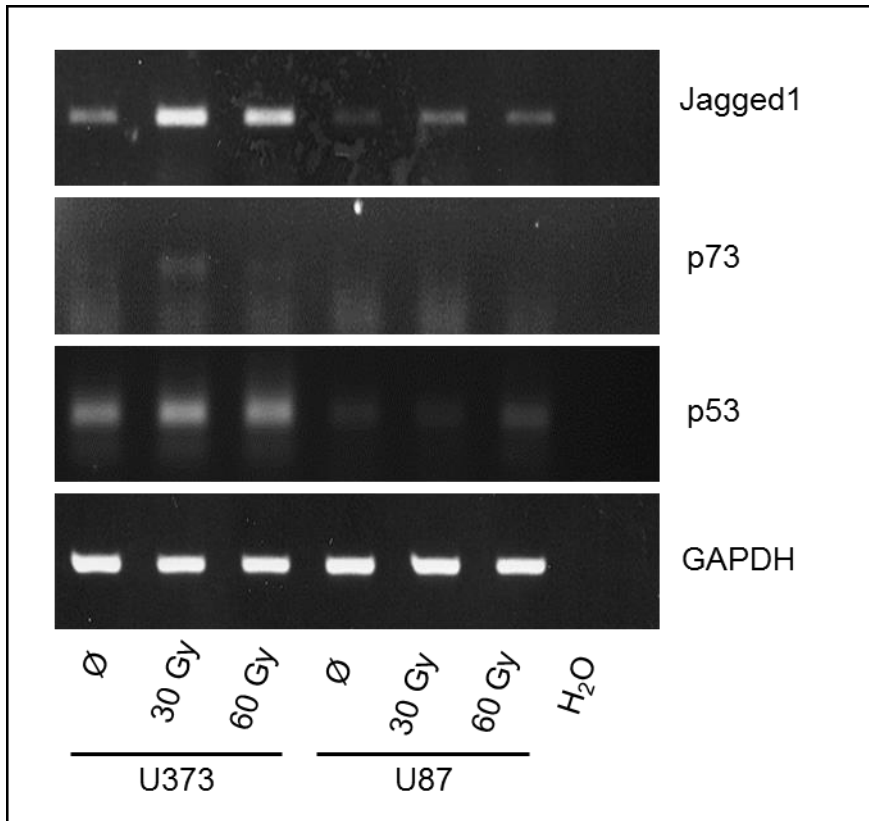


Abb. 15: Ionisierende Strahlung induziert die mRNA-Expression von Jagged1 und TAp73 in U373 Zellen. Glioblastomzelllinien (U373, U87) wurden mit 30 und 60 Gy bestrahlt und für 4 Tage unter Standardbedingungen kultiviert. In U373 Zellen fand sich mit Hilfe der konventionellen PCR nach Bestrahlung ein deutlicher Anstieg der Jagged1 Expression, sowie eine weniger stark ausgeprägte Induktion der p53- und TAp73-Expression. In U87 Zellen zeigte sich nach Bestrahlung ebenfalls ein Anstieg der Jagged1 mRNA, allerdings war dieser geringer als in U373 Zellen. Nach Bestrahlung mit 60 Gy zeigte sich auch eine Stimulation der p53-Expression, TAp73 war in U87 Zellen dagegen auch nach Bestrahlung nicht zu detektieren. Als Ladekontrolle wurde die GAPDH-Expression untersucht.

5.5 Knock down von TAp73 verhindert in Glioblastomzellen die Induktion der Expression von Jagged1 durch ionisierende Strahlung

Als nächstes wollten wir unter Verwendung von siRNAs untersuchen, ob die vermehrte Expression von Jagged1 nach ionisierender Strahlung direkt oder indirekt durch das TAp73 Protein induziert wird. Transfektion von U373-Zellen mit irrelevanter (scrambled) siRNA führte zu keiner signifikanten Veränderung der TAp73-Expression (Abb. 16). Dagegen verursachte die Transfektion mit einer gegen TAp73 gerichteten siRNA (p73siRNA1) nach Bestrahlung eine starke Reduktion des TAp73-Levels und begleitend, auch eine deutliche Reduktion der Jagged1-Expression. Die Transfektion mit einer zweiten gegen TAp73 gerichteten siRNA (p73siRNA2) führte ebenfalls zu einer Reduktion des TAp73-Levels, wenn auch schwächer ausgeprägt und entsprechend war auch die Jagged1-Expression nach Bestrahlung schwächer ausgeprägt. Vergleichbare Effekte auf die Jagged1-Expression wurden auch in U87 Zellen nach Transfektion mit den beiden gegen TAp73 gerichteten siRNAs beobachtet, obwohl hier nur wenig TAp73-Protein nachweisbar war. Die beiden eingesetzten, gegen TAp73 gerichteten, siRNAs hatten keinen Effekt auf die Expression von p53 (Abb. 16). Dies wies darauf hin, dass entgegen unseren Vermutungen p73 nicht für das Fehlen von p53 in den p53-mutierten Zellen kompensiert, sondern auch in den p53-Wildtyp-Zellen (U87) für den Effekt von Strahlung auf die Expression von Jagged1 verantwortlich ist. Die Jagged1 Expression scheint also in den nach Hochdosis-Bestrahlung überlebenden Glioblastomzellen unter der Kontrolle von TAp73 zu stehen. Allerdings könnte das *Jagged1* Gen nicht *direkt* von TAp73, sondern über indirekte Mechanismen transkriptionell reguliert werden, beispielsweise über eine TAp73-abhängige Induktion eines anderen Transkriptionsfaktors. Außerdem könnte die Zunahme an Jagged1-Protein auch auf translationaler oder auf Protein-Stabilitätsebene durch TAp73 reguliert werden. Um also zu untersuchen, ob das *Jagged1*-Gen *in vivo* von TAp73 transaktiviert werden kann, wurden in der Folge ChIP-Assays durchgeführt.

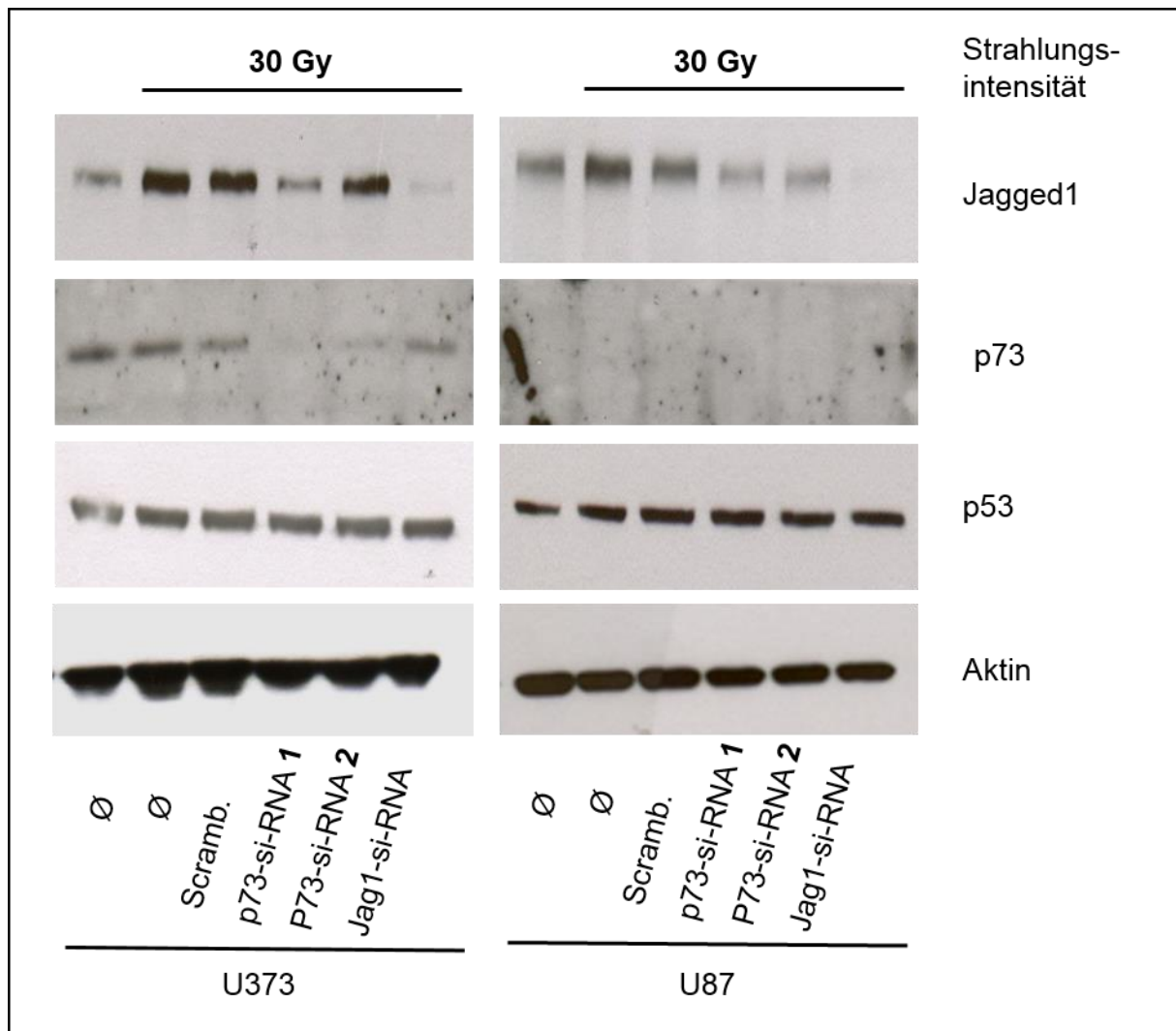


Abb. 16: Expression von Jagged1, p53 und p73 in Glioblastomzellen (U373, U87) nach Transfektion mit gegen p73 oder Jagged1 gerichteten siRNAs und darauffolgender Behandlung mit ionisierender Strahlung. Proteinnachweis im western blot. Die Zellen wurden mit siRNA transfiziert, mit 30 Gy bestrahlt und nach weiteren 24 h geerntet.

5.6 Nachweis der TAp73-Bindung an die Promotorregion des Jagged1 Gens nach gamma-Bestrahlung

Der Chromatin-Immunpräzipitations-Assay (ChIP-Assay) ist eine Methode, um DNA-bindende Proteine *in vivo*, sowie deren korrespondierende Bindungsregionen der genomischen DNA, nachzuweisen. Er stellt somit eine Momentaufnahme des Zustands dar, in der sich die „aktive“ Zelle zum Zeitpunkt der Fixierung mit

Formaldehyd befunden hat. Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten ChIP-Assays wurden U373 und U87 Zellen unter definierten Wachstumsbedingungen angezogen, entweder scheinbestrahlt oder mit 60 Gy bestrahlt und anschließend für weitere 20 h kultiviert. Durch Zugabe von Formaldehyd wurden die Zellen derart fixiert, dass DNA-gebundene Proteine mit ihrer DNA kovalent verknüpft vorlagen. Nach Aufbrechen der Zellen, Waschen und anschließender Ultraschall-Zerkleinerung des präparierten Chromatins erhielt man Proteine mit daran gebundenen DNA-Fragmenten einer durchschnittlichen Größe von 100 bis 1000 bp. Die Komplexe wurden dann mittels spezifischer Antikörper (CD30 HRS-3, p73 E-15, p73-IMG-246, p53 Do-1) immunopräzipitiert. Durch Waschen und Lösen der Protein-Antikörper Komplexe von der kopräzipitierten DNA erhielt man schließlich DNA-Fragmente, deren Identität in der Folge mit Hilfe spezifischer Primer durch PCR bestimmt werden konnte.

Für die hier vorgenommenen Analysen wurden zwei spezifische Primerpaare für p53-bindende Promoterregionen aus den *p21*- und *MDM2*-Genen sowie ein spezifisches Paar für eine Region aus dem *Jagged1* Gen verwendet, welche eine putative TAp73-Bindestelle enthält (Abb. 5). Primer für den *U6*-Genpromoter, der weder von p53 noch von TAp73 gebunden wird, dienten als Kontrolle.

Es zeigte sich, dass mit dem irrelevanten Antikörper HRS-3 (anti-CD30), der das nicht-DNA-bindende Protein CD30 präzipitiert, weder p53- noch TAp73-bindende Promotorsequenzen kopräzipitiert werden konnten. Dies indizierte, dass die Waschschriffe während der ChIP Prozedur effektiv und die zu untersuchenden DNA-Sequenzen nicht unspezifisch mitgefällt worden waren. In U87 Zellen konnte mit den beiden p73-Antikörpern keinerlei detektierbares ChIP-Signal erzeugt werden. Dieses Resultat kam nicht unerwartet, da in unseren vorangegangenen Untersuchungen (siehe Abb. 14, 16 (Protein) und Abb. 15 (RNA)) bereits gezeigt wurde, dass p73 in dieser Zelllinie nur in sehr geringen Mengen exprimiert wird. Es unterstreicht noch einmal, dass das ChIP-Verfahren in unseren Händen effektiv war und keine falsch-positiven Signale erzeugte. Hingegen erzeugte die Fällung mit dem p53-Antikörper DO-1 wie erwartet ChIP-Signale, da U87 Zellen nachweisbare Level an Wildtyp-p53 exprimieren. Bemerkenswert war jedoch, dass p53 offenbar nicht nur an die Sequenzen der klassischen p53-responsiven Gene *p21* und *MDM2* gebunden vorgelegen haben musste (Abb.17, Bahnen 7 und 8), sondern auch am *Jagged1* Promotor. Außerdem war die Bindung von p53 an *Jagged1* und *MDM2*-Sequenzen

stressabhängig: gamma-Strahlung förderte die Assoziation des Transkriptionsfaktors mit der DNA (vergleiche Abb 17, Bahn 8). Die Bindung von p53 an *Jagged1* in U87 Zellen war auch deshalb bemerkenswert, weil unsere vorherigen *p73*-siRNA-vermittelten knockdown-Untersuchungen zur gesteigerten Expression von *Jagged1* nach Bestrahlung indiziert hatten, dass *p73*, nicht aber *p53*, in U87 Zellen für die gesteigerte *Jagged1* Expression verantwortlich war (Abb.16). Zusammen deuten diese Resultate also darauf hin, dass die Bindung von *p53* an die *Jagged1* Promotorsequenz ein notwendiges, aber kein hinreichendes Ereignis für die Transaktivierung von *Jagged1* unter gamma-Bestrahlung darstellt. Hier werden wahrscheinlich weitere Signale benötigt.

Ein anderes Bild ergab sich mit den U373 Zellen. In diesen hatten wir bereits zuvor deutliche Level an *p73* Protein nachweisen können (Abb.14, 16). Während der Kontroll-Antikörper HRS-3 auch hier keinerlei Signale produzierte und damit eine unspezifische Fällung von relevanten Sequenzen ausgeschlossen werden konnte, wurde mit beiden *p73*-Antikörpern sowohl die Sequenzen des *Jagged1* Promotors als auch die *p21*- und *MDM2*-, nicht aber die *U6*-Promotorsequenzen kopräzipitiert (Abb.18). *p73* war also in U373 Zellen *in vivo* mit dem *Jagged1* Promotor assoziiert. Dass es auch mit den *p21*- und *MDM2*-Promotoren assoziiert vorlag war nicht ungewöhnlich. Es war bekannt, dass die *p53*-Bindungsmotive in beiden Genen nicht nur von *p53* selbst, sondern kontextabhängig auch von anderen Transkriptionsfaktoren aus der *p53*-Familie einschließlich *p73* erkannt werden können

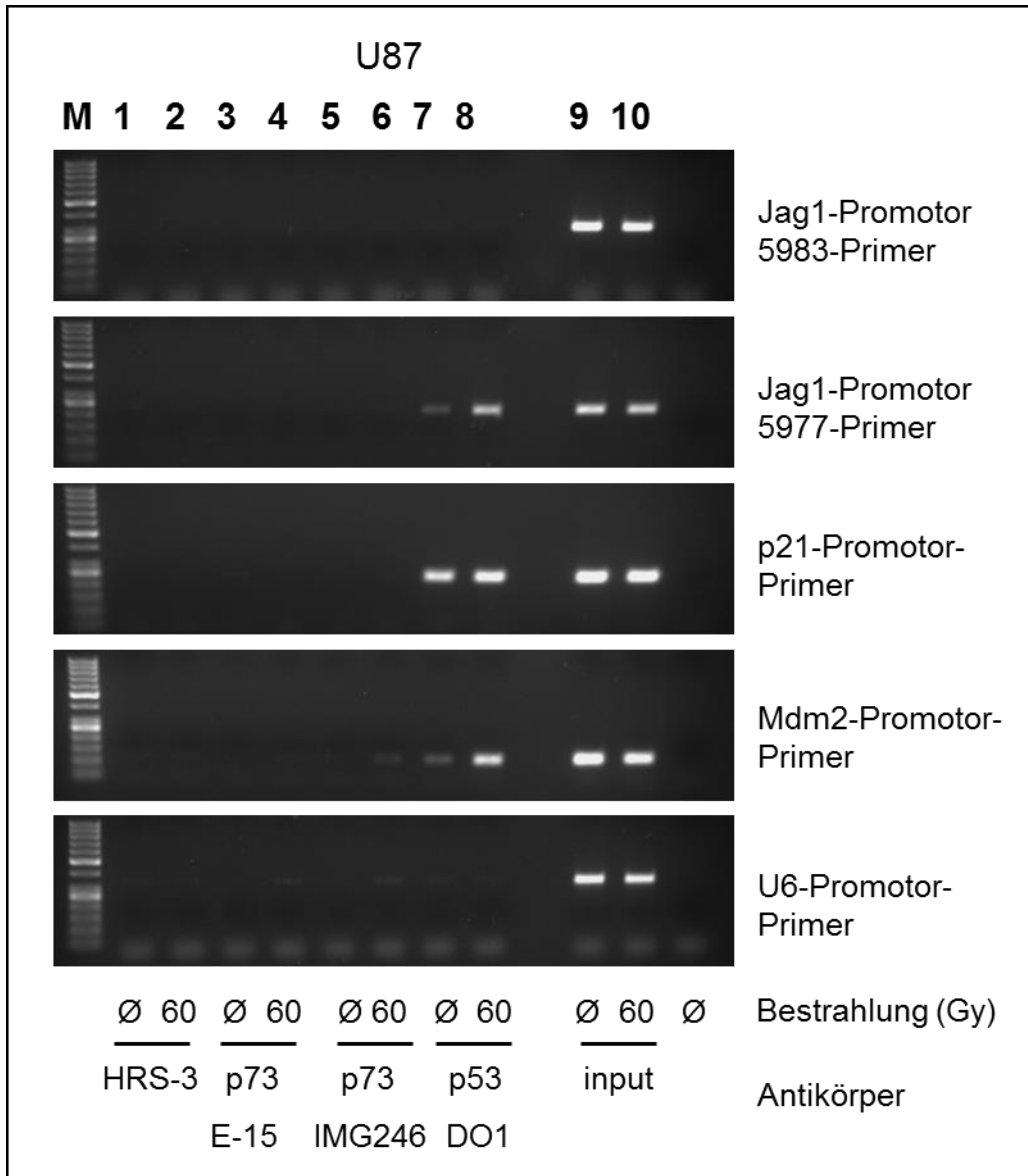


Abb. 17: Nachweis einer direkten Bindung von p53 an die Promotorregion von *Jagged1* durch Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) in U87 Glioblastomzellen. P53 bindet in vivo an die Jag1-Promotor-Sequenz (5977). Die Abbildung zeigt den ChIP Assay eines genomischen Fragments (Nukleotide 5499 bis 5749). Die Input-Kontrolle zeigt sonifiziertes Chromatin (gescheerte gesamt-DNA) vor der Immunpräzipitation (Bahnen 9 und 10). sowie mit verschiedenen AK gefällte Immunpräzipitate (Bahnen 1-8). Bahnen 1 und 2: HRS-3 (Kontrolle, präzipitiert das nicht-DNA-bindende Protein CD30); 3 und 4: p73 (E15); 5 und 6: p73 (IMG246); 7 und 8: p53 (DO-1). M=Marker.

