

Aus der Abteilung  
für Neuropathologie  
Prof. Dr. med. Markus J. Riemenschneider  
der medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

Untersuchung zur Bedeutung der USP3-abhängigen Histon-Deubiquitinierung  
in humanen Gliomen

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Christine Theresa Zander

2024

Dekan:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Markus J. Riemenschneider

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Eugen Kerkhoff

Tag der mündlichen Prüfung:

25. September 2024

In Gedenken an  
Christoph Zander  
(1961 – 2012)

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>9</b>
1.1	Höhergradige Gliome .....	9
1.2	Der Histon-Code .....	18
1.3	Die Deubiquitinase USP3.....	23
1.4	Forschungsvorhaben dieser Arbeit .....	27
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>28</b>
2.1	Material .....	28
2.1.1	Gliom-Gewebeschnitte.....	28
2.1.2	Zelllinien .....	28
2.1.3	Plasmid-DNA für transiente Transfektion .....	29
2.1.4	Oligonukleotide .....	29
2.1.4.1	PCR-Primer .....	29
2.1.4.2	siRNA für transiente Transfektion .....	29
2.1.5	Antikörper .....	30
2.1.6	Chemikalien .....	30
2.1.7	Lösungen .....	32
2.1.8	Verbrauchsmaterialien .....	32
2.1.9	Kits .....	33
2.1.10	Geräte und Ausstattung.....	34
2.1.11	Software .....	35
2.2	Methoden.....	37
2.2.1	Zellbiologische Methoden.....	37
2.2.1.1	Kultivierung.....	37
2.2.1.2	Zellernte und Aussaat.....	37
2.2.1.3	Transfektion.....	38
2.2.1.4	Proliferations-Assay.....	39
2.2.1.5	Apoptose-Assay.....	39
2.2.1.6	Lomustin-Chemosensitivitäts-Assay .....	40
2.2.1.7	Zelluläre Antwort auf DNA-Schaden .....	40
2.2.2	Molekularbiologische Arbeiten .....	41
2.2.2.1	RNA-Isolierung und Konzentrationsbestimmung.....	41
2.2.2.2	Synthese von komplementärer DNA .....	41
2.2.2.3	Quantitative Echtzeit-PCR.....	41
2.2.2.4	Next-Generation Sequencing.....	43
2.2.3	Proteinbiochemische Arbeiten .....	44
2.2.3.1	Herstellung von Gesamtproteinextrakten .....	44
2.2.3.2	Histonextraktion .....	44
2.2.3.3	Konzentrationsbestimmung der Protein- und Histonextrakte .....	45
2.2.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	45
2.2.3.5	Western Blot .....	46
2.2.3.6	Immunhistochemie.....	47

2.2.4	Bioinformatische Methoden.....	48
2.2.4.1	Statistische Auswertung.....	48
2.2.4.2	Datenverarbeitung.....	48
2.2.4.3	Hauptkomponentenanalyse.....	49
2.2.4.4	Gene Set Enrichment Analysis.....	49
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>50</b>
3.1	Expression von <i>USP3</i> .....	50
3.1.1	Expression von <i>USP3</i> in Gliomzelllinien .....	50
3.1.2	Expression von <i>USP3</i> in Hirntumorschnitten.....	51
3.2	<i>USP3</i> -Knockdown und -Überexpression .....	54
3.2.1	RNA und Protein .....	54
3.2.2	Ubiquitinierung.....	56
3.2.3	Next-Generation Sequencing.....	58
3.3	Funktionelle Untersuchungen .....	61
3.3.1	Proliferation .....	61
3.3.2	Apoptose .....	62
3.3.3	Chemosensitivität .....	62
3.3.4	Zelluläre Antwort auf DNA-Schäden.....	64
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>68</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>86</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>87</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>102</b>
7.1	Abbildungsverzeichnis .....	102
7.2	Tabellenverzeichnis .....	102
7.3	Danksagung.....	104

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

53BP1	Tumorprotein-p53-Bindeprotein 1
ANOVA	Varianzanalyse
ARC	<i>activity-regulated cytoskeleton-associated protein</i> (Gen)
ARF	Adenosyl-Ribosylierungs-Faktor (Gen)
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>ataxia telangiectasia and Rad3 related</i>
BMI1	<i>B cell-specific moloney murine leukemia virus integration site 1</i>
bp	Basenpaare
BRCA1	Brustkrebs-assoziiertes Protein 1
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> NaO <sub>7</sub>	(Mono-)Natriumcitrat
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cDNA	komplementäre DNA
CHEK1	Checkpoint-Kinase 1
c-Myc (MYC)	basischer Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktor e39
Ct	<i>cycle threshold</i>
CYP1A1	Cytochrom P450 1A1 (Gen)
DAB	Diaminobenzidin
DDR	<i>DNA damage repair</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DOC	Desoxycholsäure
DSBs	Doppelstrangbrüche
DTT	Dithiothreitol
DUBs	Deubiquitinasen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC-50 (IC-50)	mittlere effektive (inhibitorische) Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (Gen)
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FCS	fetales Kälberserum
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FOS	<i>FBJ osteosarcoma virus protooncogene</i> (Gen)
G-CIMP	<i>glioma CpG island methylator phenotype</i>
GSEA	<i>gen set enrichment analysis</i>
H2A	Histon 2A
H2Aub	ubiquitiniertes Histon 2A
H2AX	Histon 2AX
H2B	Histon 2B
H <sub>2</sub> O	Wasser
H3	Histon 3
H4	Histon 4

HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
<i>HIST2H4A</i>	<i>histone gene cluster 2, H4 histone family, member A</i> (Gen)
<i>HIST2H4B</i>	<i>histone gene cluster 2, H4 histone family, member B</i> (Gen)
<i>HSPA6</i>	Hitzeschockprotein A6 (Gen)
<i>HSPA7</i>	Hitzeschockprotein A7 (Gen)
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
<i>IDH</i>	Isocitrat-Dehydrogenase (Gen)
IHC	Immunhistochemie
IRIFs	<i>ionising radiation induced foci</i>
KCl	Kaliumchlorid
KFB	Kompetenzzentrum für Fluoreszenz Bioanalytik - Regensburg
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Kaliumhydrogenphosphat
LB	<i>lysogeny broth</i>
MAPK/ERK	<i>mitogen-activated protein kinase 1</i>
MDC1	<i>mediator of DNA damage checkpoint protein 1</i>
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
$\text{MgCl}_2$	Magnesiumchlorid
<i>MGMT</i>	O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (Gen)
miRNA	<i>microRNA</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
mut.	mutiert
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	(Di-)Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NGS	Next-Generation Sequencing
N-Myc (MYCN)	basischer Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktor e37
NP-40	Nonylphenoethoxylat
<i>NR1D1</i>	<i>nuclear receptor 1D1</i> (Gen)
NTC	<i>non-targeting control</i>
p53	Tumorprotein p53, nukleärer Transkriptionsfaktor p53
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PBS-T	phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween® 20
PCA	Hauptkomponentenanalyse
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
<i>PDGFRA</i>	<i>platelet-derived growth factor receptor alpha</i> (Gen)
PDGFR $\alpha$ (PDGFRA)	<i>platelet-derived growth factor receptor alpha</i>
PET-CT	Positronen-Emissions-Tomographie-Computertomographie
<i>PLEKHG3</i>	<i>pleckstrin homology domain-containing protein G3</i> (Gen)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRC	<i>polycomb repressive complex</i>
<i>PTEN</i>	<i>phosphatase and tensin homolog</i> (Gen)
PTMs	posttranslationale Modifikationen
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR
RAP80 (UIMC1)	<i>ubiquitin interaction motif-containing protein 1</i>
RIPA	Radioimmunpräzipitations-Assay
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>

RNA .....	Ribonukleinsäure
RNF .....	RING-Finger-Protein
RPKM .....	<i>reads per kilobase per million mapped reads</i>
RT .....	Raumtemperatur
SDS .....	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE .....	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA .....	<i>small interfering RNA</i>
SIRPA .....	<i>signal regulatory protein alpha type 1</i> (Gen)
SMC5/6 .....	<i>structural maintenance of chromosomes 5/6 complex</i>
SNAI1 .....	<i>Snail family transcriptional repressor 1</i>
SUZ12 .....	<i>PRC2 subunit suppressor of zeste 12</i>
TBS .....	TRIS-gepufferte Salzlösung
TCGA .....	<i>The Cancer Genome Atlas Program</i>
TERT .....	Telomerase-Reverse-Transkriptase (Gen)
TP53 .....	TP53-Tumorsuppressor (Gen)
TRIS .....	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton X-100 .....	T-Octylphenoxypolyethoxyethanol
Tween® 20 .....	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
USP .....	Ubiquitin-spezifische Protease
USP3 .....	Ubiquitin-spezifische Protease 3
USP3 .....	Ubiquitin-spezifische Protease 3 (Gen)
VEGF .....	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
WHO .....	<i>World Health Organization</i>
Wnt .....	<i>wingless int-1</i>
wt .....	Wildtyp
ZNS .....	zentrales Nervensystem
γH2AX .....	phosphoryliertes Histon 2AX
γH2AXub .....	ubiquitiniertes γH2AX

# 1 Einleitung

Mit einer Inzidenz von 4,67 bis 5,73 auf 100.000 Einwohner pro Jahr fallen Gliome als maligne Neubildungen des zentralen Nervensystems in die Kategorie der seltenen Erkrankungen (1,2). Trotz der vergleichsweise niedrigen Inzidenz ist die Bedeutung dieser primären Hirntumoren unter Berücksichtigung der schweren und lebensbedrohlichen Verläufe nicht nur für den Einzelnen, sondern auch für die Gesellschaft als hoch einzuschätzen (1,3). Der Großteil der Gliome entfällt auf hochmaligne Glioblastome bzw. Astrozytome des WHO-Grades 4 mit in der Regel infauster Prognose. Auch unter maximaler Behandlung liegen die mittleren Überlebenszeiten in Abhängigkeit von Komorbiditäten, Mutationsstatus und Therapieansprechen bei ein bis zwei Jahren (4–6). Ungeachtet der intensiven Forschung und Fortschritte in weiten Bereichen der Krebsmedizin hat sich das Gesamtüberleben von Glioblastompatienten und -patientinnen unter der Standardtherapie nach den Empfehlungen der aktuellen S2k-Leitlinie aus dem Jahr 2021 in den letzten Dekaden nicht entscheidend verbessert (4,6,7).

Sowohl die stagnierenden Lebenserwartungen als auch die Entwicklungsstufe der aktuellen klinischen Leitlinie spiegeln die bestehende Problematik in der Therapie der höhergradigen Gliome wider und verdeutlichen die Notwendigkeit weiterer Forschungsanstrengungen.

## 1.1 Höhergradige Gliome

### Epidemiologie

Gliome sind Hirntumore, die sich aus Stamm- und Vorläuferzellen des Binde- und Stützgewebes des Gehirns entwickeln (8,9). Mit ca. 81 % machen die Gliome den größten Anteil primärer Malignome des Gehirns aus und sind nach der Gruppe der Tumormetastasen die zweithäufigste bösartige intrakranielle Neubildung (1,5). Bei der Mehrheit der diagnostizierten Gliome handelt es sich nach Klassifikation der *World Health Organization* (WHO) um höhergradige Tumoren der Grade 3 und 4. Etwa 10 % entfallen auf diffus infiltrierende Astrozytome WHO-Grad 3, vormals anaplastische Astrozytome, und über zwei Drittel auf hochmaligne Gliome des WHO-Grades 4 (4,10,11). Gemäß der neuesten Leitlinie aus dem Jahr 2021 sind von letzteren ca. 90 % anhand ihres Isocitrat-Dehydrogenase-(*IDH*-)Mutationsstatus als Glioblastome, *IDH*-Wildtyp (WHO-Grad 4) und 10 % als Astrozytome, *IDH*-mutiert (WHO-Grad 4) einzuordnen (7,11,12). Die Inzidenz der Grad-4-Gliome ist mit 3-5/100.000 anzugeben. Das Glioblastom, *IDH*-Wildtyp ist somit der

häufigste maligne primäre Hirntumor im Erwachsenenalter (1,4,10). Es handelt sich um eine Erkrankung des mittleren bis höheren Lebensalters mit einem Erkrankungsgipfel um das 60. Lebensjahr. Männer sind gegenüber Frauen im Verhältnis 1,2:1 bis 1,6:1 vermehrt betroffen (4,10). Präventive Maßnahmen sind aufgrund der ungeklärten, wohl aber multifaktoriellen Ätiopathogenese – von seltenen genetischen Tumorsyndromen wie dem Li-Fraumeni-Syndrom oder der Neurofibromatose abgesehen – bisher kaum möglich. Als einzig valider Risikofaktor gilt derzeit ionisierende Strahlung im Kopfbereich. Allergie- und Atopieneigung werden eine protektive Wirkung zugeschrieben (1,5,11).

Die epidemiologischen Parameter beziehen sich auf Deutschland im Beobachtungszeitraum 2017 bis 2018 und entstammen der Gesundheitsberichterstattung des Bundes durch das Robert-Koch-Institut (4). Während für Westeuropa und die USA vergleichbare Inzidenzen erhoben werden, liegen diese in Asien und Afrika niedriger, was sowohl durch abweichende Versorgungs- als auch Altersstrukturen mitbedingt sein kann. Auch die leicht steigenden Inzidenzen der letzten Jahre in Deutschland sind am ehesten dem demographischen Wandel zuzuschreiben (5,10,13).

### **Symptome**

Die häufigsten Symptome bei Gliompatienten und -patientinnen sind kognitive Störungen, epileptische Anfälle und fokalneurologische Defizite wie Aphasie oder motorische und sensorische Ausfälle. Die Auftretenswahrscheinlichkeit einzelner Symptome korreliert mit Alter der Erkrankten und Tumorgrad. Jüngere Betroffene und jene mit niedriggradigen Gliomen bis einschließlich WHO-Grad 2 werden am häufigsten (bis zu 80 %) mit neu aufgetretenen epileptischen Anfällen symptomatisch, diese sind aber auch bei etwa der Hälfte der Erkrankten mit höhergradigen Tumoren zu beobachten. Ältere Erkrankte und jene mit Tumoren der WHO-Grade 3 und 4 weisen vermehrt kognitive Störungen auf. Weitere Symptome sind Kopfschmerzen und andere Zeichen eines erhöhten Hirndrucks wie Übelkeit, Erbrechen, Schwindel, Gangstörungen, Gesichtsfeldeinschränkungen, Hirnnervenausfälle oder Bewusstseinstörung. Kopfschmerzen treten nur selten monosymptomatisch als Zeichen eines Hirntumors auf und sind aufgrund ihrer Häufigkeit in der Allgemeinbevölkerung unspezifisch (7,14–16).

## **Diagnostik**

Die bildgebende Routinediagnostik zur Abschätzung von Größe, Form, Ausbreitung und Lage in Bezug zu anderen Hirnstrukturen ist die MRT (Magnetresonanztomographie). Spezielle Techniken wie die Diffusions- (17) und Perfusionswichtung (18) können bei bestimmten Fragestellungen nach beispielsweise Zelldichte oder auch Therapieansprechen eingesetzt werden. Ebenso kann als weitere Bildgebung eine PET-CT (Positronen-Emissions-Tomographie-Computertomographie) durchgeführt werden. Standard bleibt allerdings, auch aufgrund ihrer Strahlenfreiheit, die MRT-Untersuchung (7,19,20).

Zur Diagnosesicherung, Klassifizierung und entsprechender Therapieplanung ist eine feingewebliche Untersuchung unabdingbar. Die Gewebegewinnung erfolgt mittels stereotaktischer Biopsie oder direkt im Rahmen einer primären und möglichst vollständigen mikroinvasiven Tumorresektion (7,19,21). Neben der Histologie werden auch molekularpathologische Biomarker zur Einordnung herangezogen, wobei als Methoden unter anderem Immunhistochemie (IHC), Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) und verschiedene DNA/RNA-Sequenzierungs-Verfahren eingesetzt werden (22,23).

Es sind derzeit keine Screening-Verfahren für Gliome etabliert. Aktuelle Forschung beschäftigt sich diesbezüglich unter anderem mit den diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten der Analyse extrazellulärer Vesikel in Ergänzung zur Biopsie oder als Alternative, wenn diese nicht möglich ist. Im Zuge der Errichtung eines sogenannten Tumor-Mikromilieus (*micro environment*) in der Umgebung des Tumors kommt es zur Sezernierung membranumhüllter Partikel von DNA, mRNA, miRNA, Proteinen und Fetten in Körperflüssigkeiten wie Blut oder Liquor. Durch nichtinvasive Untersuchung dieser Mikrovesikel erhofft man sich frühere Diagnosen, Hinweise auf Eigenschaften und Prognose des Tumors sowie ein neuartiges Monitoring des Tumorprogresses und Therapieverlaufs (20,24).

## **Therapie und Prognose**

Die aktuelle Standardtherapie höhergradiger Gliome nach S2k-Leitlinie umfasst nach Abwägung des Ausmaßes operationsbedingter, neuer neurologischer Defizite die möglichst vollständige neurochirurgische Operation oder alternativ die Biopsie des Tumors jeweils gefolgt von einer Strahlentherapie der erweiterten Tumorregion mit anschließender Erhaltungskemotherapie mit dem Alkylans Temozolomid in meist zwölf Zyklen. Bei Glioblastomen, *IDH*-Wildtyp erfolgt nach initialer Triple-Therapie die Erweiterung des Therapieregimes um eine adjuvante Temozolomid-Therapie in sechs Zyklen (7,19,25).

Die Behandlung höhergradiger Gliome ist komplex und wird neben dem mangelnden Verständnis für die Pathophysiologie des Tumors durch mehrere Faktoren erschwert. Die lokale chirurgische Therapie wird begrenzt durch diffuses, das gesunde Gewebe infiltrierendes Wachstum und ist abhängig von Größe, Form, Lage und Gefäßversorgung des Tumors. Da die totale Resektion zu signifikant besserer Überlebenszeit gegenüber der subtotalen Resektion führt, gilt es diese unter bestmöglicher Schonung sensitiver benachbarter Hirnregionen nach Möglichkeit zu erreichen. Auch eine zytoreduktive Resektion geht gegenüber alleiniger Biopsie mit einem verbesserten Gesamtüberleben einher. Die intraoperative Verwendung von tumorspezifischen fluoreszierenden Substanzen ermöglicht einen höheren Anteil an vollständigen Resektionen (21,26–28). Weiterhin sind zur Überwindung der Blut-Hirnschranke mitunter hohe Substanzkonzentrationen in der Chemotherapie notwendig, die vermehrt zu systemischen Nebenwirkungen führen. Das Ausmaß der Radiotherapie, standardmäßig eine externe lokalisierte Bestrahlung über sechs Wochen an fünf Tagen pro Woche, wird durch die hohe Sensibilität wichtiger Hirnregionen gegenüber ionisierender Strahlung limitiert. Außerdem weisen höhergradige Gliome hohe Zellteilungsraten sowie eine schnelle Resistenzentwicklung nach Therapiebeginn auf. Insbesondere Gliome mit Mutationen, die zur Hyperaktivität von Reparaturmechanismen nach Doppelstrangbrüchen (DSBs) führen, zeigen eine vermehrte Resistenzentwicklung. Dazu kommt ein häufig fortgeschrittenes Lebensalter der Erkrankten mit entsprechenden Komorbiditäten, die sich negativ auf die Therapieverträglichkeit auswirken (20,29,30).

Mitbedingt durch diese therapeutischen Problemfelder ist die prognostische Überlebenszeit nach Diagnose unter standardmäßiger Dreifachtherapie schlecht. Das Gesamtüberleben korreliert negativ mit der Stufe der WHO-Einteilung der Gliome. So liegt die prozentuale 5-Jahres-Überlebensrate beim anaplastischen Astrozytom bei ca. 25 % und sinkt auf unter 10 % beim aggressiveren Glioblastom. Das Glioblastom verursacht deshalb mit 3-4 % einen überproportionalen Anteil der Krebstodesfälle (4–6,10).

Durch Untersuchungen an Patienten und Patientinnen mit überdurchschnittlichem Gesamtüberleben konnten prognostisch günstige Faktoren erarbeitet werden. Positiv wirken sich demnach weibliches Geschlecht, niedriges Erkrankungsalter, ein guter Gesundheitsstatus bei Erstdiagnose quantifizierbar durch den Karnofsky-Index und eine möglichst vollständige initiale chirurgische Resektion des Tumors aus. Zusätzlich sind oligodendrogliale Merkmale in der Histologie sowie bestimmte molekulare Marker und genetische Mutationen vorteilhaft. Dazu zählen der *MGMT*-Promotor-Hypermethylierungs-

Status, die 1p19q-Deletion und die *IDH*-Mutation. Negative prognostische Faktoren sind hingegen das Vorliegen spezifischer genetischer Veränderungen wie Mutationen in unter anderem *TP53*, *PDGFRA*, *TERT*-Promotor und *PTEN* oder die *EGFR*-Amplifikation, die zur Entkoppelung der Proliferation führen (6,31,32).

Derzeit wird intensiv an neuen Therapieansätzen geforscht, die als Ergänzung zur bestehenden Dreifachtherapie die Prognose verbessern sollen oder bei Rezidiven erprobt werden, für die es aktuell keine standardisierte Therapie gibt. In laufenden Studien der Phasen eins bis drei werden spezifische Inhibitoren, apparativ-interventionelle Therapien mit alternierenden elektrischen Feldern, monoklonale Antikörper, die Kopplung von Wirkstoffen an tumorspezifische Substanzen sowie Immunmodulatoren erprobt. Diese Behandlungen sind jedoch bisher nicht Therapiestandard und stehen nur einem begrenzten Patientenkollektiv im Rahmen klinischer Studien offen, wobei Ergebnisse zur Effektivität und Langzeitsicherheit größtenteils noch ausstehen (7,20).

Die Therapieversuche mit Inhibitoren und spezifischen monoklonalen Antikörpern richten sich bevorzugt gegen proliferative Signalwege wie den EGFR- und den Wnt-Pathway. Sie interagieren mit beteiligten Zelloberflächenrezeptoren, Liganden oder der nachgeschalteten Signalübermittlung in den Tumorzellen. Erforscht werden unter anderem Tyrosin-Kinase-Inhibitoren, Antikörper gegen EGFR (Cetuximab), PDGFR $\alpha$  (Imatinib) und VEGF (Bevacizumab). Letzterer richtet sich gegen die Gefäßversorgung des Tumors und führt in Studien zu verminderter Tumorgroße und einem längeren progressionsfreien Zeitraum, jedoch keinem verbesserten Gesamtüberleben. Auch Inhibitoren, die über epigenetische Modulation zu veränderter Genexpression führen, könnten in Zukunft eine Therapieoption darstellen (6,20,33,34).

Große Hoffnungen werden in Therapieansätze im Feld der Immunmodulation gesetzt. Grundgedanke der Immuntherapie ist die Unterstützung des patienteneigenen Immunsystems, sodass dieses Krebszellen effektiver erkennen und abtöten kann. Dieser Ansatz erhält zusätzliche Relevanz vor dem Hintergrund aktueller Erkenntnisse zur Ausbildung des den Tumor umgebenden Mikromilieus. Durch Produktion von immunsuppressiven Zytokinen mit inhibitorischer Wirkung auf T-Zellen, Effekte auf die Ausschüttung von Interleukinen sowie auf die Antigen-Präsentation verursacht der Tumor eine funktionale Immunsuppression in seiner Umgebung, um der Immunantwort des Körpers zu entgehen (20,35,36). Behandlungen mit Checkpoint-Inhibitoren zur Enthemmung der Immunabwehr oder auch eine Tumorstabilisierung durch Impfung

tumorspezifischer Antigenbestandteile weisen vielversprechende Zwischenergebnisse mit potenziell verbessertem Gesamtüberleben auf. In ersten Fallstudien zu chimären-Antigenrezeptor-(CAR-)T-Zell-Therapien bei Gliompatienten und -patientinnen seien radiologisch teils positive Resultate beobachtet worden (35,37). Viele der Studien befinden sich jedoch noch in den Phasen eins und zwei, sodass eine endgültige Bewertung hinsichtlich Wirksamkeit und Nebenwirkungsprofil noch aussteht (20,35,36).

Trotz der Entwicklungen der letzten Jahre stagniert in Deutschland die Entwicklung der Sterberaten an malignen Tumoren des zentralen Nervensystems (ZNS) laut des zweijährlich veröffentlichten Berichts „Krebs in Deutschland“ für die Jahre 2013 bis 2018 des Robert Koch-Instituts seit der Jahrtausendwende auf einem stabilen Niveau (4,38). Insbesondere für die WHO-Grad-4-Gliome ist wie bereits eingangs erwähnt keine signifikante Besserung der Überlebensraten in den letzten Jahrzehnten zu beobachten (6,25).

### **Einteilung**

Die Einteilung der Gliome im Erwachsenenalter erfolgt traditionell nach histologischen Kriterien. Tumoren mit diffusem Wachstumsmuster, bei denen vereinzelte Tumorzellen gesundes Hirngewebe infiltrieren, werden von solchen mit umschriebenem Wachstum unterschieden. Während Gliome mit lokalisierter Ausbreitung vorwiegend den WHO-Graden 1 und seltener auch 2 zuzuordnen sind, werden diffuse Hirntumoren aufgrund des aggressiveren Wachstums mit den Schweregraden 2 bis 4 klassifiziert. Innerhalb der Gruppe der diffus infiltrierenden Gliome lässt sich eine weitere Einteilung nach vorwiegender phänotypischer Ähnlichkeit zum mutmaßlichen glialen Ursprungsgewebe in astrozytär oder oligodendroglial treffen. Anhand histomorphologischer Merkmale, die mit zunehmendem Proliferationsverhalten und erhöhter Malignität korrelieren, werden den Entitäten die entsprechenden WHO-Grade zugeordnet. Es ergibt sich die Untergliederung der diffusen Gliome des Erwachsenenalters in Astrozytome der Grade 2-4, Oligodendrogliome Grad 2-3 sowie hochmaligne Glioblastome WHO-Grad 4 (7,11,12,36).

In dieser Arbeit wurden speziell höhergradige Gliome der WHO-Grade 3 und 4 betrachtet. Tumorschnitte und Tumorzelllinien stammen, gemäß der zum Diagnosezeitpunkt gültigen WHO-Klassifikation, von ehemals sogenannten anaplastischen Astrozytomen und Oligodendrogliomen (Grad 3) sowie Glioblastomen (Grad 4), entsprechend nach aktueller Einteilung Astrozytomen Grad 3 und 4, Oligodendrogliomen Grad 3 und Glioblastomen Grad 4.

Histologischer Ausdruck der Malignität höhergradiger Gliome sind – neben diffusem und das gesunde Gewebe infiltrierendem Wachstum – zelluläre Zeichen der unkontrollierten Proliferation und Entdifferenzierung wie erhöhte Mitoserate, Zellpleomorphismen, Kernatypien und hohe Zelldichte. Zu den histologischen Diagnosekriterien des Glioblastoms zählt zusätzlich das Vorhandensein von mikrovaskulären Proliferationen oder Nekrosearealen. Hieraus ergibt sich ein buntes, variables und regional heterogenes Bild, was zu dem historischen Namen „*glioblastoma multiforme*“ geführt hat (11,39).

Seit der WHO-Klassifikation 2016 fließen neben dem phänotypischen Erscheinungsbild erstmals ergänzend molekularpathologische Aspekte in die Einteilung der Gliome mit ein (12,40). Bei fast allen sporadisch auftretenden Gliomen lassen sich genetische Mutationen als Zeichen der damit verknüpften chromosomalen Instabilität nachweisen. Die Anzahl der Veränderungen nimmt über die höhergradigen Gliome hin zum Glioblastom zu, welches die höchste Mutationsfrequenz aufweist (5,22,41,42). Die zusätzliche Betrachtungsebene in der vorigen und der aktuellen WHO-Klassifikation spiegelt die Bedeutung molekulargenetischer Tumoreigenschaften nicht nur für ein besseres Verständnis der Pathophysiologie, sondern zunehmend auch für die Diagnostik, Prognose und Therapie von Gliomen wider (11,40). Die Bestimmung genetischer Mutationen und epigenetischer Muster erlangt eine wachsende prognostische Bedeutung für das Gesamtüberleben oder als prädiktiver Marker für die Ansprechenswahrscheinlichkeit bestimmter Therapieoptionen. Es soll eine bessere Homogenität der Tumorsubgruppen mit einer daraus resultierenden adäquateren Therapieempfehlung gewährleistet werden (7,12,22,23).

### **IDH-Mutation**

Ein zentraler Bestandteil der aktuellen WHO-Klassifikation aus dem Jahr 2021 ist die *IDH*-Mutation, deren Bedeutung in den letzten Jahren einen Wandel vollzogen hat (11,40). Ursprünglich lieferte die Bestimmung des *IDH*-Mutationsstatus zusätzliche diagnostische Hinweise zur histomorphologischen Einordnung, da sie als typisch für bestimmte Gliomentitäten gilt. So tragen 70-80 % der Gliome der WHO-Grade 2 und 3 eine *IDH*-Mutation, bei den Tumoren des WHO-Grades 4 sind lediglich ca. 10 % *IDH*-mutiert (22,43,44). In der WHO-Klassifikation von 2016 erfolgte erstmals eine Einteilung der Gliome in neue Subgruppen nach dem Vorhandensein von Mutationen in den Genen der *IDH1* und *IDH2* (40), seit der Fassung aus dem Jahr 2021 ist die *IDH*-Mutation obligates molekularpathologisches Diagnosekriterium der Astrozytome (11). Entsprechend werden

leitliniengerecht auch die *IDH*-mutierten Gliome des histomorphologisch höchsten Schweregrades in Anlehnung an ihre angenommene Entstehung aus niedriggradigeren Astrozytomen und aufgrund verwandter molekulargenetischer Muster als Astrozytome, *IDH*-mutiert, WHO-Grad 4 bezeichnet, die nichtmutierten weiterhin als Glioblastome, *IDH*-Wildtyp, WHO-Grad 4 (7,11,45). In dieser Arbeit wird teilweise weiterhin der Begriff „*IDH*-mutiertes Glioblastom“ verwendet, insbesondere in Bezug auf Gewebeprobe, die zum jeweiligen Entnahmezeitpunkt entsprechend klassifiziert worden sind sowie bei Diskussion der älteren Literatur.

Die verbesserte Trennschärfe durch den genotypisch geprägten Ansatz wird am Beispiel der Unterteilung der Grad-4-Gliome deutlich. Einerseits zeigen sich für die Subgruppen zusätzlich zu der definierenden *IDH*-Mutation homogenere Mutationsmuster. Beispielsweise ist die *IDH*-Mutation mit Veränderungen im *TP53*-Gen assoziiert, dessen Genprodukt p53 als Tumorsuppressorprotein und „Wächter des Genoms“ bei Zellstress oder DNA-Schäden einen Zellzyklusarrest sowie DNA-Reparatur oder Apoptose initiieren kann (12,22,46,47). Andererseits unterscheiden sich Grad-4-Astrozytome und Glioblastome auch deutlich in Ätiologie, mittlerem Erkrankungsalter und Prognose. 90 % der Grad-4-Tumoren weisen den *IDH*-Wildtyp auf. Dieser Subtyp entsteht meist *de-novo* als primäres Glioblastom mit einem mittleren Erkrankungsalter von 62 Jahren. Die übrigen 10 % tragen die *IDH*-Mutation, was mit sekundärer Entwicklung aus Astrozytomen niedrigerer Grade sowie einem jüngeren Erkrankungsalter von im Mittel 45 Jahren assoziiert ist. Außerdem wirkt sich das Auftreten einer *IDH*-Mutation positiv auf das Gesamtüberleben und das progressionsfreie Überleben aus. Das Glioblastom, *IDH*-Wildtyp zeigt mit einem durchschnittlichen Überleben von 15 Monaten unter Standardtherapie eine sehr schlechte Prognose. Im Gegensatz dazu überleben Betroffene mit *IDH*-mutierten Grad 4-Astrozytomen in Studien im Mittel bis zu dreißig Monate, was einer Verdopplung des mittleren Gesamtüberlebens entspricht (7,11,20,44). Neuere molekulargenetische Untersuchungen an *IDH*-mutierten Astrozytomen weisen jedoch anhand der Methylierungsmuster darauf hin, dass ein relevanter Anteil der WHO-Grad-4-Astrozytome *de novo* und nicht durch Progression aus niedriggradigeren *IDH*-mutierten Astrozytomen entstehen könnte (11,48).

Die verschiedenen humanen Isocitrat-Dehydrogenasen vermitteln Redoxreaktionen, die am Citratzyklus und der Abwehr von oxidativem Stress beteiligt sind. Der Großteil der *IDH*-Mutationen in Gliomen entfällt auf das *IDH1*-Gen, die häufigste Mutation ist mit 90 % die

*IDH1*(R132)-Punktmutation, bei der im aktiven Zentrum ein Arginin durch ein Histidin ersetzt wird (p.R132H). Durch einen Funktionsverlust wird weniger Isocitrat durch oxydative Decarboxylierung zu Alpha-Ketoglutarat umgesetzt und dabei weniger NADP<sup>+</sup> zu NADPH reduziert. Stattdessen kommt es zur gesteigerten Umwandlung von Alpha-Ketoglutarat zu 2-Hydroxyglutarat und dessen Akkumulation. Die genauen funktionellen Auswirkungen der *IDH*-Mutation auf Tumorgenese, Progression oder Tumorbiologie sind weitestgehend unklar (20,42–44,49).

Als ein Punkt werden die Auswirkungen einer verringerten NADPH-Kapazität bei *IDH*-Mutation diskutiert. Durch verstärkte Vulnerabilität gegenüber oxydativem Stress könnten das Auftreten von DNA-Schäden und somit eine Tumorentstehung begünstigt werden. Gleichzeitig könnte eine erhöhte Sensibilität für Bestrahlung und Chemotherapie resultieren, eine mögliche Erklärung für das prognostisch bessere Gesamtüberleben bei Patienten und Patientinnen mit *IDH*-mutierten Gliomen (43,44,50).

Als zentraler Mechanismus gilt darüber hinaus die kompetitive Inhibierung von mehr als sechzig Alpha-Ketoglutarat-abhängigen humanen Enzymen aufgrund ähnlicher sterischer Struktur durch den Onkometaboliten 2-Hydroxyglutarat. Betroffen sind unter anderem Histon- und DNA-Methylasen, was zu einer globalen Hypermethylierung von Histonen und DNA führt (43,49). Die resultierende abweichende Genexpression wird mit geringerer Differenzierung und gesteigerter Proliferation und Transformationsbereitschaft der Zellen in Verbindung gebracht. Die *IDH*-Mutation ist ein frühes Ereignis in der Gliomgenese und assoziiert mit der Progression von niedriggradigen zu höhergradigen Gliomen. So folgen in Gliomen der *IDH*-Mutation weitere genetische Veränderungen in beispielsweise *TP53* und dem *TERT*-Promotor oder ein 1p19q-Verlust nach (12,43,49,51,52).

Die *IDH*-Mutation und der assoziierte hypermethylierte Gliom-Phänotyp als epigenetische Variante sind nur ein Beispiel für die Verschränkung von Genetik und Epigenetik und ihre Bedeutung in Gliomen (53,54). So liegen in bis zu 50 % der Glioblastome Mutationen vor, die sich direkt oder indirekt auf epigenetische Modifikationen auswirken. In genomweiten genomischen und epigenomischen Assoziationsanalysen konnte bestätigt werden, dass der gesamte Prozess der Gliomgenese häufig mit abweichenden epigenetischen Mustern und Modifikationen verknüpft ist (11,40,52,55,56).

## 1.2 Der Histon-Code

### Epigenetik

Die Definition der Epigenetik wurde ursprünglich 1942 von C. H. Waddington geprägt: „*the causal interactions between genes and their products, which bring the phenotype into being*“ (55,57). Nach heutigem Verständnis wird als Epigenetik die Vererbung von Informationen auf die nächste Zellgeneration bezeichnet, die nicht durch die DNA-Sequenz selbst, sondern durch Modifikationen des Chromatins transportiert werden (55,58,59). Zur Epigenetik zählen die Methylierung der DNA, Modifikationen von Histonen, Histonvarianten, Positionierung im Nukleosom, nicht-kodierende RNA sowie Regulation von Länge und Stabilität der Telomere (55,59). Es ergibt sich ein komplexes System mit Auswirkungen auf alle DNA-abhängigen zellulären Prozesse wie die Transkription mit Genexpression und -Silencing, die Replikation und die DNA-Reparatur. Die über viele Mitosen etablierten vererbaren aber zugleich potenziell reversiblen epigenetischen Muster definieren die phänotypische Differenzierung der Zellen (55,60).

Die physiologische epigenetische Regulation abhängig von Zelltyp und Zellstatus ist existenziell für die normale Entwicklung und Beibehaltung gewebespezifischer Expression von Genen. In Tumoren kommt es zu globalen Veränderungen epigenetischer Muster, was zu tiefgreifender Dysregulation der Chromatinstruktur und der Genexpression führt. Durch Aktivierung oder Inhibition von Signalwegen wird die Zellhomöostase gestört, wodurch die Entstehung von Krankheiten, unter anderem Krebs, begünstigt wird (52,55).

### Histon-Modifikationen

Histone sind Strukturproteine, die der grundlegenden räumlichen Organisation der DNA-Doppelhelix dienen. Der einfachste Baustein aus DNA und Histonen ist das Nukleosom, das als Oktamer aus den Kernhistonen gebildet wird. Ein 146 Basenpaare langer Nukleinsäureabschnitt windet sich in einer 1,65-fachen Superhelix um einen Komplex aus je zwei der Histone H2A, H2B, H3 und H4. Diese Anordnung legt die Basis für die übergeordnete Struktur des Chromatins bis hin zum Vorliegen als Chromosomen (61).

Eine Variante möglicher epigenetischer Regulation des Erbguts stellt die Modifikation der Histone dar (59,62). Die Gesamtheit dieser molekularen Veränderungen wird auch als „Histon-Code“ bezeichnet. Dieser Ausdruck weist in Anlehnung an den „DNA-Code“ auf die im Muster der Modifikationen gespeicherte und verschlüsselte Information hin. Histone besitzen nach Proteinfaltung einen globulären Anteil und einen weitgehend linearen Bereich, den sogenannten Histonschwanz. Durch die Tertiär- und Quartärstruktur der Histone sind

diese linearen Proteinabschnitte vorwiegend an der Oberfläche der Nucleosomen lokalisiert, sodass sie besonders zugänglich für modifizierende Enzyme liegen. Ein Großteil der Modifizierungen findet an den Schwänzen der Kernhistone statt (62–64).

Die möglichen epigenetischen Muster sind durch eine hohe Variabilität gekennzeichnet, beginnend mit unterschiedlichen Arten von Modifikationen, darunter Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung, aber auch weniger erforschte wie die Ubiquitinierung (64,65). Diese Veränderungen umfassen den Anbau eines einzelnen Moleküls (mono-), die Verknüpfung zweier oder dreier gleichartiger Molekülgruppen (di-, tri-), bis hin zu Modifikationsketten (poly-). Außerdem kann die kovalente Bindung der Moleküle an variablen Stellen in der Aminosäuresequenz und somit auch an unterschiedlichen Aminosäureresten erfolgen. Lysine und Arginine der N-terminalen Histonreste werden häufig acetyliert, methyliert oder ubiquitiniert, Serine sind Ziele von Phosphorylierungen (62,64–66).

Durch veränderte elektrostatische Ladung oder Struktur der modifizierten Histonproteine wird auch die übergeordnete Chromatinstruktur beeinflusst. Eine lockerere oder dichtere Packung des Erbguts vereinfacht bzw. erschwert die Zugänglichkeit der DNA für Enzyme, unter anderem zur Transkription der DNA-Sequenz. Im lockereren Euchromatin ist die transkriptionelle Aktivität entsprechend höher als im dichter gepackten Heterochromatin (64,65,67). Die Chromatinstruktur als dynamischer Prozess beeinflusst existenzielle zelluläre Prozesse wie Gentranskription, Replikation, DNA-Reparaturprozesse und Chromosomen-Organisation (65,68). Histon-Acetylierungen der Histone H3 und H4 werden beispielsweise zumeist mit transkriptioneller Aktivität assoziiert (63,69).

### **Ubiquitinierung von Histonen**

Ubiquitin ist ein aus 76 Aminosäuren aufgebautes Protein, das ursprünglich durch seine Rolle im zelleigenen Proteinabbau Bekanntheit erlangte. Dort dient es als Markierungssignal für fehlerhafte oder nicht benötigte Proteine, die so durch das Proteasom erkannt und gespalten werden (70,71). Für die Beschreibung dieses Zusammenhangs erhielten Aaron Ciechanover, Avram Hershko und Irwin Rose 2004 den Nobelpreis für Chemie (72–75). Der Name Ubiquitin leitet sich von ‚ubiquitär‘ ab und verdeutlicht sein universell verbreitetes Vorkommen in Zellen (76,77). Seit den Anfängen dieser Forschung in den 1980er Jahren hat sich gezeigt, dass Ubiquitin diverse weitere Funktionen jenseits der Proteindegradation erfüllt, unter anderem als regulatorische Modifizierung an Histonen in der Epigenetik (64,65,71).

Im Gegensatz zu anderen posttranslationalen Modifikationen (PTMs), die den Anbau kleiner Moleküle wie einer Methylgruppe oder einer Phosphorgruppe beinhalten, ist die Anknüpfung des 76 Aminosäuren großen Ubiquitins eine vergleichsweise sperrige Modifikation (65,68,71). Die kovalente, reversible Verknüpfung des Proteins Ubiquitin mit einem Zielsubstrat erfolgt enzymatisch katalysiert über eine Isopeptidbindung. Hierbei wird der C-terminale Glycin-Rest des Ubiquitins mit der Aminogruppe eines Lysin-Restes des Substrats verbunden (64,71). Ist ein Substrat an mehreren Stellen ubiquitiniert, spricht man von multipler Ubiquitinierung. Wenn es sich bei dem Zielsubstrat selbst um ein Ubiquitin-Molekül handelt, kann durch Peptidbindung zwischen einem Lysin dieses ersten Ubiquitins und des C-Terminus eines weiteren distalen Ubiquitins eine Ubiquitin-Kette gebildet werden. Somit können neben der Monoubiquitinierung auch Di-, Tri- und Polyubiquitinierungen entstehen (78,79). Ein Ubiquitin-Molekül besitzt sieben verschiedene Lysin-Reste (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63), die alle zur Knüpfung von Ubiquitin-Polymeren genutzt werden können. Außerdem ist auch eine Verbindung über das endständige Methionin (M1) möglich (64,78,80). Je nach verwendetem Lysin-Rest ergibt sich durch elektrostatische Kräfte eine unterschiedliche räumliche Anordnung der Ubiquitin-Ketten, wobei eine eher lineare von einer kompakteren Struktur unterschieden werden kann (79,80). Die spezifischen Polymere nehmen unterschiedliche Funktionen in der Zelle ein. Als typische Polyubiquitinierungen werden die über Lysin 48 und Lysin 63 verknüpften Ketten bezeichnet, als atypisch die weniger erforschten K6-, K11-, K27-, K29-, K33- und M1-Verbindungen (70,78,80). Bei der K48-Polyubiquitinierung, die zur proteasomalen Proteindegradation führt, sind die Ubiquitin-Moleküle in einer geschlossenen, dichtgepackten Formation angeordnet (70,79). Im Gegensatz dazu weisen die K63-Ketten eine gestreckte und somit offenere Struktur auf, wobei die einzelnen Ubiquitin-Moleküle beinahe ausschließlich an ihrer Isopeptidbindung in Kontakt stehen. Möglicherweise erkennen Effektorproteine in diesem Fall vorrangig die Einzelmoleküle, ähnlich der Monoubiquitinierung (79,80). Die K63-Polyubiquitinierung wird unter anderem mit DNA-Reparatur, Transkription, zellulärer Signaltransduktion, Inflammation, Endozytose und Chromatinregulation assoziiert. Die nicht proteolytische Monoubiquitinierung wird im Zusammenhang mit DNA-Reparatur, Virusknospung, nukleärem Export, Endozytose und Histonregulierung beschrieben (64,78,79). Die atypischen Polyubiquitinierungen scheinen zum einen regulatorische Funktionen in Zellzyklus, Inflammation und Autoimmunität einzunehmen (K11, K27, K29, K33, Met1), zum anderen jedoch teilweise kontextabhängig auch zur Proteindegradation zu führen (K6, K29, K33) (70,80).

Die Ubiquitinierung von Histonen führt in der Regel nicht zu proteasomalem Abbau, sondern dient vorrangig der transkriptionellen Regulierung (64). Effekte können einerseits über direkte Strukturveränderungen des Chromatins durch den Anbau eines oder mehrerer Ubiquitin-Moleküle vermittelt werden, was Einfluss auf die Ablesbarkeit involvierter DNA-Abschnitte hat. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass die Ubiquitinierung als Erkennungssignal für weitere Proteine dient, über welche indirekt eine Wirkung vermittelt wird (79,81). Histone werden in multiplen Prozessen das Ziel von Ubiquitinierungen, beispielsweise bei DNA-Reparatur, transkriptioneller Regulierung, Zellzyklus, Proliferation und Zelldifferenzierung (64). Am häufigsten tritt bei Histonen die Monoubiquitinierung auf, die ähnlich wie die K63-Polyubiquitinierung regulatorische Funktionen einnimmt. Alle vier Kernhistone H2A, H2B, H3 und H4 kommen auch in monoubiquitiniertes Form vor (64,65). Am weitesten verbreitet ist die Monoubiquitinierung von H2A an Position K119, eine Modifikation die an 5-15 % der zellulären H2A-Histone vorliegt (64,81). Sie wird assoziiert mit Gen-Silencing, Erhaltung der Genomintegrität und maligner Entartung (81,82). Darüber hinaus ist auch eine Polyubiquitinierung von H2A und seiner Varianten an unterschiedlichen Positionen möglich (64,81).

Die Kopplung eines oder mehrerer Ubiquitin-Moleküle an ein Zielprotein mittels Peptidbindung wird durch das Zusammenwirken dreier Enzymgruppen ermöglicht. Nach ATP-abhängiger Aktivierung des C-Terminus des Ubiquitins durch ein E1-Enzym erfolgt im Zwischenschritt die Bindung an ein Konjugationsenzym (E2). Zuletzt erfolgt die Übertragung und peptidische Bindung des Ubiquitins an das Zielsubstrat durch eine E3-Ligase (70,71). Die Substratspezifität wird unter anderem durch die Kombinationsvielfalt der Enzyme aus den drei Gruppen gewährleistet. Während die wenigen bekannten E1-Enzyme weitgehend unspezifisch arbeiten, sind im menschlichen Genom über dreißig E2-Enzyme und über sechshundert E3-Enzyme kodiert, die gezielt Substratgruppen oder spezifische Proteine ubiquitinieren (70,80). Die Beeinflussung der Aktivität der E3-Ligasen durch beispielsweise Phosphorylierung oder Autoubiquitinierung stellt eine weitere Ebene in der Regulierung des Ubiquitinierungsmusters dar (78,79).

### **Deubiquitinasen**

Ein Merkmal posttranslationaler Modifikationen ist ihre Reversibilität, was eine dynamische Regulierung und das Beenden eines vermittelten Signals ermöglicht (65,79). Daher existieren neben Enzymen, die den „Histon-Code“ etablieren, entsprechende Gegenspieler, die Modifikationen wieder entfernen können. Bezogen auf die Ubiquitinierung handelt es

sich um die Gruppe der Deubiquitinasen (DUBs). Diese Enzyme spalten Ubiquitin durch Hydrolyse der Isopeptidbindung von Proteinen oder anderen Ubiquitin-Molekülen ab (83). Im menschlichen Genom sind nach heutigem Forschungsstand in etwa einhundert DUBs kodiert (83–85). Auffällig ist das Missverhältnis von dieser relativ begrenzten Anzahl an DUBs gegenüber mehr als sechshundert E3-Ligasen und wiederum einer vielfachen Menge möglicher Ubiquitinierungen an tausenden Proteinen in zellulären Prozessen. Zudem kann der Großteil der Ubiquitin-Ketten *in vitro* von einigen wenigen verbreiteten DUBs vergleichsweise unspezifisch gespalten werden. Demnach liegt nahe, dass weitere Mechanismen *in vivo* die Spezifität gewährleisten, wie die Modulation durch Coenzyme (80,83,84).

### **Deubiquitinasen im Tumorkontext**

Das dynamische Wechselspiel zwischen Ubiquitinierung und Deubiquitinierung nimmt regulierende Funktionen in zentralen zellbiologischen Prozessen wie Zellzyklussteuerung und DNA-Reparatur ein, die wesentlich für den Erhalt der Zellhomöostase sind. Störungen des sensiblen Ubiquitinierungs-Gleichgewichts werden deshalb unter anderem mit der Tumorentstehung, -progression und fortschreitender Tumormalignität assoziiert. Somit rücken auch die DUBs zunehmend in den Fokus aktueller Krebsforschung, sowohl als mögliche Vermittler maligner Entartung als auch als potenzielle Ziele neuer Therapien (64,86–88). Viele DUBs liegen in bestimmten Tumortypen wie Lungen-, Brust-, Darm- oder Magenkrebs verglichen mit Normalgewebe in abweichenden, überwiegend erhöhten Konzentrationen vor. In verschiedenen Arbeiten werden gewebe- und kontextabhängig sowohl tumorfördernde als auch -protektive Funktionen beschrieben (86,87).

DUBs sind weiterhin an zahlreichen neuronalen Prozessen beteiligt und werden neben inflammatorischen und degenerativen Erkrankungen des zentralen Nervensystems auch mit der Entstehung von ZNS-Tumoren wie Neuroblastomen und Gliomen assoziiert (88,89). So wurden unter anderem für die Ubiquitin-spezifischen Proteasen (USPs) USP4, USP7, USP9, USP13, USP22, USP39 und USP48 erhöhte Konzentrationen in Gliomen nachgewiesen, erniedrigte Enzymlevel für USP17 (89). Tumorfördernde Effekte werden beispielsweise über die Stabilisierung von Onkoproteinen und Transkriptionsfaktoren wie c-Myc und N-Myc oder über Deregulierung des Tumorprotein-p53-Signalwegs vermittelt (87,89). Die genaue Rolle der einzelnen DUBs in Hirntumoren sowie die zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen sind jedoch in weiten Teilen noch unklar.

### 1.3 Die Deubiquitinase USP3

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden durch das Forschungslabor der Abteilung für Neuropathologie des Universitätsklinikums Regensburg bioinformatische Untersuchungen an Expressionsdaten (*micro array*) von *IDH*-mutierten (*IDH132H*) und -nichtmutierten (*IDHwt*) Gliomen eines öffentlich zugänglichen Kollektivs, *The Cancer Genome Atlas Program* (TCGA), mittels *gen set enrichment analysis* (GSEA) durchgeführt.

Bei der GSEA mit einer Genliste bestehend aus epigenetischen Chromatin-Modifikations-Enzymen (SA BIOscience) zeigte sich bei der Gruppe der *IDH*-mutierten Tumoren eine signifikante mRNA-Anreicherung von Enzymen, die bei der Histon-Ubiquitinierung eine Rolle spielen. Innerhalb dieser Enzyme war die mRNA der Ubiquitin-spezifischen Protease 3 (USP3) besonders stark angereichert. Bei weiteren Analysen von Expressionsdaten von Gliomen der WHO-Grade 2-4 zeigte sich eine starke Überexpression von *USP3* im Vergleich zur Expression in Normalhirngewebe. Innerhalb der Subgruppe der Glioblastome (gemäß WHO-Klassifikation 2016 (40)) ist *USP3* besonders stark bei *IDH1*-mutierten Tumoren mit einem Hypermethylierungs-Phänotyp exprimiert. Entsprechend der aktuell gültigen WHO-Klassifikation (2021 (11)) wären diese zum jetzigen Zeitpunkt den Astrozytomen, *IDH*-mutiert, WHO-Grad 4 zuzuordnen.

Der hypermethylierte Gliom-Subtyp wird mit einer günstigeren Prognose assoziiert (31,44).

USP3 wurde erstmals 1999 von Sloper-Mould *et al.* in seiner Funktion als Ubiquitin-spezifische Peptidbindungshydrolase mit einem Molekulargewicht von 59 kDa beschrieben, deren kodierende Gensequenz auf dem Chromosom 15q22.3 lokalisiert ist (90). Seitdem wurden für die USP3-vermittelte Deubiquitinierung sowohl unterschiedliche Zielsubstrate als auch verschiedene betroffene Ubiquitinierungs-Typen beschrieben. Das Wirkspektrum reicht von klassischen proteinstabilisierenden Effekten über Abbau der K48-Polyubiquitinierung als proteasomales Erkennungssignal bis hin zur Entfernung regulatorischer K63-Polyubiquitinerungen und Beeinflussung der epigenetischen Ubiquitinierungslandschaft an Histonproteinen. Aus der Variabilität der beteiligten Mechanismen und Substrate erklärt sich die Vielfalt der zellulären Prozesse, mit denen USP3 als Deubiquitinase in Verbindung gebracht wird (84,91–93).

Ein aktueller Forschungsschwerpunkt liegt auf einer möglichen Relevanz von USP3 für die Krebsentstehung, wobei die funktionelle Rolle von USP3 kontrovers diskutiert wird. In verschiedenen Versuchsansätzen und Gewebetypen werden in der Literatur sowohl

onkogene als auch vereinzelt protektive Effekte von USP3 beschrieben. Entsprechend der funktionellen Varianz der jeweils untersuchten Ubiquitinierungen bzw. Zielproteine werden abweichende Pathomechanismen, beteiligte Prozesse und letztlich auch unterschiedliche USP3-assoziierte Effekte angenommen (30,91,93–105).

In der Arbeit von Fu *et al.* wird das Tumorsuppressorprotein p53 bei Zellstress mittels Deubiquitinierung durch USP3 stabilisiert und vor proteasomaler Degradation geschützt. Ein *USP3*-Knockdown führt zum Verlust der protektiven Wirkung und zu vermehrter Proliferation und Transformation (91). Eine gegensätzliche Rolle wird USP3 unter anderem im Magenkarzinom zugeschrieben, in dem es in erhöhter Konzentration nachweisbar ist (96–98,102,106). Aufgrund einer Korrelation mit klinischen und pathologischen Parametern wie geringem progressionsfreiem Überleben, Lymphknotenstatus oder Invasionstiefe beschreiben Fang *et al.* USP3 als neuen unabhängigen Biomarker in Magentumoren. Durch *USP3*-Knockdown in Zellkultur und Mausmodell werden Zellwachstum und Invasivität reduziert (96). Auch Wu *et al.* charakterisieren USP3 als Onkoprotein, das über Deubiquitinierung und Stabilisierung der Polycomb-Untereinheit SUZ12 sowie von Proteinen der kollagenen Extrazellulärmatrix zur vermehrten Migration, Invasion und Metastasierung des Magenkarzinoms führt (97,98). Erhöhte *USP3*-Expression und proliferationsfördernde Effekte *in vitro* werden ebenfalls im nichtkleinzelligen Lungenkarzinom (99), Brustkrebs (100), Plattenepithelkarzinom des Ösophagus (101) und in Gallenblasentumoren (103) beschrieben. Das *et al.* (2020) beschreiben weiterhin eine potenziell onkogene Funktion von USP3 über die Stabilisierung des Zellzyklusregulators und Proto-Onkogens Cdc25A, wobei eine hohe *USP3*-Expression bemerkenswerter Weise in Expressionsanalysen in unterschiedlichen Tumortypen sowohl mit besserer als auch mit schlechterer Prognose assoziiert sei (105). Auch in neuronalen Tumoren wird für USP3 eine karzinogene Wirkung postuliert, eine erhöhte Expression wird als negativer prognostischer Marker im Neuroblastom diskutiert. Unter anderem über die USP3-abhängige Stabilisierung des Transkriptionsfaktors N-Myc sowie weiterer Zielproteine sollen Tumorwachstum gefördert sowie die physiologische neuronale Zelldifferenzierung gehemmt werden (107) (108). Im Glioblastom identifizierten Fan *et al.* 2019 den Transkriptionsfaktor SNAIL als weiteres Zielprotein von USP3, welches durch enzymatische Entfernung einer Polyubiquitinierung vor proteasomaler Degradation geschützt wird. Eine hohe Expression von *USP3* in Glioblastomen soll über die Stabilisierung von SNAIL zu verstärkter Invasion, Migration und Tumorwachstum führen (95).

Vor dem Hintergrund einer möglichen Beteiligung an der Tumorentstehung wird im Speziellen auch die Deubiquitinierung von Histonen durch USP3 erforscht. Diese wird neben angenommenen Funktionen in Zellzyklus, Proliferation und bei der Modifikation der Chromatinstruktur insbesondere auch mit der DNA-Reparatur assoziiert (93,94,109).

Jede Zelle des menschlichen Organismus ist permanent schädlichen exogenen und endogenen Einflüssen ausgesetzt, die zu multiplen Schädigungen des sensiblen Erbguts führen. Die effektive und fehlerfreie Ausbesserung von DNA-Schäden ist essenziell, um Mutationen und maligne Entartung zu verhindern (110,111). In Abhängigkeit der Schwere der Schädigung werden ein Zellzyklusarrest sowie Abläufe zur DNA-Reparatur oder zur Apoptose initiiert. Das komplexe Netzwerk aus Signalwegen, das getriggert durch geschädigte DNA-Bereiche die Wiederherstellung der funktionsfähigen DNA vermittelt, wird als *DNA damage repair* (DDR) bezeichnet (111,112).

Zu den gravierendsten DNA-Schäden gehören DSBs, die charakteristisch für die Einwirkung ionisierender Strahlung sind, jedoch auch durch bestimmte Chemotherapeutika wie die Gruppe der Alkylanzien hervorgerufen werden können (111–114). Ein frühes und ubiquitäres Ereignis in der Reparatur von DSBs ist die durch DNA-Schäden getriggerte Phosphorylierung von H2AX, einer Variante des Histons H2A. Durch die Serin/Threonin-Kinasen ATM und ATR wird an das Serin 139 des C-terminalen Endes des Histons eine Phosphatgruppe angefügt. Das entstehende phosphorylierte Histon H2AX ( $\gamma$ H2AX) gilt als gut etablierter Marker für DSBs (115,116). PTMs der DNA und der Histone wie die beschriebene Phosphorylierung von H2A stellen wichtige Bestandteile der DDR dar. Sie beeinflussen durch Chromatinumstrukturierung die Zugänglichkeit geschädigter DNA-Bereiche, bieten Plattformen für Reparaturproteine und interagieren direkt mit anderen epigenetischen Modifikationen oder weiteren beteiligten Faktoren und vermitteln so reversibel den Ablauf der temporären Prozesse zur Erkennung und Beseitigung von DNA-Schäden (115,117,118). Die Ubiquitinierung, insbesondere von Histonen, ist eine weitverbreitete Modifikation in Signalwegen der DNA-Reparatur. Es kommt unter anderem zur Ubiquitinierung von H2A, H2B und  $\gamma$ H2AX (119–121).

USP3 wird in der Literatur als Deubiquitinase verschiedener spezifischer Ubiquitinierungen von H2A und teilweise auch  $\gamma$ H2AX im Rahmen der DNA-Reparatur beschrieben: zum einen hinsichtlich der K63-linked Polyubiquitinierung an K13/K15, die durch das Zusammenspiel der E3-Ligasen RNF8 und RNF168 am N-terminalen Rest von H2A entsteht, zum anderen als Deubiquitinase der mit dem *polycomb repressive complex 1* (PRC1) assoziierten Monoubiquitinierung an K119 (93,94,109,118).

Der Ubiquitinierung von Histonen vom H2A-Typ an Position K13/K15 geht die oben beschriebene, initiale Phosphorylierung von H2AX voraus. An die phosphorylierte C-terminale Serin-Aminosäure von  $\gamma$ H2AX bindet das Kernprotein MDC1, was selbst wiederum nach Phosphorylierung von der Ubiquitin-Ligase RNF8 gebunden wird. RNF8 ubiquitiniert das Linker-Histon H1, welches als Bindeglied zwischen den Nukleosomen nicht zu den Kernhistonen zählt. Die entstandene K63-Polyubiquitinierung dient als Rekrutierungssignal für die E3-Ligase RNF168, welche wiederum Histone vom H2A-Typ an K13/K15 polyubiquitiniert, darunter H2A und H2AX. Die Bildung der Ubiquitin-Kette erfolgt durch Verknüpfung der Ubiquitin-Moleküle über Lysin-Reste an Position 63 der Aminosäuresequenz des Ubiquitins (K63-linked). RNF168 kann zusätzlich das eigene Produkt H2Aub binden und so benachbarte H2A-artige Histone ubiquitinieren, was zur Verbreitung der Modifikation auf umliegendes Chromatin führt. Die sich ausbreitenden Ubiquitinierungen dienen als Plattform für weitere Downstream-Faktoren wie 53BP1, BRCA1 (via RAP80) oder den SMC5/6-Komplex. 53BP1 und BRCA1 sind selbst wiederum E3-Ligasen, sodass es zu weiteren Ubiquitinierungen im Bereich der geschädigten DNA kommt (94,109,118,122).

Eine weitere mit der DDR assoziierte Zielmodifikation von USP3 ist die weitverbreitete H2A-Monoubiquitinierung an K119, die durch BMI1, RING1 (RING1A) und RNF2 (RING1B) des PRC1 etabliert wird. Vorrangig wird dieser eine Hemmung der transkriptionellen Aktivität im Rahmen des Gen-Silencing zugeschrieben (118,123,124). Darüber hinaus wurde aber auch an DSBs eine Akkumulation von BMI1 und RNF2 beobachtet, eventuell als Ausdruck vermehrter transkriptioneller Repression im Rahmen der DNA-Schadensantwort. Allerdings wird teilweise auch eine unmittelbare Rolle der Monoubiquitinierung an Position K119 im DDR angenommen (109,118,125).

Nicassio *et al.* (2007) identifizierten USP3 als Deubiquitinase für an Position K119 monoubiquitiniertes H2A. Ein Knockdown führte zur Verzögerung des Zellzyklus in der S-Phase mit verminderter Proliferation. Außerdem traten vermehrt Strangbrüche mit begleitend erhöhter Aktivität von Checkpoint-Enzymen und DNA-Reparatur-Signalwegen auf. Bei Induktion von DNA-Schäden durch ionisierende Strahlung (IR) konnten ubiquitiniertes H2A und  $\gamma$ H2AX in räumlicher Nähe zur geschädigten DNA nachgewiesen werden (93). Sharma *et al.* (2014) bestätigten USP3 als Deubiquitinase von H2A an K119 im Rahmen der DNA-Reparatur, wiesen aber außerdem ubiquitinierte Lysine an Position 13 und 15 der Aminosäuresequenz von H2A und  $\gamma$ H2AX als Zielsubstrate von USP3 nach.

USP3 fungiere hier als Gegenspieler der Ubiquitin-Ligasen RNF168 und RNF8 und negativer Regulator der DDR (109). In Untersuchungen von Lancini *et al.* (2014) zeigten *Usp3*-Knockdown-Mäuse spontane chromosomale Brüche, multiple Tumorentstehung, verminderte Stammzellreserve und eine verkürzte Gesamtlebenszeit. Ein *USP3*-Knockdown bei hämatopoetischen Stammzellen habe zur Akkumulation von DNA-Schäden und Zellzyklusarrest geführt (94).

### 1.4 Forschungsvorhaben dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit vor dem Hintergrund der aktuellen Forschungslage und den Ergebnissen institutsinterner Vorarbeiten ist die Untersuchung der Funktion von USP3 als Histon-Deubiquitinase in höhergradigen humanen Gliomen. Es soll eine mögliche Beteiligung von USP3 in der Onkogenese und wachstumsfördernden Prozessen von Gliomen erforscht und eventuell ableitbare Schlüsse für Präventions- und Therapieoptionen erarbeitet werden.

In einem ersten Schritt wird das Vorkommen von USP3 in Gliomen mit dem in normalem Hirngewebe verglichen. Es erfolgt hierfür die Untersuchung der *USP3*-Expression in Gliomzelllinien sowie der Menge des USP3-Proteins in Tumorschnitten von Gliompatienten und -patientinnen. Außerdem wird eine mögliche Korrelation zwischen USP3-Vorkommen und dem *IDH*-Mutationsstatus untersucht.

Im Anschluss soll die Frage beantwortet werden, wie sich eine abweichende *USP3*-Expression in Gliomzellen auf die Synthese des USP3-Proteins und die Ubiquitinierung des Zielproteins H2A auswirkt und ob funktionelle Effekte in tumorassoziierten Prozessen resultieren. Basis dieses Forschungsvorhabens ist die Etablierung eines Zellkulturmodells mit Knockdown und Überexpression von *USP3* und reproduzierbarer Beeinflussung des Proteinlevels sowie des nachgeschalteten Effekts auf die Ubiquitinierung von H2A. Es folgen funktionelle Untersuchungen zu Prozessen, die mit der Gliomgenese, Tumorprogression oder -therapie assoziiert sind: Apoptose, Proliferation, Chemosensitivität sowie die zelluläre Reaktion auf DNA-Schäden.

Ergänzend soll mittels Next-Generation Sequencing (NGS) eine Gesamt-Transkriptom-Analyse von Überexpressions- und Knockdown-Zellen durchgeführt werden, um USP3-abhängige biologische Prozesse und Signalwege auf Expressionsebene sichtbar zu machen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Gliom-Gewebeschnitte

Sämtliche Tumorproben wurden in den Jahren 2013 bis 2015 in der Neurochirurgie des Universitätsklinikum Regensburg aus exzidiertem und in Formaldehyd fixiertem Gliomgewebe gewonnen. Die Proben stammen von Erkrankten mit diagnostizierten Glioblastomen WHO-Grad 4 und sogenannten anaplastischen Astrozytomen WHO-Grad 3, gemäß aktueller WHO-Klassifikation (2021) entsprechend 3- und 4-gradigen Astrozytomen (*IDH*mut) und Glioblastomen (*IDH*wt). Nach Einbettung in Paraffin wurden aus dem Tumorgewebe mit dem Mikrotom Schnitte einer Dicke von 3-5 µm angefertigt und auf Objektträger aufgebracht. Untersucht wurden 18 Hirntumorschnitte der WHO-Grade 3 und 4, von denen zehn Gliome den *IDH1*-Wildtyp und acht die *IDH1*-Mutation aufwiesen. Die Auswahl erfolgte anhand des *IDH1*-Mutationsnachweises mittels Sequenzierung durch die diagnostische Abteilung der Neuropathologie des Universitätsklinikums Regensburg. Als Kontrollgewebe dienten Normalhirn- und Pankreaspräparate, die ebenfalls am Universitätsklinikum Regensburg entnommen wurden.

#### 2.1.2 Zelllinien

Es wurden sechs adhärente Gliomzelllinien der Firma ATCC® (American Type Culture Collection, Manassas, USA) auf ihr *USP3*-Expressionslevel untersucht. Aufgrund hoher Expression des Zielgens sowie guter Kultivierbarkeit wurden für die weiteren Versuche die klassischen Gliomzelllinien U251MG sowie LN18 ausgewählt. Beide Linien entstammen kaukasischen, männlichen Patienten mit Glioblastomen des WHO-Grads 4 und zeigen epitheliales Wachstum (126,127).

Zelllinie	Ursprungs-Tumor	Alter	Geschlecht
A172	Glioblastom (WHO-Grad 4)	53 Jahre	männlich
HS683	anaplastisches Oligodendrogliom (WHO-Grad 3)	76 Jahre	männlich
T98G	Glioblastom (WHO-Grad 4)	61 Jahre	männlich
U118MG	Glioblastom (WHO-Grad 4)	50 Jahre	männlich
U251MG	Glioblastom (WHO-Grad 4)	75 Jahre	männlich
LN18	Glioblastom (WHO-Grad 4)	61 Jahre	männlich

**Tabelle 1: Zelllinien**

Übersicht der verwendeten Zelllinien mit demografischen Daten der Patienten.

### 2.1.3 Plasmid-DNA für transiente Transfektion

Das in *Escherichia coli* (*E. coli*) vorliegende *USP3*-Plasmid wurde von Dharmacon bezogen und nach Plasmid-Präparation zur transienten Transfektion verwendet. Der entsprechende als Kontrolle verwendete Leervektor stammte ebenfalls von Dharmacon.

Gen	Vektor	Spezifizierung	Firma
<i>USP3</i>	pCMVSPORT6	Plasmid-DNA (in <i>E. coli</i> DH10B); MGC Human USP3 Sequence-Verified cDNA; Clone ID: 6146202	Dharmacon, Lafayette, USA
Leervektor	pCMVSPORT6	Kontrolle	Dharmacon, Lafayette, USA

**Tabelle 2: Plasmid-DNA**

Angabe der verwendeten Plasmid-DNA und Kontrolle mit Vektor, Spezifizierung und Hersteller.

### 2.1.4 Oligonukleotide

#### 2.1.4.1 PCR-Primer

Gen	Accession Number	Primer-Sequenz (5' → 3')	Fragmentgröße
<i>ARF1</i>	NM_001024227.1	<i>forward</i> : GACCACGATCCTCTACAAGC <i>reverse</i> : TCCCACACAGTGAAGCTGATG	111 bp
<i>USP3</i>	NM_001256702.1	<i>forward</i> : GGAGAGCTGCCTGTATGACC <i>reverse</i> : TCGTGAGTTGCGTATGCTGT	90 bp

**Tabelle 3: PCR-Primer**

Übersicht der in der PCR verwendeten Primer des Zielgens *USP3* sowie der Kontrolle (Adenosyl-Ribosylierungs-Faktor 1 (*ARF1*)) mit Accession Number, Sequenzen und Fragmentgröße.

#### 2.1.4.2 siRNA für transiente Transfektion

Gen	Accession Number	siRNA-Sequenzen (5' → 3')
<i>USP3</i>	NM_001256702.1	CCAAAGCUGGAUCGGAUAA, GCACAAGUACCUUUAACCA, GCACACAGUAUGUAUGGAU, CCUCAUAUGUGGGACAGAA
Negativ-Kontrolle	<i>non-targeting control</i> (NTC)	UGGUUUACAUGUCGACUAA, UGGUUUACAUGUUGUGUGA, UGGUUUACAUGUUUCUGA, UGGUUUACAUGUUUCCUA

**Tabelle 4: siRNAs**

Übersicht der verwendeten siRNA (*USP3* und NTC), mit Angabe von Accession Number und Sequenzen.

### 2.1.5 Antikörper

Antikörper	Spezifität	Hersteller
Anti-Histone H2A (acidic patch)	polyklonal, Kaninchen	Merck, Darmstadt, DE
Anti- $\alpha$ -Tubulin	monoklonal, Maus	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Phospho-Histone H2A.X (Ser139) (20E3)	monoklonal, Kaninchen	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Ubiquityl-Histone H2A (Lys119) (D27C4) XP®	monoklonal, Kaninchen	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
USP3 (8L8): sc-135597	monoklonal, Maus	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA

**Tabelle 5: Primäre Antikörper**

Auflistung der im Western Blot verwendeten primären Antikörper mit Angaben zu Klonalität und Spezies. USP3 (8L8): sc-135597 fand außerdem in der Immunhistochemie Verwendung.

Antikörper	Art	Hersteller
Goat anti-mouse IgG-HRP: sc-2005	sekundärer Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Goat anti-rabbit IgG-HRP: sc-2004	sekundärer Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA

**Tabelle 6: Sekundäre Antikörper**

Übersicht der verwendeten sekundären Antikörper mit Herstellerangabe.

### 2.1.6 Chemikalien

Chemikalie / Reagenz	Hersteller
(Di-)Natriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Roth, Karlsruhe, DE
(Mono-)Natriumcitrat ( $\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_7$ )	Roth, Karlsruhe, DE
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth, Karlsruhe, DE
Ampicillin	Roth, Karlsruhe, DE
bovines Serumalbumin (BSA)	AppliChem, Darmstadt, DE
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe, DE
Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ )	Roth, Karlsruhe, DE
Color Prestained Protein Standard	New England Biolabs, Ipswich, USA
Desoxycholsäure (DOC)	Roth, Karlsruhe, DE
DharmaFECT 1 Transfection Reagent	Dharmacon, Lafayette, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe, DE
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Desoxynukleosidtriphosphat-(dNTP-)Set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Thermo Fisher Scientific (ehem. Fermentas), Waltham, USA
Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

Entellan	Merck, Darmstadt, DE
Ethanol (70 %, vergällt)	Fischar, Saarbrücken, DE
Ethanol (ROTIPURAN® ≥ 99,8 %)	Roth, Karlsruhe, DE
fetales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech, Aidenbach, DE
Glycerol	Roth, Karlsruhe, DE
Glycin	Roth, Karlsruhe, DE
Hämatoxylin	Dako, Santa Clara, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt, DE
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe, DE
Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe, DE
Lipofectamine® 2000 Reagent	Thermo Fisher Scientific (ehem. Life technologies), Waltham, USA
Lomustin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe, DE
MagicMark™ XP Western Protein Standard	Thermo Fisher Scientific (ehem. Life technologies), Waltham, USA
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Roth, Karlsruhe, DE
Methanol (ROTIPURAN® ≥ 99,9 %)	Roth, Karlsruhe, DE
Minimal Essential Medium (MEM; Opti-MEM®)	Thermo Fisher Scientific (ehem. Life technologies), Waltham, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe, DE
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, DE
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe, DE
Nonylphenoethoxylat (NP-40)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin (100 U/ml) / Streptomycin (100 µg/ml)	Thermo Fisher Scientific (ehem. Life technologies), Waltham, USA
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth, Karlsruhe, DE
Phosphatase-Inhibitor (PhosStop)	Roche, Basel, CH
phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (Tween® 20)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Protease-Inhibitor (complete ULTRA Tablets)	Roche, Basel, CH
Random Hexamer Primer (pd(N)6)	GeneLink, Hawthorne, USA
Resazurin	R&D Systems, Minneapolis, USA
RNase-freies H <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe, DE
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe, DE
SYBR Green 2x SensiFAST	Bioline, London, UK
T-octylphenoxyethoxyethanol (Triton X-100)	Roth, Karlsruhe, DE
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
TRIS-HCl	Roth, Karlsruhe, DE
Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Xylol	Roth, Karlsruhe, DE

**Tabelle 7: Chemikalien**

Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien mit Herstellerangaben.