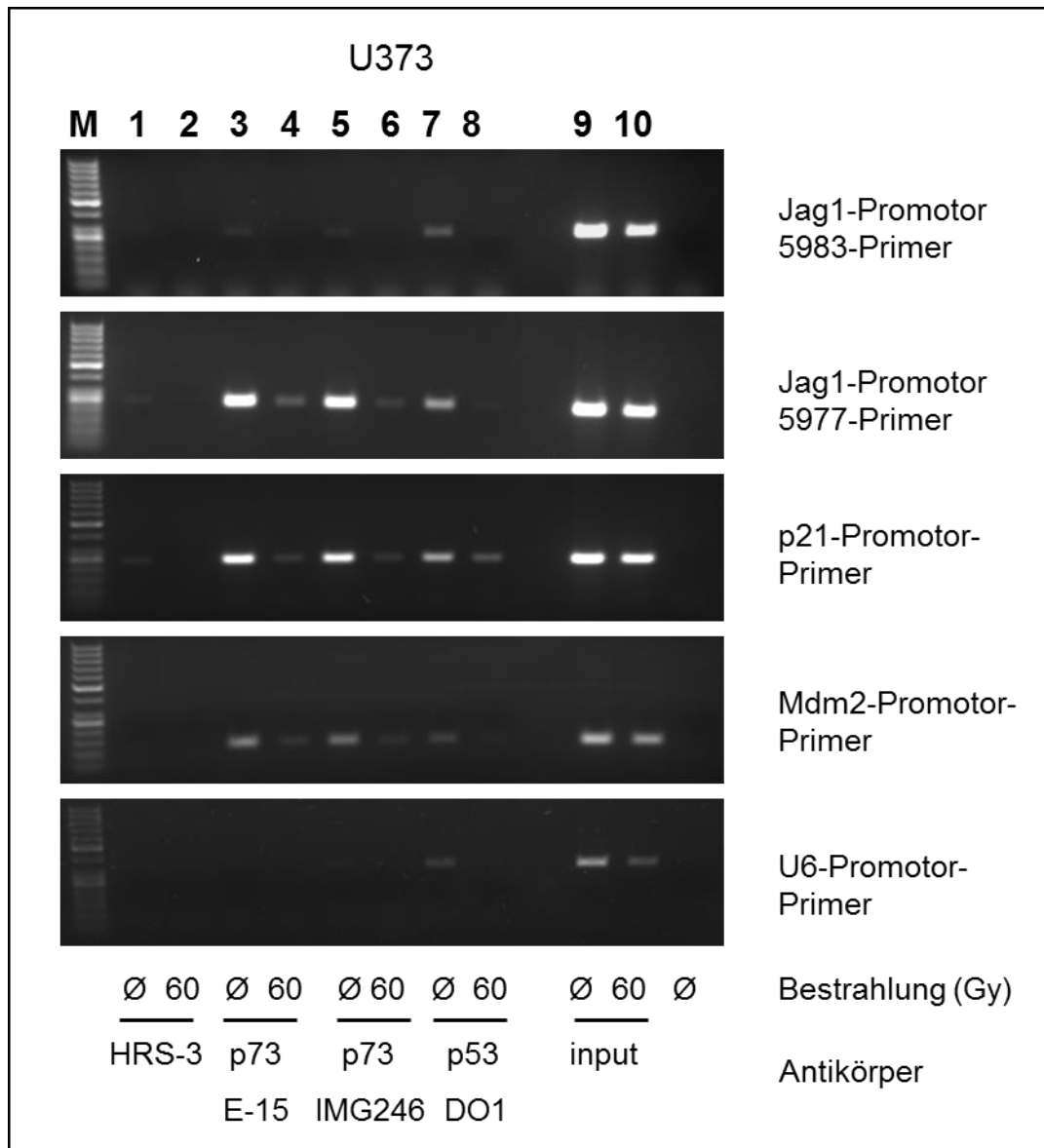


Abb. 18: Nachweis einer direkten Bindung von p73 an die Promotorregion von Jagged1 durch eine Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) in U373 Glioblastomzellen. Sowohl p73 (E-15 und IMG246) als auch p53 (DO1) binden *in vivo* an Jag1-Promotor-Sequenzen (deutlich an 5977, schwächer an 5983). Die Abbildung zeigt den ChIP Assay eines genomischen Fragments (Nukleotide 5499 bis 5749). Die Input-Kontrolle zeigt sonifiziertes Chromatin (gescheerte gesamt-DNA) vor der Immunpräzipitation (Bahnen 9 und 10) sowie mit verschiedenen AK gefällte Immunpräzipitate (Bahnen 1-8). Bahnen 1 und 2: HRS-3 (Kontrolle, präzipitiert das nicht-DNA-bindende Protein CD30); 3 und 4: p73 (E15); 5 und 6: p73 (IMG246); 7 und 8: p53 (DO-1). M=Marker.

Eine weitere bemerkenswerte Erkenntnis aus den ChIP-Assays an U373 Zellen war, dass die nach p73-Immunpräzipitation generierten PCR-Signale der *Jagged1*, *p21*- und *MDM2*-Promotorsequenzen aus bestrahlten im Vergleich zu scheinbestrahlten Kulturen abnahmen (im Gegensatz zu den Ergebnissen der p53-Immunpräzipitation in U87-Zellen), obwohl nach Bestrahlung die Expression dieser Gene zunahm. Dies lässt mehrere Interpretationen zu, die in der Diskussion der vorliegenden Arbeit besprochen werden. Insgesamt zeigten diese Untersuchungen also, dass p73, wenn es in Glioblastomzellen in nachweisbaren Mengen produziert wird, auch bereits in Abwesenheit von strahlungsinduziertem Stress an die relevante Region des *Jagged1* Gens gebunden sein kann. p53 kann ebenfalls an diese Region binden, seine Bindung allein reicht aber nicht zur Transaktivierung aus.

Als nächstes wollten wir untersuchen, ob die durch die strahlungsinduzierte Aktivierung von p73 verursachte Stimulation der *Jagged1* Expression in Glioblastomzellen einen Effekt auf deren Wachstumsverhalten/Malignität hat. Zu diesem Zweck sollte *Jagged1* in Glioblastomzellen stabil überexprimiert werden.

5.7 Stabile Transfektion von Glioblastomzelllinien mit *Jagged1*

Untersuchungen über die Rolle des Notch-Signalweges bei Krebserkrankungen sind oft durch methodische Schwierigkeiten limitiert. Beispielsweise sind Notch-defiziente knock-out Mäuse nicht lebensfähig, sie zeigen frühen embryonalen Zelltod. Um zu untersuchen ob die nach Bestrahlung beobachtete *Jagged1*-Überexpression den Malignitätsgrad der Glioblastomzelllinien veränderte, wurden die Zelllinien U87 und U373 stabil mit *Jagged1* „bulk-transfiziert“, d.h. es wurden keine Zellklone geerntet, die sich aufgrund der genetischen Heterogenität einzelner Zellen womöglich zu sehr unterschieden hätten, sondern es wurden alle stabil transfizierten Zellen „gepoolt“.

Die Überexpression von *Jagged1* konnte im Western Blot bestätigt werden (Abb. 19). Es wurde eine moderate Überproduktion von *Jagged1* erreicht, welche ebenso wie die *Jagged1* Überexpression nach Bestrahlung, keinerlei Einfluss auf die Expression von Notch4 (U87, U138, U373) oder p53 (U373) hatte. Interessant war allerdings, dass die Überexpression von *Jagged1* in U373 (Abb. 19) mit einer Induktion der Expression von p73 verbunden war (Abb. 20). Gemeinsam mit unserer Beobachtung, dass p73 *Jagged1*-Expression induzieren kann (Abb. 16, 18), deutet dies darauf hin,

dass beide über eine „positive feedforward“-Schleife miteinander verbunden sind: p73 aktiviert *Jagged1* und *Jagged1* führt wiederum zur Expression von p73.

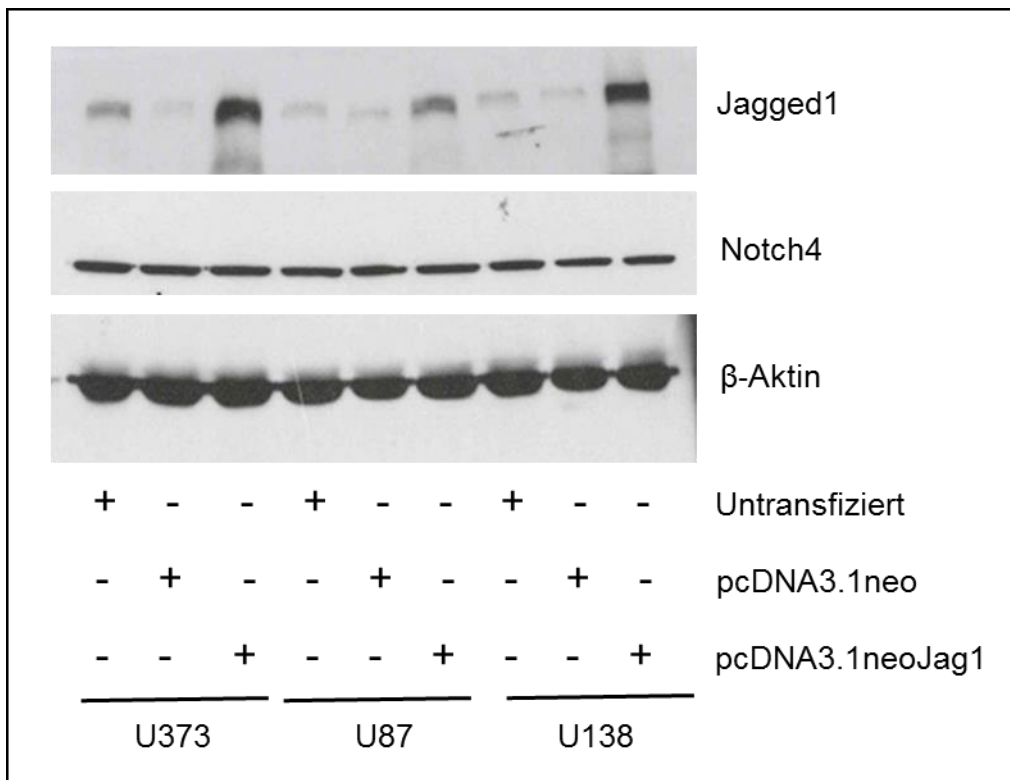


Abb. 19: Stabile Transfektion der humanen Glioblastomzelllinien U373, U87 und U138 mit Jagged1. U373 und U87 wurden scheinbehandelt oder mit einem Jagged1-Konstrukt stabil transfiziert, nach 24 h geerntet und mit Hilfe eines Western Blots aufgetrennt. Es wurden 15 µg Gesamtprotein aufgetragen. Die einzelnen Primärantikörper wurden wie folgt verdünnt: anti-Jagged1 (1:1000), anti-Notch4 (1:1000). Anti-β-Aktin (1:10000) wurde als Ladekontrolle eingesetzt.

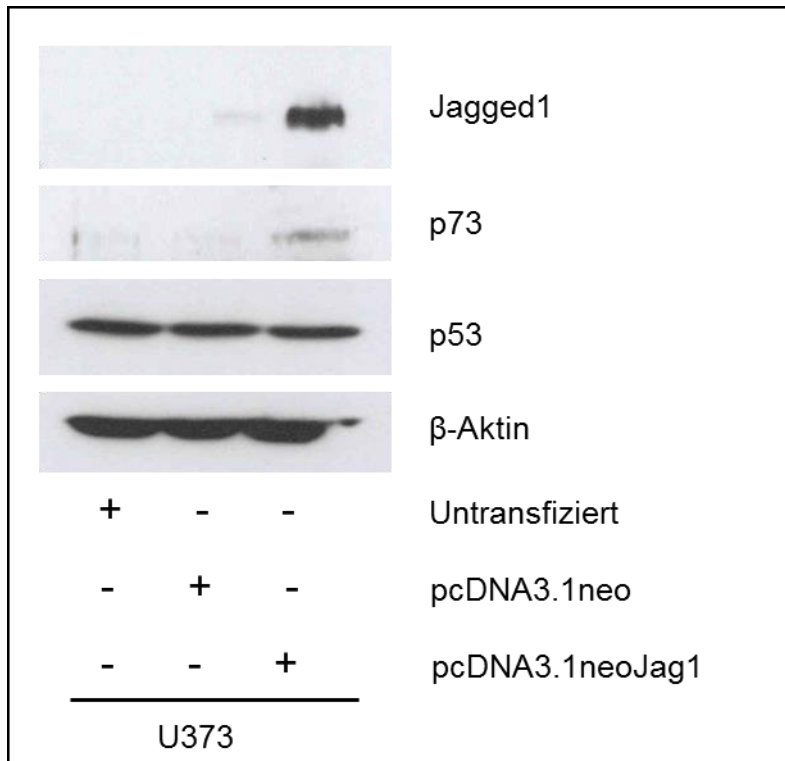


Abb. 20: Stabile Transfektion der humanen Glioblastomzelllinie U373 mit Jagged1 führt zu einem leichten Anstieg der p73-Proteinexpression. U373 wurden scheinbehandelt oder mit einem Jagged1 Konstrukt stabil transfiziert, nach 24h geerntet und mit Hilfe eines Western Blotes aufgetrennt. Es wurde 15µg Gesamtproteine aufgetragen. Die einzelnen Primärantikörper wurden wie folgt verdünnt: anti-Jagged1 (1:1000), anti-p73 (1:500), anti-Notch4 (1:1000). Anti-β-Aktin (1:10000) wurde als Ladekontrolle eingesetzt.

Glioblastome zeichnen sich durch ein stark invasives Wachstumsverhalten aus. Die stabil Jagged1-überexprimierenden U373 und U87 Zelllinien sollten deshalb als nächstes auf ein möglicherweise verändertes invasives Wachstumsverhalten *in vitro* getestet werden.

5.7.1 Agarose Spot Assay: Einfluss der Überexpression von Jagged1 auf die chemotaktisch bedingte Zellwanderung von Gliomzelllinien (U373 und U87)

Die durch Konzentrationsgradienten geeigneter Stoffe vermittelte, gezielte Fortbewegung (Vor.- bzw. Rückwärtsbewegung) von Zellen nennt man Chemotaxis. Chemotaxis ist eine der grundlegendsten physiologischen Zellreaktionen. Diese wichtige Eigenschaft spielt bei vielen biologischen Prozessen wie z.B. bei Wundheilung, bakteriellen Aggregationen, Tumorwachstum und Metastasierung eine wichtige Rolle. Chemotaktisches Verhalten ist eine der wesentlichen Eigenschaften von invasiv wachsenden Krebszellen.

Der Agarose Spot Assay ist eine leicht standardisierbare und recht einfache, aber effiziente Methode um die Migration von Zellen zu analysieren. Diese Methode wird aktuell bei unterschiedlichsten Fragestellungen erfolgreich eingesetzt, wobei ihr Repertoire von Untersuchungen zur Embryonalentwicklung bis zur Ätiologie von Krankheiten wie Krebs reicht.

Zunächst wurden die humanen, stabil mit Jagged1 transfizierten, sowie Kontroll-transfizierten Glioblastomzelllinien U373 und U87 unter den in Material und Methoden beschriebenen Bedingungen in Kultur gehalten. Die „low melting Agarose spots“ wurden wie in Abb. 4 gezeigt auf 10 cm Zellkulturschalen aufgetropft (Tropfenvolumen: 10 µl) und nach Aushärtung mit Zellsuspension überschichtet. Die Zellen wurden danach unter den in Material und Methoden beschriebenen Standardbedingungen weiterkultiviert. Nach 24 Stunden wurden die Zellkulturschalen mikroskopisch ausgewertet.

Es war deutlich zu erkennen, dass die Jagged1 transfizierten U373 Zellen verstärkt in die low-Melting Agarose Spots einwanderten (Abb. 21). Dieses Verhalten war jedoch sehr heterogen, was unter anderem daran liegen könnte, dass es sich bei den Zellen um „gepoolte“ Zellen aus stabil „bulk-transfizierten“ Kulturen handelte. Tumorzellen in Kultur sind erfahrungsgemäß heterogen.

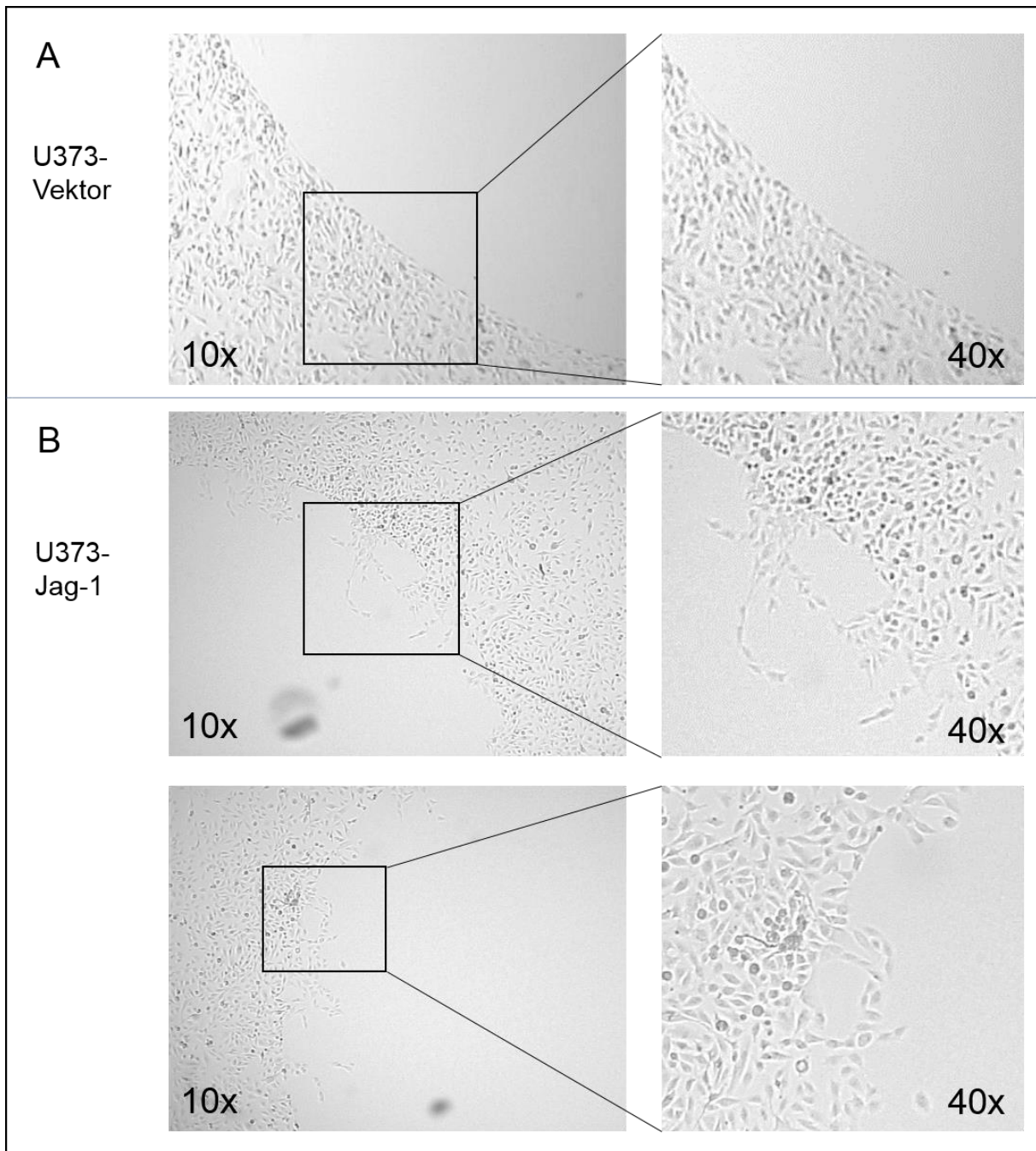


Abb. 21: Überexpression von Jagged1 steigert das Migrationsverhalten im Agarose-Spot-Assay. Mit low-melt Agarose-Spots (enthalten epidermal growth factor) präparierten Zellkulturschalen wurden 1×10^6 Glioblastomzellen in 10 ml Medium zugegeben, unter Standardbedingungen kultiviert und nach 24 h mikroskopisch ausgewertet. **A:** U373 Glioblastomzelllinie transfiziert mit einem Leervektor (Kontrolle). **B:** Stabil transfizierte U373 Glioblastomzelllinie die Jagged1 überexprimiert. Vergrößerung: 10 x und 40 x (Ausschnitt).

5.8 Zellkulturbedingungen beeinflussen die Expression von Jagged1 und von Mitgliedern der p53 Familie in Glioblastomzellen

Veränderungen der Zellkulturbedingungen und induzierter zellulärer Stress können die Expression von Komponenten der Notch- und p53-Signalwege, wichtige Regulatoren des „stress response“, beeinflussen.

Zunächst analysierten wir deshalb die Expression von Komponenten der Notch- und p53-Signalwege in Abhängigkeit von der Zelldichte von *in vitro* kultivierten Gliomzellen (U373, U87). Während sich in ca. 30% konfluenten Kulturen keine Expression von Jagged1, p73 oder Mdm2 nachweisen liess, waren alle drei Proteine bei 60 und 90% Konfluenz in U373 Gliomzellen gut detektierbar. Das p53 Protein war bei 30, 60 und 90% Konfluenz in U373 Gliomzellen in gleicher Intensität gut nachweisbar.

Desweiteren untersuchten wir den Effekt von sogenanntem konditioniertem Medium (frisches und „gebrauchtes“ zellfreies Medium im Verhältnis 1:1) auf die Expression von Komponenten der Notch- und p53-Signalwege in *in vitro* kultivierten Gliomzellen (U373, U87). Konditioniertes Medium enthält neben den zahlreichen Inhaltsstoffen des frischen Mediums eine Vielzahl von weiteren biologisch aktiven zellulären Metaboliten und Proteinen des „gebrauchten“ Medium, darunter zahlreiche von den Glioblastomzellen in das Medium sezernierte biologisch aktive Wachstumsfaktoren, inflammatorische Mediatoren und andere extrazelluläre Proteine. In U373 Gliomzellen zeigte sich eine höhere Expression von Jagged1, in mit konditioniertem Medium kultivierten Zellen. TAp73, Mdm2 oder p53 zeigte keine deutlichen Unterschiede.