### 2.1.7 Lösungen

Puffer / Lösungen	Zusammensetzung
4x Lämmli-Puffer	8 % (w/v) SDS; 10 % (v/v) $\beta$ -mercaptoethanol; 20 % (v/v) Glycerol; 0,004 % (w/v) Bromphenolblau; 0,125 M TRIS-HCl; pH einstellen auf 6,8
5 % BSA in PBS-T	5 % (w/v) BSA in PBS-T lösen
5 % Magermilch in TBS-T	5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-T lösen
Blot-Puffer (1x)	14 g Glycin; 3 g TRIS; lösen in 800 ml H <sub>2</sub> O; auffüllen mit 200 ml Methanol auf 1 l
Citrat-Puffer	2,94 g C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> NaO <sub>7</sub> lösen in 1 l H <sub>2</sub> O; pH-Wert einstellen auf 6,0
hypotoner Lysepuffer	10 mM TRIS-HCl (pH = 8); 1 mM KCl; 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1 mM PMSF; 1 mM DTT; mini protease inhibitor 1x
Lauf-Puffer (10x)	30 g TRIS; 144 g Glycin; 10 g SDS; auffüllen auf 1 l H <sub>2</sub> O; pH-Wert einstellen auf 8,3
LB-Medium	10 g Trypton; 5 g Hefe; 5 g NaCl; lösen in 1 l H <sub>2</sub> O; pH-Wert einstellen auf 7,5; autoklavieren
PBS (10x)	80 g NaCl; 2 g KCl; 14,4 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 2,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; mit H <sub>2</sub> O auf 1 l auffüllen; pH-Wert einstellen auf 7,4
PBS-T (1x)	100 ml 10x PBS lösen in 900 ml H <sub>2</sub> O; 500 $\mu$ l Tween® 20
RIPA-Lyse-Puffer	1,58 g TRIS-HCl; 1,75 g NaCl; 1 ml Triton X-100; 1 g DOC; lösen in 190 ml H <sub>2</sub> O; pH einstellen auf 8
Stripping-Puffer	0,38 g Glycin; 0,74 g NaCl; 250 $\mu$ l $\beta$ -Mercaptoethanol; 25 $\mu$ l Tween®; lösen in 50 ml H <sub>2</sub> O
TRIS-gepufferte Salzlösung (TBS (10x))	121,14 g TRIS; 58,44 g NaCl; 5,08 g MgCl <sub>2</sub> ; lösen in 1 l H <sub>2</sub> O; pH-Wert einstellen auf 7,4

#### Tabelle 8: Protokolle verwendeter Pufferlösungen

Rezepturen der selbstangestellten Puffer und Lösungen mit Angaben zu Zusammensetzung und Herstellung.

### 2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Materialien	Modell / Größe(n)	Hersteller
Deckgläschen	18 mm x 18 mm	Roth, Karlsruhe, DE
Dialysemembran	Spectra/Por®; Trenngrenze 3,5 kDa; 18 mm	Spectrum, Los Angeles, USA
Dialyseschlauch-Verschlussklammern	Spectra/Por® Closures	Spectrum, Los Angeles, USA
Eppendorf Reaktionsgefäße	SafeSeal; 1,5 ml; 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Fertig-Gele Proteingelektrophorese	Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels	Bio-Rad, Hercules, USA
Gewebekultur-Flaschen	T-75 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AT
Gewebekultur-Platten, schwarz	96-Loch	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Gewebekultur-Platten, transparent	6-Loch; 24-Loch; 96-Loch	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Gewebekultur-Schalen	Ø 6 cm	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Kryokonservierungs-Gefäße	CryoPure; 1,6 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Multipetten-Aufsatz	Combitips plus; 1 ml; 2,5 ml; 10 ml	Eppendorf, Hamburg, DE
Multiply 8er-Kette	0,2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Nitrocellulose Membrane	0,45 µm	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Objektträger	76 mm x 26 mm x 1 mm	Marienfeld, Lauda-Königshofen, DE
Pasteurpipetten, Glas	Ø 1 mm (Spitze)	VWR International GmbH, Ismaning, DE
PCR-Platten	96-Loch	4titude, Dorking, UK
PCR-Platten-Klebefolien	qPCR seal sheets	4titude, Dorking, UK
Pipetten, serologisch	2 ml; 5 ml; 10 ml; 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Pipettenspitzen, gestopft	0,5 - 20 µl; 2 - 20 µl; 2 - 200 µl; 100 - 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Spritzen	2 ml	BD GmbH, Heidelberg, DE
Spritzennadeln	20 G (Ø 1,1 mm)	BD GmbH, Heidelberg, DE
Zellschaber	17 mm (Lamellenbreite)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Zentrifugenröhrchen, konisch	15 ml; 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE

**Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien**

Auflistung der verwendeten Einwegmaterialien ergänzt durch Angaben zu Modell, Größe und vertreibender Firma.

### 2.1.9 Kits

Reagenzien-Satz (Kit)	Hersteller	Verwendung
Apo-ONE® Homogeneous Caspase 3/7 Assay	Promega, Madison, USA	Apoptose-Assay
Cell proliferation ELISA, Bromdesoxyuridin (BrdU)	Roche, Basel, CH	Proliferations-Assay
DC™ Protein Assay	Bio-Rad, Hercules, USA	Proteinbestimmung nach Lowry
EnVision™+ Dual Link System-HRP Kit	Dako, Santa Clara, USA	IHC
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Venlo, NL	Plasmid-Präparation
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Venlo, NL	RNA-Isolierung
SuperScript™ II Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific (ehem. Life technologies, ehem. Invitrogen), Waltham, USA	qRT-PCR
TruSeq® RNA Sample Preparation Kit v2	Illumina, San Diego, USA	RNA-Seq

SuperSignal West Pico Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Fotodokumentation Western Blot
---------------------------------	--	--------------------------------

**Tabelle 10: kommerzielle Reagenzien Sätze (Kits)**

Übersicht der kommerziell zusammengestellten Assays und Präparations-Kits mit Angabe des Herstellers sowie des Verwendungszwecks.

**2.1.10 Geräte und Ausstattung**

Gerät	Modell / Größe(n)	Hersteller
Blotgerät	Fastblot B44	Biometra, Göttingen, DE
Brutschrank	B6060	Heraeus, Hanau, DE
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Heracell™ 240i	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Elektrophorese-Apparatur	Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Bio-Rad, Hercules, USA
Elektrophorese-Apparatur (KFB)	Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Färbekammer, feucht (IHC)	Stain Tray™	Roth, Karlsruhe, DE
Färbetröge (IHC)	Färbetrog mit Deckel	Biosystems, Muttensz, CH
Geldokumentationssystem	ImageQuant LAS 4000 mini	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK
Horizontal-Schüttler	Schüttelmaschine LS10	Gerhardt, Königswinter-Oberdollendorf, DE
Horizontal-Schüttler (Kühlraum)	SHAKER DOS-10L	neoLAB, Heidelberg, DE
Magnetständer	Magnetic Stand-96	Thermo Fisher Scientific (ehem. Life technologies), Waltham, USA
Mehrkanalpipette	5-100 µl	Sartorius, Göttingen, DE
Mikroplatten-Reader	FLUOStar Omega	BMG Labtech, Ortenberg, DE
Mikroskop (IHC-Fotodokumentation)	Axiovert 200, AxioCam MRc	Carl Zeiss, Oberkochen, DE
Mikroskop (Zellkultur)	CX 31	Olympus, Shinjuku, JP
Mikrowelle	MW 22235 CB	Bomann, Kempen, DE
Multipette	plus	Eppendorf, Hamburg, DE
Netzgerät Proteingelektrophorese	Power Pac Basic™ (300 V, 400 mA, 75 W)	Bio-Rad, Hercules, USA
PCR-System (real-time)	StepOnePlus™	Applied Biosystems, Foster City, USA
pH-Meter	FiveEasy™	Mettler Toledo, Columbus, USA
Pipetten	0,5-10 µl; 2-20 µl; 20-200 µl; 100-1.000 µl	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipettierhilfe	accu-jet® pro	Brand, Wertheim, DE
Reagenzglasschüttler (Vortex)	100 - 2500 / min	VWR, Ismaning, DE

Schüttelinkubator	3033	GFL, Burgwedel, DE
Sequenziergerät NGS (KFB)	HiSeq 1000	Illumina, San Diego, USA
Sicherheitswerkbank	HERAsafe laminar flow KS/KSP	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Spektrophotometer	NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Thermocycler	T3000	Biometra, Göttingen, DE
Thermo-Mixer	compact	Eppendorf, Hamburg, DE
Waage	Balance PBJ6200-2M	Kern, Balingen, DE
Waage, Präzision	PioneerTM	Ohaus, Parsippany, USA
Wasserbad	AL 25	Lauda, Lauda-Königshofen, DE
Zählkammer	Neubauer	Marienfeld, Lauda- Königshofen, DE
Zentrifuge, groß	Rotina 420R	HettichLab, Tuttlingen, DE
Zentrifuge, klein	Mini Star	VWR, Ismaning, DE

**Tabelle 11: Laborausstattung**

Übersicht der genutzten elektrischen Gerätschaften und weiterer Laborausstattung.

### 2.1.11 Software

Software	Hersteller	Anwendung
CASAVA (Version 1.8.2)	Illumina, San Diego, USA	NGS
Citavi (Version 5.7)	Swiss Academic Software, Wädenswil, CH	Literaturverwaltung
cutadapt (Version 1.11)	Department of Computer Science, TU Dortmund, DE	NGS
FASTQC (Version 0.11.5)	Babraham Bioinformatics, Cambridge, UK	NGS
GenePattern GSEA module v16	Broad Institute, Cambridge, USA	NGS
Genome Reference Consortium Human Build 38 (GRCh38.p7)	ENSEMBLE gene annotation system, European Bioinformatics Institute	NGS
GraphPad Prism (Version 7)	GraphPad Software, La Jolla, USA	Statistik, graphische Darstellung
hisat2-2.0.4	Center for Computational Biology, Johns Hopkins University, Baltimore, USA	NGS
Image Quant (TL 8.1)	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK	Auswertung Western Blot
MARS Data Analysis Software (Version 2.41)	BMG Labtech, Ortenberg, DE	Mikroplatten-Analyse
Microsoft Office (Version 2007-2019)	Microsoft, Redmond, USA	Daten-Analyse

## Material und Methoden

NanoDrop 2000-Software (Version 1.4.2)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Konzentrationsbestimmung Nukleinsäuren
Omega Steuerungs- Software (Version 3.00)	BMG Labtech, Ortenberg, DE	Mikroplatten-Analyse
R (Version 3.1.2)	<a href="https://www.r-project.org/">https://www.r-project.org/</a>	NGS
StepOne™ Software (Version 2.1)	Applied Biosystems, Foster City, USA	Auswertung qRT-PCR

### **Tabelle 12: Software**

Übersicht der verwendeten Programme in der jeweils zuletzt genutzten Version mit Herstellerangabe und Verwendungszweck.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Kultivierung

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendeten adhärenenten Gliomzelllinien wurden unter sterilen Bedingungen in DMEM mit 10 % (v/v) FCS sowie den Antibiotika Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) kultiviert. Bei einer 70%igen Konfluenz des Zellrasens wurden die Gliomzellen im Verhältnis 1 : 10 gesplittet. Hierbei wurden sie mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin enzymatisch vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Die Andauung wurde durch die Zugabe von Kulturmedium abgestoppt. Nach vierminütiger Zentrifugation bei 1000 g und Abnahme des zellfreien Überstandes erfolgte die Resuspension der Zellpellets in 8 ml Kulturmedium. Die Inkubation wurde im Feuchtbrutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> vorgenommen. Die dauerhafte Lagerung der Zelllinien erfolgte in FCS mit 10 % (v/v) DMSO in Flüssigstickstoff.

#### 2.2.1.2 Zellernte und Aussaat

Für die Aussaat der Gliomzellen wurden diese äquivalent zum bereits beschriebenen Splitten in Suspension gebracht, gezählt und in entsprechender Verdünnung ausgesät. Die optimale Zellkonzentration für die jeweiligen Versuche richtete sich nach den angegebenen Herstellerempfehlungen der verwendeten Kits und Reagenzien oder wurde ausgetestet. Die Zellzahl wurde mikroskopisch in der Neubauerzählkammer und mithilfe der nachstehenden Formel ermittelt (128,129).

#### Formel Neubauer-Zählkammer

$$c = \frac{Z/n}{A * h * Verdünnung}$$

$c$  = Zelldichte (Zellen /µl)

$Z$  = Anzahl Zellen in  $n$  Großquadraten

$n$  = Anzahl ausgezählter Großquadrate

$A$  = Kammerfläche (mm<sup>2</sup>)

$h$  = Kammertiefe (mm)

### **2.2.1.3 Transfektion**

Es wurde sowohl eine Herabregulierung der *USP3*-Expression mittels *small interfering RNA* (siRNA) als auch eine Überexpression durch Plasmid-Transfektion durchgeführt. Zusätzlich wurde stets eine Negativkontrolle (NTC (*non-targeting control*)) mitgeführt. Die Austestung adäquater Konzentrationen der Transfektionsreagenzien und Nucleinsäuren entsprach den Herstellerempfehlungen. Die Einschleusung der RNA bzw. DNA in die Zelle erfolgte nach dem Prinzip der Lipofektion. Hierbei werden unilamellare Vesikel mit den jeweiligen Nucleinsäuren beladen, um im Anschluss mit der Zellmembran zu fusionieren (130,131). Die folgenden Standardprotokolle wurden in sämtlichen Versuchen verwendet.

#### **siRNA**

Bei der siRNA-vermittelten Transfektion regulieren kurze ein- oder doppelsträngige Ribonucleinsäuren durch RNA-Interferenz die Translation eines Genproduktes herab. Es kommt zur komplementären Anlagerung der synthetischen siRNA an zelleigene mRNA und zu anschließendem Abbau dieser Transkripte durch den sogenannten *RNA-induced silencing complex* (RISC), was zum Knockdown führt (132,133). 24 h nach Zellaussaat wurden die Zellen mit siRNA (*USP3* bzw. NTC) einer Endmolarität von 30 nM und 1 µl/ml *DharmaFECT* (Dharmacon) in *Opti-MEM* nach Herstellerprotokoll transfiziert.

#### **Isolierung von Plasmid-DNA**

In einem ersten Schritt erfolgte die Gewinnung von Plasmid-DNA aus der bei -80 °C gelagerten Bakterien-Stammlösung (*bacterial stock*). 3 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) wurden mit durch steriles Picken gewonnenen Klonen beimpft und diese Vorkultur über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. 400 µl der Bakteriensuspension bildeten in 200 ml LB-Medium nach erneuter nächtlicher Inkubation das Ausgangsmaterial für die anschließende Isolierung von Plasmid-DNA. Diese erfolgte als Maxi-Präparation unter Verwendung des *MaxiKits* (Qiagen) nach Herstellerprotokoll. Die Konzentration des DNA-Produkts wurde spektrophotometrisch am *NanoDrop 2000* bestimmt.

#### **Plasmid-Transfektion**

Die Überexpression des Zielgens wird durch Einschleusen der isolierten Plasmid-DNA mit Transkription und Translation durch zelleigene Enzyme erreicht (131,134). Zur Transfektion der Gliomzellen wurden 2 µl/ml *Lipofectamine*<sup>®</sup> *2000 Reagent* (Thermo Fisher Scientific) und 1 µg/ml Plasmid-DNA in *Opti-MEM* gemäß Herstellerangaben verwendet. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion für RNA-, Protein- oder Histonextraktion geerntet.

#### 2.2.1.4 Proliferations-Assay

Das Proliferationsverhalten der transfizierten Zellen wurde unter Verwendung von Bromdesoxyuridin (BrdU) analysiert. BrdU wird als Nukleosidanalogen von proliferierenden Zellen während der Synthese-Phase der Zellteilung anstelle von dTTP in die synthetisierte DNA eingebaut. Durch anschließende Markierung mit Antikörpern und Reporterenzym-vermittelten Substratumsatz kann die Proliferation einer Zellpopulation am Mikroplatten-Leser quantifiziert werden (135–138).

Die Zellen wurden in schwarzen 96-Loch-Platten ausgesät und 24 h später transfiziert. Nach 48 h wurde der Proliferations-Assay (*Cell proliferation ELISA, Bromdesoxyuridin* (Roche)) gemäß der Herstellerempfehlung durchgeführt. Der Einbau von BrdU erfolgte während einer vierstündigen Inkubationsperiode bei 37 °C im Feuchtbrutschrank. Nach Formalinfixierung des Zellrasens wurde der Anti-BrdU-Antikörper für neunzig Minuten bei Raumtemperatur (RT) auf die Zellen gegeben. Die Messung der Lumineszenz durch Umsetzung des zugegebenen Substrats erfolgte nach fünf Minuten bei einer Wellenlänge von 450 nm.

#### 2.2.1.5 Apoptose-Assay

Als Apoptose wird der programmierte Zelltod bezeichnet, der durch Immunzellen (extrinsisch) oder von der Zelle selbst als Reaktion auf DNA-Schäden oder eine entgleiste Zellhomöostase (intrinsisch) induziert werden kann. Durch das kontrollierte Absterben der Zellen sollen eine Beeinträchtigung des Gewebes durch freigesetzte intrazelluläre Stoffe sowie eine maligne Entartung der Zelle bis zur Tumorentstehung vermieden werden. Die vermittelnden Enzyme der Apoptose sind die Caspasen (*cysteiny-l-aspartate specific protease*), wobei es in einer Kaskade zur Aktivierung weiterer nachgeschalteter Caspasen kommt. Diese sogenannten Effektor-Caspasen, unter anderem die Caspasen 3 und 7, spalten zelleigene Strukturproteine und aktivieren DNA-abbauende Nukleasen (139,140).

In dieser Arbeit wurde der *Apo-ONE® Homogeneous Caspase 3/7 Assay* (Promega) verwendet. Das zugrunde liegende Prinzip ist die spezifische enzymatische Spaltung eines Rhodamin-haltigen Substrats (*rhodamine 110 bis-(N-CBZ-l-aspartyl-l-glutamyl-l-valyl-aspartic acid amide)*) durch die Caspasen 3 und 7. Die Menge des freigesetzten Fluoreszenzfarbstoffs Rhodamin ist proportional zu der Apoptoseaktivität einer Zellpopulation (141,142). Die Zellaussaat erfolgte in lichtundurchlässigen schwarzen 96-Loch-Platten. 24 h später erfolgte die Transfektion mit siRNA bzw. Plasmid wie bereits beschrieben in vierfachen Ansätzen. Nach weiteren 48 h wurde der Caspase-Assay dem Herstellerprotokoll folgend durchgeführt. Die Emission wurde nach vier Stunden Inkubation

spektrofluorometrisch am Mikroplatten-Leser bei einer Wellenlänge von 521 nm vermessen. Zur Verrechnung der basalen Fluoreszenz dienten Leerkontrollen ohne Zellen, als Bezugskontrolle die nicht transfizierten Zellen.

### **2.2.1.6 Lomustin-Chemosensitivitäts-Assay**

Der Einfluss einer Überexpression bzw. einer Herabregulation von *USP3* wurde mittels EC-50-Bestimmungen von Lomustin untersucht. Unter der EC-50 bzw. IC-50 (mittlere effektive bzw. inhibitorische Konzentration) versteht man die Konzentration einer Substanz, die zu einer 50%igen Wachstumshemmung der Zellen führt (130,143). Sie ist in diesem Fall somit ein Maß für die Chemosensitivität der Zellen gegenüber dem verwendeten alkylierenden Chemotherapeutikum Lomustin. Zur Bestimmung der Zellzahl fand der Redoxfarbstoff Resazurin Verwendung, der von vitalen Zellen zum fluoreszierenden Resoforin reduziert wird (128,144,145).

Die Zellaussaat sowie die anschließende Transfektion nach 24 h erfolgte in 96-Loch-Platten. 48 h nach Transfektion wurde Lomustin in aufsteigenden Konzentrationen (0  $\mu\text{M}$ ; 1,95  $\mu\text{M}$ ; 3,91  $\mu\text{M}$ ; 7,81  $\mu\text{M}$ ; 15,63  $\mu\text{M}$ ; 31,25  $\mu\text{M}$ ; 62,5  $\mu\text{M}$ ; 125  $\mu\text{M}$ ; 250  $\mu\text{M}$ ; 500  $\mu\text{M}$ ) auf die Zellen gegeben. Die Verdünnung der Stammlösung (10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , molare Masse = 233,7 g/mol) erfolgte in DMSO und die anschließende Verdünnungsreihe in DMEM. Nach 96 h Inkubation mit Lomustin wurden 10  $\mu\text{l}$  Resazurin je Loch zugegeben und nach weiteren drei Stunden die Lichtemission bei 590 nm (Anregung mit 544 nm) gemessen.

### **2.2.1.7 Zelluläre Antwort auf DNA-Schaden**

Der folgende Assay diente zur Untersuchung der Ubiquitinierung von H2A durch USP3 im Rahmen der zellulären Reaktion auf DNA-Schäden. Zur Induktion der DNA-Schäden wurde das alkylierende Chemotherapeutikum Lomustin verwendet, das bereits in den Versuchen zur Chemosensitivität eingesetzt wurde (siehe Kapitel 2.2.1.6). Durch den Einbau von Alkylgruppen unterbindet es die Zellreplikation und führt in höherer Konzentration zur DNA-Quervernetzung und zu sekundären Strangbrüchen (113,146–148). Zur Messung der induzierten DNA-Schäden wurde das Niveau der phosphorylierten Form des Histon H2AX ( $\gamma\text{H2AX}$ ) untersucht, welches ein etablierter Marker für die schadensgetriggerte DNA-Reparatur-Kaskade ist (64,116).

Hierzu wurden siRNA-transfizierte Zellen in 6-Loch-Platten für 24 h mit aufsteigenden Konzentrationen Lomustin (0  $\mu\text{M}$ ; 25  $\mu\text{M}$ ; 50  $\mu\text{M}$ ; 75  $\mu\text{M}$ ) behandelt. Anschließend wurden Protein sowie Histone extrahiert (siehe Kapitel 2.2.3.2) und mittels Western Blot (siehe Kapitel

2.2.3.5) die ubiquitinierte Form von H2A (H2Aub) sowie das phosphorylierte H2AX detektiert und quantifiziert.

## **2.2.2 Molekularbiologische Arbeiten**

### **2.2.2.1 RNA-Isolierung und Konzentrationsbestimmung**

Die Isolierung der RNA erfolgte durch Aufspaltung der Zellen, partielle Zerstörung von Wasserstoffbrückenbindungen durch die chaotrope Substanz Guanidiniumthiocyanat und anschließende Absorption der RNA mittels einer Siliciumdioxid-beschichteten Membran. Hierzu wurde das *RNeasy Plus Mini Kit* (Qiagen) verwendet. Die adhärennten Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend in den enthaltenen Resuspensions-Puffer aufgenommen. Die Lyse der Zellen, Absorption der RNA an die Silica-Membran sowie Zentrifugations- und Waschschriffe erfolgten nach dem Herstellerprotokoll. Die RNA wurde in 30 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O eluiert und bei -80 °C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung der Extrakte erfolgte am *Nanodrop 2000* bei 260 nm sowie bei 280 nm zur Reinheitskontrolle. Die Berechnung basiert auf einer modifizierten Form des lambert-beerschen Gesetzes, sodass die Konzentration der Nukleinsäuren in ng/µl angegeben werden kann (138,149).

### **2.2.2.2 Synthese von komplementärer DNA**

Die Synthese komplementärer DNA (cDNA) erfolgte unter Verwendung der *SuperScript II Reverse Transcriptase* (200 U/µl) von Thermo Fisher Scientific gemäß den Angaben im Herstellerprotokoll.

### **2.2.2.3 Quantitative Echtzeit-PCR**

Bei der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) handelt es sich um eine Variante der klassischen PCR, bei der neben der Amplifikation spezifischer DNA-Segmente zusätzlich eine Quantifizierung der DNA-Menge in Echtzeit möglich ist. Die exponentielle Replikation läuft in der klassischen PCR in drei aufeinanderfolgenden Schritten ab, die in zwanzig bis fünfzig Zyklen wiederholt werden. Beim Schritt der Denaturierung kommt es durch initiale Erhitzung auf 95 °C zur Lösung der Wasserstoffbrückenbindung zwischen den komplementären Basen und somit zur Trennung der beiden DNA-Stränge. In der Phase der Primerhybridisierung lagern sich die Primer den passenden DNA-Abschnitten an. Bei Abhängigkeit der dafür notwendigen Temperatur von Länge und Basenzusammensetzung der verwendeten Primer-Sequenzen betrug die

Temperatur unter den gegebenen Versuchsbedingungen 58 °C. Thermostabile Polymerasen arbeiten bei 72 °C und vermitteln durch komplementäre Nukleotidanlagerung die Elongation. Die Quantifizierung der DNA-Menge erfolgte durch Fluoreszenzmessung am *StepOnePlus* Real-Time-PCR-Gerät. Der fluoreszierende DNA-Farbstoff *SYBR-Green* lagert sich interkalierend in die synthetisierten DNA-Doppelstränge ein. Das detektierte Signal nimmt somit proportional zur Amplifikation über die PCR-Zyklen zu. Um Werte vergleichen zu können und sicherzustellen, dass im exponentiellen Bereich der Amplifikation gemessen wird, erfolgt die Bestimmung des sogenannten Ct-Werts (*cycle threshold*), bei dem das Fluoreszenzsignal erstmals signifikant über das Hintergrundniveau ansteigt. Je weniger DNA in der Ausgangsprobe, desto mehr Zyklen müssen bis zu diesem Punkt ablaufen und entsprechend höher ist der Ct-Wert (150,151). Die PCR wurde jeweils mit *USP3*-Primern und *ARF1*-Primern durchgeführt. Je Ansatz wurden Triplets pipettiert, wobei ein Ansatz (25 µl) aus folgenden Komponenten bestand: 12,50 µl *SYBR-Green*; 6 µl RNase-freies H<sub>2</sub>O; 0,75 µl Vorwärts- und 0,75 µl Rückwärts-Primer und 5 µl verdünnte cDNA (1 : 25) bzw. H<sub>2</sub>O.

Phasen des PCR-Laufs	Wiederholungen	Temperatur	Dauer
1 initiale Denaturierung		95 °C	15 min
2a Denaturierung	35 Zyklen	95 °C	20 sec
2b Primerhybridisierung		58 °C	20 sec
2c Elongation		72 °C	20 sec
3 finale Extension		72 °C	5 min
4 Ende		4 °C	∞

**Tabelle 13: PCR-Schema**

Tabellarische Übersicht des angewandten Schemas der qRT-PCR mit Angaben zu Wiederholungen, Temperatur und Dauer der Einzelschritte.

Zur Überprüfung der Spezifität der amplifizierten PCR-Produkte erfolgte am Ende der Zyklen eine Schmelzkurvenanalyse. Die Auswertung der Messdaten wurde mit Hilfe der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode durchgeführt (150,151). Hierbei wurde zunächst jeder *USP3*-Messwert einer Probe mit dem entsprechenden Wert von *ARF1* verrechnet, der als interne Ladekontrolle diente ( $\text{Ct}_{\text{USP3}} - \text{Ct}_{\text{ARF1}} = \Delta\text{Ct}$ ). Anschließend wurden die  $\Delta\text{Ct}$ -Werte der *USP3*-transfizierten Proben in Relation zu den Kontrollproben (NTC) gesetzt ( $\Delta\text{Ct}_{\text{Probe}} - \Delta\text{Ct}_{\text{NTC}} = \Delta\Delta\text{Ct}$ ). Die Expressionsniveaus des Zielgens konnten durch Bildung des Potenzwerts zur Basis 1,9 mit den jeweiligen  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werten als Exponenten vergleichbar gemacht werden.

#### 2.2.2.4 Next-Generation Sequencing

Die Hochdurchsatz-Sequenzierung von siRNA- und Plasmid-transfizierten Zellen der Linien LN18 und U251 ermöglichte eine Untersuchung der Auswirkungen einer Überexpression oder Herabregulation von *USP3* auf die globale Genexpression in den behandelten Gliomzelllinien. Die Analyse wurde mit einer hohen Sequenzabdeckung mit dem *HiSeq 1000* (Illumina) nach dem Verfahren der Farbstoffsequenzierung durchgeführt. Hierzu wurde modifizierte Proben-DNA (*libraries*) auf einen Chip (*flow cell*) geladen und in Einzelschritten von je einem Nukleotid amplifiziert. Die Synthese erfolgt mit reversiblen Farbstoffterminatoren (*reversible dye-terminators*). Diese synthetischen Nukleotide sind fluoreszenzmarkiert und blockieren die weitere Amplifikation reversibel, sodass durch Fotografie nach jedem Syntheseschritt eine Sequenzierung der Basenreihenfolge ermöglicht wird (*Synthesis by sequencing*) (152–154).

#### Library-Präparation

Die Libraries wurden mit dem *TruSeq® Library Preparation Kit v2* (Illumina) nach einer 60%igen Variante des Herstellerprotokolls aus isolierter RNA (300 ng) präpariert.

#### Aufreinigung und Fragmentierung der RNA

Nach Isolierung von RNA (siehe Kapitel 2.2.2.1) erfolgte die Verdünnung der Probe mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O auf 300 ng RNA in 30 µl Endvolumen. Aus der Gesamt-RNA wurde die mRNA anhand ihrer charakteristischen Polyadenylierung durch Zugabe RNA-bindender Mikrokügelchen (*RNA Purification Beads*) und anschließende magnetische Selektion aufgereinigt. Im Anschluss wurde die RNA fragmentiert, von den Kügelchen losgelöst und mit Primer und Puffer für die folgende Transkription in cDNA versehen (*Elution, Prime, Fragment mix*). Die Synthese der doppelsträngigen cDNA erfolgte mit Hilfe einer reversen Transkriptase (*SuperScript™ II*) nach dem bereits bei der cDNA-Einzelstrang-Synthese beschriebenen Prinzip (siehe Kapitel 2.2.2.2).

Danach wurden die Enden der DNA-Fragmente begradigt (*End Repair Mix*) und am 3´-Ende adenyliert (*A-Tailing Mix*), um die komplementäre Anlagerung der Indizes zu ermöglichen (*Ligation Control Mix*). Diese Adapter aus je sechs Basenpaaren ermöglichen bei gleichzeitiger Ladung mehrerer Proben eine Zuordnung der DNA-Fragmente. Die Amplifikation der zu sequenzierenden Fragmente wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt (*PCR Primer Cocktail, PCR Master Mix*).

### **RNA-Sequenzierung**

Die Sequenzierung (RNA-Seq) erfolgte in einer Core Facility der Universität Regensburg im Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik (KFB). Die fertigen Libraries wurden mit dem *Bioanalyzer 2100* (Agilent) einer Qualitätskontrolle unterzogen und anschließend auf dem Sequenziergerät *HiSeq 1000* (Illumina) analysiert. Die Proben wurden zunächst durch Verwendung des *KAPA SYBR FAST ABI Prism Library Quantification Kit* (Kapa Biosystems, Wilmington, USA) quantifiziert und nachfolgend in äquimolaren Mengen auf die *Flow Cell* geladen. Die Sequenzierung in Einzel-Leseschritten wurde in fünfzig Zyklen mit einer Sequenzierungs-Tiefe von fünfzig Basenpaaren realisiert.

## **2.2.3 Proteinbiochemische Arbeiten**

### **2.2.3.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten**

Zellaussaat und Transfektion zur Gewinnung von Gesamtprotein erfolgte in 6-Loch-Platten nach Standardprotokoll (siehe Kapitel 2.2.1.2). 48 h nach Behandlung wurden je Näpfchen 100 µl RIPA-Lysepuffer auf die Zellen gegeben und diese anschließend mit Zellschabern abgelöst. Während 15-minütigen Schüttelns bei 4 °C wurde eine vollständige Lyse der Zellen erreicht. Durch anschließendes Abzentrifugieren mit maximaler Umdrehung sammelten sich Membranbestandteile und sonstige Zelldebris als Pellet, sodass die Proteinfraction im Überstand verblieb. Um eine Denaturierung des Proteins zu verhindern, wurden dem Lysepuffer Protease- und Phosphatase-Inhibitoren (*cOmplete ULTRA Tablets*, *PhosStop* (Roche)) zugesetzt. Alle Arbeiten mit Protein- oder Histonextrakten wurden auf Eis oder bei 4 °C und gekühlter Zentrifuge durchgeführt. Die Proben wurden bei -80 °C gelagert.

### **2.2.3.2 Histonextraktion**

Histone als basische Verpackungsproteine der Nukleinsäuren lassen sich in saurer Umgebung extrahieren (155,156). Nach zweimaligem Waschen mit 4 °C kaltem PBS wurden die Zellen im Ganzen mechanisch mittels Zellschaber abgelöst und in PBS in Mikroreaktionsgefäße überführt. Nach Zentrifugation bei 300 g und Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Resuspension in 200 µl hypotonem Lysepuffer, der durch den entstehenden osmotischen Gradienten zu Wassereinstrom und Zellschwellung führt. Die saure Extraktion wurde in HCl einer molaren Endkonzentration von 0,2 M durchgeführt. Während der 30-minütigen Inkubation auf Eis

gehen die Histone in Lösung und können durch Zentrifugation bei 1100 g von Zellbestandteilen höherer Dichte getrennt werden. Der mit Histonen angereicherte Überstand wurde in Dialysemembranen (Spectrum) mit einer Trenngrenze (*molecular weight cut-off* (MWCO)) von 3,5 kDa pipettiert und gegen HCl-Lösung und H<sub>2</sub>O dialysiert. Die Histone wurden zweimal für eine Stunde bei 4 °C in 0,1 M HCl als Dialyselösung geschwenkt, anschließend eine Stunde, zwei Stunden sowie über Nacht in destilliertem H<sub>2</sub>O. Lysepuffer und HCl wurden so osmotisch entfernt und die in H<sub>2</sub>O vorliegenden Histone anschließend bei -80 °C gelagert.

### **2.2.3.3 Konzentrationsbestimmung der Protein- und Histonextrakte**

Die Protein- und Histonkonzentrationen der Proben wurden mit dem Verfahren nach Lowry unter Verwendung des *DC™ Protein Assay* (Bio-Rad) entsprechend der Herstellerangaben bestimmt. In einem ersten Schritt kommt es im Rahmen der Biuret-Reaktion zur Komplexbildung von Peptidbindungen und Cu<sup>2+</sup>-Ionen. Cu(II) wird zu Cu(I) reduziert, um anschließend in einer weiteren Reduktions-Oxidations-Reaktion die Entstehung von Molybdänblau zu ermöglichen (157,158). Dieses entsteht somit proportional zum Proteingehalt der Probe und wurde nach 15-minütiger Inkubation bei einer Wellenlänge von 750 nm photometrisch am Mikrotiterplatten-Leser (*FLUOStar Omega* (BMG labtech)) vermessen. Anhand einer Standardreihe mit bekannten Proteinkonzentrationen von 50 µg/ml bis 1000 µg/ml wurden die Probenkonzentrationen interpoliert. Um im Bereich der Standardkurve zu messen, erfolgte eine Verdünnung der Proteinproben von 1 : 10. Die Histonextrakte konnten aufgrund niedrigerer Konzentrationen unverdünnt gemessen werden.

### **2.2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen bzw. Histonextrakten wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. SDS wirkt hierbei als Detergens und löst die Tertiär- und Quartär-Struktur der Proteine auf. Zusätzlich verleiht es ihnen eine ihrer Größe proportionale negative Ladung, was eine elektrophoretische Auftrennung ermöglicht (159). Die Proben wurden mit RIPA-Puffer verdünnt und Lämmli-Puffer wurde zugesetzt, sodass je Tasche 50 µg Protein geladen wurden. Für den Fall einer unzureichenden Konzentration wurden alle Proben des Teilversuchs entsprechend der maximal erreichbaren Proteinmenge der am niedrigsten konzentrierten Probe geladen. Nach Verdünnung und Schütteln wurden die Proben fünf Minuten bei 95 °C erhitzt und

anschließend auf 12%iges (Protein) bzw. 15%iges (Histone) SDS-Gel geladen. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine nach der Größe erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 90 V für dreißig Minuten und 120 V für weitere sechzig Minuten an die mit Laufpuffer befüllte Elektrophorese-Kammer.

### 2.2.3.5 Western Blot

Im Anschluss wurden die aufgetrennten Proteine mittels Western Blot elektrophoretisch auf Nitrocellulose-Membran transferiert (159). Die Fließpapiere und die Membran wurden fünf Minuten in Blot-Puffer eingelegt und die sogenannte halbtrockene Blot-Apparatur wie folgt aufgebaut: Zuunterst, auf die Anode des Blotgeräts, wurden drei Fließpapiere und darauf die Nitrocellulose-Membran platziert. Anschließend wurde das SDS-Gel kurz mit destilliertem H<sub>2</sub>O gespült, auf die Membran überführt und mit drei weiteren Fließpapieren bedeckt. Die Übertragung der Proteinbanden erfolgte bei maximal 27 V und konstanten 150 mA für 45 Minuten.

Zur Detektion der spezifischen Proteinbanden wurden folgende Antikörper entsprechend der Herstellerangaben und in durch Austestung ermittelten Verdünnungen verwendet:

Antikörper	Verdünnung	Inkubation
Anti-Histone H2A (acidic patch)	1 : 1000, in 5 % Magermilch in PBS-T	Über Nacht bei -4 °C
Anti- $\alpha$ -Tubulin	1 : 3000, in 5 % Magermilch in PBS-T	Über Nacht bei -4 °C
Phospho-Histone H2A.X (Ser139) (20E3)	1 : 1000, in 5 % BSA in TBS-T	Über Nacht bei -4 °C
Ubiquityl-Histone H2A (Lsy119) (D27C4) XP®	1 : 5000, in 5 % Magermilch in PBS-T	Über Nacht bei -4 °C
USP3 (8L8): sc-135597	1 : 200, in 5 % Magermilch in PBS-T	Über Nacht bei -4 °C
Goat anti-mouse IgG-HRP: sc-2005	1 : 5000, je nach primär Antikörper	1 h bei RT
Goat anti-rabbit IgG-HRP: sc-2004	1 : 5000, je nach primär Antikörper	1 h bei RT

**Tabelle 14: Antikörper Western Blot**

Übersicht über die für Western Blots verwendeten primären und sekundären Antikörper mit Angabe von Verdünnung, Lösungsmittel sowie Dauer und Temperatur der Inkubation.

Um unspezifische Antikörperbindung zu verhindern, wurden die Membranen dreißig Minuten geblockt. Die Blocklösung war jeweils mit dem verdünnenden Lösungsmittel des Primärantikörpers identisch. Zunächst erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper zur spezifischen Bindung des Ziel-Antigens. Nach dreimaligem je zehnminütigem Waschen mit Puffer wurden die Membranen in 10 ml Lösung eines geeigneten Sekundärantikörpers inkubiert, der gegen die Fc-Region (*fragment crystallizable*) des speziefremden Primärantikörpers gerichtet ist. Je nach Ursprungswirt der primären Antikörper wurden sekundäre Antikörper aus Ziegen Serum gegen Maus oder Kaninchen verwendet. Der Sekundärantikörper liegt gebunden an eine Meerrettich-Peroxidase vor, welche die Umwandlung eines Substrats in sein lumineszierendes Produkt vermittelt. Verwendet wurde hierzu das *SuperSignal West Pico Substrate* (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerprotokoll. Die Substratumsetzung wurde nach einer Minute Inkubation am *ImageQuant LAS 4000 mini* (GE Healthcare) mittels Chemilumineszenz gemessen und dokumentiert.

In einem zweiten Schritt wurde zusätzlich Tubulin bzw. H2A als Ladekontrolle angefärbt, um eine Quantifizierung durch Verrechnung möglicher Schwankungen bei der Beladung des SDS-Gels zu ermöglichen. War der Ziel-Antikörper und der Antikörper der Ladekontrolle aus Seren derselben Spezies gewonnen worden, wurden die zur Detektion des Ziel-Antigens bereits gebundenen Antikörper durch dreißigminütiges Einlegen in  $\beta$ -Mercaptoethanolhaltigem Stripping-Puffer entfernt, bevor im Anschluss auf derselben Membran das Kontroll-Antigen detektiert wurde.

Die quantitative Auswertung der fotodokumentierten Banden erfolgte durch Vermessung der Pixeldichte mittels *Image Quant (TL 8.1)*.

### **2.2.3.6 Immunhistochemie**

Die immunhistochemischen Färbungen wurden mit dem *EnVision™+ Dual Link System-HRP Kit* (Dako) und dem monoklonalen Maus-Antikörper *USP3 (8L8): sc-135597* (Santa Cruz Biotechnology) in einer Verdünnung von 1 : 20 in PBS mit 1 % (w/v) BSA durchgeführt. Zu den verwendeten Gewebeschnitten siehe Kapitel 2.1.1. Diese wurden zur Vorbereitung dreißig Minuten bei 70 °C aufgetaut. Nach der absteigenden Alkoholreihe zur Entparaffinierung des Gewebes wurden die Schnitte vierzig Minuten in Citrat-Puffer gekocht, um Zielepitope zu demaskieren und Kernproteine besser zugänglich zu machen. Dem Herstellerprotokoll folgend wurden zuerst endogene Enzyme (*Dual Endogenous Enzyme Block*, zehn Minuten) deaktiviert und anschließend je Schnitt 100  $\mu$ l der

Primärantikörperverdünnung über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Der an den USP3-Antikörper bindende Sekundärantikörper (*Labelled Polymer HRP*, Meerrettich-Peroxidase) wurde zehn Minuten inkubiert. Diaminobenzidin (DAB, fünf Minuten) diente als chromogenes Substrat, das durch Oxidation zum farbigen Produkt umgesetzt wird und die Verteilung des Zielproteins im Gewebeschnitt sichtbar macht (137,160). Zur exakteren Darstellung der Strukturen erfolgte eine Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin. Nachdem den Schnitten durch die aufsteigende Alkoholreihe wässrige Bestandteile wieder entzogen worden waren, folgte die Eindeckelung und Haltbarmachung mit Entellan. Um die Beurteilung der Schnitte zu objektivieren, wurden repräsentative Ausschnitte des Tumors fotografiert und anschließend bewertet.

Punkt wert	Bewertungs-Kriterien		
	Anzahl gefärbter Zellen	Intensität	Lokalisation
0	Keine Färbung	Keine Färbung	zytoplasmatisch
1	<10 %	schwach	überwiegend zytoplasmatisch
2	10-50 %	mittel	gleichmäßig
3	50-80 %	stark	überwiegend nukleär
4	>80 %	sehr stark	nukleär

**Tabelle 15: Kriterien der Punktwertung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte**  
 Übersicht des Bewertungsmaßstabes zur Beurteilung der IHC-Färbung mit Zuordnung der Punktwerte 0 – 4 in den Kategorien Anzahl, Intensität und Lokalisation gefärbter Zellen.

## 2.2.4 Bioinformatische Methoden

### 2.2.4.1 Statistische Auswertung

Die Versuche wurden in mindestens drei unabhängigen Wiederholungen durchgeführt (Ausnahmen: *USP3*-Expression in Gliomzelllinien, NGS und Chemosensitivitäts-Assay mit jeweils zwei Replikaten). Die statistische Auswertung wurde soweit nicht anders angegeben mit *Microsoft Office Excel* (Version 2007-2019) und *GraphPad Prism* (Version 7) durchgeführt, p-Werte mit Hilfe des t-Tests berechnet. P-Werte von  $p < 0,05$  (\*) bzw.  $p < 0,01$  (\*\*) bzw.  $p < 0,001$  (\*\*\*) bzw.  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*) wurden als statistisch signifikant interpretiert.

### 2.2.4.2 Datenverarbeitung

Mittels der Software *CASAVA 1.8.2* (Illumina) wurden die durch NGS am KFB erhobenen Daten von .bcl-Dateien in .fastq-Dateien transformiert. Zur weiteren Aufarbeitung der NGS-

Daten wurden Programme verwendet, die online frei oder zu Forschungszwecken zur Verfügung standen. Störende Oligonukleotid-Sequenzen von Primern, Indizes oder Polyadenylierung wurden durch die Trimm-Software *cutadapt v1.11* (Fakultät für Informatik, TU Dortmund) entfernt, die anschließende Qualitätskontrolle wurde mit *FASTQC v 0.11.5* (Babraham Bioinformatics) durchgeführt. Mit der Software *hisat2-2.0.4* (Center for Computational Biology, Johns Hopkins University) wurden die abgelesenen Sequenzen auf das humane Genom (GRCh38, ENSEMBLE *gene annotation system*, European Bioinformatics Institute) gemappt. Die gemappten Reads wurden mittels der Software *Subread package v 1.5.0-p1* mit ENSEMBLE-Genen abgeglichen. Die statistische Auswertung erfolgte mit der R-Version 3.3.2 und dem R-Programm *DESeq2*. Differenziell exprimierte Gene wurden mit einem  $\log_2 \text{fold change} > 1$  bzw.  $< -1$  und einem angepassten p-Wert  $< 0,05$  ermittelt (161,162).

### 2.2.4.3 Hauptkomponentenanalyse

Die Hauptkomponentenanalyse, auch *principal component analysis* (PCA), ist ein Verfahren der multivariablen Statistik, das zur Veranschaulichung umfangreicher Datensätze verwendet wird. Der zugrunde liegende mathematische Algorithmus überführt den Informationsgehalt multipler Variablen in eine reduzierte multidimensionale Darstellung der Komponenten mit der größten Diskrepanz (163,164).

Basierend auf den eintausend am stärksten variabel exprimierten Genen der RNA-Sequenzierung diente die PCA in dieser Arbeit der Untersuchung von möglichen Unterschieden der Genexpression nach *USP3*-Knockdown, -Überexpression sowie untransfizierten Zellen. Die Analyse wurde mit der Freeware *R v3.1.2*, *Bioconductor v3.073* durchgeführt. Die graphische Darstellung in einem zweidimensionalen Koordinatensystem mit X-Achse (PC1) und Y-Achse (PC2) in Ausrichtung der Hauptvariabilitäten wurde unter Verwendung der *reads per kilobase per million mapped reads* (RPKM-Werte) mit dem R-Paket *ggbiplot* erstellt.

### 2.2.4.4 Gene Set Enrichment Analysis

Die GSEA vergleicht das Expressions-Niveau definierter Gengruppen einer Zellpopulation mit einer Kontrollpopulation. Die Einteilung erfolgt anhand gemeinsamer biologischer Funktionen, Lokalisation im Genom oder Regulation der Expression (163,165). Die Analyse wurde in dieser Arbeit unter Verwendung der RPKM-Werte mit *GenePattern GSEA module v16* (Broad Institute) durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

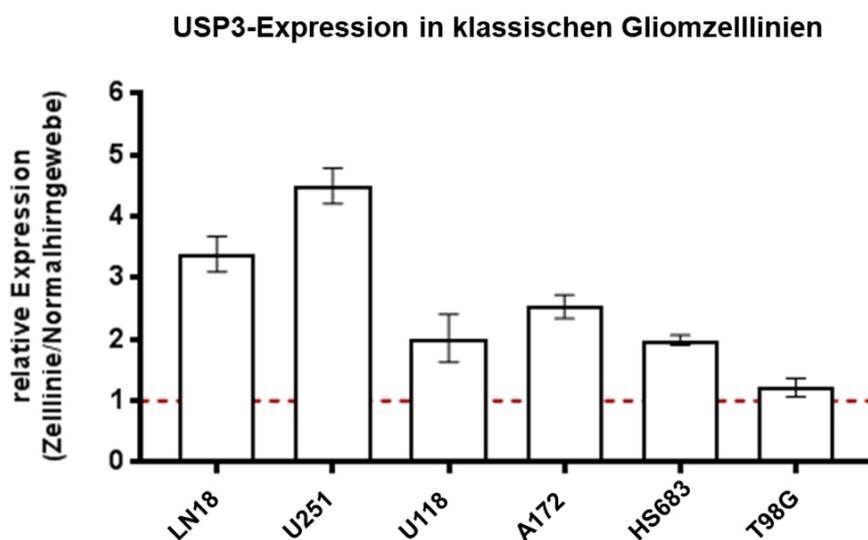
#### 3.1 Expression von *USP3*

Um eine mögliche Beteiligung in der Entstehung oder Progression von Gliomen zu untersuchen, wurde das Expressionsniveau von *USP3* in Gliomzelllinien sowie in histologischen Tumorschnitten mit dem in Normalhirngewebe verglichen.

##### 3.1.1 Expression von *USP3* in Gliomzelllinien

Die Menge von *USP3*-RNA als Korrelat der stattfindenden Transkription des *USP3*-Gens in den sechs untersuchten klassischen Gliomzelllinien wurde nach RNA-Isolierung (siehe Kapitel 2.2.2.1) und cDNA-Synthese (siehe Kapitel 2.2.2.2) mittels qRT-PCR (siehe Kapitel 2.2.2.3) bestimmt.

Die Untersuchung der Expression von *USP3* in den Gliomzelllinien LN18, U251, U118, A172, HS683 und T98G ergibt ein erhöhtes RNA-Niveau in allen untersuchten Zelllinien im Vergleich zur Kontrolle aus Normalhirngewebe. So ist die Menge an *USP3* in den Zelllinien jeweils um den Faktor 3,39 (LN18), 4,5 (U251), 2,02 (U118), 2,54 (A172), 1,99 (HS683) und 1,22 (T98G) höher (siehe Abbildung 1). Da für die Durchführung von Knockdown-Experimenten eine hohe basale Expression günstig ist, werden die beiden Zelllinien mit der stärksten *USP3*-Expression – LN18 und U251 – für die weiteren Versuche verwendet.



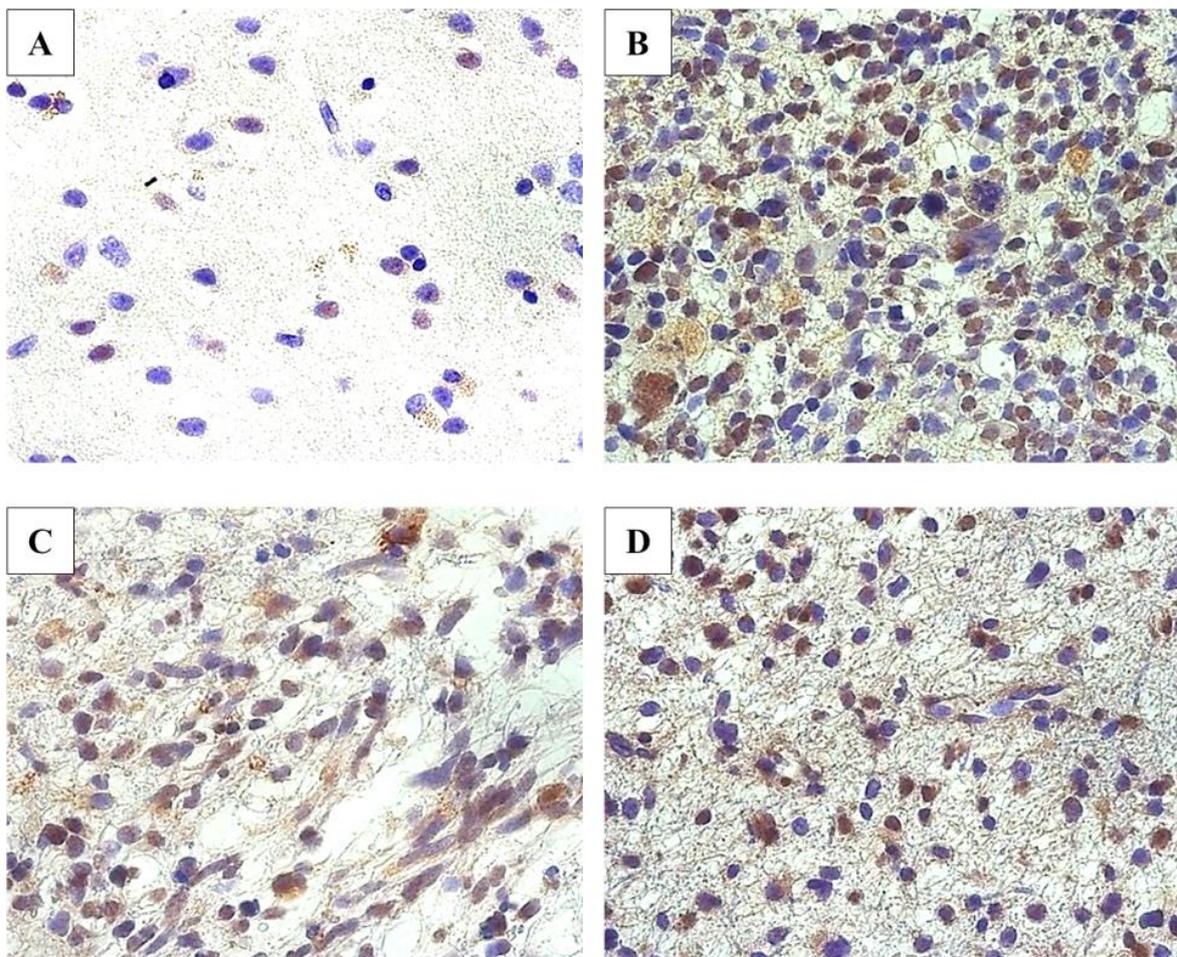
**Abbildung 1: *USP3*-Expression in klassischen Gliomzelllinien**

Abgebildet ist die durch qRT-PCR ermittelte und auf Werte von Normalhirngewebe (gestrichelte Linie) normierte Expression von *USP3* (Y-Achse) in sechs klassischen Gliomzelllinien (X-Achse). Der Versuch wurde in unabhängiger Doppelbestimmung durchgeführt (N = 2).

### 3.1.2 Expression von *USP3* in Hirntumorschnitten

Mittels IHC-Färbung (siehe Kapitel 2.2.3.6) des *USP3*-Proteins in Tumorschnitten aus Operationspräparaten sowie in Gewebeproben aus Normalhirngewebe wurde die Menge der Deubiquitinase *USP3* in Gliomen in Relation zum physiologischen Zustand betrachtet. Zusätzlich wurde nach Unterschieden in Abhängigkeit vom *IDH1*-Mutationsstatus geforscht.

Verglichen mit histologischen Schnitten gesunden Hirngewebes (siehe Abbildung 2 (A)) zeigt sich in den Gliomschnitten (siehe Abbildung 2 (B-D)) eine deutlich vermehrte immunhistochemische Anfärbung des *USP3*-Proteins, die sich als bräunliche Färbung darstellt. So ist sowohl der Anteil signalpositiver Zellen als auch die Intensität der Färbung erhöht. Unter dem Gesichtspunkt der *IDH1*-Mutation ist eine Diskrimination der beiden Untergruppen *IDH1*-Wildtyp (C) und *IDH1*-mutiert (B,D) im direkten Vergleich nicht möglich.



**Abbildung 2: IHC-Färbung von *USP3* in Normalhirngewebe und Tumorschnitten**

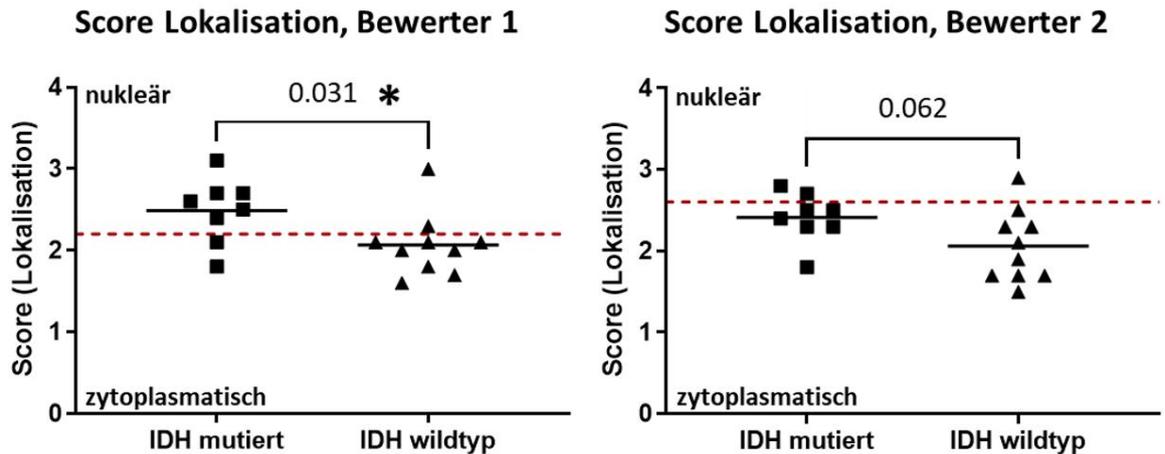
Die Bildtafel zeigt exemplarische IHC-gefärbte Hirngewebeschnitte. Abgebildet sind Normalhirngewebe (A) und Tumorschnitte (B - D). Ein Präparat zeigt den *IDH1*-Wildtyp (C), zwei weitere (B, D) den *IDH1*-mutierten Subtyp.

Die Beurteilung ist durch abweichende Zelldichten zwischen den Tumoren aber auch durch die Varianz einzelner Tumorabschnitte innerhalb eines Präparates eingeschränkt. Zur Objektivierung erfolgte im nächsten Schritt die verblindete Bewertung von je zehn repräsentativen Tumorauschnitten pro Fall mittels Bewertungen der drei Kriterien ‚Anzahl gefärbter Zellen‘, ‚Intensität der Färbung‘ und ‚Lokalisation des Signals‘ durch zwei unabhängige Untersucher. Jedes Kriterium wurde mit 0 bis maximal 4 Punkten gewertet. (siehe Kapitel 2.2.3.6., Tabelle 15).

In der kombinierten Summenwertung von Anzahl und Intensität punkten alle Gliome höher als die Normalhirnprobe, unabhängig von ihrem *IDH1*-Mutationsstatus. So ergibt sich in der ersten Wertung ein mittlerer Punktwert der *IDH1*-Wildtyp-Gliome von 5,05 und der *IDH1*-mutierten von 5,55, wobei die Normalhirnprobe bei 2,60 liegt. In einer zweiten unabhängigen Wertung liegen die Mittelwerte bei gleicher Tendenz bei 4,63 (*IDH1*wt) und 4,78 (*IDH1*mut) bei einem Wert von 3,30 für das Normalhirngewebe. Der maximal erreichbare Summenwert aus Anzahl gefärbter Zellen und Intensität liegt bei 8.

Zwischen Wildtyp und *IDH1*-mutierten Tumoren kann hinsichtlich Anzahl und Intensität USP3-positiver Zellen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p_1 = 0,106$ ,  $p_2 = 0,418$ ).

Bezüglich der Lokalisation des Signals – Anfärbung vorwiegend nukleär (hohe Wertung) oder zytoplasmatisch (niedrige Wertung) – unterscheiden sich *IDH1*-mutierte und nichtmutierte Tumoren signifikant. Die *IDH1*-mutierten Tumoren weisen tendenziell ein stärker im Zellkern verortetes Signal als die Wildtyp-Tumoren auf (siehe Abbildung 3). Der theoretische Maximalwert für die Einzelkategorie Lokalisation liegt bei 4, wobei dieser einer ausschließlichen Kernfärbung entspricht. In der Erstbestimmung erzielen die Wildtyp-Gliome einen Mittelwert von 2,06, die Mutationsträger einen Mittelwert von 2,41 ( $p_1 = 0,031$ ). Die Vergleichsprobe aus Normalhirngewebe liegt bei 2,20. In der zweiten unabhängigen Beurteilung scoren die Wildtyp-Gliome im Mittel bei 2,07, die *IDH1*-mutierte Gruppe bei 2,49 ( $p_2 = 0,062$ ) bei einem Normalhirnwert von 2,60.



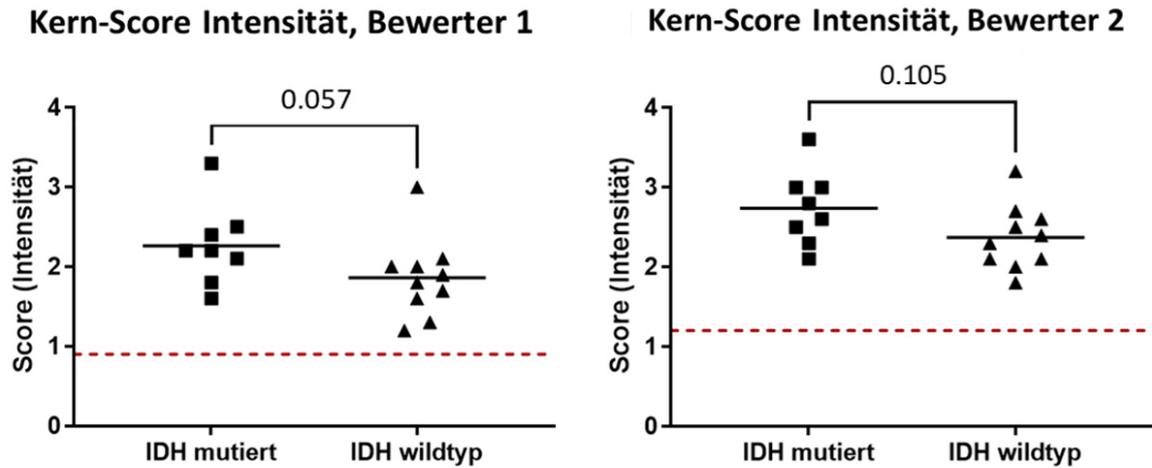
**Abbildung 3: IHC: Punktwertung nach Lokalisation der Färbung**

Die Grafik zeigt die Diskrimination der *IDH1*-Subgruppen (X-Achse) nach vorherrschender Lokalisation des Signals in der Zelle (Y-Achse). Abgebildet sind die Werte der Einzeltumoren (*IDH1*wt: N = 10; *IDH1*mut: N = 8), die Mittelwerte der Gruppen (horizontale Balken), sowie der Wert des Normalhirngewebes (gestrichelte Linie). Die Beurteilung von nukleärer oder zytoplasmatischer Ausprägung der IHC-Färbung von USP3 erfolgte durch zwei unabhängige Bewerter. (Bewerter 1: p = 0,031; Bewerter 2: p = 0,062)

Aufgrund der Annahme, dass für die Deubiquitinierung von Histonen durch USP3 die im Nukleus befindlichen Enzyme im Vordergrund stehen, wurde eine weitere Beurteilung durchgeführt, bei der ausschließlich intranukleäre IHC-Signale bewertet wurden.

In diesem Kern-Scoring zeigt sich kein Unterschied die Anzahl der gefärbten Zellkerne ( $p_1 = 0,472$ ,  $p_2 = 0,326$ ) betreffend, jedoch wird die *IDH1*-mutierte Gruppe in der Kategorie Intensität der Färbung tendenziell höher bewertet ( $p_1 = 0,057$ ,  $p_2 = 0,105$ ). In der ersten Kernwertung liegen die Wildtyp-Gliome bei 1,86 und die *IDH1*-mutierten Tumoren bei 2,26 (siehe Abbildung 4). Die Normalhirnprobe wird mit 0,90 bewertet. In der zweiten Beurteilung der Intensität der Kernwertung scoren die Wildtyp-Gliome im Mittel bei 2,37, die *IDH1*-mutierte Gruppe bei 2,74 mit einem Normalhirnwert von 1,20. Der theoretische Maximalwert dieser Wertung liegt bei 4.

Es ergibt sich somit in Gliomzelllinien und im Tumorgewebe eine gegenüber Normalhirngewebe erhöhte *USP3*-Expression sowie zudem in *IDH1*-mutierten Gliomen eine vermehrt nukleäre Lokalisation von USP3 mit Intensivierung des Kernsignals. Eine höhere *USP3*-Expression bei *IDH1*-mutierten Gliomen wurde auch bei institutsinternen *in silico* Analysen umfangreicher öffentlich zugänglicher Transkriptionsuntersuchungen gezeigt.



**Abbildung 4: IHC: Wertung nach Intensität der Kernfärbung**

Graphisch dargestellt sind die Punktwerte für Intensität (Y-Achse) der *IDH1*wt- und *IDH1*mut-Gliome (X-Achse) bei ausschließlicher Betrachtung der Kernfärbung. Abgebildet sind die Werte der Einzeltumoren (*IDH1*wt: N = 10; *IDH1*mut: N = 8), die Mittelwerte der Gruppen (horizontale Balken), sowie der Wert des Normalhirngewebes (gestrichelte Linie). Die Beurteilung erfolgte durch zwei unabhängige Bewerter. (Bewerter 1: p = 0,057; Bewerter 2: p = 0,105)

### 3.2 *USP3*-Knockdown und -Überexpression

Um Auswirkungen der veränderten Expressions-Level von *USP3* in Gliomzelllinien und Tumorgewebe zu untersuchen, wurde die Überexpression und komplementär die Herabregulation von *USP3* im Zellkulturmodell etabliert (siehe Kapitel 2.2.1). Nach Kultivierung von LN18 und U251 und Transfektion mit siRNA bzw. Plasmid-DNA wurde aus Zellen RNA isoliert sowie Protein und Histone extrahiert (siehe Kapitel 2.2.3). Der Nachweis der erfolgreichen Transfektion erfolgte auf Transkriptionsebene mittels qRT-PCR zum Nachweis von RNA (siehe Kapitel 2.2.2.3) und auf Translationsebene mittels Western Blot zum Nachweis des *USP3*-Proteins (siehe Kapitel 2.2.3.5). Außerdem wurde zur Überprüfung der funktionellen Aktivität der regulierten Deubiquitinase *USP3* nach Histoneextraktion und Western Blot das Ausmaß der Ubiquitinierung des Histons H2A ermittelt, das ein Zielprotein der Deubiquitinase-Funktion von *USP3* darstellt.

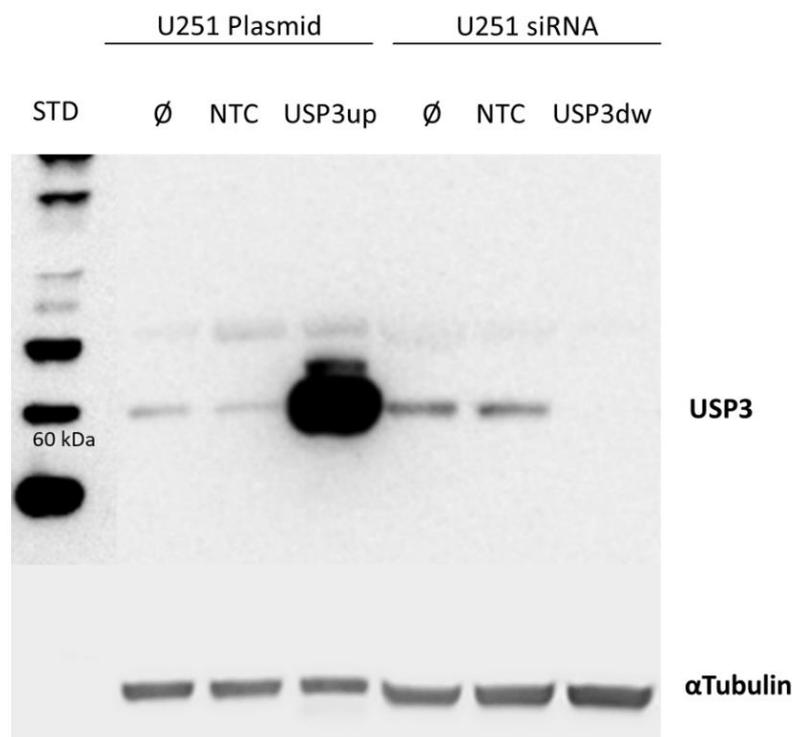
#### 3.2.1 RNA und Protein

Auf RNA-Ebene wird für die Gliomzelllinien LN18 und U251 im Zellkulturmodell ein reproduzierbarer signifikanter Knockdown sowie eine stabile Überexpression von *USP3* erzielt. In der qRT-PCR ergibt sich nach siRNA-Transfektion in LN18 eine im Mittel um 58 % und in U251 im Mittel um 55 % verminderte *USP3*-Expression. Mittels Plasmid-Transfektion wird eine Anhebung der Menge an *USP3*-mRNA auf das über 200-Fache

## Ergebnisse

erreicht. Aufgrund deutlicher Streuung der Einzelergebnisse und der geringeren Anzahl der Versuche ergab sich in U251 nach Überexpression, trotz reproduzierbarer deutlicher Vervielfachung der *USP3*-Expression, keine Signifikanz.

Die erzielten Veränderungen des *USP3*-mRNA-Levels führen in LN18 und U251 zu entsprechenden Effekten auf Proteinebene. Im Western Blot (siehe Abbildung 5) stellt sich nach Plasmid-Transfektion eine im Vergleich zur Kontrolle sehr stark ausgeprägte *USP3*-Bande sowie nach siRNA-Transfektion eine klar erkennbare Abschwächung der *USP3*-Bande dar.



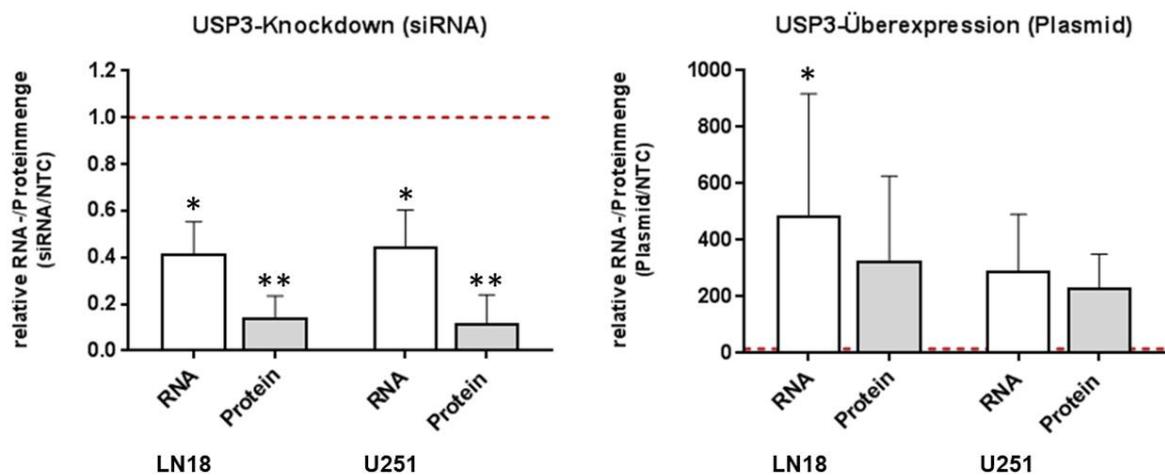
### Abbildung 5: USP3-Überexpression und -Knockdown in U251 auf Proteinebene

Abgebildet ist ein exemplarischer Western Blot nach Plasmid- und siRNA-Transfektion in der Zelllinie U251 mit Detektion des *USP3*-Proteins sowie  $\alpha$ Tubulins als Ladekontrolle. Es zeigt sich eine deutliche Regulation der *USP3*-Proteinmenge verglichen mit gänzlich unbehandelten Zellen ( $\emptyset$ ) sowie den jeweiligen NTCs. Die mittels *USP3*-Antikörper detektierten Banden stellen sich in etwa auf Höhe der 60 kDa-Bande des Protein-Standards (STD) dar.

In der quantitativen Auswertung der Western Blots (siehe Abbildung 6) zeigt sich, dass der auf RNA-Ebene erzielte Knockdown auf Proteinebene in eine deutlichere Herabregulation des *USP3*-Proteins übersetzt wird. So wird nach siRNA-Transfektion ein signifikanter Protein-Knockdown von im Mittel 86 % (RNA 58 %) in LN18 bzw. 88 % (RNA 55 %) in U251 erreicht. Nach Transfektion mit Plasmid-DNA ergibt sich in der quantitativen Auswertung,

korrelierend mit der deutlichen Überexpression auf RNA-Ebene, eine Vervielfachung des USP3-Proteins ebenfalls im Mittel auf das über 200-Fache in beiden Zelllinien. Äquivalent zu den RNA-Ergebnissen in U251 wird auch auf Proteinebene bei geringerer Versuchsanzahl und deutlichen Schwankungen das Signifikanzniveau trotz stabiler Überregulation nach Plasmid-Transfektion nicht erreicht.