In U87 Zellen fand sich kein Medium-abhängiger Effekt auf die Expression von Jagged1. Bei den ca. 30% konfluenten U87 Zellen zeigte sich eine stärkere p53 Expression verglichen mit U87 Zellen bei 60% und 90% Konfluenz. Je dichter der Zellrasen umso geringer die p53 Expression in den U87 Zellen (Abb.22).

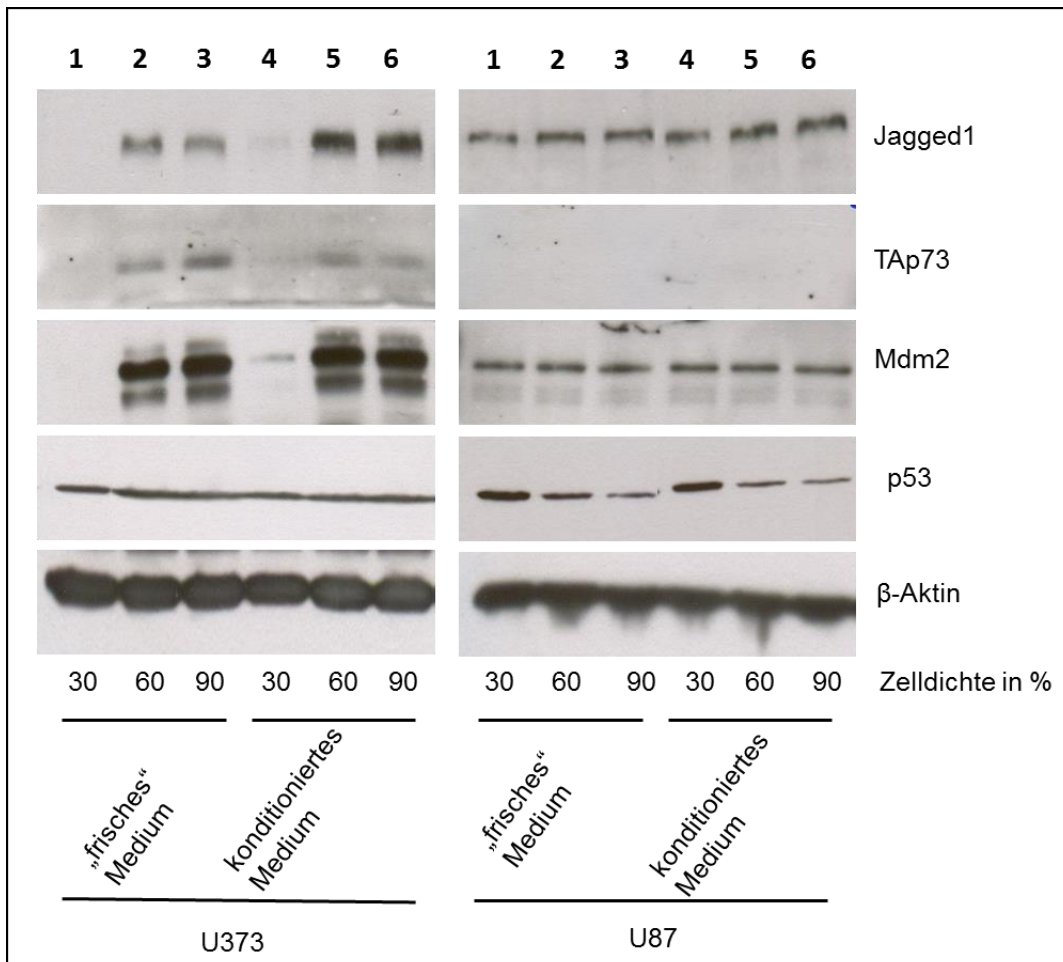


Abb. 22: Konditioniertes Medium aktiviert in U373-Zellen Jagged1 und p73. Bei diesem Versuch wurden zwei Glioblastomzelllinien (U373 und U87) mit unterschiedlichen Medien unter standardisierten Bedingungen kultiviert. Die Zellen wurden in drei unterschiedlichen Dichten ausgesät (30, 60 und 90% Konfluenz) und zwei unterschiedlichen Medien behandelt: (a) frisches physiologisches Medium und (b) konditioniertes Medium.

Gliomzellen zeigen also Zelldichte-abhängige sowie parakrine Effekte auf die Expression von Komponenten der Notch- und p53-Signalwege. Diese Effekte können die charakteristischen Veränderungen in der Expression von Komponenten der Notch- und p53-Signalwege in Gliomzellen durch ionisierende Strahlung (Abb.22) jedoch nicht vollständig erklären.

6 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, neue Erkenntnisse zur Relevanz des Notch-Signalwegs für Pathogenese, Wachstumsverhalten und Therapie des Glioblastoms zu gewinnen. Dabei sollte auch ein möglicher cross-talk zwischen Notch und p53 untersucht werden. Um ein besseres Verständnis der an diesem komplexen Netzwerk beteiligten molekularen Mechanismen zu erzielen, wurde zunächst die Expression von wichtigen Komponenten des Notch-Signalwegs in Glioblastomzellen *in vitro* charakterisiert.

6.1 Differentielle Expression von wichtigen Komponenten des Notch-Signalwegs in humanen Glioblastomzelllinien

Die molekularen Mechanismen, über die der Notch-Signalweg biologische Prozesse im adulten Gehirn reguliert und welche seiner Relevanz für Pathogenese, Wachstumsverhalten und Therapie des GBM (Purow 2012) zu Grunde liegen, sind noch nicht genau bekannt. Wirkung und Funktion von Notch hängen entscheidend von der Expression der beteiligten Rezeptoren und ihrer korrespondierenden Liganden ab. Der Notch-Signalweg wird im ausgereiften Gehirn während der gesamten Lebensspanne exprimiert (Dhanesh et al. 2016). Auch Notch1 und sein korrespondierender Ligand Jagged1 (Teodorczyk und Schmidt 2015), die für die vorliegende Arbeit von besonderer Relevanz sind, wurden in wichtigen ZNS-Strukturen lokalisiert. Notch1 und Notch2 können im menschlichen Gehirn in pyramidalen Neuronen des Cortex und im Hippocampus (Berezovska et al. 1998), Notch3 dagegen hauptsächlich in astroglialen Vorläuferzellen und dem Plexus Choroideus (Dang et al. 2006; Solecki et al. 2001) nachgewiesen werden. Im adulten Gehirn werden die Liganden Jagged1 und Jagged2 hauptsächlich im Vorderhirn (Monsalve et al. 2014), DLL1 und DLL3 dagegen im Cortex und im Cerebellum exprimiert (Monsalve et al. 2014). Wir charakterisierten die Expression von wichtigen Komponenten des Notch-Signalwegs (Notch-Rezeptoren 1,2,4; Notch-Liganden: Dll1,3,4, Jagged1,2) in humanen Glioblastomzelllinien (Tx3868, Tx3095, U373,

U118, U87), wobei wir eine differentielle Expression bestimmter Rezeptoren und Liganden nachwiesen. Notch-Rezeptoren1, 2 und 4 und der korrespondierende Ligand Jagged1 waren in allen untersuchten Zelllinien auf RNA-Ebene exprimiert. Dagegen wurden die anderen untersuchten Moleküle differentiell exprimiert, z.B. Notch3 nur in den Glioblastomzellen U373, U118, U87, nicht aber in den Zelllinien Tx3868 und Tx3095. Die einheitliche Expression der Notch Rezeptoren1, 2 und 4 und des korrespondierenden Liganden Jagged1 in allen untersuchten Zelllinien weist auf eine wichtige Funktion dieser Moleküle in Glioblastomzellen hin. Die differentielle RNA-Expression von Notch3, Jagged2, Dll1 und 4 hingegen könnte für deren Relevanz für Pathogenese, Wachstumsverhalten und Therapie bestimmter GBM Subtypen sprechen. Die differentielle Expression dieser Moleküle in den untersuchten Zelllinien korreliert nicht mit dem Status (Wildtyp oder mutiert) des Transkriptionsfaktors p53.

Die RNA-Expression der Notch-Rezeptoren und -Liganden korrelierte nur teilweise mit deren Expression auf Proteinebene. Während die RNA-Expression der Notch-Rezeptoren in allen untersuchten Zelllinien vergleichbar war, erwies sich deren Expression auf Proteinebene als variabel. Wir konnten eine starke Proteinexpression von Notch3 und Notch4 in den Glioblastomzelllinien U 87, U 373, TX 3095, und TX3868 zeigen. Dagegen wurden sowohl die aktive als auch die Volllänge-Form des Notch1 Rezeptors lediglich in zwei (U373, TX3095) der vier untersuchten Zelllinien nachgewiesen, wobei die aktive Form stärker exprimiert war. In einer Zelllinie (TX3868) war lediglich die aktive Form des Notch1 Rezeptors detektierbar; in der Gliomzelllinie U87 war keine Notch1 Expression darstellbar. Dies deutet darauf hin, dass die Expression der Notch-Rezeptoren in Glioblastomzellen eher auf Proteinebene als auf Transkriptionsebene reguliert wird, etwa durch Modulation der Translation oder Proteinstabilität. Interessanterweise wurden die auf Transkriptionsebene oft simultan exprimierten Liganden Jagged1 und Jagged2 in den von uns untersuchten GBM-Zelllinien auf Proteinebene nie simultan exprimiert. Jagged1-Protein wurde in drei (U 87, U 373, TX 3095) der vier untersuchten Zelllinien detektiert, aber nicht in TX3868 Zellen. Dagegen wurde Jagged2 ausschliesslich in Tx3868 Zellen exprimiert. In den Zelllinien Tx3095, U373 und U87 wurde keine Jagged2-Bande detektiert. Bemerkenswert war, dass die Proteinexpression von Jagged1 in U373 Zellen und von Jagged2 in TX 3868 Zellen um ein Vielfaches stärker war als die von Jagged1 in den Zelllinien U 87 und TX

3095. Die als Kontrolle eingesetzten HaCaT (Sethi et al. 2010) Zellen zeigten eine starke Expression sowohl von Jagged1 als auch von Jagged2 was darauf hinweist, dass eine Koexpression der beiden Liganden auf Proteinebene nicht grundsätzlich ausgeschlossen ist.

Gegenwärtig erlauben unsere Resultate noch keine endgültigen Schlussfolgerungen zu einer möglichen Korrelation der differentiellen Expression dieser Moleküle mit dem Malignitätsgrad von Gliomen, da uns dieser nur von den zwei Primärtumoren der Zelllinien U87 und U118 (jeweils WHO Grad IV) bekannt ist. Auch war die Analyse des Notch-Signalwegs mittels Western blot, FACS oder Immunzytologie nur eingeschränkt möglich, da nicht für alle Komponenten geeignete Antikörper zur Verfügung standen.

Unsere Ergebnisse befinden sich jedoch im Einklang mit der Hypothese, dass die Expression von Notch-Rezeptoren und deren korrespondierenden Liganden einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten von Glioblastomzellen hat und unterstützen das Konzept vom Notch-Signalweg als einer potentiellen Zielstruktur bei der Entwicklung neuer Medikamente zur Prävention oder Therapie des Glioblastoms.

Wie ordnen sich diese Resultate in den Kanon der bisherigen Erkenntnisse in der Literatur ein? Es fanden sich wesentliche Übereinstimmungen teilweise aber auch Widersprüche. Sicherlich sind unsere in Zelllinien erzielten Resultate nur eingeschränkt mit Ergebnissen aus Primärkulturen oder Biopsaten vergleichbar, auch weil gegen unterschiedliche Epitope gerichtete Primärantikörper eingesetzt wurden. Mehrere Studien (Dell'albani et al. 2014; Purow et al. 2005) analysierten die Expression der Notch-Rezeptoren in Gliomzelllinien, in Biopsien aus humanen Gliomen unterschiedlichen WHO Grades und in humanen primären Zellkulturen, die aus Gliomen unterschiedlichen WHO Grades gewonnen wurden. Eine Untersuchung korrelierte die Expression der Notch-Rezeptoren in Gliomzelllinien mit der Expression von Differenzierungsmarkern wie Vimentin und glial fibrillary acidic protein (GFAP) (Dell'albani et al. 2014). Zelllinien mit starker GFAP-Expression (u.a. C6 und U373) exprimierten ebenfalls stark Notch1. Dagegen zeigten Zelllinien mit geringer Proteinexpression von GFAP (u.a. 9L und U87), auch eine niedrige Expression des Notch1 Proteins. Eine hohe Expression von Vimentin war in der Regel (z.B. in der Zelllinie U373) mit einer starken Expression von Notch2 und von Notch4 assoziiert. Eine niedrige/moderate Notch1 Expression fand sich sowohl in primären Zellkulturen

aus Biopsien von niedrig-malignen (WHO Grad II Astrozytomen) als auch von hoch-malignen Gliomen. Dagegen zeigte sich in primären Zellkulturen aus Biopsien von niedrig-malignen (WHO Grad II Astrozytomen) eine niedrige und in primären Zellkulturen von hoch-malignen Gliomen eine starke Notch4 Expression (Dell'albani et al. 2014). Das Überführen von mit 10% FCS kultivierten Zellen in Serum-freie Bedingungen (plus Wachstumsfaktoren) bewirkte keine Veränderung der Expression von Notch1, aber einen deutlichen Rückgang der Expression von Notch4 (Dell'albani et al. 2014). Die immunhistochemische Untersuchung von Biopsien aus Grad IV Gliomen zeigte eine geringere Anzahl von Notch1-positiven verglichen mit Notch4-positiven Tumoren (Dell'albani et al. 2014). Auch war die Intensität der Immunreaktivität schwächer in Notch1-positiven verglichen mit Notch4-positiven Tumoren (Dell'albani et al. 2014).

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sprechen somit dafür, dass bei Gliomen eine starke Expression von Notch1 mit einem hohen Differenzierungs- und niedrigen Malignitätsgrad, eine starke Expression von Notch4 dagegen mit einem niedrigen Differenzierungs- und hohen Malignitätsgrad assoziiert ist (Dell'albani et al. 2014). Purow *et al.* berichteten in einer ähnlichen Studie über die stärkere Expression von Notch1 in Gliomen relativ niedrigen Malignitätsgrads (WHO Grad II und III) vgl. mit den aggressiveren Glioblastomen (Purow et al. 2005). Andere Untersuchungsergebnisse sprechen auch für eine Bedeutung von Notch1 als unabhängiger prognostischer Faktor bei Gliomen. In mehreren Publikationen wurde gezeigt, dass nukleäre Notch1-Immunreaktivität bei hoch-malignen Gliomen mit einer besseren Prognose korreliert, bzw. dass die starke Expression von Notch1 mit einem niedrigen Malignitätsgrad assoziiert ist (Dell'albani et al. 2014; Purow et al. 2005). Interessanterweise konnten funktionelle Studien sowohl nach Unterdrückung („knock down“) der Expression von Notch1 als auch nach Notch2-Überexpression ein vermindertes Zellwachstum und die Induktion von Apoptose zeigen (Xu et al. 2013). In einer Untersuchung (Dell'albani et al. 2014) zeigte sich in Gliomen mit hohem Malignitätsgrad keine Notch2-Expression. Dagegen fand sich in einer Studie in Biopsaten von Gliom-Patienten mit relativ günstiger Prognose eine geringe Notch2-Expression (Boulay et al. 2007).

Die publizierten Resultate anderer Arbeitsgruppen sprechen somit dafür, dass eine starke Proteinexpression von Notch1 und eine geringe von Notch4 bei Gliomen mit einem hohen Differenzierungs- und niedrigen Malignitätsgrad assoziiert sind

(Stockhausen et al. 2012). Sie sind somit gut mit den oben skizzierten Ergebnissen unserer Arbeit zur Notch1-Expression und mit unserem Nachweis einer stärkeren Notch4-Proteinexpression in U87 Zellen (aus einem Primärtumor mit niedrigem Differenzierungsgrad, WHO Grad 4) vereinbar.

Neben der in diesem Abschnitt diskutierten Relevanz für Malignitätsgrad und Prognose sprechen Untersuchungsergebnisse auch für eine Bedeutung von Notch für die Karzinogenese von Gliomen (Stockhausen et al. 2012). Es wurde berichtet, dass die aktiven Formen von Notch1, Notch2 und Notch3 mit unterschiedlicher Effizienz in der Lage sind, gliale Tumore zu induzieren (Pierfelice et al. 2011). Gliale Vorläuferzellen in N. opticus und Retina waren besonders empfänglich für eine Notch1-getriebene Tumortransformation (Pierfelice et al. 2011). Dagegen begünstigte die Überexpression von Notch1, 2, oder 3 in glialen Vorläuferzellen des Gehirns die maligne Transformation nicht. Der Einfluss von Notch4 auf die Pathogenese von Gliomen ist bislang noch unbekannt.

6.2 Wechselwirkungen zwischen Notch-Signalweg und anderen Signalwegen bei Gliomen

Die genauen molekularen Mechanismen, über welche die in dieser Arbeit gezeigte differentielle Expression von wichtigen Komponenten des Notch-Signalwegs Pathogenese, Wachstumsverhalten und Therapie des GBM beeinflussen könnte, sind bislang noch weitgehend unbekannt. Bestimmte, Notch nachgeschaltete Signalwege, an denen u.a. Hes1, EGFR, RAS/MEK/ERK- und G13-K/AKT beteiligt sind, sind aktuell von besonderem Interesse. Die wenigen bislang publizierten Untersuchungsergebnisse sprechen beim GBM allerdings nicht für eine Regulation der Hes1-Expression durch Notch-Rezeptoren oder für eine Funktion von Hes1 als Marker für die Differenzierung von Gliomen. So wird Hes1 beim GBM unterschiedlich stark und ohne Korrelation mit der Expression von Notch1 oder Notch4 exprimiert (Narayanappa et al. 2016). Primäre GBM-Kulturen zeigen auch unter unterschiedlichen Wachstumsbedingungen (Monolayer oder Sphäroide) eine konstitutive, weitestgehend konstante, Expression von Hes1 (Stockhausen et al. 2012).

Bei verschiedenen Tumorerkrankungen wurde ein cross-talk zwischen EGFR- und Notch-Signalwegen gezeigt (Fitzgerald et al. 2000; Kolev et al. 2008; Miyamoto et al. 2003; Stockhausen et al. 2005; Weijzen et al. 2002; Zeng et al. 2005). Vom Notch-Signalweg wird angenommen, dass er das Überleben und die Proliferation von neuronalen Stammzellen (NSC) über die Interaktion mit Signalwegen, die dem EGFR nachgeschaltet sind, reguliert (Androutsellis-Theotokis et al. 2006). Zwei der wichtigsten, dem EGFR nachgeschaltete Signalwege sind die RAS/MEK/ERK- und G13-K/AKT-Signalwege, die an zellulären Prozessen wie Proliferation, Migration und Apoptose-Resistenz beteiligt sind. Der Notch-Signalweg hält humane, RAS-transformierte Astrozyten, die eine hochregulierte Notch1-Expression zeigen, in einem undifferenzierten, proliferierenden Zustand (Kanamori et al. 2007). Hemmung des Notch-Signalwegs führt in diesen Zellen zur Abnahme von Proliferation und zur Zunahme der Differenzierung. Konstitutive Aktivierung von Notch1 alleine ist aber nicht in der Lage, immortalisierte Astrozyten zu transformieren oder die Tumorigenität von RAS-transformierten Astrozyten zu verstärken (Kanamori et al. 2007). Diese Zusammenhänge sprechen dafür, dass Notch1, in Synergie mit RAS, eine Rolle bei der malignen Transformation von Gliazellen spielt.

Unabhängig von der Notch-RAS-Interaktion reguliert Notch in Gliomen auch die Phosphorylierung und somit Aktivierung von AKT (Xu et al. 2010; Gao et al. 2007; Zhao et al. 2010). Konstitutiv aktiviertes Notch1 führt zur Phosphorylierung von AKT und erhöht das Wachstum von Gliomen *in vitro*, wohingegen die Hemmung von Notch1 zu einer Unterdrückung der AKT-Aktivierung und zu einer verminderten Viabilität von Gliomen in *in vitro* und *in vivo* führt (Xu et al. 2010; Gao et al. 2007; Zhao et al. 2010). Somit kann der Notch-Signalweg in Gliomen sowohl mit dem RAS/MEK/ERK- als auch mit dem P13/kAKT-Signalweg in Verbindung gebracht werden.