Zusammenfassend wird jedoch durch die hier etablierte Methode eine deutliche Veränderung des *USP3*-Expressionsniveaus und resultierend der USP3-Proteinmenge gewährleistet, wodurch die Voraussetzungen für ein reproduzierbares Zellkulturmodell mit regulierbarer *USP3*-Expression in den verwendeten Gliomzelllinien gegeben sind.



**Abbildung 6: Relative RNA- und Proteinmengen nach Transfektion**

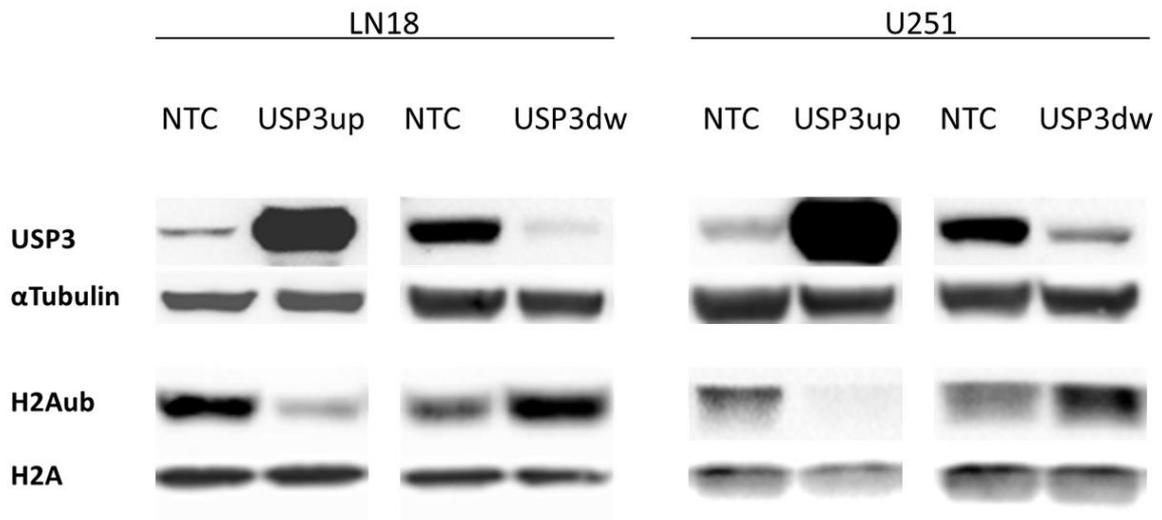
Die beiden Grafiken zeigen die in Relation zur Kontrolle (NTC, gestrichelte Linie) gesetzte Verminderung durch siRNA bzw. Vervielfachung durch Plasmid des Transkriptions- (RNA) sowie des Translationsproduktes (Protein) von *USP3* (Y-Achse) nach Transfektion in LN18 und U251 (X-Achse). (Knockdown: RNA-LN18: N = 6, p = 0,031; Protein-LN18: N = 9, p = 0,004; RNA-U251: N = 6, p = 0,031; Protein-U251: N = 9, p = 0,004; Überexpression: RNA-LN18: N = 6, p = 0,031; Protein-LN18: N = 4, p = 0,125; RNA-U251: N = 3, p = 0,25; Protein-U251: N = 3, p = 0,25)

### 3.2.2 Ubiquitinierung

Die Deubiquitinase-Funktion von USP3 wurde mittels Western Blot der extrahierten Histone mit einem spezifischen Antikörper für ubiquitiniertes H2A untersucht.

Entsprechend der deubiquitinierenden Eigenschaft von USP3 wird eine entgegengerichtete Regulation der Ubiquitinierung in Abhängigkeit der veränderten *USP3*-Expression festgestellt. Eine Zusammenstellung exemplarischer Western Blots von LN18 und U251 nach siRNA- und Plasmid-DNA-Transfektion mit Detektion von USP3-Protein und H2Aub-Histonextrakten zeigt Abbildung 7. Es kommt in beiden untersuchten Zelllinien nach *USP3*-

Überexpression mit entsprechendem Anstieg des USP3-Proteins zu einer sichtbaren Abschwächung der H2Aub-Bande als Zeichen einer verminderten Ubiquitinierung des Histons H2A. Der *USP3*-Knockdown auf RNA- und Proteinebene führt dementsgegen zu einer Intensivierung der H2Aub-Bande, was eine verstärkte Ubiquitinierung von H2A anzeigt.



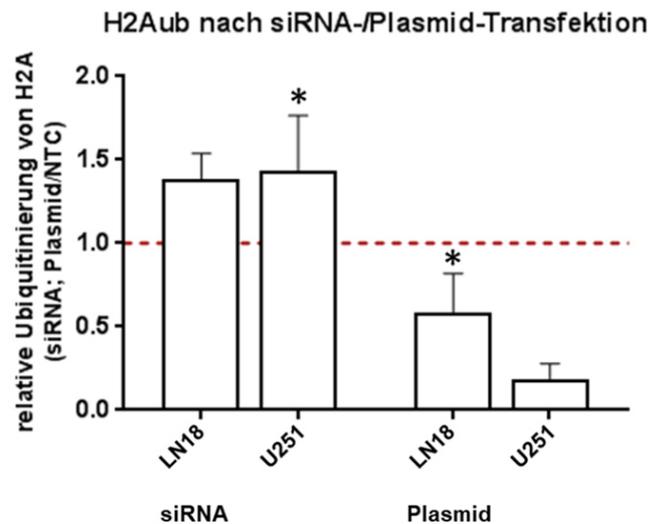
**Abbildung 7: Übersichtsschema der Western Blots mit Protein- und Histonextrakten**

Die Grafik zeigt eine Übersicht der Ergebnisse der Protein- und Histon-Western Blots nach siRNA-Knockdown und Plasmid-Überexpression von *USP3*. In den ersten beiden Zeilen sind die USP3-Proteinbanden je paarig mit Kontrolle sowie die Ladekontrolle mit  $\alpha$ Tubulin abgebildet. Darunter folgen die Proteinbanden für die ubiquitinierte Form von H2A (H2Aub) und H2A als Ladekontrolle. Die Proben der unteren beiden Zeilen wurden aus Histonextrakten gewonnen.

Zur Objektivierung dieser im Einzelversuch sichtbaren Regulationseffekte erfolgte im Anschluss die quantitative Auswertung mehrerer Western Blots nach photometrischer Bestimmung der Bandenstärke und Verrechnung mit der Ladekontrolle H2A.

Es zeigt sich in beiden Zelllinien auch hier ein messbarer Effekt der veränderten *USP3*-Expression auf die Ubiquitinierung von H2A (siehe Abbildung 8). Der Protein-Knockdown der Deubiquitinase USP3 führt verglichen mit der untransfizierten Kontrolle zu einem mittleren Anstieg des ubiquitinierten Histons H2A auf das 1,39-Fache in LN18 ( $p = 0,063$ ) und das 1,44-Fache in U251 ( $p = 0,016$ ). Die *USP3*-Überexpression bedingt eine Verringerung der ubiquitinierten Form im Mittel um den Faktor 0,58 in LN18 ( $p = 0,031$ ) und den Faktor 0,19 in U251 ( $p = 0,125$ ). In den Teilversuchen mit kleinerer Fallzahl ergibt sich keine Signifikanz. In der Tendenz sind die Effekte auf Ubiquitinierungs-Ebene in beide Regulationsrichtungen für U251 stärker ausgeprägt als in LN18.

Durch diese Ergebnisse wird die bekannte Deubiquitinase-Funktion von USP3 am Zielsubstrat H2A auch für Gliomzelllinien gezeigt.



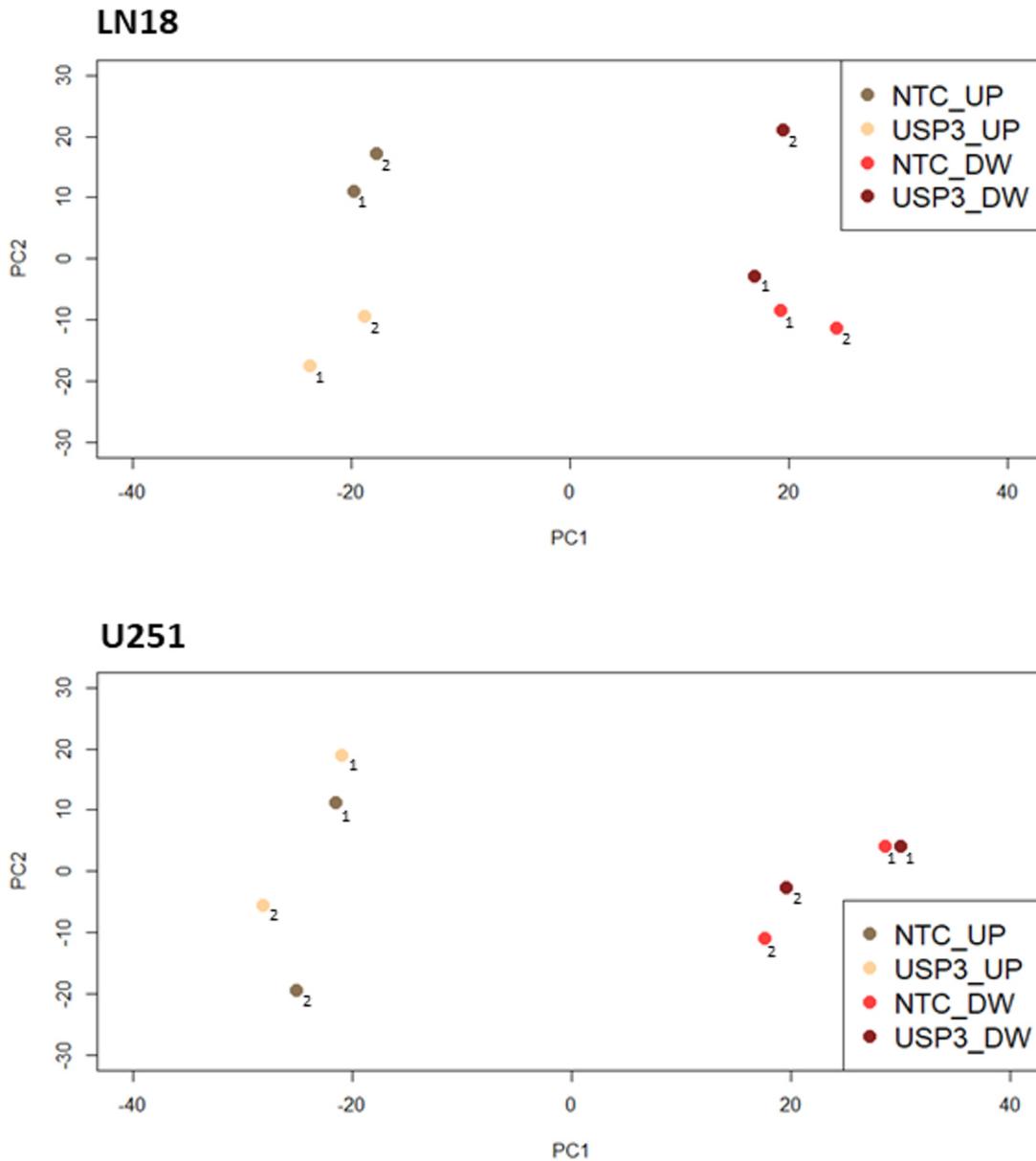
**Abbildung 8: Ubiquitinierung von H2A nach siRNA- oder Plasmid-DNA-Transfektion**

Dargestellt sind die transfektionsvermittelten Effekte einer regulierten *USP3*-Expression auf die Ubiquitinierung des Histons H2A nach siRNA- und Plasmid-Behandlung in LN18 und U251 (X-Achse). Die Werte der Ubiquitinierung (Y-Achse) wurden in Relation zur Kontrolle (NTC, gestrichelte Linie) abgebildet. (Knockdown: LN18: N = 5,  $p = 0,063$ ; U251: N = 6,  $p = 0,016$ ; Überexpression: LN18: N = 6,  $p = 0,031$ ; U251: N = 4,  $p = 0,125$ )

### 3.2.3 Next-Generation Sequencing

Zur Untersuchung möglicher Auswirkungen des Knockdowns bzw. der Überexpression von *USP3* auf das Transkriptom wurden transfizierte Zellen mittels RNA-NGS analysiert (siehe Kapitel 2.2.2.4). Die parallele Materialgewinnung für qRT-PCR sowie Histonextraktion mit anschließendem Western Blot aus demselben Ansatz diente der Qualitätskontrolle von Knockdown und Überexpression. Die Expressionsdatensätze wurden mittels PCA, GSEA und differenzieller Genexpressionsanalyse ausgewertet (siehe Kapitel 2.2.4).

Die durchgeführten PCAs (siehe Abbildung 9) verdeutlichen, dass sich die Hauptvarianzen der Einzelansätze in beiden Zelllinien durch die veränderten Versuchsbedingungen je nach Art der Transfektion ergeben und sich die Knockdown- und Überexpressionsproben entsprechend voneinander an der PC1-Achse auftrennen. Hierbei zeigen bereits die jeweiligen NTCs eine relevante Divergenz in PC1-Richtung. Den externen Einflüssen der Versuchsprotokolle mit NTC-siRNA und -Plasmid ohne Regulation des Zielgens *USP3* sind somit bereits die deutlichsten Effekte auf die Genexpression der Gliomzellen zuzuschreiben.



**Abbildung 9: PCAs der Expressionsdaten der RNA-NGS**

Die Genexpressionsdaten der Zellproben nach Transfektion werden mittels PCAs für beide Zelllinien dargestellt. Eingeschlossene Gene: Top 1000 der differenziell exprimierten Gene. Anteil der Varianz (*proportions of variance*) LN18: PC1 22,3 %, PC2 13,0 %; U251: PC1 26,5 %, PC2 9,6 %. Bei niedrigen Anteilen der PC1- und PC2-Achsen an der Gesamtvarianz ist die zweidimensionale Darstellung nur bedingt geeignet, die Datensätze adäquat abzubilden. Kennzeichnung der Replikate durch Indizes. (N = 2)

Die Varianz der Zellpopulationen nach Regulierung der *USP3*-Expression bildet sich überwiegend auf der PC2-Achse ab, sie ist geringer ausgeprägt als die bereits beschriebenen Effekte der jeweiligen Transfektionsart.

Für die Zelllinie LN18 liegen die jeweiligen Duplikate in der PCA mit Ausnahme der *USP3*-siRNA-transfizierten Proben nahe zusammen. Nach Transfektion zeigt sich für LN18 eine erkennbare Auftrennung der transfizierten Ansätze und der jeweiligen Kontrollen an der PC2-Achse, wobei die Verlagerungen in Bezug auf die zugehörigen NTCs für *USP3*-Knockdown und *USP3*-Überexpression entgegengerichtet sind.

Für U251 ergeben sich in der PCA deutliche Replikatschwankungen, die sich ausgeprägter als die Effekte der *USP3*-Regulation darstellen. Trotz erkennbarer Relativverschiebung nach Knockdown und Überexpression vorwiegend entlang der PC2-Achse zeigt sich somit für U251 keine entsprechende Auftrennung der Zellpopulationen. Im Gegensatz zu LN18 ist die Verlagerung bei beiden *USP3*-Regulationsrichtungen auf der PC2-Achse gleichgerichtet. Eines der beiden Replikate nach Transfektion von U251 mit *USP3*-siRNA weist in der PCA eine nahezu deckungsgleiche Lokalisation mit der entsprechenden siRNA-NTC auf. Für dieses Probenpaar ergibt sich demnach kein relevanter Effekt auf die Expression der Gene, die in der dargestellten PCA für die Hauptvariabilität im U251-Probenkollektiv insgesamt verantwortlich sind.

Die Ergebnisse der PCA spiegeln sich auch in der Analyse der differenziell exprimierten Gene ( $\log_2 \text{fold change} > 1$  und  $< -1$ , p-Wert  $< 0,05$ ) wider. Lediglich in LN18 mit erkennbarer Auftrennung der Ansätze nach *USP3*-Regulationsrichtung zeigen sich für Knockdown und Überexpression verglichen mit den jeweiligen Kontrollen wenige signifikant unterschiedlich exprimierte Gene. Nach Plasmid-Transfektion sind in LN18 neben *USP3* sechs weitere Gene hochreguliert (*HSPA6*, *HSPA7*, *ARC*, *PLEKHG3*, *FOS*, *SIRPA*), nach siRNA-Transfektion zeigt sich bei vier Genen eine herabregulierte Expression (*HIST2H4A*, *HIST2H4B*, *CYP1A1*, *NR1D1*). In U251 mit Überwiegen der Replikatschwankungen gegenüber den Auswirkungen der veränderten *USP3*-Expression zeigen sich abgesehen von *USP3* nach Plasmid-Transfektion keine signifikant regulierten Gene. In beiden Zelllinien wird die Veränderung der *USP3*-Expression nach siRNA-Transfektion trotz parallelem Nachweis des Knockdowns mittels qRT-PCR und Western Blot bei der kleinen Replikatzahl im Gegensatz zur Überexpression nicht signifikant.

In der GSEA sind die untersuchten zellulären Signalwege und Stoffwechselprozesse in Abhängigkeit der Transfektion mit siRNA oder Plasmid-DNA nicht signifikant reguliert.

Anhand der hier durchgeführten Analysen der Expressionsdaten nach RNA-NGS ist von keinem deutlichen Effekt einer veränderten *USP3*-Expression auf das Transkriptom der untersuchten Gliomzelllinien auszugehen.

### 3.3 Funktionelle Untersuchungen

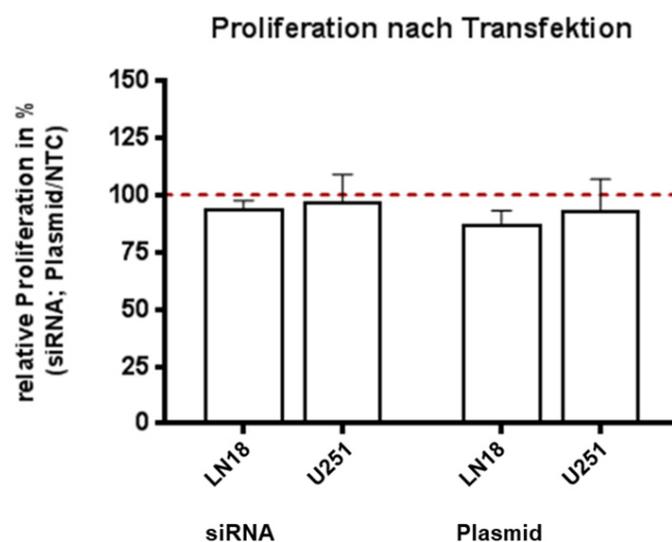
Nach Etablierung eines Zellkulturmodells durch reproduzierbaren Knockdown und Überexpression von *USP3* auf RNA- und Proteinebene sowie Nachweis der deubiquitinierenden Funktion von *USP3* auf das Zielsubstrat Histon H2A wurden Untersuchungen zu möglichen funktionellen Effekten einer veränderten *USP3*-Expression in Gliomzellen durchgeführt. Im Fokus standen Bereiche der Zellfunktion, die mit Entstehung, Progression oder Therapieansprechen von Hirntumoren in Verbindung stehen wie Proliferation, Apoptose, Chemosensitivität und zelluläre Reaktion auf DNA-Schäden.

#### 3.3.1 Proliferation

Die Proliferation der Zellen unter *USP3*-Knockdown und -Überexpression wurde mittels BrdU-Assay untersucht (siehe Kapitel 2.2.1.4).

Die durchschnittliche Teilungsaktivität der Gliomzellen in Relation zur Kontrolle liegt bei 94 % (LN18, siRNA), 97 % (U251, siRNA), 87 % (LN18, Plasmid) und 93 % (U251, Plasmid). Es zeigt sich lediglich für die Zelllinie LN18 eine nichtsignifikante Tendenz zur leicht verminderten Proliferation bei beiden Transfektionsrichtungen (siehe Abbildung 10).

Das Wachstumsverhalten der Zelllinien LN18 und U251 wird durch veränderte *USP3*-Proteinlevel somit nicht signifikant beeinflusst.



**Abbildung 10: Proliferation transfizierter Zellen im BrdU-Assay**

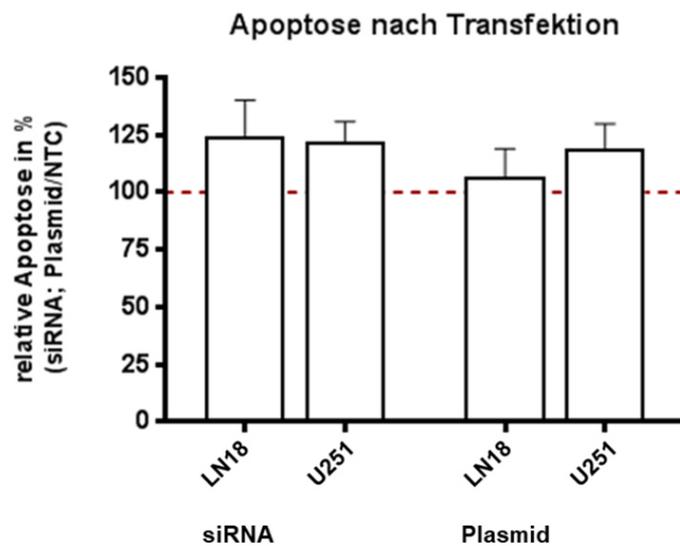
Die Abbildung zeigt die relative Proliferation (Y-Achse) der Gliomzelllinien LN18 und U251 nach Knockdown und Überexpression (X-Achse) von *USP3* gemessen mittels BrdU-Assays. Die Proliferationswerte der Kontrollen wurden je auf 100 % (NTC, gestrichelte Linie) gesetzt. (N ≥ 3)

### 3.3.2 Apoptose

Die Untersuchung eines möglichen Einflusses von USP3 auf die Apoptose wurde mit dem *Apo-ONE® Homogeneous Caspase 3/7 Assay* durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.1.5).

Die relative Aktivität der Apoptose gemittelt über die Einzelversuche liegt bei 124 % (LN18, siRNA), 122 % (U251, siRNA), 106 % (LN18, Plasmid) und 119 % (U251, Plasmid). Es zeigt sich eine diskrete, nicht signifikante Erhöhung der Apoptoseaktivität in beiden Zelllinien und beiden Regulationsrichtungen (siehe Abbildung 11).

Ein spezifischer USP3-abhängiger Effekt auf das Apoptoseverhalten der Gliomzelllinien nach Transfektion ist nicht nachzuweisen.



**Abbildung 11: Apoptose-Aktivität im Caspase-Assay**

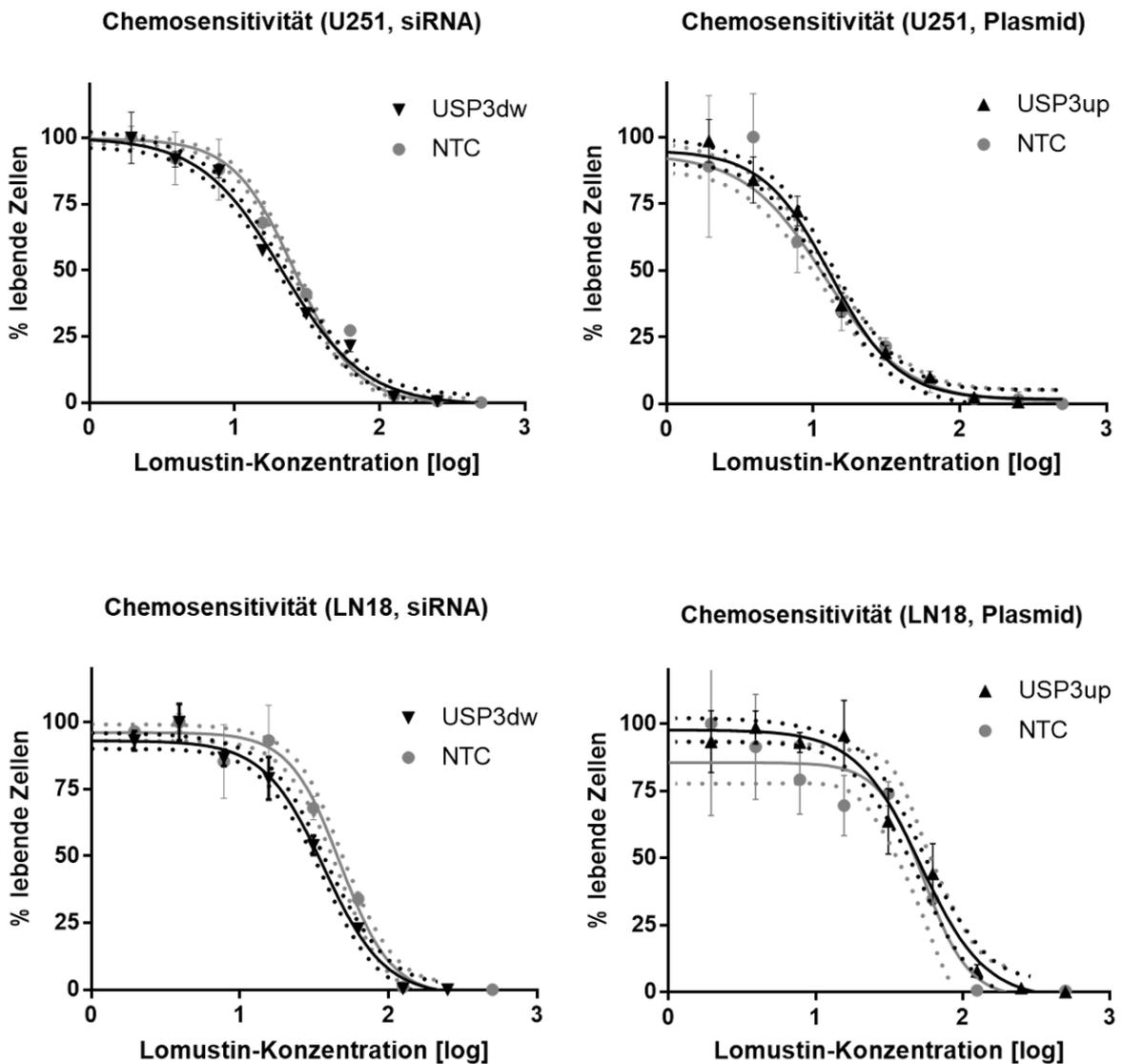
Aufgetragen ist die relative Apoptoseaktivität (Y-Achse) der Zelllinien LN18 und U251 nach Transfektion mit siRNA und Plasmid (X-Achse). Die Kontrolle wurde hier jeweils auf 100 % gesetzt (NTC, gestrichelte Linie). (N ≥ 3)

### 3.3.3 Chemosensitivität

Die Bestimmung der Chemosensitivität der Gliomzellen wurde mit Lomustin und anschließender Vitalitätsbestimmung durch Resazurin durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.1.6). In einem Vorversuch wurde eine mögliche zellschädigende Wirkung des in der Lomustinstammlösung enthaltenen DMSO untersucht. Es wurde keine relevante apoptotische Wirksamkeit der maximal verwendeten DMSO-Konzentration detektiert, sodass von einer Berücksichtigung und Verrechnung abgesehen werden kann.

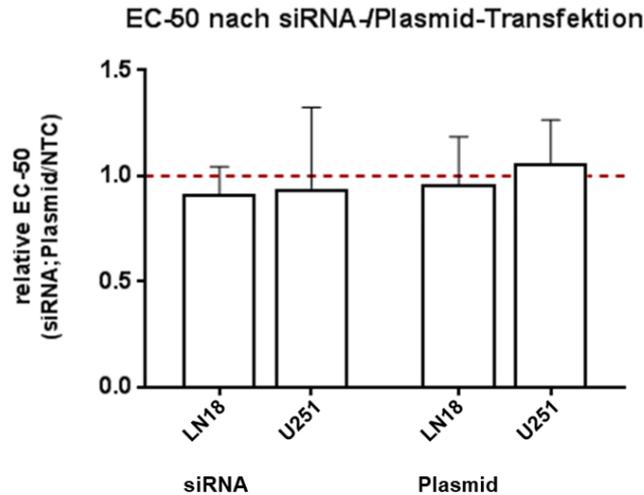
## Ergebnisse

Die Auswertung zeigt, dass weder der Knockdown noch die Überexpression von *USP3* die Chemosensitivität der Gliomzelllinien LN18 und U251 gegenüber dem alkylierenden Chemotherapeutikum Lomustin signifikant beeinflussen. Sowohl die Betrachtung der Einzel-Kurven (siehe Abbildung 12) als auch die quantitative Auswertung der ermittelten EC-50-Werte aus Doppelbestimmung (siehe Abbildung 13) stützen übereinstimmend diesen Befund.



**Abbildung 12: EC-50-Kurven nach *USP3*-Regulation und Lomustinbehandlung**

Graphisch dargestellt sind exemplarische EC-50-Kurven beider Zelllinien (LN18, U251) nach siRNA- und Plasmid-Transfektion und anschließender Lomustinbehandlung, wobei der Anteil lebender Zellen in % (Y-Achse) gegen steigende Lomustinkonzentrationen (logarithmisch, X-Achse) aufgetragen ist.



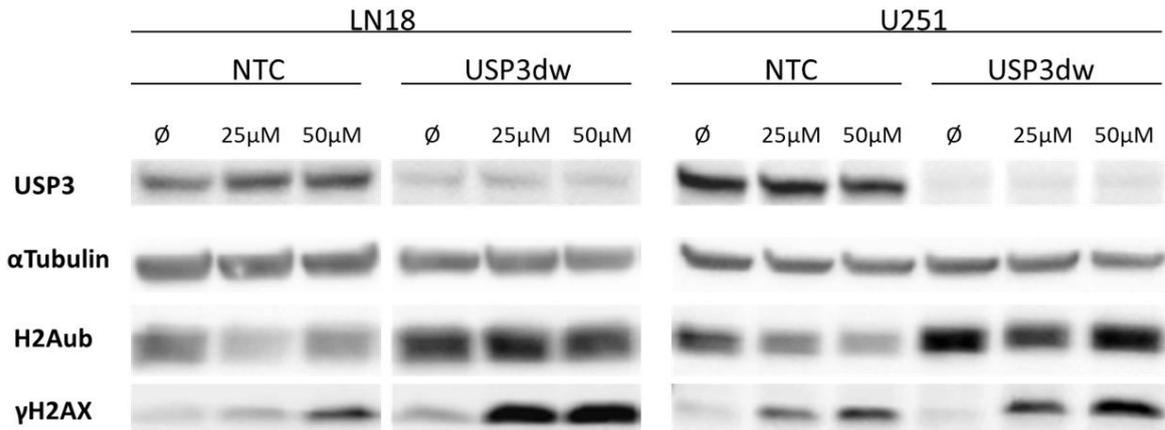
**Abbildung 13: Ergebnisse des Chemosensitivitäts-Assays mit Lomustin**

Die Abbildung zeigt die quantitative Auswertung der EC-50-Einzelversuche. Aufgetragen sind die relativen EC-50-Werte bezogen auf die Kontrolle (NTC, gestrichelte Linie) in Y-Achsen-Richtung sowie Zelllinie und Transfektionsart (X-Achse). Durch die Transfektionen wurde keine signifikante Änderung der Sensitivität der Gliomzellen gegenüber dem Chemotherapeutikum Lomustin erreicht. (N = 2)

### 3.3.4 Zelluläre Antwort auf DNA-Schäden

Zur Untersuchung des Einflusses von USP3 auf die DNA-Reparatur nach Strangbrüchen wurden H2Aub und  $\gamma$ H2AX nach siRNA-Transfektion und Behandlung mit steigenden Lomustinkonzentrationen in Western Blots von Protein- und Histoneextrakten bestimmt (siehe Kapitel 2.2.1.7).

Abbildung 14 zeigt beispielhaft Western Blots von siRNA-transfizierten LN18- und U251-Zellen nach Detektion von USP3,  $\alpha$ Tubulin, H2Aub und dem DNA-Schadensmarker  $\gamma$ H2AX mittels spezifischer Antikörper. Es ist ersichtlich, dass der *USP3*-Knockdown mit folgendem Teilverlust der USP3-Banden bei sämtlichen Lomustinkonzentrationen eine Verstärkung der H2A-Ubiquitinierung nach sich zieht. Die H2Aub-Banden weisen allerdings nach Lomustinbehandlung sowohl in den transfizierten Proben als auch in der Kontrollreihe deutliche Intensitätsschwankungen auf. Bei Betrachtung der  $\gamma$ H2AX-Banden zeigt sich ein mit den steigenden Lomustinkonzentrationen korrelierender Anstieg des Schadensmarkers sowohl in den *USP3*-Knockdown-Zellen als auch den NTC-Proben. In LN18 fällt diese Lomustin-bedingte Intensivierung der  $\gamma$ H2AX-Banden in den siRNA-transfizierten Zellen erheblich deutlicher aus als in den Kontrollproben. In U251 zeigt sich im dargestellten Western Blot ebenfalls ein derartiger Effekt, wenn auch weniger ausgeprägt.

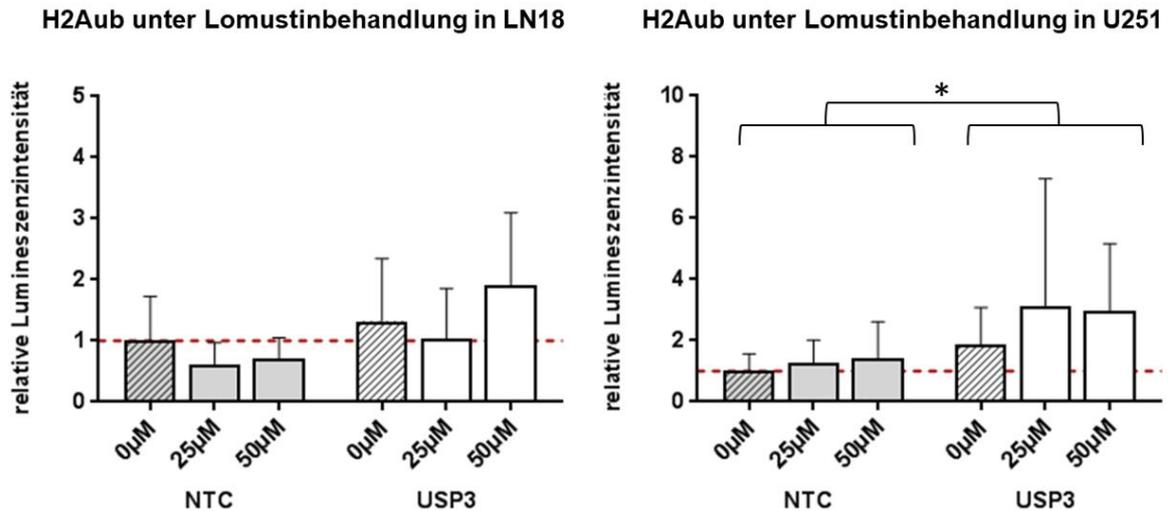


**Abbildung 14: Western Blots nach USP3-Knockdown und Lomustinbehandlung**

Dargestellt sind exemplarische Western Blots nach siRNA-Transfektion und Lomustinbehandlung in LN18 und U251. Die ersten beiden Zeilen zeigen USP3-Protein und  $\alpha$ Tubulin (Ladekontrolle). In der dritten Zeile ist die nach siRNA-Transfektion gesteigerte Ubiquitinierung von H2A zu sehen sowie darunter in der letzten Zeile  $\gamma$ H2AX als Marker für induzierte DNA-Schäden. H2A als Ladekontrolle der Histonextrakte ist der Übersichtlichkeit wegen nicht abgebildet. In die anschließenden quantitativen Auswertungen wurden nur die Einzelexperimente eingeschlossen, bei denen ein stabiler USP3-Protein-Knockdown und damit einhergehend eine erhöhte Ubiquitinierung von H2A in der Kontrollprobe ohne Lomustin beobachtet wurde.

Die Protein- und Histonbanden der Western Blots wurden durch Verrechnung der fotodokumentierten Pixeldichten quantitativ ausgewertet. Im Anschluss wurden das Ubiquitinierungs-Niveau von H2A sowie die Menge des DNA-Schadensmarkers  $\gamma$ H2AX in Abhängigkeit von USP3-Knockdown und Lomustinbehandlung mittels mehrfaktorieller (zweifacher) Varianzanalyse (ANOVA, *analysis of variance*) untersucht.

Hinsichtlich der Ubiquitinierung von H2A als Zielprotein von USP3 ergibt die Auswertung mehrerer Einzelversuche (siehe Abbildung 15), dass H2Aub nach Transfektion mit USP3-siRNA in allen Proben im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle zunimmt, unabhängig von der verwendeten Konzentration des Chemotherapeutikums. Bei starker Streuung der Ergebnisse der Einzelversuche unter Lomustinbehandlung in beiden Zelllinien ist der Effekt bei U251 signifikant ( $p = 0,049$ ), für LN18 wird das Signifikanzniveau knapp nicht erreicht ( $p = 0,065$ ). Es zeigt sich in den nicht transfizierten Proben kein signifikanter Effekt der steigenden Lomustinkonzentrationen auf die Ubiquitinierung von H2A. Ebenso ist in den USP3-Knockdown-Proben keine Beeinflussung des Ausmaßes der USP3-vermittelten Mehr-Ubiquitinierung in Abhängigkeit von der Lomustinkonzentration von den erheblichen Replikatschwankungen abzugrenzen.