In Tumoren mit EGFR-Amplifikation oder Mutation ist der Notch-Signalweg aktiviert. Dies kann insbesondere auf Protein-Ebene nachgewiesen werden, was ebenso wie unsere Resultate für die Bedeutung von posttranskriptionalen Mechanismen spricht. Tatsächlich induzieren RAS und AKT in einem Glioma-Maus-Model Notch1 mRNA und Protein (Rajasckhar et al. 2003). Während Notch- und EGFR-Expression in Gliomen mit Amplifikation im EGFR-Gen auf Proteinebene korreliert, korreliert in Gliomen ohne EGFR-Amplifikation die Expression der Notch1- und der EGFR-mRNA (Purow et al. 2008). Hemmung von Notch1 reduziert in Gliomzelllinien EGFR-mRNA

und -Protein (Purow et al. 2008; Seidel et al. 2010). Induktion der Expression von Notch1 führt zu einer p53-abhängigen Hochregulation der EGFR-Expression (Purow et al. 2008; Seidel et al. 2010). Diese Untersuchungsergebnisse sprechen dafür, dass sich die EGFR-Expression in Gliomen mit intaktem p53-Protein und ohne EGFR-Amplifikation unter der transkriptionalen Kontrolle des Notch-Signalwegs befindet (Stockhausen et al. 2012). Dagegen sind Komponenten des Notch-Signalwegs in Tumoren mit EGFR-Amplifikation auf Proteinebene hochreguliert, möglicherweise durch die erhöhte Aktivität der dem EGFR nachgeschalteten Signalwege RAS/MEK/ERK und P13/K/AKT (Kiec-Wilk et al. 2010; Stockhausen et al. 2012). Diese Zusammenhänge sprechen für die Bedeutung des „cross-talk“ zwischen Notch- und EGFR-Signalwegen für das Wachstumsverhalten des GBM, allerdings sind zur endgültigen Klärung weitere Untersuchungen erforderlich.

6.3 Einfluss von Strahlen- oder Chemotherapie auf die Expression wichtiger Moleküle der Notch- und p53-Signalwege in GBM-Zelllinien

Die Hochdosis-Strahlentherapie ist eine Standardtherapie zur Behandlung des Glioblastoms (Corso und Bindra 2016). Allerdings sind Glioblastome häufig strahlenresistent und Rezidive treten in der Regel wenige Monate nach Ersttherapie auf (Corso und Bindra 2016). Wie die Behandlung mit ionisierender Strahlung induzieren auch andere aktuell zur Behandlung des Glioblastoms eingesetzte Therapieprinzipien wie die Behandlung mit bestimmten Zytostatika (u.a. Doxorubicin) DNA-Doppelstrangbrüche, die schwerwiegende biologische Folgen für die Zelle nach sich ziehen (Christmann et al. 2003; Olive et al. 1998). Wenn bei DNA-Doppelstrangbrüchen die Reparatursysteme der Zelle nicht ausreichen kann der Schaden nicht mehr behoben werden. Dann werden Mechanismen in Gang gesetzt, die dauerhaften Zellzyklus-Arrest, Apoptose, Seneszenz oder mitotischen Zelltod induzieren können (Olive 1998). Sie aktivieren Caspasen, diese haben eine große Bedeutung für Resistenz und Sensitivität gegenüber Apoptose nach Behandlung mit Zytostatika wie Doxorubicin oder mit ionisierender Strahlung (Christmann et al. 2003; Friesen et al. 1999; Christmann et al. 2003). Als wichtiger Regulator der zellulären Antwort nach DNA-Schädigung ist neben p53 (Müller et al. 2006; Pei et al. 2015) auch der Notch-Signalweg entscheidend an der Steuerung von Prozessen beteiligt,

die das weitere Schicksal von mit ionisierender Strahlung oder mit Zytostatika behandelten Zellpopulationen bestimmen (Shen et al. 2015; Wang et al. 2010; Yahyanejad et al. 2016).

Richtungsweisende Forschungsergebnisse der letzten Jahre sprechen für eine Interaktion der Notch- und p53-Signalwege (Dotto 2009; Simón et al. 2014; Niklison-Chirou et al. 2016). Die funktionelle Signifikanz dieses cross-talks wurde unter anderem für die Aufrechterhaltung von Stammzeleigenschaften nachgewiesen (Tao et al. 2011). So konnte gezeigt werden, dass das komplexe Zusammenspiel zwischen Notch und p53 für die Balance zwischen der Selbsterneuerung des Stammzell-Pools von epidermalen Keratinozyten und deren Differenzierung von Bedeutung ist (Nguyen et al. 2006). Die Interaktion der Notch- und p53-Signalwege ist auch für Pathogenese und Progression von Tumorerkrankungen von Bedeutung. Der Tumorsuppressor p53 ist eines der „Master“-Proteine, die im Zuge der Tumorentwicklung besonders häufig in ihrer Funktionalität beeinträchtigt sind (Dudgeon et al. 2006; Hainaut und Hollstein 2000; Muller et al. 2011). Die p53-Familie beinhaltet mit p63 und p73 weitere Transkriptionsfaktoren die ebenfalls an der „Stressantwort“ von Zellen beteiligt sind, darunter die Regulation von Zellwachstum und Zelltod nach DNA-Schädigung (Napoli 2017; Ferraiuolo et al. 2016; Orzol et al. 2015; Suliman et al. 2001; Venkatanarayan et al. 2016). Bislang war nur wenig über den Einfluss von Strahlen- oder Chemotherapie auf die Expression wichtiger Moleküle der Notch- und p53/p63/p73-Signalwege beim GBM bekannt. Wir stellten uns daher zunächst die Frage, inwieweit Veränderungen in der Expression und Funktion von Komponenten des Notch-Systems mit der Entwicklung von strahlenresistenten Glioblastomzellen assoziiert sind. Die Detektion solcher Veränderungen könnte therapeutische Perspektiven zur Überwindung der Strahlenresistenz aufzeigen (Yahyanejad et al. 2016). Für diese Untersuchungen wählten wir zwei Zelllinien aus, die neben der Expression von Notch-3, Notch4 und Jagged1 entweder eine funktionell inaktivierende Mutation im p53-Gen (U373) oder den p53-Wildtyp (U87) exprimieren. Wie erwartet führte die Behandlung mit hohen Dosen ionisierender Strahlung (30-120 Gy) zu einer Zeit- und Dosis-abhängigen Verringerung der Population an vitalen U373 und U87 Zellen. Mit ansteigender Strahlendosis fanden sich zunehmend weniger überlebende Zellen. Bereits nach einem Tag kam es zu einer deutlichen Verringerung der Population von U373- und U87-Zellen. Dieser Effekt war nach 4 Tagen am stärksten und nicht vom Status des

p53-Proteins abhängig. Überlebende Zellen zeigten charakteristische morphologische Veränderungen, darunter das vermehrte Auftreten von Dendriten-ähnlichen Ausläufern.

Bei den Zelllinien U373, U87 und TX3868 führte die einmalige Behandlung mit ionisierender Strahlung nach 96 h zu einer vermehrten Proteinexpression des Notch-Liganden Jagged1. Die Stimulation der Expression von *Jagged1* nach Bestrahlung konnte auch in der semi-quantitativen RT-PCR nachgewiesen werden. Sie war in U373 Zellen deutlich ausgeprägter als in U87 Zellen. Dagegen zeigte die Proteinexpression von Notch4 nach Behandlung mit ionisierender Strahlung keine Dosis-abhängige Veränderung. Notch4 wurde konstant und stark exprimiert. Insgesamt zeigten diese Untersuchungen, dass ionisierende, hochdosierte Strahlung zur Selektion einer Population von Glioblastomzellen führt, die u.a. durch charakteristische Veränderungen in der Expression von Komponenten des Notch-Signalwegs charakterisiert ist. Dabei kommt es insbesondere zu einer vermehrten Expression von Jagged1 auf Protein- und RNA-Ebene. Bislang ist nur wenig über die molekularen Mechanismen, welche die Expression der Notch-Liganden regulieren bekannt. Diese Frage wurde deshalb in weiteren Versuchen untersucht.

Ein wesentliches Ziel bestand darin, neue Einblicke in den möglichen cross-talk von p53- und Notch-Signalwegen beim Glioblastom zu erlangen. Daher untersuchten wir als nächstes inwieweit die durch ionisierende Strahlung oder Doxorubicin induzierten Veränderungen in der Expression von Jagged1 mit Veränderungen in der Expression von Mitgliedern der p53-Familie assoziiert sind. Interessanterweise induzierte die Behandlung mit Doxorubicin in U87 Zellen die Expression von p53, Jagged1, sowie die p53-Zielgene Mdm2 und p21. Ionisierende Strahlung führte Zeit- und Dosis-abhängig zu einem starken Anstieg der Expression von Jagged1 (auf mRNA und Protein-Ebene) in allen untersuchten Zelllinien, wobei die stärksten Effekte 48 Stunden nach Behandlung mit 60 Gy beobachtet wurden. Eine Protein-Expression von Jagged2 konnte weder vor noch nach Behandlung mit ionisierender Strahlung in den untersuchten GBM-Zellen (U87, U373) beobachtet werden. Zusammengefasst sprechen diese Untersuchungsergebnisse dafür, dass die Behandlung mit ionisierender Strahlung die Expression von Jagged1 moduliert, und dass dieser Effekt nicht vom p53-Status der GBM-Zellen abhängt. Gab es vielleicht einen Zusammenhang mit anderen Mitgliedern der p53-Familie?

Als nächstes untersuchten wir deshalb, ob der starke Anstieg der Expression von Jagged1 (mRNA und Protein) nach ionisierender Bestrahlung mit Veränderungen der Protein-Expression von Notch4 und/oder p73 assoziiert ist. Im Western Blot konnten wir eine starke Bande für Notch4 sowohl in unbehandelten als auch in bestrahlten Zellen nachweisen. Dieses Resultat fand sich sowohl in U373 Zellen, die eine Missense-Mutation im p53-Gen tragen (p53mut), als auch in U87 Zellen, deren p53-Status als wildtyp charakterisiert wurde (p53wt). Unsere Ergebnisse sprechen somit dafür, dass die Expression des Notch4 Proteins in Glioblastomzelllinien durch ionisierende Strahlung nicht moduliert wird und auch nicht mit der Expression von p53 oder Jagged1 korreliert.

Interessanterweise fanden wir jedoch in zwei (U373, Tx3868) von drei untersuchten GBM-Zelllinien, dass der Anstieg der Expression von Jagged1 nach ionisierender Bestrahlung (30 Gy oder 60 Gy) Dosis-abhängig mit einem starken Anstieg der Protein-Expression von p73 assoziiert war. Dagegen zeigte eine dritte untersuchte Zelllinie (U87), deren p53 Status als wildtyp charakterisiert wurde, 96 h nach Bestrahlung einen starken Anstieg der Expression von Jagged1, ohne dass das p73 Protein nachgewiesen werden konnte. Dies indiziert, dass die durch ionisierende Strahlung induzierte Hochregulation des p73 Proteins in GBM-Zelllinien von deren p53 Status abhängt und dass p73 in GBM-Zellen für mutiertes p53 kompensieren kann. Im Gegensatz zu Mutationen in anderen Tumorsuppressorgenen können Mutationen im p53 Gen nicht nur zu einem Funktionsverlust („loss of function“), sondern auch zu einem Zugewinn neuer Fähigkeiten („gain of function“) führen (Ferraiuolo M. et al. 2016; Rangel LP et al. 2014). Zu einem solchen „gain of function“ kann es auch durch Protein-Protein-Interaktionen zwischen mutiertem p53 (mutp53) und p73 kommen (Di Como et al. 1999; Deyoung und Ellisen 2007; Gaiddon et al. 2001; Stindt et al. 2015). Nach der Bindung an mutp53 können die Isoformen von p73 ihre Aufgaben, darunter auch die Kompensation des Verlusts der Tumorsuppressorfunktion von p53, nicht mehr erfüllen.

Da wir unter Bestrahlung entweder p53- oder p73-Aktivierung beobachteten, untersuchten wir, ob der starke Anstieg der Expression von Jagged1 (mRNA und Protein) nach ionisierender Bestrahlung vielleicht auf diese Transkriptionsfaktoren zurückgeht. Wir hatten ja in zwei (U373, U87) von drei untersuchten GBM-Zelllinien einen starken Anstieg der Expression von p53 nach ionisierender Bestrahlung (30 Gy oder 60 Gy) gefunden. Allerdings war der Anstieg der Expression von p53 deutlich

stärker in den GBM-Zellen, die eine inaktivierende Missense Mutation von p53 tragen (U373) verglichen mit der Zelllinie (U87), deren p53-Status als wildtyp charakterisiert wurde. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen auf Proteinebene induzierte die Behandlung mit ionisierender Strahlung (30 Gy) die mRNA Expression von p73 in U373, aber nicht in U87 Zellen. Diese Ergebnisse unterstützen somit ebenfalls die Hypothese, dass p73 in GBM-Zellen, die eine p53-inaktivierende Missense-Mutation tragen, möglicherweise induziert wird, um Funktionen eines möglicherweise inaktiven *p53*-Gens zu ersetzen. Zusammengenommen sind unsere Ergebnisse deshalb mit der Hypothese vereinbar, dass die Expression des *Jagged1*-Gens in den nach Hochdosis-Bestrahlung überlebenden U373-Glioblastomzellen, direkt oder indirekt, unter der Kontrolle von p73 steht. Die Induktion der Expression von *Jagged1* war somit vereinbar mit der Vorstellung dass:

1. *Jagged1* ein direktes Zielgen von p53 ist.
2. *Jagged1* ein direktes Zielgen von p73 ist.
3. *Jagged1* ein indirektes Zielgen eines Mitglieds der p53-Familie ist (die p53-Familie stimuliert einen anderen, bislang unbekanntem Transkriptionsfaktor, der *Jagged1* reguliert).
4. Die Expression von *Jagged1* unabhängig von der p53-Familie reguliert wird.

Mit den folgenden Experimenten wollten wir überprüfen, welche dieser Hypothesen zutrifft.

Wie nach DNA-Schädigung durch Doxorubicin beobachteten wir nach Behandlung mit ionisierender Strahlung in GBM-Zelllinien eine Zeit- und Dosis-abhängige Veränderung in der Expression wichtiger Komponenten der p53-Familie. Nach Bestrahlung mit 30 und 60 Gy zeigte sich in den Glioblastomzelllinien U373 und Tx3868 eine starke Induktion des Transkriptionsfaktors p73. Wir untersuchten deshalb als nächstes mit zwei unterschiedlichen Methoden, ob *Jagged1* ein direktes Zielgen von p73 ist, dem siRNA-vermittelten knockdown von *p73*, und dem Nachweis der direkten Bindung von p73 an den *Jagged1*-Promotor durch Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP).

6.4 Hemmung der durch ionisierende Strahlung induzierten Expression von p73 und von Jagged1 nach p73 knockdown

Die transiente Transfektion von GBM-Zellen mit gegen p73 gerichteten siRNAs verringerte die p73-Expression deutlich. Interessanterweise hemmte der knockdown von p73 auch den Anstieg der Expression von Jagged1 nach ionisierender Bestrahlung (30 Gy oder 60 Gy) sowohl in U373 als auch in U87 Zellen. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Strahlungs-induzierte Expression von Jagged1 p73-abhängig ist. Im Einklang mit diesem Resultat führte die Transfektion mit p73siRNA2, welche die Expression von p73 weniger effektiv verringerte, auch zu einer weniger starken Reduktion des Jagged1-Levels. Andere Arbeitsgruppen hatten an anderen Systemen gezeigt, die Expression von Jagged1 und Jagged2 durch p73 und p63, aber nicht durch p53, reguliert wird.

6.5 Nachweis der direkten Bindung von p73 an den Jagged1-Promotor durch Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Um zu untersuchen ob das p73 Protein in der Lage ist, *in vivo* an die Promotorregion des *Jagged1*-Gens zu binden, etablierten wir einen ChIP-Assay. Der ChIP-Assay nutzt die Eigenschaft von Antikörpern, DNA-bindende Proteine gemeinsam mit der assoziierten genomischen DNA mittels Immunpräzipitation zu isolieren. Für unsere ChIP-Assay-Experimente wählten wir die Zelllinien U87 und U373, da beide nach Behandlung mit ionisierender Strahlung eine starke Induktion der Expression von Jagged1 zeigen, aber einen unterschiedlichen p53-Status aufweisen. Aus Formalin-fixierten („cross-linked“) Zellextrakten isolierten wir DNA/Protein-Komplexe unter Verwendung von einem gegen p53 und von zwei gegen p73 gerichteten Antikörpern. Wir untersuchten die Immunpräzipitate mittels PCR dann auf die Anwesenheit bestimmter Promotorsequenzen. Für die hier vorgenommenen Analysen wurden zwei spezifische Primerpaare für p53-bindende Promoterregionen aus den *p21*- und *MDM2*-Genen sowie ein spezifisches Paar für eine Region aus dem *Jagged1*-Gen verwendet, welche eine putative p73-Bindestelle enthält. Primer für den *U6*-Genpromoter, der weder von p53 noch von p73 gebunden wird, dienten als negative Kontrolle. Es zeigte sich, dass mit dem irrelevanten Antikörper HRS-3, der das nicht-DNA-bindende Protein CD30 präzipitiert, weder p53- noch p73-bindende

Promotorsequenzen ko-präzipitiert werden konnten. Dies implizierte, dass die Waschschriffe während der ChIP Prozedur effektiv und die zu untersuchenden DNA-Sequenzen nicht unspezifisch mitgefällt worden waren.

In U87 Zellen konnte mit den beiden p73-Antikörpern unter allen Untersuchungsbedingungen kein detektierbares ChIP-Signal erzeugt werden. Dieses Resultat kam nicht unerwartet, da in unseren vorangegangenen Untersuchungen bereits gezeigt werden konnte, dass p73 in dieser Zelllinie nur in sehr geringen Mengen exprimiert wird. Es unterstreicht noch einmal, dass das ChIP-Verfahren in unseren Händen effektiv war und keine falsch-positiven Signale erzeugte. Hingegen erzeugte die Fällung mit dem p53-Antikörper DO-1 in U87 Zellen, welche nachweisbare Level an Wildtyp-p53 exprimieren, wie erwartet ChIP-Signale. Bemerkenswert war jedoch, dass p53 offenbar nicht nur an die Sequenzen der klassischen p53-Zielgene *p21* und *MDM2* gebunden hatte, sondern auch an die Sequenz aus der Promotorregion des *Jagged1* Gens. Außerdem war die Bindung von p53 an *Jagged1* und *MDM2*-Promotorsequenzen stressabhängig: ionisierende Strahlung verstärkte die Assoziation des Transkriptionsfaktors p53 mit der DNA.

Ein anderes Bild ergab sich in U373-Zellen, in denen wir zuvor deutliche Level an p73-Protein nachgewiesen hatten. Während der Kontroll-Antikörper HRS-3 auch hier unter allen Untersuchungsbedingungen kein detektierbares ChIP-Signal erzeugte und damit eine unspezifische Fällung von relevanten Sequenzen ausgeschlossen werden konnte, wurden mit beiden p73-Antikörpern sowohl eine Sequenz des *Jagged1* Promotors als auch die *p21*- und *MDM2*-, nicht aber die *U6*-Promotorsequenzen ko-präzipitiert. Somit konnten wir in U373 Zellen *in vivo* die Bindung des p73 Proteins an die Promotorregion des *Jagged1* Gens nachweisen. Dass das p73 Protein auch mit den *p21*- und *MDM2*-Promotoren assoziierte, war nicht überraschend. Es war bekannt, dass die p53-Bindungsmotive in beiden Genen nicht nur von p53 selbst, sondern kontextabhängig auch von anderen Transkriptionsfaktoren aus der p53-Familie einschließlich p73 erkannt werden können (Sasaki et al. 2002).

Wir konnten aber nicht nur eine Bindung von p73, sondern auch von p53 an die *Jagged1*, *p21* und *MDM2*-Promotoren zeigen. U373 Zellen exprimieren mutiertes p53, das nicht DNA-bindungsfähig ist. Wir vermuten, dass das zweite Allel des p53-Gens in diesen Zellen Wildtyp-p53 kodiert und die Zellen damit heterozygot sind.

Dies würde nicht nur die Resultate unserer ChIP-Assays erklären, sondern wäre auch konform mit unserer Beobachtung, dass p53-aktivierender Stress in U373 Zellen zu einer, wenn auch im Vergleich zu wildtyp-p53 profizienten U87 Zellen verminderten, transkriptionellen Aktivierung von *p21* und *MDM2* führt.

Eine weitere bemerkenswerte Erkenntnis aus den ChIP-Assays an U373 Zellen war, dass die nach p73-Immunpräzipitation generierten PCR-Signale der *Jagged1*, *p21*- und *MDM2*-Promotorsequenzen aus bestrahlten, im Vergleich zu scheinbestrahlten, Kulturen abnahmen (im Gegensatz zu den Ergebnissen der p53-Immunpräzipitation in U87-Zellen), obwohl nach Bestrahlung die Expression dieser Gene zunahm. Dies lässt mehrere Interpretationen zu. Es ist bekannt, dass p73 in der Zelle in verschiedenen Isoformen vorkommt und dass einige dieser Isoformen (wie z. B. Δ Np73) zwar an Gene binden, diese aber aufgrund einer fehlenden Transaktivierungsdomäne nicht transaktivieren können (Dötsch et al. 2010; Levrero et al. 2000). Unsere ChIP-Antikörper konnten zwischen diesen Isoformen nicht unterscheiden. Denkbar wäre also, dass in unbestrahlten U373 Zellen das *Jagged1* Gen von Δ Np73 gebunden und so nicht aktiviert wurde. Nach Bestrahlung könnte dann, etwa durch posttranslationelle Modifikationen, die DNA-Bindfähigkeit von Δ Np73 herab- und die von TAp73 heraufgesetzt worden sein. ChIP-geeignete Antikörper, die zwischen Δ Np73 und TAp73 unterscheiden, sollen diese Hypothese in zukünftigen Arbeiten testen.

Insgesamt zeigten diese Untersuchungen also, dass p73, wenn es in Glioblastomzellen in nachweisbaren Mengen produziert wird, auch bereits in Abwesenheit von strahlungsinduziertem Stress an die Promotorregion des *Jagged1* Gens gebunden sein kann. p53 kann ebenfalls an diese Region binden. Die Intensität der Bindung von p73 an *Jagged1*, abgeleitet aus der Stärke des PCR-Signals in den ChIP-Analysen, korreliert jedoch nicht mit der Transaktivierung des *Jagged1* Gens durch p73. Es scheint also die Erfüllung weiterer, über die DNA-Bindung hinausreichende Voraussetzungen für die erfolgreiche Gen-Transaktivierung notwendig zu sein. Dies steht auch in Einklang mit unserer Beobachtung, dass p53 das *Jagged1* Gen in U87 Zellen zwar stark binden, aber nicht transaktivieren kann.

Es ist bislang nur sehr wenig über Zielgene bekannt, die spezifisch durch p73 reguliert werden (Dötsch et al. 2010). In primären Neuronen inhibiert TAp73 die

NICD-induzierte Gen-Expression und wirkt dadurch als ein Notch-Antagonist, möglicherweise über die direkte Assoziation von TAp73 und NICD (Hooper et al. 2006). Ein anderer Mechanismus, über den TAp73 in Neuronen möglicherweise Notch inhibiert, involviert korrespondierende Liganden. Im Gegensatz zu p53 kann TAp73 die Expression der Notch-Liganden *Jagged1* und *Jagged2* induzieren (Sasaki et al. 2002). Daneben wurde demonstriert, dass das zweite Intron des *Jagged1*-Gens eine p63-Bindungsstelle enthält die mit dem p63-Protein *in vivo* direkt interagieren kann (nachgewiesen durch ChIP, Sasaki et al. 2002). Ein heterologer Reporterassay zeigte, dass diese p63 Bindungsstelle die Eigenschaft eines funktionellen response-Elements hat und für p63 spezifisch ist (Sasaki et al. 2002).

Insgesamt unterstützen unsere Ergebnisse also die Hypothesen, dass die Transkription des *Jagged1*-Gens in den nach Hochdosis-Bestrahlung überlebenden Glioblastomzellen: (I) bei inaktivem p53 (U373) unter der Kontrolle von p73 steht, und (II) bei p53-wildtyp-Status (U87) dagegen durch p53 und möglicherweise andere Transkriptionsfaktoren induziert wird. Dieses bemerkenswerte Resultat indiziert, dass die p53-Familie die in den meisten untersuchten Zelltypen als Suppressor von Wachstum und Überleben wirkt, in Stammzell-artigen Zellen des Glioblastoms auch onkogene Eigenschaften haben kann.

6.6 Jagged1-Expression und Wachstumsverhalten/ Malignitätsgrad von Glioblastomzellen

Glioblastome zeichnen sich durch eine hohe Invasivität aus (Qiu et al. 2016). Eine starke Jagged1-Expression ist in primären Glioblastomen mit einer ungünstigen Prognose assoziiert (Qiu et al. 2015). Als nächstes wollten wir untersuchen, ob die durch die strahlungsinduzierte Aktivierung von p73 verursachte Stimulation der Jagged1-Expression in Glioblastomzellen einen Effekt auf deren Wachstumsverhalten/Malignitätsgrad hat. Zu diesem Zweck wurden die Zelllinien U87 und U373 stabil mit Jagged1 „bulk“-transfiziert, d.h. es wurden keine einzelnen Zellklone geerntet (die sich aufgrund der genetischen Heterogenität einzelner Zellen womöglich zu sehr unterschieden hätten), sondern alle stabil transfizierten Zellen „gepoolt“. Die verstärkte Expression von Jagged1 konnte im Western Blot bestätigt werden. Es wurde eine moderate Steigerung der Produktion von Jagged1 erreicht, welche, wie die vermehrte Jagged1-Expression nach Bestrahlung, keinerlei Einfluss

auf die Expression von Notch4 oder p53 ausübte. Interessant war allerdings, dass die Überexpression von Jagged1 in U373-Zellen mit einer Induktion der Expression von p73 verbunden war. Zusammen mit unserer Beobachtung, dass das p73-Protein die Jagged1-Expression induzieren kann, war dieses Ergebnis mit der Hypothese vereinbar, dass beide Moleküle über eine positive sogenannte „feedback“-Schleife miteinander verbunden sind: p73 stimuliert die Expression von *Jagged1* und Jagged1 induziert wiederum die Expression von p73. Glioblastome zeichnen sich durch eine hohe Invasivität aus (Qiu et al. 2016). Die stabil Jagged1-überexprimierenden U373- und U87-Zellen wurden deshalb als nächstes auf ihre Invasivität *in vitro* getestet.

6.7 Einfluss von Zellkulturbedingungen auf die Expression von Komponenten der Notch- und p53-Signalwege

Das *in vitro* Wachstumsverhalten von Zellen wird wesentlich durch die Kulturbedingungen, darunter Mediumzusammensetzung und Zelldichte (Konfluenz), beeinflusst. Mediumzusammensetzung, pH-Wert und Osmolarität variieren in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern, wie beispielsweise Zelltyp, Zelldichte und Kultursystem. Es ist bekannt, dass Stress in Form von gebrauchtem („altem“) Medium oder zu starker Konfluenz, das Wachstumsverhalten von *in vitro* kultivierten Zellen beeinflusst. Sogenanntes konditioniertes Medium (z.B. frisches und gebrauchtes Medium im Verhältnis 1:1) enthält neben den zahlreichen Ursprungskomponenten des Mediums eine Vielzahl von weiteren biologisch aktiven Metaboliten und Wachstumsfaktoren, welche von den Zellen während der *in vitro* Kultivierung in das Medium sezerniert wurden und deren Wachstumsverhalten beeinflussen. Diese in das Medium sezernierten Wachstumsfaktoren modulieren zahlreiche zelluläre Mechanismen wie Zellproliferation, Adhäsion, Morphologie, Differenzierung, Migration, Entzündungsreaktionen, Angiogenese und Apoptose. Untersuchungen haben gezeigt, dass Verletzungen oder Stress bei der *in vitro* Kultivierung von Zellen zur Ausschüttung von zahlreichen Wachstumsfaktoren führen können, darunter PDGF (Platelet derived growth factor; Wachstumsfaktor aus Blutplättchen), VEGF (Vascular endothelial growth factor; Wachstumsfaktor aus dem Endothel der Gefäße), FGF (Fibroblast growth factor; Fibroblasten-Wachstumsfaktor) und IGF (Insulin-like growth factor; Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor) (Gonzales-Rubio et al. 1996; Stein et al. 1995; Yang et al. 1997 und West et al. 1995).

Wir konnten zeigen, dass bestimmte Veränderungen der *in vitro* Kulturbedingungen (Zelldichte) neben einem veränderten Wachstumsverhalten in Glioblastomzellen auch mit einer veränderten Expression von Komponenten der Notch- und p53-Signalwege, wichtigen Regulatoren der Stress „response“, assoziiert ist. Dabei zeigten sich Unterschiede zwischen U373 und U87 Zellen, was auf eine Beeinflussung durch den p53-Mutationsstatus hindeutet. Während sich bei ca. 30% Konfluenz in U373-Kulturen keine Expression von Jagged1, p73 oder Mdm2 nachweisen liess, waren alle drei Proteine bei 60 und 90% Konfluenz in U373 Gliomzellen gut detektierbar. Das p53 Protein war bei 30, 60 und 90% Konfluenz in U373 Gliomzellen in gleicher Intensität gut nachweisbar. In mit konventionellem, verglichen mit sogenanntem konditioniertem, Medium (frisches und gebrauchtes Medium im Verhältnis 1:1) kultivierten U373 Gliomzellen zeigten sich keine Unterschiede in der Expression von Jagged1, p73 oder Mdm2. In U87 Zellen fand sich dagegen weder ein Zelldichte- noch ein Medium-abhängiger Effekt auf die Expression von Jagged1, p73 oder Mdm2. Unter allen Versuchsbedingungen war in U87 Zellen keine Expression von p73 nachweisbar. Bei den ca. 30% konfluenten U87 Zellen zeigte sich eine schwächere p53 Expression verglichen mit U87 Zellen bei 60% und 90% Konfluenz. Je dichter der Zellrasen, umso geringer die p53 Expression in den U87 Zellen. Dies deutet also darauf hin, dass Gliomzellen Zelldichte-abhängige Veränderungen in der Expression von Komponenten der Notch- und p53-Signalwege zeigen. Dabei ergaben sich Unterschiede zwischen U373 und U87 Zellen, was auf eine Beeinflussung durch den p53- Mutationsstatus hindeutet. Diese Effekte konnten die charakteristischen Veränderungen in der Expression von Komponenten der Notch- und p53-Signalwege in Gliomzellen durch ionisierende Strahlung allerdings nicht vollständig erklären.

6.8 Modulation des Notch-Signalwegs als mögliche Therapieoption beim Glioblastom – aktuelle Konzepte und Perspektiven

Die Strategie zur Modulation des Notch-Signalwegs als neue Therapieoption zur Behandlung des Glioblastoms (Yuan et al. 2015) wird durch aktuelle Forschungsergebnisse unterstützt, die die Bedeutung dieses Signalwegs für

Pathogenese und Progression zahlreicher Tumorerkrankungen belegen (Alketbi und Attoub 2015; Ayaz und Osborne 2014; Capaccione und Pine 2013; El Hindy et al. 2013; Grochowski et al. 2016; Hu et al. 2012; Prokopi et al. 2015; Sugiyama et al. 2016; Takebe et al. 2015; Thelu et al. 2002; Wang et al. 2011; Wang et al. 2012; Weng et al. 2004; Zhang et al. 2010). So konnte kürzlich für das Pankreaskarzinom, einer Tumorentität mit sehr ungünstiger Prognose, und für zahlreiche weitere Malignome, eine wichtige Funktion von Notch als Tumorsuppressor gezeigt werden (Nowell und Radtke 2017). Miyamoto et al. konnten bei Maus und Mensch nachweisen, dass Komponenten des Notch-Signalwegs und Notch-Zielgene sowohl beim invasiven Pankreaskarzinom als auch bei dessen Vorläuferläsionen, verstärkt exprimiert werden (Miyamoto et al. 2003). Desweiteren konnte bei mehreren transgenen Pankreaskarzinom-Mausmodellen eine pathologische Aktivierung des Notch-Signalwegs gezeigt werden (Miyamoto et al. 2003). Zusammengefasst unterstreichen diese Untersuchungen die Bedeutung eines fehlregulierten Notch-Signalwegs nicht nur für die Initiierung und maligne Transformation von Pankreaskarzinomzellen, sondern auch für deren Resistenzentwicklung gegen Chemotherapie und ionisierende Strahlung. Die pharmakologische Hemmung des Notch-Signalwegs wird aktuell vor allem bei Tumorentitäten mit fehlerhafter Notch-Aktivierung, dazu gehören neben dem Pankreaskarzinom u.a. auch die akute lymphatische Leukämie und das Glioblastom, als aussichtsreiche Strategie zur Prävention oder Therapie diskutiert (Alketbi und Attoub 2015). Da die γ -Sekretase-induzierte Abspaltung der intrazellulären Notch-Domäne für die Vermittlung der Notch-Wirkung ein zentrales Ereignis darstellt, wird zurzeit auch das therapeutische Potential von γ -Sekretase Inhibitoren (GSI) zur Behandlung von Tumorerkrankungen intensiv erforscht (Dantas-Barbosa et al. 2015; Saito et al. 2015). Neben präklinischen Studien im Mausmodell werden aktuell auch klinische Therapiestudien bei unterschiedlichen Tumorerkrankungen, darunter das Glioblastom, durchgeführt (Xu et al. 2016; Yahyanejad et al. 2016).

Es ist allerdings wichtig darauf hinzuweisen, dass GSIs nicht ausschliesslich den Notch Signalweg beeinflussen und nicht Tumor-spezifisch wirken, weshalb auch unerwünschte Nebenwirkungen zu erwarten sind (Droy-Dupré et al. 2012). Eine bekannte Nebenwirkung von GSI besteht in der Metaplasie von Becherzellen im Dünndarm (Droy-Dupré et al. 2012). Allerdings wird dieser Effekt deutlich vermindert, wenn das Medikament intermittierend (mit Unterbrechungen) gegeben wird (Droy-

Dupré et al. 2012). Eine mögliche Erklärung dafür besteht darin, dass die intermittierende Gabe es intestinalen Stammzellen ermöglicht, sich ordnungsgemäß zu differenzieren (Droy-Dupré et al. 2012).

Die Beeinflussung von Stammzellen durch Notch-Inhibition ist ebenfalls ein mögliches therapeutisches Angriffsziel. Tatsächlich verstärken GSI den Zelltod und reduzieren das Wachstum von aus Gliomen isolierten „brain cancer stem-like cells“ (bCSC) und machen sie empfindlicher gegenüber Strahlentherapie. Dieser Effekt ist für die Entwicklung neuer Therapieoptionen zur Behandlung von Glioblastomen potentiell von großer Bedeutung, da bCSCs an der Entwicklung der Strahlenresistenz von Gliomen beteiligt sind (Bao S. et al. 2006). Es konnte gezeigt werden, dass bCSCs als Antwort auf Strahlentherapie die „damage checkpoint response“ aktivieren, die Aktivität von DNA-Reparaturmechanismen erhöhen und als Folge dieser Mechanismen auch die Apoptose vermindern (Bao S. et al. 2006). Darüber hinaus konnte in unterschiedlichen Zellkulturmodellen dargestellt werden, dass die Behandlung mit ionisierender Strahlung die Anzahl CD133- positiver Tumorzellen erhöht (Bao S. et al. 2006). Es ist bekannt, dass GBM-Rezidive einen höheren Anteil an CD 133-positiven Zellen aufweisen, verglichen mit neu diagnostizierten GBMs. Man kann daher spekulieren, ob eine Ursache für das Scheitern der aktuell zur Behandlung von Gliomen zur Verfügung stehenden Therapieoptionen darin besteht, dass diese zwar die Masse an Tumorzellen abtöten, allerdings nicht die Tumor-initiiierenden bCSCs, welche in der Lage sind den Tumor zu regenerieren und ein Rezidiv zu bilden. Ionisierende Strahlung induziert die Expression von Notch-Zielgenen in aus Gliomen gewonnenen CD133-positiven Zellen. Durch die kombinierte Behandlung mit GSI und Strahlentherapie kann die Strahlentherapie-Resistenz in diesen CD133-positiven Zellen zumindest teilweise überwunden werden. Die Transfektion der Zellen mit ICN1 oder ICN2 verstärkt den additiven Effekt von Strahlentherapie und GSI, wogegen der knockdown von Notch1 oder 2 (durch short hairpin RNA) CD133-positive Zellen gegenüber Strahlentherapie sensitiviert. Hingegen sprechen CD133-negative Zellen nicht auf die GSI-Behandlung an. Diese Ergebnisse suggerieren, dass die Notch-Aktivität bCSC vor Strahlentherapie-induziertem Zelltod schützt und dass die Blockade dieses Signalweges deren Strahlenresistenz zumindest teilweise überwindet.

Eine andere aussichtsreiche neue Therapieoption zur Behandlung von Glioblastomen besteht in der Anti-Angiogenese Therapie unter Verwendung des

VEGF-Inhibitors Bevacizumab (Avastin®), obwohl es nach zunächst erfolgreicher Behandlung regelmässig zum Rezidiv der Tumoren kommt (Mar et al. 2015; Poulsen et al. 2009; Vredenburg et al. 2007). Man nimmt heute an, dass diese Rezidive durch die Aktivierung von alternativen pro-Angiogenese-Signalwegen gefördert werden (Bergers und Hanahan 2008). Der Notch-Signalweg ist über die Expression von DLL4 an der Tumorangio-genese beteiligt (Zhang et al. 2015) und eine Aktivierung dieses Signalweges könnte an der Resistenzentwicklung unter Behandlung mit Bevacizumab beteiligt sein. Es wurde gezeigt, dass die Hemmung des Notch-Signalwegs durch lösliches DLL4 sowohl Bevacizumab-sensitive als auch -resistente Tumoren beeinflusst (Zhang et al. 2015). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass der Notch-Signalweg neben VEGF ein interessantes Angriffsziel für die Behandlung des Glioblastoms darstellt.

6.9 Schlussfolgerungen und Ausblick

Unsere Forschungsergebnisse unterstreichen die bedeutende Rolle der Notch- und p53/p63/p73-Signalwege für Pathogenese, Wachstumsverhalten und Therapie von Glioblastomzellen. Sie stützen die folgenden Hypothesen: (I) In Abhängigkeit vom p53-Status werden wichtige Komponenten des Notch-Signalwegs (u.a. Jagged1) differentiell exprimiert. (II) Behandlung mit ionisierender Strahlung oder Doxorubicin stimuliert die Jagged1-Expression, welche mit verändertem Wachstumsverhalten assoziiert ist. (III) In Glioblastomzellen mit mutiertem p53 wird die starke Jagged1-Expression durch das p53-verwandte p73 Protein auf Transkriptionsebene induziert. Es gelang somit *Jagged1* als direktes p73-Zielgen in Glioblastomen zu identifizieren und neue Interaktionen zwischen Notch- und p53-Signalwegen aufzuzeigen. Die Relevanz dieser Ergebnisse, u.a. für Pathogenese und Wachstumsverhalten als auch für das Therapieansprechen von Glioblastomzellen, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

7 Literaturverzeichnis

A

1. Agostini M, Tucci P, Chen H, Knight RA, Bano D, Nicotera P, McKeon F, Melino G. p73 regulates maintenance of neural stem cell. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Dec 3;403(1):13-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.10.087. PubMed PMID: 20977890; PubMed Central PMCID: PMC3041924.
2. Agostini M. p73: a multifunctional protein in neurobiology. *Mol Neurobiol.* 2011 Apr;43(2):139-46. doi: 10.1007/s12035-011-8172-6. Review. PubMed PMID: 21380933; PubMed Central PMCID: PMC3062774.
3. Alketbi A, Attoub S. Notch Signaling in Cancer: Rationale and Strategies for Targeting. *Curr Cancer Drug Targets.* 2015;15(5):364-74. Review. PubMed PMID:26239151.
4. Androutsellis-Theotokis A, Leker RR, Soldner F, Hoepfner DJ, Ravin R, Poser SW, Rueger MA, Bae SK, Kittappa R, McKay RD. Notch signalling regulates stem cell numbers *in vitro* and in vivo. *Nature.* 2006 Aug 17; 442(7104):823-6. PubMed PMID: 16799564.
5. Anjum K, Shagufta BI, Abbas SQ, Patel S, Khan I, Shah SAA, Akhter N, Hassan SSU. Current status and future therapeutic perspectives of glioblastoma multiforme (GBM) therapy: A review. *Biomed Pharmacother.* 2017 Aug;92:681-689.doi: 10.1016/j.biopha.2017.05.125. Epub 2017 Jun 3. Review. PubMed PMID:28582760.
6. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science.* 1999 Apr 30;284(5415):770-6. Review. PubMed PMID: 10221902.
7. Ayaz F, Osborne BA. Non-canonical notch signaling in cancer and immunity. *Front Oncol.* 2014 Dec 4; 4:345. doi: 10.3389/fonc.2014.00345. eCollection 2014. Review. PubMed PMID: 25538890; PubMed Central PMCID: PMC4255497.

B

8. Bailey SG, Cragg MS, Townsend PA. Family friction as $\Delta Np73$ antagonises p73 and p53. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011 Apr; 43(4):482-6. doi: 10.1016/j.biocel.2010.12.022. Review. PubMed PMID: 21216303.
9. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature.* 2006 Dec 7;444(7120):756-60. PubMed PMID: 17051156.
10. Berezovska O, Xia MQ, Hyman BT. Notch is expressed in adult brain, is coexpressed with presenilin-1, and is altered in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1998 Aug;57(8):738-45. PubMed PMID: 9720489.