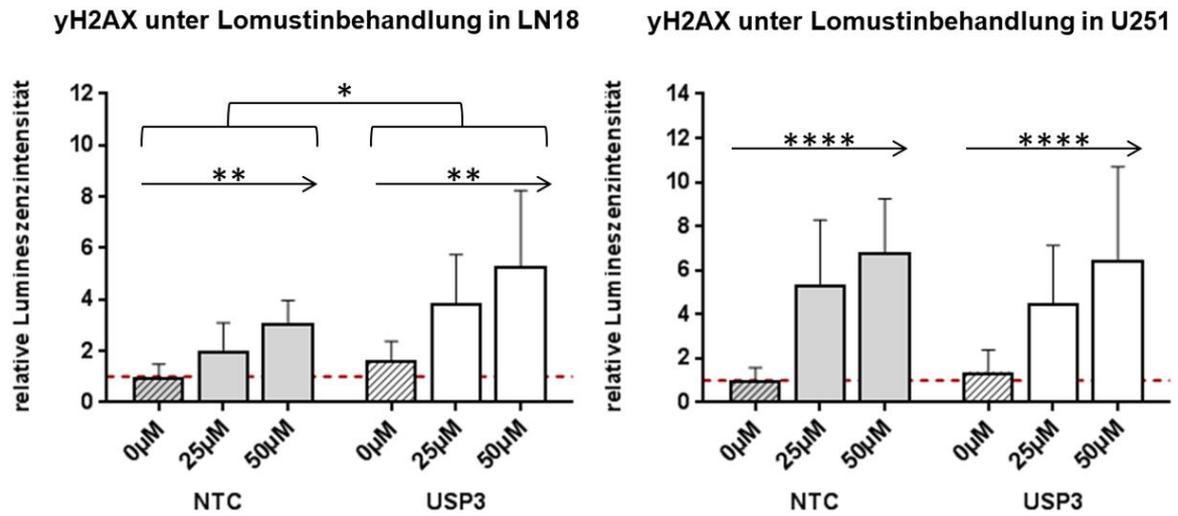


**Abbildung 15: H2Aub in siRNA-transfizierten Zellen nach Lomustinbehandlung**

In der Zusammenstellung sind die Effekte auf die H2A-Ubiquitinierung (Y-Achse) durch die siRNA-Transfektion mit additiver Lomustinbehandlung (X-Achse) dargestellt. Die Werte sind in Relation zur untransfizierten Kontrolle ohne Lomustin gesetzt (NTC, 0 µM, gestrichelte Linie). Die Änderung der Ubiquitinierung ist größtenteils dem Einflussfaktor des *USP3*-Knockdowns zuzuordnen (U251:  $p = 0,049$ ; LN18:  $p = 0,065$ ). Die ansteigenden Lomustinkonzentrationen haben keinen zusätzlichen signifikanten Einfluss auf das Level der H2A-Ubiquitinierung. ( $N \geq 3$ )

Die quantitative Auswertung der  $\gamma$ H2AX-Banden (siehe Abbildung 16) ergibt in beiden Zelllinien mit zunehmender Lomustinkonzentration einen hochsignifikanten Anstieg des DNA-Schadensmarkers sowohl in den transfizierten Zellen als auch in den NTCs (LN18:  $p = 0,0061$ , U251:  $p < 0,0001$ ). Darüber hinaus wird der bereits in den Western Blots der Einzelversuche optisch erkennbare Effekt der Transfektion auf das Ausmaß des  $\gamma$ H2AX-Anstieges in der Zelllinie LN18 als signifikant bestätigt ( $p = 0,0261$ ). Mit zunehmender Lomustinkonzentration steigt die  $\gamma$ H2AX-Menge in den siRNA-transfizierten Zellen verglichen mit den jeweiligen Kontrollen schneller und deutlicher an. Für U251 ist ein entsprechender Effekt – entgegen der in den Einzelversuchen im Western Blot zum Teil zu beobachtenden Tendenz – in der quantitativen Auswertung der Gesamtversuchsreihe nicht nachzuweisen.

Im Ergebnis scheint ein mittels siRNA-Knockdown erzeugter USP3-Mangel in der Gliomzelllinie LN18 das Ausmaß Lomustin-induzierter DNA-Schäden und das Anlaufen der zellulären DNA-Schadensantwort zu verstärken.



**Abbildung 16:  $\gamma$ H2AX bei siRNA-transfizierten Zellen nach Lomustinbehandlung**

Die Grafik zeigt die Effekte von Transfektion und Lomustinbehandlung (X-Achse) auf die vorhandene Menge von  $\gamma$ H2AX (Y-Achse). Die Werte sind in Relation zur untransfizierten Kontrolle ohne Lomustin gesetzt (NTC, 0  $\mu$ M, gestrichelte Linie). Deutlich erkennbar ist der hochsignifikante Anstieg des Schadensmarkers mit steigenden Lomustinkonzentrationen (LN18:  $p = 0,0061$ ; U251:  $p < 0,0001$ ). Bei LN18 hat zusätzlich auch der *USP3*-Knockdown einen signifikanten ( $p = 0,0261$ ) Einfluss und führt zu einem vermehrten  $\gamma$ H2AX-Anstieg. ( $N \geq 3$ )

## 4 Diskussion

Diese Arbeit untersucht die Rolle von USP3 hinsichtlich der Deubiquitinierung des Zielproteins Histon H2A in höhergradigen humanen Gliomen. Eingeschlossene Aspekte ergeben sich vor dem Hintergrund aktueller Forschung und institutsinterner Vorergebnisse. Der Fokus liegt auf der Relevanz für die Tumorentstehung und -progression und möglichen ableitbaren Schlussfolgerungen zu klinischen Aspekten wie Prognose und Therapie.

Es wird gezeigt, dass in höhergradigen Gliomen erhöhte Mengen von USP3 verglichen mit physiologischem Hirngewebe vorliegen. Zum einen belegen die PCR-Untersuchungen in Gliomzelllinien eine vermehrte *USP3*-Expression, zum anderen werden die erhöhten USP3-Level auf Proteinebene immunhistochemisch in Tumorschnitten von Gliompatienten und -patientinnen nachgewiesen. Es werden somit die institutsinternen Vorergebnisse durchgeführter TCGA-Expressionsdaten-Analysen zur signifikanten Anreicherung von *USP3*-mRNA in Gliomen verifiziert. In der immunhistochemischen Untersuchung des USP3-Vorkommens der Gliomgewebeschnitte hinsichtlich einer möglichen Assoziation mit dem *IDH*-Mutationsstatus unterscheiden sich die beiden Subgruppen nicht signifikant. Bei Betrachtung der zellulären Verteilung der Färbemuster sprechen die Ergebnisse jedoch für eine vermehrt nukleäre Lokalisation von USP3 bei Vorliegen einer *IDH*-Mutation.

Mittels transienter Knockdown- und Überexpressionsversuche wird USP3 als Deubiquitinase von H2A in humanen Gliomen bestätigt und ein Zellkulturmodell als Basis weiterer Versuche etabliert. Die durch siRNA- und Plasmidtransfektion veränderte *USP3*-Expression wird durch PCR-Untersuchungen nachgewiesen, die veränderten Level des USP3-Proteins mittels Western Blot. Der Nachweis der entgegengerichtet regulierten Ubiquitinierung von H2A erfolgt nach Histonextraktion mit H2Aub-spezifischen Antikörpern im Western Blot.

In funktionellen Untersuchungen zu tumorassoziierten Prozessen ergeben sich Hinweise auf eine Beteiligung von USP3 in der DNA-Reparatur in Gliomzelllinien. Unter *USP3*-Knockdown zeigt sich nach Lomustinbehandlung ein erhöhtes Vorkommen des DNA-Schadensmarkers  $\gamma$ H2AX. Mit den hier untersuchten Methoden und Bedingungen wird keine signifikante USP3-abhängige Beeinflussung von Proliferation, Apoptose und Chemosensitivität in Gliomzellen festgestellt. Ergänzende NGS-Analysen ergeben keine deutlichen Effekte eines veränderten *USP3*-mRNA-Levels auf das Transkriptom. Die Genexpression gängiger Stoffwechselprozesse und Signalwege wird durch die transiente *USP3*-Modulation nicht signifikant beeinflusst.

### **USP3 in höhergradigen Gliomen**

Während eine Beteiligung von USP3 für die Entstehung unterschiedlicher Tumortypen seit einigen Jahren im Fokus aktueller Forschung steht, ist bezüglich seiner Funktion für die Entstehung, Progression und Therapie von Gliomen nur wenig bekannt (91,94–96). In gesundem Hirngewebe liegt USP3, verglichen mit relativ konstantem Vorkommen in den meisten anderen Gewebetypen, in niedrigerer Konzentration vor (90). In der Arbeit von Fan *et al.* aus dem Jahr 2019 wurden erhöhte USP3-Level in Gliomschnitten und -zelllinien gegenüber Normalhirngewebe festgestellt, besonders ausgeprägt in Glioblastomen. Hohe USP3-Expressions-Werte im Tumorgewebe seien mit einer schlechteren Prognose assoziiert gewesen (95). Zudem soll nach Tu *et al.* in rezidierten Glioblastomen die häufig zu beobachtende Radiotherapieresistenz dieser Tumoren auch über Induktion einer verstärkten USP3-Expression vermittelt werden (166). Andererseits beschreiben jedoch Das *et al.* nach Expressionsanalysen (TCGA) im Abgleich mit klinischen Parametern ein besseres Überleben von Glioblastompatienten mit hoher USP3-Expression (105). Lancini *et al.* berichten darüber hinaus von multipler spontaner Tumorentstehung in *Usp3*-Knockoutmäusen, unter anderem seien auch bösartige Neubildungen im zentralen Nervensystem aufgetreten (94).

Institutsinterne Vorarbeiten durch Dr. Julia Lorenz (Abteilung für Neuropathologie des Universitätsklinikums Regensburg) erbrachten eine signifikant erhöhte Expression von USP3 in Expressionsdaten (TCGA) von Gliomen der WHO-Grade 2-4 im Vergleich zu Normalhirngewebe. Übereinstimmend mit diesen Vorergebnissen und den Ergebnissen von Fan *et al.* (95) zeigt diese Arbeit eine signifikante Erhöhung der USP3-Expression in höhergradigen Gliomen gegenüber dem geringen Vorkommen in gesundem Normalhirngewebe. Der Nachweis erfolgte zum einen durch Expressionsanalysen an sechs etablierten Gliomzelllinien mit der stärksten USP3-Expression in den Linien LN18 und U251, zum anderen immunhistochemisch an asservierten Tumorpräparaten von Erkrankten, die aufgrund höhergradiger Gliome (Grad 3, Grad 4) operiert worden waren. Das erhöhte USP3-Niveau zeigte sich sowohl durch einen größeren Anteil signalpositiver Zellen als auch eine intensivere Anfärbung dieser Zellen.

Das vermehrte Vorkommen von USP3 in Gliomgewebe kann ein Hinweis für eine kritische Beteiligung der Deubiquitinase in der Pathophysiologie dieser Tumoren sein. Bemerkenswerterweise sind im Hirngewebe, wie bereits für andere Gewebetypen bekannt, sowohl erhöhte als auch erniedrigte USP3-Level im Tumorkontext beschrieben (94,95,105,108,166). Es bedarf demnach möglicherweise im physiologischen Zustand einer

Gleichgewichtseinstellung auf einem bestimmten USP3-Level, wobei Abweichungen in beide Regulationsrichtungen zur Tumorentstehung beitragen könnten. Für ein streng reguliertes System sprechen die per se niedrigen Konzentrationen in den meisten Gewebetypen und speziell im Hirngewebe (90). Denkbar wären auch verschiedene kontext- oder gewebespezifische Funktionen von USP3.

### **USP3-Expression in *IDH1*-mutierten Gliomen**

Die Vorergebnisse der bioinformatischen Analysen der Abteilung für Neuropathologie des Universitätsklinikums Regensburg zeigten darüber hinaus eine verstärkte Ausprägung der USP3-Konzentrationserhöhung in Gliomen mit *IDH1*-Mutation. Nach vormaliger Bedeutung als prognostisch günstiger molekularer Marker ist das Vorliegen einer *IDH*-Mutation seit der aktuellen WHO-Klassifikation für die Entität der adulten diffusen Astrozytome obligates Diagnosekriterium (11,31,44,49). Diese auf Transkriptionsebene festgestellte Assoziation von USP3-Expression und *IDH*-Mutationsstatus konnte auf Proteinebene in Gliomschnitten immunhistochemisch mit der vergleichsweise kleinen Kohorte in dieser Arbeit in der Tendenz bestätigt werden. Die beobachtete intranukleäre USP3-Anreicherung in den *IDH1*-mutierten Tumoren kann als Zeichen einer Rekrutierung von USP3 aus dem Zytoplasma in den Zellkern bei vermehrtem Bedarf in DNA-assoziierten Prozessen interpretiert werden.

Die *IDH*-Mutation geht mit weitreichenden epigenetischen und zellbiologischen Veränderungen von Tumorzellen einher, die insbesondere in Gliomen intensiv erforscht werden (49,50). Auch wenn die Auswirkungen des resultierenden Phänotyps auf Tumorgenese, Tumorprogress, Prognose und Therapiemöglichkeiten noch nicht gänzlich verstanden sind, ergeben sich anhand der zugrunde liegenden diskutierten Mechanismen Erklärungsansätze für mögliche Wechselwirkungen zwischen *IDH*-Mutationsstatus und USP3-Expression.

Zunächst resultiert aus einem Funktionsverlust der IDH-Enzyme über Akkumulation des Onkometaboliten 2-Hydroxyglutarat eine globale DNA-Hypermethylierung, der sogenannte *glioma CpG island methylator phenotype* (G-CIMP) (43,49,53). Die Hypermethylierung der häufig in Promotorregionen gelegenen und CpG-Dinukleotid-reichen Areale (*CpG islands*) kann über eine veränderte Genregulation und insbesondere über das Silencing von Tumorsuppressorgenen zur Tumorgenese beitragen. Beispielsweise ist die prognostisch

relevante und mitunter therapieentscheidende Methylierung des *MGMT*-Promotors ebenfalls mit der *IDH*-Mutation und dem G-CIMP-Subtyp assoziiert (53,54,167).

Einzelne epigenetische Veränderungen oder auch Modifikationstypen wie die Methylierung bestehen nicht isoliert, sondern sind im Rahmen eines sogenannten *inter-mod-crosstalks* eng mit weiteren epigenetischen Modifikationen von DNA und Histonen verschränkt. Beschrieben sind sowohl unmittelbare sterische Interaktionen als auch indirekte Effekte über Veränderung der Transkription und Aktivität der regulatorischen Enzyme des epigenetischen Codes, zu denen auch USP3 gehört (56,65,66,168,169). G-CIMP-Tumoren sind beispielsweise zusätzlich mit spezifischen Histon-Modifikationen assoziiert. Besonders erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang das verstärkte Auftreten der K27-Trimethylierung des Histons H3 (56,66,170). Für die Monoubiquitinierung an H2AK119 und die Trimethylierung H3K27 werden über die Polycomb-Komplexe (PRC1, PRC2) vermittelte, gegenseitige Wechselwirkungen und Feedback-Schleifen erforscht. Eine Kolo-kalisation dieser beiden Modifikationen ist im Kontext der transkriptionellen Repression beschrieben, auch wenn die genauen Mechanismen noch nicht endgültig geklärt und Studienergebnisse in unterschiedlichen Zelltypen und Kontexten teils widersprüchlich sind. Die durch E3-Ligasen des PRC1 erfolgte Monoubiquitinierung kann als Andockstelle für Proteine des PRC2 dienen, was infolge zur Etablierung der Methylierung an H3K27 führt. Das globale Methylierungsmuster wiederum beeinflusst durch die veränderte Chromatinstruktur die Zugänglichkeit der DNA für chromatinbindende Proteine, wie sie auch im Vorfeld der Ubiquitinierung nötig sind (124,125,171).

Die abweichende epigenetische Prägung *IDH*-mutierter Gliome könnte über die oben genannten Modifizierungsmuster und -verschränkungen die erhöhten Level von USP3 in den hier untersuchten *IDH*-mutierten Gliomschnitten als Zeichen eines verstärkten Umsatzes von Ubiquitinierungen in verschiedenen zellulären Prozessen erklären. Zu nennen ist beispielsweise ein vermehrter Bedarf von USP3 in seiner in der Literatur beschriebenen Funktion in der DNA-Reparatur (94,109) als mögliche Folge akkumulierter DNA-Schäden bei *MGMT*-Promotor-Methylierung. Auch eine zu diskutierende Beteiligung von USP3 bei der Polycomb-assoziierten Regulierung der transkriptionellen Aktivität (93,123,124,172) könnte die erhöhte *USP3*-Expression im Rahmen der weitreichend veränderten Chromatinstruktur in *IDH*-mutierten Gliomen mitbedingen.

Weiterhin resultiert aus der *IDH*-Mutation eine verminderte Reduktion von NADP<sup>+</sup> zu NADPH mit einer erhöhten Vulnerabilität gegenüber oxydativem Stress (44,49,50). Sowohl

durch endogene als auch exogene Quellen unterliegen Zellen kontinuierlich dem Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies, auch Sauerstoffradikale genannt, die zur Oxidation von Basen und deren Zuckern, Basenringbrüchen und kovalenten Querverknüpfungen (*crosslinks*) von Basen führen können. Im Rahmen der Reparaturprozesse werden ca. 1 % der oxidativen Einzelstrangschäden in endogene DSBs umgewandelt, es kommt infolge zur Phosphorylierung und nachfolgenden Ubiquitinierung von H2AX (173–176). Ubiquitiniertes  $\gamma$ H2AX ist ebenso wie ubiquitiniertes H2A im Kontext der DDR als Substrat von USP3 beschrieben (93,94,109). Eine vermehrte Aktivität der Deubiquitinase USP3 bei erhöhter Sensitivität gegenüber oxidativen DNA-Schäden in *IDH*-mutierten Gliomzellen erscheint vor diesem Hintergrund plausibel.

### **USP3 als Deubiquitinase in Gliomzelllinien**

Unter der Annahme, dass die erhöhten USP3-Vorkommen in Gliomschnitten und -zellen als Indiz für eine Rolle in der Tumorgenese zu werten sind, wurde ein Zellkulturmodell etabliert. Der Fokus der Untersuchungen lag auf der USP3-abhängigen Histon-Deubiquitinierung, die auf Basis aktueller Forschungsarbeiten (93,94,109) und aufgrund der in der Literatur beschriebenen und in dieser Arbeit beobachteten nukleären Lokalisation (93,177) als möglicher zugrunde liegender Pathomechanismus eingeschätzt wurde. Mittels Knockdowns und Überexpression wurden zum einen die direkten Effekte einer veränderten *USP3*-Expression auf Protein- und Ubiquitinierungs-Ebene und zum anderen etwaige nachgeschaltete funktionelle Auswirkungen untersucht.

Im Zellkulturmodell von LN18 und U251 konnte in dieser Arbeit USP3 als Deubiquitinase des Histons H2A in Gliomzelllinien bestätigt werden. Knockdown und Überexpression von *USP3* vermittelten über entsprechende Änderungen des RNA-Niveaus und der Proteinmenge Effekte am Zielprotein H2A in Form gegenläufiger Beeinflussung des Ubiquitinierungs-Niveaus. Diese Ergebnisse stützen die bisher veröffentlichten Erkenntnisse bezüglich der USP3-abhängigen Histon-Deubiquitinierung, insbesondere sind sie konkordant mit den Arbeiten von Nicassio *et al.* (93) und Sharma *et al.* (109). Zu widersprechenden Ergebnissen kommen Mosbech *et al.*, nach deren Erkenntnissen der Knockdown einer einzelnen Deubiquitinase wie USP3 aufgrund funktioneller Redundanz innerhalb dieser Enzymgruppe nicht zu einer Veränderung des Ubiquitinierungs-Levels führt (177).

In anderen Tumorzelltypen wurde USP3 bereits *in vitro* als Deubiquitinase an zwei verschiedenen Ubiquitinierungs-Positionen in der Aminosäuresequenz von Histonen des H2A-Typs nachgewiesen (93,109). Diesen Modifikationen werden jeweils unterschiedliche Funktionen und abweichende vorrangige Beteiligungen in zellbiologischen Prozessen zugeschrieben. Die Etablierung der Polyubiquitinierung an K13/K15 und infolge auch die entsprechende Deubiquitinierung durch USP3 gelten als Schlüsselschritte bei der Reparatur von DNA-Schäden (94,109,121). Die weitverbreitete Monoubiquitinierung an Position K119 ist unter physiologischen Zellbedingungen hingegen primär mit transkriptionellem Gen-Silencing assoziiert (123,124). Im Kontext der beschriebenen USP3-abhängigen Deubiquitinierung scheint diese Histon-Modifikation jedoch zusätzlich eine kritische Funktion im Zellzyklus sowie bei der Aufrechterhaltung der Genomintegrität einzunehmen (93). Mit fortschreitender Kenntnis epigenetischer Modifikationen und deren komplexer Wechselwirkungen wird zunehmend auch für die Ubiquitinierung an K119 eine Relevanz in der zellulären DNA-Schadensantwort postuliert. Hierbei werden neben einer unmittelbaren Beteiligung auch ein Crosstalk verschiedener Modifikationen sowie die Verschränkung der übergeordneten biologischen Funktionen Transkription, Replikation, Zellzyklusprogress und DNA-Reparatur in Erwägung gezogen (81,109,117,118,125).

Der in dieser Arbeit verwendete H2Aub-Antikörper, der nach Verständnis der Verfasserin auch bei den Untersuchungen von Nicassio *et al.* (93) und Sharma *et al.* (109) Einsatz fand, detektiert laut Herstellerangaben die Monoubiquitinierung des Lysin-Rests an Position 119 von H2A (178). Sharma *et al.* beschreiben jedoch zusätzlich eine Affinität des Antikörpers zu ubiquitinierten Aminosäureresten an K13 und K15 (109), sodass eine mangelnde Spezifität für H2Aub K119 zu diskutieren ist. Eine sichere Zuordnung der detektierten Ubiquitinierungen zu einer der genannten Lysin-Positionen wäre demzufolge nicht möglich.

Vor dem Hintergrund der angenommenen funktionellen Überschneidungen und aufgrund der gegebenenfalls eingeschränkten Spezifität des H2Aub-Antikörpers wurden in dieser Arbeit Untersuchungen tumorassoziierter Zellfunktionen mit Bezug zu beiden in der Literatur vorbeschriebenen Ziel-Ubiquitinierungen von USP3 eingeschlossen. Die entsprechenden zellulären Prozesse wurden im etablierten Zellkulturmodell mit Regulierung der H2A-Ubiquitinierungs-Level durch *USP3*-Knockdown und -Überexpression mittels funktioneller Assays zu Proliferation, Apoptose, Chemosensitivität und DNA-Schadensantwort sowie durch ergänzende NGS-Analysen untersucht. Die Ergebnisse werden im Folgenden diskutiert.

### **Effekte von USP3 auf Proliferation und Apoptose**

Eines der Kennzeichen maligner Tumoren ist eine Fehlregulation im Zellzyklus. Sowohl eine entkoppelte Proliferation als auch eine beeinträchtigte Aktivierung der Apoptose als Reaktion auf nicht anderweitig beherrschbare DNA-Schäden können zu unkontrolliertem und invasivem Zellwachstum führen (46,60,179). Die unter *USP3*-Knockdown und -Überexpression durchgeführten Proliferations-Analysen mittels BrdU-Inkorporation zeigten ebenso wie die Untersuchungen zur Apoptose-Aktivität durch einen Caspase-3/7-Assay unter den hier verwendeten Bedingungen keine signifikanten Effekte. Insbesondere konnte keine gegenläufige Regulierung durch siRNA-Knockdown oder Plasmid-DNA-Überexpression belegt werden, wie sie bei einem spezifischen Effekt von USP3 auf die Zellproliferation oder den programmierten Zelltod zu erwarten wäre.

Konsistent mit den Ergebnissen des Apoptose-Assays beschreiben Nicassio *et al.* keine generell erhöhte Caspase-Aktivität nach *USP3*-Knockdown in Tumorzellen (93). Dementgegen sei von Das *et al.* bei Behandlung von HeLa-Zellen mit Etoposid vermehrte Apoptose nach *USP3*-Knockdown festgestellt worden (105). Im Kontext chronischer Entzündungsgeschehen sei in arthritischem Gewebe eine niedrige USP3-Konzentration festgestellt und mit einer erhöhten inflammatorischen und apoptotischen Aktivität assoziiert worden, ein *USP3*-Knockdown habe auch hier im Zellkulturmodell zu einer verstärkten Chondrozytenapoptose geführt (180).

Bezüglich des Proliferationsverhaltens belegen mehrere Veröffentlichungen eine Funktion von USP3 in der Regulation des Zellzyklus und Effekte auf Tumorwachstum, Migration und Metastasierung (91,93–96,107,108). So führte bei Nicassio *et al.* der *USP3*-Knockdown an Osteosarkom-Zellen (U2OS) zu einem verminderten BrdU-Einbau und weniger Mitosefiguren als Zeichen des verlangsamten Zellwachstums. Bei im Zellzyklus synchronisierten Zellen konnte eine Verzögerung der S-Phase beobachtet werden (93). Übereinstimmend beschreiben Lancini *et al.* in hämatopoetischen Stammzellen nach *USP3*-Knockdown einen Zellzyklus-Arrest und geringere Kolonien-Bildung (94) sowie Das *et al.* in Zellen des Zervixkarzinoms (HeLa) verminderte Zellteilungsraten und Verzögerungen im Zellzyklus (105). Fang *et al.* zeigten für das Magenkarzinom ein vermindertes Tumorzellwachstum nach Knockdown und gegenläufig bei Überexpression im Mausmodell eine beschleunigende Wirkung von USP3 auf den Zellzyklus (96). In Neuroblastomzellen habe ein *USP3*-Knockdown inhibitorisch auf Zellerneuerung, Proliferation und Kolonien-

Bildung gewirkt, induzierte Tumoren in Mäusen zeigten unter Knockdown-Bedingungen ein verlangsamtes Wachstum (107,108). Hemmende Auswirkungen eines USP3-Mangels auf die Proliferation sind weiterhin auch in vergleichbaren Versuchen zu nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen (99), Mamma- (100), Ösophagus- (101) und Gallenblasenkarzinomen (103) beschrieben. Speziell in Glioblastomzellen habe ein *USP3*-Knockdown inhibitorisch auf Invasion und Migration gewirkt, in Knockdown-Mäusen wird von einem abgeschwächten Tumorwachstum berichtet (Fan *et al.*) (95). Den genannten Arbeiten widersprechend beschreiben Fu *et al.* an U2OS-Zellen eine verstärkte Proliferation, vermehrte Kolonien-Bildung und Zelltransformation nach *USP3*-Knockdown (91).

Die veröffentlichten Ergebnisse bezüglich des USP3-abhängigen Proliferationsverhaltens sind in der Zusammenschau ebenso wie die jeweils angenommenen zugrunde liegenden Wirkmechanismen uneinheitlich. Auf der einen Seite habe in der letztgenannten Arbeit ein USP3-Mangel p53-vermittelt die Zellproliferation verstärkt, USP3 käme somit eine genomstabilisierende und tumorprotektive Funktion zu (91). Auf der anderen Seite habe sich ein *USP3*-Knockdown in einer Mehrheit der Veröffentlichungen zu unterschiedlichen Tumorentitäten und auch im Glioblastom hemmend auf das maligne Zellwachstum ausgewirkt, was für eine tumorfördernde Wirkung von USP3 sprechen würde (95,96,98–101,103). Auch in den Arbeiten von Lancini *et al.* und Nicassio *et al.* sei eine verminderte Proliferation unter *USP3*-Knockdown festgestellt worden, allerdings sei es darüber hinaus auch zur Akkumulation von DNA-Schäden gekommen (93,94). Der Zellzyklusarrest mit konsekutiv verminderter Proliferation kann in diesem Fall somit auch als Zeichen einer genomischen Instabilität mit vermehrter Entstehung und Akkumulation von DNA-Schäden interpretiert werden.

In dieser Arbeit konnten die teils heterogenen Erkenntnisse anderer Arbeitsgruppen bezüglich einer Funktion von USP3 im Zellzyklus nicht bestätigt werden. Als mögliche Ursachen sind zum einen gewebespezifische Unterschiede der verwendeten Tumortypen und Zelllinien sowohl bezüglich des grundsätzlichen Proliferationsverhaltens als auch bezüglich einer eventuell abweichenden Aktivität oder gar Funktion von USP3 zu nennen. Zum anderen wurden die Erkenntnisse zum Teil mit grundsätzlich verschiedenen Methoden wie beispielsweise Mausmodell gegenüber Zellkulturmodell erhoben und auch innerhalb der jeweiligen Versuchsprotokolle können abweichende Einflussfaktoren und Bedingungen bezüglich der Kultivierung der Zelllinien, der Effektivität von Knockdown und Überexpression oder der Messmethodik zu abweichenden Ergebnissen führen. Weiterhin ist darauf hinzuweisen, dass die in dieser Arbeit bei den verwendeten Gliomzelllinien

beobachtete relativ große Schwankungsbreite der einzelnen Versuchsansätze einen eventuell vorhandenen aber diskret ausgeprägten Effekt maskiert haben könnte. Da unter anderem von Nicassio *et al.* (93) und Das *et al.* (105) eine USP3-bedingte Verzögerung des Zellzyklus beschrieben wird, ist gegebenenfalls auch eine Synchronisation der Zellen in Erwägung zu ziehen, um zellzyklusabhängige Effekte zu detektieren.

### **USP3 im Kontext der zellulären DNA-Schadensantwort**

Für die DUBs und im Speziellen USP3 wird eine Beteiligung in Prozessen der DNA-Reparatur angenommen. Mehrere Arbeitsgruppen beschreiben USP3 als negativen Regulator des Histon-Codes in der DDR und als notwendig für die Beendigung der Reparaturmechanismen und für die Rückkehr zum regelhaften Zellzyklus (93,94,109,118). Einer möglichen USP3-abhängigen Beeinträchtigung der DNA-Reparatur kann über die Akkumulation von DNA-Schäden, das Auftreten von Mutationen und schließlich maligne Entartung eine zentrale Bedeutung in der Tumorentstehung und -progression zukommen. Darüber hinaus ergibt sich auch eine Relevanz hinsichtlich klinisch-therapeutischer Fragestellungen. Gestörte Reparaturmechanismen könnten die Sensibilität der Tumorzellen gegenüber DNA-Schäden-verursachenden Chemotherapeutika erhöhen, was ergänzende Therapieoptionen eröffnen würde (68,146,181).

In Konsequenz wurden transfizierte Gliomzellen auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Lomustin untersucht, es zeigte sich keine signifikante Beeinflussung der Chemosensitivität der Zellen in Abhängigkeit der USP3-Level. Weder *USP3*-Knockdown noch *USP3*-Plasmid-Transfektion führten zu reproduzierbarer Beeinflussung der EC-50-Werte, insgesamt ergab sich zudem eine große Streubreite der Replikate. Es lässt sich somit weder eine Wahrscheinlichkeitsprognose für ein Ansprechen auf Lomustin in Abhängigkeit der basalen *USP3*-Expression eines Glioms noch eine mögliche Optimierung der Alkylanzientherapie durch USP3-modulierende Medikamente ableiten.

Für Angehörige der DUB-Familie sind teilweise Wirkeffekte einer veränderten Expression auf die Chemosensitivität beschrieben, so beispielsweise eine erhöhte Sensitivität von Leberkrebszellen gegen 5-Fluorouracil nach USP22-Knockdown (87,182,183). Auf eine mögliche Relevanz hinsichtlich des onkologischen Therapieansprechens weisen auch für die Deubiquitinase USP3 einzelne Veröffentlichungen hin. Im Kolonkarzinom soll eine durch nichtkodierende RNAs vermittelte Erhöhung der USP3-Aktivität und begünstigte Kolokalisation mit ubiquitinierten Zielproteinen die Aktivierung des MAPK/ERK-

Signalweges und dadurch eine erhöhte Chemosensitivität gegenüber Oxaloplatin bedingen (184). Für Gliomzelllinien liegen nach Wissen der Verfasserin keine vergleichbaren Erkenntnisse bezüglich der Chemosensitivität in Abhängigkeit einer veränderten *USP3*-Expression vor. Allerdings werden *USP3*-vermittelte Deubiquitinierungsprozesse im Rahmen der ATR-CHEK1-vermittelten Erkennung von DNA-Schäden mit Effekten auf die Radiosensitivität von rezidivierten Glioblastomen assoziiert (166).

Bei der Interpretation der Ergebnisse zur Chemosensitivität muss bedacht werden, dass im gegenständlichen Versuchsaufbau mit der Messgröße der EC-50-Werte lediglich ein vermehrter Zelltod als Endpunkt einer beeinträchtigten DNA-Reparatur nachweisbar ist. Die in dieser Arbeit verwendeten immortalisierten Gliomzelllinien verfügen jedoch als Zeichen ihrer ausgeprägten Malignität über Mechanismen, um die zelluläre Schadensantwort an verschiedenen Schritten der Signalwege zu umgehen oder zu unterbrechen. Diesbezüglich ist die *TP53*-Mutation zu nennen, die als häufige Mutation höhergradiger Gliome auch in den hier verwendeten Zelllinien LN18 und U251 vorliegt (11,42,126,127,185). Entsprechend können Kontrollmechanismen derart beeinträchtigt sein, dass es trotz persistierender DNA-Schäden nicht zu Zellzyklusarrest und Apoptose kommt.

Zur Untersuchung möglicher Auswirkungen veränderter *USP3*-Level auf die Signalwege der DNA-Reparatur wurden deshalb zusätzlich molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt. SiRNA-transfizierte Gliomzellen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen der alkylierenden Substanz Lomustin behandelt. Induzierte DSBs wurden mithilfe des Markers  $\gamma$ H2AX detektiert, außerdem wurden *USP3*-RNA, *USP3*-Protein und das Ubiquitinierungsniveau von H2A bestimmt. Um die Rahmenbedingungen des Experiments zu überprüfen, wurden mehrere Kontrollparameter mit den Erwartungswerten vorheriger Versuche abgeglichen. In den Proben ohne Lomustin zeigte der siRNA-Knockdown von *USP3* gegenüber der Kontrolle die angenommene Wirkung auf RNA-, Protein- und Ubiquitinierungs-Ebene im konkreten Versuchsaufbau, was sowohl die Reproduzierbarkeit des beobachteten Effekts aus der Etablierung des Zellkulturmodells als auch die Ergebnisse zum *USP3*-Knockdown anderer Arbeitsgruppen (93,94,109) bestätigt. In der Kontrollgruppe stieg außerdem wie erwartet die Konzentration von  $\gamma$ H2AX als vielfach zitierter Marker für DSBs mit zunehmender Lomustinkonzentration an (64,113,116). Es wird demnach postuliert, dass es durch die alkylierende Wirkung von Lomustin über die in der Literatur (113,146,148) beschriebene Quervernetzung von DNA zu DNA sowie DNA zu Protein in den verwendeten Gliomzellen zu mittels  $\gamma$ H2AX detektierbaren Strangbrüchen kommt.

Bei Betrachtung der Ubiquitinierung von H2A nach kombinierter Lomustin- und siRNA-Behandlung zeigte sich ein signifikanter Anstieg des H2Aub-Levels aller *USP3*-Knockdown-Proben gegenüber den jeweiligen Kontrollen mit gleicher Lomustinkonzentration in U251, ein deutlicher gleichgerichteter Trend auch in der Zelllinie LN18. In der Reihe der nicht transfizierten Proben führten steigende Konzentrationen von Lomustin mit entsprechendem Anstieg von  $\gamma$ H2AX zu keiner signifikanten Veränderung der Ubiquitinierung von H2A, ebenso führten die steigenden Lomustinkonzentrationen in der *USP3*-Knockdown-Reihe zu keiner überproportionalen darüberhinausgehenden Mehr-Ubiquitinierung. Die Erhöhung des Ubiquitin-Niveaus durch den *USP3*-Knockdown auch unter Einwirkung steigender Lomustinbehandlung belegt zunächst, dass USP3 auch in Gegenwart von DNA-Schäden als Deubiquitinase von H2Aub fungiert und sich ein Knockdown dieser einzelnen Deubiquitinase messbar auf das H2A-Ubiquitinierungs-Level auswirkt. Es ist somit auch nicht von einer relevanten kontextabhängigen Kompensation der USP3-Funktion durch funktionell redundante DUBs auszugehen. Der fehlende H2Aub-Anstieg nach Lomustinbehandlung in der untransfizierten Probenreihe spricht weiterhin dafür, dass die Induktion von DSBs mit nachgeschalteter Aktivierung von Signalwegen der DNA-Reparatur mit  $\gamma$ H2AX-Erhöhung nicht in gleichem Maße auch eine vermehrte Ubiquitinierung von H2A nach sich zieht. Es ergibt sich weiterhin kein Hinweis auf eine verdeckte dynamische Mehr-Ubiquitinierung mit gleichzeitig erhöhter USP3-Deubiquitinierung, da ein derartiger Effekt in der Knockdown-Reihe demaskiert worden wäre.