11. Bergers G, Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer*. 2008 Aug; 8(8):592-603. doi: 10.1038/nrc2442. Review. PubMed PMID:18650835; PubMed Central PMCID: PMC2874834.
12. Boulay JL, Miserez AR, Zweifel C, Sivasankaran B, Kana V, Ghaffari A, Luyken C, Sabel M, Zerrouqi A, Wasner M, Van Meir E, Tolnay M, Reifenberger G, Merlo A. Loss of NOTCH2 positively predicts survival in subgroups of human glial brain tumors. *PLoS One*. 2007 Jun 27;2(6):e576. PubMed PMID: 17593975; PubMed Central PMCID: PMC1892807.
13. Buhlmann S, Pützer BM. DNP73 a matter of cancer: mechanisms and clinical implications. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Apr; 1785(2):207-16. doi: 10.1016/j.bbcan.2008.01.002. Review. PubMed PMID: 18302944.

C

14. Capaccione KM, Pine SR. The Notch signaling pathway as a mediator of tumor survival. *Carcinogenesis*. 2013 Jul; 34(7):1420-30. doi: 10.1093/carcin/bgt127. Review. PubMed PMID: 23585460; PubMed Central PMCID: PMC3697894.
15. Castro DS, Skowronska-Krawczyk D, Armant O, Donaldson IJ, Parras C, Hunt C, Critchley JA, Nguyen L, Gossler A, Göttgens B, Matter JM, Guillemot F. Proneural bHLH and Brn proteins coregulate a neurogenic program through cooperative binding to a conserved DNA motif. *Dev Cell*. 2006 Dec;11(6):831-44. PubMed PMID: 17141158.
16. Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*. 2003 Nov 15;193(1-2):3-34. Review. PubMed PMID: 14599765.
17. Corso CD, Bindra RS. Success and Failures of Combined Modalities in Glioblastoma Multiforme: Old Problems and New Directions. *Semin Radiat Oncol*. 2016 Oct; 26(4):281-98. doi: 10.1016/j.semradonc.2016.06.003. Epub 2016 Jun 3. Review. PubMed PMID: 27619250.
18. Cuddihy AR, Bristow RG. The p53 protein family and radiation sensitivity: Yes or no? *Cancer and Metastasis Reviews*. 2004;23:237-257.

D

19. Dang TP. Notch, apoptosis and cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2012; 727:199-209. doi: 10.1007/978-1-4614-0899-4_15. Review. PubMed PMID: 22399349.
20. Dang L, Fan X, Chaudhry A, Wang M, Gaiano N, Eberhart CG. Notch3 signaling initiates choroid plexus tumor formation. *Oncogene*. 2006 Jan 19;25(3):487-91. PubMed PMID: 16186803.
21. Dang L, Fan X, Chaudhry A, Wang M, Gaiano N, Eberhart CG. Notch3 signaling initiates choroid plexus tumor formation. *Oncogene*. 2006 Jan 19;25(3):487-91. PubMed PMID: 16186803.
22. Dantas-Barbosa C, Bergthold G, Daudigeos-Dubus E, Blockus H, Boylan JF, Ferreira C, Puget S, Abely M, Vassal G, Grill J, Georger B. Inhibition of the NOTCH pathway using γ -secretase inhibitor RO4929097 has limited antitumor

- activity in established glial tumors. *Anticancer Drugs*. 2015 Mar; 26(3):272-83. doi: 10.1097/ CAD.000000000000190. PubMed PMID: 25486598.
23. Dell'albani P, Rodolico M, Pellitteri R, Tricarichi E, Torrisi SA, D'Antoni S, Zappia M, Albanese V, Caltabiano R, Platania N, Aronica E, Catania MV. Differential patterns of NOTCH1-4 receptor expression are markers of glioma cell differentiation. *Neuro Oncol*. 2014 Jan; 16(2):204-16. doi: 10.1093/neuonc/not168. PubMed PMID: 24305720; PubMed Central PMCID: PMC3895382.
24. Deyoung MP, Ellisen LW. p63 and p73 in human cancer: defining the network. *Oncogene*. 2007 Aug 9;26(36):5169-83. Review. PubMed PMID: 17334395.
25. Dhanesh SB, Subashini C, James J. Hes1: the maestro in neurogenesis. *Cell Mol Life Sci*. 2016 Nov;73(21):4019-42. doi: 10.1007/s00018-016-2277-z. Epub 2016 May 27. Review. PubMed PMID: 27233500.
26. Di Como CJ, Gaiddon C, Prives C. p73 function is inhibited by tumor-derived p53 mutants in mammalian cells. *Mol Cell Biol*. 1999 Feb;19(2):1438-49. PubMed PMID: 9891077; PubMed Central PMCID: PMC116072.
27. Dötsch V, Bernassola F, Coutandin D, Candi E, Melino G. p63 and p73, the ancestors of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010 Sep;2(9):a004887. doi: 10.1101/cshperspect.a004887. Review. PubMed PMID: 20484388; PubMed Central PMCID: PMC2926756.
28. Dotto GP. Crosstalk of Notch with p53 and p63 in cancer growth control. *Nat Rev Cancer*. 2009 Aug; 9(8):587-95. doi: 10.1038/nrc2675. Review. PubMed PMID: 19609265.
29. Droy-Dupré L, Vallée M, Bossard C, Laboisie CL, Jarry A. A multiparametric approach to monitor the effects of γ -secretase inhibition along the whole intestinal tract. *Dis Model Mech*. 2012 Jan; 5(1):107-14. doi: 10.1242/dmm.007591. PubMed PMID: 21885452; PubMed Central PMCID: PMC3255549.
30. Dudgeon C, Kek C, Demidov ON, Saito S, Fernandes K, Diot A, Bourdon JC, Lane DP, Appella E, Fornace AJ Jr, Bulavin DV. Tumor susceptibility and apoptosis defect in a mouse strain expressing a human p53 transgene. *Cancer Res*. 2006 Mar 15;66(6):2928-36.

E

31. El Hindy N, Keyvani K, Pagenstecher A, Dammann P, Sandalcioglu IE, Sure U, Zhu Y. Implications of DLL4-Notch signaling activation in primary glioblastoma multiforme. *Neuro Oncol*. 2013 Oct;15(10):1366-78. doi: 10.1093/neuonc/not071. Epub 2013 Jun 20. PubMed PMID: 23787764; PubMed Central PMCID: PMC3779034.
32. B, Huang T, Karsy M. Current understanding of the role and targeting of tumor suppressor p53 in glioblastoma multiforme. *Tumour Biol*. 2013 Aug; 34(4):2063-74. doi: 10.1007/s13277-013-0871-3. Review. PubMed PMID: 23737287.

F

33. Fatt MP, Cancino GI, Miller FD, Kaplan DR. p63 and p73 coordinate p53 function to determine the balance between survival, cell death, and senescence in adult neural precursor cells. *Cell Death Differ.* 2014 Oct; 21(10):1546-59. doi: 10.1038/cdd.2014.61. PubMed PMID: 24809925; PubMed Central PMCID: PMC4158681.
34. Ferraiuolo M, Di Agostino S, Blandino G, Strano S. Oncogenic Intra-p53 Family Member Interactions in Human Cancers. *Front Oncol.* 2016 Mar 31; 6:77. doi: 10.3389/fonc.2016.00077. Review. PubMed PMID: 27066457; PubMed Central PMCID: PMC4814729.
35. Fitzgerald K, Harrington A, Leder P. Ras pathway signals are required for notch mediated oncogenesis. *Oncogene.* 2000 Aug 31;19(37):4191-8. PubMed PMID: 10980592.
36. Friesen C, Fulda S, Debatin KM. Induction of CD95 ligand and apoptosis bydoxorubicin is modulated by the redox state in chemosensitive- and drug-resistant tumor cells. *Cell Death Differ.* 1999 May;6(5):471-80. PubMed PMID: 10381639.
37. Fricker M, Papadia S, Hardingham GE, Tolkovsky AM. Implication of TAp73 in the p53-independent pathway of Puma induction and Puma-dependent apoptosis in primary cortical neurons. *J Neurochem.* 2010 Aug; 114(3):772-83. doi: 10.1111/j.1471 4159.2010.06804.x. PubMed PMID: 20477944; PubMed Central PMCID: PMC2956137.

G

38. Gaiddon C, Lokshin M, Ahn J, Zhang T, Prives C. A subset of tumor-derived mutant forms of p53 down-regulate p63 and p73 through a direct interaction with the p53 core domain. *Mol Cell Biol.* 2001 Mar;21(5):1874-87. PubMed PMID: 11238924; PubMed Central PMCID: PMC86759.
39. Gao X, Deeb D, Jiang H, Liu Y, Dulchavsky SA, Gautam SC. Synthetic triterpenoids inhibit growth and induce apoptosis in human glioblastoma and neuroblastoma cells through inhibition of prosurvival Akt, NF-kappaB and Notch1 signaling. *J Neurooncol.* 2007 Sep;84(2):147-57. PubMed PMID: 17361329.
40. Grespi F, Amelio I, Tucci P, Annicchiarico-Petruzzelli M, Melino G. Tissue-specific expression of p73 C-terminal isoforms in mice. *Cell Cycle.* 2012 Dec 1; 11(23):4474-83. doi: 10.4161/cc.22787. PubMed PMID: 23159862; PubMed Central PMCID: PMC3552929.
41. Grochowski CM, Loomes KM, Spinner NB. Jagged1 (JAG1): Structure, expression, and disease associations. *Gene.* 2016 Jan 15;576(1 Pt 3):381-4. doi:10.1016/j.gene.2015.10.065. Epub 2015 Nov 6. Review. PubMed PMID: 26548814; PubMed Central PMCID: PMC4673022.
42. Groot AJ, Vooijs MA. The role of Adams in Notch signaling. *Adv Exp Med Biol.*2012;727:15-36. doi: 10.1007/978-1-4614-0899-4_2. Review. PubMed PMID: 22399336; PubMed Central PMCID: PMC4050497.

H

43. Hainaut P, Hollstein M. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res.* 2000;77:81-137. Review. PubMed PMID: 10549356.
44. Hambardzumyan D, Becher OJ, Holland EC. Cancer stem cells and survival pathways. *Cell Cycle.* 2008 May 15;7(10):1371-8. Review. PubMed PMID: 18421251.
45. Hambardzumyan D, Gutmann DH, Kettenmann H. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nat Neurosci.* 2016 Jan;19(1):20-7. doi: 10.1038/nn.4185. Review. PubMed PMID: 26713745; PubMed Central PMCID: PMC4876023.
46. Hess S, Pfreundschuh M, Gleissner B. Notch signaling. *J Neurosurg.* 2007 Nov;107(5):1060-1; author reply 1061-2.
47. Hess S. Untersuchungen zur Wirkung von Cannabinoiden/Endocannabinoiden und AM 404 auf primäre Mikrogliazellen der Ratte und humane Monozyten. Diplomarbeit an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau, Fakultät Biologie. 2006.
48. Heyne K, Willnecker V, Schneider J, Conrad M, Raulf N, Schüle R, Roemer K. NIR, an inhibitor of histone acetyltransferases, regulates transcription factor TAp63 and is controlled by the cell cycle. *Nucleic Acids Res.* 2010 Jun; 38(10):3159-71. doi: 10.1093/nar/gkq016. Epub 2010 Jan 31.
49. Holembowski L, Schulz R, Talos F, Scheel A, Wolff S, Dobbstein M, Moll U. While p73 is essential, p63 is completely dispensable for the development of the central nervous system. *Cell Cycle.* 2011 Feb 15;10(4):680-9. PubMed PMID: 21293190; PubMed Central PMCID: PMC3174004.
50. Holland EC. Glioblastoma multiforme: the terminator. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jun 6;97(12):6242-4. PubMed PMID: 10841526; PubMed Central PMCID: PMC33993.
51. Hooper C, Tavassoli M, Chapple JP, Uwanogho D, Goodyear R, Melino G, Lovestone S, Killick R. TAp73 isoforms antagonize Notch signalling in SH-SY5Y neuroblastomas and in primary neurones. *J Neurochem.* 2006 Nov;99(3):989-99. PubMed PMID: 17076661.
52. Hu YY, Zheng MH, Zhang R, Liang YM, Han H. Notch signaling pathway and cancer metastasis. *Adv Exp Med Biol.* 2012; 727:186-98. doi: 10.1007/978-1-4614-0899-4_14. Review. PubMed PMID: 22399348.

I

53. Iso T, Hamamori Y, Kedes L. Notch signaling in vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 Apr 1;23(4):543-53. Review. PubMed PMID: 12615665.
54. Iso T, Kedes L, Hamamori Y. HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J Cell Physiol.* 2003 Mar;194(3):237-55. Review. PubMed PMID: 12548545.

J

K

55. Kanamori M, Kawaguchi T, Nigro JM, Feuerstein BG, Berger MS, Miele L, Pieper RO. Contribution of Notch signaling activation to human glioblastoma multiforme. *J Neurosurg.* 2007 Mar;106(3):417-27. PubMed PMID: 17367064.
56. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* 1991 Dec 1;51(23 Pt 1):6304-11. PubMed PMID: 1933891.
57. Khoury MP, Bourdon JC. The isoforms of the p53 protein. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010 Mar;2(3):a000927. doi: 10.1101/cshperspect.a000927. Review. PubMed PMID: 20300206; PubMed Central PMCID: PMC2829963.
58. Kiec-Wilk B, Grzybowska-Galuszka J, Polus A, Pryjma J, Knapp A, Kristiansen K. The MAPK-dependent regulation of the Jagged/Notch gene expression by VEGF, bFGF or PPAR gamma mediated angiogenesis in HUVEC. *J Physiol Pharmacol.* 2010;61:217–25.
59. Kimura H. Histone modifications for human epigenome analysis. *J Hum Genet.* 2013 Jul;58(7):439-45. doi: 10.1038/jhg.2013.66. Epub 2013 Jun 6. Review. PubMed PMID: 23739122.
60. Kolev V, Mandinova A, Guinea-Viniegra J, Hu B, Lefort K, Lambertini C, et al. EGFR signalling as a negative regulator of Notch1 gene transcription and function in proliferating keratinocytes and cancer. *Nat Cell Biol.* 2008; 10:902–11. doi: 10.1038/ncb1750.
61. Krejčí A, Bernard F, Housden BE, Collins S, Bray SJ. Direct response to Notch activation: signaling crosstalk and incoherent logic. *Sci Signal.* 2009 Jan 27;2(55):ra1. doi: 10.1126/scisignal.2000140. Erratum in: *Sci Signal.* 2009;2(58):er3. PubMed PMID: 19176515.
62. Kume T. Ligand-dependent Notch signaling in vascular formation. *Adv Exp Med Biol.* 2012; 727:210-22. doi: 10.1007/978-1-4614-0899-4_16. Review. PubMed PMID: 22399350.
63. Kwon SM, Alev C, Lee SH, Asahara T. The molecular basis of Notch signaling: a brief overview. *Adv Exp Med Biol.* 2012; 727:1-14. doi: 10.1007/978-1-4614-0899-4_1. PubMed PMID: 22399335.

L

64. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature.* 1992 Jul 2;358(6381):15-6. PubMed PMID: 1614522.
65. Lane D, Levine A. p53 Research: the past thirty years and the next thirty years. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010 Dec;2(12):a000893. doi: 10.1101/cshperspect.a000893. Epub 2010 May 12. Review. PubMed PMID: 20463001; PubMed Central PMCID: PMC2982174.

66. Levrero M, De Laurenzi V, Costanzo A, Gong J, Wang JY, Melino G. The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *J Cell Sci.* 2000 May;113 (Pt 10):1661-70. Review. PubMed PMID: 10769197.
67. Liu S, Bonner JM, Chanet S, Commisso C, Skwarek LC, Schweisguth F, Boulianne GL. Functional analysis of the NHR2 domain indicates that oligomerization of Neuralized regulates ubiquitination and endocytosis of Delta during Notch signaling. *Mol Cell Biol.* 2012 Dec; 32(24):4933-45. doi: 10.1128/MCB.00711-12. PubMed PMID: 23045391; PubMed Central PMCID: PMC3510530.
68. Liu ZH, Dai XM, Du B. Hes1: a key role in stemness, metastasis and multidrug resistance. *Cancer Biol Ther.* 2015; 16(3):353-9. doi: 10.1080/15384047.2015.1016662. Review. PubMed PMID: 25781910; PubMed Central PMCID: PMC4622741.
69. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016 Jun; 131(6):803-20. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1. Epub 2016 May 9. Review. PubMed PMID: 27157931.
70. Lucena-Araujo AR, Kim HT, Thomé C, Jacomo RH, Melo RA, Bittencourt R, Pasquini R, Pagnano K, Glória AB, Chauffaille Mde L, Athayde M, Chiattonne CS, Mito I, Bendlin R, Souza C, Bortolheiro C, Coelho-Silva JL, Schrier SL, Tallman MS, Grimwade D, Ganser A, Berliner N, Ribeiro RC, Lo-Coco F, Löwenberg B, Sanz MA, Rego EM. High Δ Np73/TAp73 ratio is associated with poor prognosis in acute promyelocytic leukemia. *Blood.* 2015 Nov 12; 126(20):2302-6. doi: 10.1182/blood-2015-01-623330. PubMed PMID: 26429976; PubMed Central PMCID: PMC4760128.

M

71. Maas AM, Bretz AC, Mack E, Stiewe T. Targeting p73 in cancer. *Cancer Lett.* 2013 May 28; 332(2):229-36. doi: 10.1016/j.canlet.2011.07.030. Review. PubMed PMID: 21903324.
72. Maltzman W, Czyzyk L. UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol Cell Biol.* 1984 Sep;4(9):1689-94. PubMed PMID: 6092932; PubMed Central PMCID: PMC368974.
73. Mar N, Desjardins A, Vredenburgh JJ. CCR 20th Anniversary Commentary: Bevacizumab in the Treatment of Glioblastoma--The Progress and the Limitations. *Clin Cancer Res.* 2015 Oct 1; 21(19):4248-50. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1381. PubMed PMID: 26429979.
74. Marcel V, Petit I, Murray-Zmijewski F, Gouillet de Rugy T, Fernandes K, Meuray V, Diot A, Lane DP, Aberdam D, Bourdon JC. Diverse p63 and p73 isoforms regulate Δ 133p53 expression through modulation of the internal TP53 promoter activity. *Cell Death Differ.* 2012 May;19(5):816-26. doi: 10.1038/cdd.2011.152. Epub 2011 Nov 11. PubMed PMID: 22075982; PubMed Central PMCID: PMC3321620.

75. Mathieu P, Adami PV, Morelli L. Notch signaling in the pathologic adult brain. *Biomol Concepts*. 2013 Oct; 4(5):465-76. doi: 10.1515/bmc-2013-0006. Review. PubMed PMID: 25436753.
76. McLendon RE, Rosenblum MK, Bigner DD (editors). *Russell & Rubinstein's Pathology of Tumors of the Nervous System 7Ed*, 2006, CRC Press Boca Raton, Florida, USA. ISBN 9780340810071
77. Miyamoto Y, Maitra A, Ghosh B, Zechner U, Argani P, Iacobuzio-Donahue CA, Sriuranpong V, Iso T, Meszoely IM, Wolfe MS, Hruban RH, Ball DW, Schmid RM, Leach SD. Notch mediates TGF alpha-induced changes in epithelial differentiation during pancreatic tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2003 Jun;3(6):565-76. PubMed PMID: 12842085.
78. Mizoguchi M, Kuga D, Guan Y, Hata N, Nakamizo A, Yoshimoto K, Sasaki T. Loss of heterozygosity analysis in malignant gliomas. *Brain Tumor Pathol*. 2011 Jul; 28(3):191-6. doi: 10.1007/s10014-011-0038-0. Review. Erratum in: *Brain Tumor Pathol*. 2011 Jul;28(3):197. PubMed PMID: 21629980.
79. Moll UM, Slade N. p63 and p73: roles in development and tumor formation. *Mol Cancer Res*. 2004 Jul;2(7):371-86. Review. PubMed PMID: 15280445.
80. Monastirioti M, Giagtzoglou N, Koumbanakis KA, Zacharioudaki E, Deligiannaki M, Wech I, Almeida M, Preiss A, Bray S, Delidakis C. Drosophila Hey is a target of Notch in asymmetric divisions during embryonic and larval neurogenesis. *Development*. 2010 Jan;137(2):191-201. doi: 10.1242/dev.043604. PubMed PMID: 20040486; PubMed Central PMCID: PMC2799155.
81. Monsalve EM, García-Gutiérrez MS, Navarrete F, Giner S, Laborda J, Manzanares J. Abnormal expression pattern of Notch receptors, ligands, and downstream effectors in the dorsolateral prefrontal cortex and amygdala of suicidal victims. *Mol Neurobiol*. 2014 Apr; 49(2):957-65. doi: 10.1007/s12035-013-8570-z. PubMed PMID: 24151014.
82. Müller M, Schleithoff ES, Stremmel W, Melino G, Krammer PH, Schilling T. One, two, three--p53, p63, p73 and chemosensitivity. *Drug Resist Updat*. 2006 Dec;9(6):288-306. Review. PubMed PMID: 17287142.
83. Muller PA, Vousden KH, Norman JC. p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion. *J Cell Biol*. 2011 Jan 24; 192(2):209-18. doi: 10.1083/jcb.201009059. Review. PubMed PMID: 21263025; PubMed Central PMCID: PMC3172183.
84. Muller PA, Vousden KH. p53 mutations in cancer. *Nat Cell Biol*. 2013 Jan;15(1):2-8. doi: 10.1038/ncb2641. Review. PubMed PMID: 23263379.

N

85. Napoli M, Flores ER. The p53 family orchestrates the regulation of metabolism: physiological regulation and implications for cancer therapy. *Br J Cancer*. 2017 Jan 17; 116(2):149-155. doi: 10.1038/bjc.2016.384. PubMed PMID: 27884017; PubMed Central PMCID: PMC5243983.
86. Narayanappa R, Rout P, Aithal MG, Chand AK. Aberrant expression of Notch1, HES1, and DTX1 genes in glioblastoma formalin-fixed paraffin-

embedded tissues. *Tumour Biol.* 2016 May; 37(5):6935-42. doi: 10.1007/s13277-015-4592-7. PubMed PMID:26662803.

87. Nguyen BC, Lefort K, Mandinova A, Antonini D, Devgan V, Della Gatta G, Koster MI, Zhang Z, Wang J, Tommasi di Vignano A, Kitajewski J, Chiorino G, Roop DR, Missero C, Dotto GP. Cross-regulation between Notch and p63 in keratinocyte commitment to differentiation. *Genes Dev.* 2006 Apr 15;20(8):1028-42. PubMed PMID:16618808; PubMed Central PMCID: PMC1472299.
88. Niklison-Chirou MV, Killick R, Knight RA, Nicotera P, Melino G, Agostini M. How Does p73 Cause Neuronal Defects? *Mol Neurobiol.* 2016 Sep; 53(7):4509-20. doi: 10.1007/s12035-015-9381-1. Review. PubMed PMID: 26266644.
89. Nowell CS, Radtke F. Notch as a tumour suppressor. *Nat Rev Cancer.* 2017 Mar;17(3):145-159. doi: 10.1038/nrc.2016.145. Epub 2017 Feb 3. Review. PubMed PMID: 28154375.

O

90. Ohgaki H, Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005a Jun;64(6):479-89. Review. PubMed PMID: 15977639.
91. Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol.* 2005b Jan;109(1):93-108. Epub 2005 Feb 1. Review. PubMed PMID: 15685439.
92. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol.* 2007 May;170(5):1445-53. Review. PubMed PMID: 17456751; PubMed Central PMCID: PMC1854940.
93. Olive PL. The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation. *Radiat Res.* 1998 Nov;150(5 Suppl):S42-51. Review. PubMed PMID: 9806608.
94. Orzol P, Holcakova J, Nekulova M, Nenutil R, Vojtesek B, Coates PJ. The diverse oncogenic and tumour suppressor roles of p63 and p73 in cancer: a review by cancer site. *Histol Histopathol.* 2015 May; 30(5):503-21. doi: 10.14670/HH-30.503. Review. PubMed PMID: 25510918.
95. Oswald C, Stiewe T. In good times and bad: p73 in cancer. *Cell Cycle.* 2008 Jun 15;7(12):1726-31. Review. PubMed PMID: 18583938.

P

96. Park JS, Kim EJ, Lee JY, Sin HS, Namkoong SE, Um SJ. Functional inactivation of p73, a homolog of p53 tumor suppressor protein, by human papillomavirus E6 proteins. *Int J Cancer.* 2001 Mar 15;91(6):822-7. PubMed PMID: 11275986.
97. Patel NS, Li JL, Generali D, Poulson R, Cranston DW, Harris AL. Up-regulation of delta-like 4 ligand in human tumor vasculature and the role of

- basal expression in endothelial cell function. *Cancer Res.* 2005 Oct 1;65(19):8690-7. PubMed PMID: 16204037.
98. Patel NS, Dobbie MS, Rochester M, Steers G, Poulson R, Le Monnier K, Cranston DW, Li JL, Harris AL. Up-regulation of endothelial delta-like 4 expression correlates with vessel maturation in bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 2006 Aug 15;12(16):4836-44. PubMed PMID: 16914569.
99. Pei J, Park IH, Ryu HH, Li SY, Li CH, Lim SH, Wen M, Jang WY, Jung S. Sublethal dose of irradiation enhances invasion of malignant glioma cells through p53-MMP 2 pathway in U87MG mouse brain tumor model. *Radiat Oncol.* 2015 Aug 6; 10:164. doi:10.1186/s13014-015-0475-8. PubMed PMID: 26245666; PubMed Central PMCID:PMC4554349.
100. Pierfelice TJ, Schreck KC, Dang L, Asnaghi L, Gaiano N, Eberhart CG. Notch3 activation promotes invasive glioma formation in a tissue site-specific manner. *Cancer Res.* 2011 Feb 1;71(3):1115-25. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0690. Epub 2011 Jan 18. PubMed PMID: 21245095; PubMed Central PMCID: PMC3076023.
101. Poulsen HS, Grunnet K, Sorensen M, Olsen P, Hasselbalch B, Nelausen K, Kosteljanetz M, Lassen U. Bevacizumab plus irinotecan in the treatment patients with progressive recurrent malignant brain tumours. *Acta Oncol.* 2009;48(1):52-8. doi: 10.1080/02841860802537924. PubMed PMID: 19031176.
102. Prokopi M, Kousparou CA, Epenetos AA. The Secret Role of microRNAs in Cancer Stem Cell Development and Potential Therapy: A Notch-Pathway Approach. *Front Oncol.* 2015 Feb 11; 4:389. doi: 10.3389/fonc.2014.00389. eCollection 2014. Review. PubMed PMID: 25717438; PubMed Central PMCID: PMC4324081.
103. Purow B. Notch inhibition as a promising new approach to cancer therapy. *Adv Exp Med Biol.* 2012; 727:305-19. doi: 10.1007/978-1-4614-0899-4_23. Review. PubMed PMID: 22399357; PubMed Central PMCID: PMC3361718.
104. Purow BW, Haque RM, Noel MW, Su Q, Burdick MJ, Lee J et al.: Expression of Notch-1 and its ligands, Delta-like-1 and Jagged-1, is critical for glioma cell survival and proliferation. *Cancer Res* 65:2353-2363, 2005.
105. Purow BW, Sundaresan TK, Burdick MJ, Kefas BA, Comeau LD, Hawkinson MP, Su Q, Kotliarov Y, Lee J, Zhang W, Fine HA. Notch-1 regulates transcription of the epidermal growth factor receptor through p53. *Carcinogenesis.* 2008 May; 29(5):918-25. doi: 10.1093/carcin/bgn079. PubMed PMID: 18359760; PubMed Central PMCID: PMC2902388.

Q

106. Querido E, Morrison MR, Chu-Pham-Dang H, Thirlwell SW, Boivin D, Branton PE. Identification of three functions of the adenovirus e4orf6 protein that mediate p53 degradation by the E4orf6-E1B55K complex. *J Virol.* 2001 Jan;75(2):699-709. Erratum in: *J Virol* 2001 Mar;75(5):2508. Morrison MR [corrected to Morrison MR]. PubMed PMID: 11134283; PubMed Central PMCID: PMC113966.

107. Qiu XX, Chen L, Wang CH, Lin ZX, Chen BJ, You N, Chen Y, Wang XF. The Vascular Notch Ligands Delta-Like Ligand 4 (DLL4) and Jagged1 (JAG1) Have Opposing Correlations with Microvascularization but a Uniform Prognostic Effect in Primary Glioblastoma: A Preliminary Study. *World Neurosurg.* 2016 Apr; 88:447-58. doi: 10.1016/j.wneu.2015.10.058. PubMed PMID: 26546995.
108. Qiu XX, Wang CH, You N, Chen BJ, Wang XF, Chen YP, Lin ZX. High Jagged1 expression is associated with poor outcome in primary glioblastoma. *Med Oncol.* 2015 Jan; 32(1):341. doi: 10.1007/s12032-014-0341-9. Erratum in: *Med Oncol.* 2016 Sep;33(9):100. PubMed PMID: 25424769.

R

109. Rajasekhar VK, Viale A, Socci ND, Wiedmann M, Hu X, Holland EC. Oncogenic Ras and Akt signaling contribute to glioblastoma formation by differential recruitment of existing mRNAs to polysomes. *Mol Cell.* 2003 Oct;12(4):889-901. PubMed PMID: 14580340.
110. Rangel LP, Costa DC, Vieira TC, Silva JL. The aggregation of mutant p53 produces prion-like properties in cancer. *Prion.* 2014 Jan-Feb;8(1):75-84. PubMed PMID: 24509441.
111. Rees JH, Smirniotopoulos JG, Jones RV, Wong K. Glioblastoma multiforme: radiologic-pathologic correlation. *Radiographics.* 1996 Nov;16(6):1413-38; quiz 1462-3. PubMed PMID: 8946545.
112. Reichrath S, Müller CS, Gleissner B, Pfreundschuh M, Vogt T, Reichrath J. Notch- and vitamin D signaling in 1,25(OH)₂D₃-resistant glioblastoma multiforme (GBM) cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010 Jul;121(1-2):420-4. doi:10.1016/j.jsbmb.2010.02.028. Epub 2010 Mar 4.
113. Reichrath S, Reichrath J. No evidence for induction of key components of the Notch signaling pathway (Notch-1, Jagged-1) by treatment with UV-B, 1,25(OH)₂D₃, and/or epigenetic drugs (TSA, 5-Aza) in human keratinocytes in vitro. *Dermatoendocrinol.* 2012 Jan 1;4(1):44-52. doi: 10.4161/derm.19027.
114. Reichrath J, Reichrath S. Notch-signaling and non-melanoma skin cancer: an ancient friend, revisited. *Adv Exp Med Biol.* 2012; 727 In press.
115. Robertson LB, Armstrong GN, Olver BD, Lloyd AL, Shete S, Lau C, Claus EB, Barnholtz-Sloan J, Lai R, Il'yasova D, Schildkraut J, Bernstein JL, Olson SH, Jenkins RB, Yang P, Ryneerson AL, Wrensch M, McCoy L, Wienke JK, McCarthy B, Davis F, Vick NA, Johansen C, Bødtker H, Sadetzki S, Bruchim RB, Yechezkel GH, Andersson U, Melin BS, Bondy ML, Houlston RS. Survey of familial glioma and role of germline p16INK4A/p14ARF and p53 mutation. *Fam Cancer.* 2010 Sep;9(3):413-21. doi: 10.1007/s10689-010-9346-5. Erratum in: *Fam Cancer.* 2010 Sep;9(3):423-4. Ryneerson, Amanda L [corrected to Ryneerson, Amanda Lynn]. PubMed PMID: 20455025; PubMed Central PMCID: PMC2922430.
116. Robles AL, Harris CC. Clinical outcomes and correlates of TP53 mutations and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a001016.

117. Roemer K. Notch and the p53 clan of transcription factors. *Adv Exp Med Biol.* 2012; 727:223-40. doi: 10.1007/978-1-4614-0899-4_17. Review. PubMed PMID: 22399351.

S

118. Saito N, Aoki K, Hirai N, Fujita S, Iwama J, Hiramoto Y, Ishii M, Sato K, Nakayama H, Harashina J, Hayashi M, Izukura H, Kimura H, Ito K, Sakurai T, Yokouchi Y, Oharazeki T, Takahashi K, Iwabuchi S. Effect of Notch expression in glioma stem cells on therapeutic response to chemoradiotherapy in recurrent glioblastoma. *Brain Tumor Pathol.* 2015 Jul; 32(3):176-83. doi: 10.1007/s10014-015-0215-7. PubMed PMID: 25665548.
119. Saito T. NEPRO: a novel Notch effector for maintenance of neural progenitor cells in the neocortex. *Adv Exp Med Biol.* 2012; 727:61-70. doi: 10.1007/978-1-4614-0899-4_5. Review. PubMed PMID: 22399339.
120. Sasaki Y, Ishida S, Morimoto I, Yamashita T, Kojima T, Kihara C, Tanaka T, Imai K, Nakamura Y, Tokino T. The p53 family member genes are involved in the Notch signal pathway. *J Biol Chem.* 2002 Jan 4;277(1):719-24. PubMed PMID: 11641404.
121. Schlegel U, Moots PL, Rosenblum MK, Thaler HT, Furneaux HM. Expression of transforming growth factor alpha in human gliomas. *Oncogene.* 1990 Dec;5(12):1839-42. PubMed PMID: 2284103.
122. Seidel S, Garvalov BK, Wirta V, von Stechow L, Schänzer A, Meletis K, Wolter M, Sommerlad D, Henze AT, Nistér M, Reifenberger G, Lundeberg J, Frisén J, Acker T. A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 alpha. *Brain.* 2010 Apr; 133(Pt 4):983-95. doi: 10.1093/brain/awq042. PubMed PMID: 20375133.
123. Shaw P, Bovey R, Tardy S, Sahli R, Sordat B, Costa J. Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 May 15;89(10):4495-9. PubMed PMID: 1584781; PubMed Central PMCID: PMC49109.
124. Shen Y, Chen H, Zhang J, Chen Y, Wang M, Ma J, Hong L, Liu N, Fan Q, Lu X, Tian Y, Wang A, Dong J, Lan Q, Huang Q. Increased Notch Signaling Enhances Radioresistance of Malignant Stromal Cells Induced by Glioma Stem/ Progenitor Cells. *PLoS One.* 2015 Nov 23;10(11):e0142594. doi: 10.1371/journal.pone.0142594. PubMed PMID: 26599017; PubMed Central PMCID: PMC4657951.
125. Simón R, Aparicio R, Housden BE, Bray S, Busturia A. Drosophila p53 controls Notch expression and balances apoptosis and proliferation. *Apoptosis.* 2014 Oct; 19(10):1430-43. doi: 10.1007/s10495-014-1000-5. PubMed PMID: 24858703.
126. Somasundaram K, Reddy SP, Vinnakota K, Britto R, Subbarayan M, Nambiar S, Hebbar A, Samuel C, Shetty M, Sreepathi HK, Santosh V, Hegde AS, Hegde S, Kondaiah P, Rao MR. Upregulation of ASCL1 and inhibition of Notch signaling pathway characterize progressive astrocytoma. *Oncogene.* 2005 Oct 27;24(47):7073-83. PubMed PMID: 16103883.

127. Solecki DJ, Liu XL, Tomoda T, Fang Y, Hatten ME. Activated Notch2 signaling inhibits differentiation of cerebellar granule neuron precursors by maintaining proliferation. *Neuron*. 2001 Aug 30;31(4):557-68. PubMed PMID: 11545715.
128. Staberg M, Michaelsen SR, Olsen LS, Nedergaard MK, Villingshøj M, Stockhausen MT, Hamerlik P, Poulsen HS. Combined EGFR- and notch inhibition display additive inhibitory effect on glioblastoma cell viability and glioblastoma-induced endothelial cell sprouting *in vitro*. *Cancer Cell Int*. 2016 Apr 26; 16:34. doi: 10.1186/s12935-016-0309-2. PubMed PMID: 27118928; PubMed Central PMCID: PMC4845362.
129. Stein B, Weintraub WS, Gebhart SP, Cohen-Bernstein CL, Grosswald R, Liberman HA, Douglas JS Jr, Morris DC, King SB 3rd. Influence of diabetes mellitus on early and late outcome after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Circulation*. 1995 Feb 15;91(4):979-89. PubMed PMID: 7850985.
130. Stiewe T, Pützer BM. Role of p73 in malignancy: tumor suppressor or oncogene? *Cell Death Differ*. 2002 Mar;9(3):237-45. Review. PubMed PMID: 11859406.
131. Stindt MH, Muller PA, Ludwig RL, Kehrlöesser S, Dötsch V, Vousden KH. Functional interplay between MDM2, p63/p73 and mutant p53. *Oncogene*. 2015 Aug 13; 34(33):4300-10. doi: 10.1038/onc.2014.359. PubMed PMID: 25417702; PubMed Central PMCID: PMC4351904.
132. Stockhausen MT, Kristoffersen K, Poulsen HS. Notch signaling and brain tumors. *Adv Exp Med Biol*. 2012; 727:289-304. doi: 10.1007/978-1-4614-0899-4_22. Review. PubMed PMID: 22399356.
133. Stockhausen MT, Sjölund J, Axelson H. Regulation of the Notch target gene Hes-1 by TGFalpha induced Ras/MAPK signaling in human neuroblastoma cells. *Exp Cell Res*. 2005 Oct 15; 310(1):218-28. PubMed PMID: 16120441
134. Sugiyama M, Oki E, Nakaji Y, Tsutsumi S, Ono N, Nakanishi R, Sugiyama M, Nakashima Y, Sonoda H, Ohgaki K, Yamashita N, Saeki H, Okano S, Kitao H, Morita M, Oda Y, Maehara Y. High expression of the Notch ligand Jagged-1 is associated with poor prognosis after surgery for colorectal cancer. *Cancer Sci*. 2016 Nov; 107(11):1705-1716. doi: 10.1111/cas.13075. PubMed PMID: 27589478; PubMed Central PMCID: PMC5132269.
135. Suliman Y, Opitz OG, Avadhani A, Burns TC, El-Deiry W, Wong DT, Rustgi AK. p63 expression is associated with p53 loss in oral-esophageal epithelia of p53-deficient mice. *Cancer Res*. 2001 Sep 1;61(17):6467-73. PubMed PMID: 11522642.

T

136. Takebe N, Miele L, Harris PJ, Jeong W, Bando H, Kahn M, Yang SX, Ivy SP. Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015 Aug; 12(8):445-64. doi: 10.1038/nrclinonc.2015.61. Epub 2015 Apr 7. Review. PubMed PMID: 25850553; PubMed Central PMCID: PMC4520755.
137. Talos F, Abraham A, Vaseva AV, Holembowski L, Tsirka SE, Scheel A, Bode D, Dobbstein M, Brück W, Moll UM. p73 is an essential regulator of

- neural stem cell maintenance in embryonal and adult CNS neurogenesis. *Cell Death Differ.* 2010 Dec; 17(12):1816-29. doi: 10.1038/cdd.2010.131. PubMed PMID: 21076477; PubMed Central PMCID: PMC3260880.
138. Tang P, Steck PA, Yung WK. The autocrine loop of TGF- α /EGFR and brain tumors. *J Neurooncol.* 1997 Dec;35(3):303-14. Review. PubMed PMID: 9440027.
139. Tannapfel A, John K, Mise N, Schmidt A, Buhlmann S, Ibrahim SM, Pützer BM. Autonomous growth and hepatocarcinogenesis in transgenic mice expressing the p53 family inhibitor DNp73. *Carcinogenesis.* 2008 Jan;29(1):211-8. PubMed PMID: 17984115.
140. Tao L, Roberts AL, Dunphy KA, Bigelow C, Yan H, Jerry DJ. Repression of mammary stem/progenitor cells by p53 is mediated by Notch and separable from apoptotic activity. *Stem Cells.* 2011 Jan; 29(1):119-27. doi: 10.1002/stem.552. PubMed PMID: 21280161; PubMed Central PMCID: PMC3404152.
141. Thélu J, Rossio P, Favier B. Notch signalling is linked to epidermal cell differentiation level in basal cell carcinoma, psoriasis and wound healing. *BMC Dermatol.* 2002; 2:7. doi: 10.1186/1471-5945-2-7. [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]
142. Teodorczyk M, Schmidt MH. Notching on Cancer's Door: Notch Signaling in Brain Tumors. *Front Oncol.* 2015 Jan 5; 4:341. doi: 10.3389/fonc.2014.00341. Review. PubMed PMID: 25601901; PubMed Central PMCID: PMC4283135
143. Tissir F, Ravni A, Achouri Y, Riethmacher D, Meyer G, Goffinet AM. DeltaNp73 regulates neuronal survival in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Sep 29; 106(39):16871-6. doi: 10.1073/pnas.0903191106. PubMed PMID: 19805388; PubMed Central PMCID: PMC2757832.
144. Tomasini R, Secq V, Pouyet L, Thakur AK, Wilhelm M, Nigri J, Vasseur S, Berthezene P, Calvo E, Melino G, Mak TW, Iovanna JL. TAp73 is required for macrophage-mediated innate immunity and the resolution of inflammatory responses. *Cell Death Differ.* 2013 Feb; 20(2):293-301. doi: 10.1038/cdd.2012.123. PubMed PMID: 22976836; PubMed Central PMCID: PMC3554333.

U

145. Udolph G. Notch signaling and the generation of cell diversity in *Drosophila* neuroblast lineages. *Adv Exp Med Biol.* 2012; 727:47-60. doi:10.1007/978-1-4614-0899-4_4. Review. PubMed PMID: 22399338.

V

146. Venkatanarayan A, Raulji P, Norton W, Flores ER. Novel therapeutic interventions for p53-altered tumors through manipulation of its family members, p63 and p73. *Cell Cycle.* 2016; 15(2):164-71. doi: 10.1080/15384101.2015.1121333. PubMed PMID: 26652033; PubMed Central PMCID: PMC4825839.

147. Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Apr;8(4):275-83.
148. Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE 2nd, Dowell JM, Reardon DA, Quinn JA, Rich JN, Sathornsumetee S, Gururangan S, Wagner M, Bigner DD, Friedman AH, Friedman HS. Phase II trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma. *Clin Cancer Res.* 2007 Feb 15;13(4):1253-9. PubMed PMID: 17317837.