Nach derzeitigem Forschungsstand kommt es als Reaktion auf DSBs nach Phosphorylierung von H2AX zu weitreichenden Ubiquitin-Modifikationen an Histonproteinen vom H2A-Typ, unter anderem  $\gamma$ H2AX und H2A, die beide als Substrate von USP3 beschrieben sind (109,118,119). H2A ist jedoch eines der am häufigsten ubiquitinierten Proteine (64,81), sodass Veränderungen des H2Aub-Levels im Rahmen der DDR möglicherweise nicht vom hohen Basisniveau bzw. den Effekten des Knockdowns abgrenzbar gewesen wären, zumal unter Behandlung mit Lomustin relativ ausgeprägte Replikatschwankungen zu beobachten waren. Zudem ist trotz Hinweisen auf eine teils mangelnde Bindungsspezifität innerhalb der ubiquitinierten H2A-artigen Histone (109) eine höhere Affinität des verwendeten Antikörpers zur H2A-Monoubiquitinierung an K119 als transkriptionell repressives Signal in der DDR anzunehmen. Veränderte Level der durch RNF8- und RNF168 vermittelten K13- und K15-Polyubiquitinierung von H2A und  $\gamma$ H2AX (186) könnten somit im Vergleich eingeschränkt detektiert worden sein. Demnach wäre zur Untersuchung wechselseitiger

Auswirkungen von DNA-Schaden und *USP3*-Knockdown die Bildung von  $\gamma$ H2AXub der sensitivere Ubiquitinierungsschritt, was in gesonderten Versuchen mit  $\gamma$ H2AXub-spezifischen Antikörpern zu überprüfen wäre. Dies stützend zeigten Sharma *et al.* in HeLa-Zellen unter *USP3*-Knockdown und paralleler UV-Bestrahlung keine über die Effekte der Transfektion hinausgehende Veränderung der H2A-Ubiquitinierung bei gleichzeitig erhöhten Leveln von  $\gamma$ H2AXub (109).

Weiterhin sind mögliche einschränkende Faktoren im konkreten Versuchsaufbau zu diskutieren. Zum einen könnte das induzierte Schadensausmaß bei höheren Lomustinkonzentrationen derartig unphysiologisch ausgeprägt sein, dass die Reparaturkapazitäten der Zelle überschritten werden, beispielsweise durch die begrenzte Verfügbarkeit von zellulären Komponenten wie Ubiquitin-Ligasen. So könnten frühe Schritte wie die Phosphorylierung von H2AX und auch in gewissem Maße die Ubiquitinierung desselben noch ausgeprägter ablaufen als nachgeschaltete Schritte wie die Ubiquitinierung von H2A. Zum anderen werden für das verwendete Alkylans Lomustin weitere zytostatische Wirkmechanismen neben der DSB-Induktion, wie etwa die Hemmung der DNA-Schadensreparatur über ein Isocyanat-Zwischenprodukt, beschrieben (113,146). Um potenziell interferierende Effekte auszuschließen, sollten gegebenenfalls alternative Methoden der DNA-Schädigung erprobt werden. Von anderen Arbeitsgruppen wurde beispielsweise ionisierende Strahlung, überwiegend in Form von Röntgenstrahlen und UV-Licht, zur selektiveren Induktion von DSBs eingesetzt (93,94,109).

Bei Untersuchung des  $\gamma$ H2AX-Niveaus in *USP3*-Knockdown-Zellen während Lomustinbehandlung zeigte sich ein Anstieg der  $\gamma$ H2AX-Konzentration mit zunehmenden Konzentrationen des Alkylans in beiden Zelllinien. In LN18 war zudem bei Vergleich mit der nicht transfizierten Probenreihe in der *USP3*-Knockdown-Reihe eine vermehrte Phosphorylierung von H2AX bei jeweils gleicher Lomustinkonzentration festzustellen. Die Ergebnisse belegen, dass es auch unter *USP3*-Knockdown zur Aktivierung der Signalwege der DNA-Schadensreparatur kommt und der frühe Schritt der H2AX-Phosphorylierung nicht durch die Beeinflussung der nachgeschalteten Ubiquitinierung gehemmt wird. Die Verstärkung des Lomustin-induzierten  $\gamma$ H2AX-Konzentrationsanstiegs durch den *USP3*-Knockdown spricht zudem für das vermehrte Vorliegen von DNA-Schäden in Form von DSBs während eines *USP3*-Mangelzustandes.

Diese Beobachtung ist konsistent mit Erkenntnissen anderer Arbeitsgruppen mit anderen Zellarten. Grundlegende Arbeiten zu *USP3* im Kontext zellulärer Reaktionen auf DNA-

Schädigung veröffentlichten Nicassio *et al.* 2007. In Osteosarkomzellen (U2OS) zeigte sich nach Knockdown von *USP3* ein Anstieg der Konzentration von  $\gamma$ H2AX, weiterhin konnten vermehrte DSBs direkt mittels Einzelzell-Gelelektrophorese (*comet-assay*) detektiert werden (93). Vergleichbare Effekte des *USP3*-Knockdowns auf die  $\gamma$ H2AX-Konzentration bestätigten 2014 Lancini *et al.* für hämatopoetische Stammzellen und Sharma *et al.* für Zervixkarzinomzellen (HeLa) (94,109). Letztere zeigten für HeLa-Zellen bei kombinierter UV-Bestrahlung und Transfektion mit *USP3*-siRNA eine Erhöhung der  $\gamma$ H2AX-Konzentration, die über die basale radiogene Zellschädigung hinausging und als Effekt des Knockdowns gewertet wurde (109). Lancini *et al.* führten darüber hinaus Experimente mit *Usp3*-Knockdown-Mäusen durch. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Zellkulturversuche kam es zur Akkumulation chromosomaler Brüche und verstärkter mitotischer Rekombination mit spontaner Tumorentstehung und verkürzter Lebenszeit der Versuchstiere (94). Allerdings wird in der Literatur vereinzelt auch eine erhöhte *USP3*-Expression mit der Entstehung von DSBs in Verbindung gebracht. Das *et al.* beschreiben in Überexpressions-Versuchen einen signifikanten Anstieg von  $\gamma$ H2AX-positiven HeLa-Zellen (105). Das Nebeneinander beider Regulationsrichtungen im Zusammenhang mit vermehrten DSBs könnte die bereits erörterte Theorie einer physiologisch eng regulierten *USP3*-Gleichgewichtseinstellung stützen. Eigene Erkenntnisse zu Auswirkungen einer Überexpression von *USP3* auf die zellulären  $\gamma$ H2AX-Level und assoziierte DNA-Schäden konnten bei ausgeprägten Replikatschwankungen in entsprechenden Vorversuchen in dieser Arbeit nicht gewonnen werden.

Die vermehrte Detektion von Strangbrüchen unter *USP3*-Knockdown in dieser und den verglichenen Arbeiten spricht für eine kritische Funktion von *USP3* in den Abläufen der DNA-Reparatur. Als Vermittler der Reversibilität von Ubiquitinierungs-Signalen in der Umgebung von DNA-Schäden werden die DUBs mit dem Beenden der Reparaturprozesse und der Rückkehr zum regelhaften Zellzyklus assoziiert (118,186,187). Für eine derartige spezifische Beteiligung von *USP3* in der DNA-Schadensantwort sprechen auch die nachfolgenden Beobachtungen anderer Forschungsgruppen:

Zum einen scheinen Knockdown und Überexpression von *USP3* die Anlagerung von Reparaturfaktoren der DNA-Reparatur zu beeinflussen, die den Ubiquitinierungs-Signalen an  $\gamma$ H2AX und H2A nachgeschaltet sind. So habe sich nach *USP3*-Knockdown in Osteosarkomzellen eine gesteigerte nukleäre Ansammlung des Checkpointproteins 53BP1

gezeigt, in gegenläufiger Regulationsrichtung sei es nach *USP3*-Überexpression zu einer verminderten Akkumulation von Reparaturfaktoren gekommen (93,109).

Zum anderen soll *USP3* eine Funktion in der Formierung sogenannter Reparatur-Foki haben. An geschädigten DNA-Bereichen kommt es zur Kollokalisierung von PTMs und Chromatin-assoziiierter Proteine, die über Umstrukturierung des Chromatins die notwendige Zugänglichkeit der geschädigten DNA für weitere Reparaturproteine vermitteln. Die Foki stellen somit die räumlichen Korrelate der ablaufenden Reparaturprozesse dar (117,118,188). In nach ionisierender Bestrahlung entstehenden *ionising radiation induced foci* (IRIFs) wird eine parallele Ansammlung von  $\gamma$ H2AX und H2Aub beschrieben, ein *USP3*-Knockdown habe zur verzögerten Auflösung der Reparatur-Foki geführt (93). In *USP3*-überexpmierenden Zellen sei nach ionisierender Bestrahlung eine verringerte Foki-Formierung zu beobachten gewesen (109).

Die Versuchsergebnisse dieser Arbeit werden unter Berücksichtigung der entsprechenden oben aufgeführten Erkenntnisse anderer Arbeitsgruppen dahingehend interpretiert, dass ein *USP3*-Mangel durch die fehlende Reversibilität der H2A-Ubiquitinierungen zu einer beeinträchtigten DNA-Reparatur führt. Der Ausfall des kritischen Deubiquitinierungsschrittes könnte den umstrukturierten Zustand des Chromatins mit Persistenz des Markers  $\gamma$ H2AX einfrieren. Ein *USP3*-Knockdown würde den vollständigen Ablauf der DNA-Reparatur und die Rückkehr zum physiologischen Zellzyklus behindern und somit zu einer vermehrten Akkumulation von DNA-Schäden führen. Der  $\gamma$ H2AX-Konzentrationsanstieg in den transfizierten Zellen gegenüber der Kontrolle auch in dem Probenpaar ohne Lomustin könnte für einen stetig anfallenden Basisschaden sprechen, der unter physiologischen Bedingungen kontinuierlich von der zellulären DNA-Reparatur beseitigt wird und sich unter *USP3*-Knockdown-Bedingungen aufstaut.

Es stellt sich die Frage, weshalb der oben beschriebene Konzentrationsanstieg von  $\gamma$ H2AX nach *USP3*-Knockdown nur in der Zelllinie LN18 und nicht auch in der parallel untersuchten Linie U251 beobachtet werden konnte. Bei Betrachtung der nicht transfizierten Kontrollen beider Zelllinien fällt für U251 eine deutlichere  $\gamma$ H2AX-Konzentrationserhöhung zwischen 0  $\mu$ M und 25  $\mu$ M Lomustin verglichen mit den entsprechenden Proben von LN18 auf. Der weitere Anstieg zwischen 25  $\mu$ M und 50  $\mu$ M, der in den LN18-Zellen näherungsweise dem zwischen 0  $\mu$ M und 25  $\mu$ M entspricht, ist in der U251-Zelllinie gegenüber dem ersten Anstieg zwischen unbehandelt und 25  $\mu$ M Lomustin deutlich geringer ausgeprägt. Diese

Befunde sprechen für eine höhere Empfindlichkeit von U251 gegenüber Lomustin, da bei gleicher Lomustinkonzentration verglichen mit LN18 in stärkerem Ausmaß DSBs induziert wurden. Das Abflachen des  $\gamma$ H2AX-Konzentrationsanstiegs bei weiterer Erhöhung der Lomustinkonzentration könnte als Erreichen eines Plateaus interpretiert werden. Demnach würde sich die Aktivierung der DNA-Reparatur im Versuchsaufbau bei höheren Konzentrationen des Chemotherapeutikums einem Sättigungsniveau annähern, welches für die unterschiedlichen Zelllinien je nach Sensitivität bei entsprechend abweichenden Lomustinkonzentrationen erreicht werden würde. Additive Effekte des Knockdowns auf das  $\gamma$ H2AX-Niveau könnten eventuell nur im anfänglich ansteigenden Bereich sichtbar sein, sodass gegebenenfalls für U251 die Erprobung niedrigerer Lomustinkonzentrationen in Erwägung gezogen werden sollte.

### **Einfluss von USP3 auf das Transkriptom**

Neben den aufgeführten funktionellen Untersuchungen wurde ergänzend eine Transkriptom-Analyse von *USP3*-siRNA- und *USP3*-Plasmid-transfizierten Zellen mittels mRNA-NGS durchgeführt. Sie diente sowohl der Überprüfung der bisherigen Versuchsergebnisse auf einer weiteren Ebene als auch der Aufdeckung möglicher alternativer USP3-abhängiger Prozesse sowie genereller Effekte auf die transkriptionelle Aktivität.

In der Auswertung der Expressionsdatensätze zeigten sich keine durch das veränderte USP3-Niveau vermittelten Effekte auf die untersuchten Signalwege und Stoffwechselprozesse. In der Hauptkomponentenanalyse wurde ebenfalls keine deutliche Auftrennung der Zellpopulationen in Abhängigkeit der USP3-Expression festgestellt. Lediglich in der Zelllinie LN18 konnten wenige differenziell exprimierte Gene ermittelt werden. Diese Ergebnisse unterstützen plausibel, dass die Regulation der Deubiquitinase USP3 keinen direkten und ausgeprägten Einfluss auf das Gesamt-Transkriptom der untersuchten Gliomzellen hat.

Vergleichbare Sequenzierungsanalysen wurden auch von Lancini *et al.* 2016 für Vorläuferzellen und verschiedene B-Zellpopulationen aus *Usp3*-Knockoutmäusen mit entsprechendem Fokus auf Stammzellerhalt und Differenzierung durchgeführt. Hierbei seien mit weniger als einhundert differenziell exprimierten Genen ebenfalls keine ausgeprägten transkriptionellen Effekte durch USP3-Mangel festgestellt worden (Daten verfügbar in der NCBI GEO Datenbank (189), Accession GSE58495) (190,191).

### **Einordnung der Ergebnisse**

Den Ausgangspunkt für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen stellte der Nachweis einer erhöhten *USP3*-Expression in höhergradigen Gliomen *in vitro* und *in situ* dar, wodurch die Ergebnisse institutsinterner Transkriptom-Analysen und aktueller Forschungsergebnisse zu Glioblastomen (95) bestätigt werden konnten. Auf dieser Basis wurde zur funktionellen Analyse von *USP3* ein Zellkulturmodell etabliert und mittels Knockdowns und Überexpression die *USP3*-Funktion als Deubiquitinase für das Zielsubstrat H2Aub in Gliomzellen belegt.

In der Literatur werden die DUBs und speziell *USP3* mit unterschiedlichen tumorassoziierten zellulären Prozessen wie Transkription, Proliferation und DNA-Reparatur assoziiert. In der Zusammenschau der Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen zeigt diese Arbeit eine Beteiligung von *USP3* in der zellulären DNA-Schadensantwort in höhergradigen humanen Gliomen auf. Der verstärkte Anstieg der Konzentration des DNA-Schadensmarkers  $\gamma$ H2AX nach Lomustineinwirkung unter *USP3*-Knockdown in der Gliomzelllinie LN18 wird vor dem Hintergrund der diskutierten Literatur dahingehend interpretiert, dass die Reversibilität der Signalwege der DNA-Reparatur durch Ausfall der kritischen *USP3*-abhängigen H2A-Deubiquitinierung nicht mehr gewährleistet ist. Es resultieren Beeinträchtigungen der effektiven Beendigung der DDR und der Rückkehr zum physiologischen Zellzyklus mit Akkumulation von DNA-Schäden.

Infolge der eingeschränkten DNA-Reparatur könnten niedrige *USP3*-Level das Auftreten von Genmutationen und nachfolgend eine Tumorentstehung begünstigen, wie von Lancini *et al.* im Mausmodell aufgezeigt (94). In dieser Arbeit wurden demgegenüber erhöhte *USP3*-Level in Gliomgewebeschnitten und Gliomzelllinien verglichen mit Normalhirngewebe nachgewiesen. Entsprechend zeigten auch Fan *et al.* in Glioblastomzellen eine erhöhte *USP3*-Expression, außerdem sei es in Knockdown-Experimenten zu verminderter Proliferation und verlangsamtem Tumorwachstum gekommen (95). Wie bereits erläutert, könnte in einem empfindlich regulierten System die Abweichung vom physiologischen Normalbereich sowohl nach oben als auch nach unten zu genotoxischem Zellstress führen. Im Kontext der DNA-Reparatur lässt sich diese Überlegung für *USP3*-Überangebot einerseits und *USP3*-Mangel andererseits auch mechanistisch erklären. Bei *USP3*-Überexpression könnte durch das resultierende Überwiegen der Deubiquitinierung die Rekrutierungsplattform für Downstream-Reparaturfaktoren fehlen, sodass das Anlaufen der Reparaturprozesse verhindert werden könnte. Ein *USP3*-Mangel würde hingegen die Signalaufhebung der DDR beeinträchtigen. Somit könnten Abweichungen in beide

## Diskussion

Regulationsrichtungen die Effektivität der DNA-Reparatur negativ beeinflussen und die Entstehung von Genmutationen und Tumoren fördern.

Neben den Erkenntnissen zum besseren Verständnis der Tumorgenese von Gliomen ergibt sich aus den Untersuchungsergebnissen auch eine mögliche klinische Relevanz. Insbesondere vor dem Hintergrund der Korrelation einer hohen *USP3*-Expression mit dem Vorliegen der prognostisch günstigen *IDH*-Mutation in dem im Vorfeld bioinformatisch analysierten Patientenkollektiv sowie in den untersuchten Tumorschnitten ist eine Bedeutung von *USP3* als potenzieller prognostischer Marker oder als Angriffspunkt neuer Therapieoptionen zu diskutieren.

### **Ausblick**

Diese Arbeit untersucht die Deubiquitinase USP3 im Kontext tumorassoziierter Prozesse in humanen Gliomen und weist im Zellkulturmodell auf eine kritische Beteiligung von USP3 in der DNA-Reparatur hin. Dieses Ergebnis stellt einen weiteren Schritt in dem noch relativ jungen aber vielversprechenden Forschungsfeld der DUBs dar. Um die beteiligten Mechanismen weiter zu entschlüsseln und gegebenenfalls klinische Konsequenzen für die nach wie vor schwierige Therapie höhergradiger Gliome abzuleiten, bedarf es weiterer zielgerichteter Forschung.

Vor dem Hintergrund unterschiedlicher Ergebnisse zur DNA-Reparatur in den beiden untersuchten Gliomzelllinien erscheint zunächst der Einschluss weiterer Zelllinien sinnvoll. Dabei sollten auch der Mutationsstatus und das jeweilige epigenetische Profil berücksichtigt werden sowie die verwendeten Lomustinkonzentrationen an die Chemosensitivität angepasst werden. Eine zusätzliche Option ist die Schadensinduktion mittels ionisierender Strahlung, um das Interaktionspotenzial der Alkylanzien über nicht berücksichtigte Wirkmechanismen zu vermeiden. Auch die Erweiterung der Versuchsansätze um das Monitoring verbreiteter PTMs zur Detektion möglicher Interaktionen und die Untersuchung von Downstream-Faktoren im Signalweg der DNA-Reparatur sind zu diskutieren.

Ein weiterer Ansatzpunkt für künftige Untersuchungen ist die Optimierung des verwendeten Zellkulturmodells, insbesondere ist an dieser Stelle die Problematik der kontinuierlich veränderten *USP3*-Expression zu nennen. Sowohl die in dieser Arbeit aufgetretenen Versuchsschwankungen bei Verwendung der transienten Expression als auch die in Vorversuchen zu stabilen Klonen beobachtete erschwerte Kultivierbarkeit mit Verlust der *USP3*-Überexpression mit steigender Passagenzahl weisen auf vermehrten Zellstress durch die unphysiologische und dauerhaft veränderte Expression von *USP3* hin. Deshalb könnte die Etablierung stabiler Zellklone mit induzierbarer *USP3*-Modulierung in Erwägung gezogen werden. Da sowohl für einige DUBs als auch für assoziierte Ubiquitinierungsmuster teilweise zellzyklusabhängige Regulierungen beschrieben sind, könnte eine Synchronisierung der Zellen in den funktionellen Versuchen mögliche Effekte in Abhängigkeit der jeweiligen Zellzyklusphase sichtbar machen.

## 5 Zusammenfassung

Höhergradige Gliome stellen aufgrund ihrer nach wie vor schlechten Prognose eine Herausforderung in der neuroonkologischen Therapie dar. Mit zunehmender Bedeutung molekularpathologischer Aspekte in der WHO-Klassifikation und der Gliomtherapie rücken auch epigenetische Veränderungen und die beteiligten Enzyme weiter in den Fokus aktueller Forschung. Eine weitverbreitete posttranslationale Modifikation ist die Ubiquitinierung. Diese nimmt regulatorische Funktionen in zentralen zellbiologischen Prozessen wie Proliferation, Apoptose, Genexpression und DNA-Reparatur ein, die für maligne Entartung und Tumorbilogie von Relevanz sind. Im Zuge dessen wurden auch die Deubiquitinasen als Vermittler der Reversibilität von Ubiquitinierungssignalen in unterschiedlichen Tumorentitäten mit der Krebsentstehung assoziiert, unter anderem die Deubiquitinase USP3. Institutsinterne Analysen von TCGA-Expressionsdaten zeigen ein erhöhtes Vorkommen von USP3 in Gliomen und weisen auf eine mögliche Assoziation mit dem *IDH*-Mutationsstatus hin.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle von USP3 in höhergradigen humanen Gliomen als Deubiquitinase des Histons H2A zu erforschen. Hierzu wurde zunächst die *USP3*-Expression in Gliomzelllinien sowie das Vorkommen in Tumorgewebeschnitten untersucht. Die Funktion als Deubiquitinase wurde mittels Bestimmung der H2A-Ubiquitinierung nach Überexpression und Knockdown in ausgewählten Gliomzelllinien überprüft. Im Anschluss erfolgten funktionelle Untersuchungen sowie NGS-Analysen auf mRNA-Ebene.

Es konnte in den sechs untersuchten klassischen Gliomzelllinien eine um 1,2- bis 4,5-fach erhöhte *USP3*-Expression gegenüber Normalhirngewebe festgestellt werden. Auch in Tumorschnitten höhergradiger Gliome von Erkrankten war USP3 immunhistochemisch signifikant vermehrt nachzuweisen. Zusätzlich zeigte sich bei *IDH*-mutierten Tumoren gegenüber dem *IDH*-Wildtyp ein stärkeres USP3-Signal im Zellkern. Weiterhin wurde mittels siRNA- und Plasmidtransfektion ein Zellkulturmodell mit reproduzierbarem Knockdown und Überexpression auf RNA- und Proteinebene in den Zelllinien U251 und LN18 etabliert. Durch den Nachweis der gegenläufig regulierten H2A-Ubiquitinierung in Western Blots von Histonextrakten konnte USP3 als Deubiquitinase des Histons H2A auch in humanen Gliomzellen bestätigt werden. Die funktionellen Untersuchungen erbrachten Ergebnisse hinsichtlich einer möglichen kritischen Funktion von USP3 in den Abläufen der zellulären DNA-Reparatur. Bei Induktion von DNA-Schäden durch Behandlung mit aufsteigenden Lomustinkonzentrationen zeigte sich in LN18 nach *USP3*-Knockdown verglichen mit den Kontrollzellen ein schnellerer und ausgeprägterer Anstieg des DNA-Schadensmarkers  $\gamma$ H2AX. Resultierende Effekte auf die Chemosensitivität gegenüber Lomustin waren bei Betrachtung der Zellvitalität jedoch nicht festzustellen. In den weiteren Untersuchungen tumorassoziierter Prozesse zeigten veränderte USP3-Spiegel unter den Bedingungen dieser Arbeit keinen Einfluss auf Proliferation, Apoptose und das Transkriptom.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse dieser Doktorarbeit auf eine Beteiligung der Deubiquitinase USP3 in der zellulären Antwort auf Erbgutschäden in höhergradigen humanen Gliomen hin. Die beobachtete Akkumulation von DNA-Schäden nach Behandlung mit Alkylanzien und bei gleichzeitigem Vorliegen einer USP3-Mangelsituation kann auf eine gestörte Modulation des regulatorischen Ubiquitinierungsmusters in den Signalwegen der DNA-Reparatur zurückzuführen sein. USP3 könnte somit nicht nur in der Gliomgenese, sondern auch hinsichtlich des klinischen Therapieansprechens eine Relevanz zukommen, was durch die Assoziation mit der prognostisch günstigen *IDH*-Mutation gestützt wird.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, Deltour I, Fisher JL, Langer CE, Pekmezci M, Schwartzbaum JA, Turner MC, Walsh KM, Wrensch MR, Barnholtz-Sloan JS. The epidemiology of glioma in adults: A "state of the science" review. *Neuro-oncology*. 2014;16(7):896–913. doi:10.1093/neuonc/nou087
2. Decision No 1295/1999/EC of the European Parliament and of the Council of 29 April 1999 adopting a programme of community action on rare diseases within the framework for action in the field of public health (1999-2003): OJ L 155, 22.6.1999: European Commission, Directorate F - Public Health; 1999 [cited 2023 Jul 6]. Available from: [https://ec.europa.eu/health/archive/ph\\_overview/previous\\_programme/rare\\_diseases/raredis\\_wpgm99\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/health/archive/ph_overview/previous_programme/rare_diseases/raredis_wpgm99_en.pdf)
3. Leibniz Universität Hannover - Forschungsstelle für Gesundheitsökonomie. Maßnahmen zur Verbesserung der gesundheitlichen Situation von Menschen mit seltenen Erkrankungen in Deutschland: Forschungsbericht - Studie im Auftrag des Bundesministeriums für Gesundheit. Hannover; 2009 [cited 2023 Jul 6]. Available from: [https://www.namse.de/fileadmin/user\\_upload/downloads/BMG\\_Forschungsbericht\\_Seltene\\_Krankheiten.pdf](https://www.namse.de/fileadmin/user_upload/downloads/BMG_Forschungsbericht_Seltene_Krankheiten.pdf)
4. Robert Koch-Institut - Zentrum für Krebsregisterdaten. Krebs in Deutschland für 2017/2018, pp.122-125. Berlin; 2021 [cited 2023 May 31]. Available from: [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/kid\\_2021/krebs\\_in\\_deutschland\\_2021.pdf](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2021/krebs_in_deutschland_2021.pdf)
5. Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol*. 2005;109(1):93–108. doi:10.1007/s00401-005-0991-y
6. Delgado-López PD, Corrales-García EM. Survival in glioblastoma: A review on the impact of treatment modalities. *Clin Transl Oncol*. 2016;18(11):1062–71. doi:10.1007/s12094-016-1497-x
7. Deutsche Gesellschaft für Neurologie. Gliome: S2k-Leitlinie; 2021. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie [cited 2022 Jun 12]. Available from: [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/030-099l\\_S2k\\_Gliome\\_2021-07.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/030-099l_S2k_Gliome_2021-07.pdf)
8. Yao M, Li S, Wu X, Diao S, Zhang G, He H, Bian L, Lu Y. Cellular origin of glioblastoma and its implication in precision therapy. *Cell Mol Immunol*. 2018;15(8):737–9. doi:10.1038/cmi.2017.159
9. Weller M, Wick W, Aldape K, Brada M, Berger M, Pfister SM, Nishikawa R, Rosenthal M, Wen PY, Stupp R, Reifenberger G. Glioma. *Nature reviews. Disease primers*. 2015;1. doi:10.1038/nrdp.2015.17
10. Ostrom QT, Cioffi G, Gittleman H, Patil N, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012-2016. *Neuro-oncology*. 2019;21(Suppl 5):v1-v100. doi:10.1093/neuonc/noz150
11. WHO Classification of tumours editorial board. World Health Organization classification of tumours of the central nervous system. 5th ed. Lyon: International Agency For Research on Cancer; 2021, pp.15-55.

12. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, Deimling A v., 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;131(6):803–20. doi:10.1007/s00401-016-1545-1
13. McNeill KA. Epidemiology of Brain Tumors. *Neurol Clin.* 2016;34(4):981–98. doi:10.1016/j.ncl.2016.06.014
14. Vecht CJ, Kerkhof M, Duran-Pena A. Seizure prognosis in brain tumors: New insights and evidence-based management. *Oncologist.* 2014;19(7):751–9. doi:10.1634/theoncologist.2014-0060
15. Posti JP, Bori M, Kauko T, Sankinen M, Nordberg J, Rahi M, Frantzén J, Vuorinen V, Sipilä JOT. Presenting symptoms of glioma in adults. *Acta Neurol Scand.* 2015;131(2):88–93. doi:10.1111/ane.12285
16. Rasmussen BK, Hansen S, Laursen RJ, Kosteljanetz M, Schultz H, Nørgård BM, Guldberg R, Gradel KO. Epidemiology of glioma: Clinical characteristics, symptoms, and predictors of glioma patients grade I-IV in the the Danish Neuro-Oncology Registry. *J Neurooncol.* 2017;135(3):571–9. doi:10.1007/s11060-017-2607-5
17. Yamasaki F, Kurisu K, Satoh K, Arita K, Sugiyama K, Ohtaki M, Takaba J, Tominaga A, Hanaya R, Yoshioka H, Hama S, Ito Y, Kajiwara Y, Yahara K, Saito T, Thohar MA. Apparent diffusion coefficient of human brain tumors at MR imaging. *Radiology.* 2005;235(3):985–91. doi:10.1148/radiol.2353031338
18. Aquino D, Di Stefano AL, Scotti A, Cuppini L, Anghileri E, Finocchiaro G, Bruzzone MG, Eoli M. Parametric response maps of perfusion MRI may identify recurrent glioblastomas responsive to bevacizumab and irinotecan. *PLoS ONE.* 2014;9(3):e90535. doi:10.1371/journal.pone.0090535
19. Weller M, van den Bent M, Tonn JC, Stupp R, Preusser M, Cohen-Jonathan-Moyal E, Henriksson R, Le Rhun E, Balana C, Chinot O, Bendszus M, Reijneveld JC, Dhermain F, French P, Marosi C, Watts C, Oberg I, Pilkington G, Baumert BG, Taphoorn MJB, Hegi M, Westphal M, Reifenberger G, Soffiatti R, Wick W. European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. *The Lancet Oncology.* 2017;18(6):e315-e329. doi:10.1016/S1470-2045(17)30194-8
20. Carlsson SK, Brothers SP, Wahlestedt C. Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme. *EMBO Mol Med.* 2014;6(11):1359–70. doi:10.15252/emmm.201302627
21. Tsitlakidis A, Foroglou N, Venetis CA, Patsalas I, Hatzisotiriou A, Selviaridis P. Biopsy versus resection in the management of malignant gliomas: A systematic review and meta-analysis. *J Neurosurg.* 2010;112(5):1020–32. doi:10.3171/2009.7.JNS09758
22. Scheie D, Kufaishi HHA, Broholm H, Lund EL, Stricker K de, Melchior LC, Grauslund M. Biomarkers in tumors of the central nervous system - a review. *APMIS.* 2019;127(5):265–87. doi:10.1111/apm.12916
23. Malzkorn B, Reifenberger G. Integrierte Diagnostik der diffusen astrozytären und oligodendroglialen Gliome [Integrated diagnostics of diffuse astrocytic and

- oligodendroglial tumors]. *Pathologie*. 2019;40(Suppl 1):9–17. German. doi:10.1007/s00292-019-0581-8
24. Azam Z, Quillien V, Wang G, To S-ST. The potential diagnostic and prognostic role of extracellular vesicles in glioma: Current status and future perspectives. *Acta Oncol*. 2019;58(3):353–62. doi:10.1080/0284186X.2018.1551621
  25. Nayak L, Reardon DA. High-grade Gliomas. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*. 2017;23(6):1548–63. doi:10.1212/CON.0000000000000554
  26. Hervey-Jumper SL, Berger MS. Maximizing safe resection of low- and high-grade glioma. *J Neurooncol*. 2016;130(2):269–82. En;en. doi:10.1007/s11060-016-2110-4
  27. Stummer W, Reulen H-J, Meinel T, Pichlmeier U, Schumacher W, Tonn J-C, Rohde V, Opperl F, Turowski B, Woiciechowsky C, Franz K, Pietsch T. Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: Identification of and adjustment for bias. *Neurosurgery*. 2008;62(3):564-76; discussion 564-76. doi:10.1227/01.neu.0000317304.31579.17
  28. Schebesch K-M, Proescholdt M, Höhne J, Hohenberger C, Hansen E, Riemenschneider MJ, Ullrich W, Doenitz C, Schlaier J, Lange M, Brawanski A. Sodium fluorescein-guided resection under the YELLOW 560 nm surgical microscope filter in malignant brain tumor surgery—a feasibility study. *Acta Neurochirurgica*. 2013;155(4):693–9. doi:10.1007/s00701-013-1643-y
  29. Kortmann R-D, Jeremic B, Weller M, Plasswilm L, Bamberg M. Radiochemotherapy of Malignant Glioma in Adults. *Strahlenther Onkol*. 2003;179(4):219–32. doi:10.1007/s00066-003-1027-y
  30. Wu W, Klockow JL, Zhang M, Lafortune F, Chang E, Jin L, Wu Y, Daldrup-Link HE. Glioblastoma multiforme (GBM): An overview of current therapies and mechanisms of resistance. *Pharmacological research*. 2021;171. doi:10.1016/j.phrs.2021.105780
  31. Hartmann C, Hentschel B, Simon M, Westphal M, Schackert G, Tonn JC, Loeffler M, Reifenberger G, Pietsch T, Deimling A v., Weller M. Long-term survival in primary glioblastoma with versus without isocitrate dehydrogenase mutations. *Clin Cancer Res*. 2013;19(18):5146–57. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0017
  32. Reifenberger G, Weber RG, Riehmer V, Kaulich K, Willscher E, Wirth H, Gietzelt J, Hentschel B, Westphal M, Simon M, Schackert G, Schramm J, Matschke J, Sabel MC, Gramatzki D, Felsberg J, Hartmann C, Steinbach JP, Schlegel U, Wick W, Radlwimmer B, Pietsch T, Tonn JC, Deimling A v., Binder H, Weller M, Loeffler M. Molecular characterization of long-term survivors of glioblastoma using genome- and transcriptome-wide profiling. *Int. J. Cancer*. 2014;135(8):1822–31. doi:10.1002/ijc.28836
  33. Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS, Wefel JS, Blumenthal DT, Vogelbaum MA, Colman H, Chakravarti A, Pugh S, Won M, Jeraj R, Brown PD, Jaeckle KA, Schiff D, Stieber VW, Brachman DG, Werner-Wasik M, Tremont-Lukats IW, Sulman EP, Aldape KD, Curran WJ, Mehta MP. A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med*. 2014;370(8):699–708. doi:10.1056/NEJMoa1308573
  34. Lee DH, Ryu H-W, Won H-R, Kwon SH. Advances in epigenetic glioblastoma therapy. *Oncotarget*. 2017;8(11):18577–89. doi:10.18632/oncotarget.14612