W

149. Wang J, Sullenger BA, Rich JN. Notch signaling in cancer stem cells. *Adv Exp Med Biol.* 2012; 727:174-85. doi: 10.1007/978-1-4614-0899-4_13. Review. PubMed PMID: 22399347.
150. Wang J, Wakeman TP, Lathia JD, Hjelmeland AB, Wang XF, White RR, Rich JN, Sullenger BA. Notch promotes radioresistance of glioma stem cells. *Stem Cells.* 2010 Jan;28(1):17-28. doi: 10.1002/stem.261. PubMed PMID: 19921751; PubMed Central PMCID: PMC2825687.
151. Wang Z, Li Y, Ahmad A, Banerjee S, Azmi AS, Kong D, et al. Down-regulation of Notch-1 is associated with Akt and FoxM1 in inducing cell growth inhibition and apoptosis in prostate cancer cells. *J Cell Biochem.* 2011; 112:78–88. doi: 10.1002/jcb.22770.
152. Watanabe K, Tachibana O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol.* 1996 Jul;6(3):217-23; discussion 23-4. PubMed PMID: 8864278.
153. Weijzen S, Rizzo P, Braid M, Vaishnav R, Jonkheer SM, Zlobin A, Osborne BA, Gottipati S, Aster JC, Hahn WC, Rudolf M, Siziopikou K, Kast WM, Miele L. Activation of Notch-1 signaling maintains the neoplastic phenotype in human Ras-transformed cells. *Nat Med.* 2002 Sep;8(9):979-86. PubMed PMID: 12185362.
154. Weng AP, Aster JC. Multiple niches for Notch in cancer: context is everything. *Curr Opin Genet Dev.* 2004; 14:48–54. doi: 10.1016/j.gde.2003.11.004. [PubMed] [Cross Ref]
155. Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med.* 2008 Jul 31; 359(5):492-507. doi: 10.1056/NEJMra0708126. Review. Erratum in: *N Engl J Med.* 2008 Aug 21;359(8):877. PubMed PMID: 18669428.
156. West S. Progression of nuclear sclerosis and long-term visual results of vitrectomy with transforming growth factor beta-2 for macular holes. *Am J Ophthalmol.* 1995 Jun;119(6):819. PubMed PMID: 7785710.
157. Wiggins HL, Rappoport JZ. An agarose spot assay for chemotactic invasion. *BioTechniques* 2010; 48(2):121-124.
158. Wong AJ, Bigner SH, Bigner DD, Kinzler KW, Hamilton SR, Vogelstein B. Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Oct; 84(19):6899-903. PubMed PMID: 3477813; PubMed Central PMCID: PMC299192.

X

159. Xu P, Qiu M, Zhang Z, Kang C, Jiang R, Jia Z, Wang G, Jiang H, Pu P. The oncogenic roles of Notch1 in astrocytic gliomas *in vitro* and *in vivo*. *J Neurooncol.* 2010 Mar; 97(1):41-51. doi: 10.1007/s11060-009-0007-1. PubMed PMID: 19771395.
160. Xu P, Zhang A, Jiang R, Qiu M, Kang C, Jia Z, Wang G, Han L, Fan X, Pu P. The different role of Notch1 and Notch2 in astrocytic gliomas. *PLoS One.* 2013;8(1):e53654. doi: 10.1371/journal.pone.0053654. Epub 2013 Jan 21. PubMed PMID: 23349727; PubMed Central PMCID: PMC3549979.
161. Xu R, Shimizu F, Hovinga K, Beal K, Karimi S, Droms L, Peck KK, Gutin P, Iorgulescu JB, Kaley T, DeAngelis L, Pentsova E, Nolan C, Grommes C, Chan T, Bobrow D, Hormigo A, Cross JR, Wu N, Takebe N, Panageas K, Ivy P, Supko JG, Tabar V, Omuro A. Molecular and Clinical Effects of Notch Inhibition in Glioma Patients: A Phase 0/I Trial. *Clin Cancer Res.* 2016 Oct 1;22(19):4786-4796. PubMed PMID: 27154916; PubMed Central PMCID: PMC5050072.

Y

162. Yahyanejad S, King H, Iglesias VS, Granton PV, Barbeau LM, van Hoof SJ, Groot AJ, Habets R, Prickaerts J, Chalmers AJ, Eekers DB, Theys J, Short SC, Verhaegen F, Vooijs M. NOTCH blockade combined with radiation therapy and temozolomide prolongs survival of orthotopic glioblastoma. *Oncotarget.* 2016 Jul 5; 7(27):41251-41264. doi: 10.18632/oncotarget.9275. PubMed PMID: 27183910; PubMed Central PMCID: PMC5173056.
163. Yahyanejad S, Theys J, Vooijs M. Targeting Notch to overcome radiation resistance. *Oncotarget.* 2016 Feb 16; 7(7):7610-28. doi: 10.18632/oncotarget.6714. Review. PubMed PMID: 26713603; PubMed Central PMCID: PMC4884942.
164. Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature.* 1991 Jul 25;352(6333):345-7. PubMed PMID: 1852210.
165. Yuan X, Wu H, Xu H, Xiong H, Chu Q, Yu S, Wu GS, Wu K. Notch signaling: an emerging therapeutic target for cancer treatment. *Cancer Lett.* 2015 Dec 1; 369(1):20-7. doi: 10.1016/j.canlet.2015.07.048. Epub 2015 Sep 1. Review. PubMed PMID: 26341688.

Z

166. Zeng Q, Li S, Chepeha DB, Giordano TJ, Li J, Zhang H, Polverini PJ, Nor J, Kitajewski J, Wang CY. Crosstalk between tumor and endothelial cells promotes tumor angiogenesis by MAPK activation of Notch signaling. *Cancer Cell.* 2005 Jul;8(1):13-23. PubMed PMID: 16023595.
167. Zhang M, Ye G, Li J, Wang Y. Recent advance in molecular angiogenesis in glioblastoma: the challenge and hope for anti-angiogenic therapy. *Brain Tumor Pathol.* 2015 Oct; 32(4):229-36. doi: 10.1007/s10014-015-0233-5. Review. PubMed PMID: 26437643.

168. Zhang Y, Li B, Ji ZZ, Zheng PS. Notch1 regulates the growth of human colon cancers. *Cancer*. 2010; 116:5207–18. doi: 10.1002/cncr.25449.
169. Zhao D, Xue C, Lin S, Shi S, Li Q, Liu M, Cai X, Lin Y. Notch Signaling Pathway Regulates Angiogenesis via Endothelial Cell in 3D Co-Culture Model. *J Cell Physiol*. 2017 Jun; 232(6):1548-1558. doi: 10.1002/jcp.25681. PubMed PMID: 27861873.
170. Zhao N, Guo Y, Zhang M, Lin L, Zheng Z. Akt-mTOR signaling is involved in Notch-1-mediated glioma cell survival and proliferation. *Oncol Rep*. 2010 May;23(5):1443-7. PubMed PMID: 20372862.
171. Zheng Y, Lin L, Zheng Z. TGF-alpha induces upregulation and nuclear translocation of Hes1 in glioma cell. *Cell Biochem Funct*. 2008 Aug; 26(6):692-700. doi: 10.1002/cbf.1494. PubMed PMID: 18636

8 Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1: Die verschiedenen Arten von Gliazellen und ihre Funktionen.

Abb. 2: Schematische Darstellung des Notch-Signalwegs

Abb. 3: DNA-Schäden: von der Detektion bis zur Behebung.

Abb. 4: Schematische Darstellung eines Agarose-Spot-Assays.

Abb. 5: Schematische Darstellung des Sandwich-Aufbaus eines Western-Blots

Abb. 6: Regulation der Jagged1-Expression durch p73.

Abb. 7: RNA-Expression ausgewählter Notch-Rezeptoren und -Liganden in Glioblastomzelllinien und in Saos-2-Zellen.

Abb. 8: Protein-Expression ausgesuchter Notch-Rezeptoren und Liganden bei Glioblastomzelllinien.

Abb. 9: FACS-Analysen der Notch-Signalwegkomponenten Notch4 und Jagged2.

Abb. 10: Durchlichtmikroskopische Aufnahmen von U373 und U87 Kulturen nach Behandlung mit ionisierender γ -Strahlung.

Abb. 11: Stimulation der Expression des Notch-Liganden Jagged1 in Glioblastomzelllinien durch Behandlung mit ionisierender Strahlung.

Abb. 12: Ionisierende Strahlung stimuliert die Transkription von *Jagged-1*.

Abb. 13: Behandlung der Gliomzelllinie U87 mit Doxorubicin induziert die Expression des Tumorsuppressors p53.

Abb. 14: Hochdosierte γ -Strahlung stimuliert die Protein-Expression von Jagged1 und TAp73.

Abb. 15: Ionisierende Strahlung induziert die mRNA-Expression von Jagged1 und TAp73 in U373 Zellen.

Abb. 16: Expression von Jagged1, p53 und p73 in Glioblastomzellen (U373, U87) nach Transfektion mit gegen p73 oder Jagged1 gerichteten siRNAs und darauffolgender Behandlung mit ionisierender Strahlung.

Abb. 17: Nachweis einer direkten Bindung von p53 an die Promotorregion von *Jagged1* durch Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) in U87 Glioblastomzellen.

Abb. 18: Nachweis einer direkten Bindung von p73 an die Promotorregion von Jagged1 durch eine Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) in U373 Glioblastomzellen.

Abb. 19: Stabile Transfektion der humanen Glioblastomzelllinien U373, U87 und U138 mit Jagged1.

Abb. 20: Stabile Transfektion der humanen Glioblastomzelllinie U373 mit Jagged1 führt zu einem leichten Anstieg der p73-Proteinexpression.

Abb. 21: Überexpression von Jagged1 steigert das Migrationsverhalten im Agarose-Spot-Assay.

Abb. 22: Konditioniertes Medium aktiviert in U373-Zellen Jagged1 und p73.

9 Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Kurze Beschreibung der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien

Tabelle 2: Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen

Tabelle 3: 50 µl Standard-PCR-Ansatzes für RNA-Analysen

Tabelle 4: 20 µl Standard-PCR-Ansatz für CHIP-Analysen

Tabelle 5: PCR-Standardprogramm für die Amplifikation von cDNA

Tabelle 6: Primerverzeichnis

Tabelle 7: Antikörperverzeichnis

Tabelle 8: RNA-Expression von Notch-Rezeptoren (Notch1-4) und korrespondierenden Liganden (Jagged1, -2; Dll-1, -3) in ausgewählten Glioblastomzelllinien

10 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
35S	Radioaktives Isotop von Schwefel
5FU	5-Fluorouracil
Abb.	Abbildung
AD	Transaktivierungs-Domäne
ADR	Adriamycin
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BD	Basische Domäne
BLAST	basic local alignment search tool
BMH	Bis-maleimidohexan
bp, kb Basen.,	Kilobasenpaare
BSA	„Bovine serum albumine“, Rinderserumalbumin
C	Kohlenstoff
C.elegans	Caenorhabditis elegans
ca.	circa
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalievirus
CO ₂	Kohlendioxid
D.melanogaster	Drosophila melanogaster
Da, kDa Dalton,	Kilodalton
DBD	DNA-Bindedomäne
dd H ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DII	Delta-like protein

Abkürzungsverzeichnis

DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiotreithol
E.coli	Escherichia coli
ECL	Elektrochemolumineszenz
EGF	Epidermal Growth Factor
et al.	und Mitarbeiter
evtl.	eventuell
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluoreszin
FKS	Fötales Kälberserum
fwd	forward
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GLD	Glutaraldehyd
GSI	Gamma Secretase-Inhibitoren
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
H ₂ O _{dd}	Bidestilliertes Wasser
HCL	Chlorwasserstoff
HRP	Meerrettich-Peroxidase
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INHAT	Inhibitor der Histon-Acetyltransferase
J	Joule
Jag1	Jagged1
kDa	Kilo-Dalton
l Lambda	Wellenlänge
l	Liter
LB	„Luria broth“
LPS	Lipopolysaccharid

Abkürzungsverzeichnis

LTR	long terminal repeat
μ	Mikro
m	Milli
M	Molar
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-aktivierten Protein Kinasen
MCS	multiple cloning site
MDM2	Mouse double minute 2 homolog
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mtDNA	mitochondriale DNA
NF-κB	Nuklear Faktor-κB
ng	Nanogramm
NLS	Kernlokalisierungssignal
nm	Nanometer
Ø	unbehandelt
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (engl: phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PRD	Prolin-reiche Domäne
Rev	Reverse
RNA	„Ribonucleic acid“, Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoff-Spezies
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: rounds per minute)
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription Polymerasekettenreaktion
SAM	„sterile alpha motif“
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sec	Sekunde
siRNA	Small interfering RNAs
SV40	„Simian virus 40“

T3	Trijodthyronin
Δ -TA	ohne Transaktivierungsdomäne
TA	Transaktivierungs-
TBS-T	Tris-buffered-saline-TWEEN
TD	Tetramerisierungsdomäne
TEMED	N',N',N',N'-Tetramethylethyldiamid
TNF- α	Tumornekrosefaktoren
U	„Unit“, Einheit
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

11 Veröffentlichungen

Literaturverzeichnis Sandra Reichrath (geborene Hess):

Reichrath S, Reichrath J, Moussa AT, Meier C, Tschernig T. Targeting the non neuronal cholinergic system in macrophages for the management of infectious diseases and cancer: challenge and promise. *Cell Death Discov.* 2016 Oct 17;2:16063. eCollection 2016 Oct 17. Review. PubMed PMID: 27785369; PubMed Central PMCID: PMC5066265.

Reichrath S, Reichrath J. No evidence for induction of key components of the Notch signaling pathway (Notch-1, Jagged-1) by treatment with UV-B, 1,25(OH)(2)D(3), and/or epigenetic drugs (TSA, 5-Aza) in human keratinocytes in vitro. *Dermatoendocrinol.* 2012 Jan 1;4(1):44-52. doi: 0.4161/derm.19027.

Reichrath J, **Reichrath S**. Hope and challenge: the importance of ultraviolet (UV) radiation for cutaneous vitamin D synthesis and skin cancer. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 2012 Apr;243:112-9. doi: 10.3109/00365513.2012.682876.

Reichrath J, **Reichrath S**. Notch-signaling and nonmelanoma skin cancer: an ancient friend, revisited. *Adv Exp Med Biol.* 2012;727:265-71. doi: 10.1007/978-1-4614-0899-4_20.

Essa S, **Reichrath S**, Mahlknecht U, Montenarh M, Vogt T, Reichrath J. Signature of VDR miRNAs and epigenetic modulation of vitamin D signaling in melanoma cell lines. *Anticancer Res.* 2012 Jan;32(1):383-9.

Köstner K, Denzer N, Koreng M, **Reichrath S**, Gräber S, Klein R, Tilgen W, Vogt T, Reichrath J. Association of genetic variants of the vitamin D receptor (VDR) with cutaneous squamous cell carcinomas (SCC) and basal cell carcinomas (BCC): a pilot study in a German population. *Anticancer Res.* 2012 Jan;32(1):327-33.

Reichrath S, Müller CS, Gleissner B, Pfreundschuh M, Vogt T, Reichrath J. Notch- and vitamin D signaling in 1,25(OH)2D3-resistant glioblastoma multiforme (GBM) cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010 Jul;121(1-2):420-4. doi: 10.1016/j.jsbmb.2010.02.028. Epub 2010 Mar 4.

Hess S, Pfreundschuh M, Gleissner B. Notch signaling. *J Neurosurg.* 2007 Nov;107(5):1060-1. author reply 1061-2.

Assmann G, Werner C, Herrmann M, Momber D, Krenn T, Lothschütz D, Fischer L, **Hess S**, Ketter R, Feiden W, Jung S, Herrmann W, Schubert J, Pfreundschuh M, Widmann T. Detection of Meningeosis neoplastica by real-time quantitation of telomerase activity. *Clin Chem Lab Med.* 2009;47(10):1271-6. doi: 10.1515/CCLM.2009.258.

Navarrete CM, Fiebich BL, de Vinuesa AG, **Hess S**, de Oliveira AC, Candelario-Jalil E, Caballero FJ, Calzado MA, Muñoz E. Opposite effects of anandamide and N-

arachidonoyl dopamine in the regulation of prostaglandin E and 8-iso-PGF formation in primary glial cells. *J Neurochem.* 2009 Apr;109(2):452-64. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.05966.x. Epub 2009 Feb 7.

Hess S. Untersuchungen zur Wirkung von Cannabinoiden/Endocannabinoiden und AM 404 auf primäre Mikrogliazellen der Ratte und humane Monozyten. Diplomarbeit an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau, Fakultät Biologie. 2006.

Caballero FJ, Navarrete CM, **Hess S**, Fiebich BL, Appendino G, Macho A, Muñoz E, Sancho R. The acetaminophen-derived bioactive N-acylphenolamine AM404 inhibits NFAT by targeting nuclear regulatory events. *Biochem Pharmacol.* 2007 Apr 1;73(7):1013-23. Epub 2006 Dec 15.

Akundi RS, Candelario-Jalil E, **Hess S**, Hüll M, Lieb K, Gebicke-Haerter PJ, Fiebich BL. Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-activated primary rat microglia. *Glia.* 2005 Aug 15;51(3):199-208.

Fiebich BL, Grozdeva M, **Hess S**, Hüll M, Danesch U, Bodensieck A, Bauer R. *Petasites hybridus* extracts in vitro inhibit COX-2 and PGE2 release by direct interaction with the enzyme and by preventing p42/44 MAP kinase activation in rat primary microglial cells. *Planta Med.* 2005 Jan;71(1):12-9.

Herausgeberschaften:

Notch Signaling in Embryology and Cancer (Herausgeber: *Jörg Reichrath* und **Sandra Reichrath**). Landes Bioscience, Austin, USA und Springer Science+Business Media, New York, USA, 2012.

12 Danksagung

Ich möchte mich bei Allen bedanken, die zum Gelingen dieser Promotionsarbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt zunächst Frau PD Dr. Gleissner für die Überlassung des interessanten Themas.

Besonders danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Pfreundschuh, der es mir nach dem Weggang von Frau PD Dr. Gleissner ermöglichte diese Promotionsarbeit in seinem Labor fertigzustellen und der mich während jeder Phase dieser Arbeit uneingeschränkt unterstützte.

Desweiteren bin ich überaus dankbar, dass ich mich an die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Klaus Römer im Jose Carreras Zentrum der Inneren Medizin I angliedern durfte. Hier lernte ich die wunderbare Welt des Tumorsuppressors p53 kennen. Die Diskussionen mit Herrn Prof. Römer, sein kompetenter Rat und seine Unterstützung trugen wesentlich zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit bei.

Danke möchte ich auch Herrn Prof. Meese vom hiesigen Institut für Humangenetik für die Bereitstellung von Glioblastomzelllinien.

Besonders danken möchte ich auch Frau Dr. Heyne für die vielen inspirierenden freundschaftlichen kritischen Diskussionen in allen Situationen die einem im Laboralltag begegnen. Die Zusammenarbeit war in vielen Bereichen bewusstseinsweiternd. Durch Sie lernte ich erkennen was ein Zeigefinger alles zu bedeuten hat. Auch Frau Maria Kemele hat mich liebevoll in die Laborhygiene eingeführt. Und auch Sie hat mich physisch wie psychisch durch den Laboralltag begleitet und mir die enorme Wichtigkeit der E's erläutert.

Frau Evi Regitz danke ich für die freundliche, geduldige und kompetente Unterstützung bei der Durchführung einzelner Experimente. Sie zeigte mir die Welt der Klone.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Mitdotorandin Eva Chmielnik und PD Dr. Herrn Frank Neumann sowie alle Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen des Jose Carreras Zentrums der Inneren Medizin I für die außerordentlich gute Zusammenarbeit.

Der erfolgreiche Abschluss dieser Arbeit wäre ohne ihre Hilfe nicht möglich gewesen, weshalb ich mich bei allen herzlich bedanken will.

Allen meinen lieben Freunden danke ich für die Ausdauer, Ruhe und Geduld, womit sie mir stets zur Seite standen.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern Hannelore und Bernd Hess, die mir das Studium der Biologie ermöglichten und mir auch während der Anfertigung der Doktorarbeit immerzu unterstützend zur Seite standen auch wenn Sie nicht immer wussten was genau ich so gemacht habe.

Meinem allergrößten Dank gilt meiner kleinen Familie. Mein Mann Prof. Dr. Jörg Reichrath hat das ganze Ausmass hautnah miterlebt. Ihm danke ich liebevoll und von ganzem Herzen für die uneingeschränkte und geduldige Bereitschaft mich durch diese anstrengende Zeit zu begleiten und zu unterstützen. An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meinen zwei Jungs Niklas und Benjamin bedanken und entschuldigen. Jetzt werden Sie diesen DANK noch nicht verstehen aber ich hoffe sie können später verstehen warum die Mama manchmal sehr unausgeglichen war. Danke, dass Kinder so sind wie sie sind, lebensfroh und uneingeschränkt ehrlich.