35. Razavi S-M, Lee KE, Jin BE, Aujla PS, Gholamin S, Li G. Immune Evasion Strategies of Glioblastoma. *Front Surg.* 2016;311. doi:10.3389/fsurg.2016.00011
36. Wirsching H-G, Weiss T, Roth P, Weller M. Grundlagen zur Diagnose und Therapie von Gliomen [Basic principles of diagnosis and treatment of gliomas]. *Nervenarzt.* 2018. German. doi:10.1007/s00115-018-0519-z
37. Migliorini D, Dietrich P-Y, Stupp R, Linette GP, Posey AD, June CH. CAR T-Cell Therapies in Glioblastoma: A First Look. *Clin Cancer Res.* 2018;24(3):535–40. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-2871
38. Robert Koch-Institut - Zentrum für Krebsregisterdaten. Krebs in Deutschland für 2013/2014, pp.108-111. Berlin; 2017 [cited 2022 Jun 24]. Available from: [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/vergangene\\_ausgaben/downloads/krebs\\_in\\_deutschland\\_11.pdf](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/vergangene_ausgaben/downloads/krebs_in_deutschland_11.pdf)
39. Bailey P, Cushing H. A Classification of the Tumours of the Glioma Group on a Histogenetic Basis With a Correlated Study of Prognosis. Montreal: The J. B. Lippincott Co.; 1926.
40. WHO Classification of tumours editorial board. World Health Organization classification of tumours of the central nervous system. 4th ed. Lyon: International Agency For Research on Cancer; 2016, pp.15-78.
41. Riemenschneider MJ, Reifenberger G. Molecular neuropathology of gliomas. *Int J Mol Sci.* 2009;10(1):184–212. doi:10.3390/ijms10010184
42. Crespo I, Vital AL, Gonzalez-Tablas M, Patino MdC, Otero A, Lopes MC, Oliveira C de, Domingues P, Orfao A, Taberner MD. Molecular and Genomic Alterations in Glioblastoma Multiforme. *Am J Pathol.* 2015;185(7):1820–33. doi:10.1016/j.ajpath.2015.02.023
43. Clark O, Yen K, Mellingshoff IK. Molecular Pathways: Isocitrate Dehydrogenase Mutations in Cancer. *Clin Cancer Res.* 2016;22(8):1837–42. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1333
44. Chen J-R, Yao Y, Xu H-Z, Qin Z-Y. Isocitrate Dehydrogenase (IDH)1/2 Mutations as Prognostic Markers in Patients With Glioblastomas. *Medicine (Baltimore).* 2016;95(9):e2583. doi:10.1097/MD.0000000000002583
45. Brat DJ, Aldape K, Colman H, Figarella-Branger D, Fuller GN, Giannini C, Holland EC, Jenkins RB, Kleinschmidt-DeMasters B, Komori T, Kros JM, Louis DN, McLean C, Perry A, Reifenberger G, Sarkar C, Stupp R, van den Bent MJ, Deimling A v., Weller M. cIMPACT-NOW update 5: Recommended grading criteria and terminologies for IDH-mutant astrocytomas. *Acta Neuropathol.* 2020;139(3):603–8. doi:10.1007/s00401-020-02127-9
46. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011;144(5):646–74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
47. Sidransky D, Mikkelsen T, Schwechheimer K, Rosenblum ML, Cavanee W, Vogelstein B. Clonal expansion of p53 mutant cells is associated with brain tumour progression. *Nature.* 1992;355(6363):846–7. doi:10.1038/355846a0
48. Korshunov A, Casalini B, Chavez L, Hielscher T, Sill M, Ryzhova M, Sharma T, Schimpf D, Stichel D, Capper D, Reuss DE, Sturm D, Absalyamova O, Golanov A, Lambo S, Bewerunge-Hudler M, Lichter P, Herold-Mende C, Wick W, Pfister SM, Kool M, Jones DTW, Deimling A v., Sahm F. Integrated molecular characterization

- of IDH-mutant glioblastomas. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2019;45(2):108–18. doi:10.1111/nan.12523
49. Ohba S, Hirose Y. Association between mutant IDHs and tumorigenesis in gliomas. *Med Mol Morphol.* 2018;51(4):194–8. doi:10.1007/s00795-018-0189-8
  50. Ichimura K. Molecular pathogenesis of IDH mutations in gliomas. *Brain Tumor Pathol.* 2012;29(3):131–9. doi:10.1007/s10014-012-0090-4
  51. Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am J Pathol.* 2009;174(4):1149–53. doi:10.2353/ajpath.2009.080958
  52. Azzarelli R, Simons BD, Philpott A. The developmental origin of brain tumours: A cellular and molecular framework. *Development.* 2018;145(10). doi:10.1242/dev.162693
  53. Turcan S, Rohle D, Goenka A, Walsh LA, Fang F, Yilmaz E, Campos C, Fabius AWM, Lu C, Ward PS, Thompson CB, Kaufman A, Guryanova O, Levine R, Heguy A, Viale A, Morris LGT, Huse JT, Mellinghoff IK, Chan TA. IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature.* 2012;483(7390):479–83. doi:10.1038/nature10866
  54. Malta TM, Souza CF de, Sabedot TS, Silva TC, Mosella MS, Kalkanis SN, Snyder J, Castro AVB, Noushmehr H. Glioma CpG island methylator phenotype (G-CIMP): Biological and clinical implications. *Neuro-oncology.* 2018;20(5):608–20. doi:10.1093/neuonc/nox183
  55. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis.* 2010;31(1):27–36. doi:10.1093/carcin/bgp220
  56. Kondo Y, Katsushima K, Ohka F, Natsume A, Shinjo K. Epigenetic dysregulation in glioma. *Cancer Sci.* 2014;105(4):363–9. doi:10.1111/cas.12379
  57. Waddington CH. The epigenotype. *Endeavour.* 1942;(1):18–20. Reprinted in *Int J Epidemiol.* 2012;41(1):10-3. doi:10.1093/ije/dyr184
  58. Holliday R. The inheritance of epigenetic defects. *Science.* 1987;238(4824):163–70. doi:10.1126/science.3310230
  59. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(2):143–53. doi:10.1038/nrc1279
  60. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell.* 2007;128(4):683–92. doi:10.1016/j.cell.2007.01.029
  61. Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature.* 1997;389(6648):251–60. doi:10.1038/38444
  62. Turner BM. Cellular memory and the histone code. *Cell.* 2002;111(3):285–91. doi:10.1016/s0092-8674(02)01080-2
  63. Li B, Carey M, Workman JL. The role of chromatin during transcription. *Cell.* 2007;128(4):707–19. doi:10.1016/j.cell.2007.01.015
  64. Shanmugam MK, Arfuso F, Arumugam S, Chinnathambi A, Jinsong B, Warriar S, Wang LZ, Kumar AP, Ahn KS, Sethi G, Lakshmanan M. Role of novel histone

- modifications in cancer. *Oncotarget*. 2018;9(13):11414–26. doi:10.18632/oncotarget.23356
65. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*. 2011;21(3):381–95. doi:10.1038/cr.2011.22
  66. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*. 2008;358(11):1148–59. doi:10.1056/NEJMra072067
  67. Berger SL. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature*. 2007;447(7143):407–12. doi:10.1038/nature05915
  68. Thompson LL, Guppy BJ, Sawchuk L, Davie JR, McManus KJ. Regulation of chromatin structure via histone post-translational modification and the link to carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev*. 2013;32(3-4):363–76. doi:10.1007/s10555-013-9434-8
  69. Pradeepa MM. Causal role of histone acetylations in enhancer function. *Transcription*. 2017;8(1):40–7. doi:10.1080/21541264.2016.1253529
  70. Nandi D, Tahiliani P, Kumar A, Chandu D. The ubiquitin-proteasome system. *J Biosci*. 2006;31(1):137–55. doi:10.1007/bf02705243
  71. Pickart CM, Eddins MJ. Ubiquitin: Structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1695(1-3):55–72. doi:10.1016/j.bbamcr.2004.09.019
  72. Giles J. Chemistry Nobel for trio who revealed molecular death-tag. *Nature*. 2004;431(7010):729. doi:10.1038/431729a
  73. Hershko A, Ciechanover A, Rose IA. Identification of the active amino acid residue of the polypeptide of ATP-dependent protein breakdown. *Journal of Biological Chemistry*. 1981;256(4):1525–8.
  74. Hershko A, Ciechanover A, Heller H, Haas AL, Rose IA. Proposed role of ATP in protein breakdown: Conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980;77(4):1783–6. doi:10.1073/pnas.77.4.1783
  75. Wilkinson KD, Urban MK, Haas AL. Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 1980;255(16):7529–32.
  76. Goldstein G, Scheid M, Hammerling U, Schlesinger DH, Niall HD, Boyse EA. Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975;72(1):11–5. doi:10.1073/pnas.72.1.11
  77. Schlesinger DH, Goldstein G, Niall HD. The complete amino acid sequence of ubiquitin, an adenylate cyclase stimulating polypeptide probably universal in living cells. *Biochemistry*. 1975;14(10):2214–8. doi:10.1021/bi00681a026
  78. Ohtake F, Tsuchiya H. The emerging complexity of ubiquitin architecture. *J Biochem*. 2017;161(2):125–33. doi:10.1093/jb/mvw088
  79. Woelk T, Sigismund S, Penengo L, Polo S. The ubiquitination code: a signalling problem. *Cell Div*. 2007;211. doi:10.1186/1747-1028-2-11

80. Kulathu Y, Komander D. Atypical ubiquitylation - the unexplored world of polyubiquitin beyond Lys48 and Lys63 linkages. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(8):508–23. doi:10.1038/nrm3394
81. Vissers JH, Nicassio F, van Lohuizen M, Di Fiore PP, Citterio E. The many faces of ubiquitinated histone H2A: insights from the DUBs. *Cell Div.* 2008;38. doi:10.1186/1747-1028-3-8
82. McClurg UL, Robson CN. Deubiquitinating enzymes as oncotargets. *Oncotarget.* 2015;6(12):9657–68. doi:10.18632/oncotarget.3922
83. Nijman SMB, Luna-Vargas MPA, Velds A, Brummelkamp TR, Dirac AMG, Sixma TK, Bernards R. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell.* 2005;123(5):773–86. doi:10.1016/j.cell.2005.11.007
84. Leznicki P, Kulathu Y. Mechanisms of regulation and diversification of deubiquitylating enzyme function. *J Cell Sci.* 2017;130(12):1997–2006. doi:10.1242/jcs.201855
85. Hanpude P, Bhattacharya S, Dey AK, Maiti TK. Deubiquitinating enzymes in cellular signaling and disease regulation. *IUBMB Life.* 2015;67(7):544–55. doi:10.1002/iub.1402
86. Wei R, Liu X, Yu W, Yang T, Cai W, Liu J, Huang X, Xu G-t, Zhao S, Yang J, Liu S. Deubiquitinases in cancer. *Oncotarget.* 2015;6(15):12872–89. doi:10.18632/oncotarget.3671
87. Young M-J, Hsu K-C, Lin TE, Chang W-C, Hung J-J. The role of ubiquitin-specific peptidases in cancer progression. *J Biomed Sci.* 2019;26(1):42. doi:10.1186/s12929-019-0522-0
88. Scholz N, Kurian KM, Siebzehnrubl FA, Licchesi JDF. Targeting the Ubiquitin System in Glioblastoma. *Front Oncol.* 2020;10:574011. doi:10.3389/fonc.2020.574011
89. Das S, Ramakrishna S, Kim K-S. Critical Roles of Deubiquitinating Enzymes in the Nervous System and Neurodegenerative Disorders. *Mol Cells.* 2020;43(3):203–14. doi:10.14348/molcells.2020.2289
90. Sloper-Mould KE, Eyre HJ, Wang X-W, Sutherland GR, Baker RT. Characterization and Chromosomal Localization of USP3, a Novel Human Ubiquitin-specific Protease. *Journal of Biological Chemistry.* 1999;274(38):26878–84. doi:10.1074/jbc.274.38.26878
91. Fu S, Shao S, Wang L, Liu H, Hou H, Wang Y, Wang H, Huang X, Lv R. USP3 stabilizes p53 protein through its deubiquitinase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017. doi:10.1016/j.bbrc.2017.08.036
92. Cui J, Song Y, Li Y, Zhu Q, Tan P, Qin Y, Wang HY, Wang R-F. USP3 inhibits type I interferon signaling by deubiquitinating RIG-I-like receptors. *Cell Res.* 2014;24(4):400–16. doi:10.1038/cr.2013.170
93. Nicassio F, Corrado N, Vissers JHA, Areces LB, Bergink S, Marteiijn JA, Geverts B, Houtsmuller AB, Vermeulen W, Di Fiore PP, Citterio E. Human USP3 is a chromatin modifier required for S phase progression and genome stability. *Curr Biol.* 2007;17(22):1972–7. doi:10.1016/j.cub.2007.10.034

94. Lancini C, van den Berk PCM, Vissers JHA, Gargiulo G, Song J-Y, Hulsman D, Serresi M, Tanger E, Blom M, Vens C, van Lohuizen M, Jacobs H, Citterio E. Tight regulation of ubiquitin-mediated DNA damage response by USP3 preserves the functional integrity of hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. 2014;211(9):1759–77. doi:10.1084/jem.20131436
95. Fan L, Chen Z, Wu X, Cai X, Feng S, Lu J, Wang H, Liu N. Ubiquitin-Specific Protease 3 Promotes Glioblastoma Cell Invasion and Epithelial-Mesenchymal Transition via Stabilizing Snail. *Mol Cancer Res*. 2019;17(10):1975–84. doi:10.1158/1541-7786.MCR-19-0197
96. Fang C-L, Lin C-C, Chen H-K, Hseu Y-C, Hung S-T, Sun D-P, Uen Y-H, Lin K-Y. Ubiquitin-specific protease 3 overexpression promotes gastric carcinogenesis and is predictive of poor patient prognosis. *Cancer Sci*. 2018;109(11):3438–49. doi:10.1111/cas.13789
97. Wu X, Liu M, Zhu H, Wang J, Dai W, Li J, Zhu D, Tang W, Xiao Y, Lin J, Zhang W, Sun Y, Zhang Y, Chen Y, Li G, Li A, Xiang L, Liu S, Wang J. Ubiquitin-specific protease 3 promotes cell migration and invasion by interacting with and deubiquitinating SUZ12 in gastric cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;38(1):277. doi:10.1186/s13046-019-1270-4
98. Wu X, Wang H, Zhu D, Chai Y, Wang J, Dai W, Xiao Y, Tang W, Li J, Hong L, Pei M, Zhang J, Lin Z, Wang J, Li A, Liu S. USP3 promotes gastric cancer progression and metastasis by deubiquitination-dependent COL9A3/COL6A5 stabilisation. *Cell Death Dis*. 2022;13(1):209. doi:10.1038/s41419-021-04460-7
99. Liao X-H, Wang Y, Zhong B, Zhu S-Y. USP3 promotes proliferation of non-small cell lung cancer through regulating RBM4. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2020;24(6):3143–51. doi:10.26355/eurrev\_202003\_20681
100. Wu Y, Qin J, Li F, Yang C, Li Z, Zhou Z, Zhang H, Li Y, Wang X, Liu R, Tao Q, Chen W, Chen C. USP3 promotes breast cancer cell proliferation by deubiquitinating KLF5. *Journal of Biological Chemistry*. 2019;294(47):17837–47. doi:10.1074/jbc.RA119.009102
101. Shi K, Zhang JZ, Yang L, Li N-N, Yue Y, Du X-H, Zhang X-Z, Lu YC, Guo D. Protein deubiquitylase USP3 stabilizes Aurora A to promote proliferation and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2021;21(1):213. doi:10.1186/s12885-021-08934-x
102. Li B, Jin M, Cao F, Li J, Wu J, Xu L, Liu X, Shi Y, Chen W. Hsa\_circ\_0017639 expression promotes gastric cancer proliferation and metastasis by sponging miR-224-5p and upregulating USP3. *Gene*. 2020;750:144753. doi:10.1016/j.gene.2020.144753
103. Liang R-P, Zhang X-X, Zhao J, Zhu R-T, Wang W-J, Lu Q-W, Sun Y-L. Ubiquitin-specific protease 3 facilitates cell proliferation by deubiquitinating pyruvate kinase L/R in gallbladder cancer. *Laboratory Investigation*. 2022;102(12):1367–76. doi:10.1038/s41374-022-00836-1
104. Alkhizzi B, Khan M, Al-Ghafari A, Choudhry H. Upregulation of circular and linear METTL3 and USP3 in colorectal cancer. *Oncol Lett*. 2021;22(3):1467. doi:10.3892/ol.2021.12936

105. Das S, Chandrasekaran AP, Suresh B, Haq S, Kang J-H, Lee S-J, Kim J, Kim J, Lee S, Kim HH, Kim K-S, Ramakrishna S. Genome-scale screening of deubiquitinase subfamily identifies USP3 as a stabilizer of Cdc25A regulating cell cycle in cancer. *Cell Death Differ.* 2020;27(11):3004–20. doi:10.1038/s41418-020-0557-5
106. Jin G, Zhang J, Cao T, Chen B, Tian Y, Shi Y. Exosome-mediated lncRNA SND1-IT1 from gastric cancer cells enhances malignant transformation of gastric mucosa cells via up-regulating SNAIL1. *J Transl Med.* 2022;20(1):101042831771462. doi:10.1186/s12967-022-03306-w
107. Nagy Z, Seneviratne JA, Kanikevich M, Chang W, Mayoh C, Venkat P, Du Y, Jiang C, Salib A, Koach J, Carter DR, Mitra R, Liu T, Parker MW, Cheung BB, Marshall GM. An ALYREF-MYCN coactivator complex drives neuroblastoma tumorigenesis through effects on USP3 and MYCN stability. *Nat Commun.* 2021;12(1):150. doi:10.1038/s41467-021-22143-x
108. Karapurkar JK, Kim M-S, Colaco JC, Suresh B, Sarodaya N, Kim D-H, Park C-H, Hong S-H, Kim K-S, Ramakrishna S. CRISPR/Cas9-based genome-wide screening of the deubiquitinase subfamily identifies USP3 as a protein stabilizer of REST blocking neuronal differentiation and promotes neuroblastoma tumorigenesis. *J Exp Clin Cancer Res.* 2023;42(1):258. doi:10.1186/s13046-023-02694-1
109. Sharma N, Zhu Q, Wani G, He J, Wang Q-e, Wani AA. USP3 counteracts RNF168 via deubiquitinating H2A and gammaH2AX at lysine 13 and 15. *Cell Cycle.* 2014;13(1):106–14. doi:10.4161/cc.26814
110. Friedberg EC, Walker GC, Siede W, Wood RD, Schultz, R. A., Ellenberger, T. DNA Repair and Mutagenesis. 2nd ed. Washington: ASM Press; 2006, pp.1-106.
111. Chatterjee N, Walker GC. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen.* 2017;58(5):235–63. doi:10.1002/em.22087
112. Groelly FJ, Fawkes M, Dagg RA, Blackford AN, Tarsounas M. Targeting DNA damage response pathways in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2023;23(2):78–94. doi:10.1038/s41568-022-00535-5
113. Wang AT, McHugh PJ, Hartley JA. Repair of DNA Interstrand Cross-links Produced by Cancer Chemotherapeutic Drugs. In: Panasci L, Aloyz R, Alaoui-Jamali M, editors. *Advances in DNA Repair in Cancer Therapy.* New York, NY: Springer; 2013. p. 1–23.
114. Stratenwerth B, Geisen SM, He Y, Beltzig L, Sturla SJ, Kaina B. Molecular Dosimetry of Temozolomide: Quantification of Critical Lesions, Correlation to Cell Death Responses, and Threshold Doses. *Mol Cancer Ther.* 2021;20(10):1789–99. doi:10.1158/1535-7163.MCT-21-0228
115. Costelloe T, Fitzgerald J, Murphy NJ, Flaus A, Lowndes NF. Chromatin modulation and the DNA damage response. *Exp Cell Res.* 2006;312(14):2677–86. doi:10.1016/j.yexcr.2006.06.031
116. Huang X, Darzynkiewicz Z. Cytometric Assessment of Histone H2AX Phosphorylation. In: Henderson DS, editor. *DNA Repair Protocols, Mammalian Systems.* Totowa, NJ: Humana Press Inc; 2006. p. 73–80. (Methods in Molecular Biology).

117. Lukas J, Lukas C, Bartek J. More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. *Nat Cell Biol.* 2011;13(10):1161–9. doi:10.1038/ncb2344
118. Smeenk G, Mailand N. Writers, Readers, and Erasers of Histone Ubiquitylation in DNA Double-Strand Break Repair. *Front Genet.* 2016;7:122. doi:10.3389/fgene.2016.00122
119. Bergink S, Jentsch S. Principles of ubiquitin and SUMO modifications in DNA repair. *Nature.* 2009;458(7237):461–7. doi:10.1038/nature07963
120. Messick TE, Greenberg RA. The ubiquitin landscape at DNA double-strand breaks. *J Cell Biol.* 2009;187(3):319–26. doi:10.1083/jcb.200908074
121. Brown JS, Jackson SP. Ubiquitylation, neddylation and the DNA damage response. *Open Biol.* 2015;5(4):150018. doi:10.1098/rsob.150018
122. Ginjala V, Nacerddine K, Kulkarni A, Oza J, Hill SJ, Yao M, Citterio E, van Lohuizen M, Ganesan S. BMI1 is recruited to DNA breaks and contributes to DNA damage-induced H2A ubiquitination and repair. *Mol Cell Biol.* 2011;31(10):1972–82. doi:10.1128/MCB.00981-10
123. Wang H, Wang L, Erdjument-Bromage H, Vidal M, Tempst P, Jones RS, Zhang Y. Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature.* 2004;431(7010):873–8. doi:10.1038/nature02985
124. Tamburri S, Lavarone E, Fernández-Pérez D, Conway E, Zanotti M, Manganaro D, Pasini D. Histone H2AK119 Mono-Ubiquitination Is Essential for Polycomb-Mediated Transcriptional Repression. *Mol Cell.* 2020;77(4):840-856.e5. doi:10.1016/j.molcel.2019.11.021
125. Barbour H, Daou S, Hendzel M, Affar EB. Polycomb group-mediated histone H2A monoubiquitination in epigenome regulation and nuclear processes. *Nat Commun.* 2020;11(1):5947. doi:10.1038/s41467-020-19722-9
126. SIB Swiss Institute of Bioinformatics. Cellosaurus cell line U-251MG (CVCL\_0021) [Internet]. 2012 [updated 2023 Jun 29; cited 2023 Jul 16], vers. 43. Available from: [http://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL\\_0021](http://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_0021)
127. SIB Swiss Institute of Bioinformatics. Cellosaurus cell line LN-18 (CVCL\_0392) [Internet]. 2012 [updated 2023 Jun 29; cited 2023 Jul 16], vers. 35. Available from: [https://www.cellosaurus.org/CVCL\\_0392](https://www.cellosaurus.org/CVCL_0392)
128. Gstraunthaler G, Lindl T. Bestimmung allgemeiner Wachstumsparameter. In: Gstraunthaler G, Lindl T, editors. *Zell- und Gewebekultur, Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen.* Berlin, Heidelberg: Springer; 2021. p. 155–72.
129. Darling JL. In Vitro Culture of Malignant Brain Tumors. In: Pfragner R, Freshney RI, editors. *Culture of human tumor cells.* Hoboken, NJ: Wiley-Interscience; 2004. p. 349–72. (Culture of specialized cells).
130. Gstraunthaler G, Lindl T. Spezielle zellbiologische Methoden in der Zellkultur. In: Gstraunthaler G, Lindl T, editors. *Zell- und Gewebekultur, Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen.* Berlin, Heidelberg: Springer; 2021. p. 251–302.
131. Recillas-Targa F. Multiple strategies for gene transfer, expression, knockdown, and chromatin influence in mammalian cell lines and transgenic animals. *Mol Biotechnol.* 2006;34(3):337–54. doi:10.1385/MB:34:3:337

132. Iwakawa H-O, Tomari Y. Life of RISC: Formation, action, and degradation of RNA-induced silencing complex. *Mol Cell*. 2022;82(1):30–43. doi:10.1016/j.molcel.2021.11.026
133. Lenz G. The RNA interference revolution. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38(12):1749–57. doi:10.1590/s0100-879x2005001200003
134. Heidel J, Mishra S, Davis ME. Molecular Conjugates. In: Schaffer DV, Zhou W, editors. *Gene Therapy and Gene Delivery Systems*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2005. p. 7–39.
135. Romar GA, Kupper TS, Divito SJ. Research Techniques Made Simple: Techniques to Assess Cell Proliferation. *J Invest Dermatol*. 2016;136(1):e1-e7. doi:10.1016/j.jid.2015.11.020
136. Cavanagh BL, Walker T, Norazit A, Meedeniya ACB. Thymidine analogues for tracking DNA synthesis. *Molecules*. 2011;16(9):7980–93. doi:10.3390/molecules16097980
137. Linke RP. Immunological Techniques. In: Lottspeich F, Engels JW, editors. *Bioanalytics, Analytical methods and concepts in biochemistry and molecular biology*. Weinheim: Wiley VCH; 2018. p. 63–106.
138. Mäntele W. Spectroscopy. In: Lottspeich F, Engels JW, editors. *Bioanalytics, Analytical methods and concepts in biochemistry and molecular biology*. Weinheim: Wiley VCH; 2018. p. 131–80.
139. Thornberry NA. Caspases: Key mediators of apoptosis. *Chem Biol*. 1998;5(5):R97-103.
140. Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. Caspases - an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2008;151(1):10–27. doi:10.1016/j.cbpb.2008.05.010
141. Cai SX, Zhang HZ, Guastella J, Drewe J, Yang W, Weber E. Design and synthesis of rhodamine 110 derivative and caspase-3 substrate for enzyme and cell-based fluorescent assay. *Bioorg Med Chem Lett*. 2001;11(1):39–42.
142. Kaufmann SH, Lee S-H, Meng XW, Loegering DA, Kottke TJ, Henzing AJ, Ruchaud S, Samejima K, Earnshaw WC. Apoptosis-associated caspase activation assays. *Methods*. 2008;44(3):262–72. doi:10.1016/j.ymeth.2007.11.005
143. Blumenthal RD, Goldenberg DM. Methods and goals for the use of in vitro and in vivo chemosensitivity testing. *Mol Biotechnol*. 2007;35(2):185–97. doi:10.1007/BF02686104
144. Nakayama GR, Caton MC, Nova MP, Parandoosh Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *J Immunol Methods*. 1997;204(2):205–8. doi:10.1016/s0022-1759(97)00043-4
145. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*. 2000;267(17):5421–6. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x
146. Newton HB. Clinical Pharmacology of Brain Tumor Chemotherapy. In: Newton HB, editor. *Handbook of brain tumor chemotherapy*. Amsterdam, Boston: Elsevier/Academic; 2006. p. 21–43.

147. Kaina B, Christmann M, Naumann S, Roos WP. MGMT: Key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair (Amst)*. 2007;6(8):1079–99. doi:10.1016/j.dnarep.2007.03.008
148. Nikolova T, Roos WP, Krämer OH, Strik HM, Kaina B. Chloroethylating nitrosoureas in cancer therapy: DNA damage, repair and cell death signaling. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2017;1868(1):29–39. doi:10.1016/j.bbcan.2017.01.004
149. Jurk M. Isolation and Purification of Nucleic Acids. In: Lottspeich F, Engels JW, editors. *Bioanalytics, Analytical methods and concepts in biochemistry and molecular biology*. Weinheim: Wiley VCH; 2018. p. 665–80.
150. Bustin SA, Nolan T. Analysis of mRNA Expression by Real-time PCR. In: Saunders NA, Lee MA, editors. *Real-time PCR, Advanced technologies and applications*. Norfolk: Caister Academic Press; 2013. p. 51–88.
151. Schönbrunner N, Engels J, Kessler C. Polymerase Chain Reaction. In: Lottspeich F, Engels JW, editors. *Bioanalytics, Analytical methods and concepts in biochemistry and molecular biology*. Weinheim: Wiley VCH; 2018. p. 755–83.
152. Chen F, Dong M, Ge M, Zhu L, Ren L, Liu G, Mu R. The history and advances of reversible terminators used in new generations of sequencing technology. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2013;11(1):34–40. doi:10.1016/j.gpb.2013.01.003
153. Myllykangas S, Buenrostro J, Ji HP. Overview of Sequencing Technology Platforms. In: Rodríguez-Ezpeleta N, Hackenberg M, Aransay AM, editors. *Bioinformatics for High Throughput Sequencing*. New York, NY: Springer Science+Business Media LLC; 2012. p. 11–26.
154. Zimmermann J, Blake J. DNA Sequencing. In: Lottspeich F, Engels JW, editors. *Bioanalytics, Analytical methods and concepts in biochemistry and molecular biology*. Weinheim: Wiley VCH; 2018. p. 785–815.
155. Govaert E, van Steendam K, Scheerlinck E, Vossaert L, Meert P, Stella M, Willems S, Clerck L de, Dhaenens M, Deforce D. Extracting histones for the specific purpose of label-free MS. *Proteomics*. 2016;16(23):2937–44. doi:10.1002/pmic.201600341
156. Shechter D, Dormann HL, Allis CD, Hake SB. Extraction, purification and analysis of histones. *Nat Protoc*. 2007;2(6):1445–57. doi:10.1038/nprot.2007.202
157. Fischer L, Stressler T. Protein determination. In: Lottspeich F, Engels JW, editors. *Bioanalytics, Analytical methods and concepts in biochemistry and molecular biology*. Weinheim: Wiley VCH; 2018. p. 23–33.
158. Walsh G. *Proteins: Biochemistry and biotechnology*. 2nd ed. Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons Inc; 2014, pp. 91–140.
159. Westermeier R, Görg A. Electrophoretic Techniques. In: Lottspeich F, Engels JW, editors. *Bioanalytics, Analytical methods and concepts in biochemistry and molecular biology*. Weinheim: Wiley VCH; 2018. p. 243–74.
160. Cartun RW, Taylor CR, Dabbs DJ. Techniques of Immunohistochemistry: Principles, Pitfalls and Standardization. In: Dabbs DJ, editor. *Diagnostic Immunohistochemistry, Theranostic and Genomic Applications*. Philadelphia: Elsevier; 2021. p. 1–46.

161. Lorenz DJ, Gill RS, Mitra R, Datta S. Using RNA-seq Data to Detect Differentially Expressed Genes. In: Datta S, Nettleton D, editors. *Statistical Analysis of Next Generation Sequencing Data*. Cham: Springer; 2014. p. 25–49. (Frontiers in Probability and the Statistical Sciences).
162. Young MD, McCarthy DJ, Wakefield MJ, Smyth GK, Oshlack A, Robinson MD. Differential Expression for RNA Sequencing (RNA-Seq) Data: Mapping, Summarization, Statistical Analysis, and Experimental Design. In: Rodríguez-Ezpeleta N, Hackenberg M, Aransay AM, editors. *Bioinformatics for High Throughput Sequencing*. New York, NY: Springer Science+Business Media LLC; 2012. p. 169–90.
163. Pevsner J. *Bioinformatics and functional genomics*. 3rd ed. Chichester: Wiley Blackwell; 2015, pp.479-539.
164. Vidal R, Ma Y, Sastry SS. *Generalized Principal Component Analysis*. New York, NY: Springer New York; 2016. (vol. 40), pp.25-62.
165. Conesa A, Madrigal P, Tarazona S, Gomez-Cabrero D, Cervera A, McPherson A, Szczesniak MW, Gaffney DJ, Elo LL, Zhang X, Mortazavi A. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biol.* 2016;1713. doi:10.1186/s13059-016-0881-8
166. Tu Y, Chen Z, Zhao P, Sun G, Bao Z, Chao H, Fan L, Li C, You Y, Qu Y, Chen Y, Ji J. Smoothed Promotes Glioblastoma Radiation Resistance Via Activating USP3-Mediated Claspin Deubiquitination. *Clin Cancer Res.* 2020;26(7):1749–62. doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-1515
167. Mur P, Rodríguez de Lope Á, Díaz-Crespo FJ, Hernández-Iglesias T, Ribalta T, Fiaño C, García JF, Rey JA, Mollejo M, Meléndez B. Impact on prognosis of the regional distribution of MGMT methylation with respect to the CpG island methylator phenotype and age in glioma patients. *J Neurooncol.* 2015;122(3):441–50. doi:10.1007/s11060-015-1738-9
168. Zhang Y. Transcriptional regulation by histone ubiquitination and deubiquitination. *Genes Dev.* 2003;17(22):2733–40. doi:10.1101/gad.1156403
169. Nakagawa T, Kajitani T, Togo S, Masuko N, Ohdan H, Hishikawa Y, Koji T, Matsuyama T, Ikura T, Muramatsu M, Ito T. Deubiquitylation of histone H2A activates transcriptional initiation via trans-histone cross-talk with H3K4 di- and trimethylation. *Genes Dev.* 2008;22(1):37–49. doi:10.1101/gad.1609708
170. Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Jones RS, Zhang Y. Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science.* 2002;298(5595):1039–43. doi:10.1126/science.1076997
171. Napoles M de, Mermoud JE, Wakao R, Tang YA, Endoh M, Appanah R, Nesterova TB, Silva J, Otte AP, Vidal M, Koseki H, Brockdorff N. Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. *Dev Cell.* 2004;7(5):663–76. doi:10.1016/j.devcel.2004.10.005
172. Smolle M, Workman JL. Transcription-associated histone modifications and cryptic transcription. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms.* 2013;1829(1):84–97. doi:10.1016/j.bbagr.2012.08.008

173. Tanaka T, Halicka HD, Huang X, Traganos F, Darzynkiewicz Z. Constitutive histone H2AX phosphorylation and ATM activation, the reporters of DNA damage by endogenous oxidants. *Cell Cycle*. 2006;5(17):1940–5. doi:10.4161/cc.5.17.3191
174. Zhao H, Traganos F, Albino AP, Darzynkiewicz Z. Oxidative stress induces cell cycle-dependent Mre11 recruitment, ATM and Chk2 activation and histone H2AX phosphorylation. *Cell Cycle*. 2008;7(10):1490–5. doi:10.4161/cc.7.10.5963
175. Kumar N, Raja S, van Houten B. The involvement of nucleotide excision repair proteins in the removal of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(20):11227–43. doi:10.1093/nar/gkaa777
176. Luczak MW, Zhitkovich A. Monoubiquitinated  $\gamma$ -H2AX: Abundant product and specific biomarker for non-apoptotic DNA double-strand breaks. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2018;355:238–46. doi:10.1016/j.taap.2018.07.007
177. Mosbech A, Lukas C, Bekker-Jensen S, Mailand N. The deubiquitylating enzyme USP44 counteracts the DNA double-strand break response mediated by the RNF8 and RNF168 ubiquitin ligases. *J Biol Chem*. 2013;288(23):16579–87. doi:10.1074/jbc.M113.459917
178. CST - Ubiquityl-Histone H2A (Lys119) (D27C4) XP® Rabbit mAb [Internet] [cited 2022 Jun 12]. Available from: <https://www.cellsignal.de/products/primary-antibodies/ubiquityl-histone-h2a-lys119-d27c4-xp-rabbit-mab/8240>
179. Wouters BG, Chiu RK. Evaluating the Importance of Apoptosis and Other Determinants of Cell Death and Survival. In: Gewirtz DA, Grant S, Holt SE, editors. *Apoptosis, Senescence, and Cancer*. Totowa, NJ: Humana Press Inc; 2007. p. 55–72. (Cancer Drug Discovery and Development).
180. Zhou Q, Xiao Z, Zhou R, Zhou Y, Fu P, Li X, Wu Y, Wu H, Qian Q. Ubiquitin-specific protease 3 targets TRAF6 for deubiquitination and suppresses IL-1 $\beta$  induced chondrocyte apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019;514(2):482–9. doi:10.1016/j.bbrc.2019.04.163
181. Williams MJ, Singleton WGB, Lowis SP, Malik K, Kurian KM. Therapeutic Targeting of Histone Modifications in Adult and Pediatric High-Grade Glioma. *Front Oncol*. 2017;7:45. doi:10.3389/fonc.2017.00045
182. Schmidt F, Kunze M, Looock A-C, Dobbelstein M. Screening analysis of ubiquitin ligases reveals G2E3 as a potential target for chemosensitizing cancer cells. *Oncotarget*. 2015;6(2):617–32. doi:10.18632/oncotarget.2710
183. Zhang J, Luo N, Tian Y, Li J, Yang X, Yin H, Xiao C, Sheng J, Li Y, Tang B, Li R. USP22 knockdown enhanced chemosensitivity of hepatocellular carcinoma cells to 5-Fu by up-regulation of Smad4 and suppression of Akt. *Oncotarget*. 2017;8(15):24728–40. doi:10.18632/oncotarget.15798
184. Zheng Z, Wu M, Li H, Xu W, Yang M, Pan K, Ni Y, Jiang T, Zheng H, Jin X, Zhang Y, Ding L, Fu J. Downregulation of AC092894.1 promotes oxaliplatin resistance in colorectal cancer via the USP3/AR/RASGRP3 axis. *BMC Med*. 2023;21(1):209. doi:10.1186/s12916-023-02826-6
185. Dent P, Curiel DT, Fisher PB. Resistance/Signaling Pathways. In: Gewirtz DA, Grant S, Holt SE, editors. *Apoptosis, Senescence, and Cancer*. Totowa, NJ: Humana Press Inc; 2007. p. 281–98. (Cancer Drug Discovery and Development).

186. Citterio E. Fine-tuning the ubiquitin code at DNA double-strand breaks: deubiquitinating enzymes at work. *Front Genet.* 2015;6282. doi:10.3389/fgene.2015.00282
187. Nishi R, Wijnhoven P, Le Sage C, Tjeertes J, Galanty Y, Forment JV, Clague MJ, Urbé S, Jackson SP. Systematic characterization of deubiquitylating enzymes for roles in maintaining genome integrity. *Nat Cell Biol.* 2014;16(10):1016-26, 1-8. doi:10.1038/ncb3028
188. Bekker-Jensen S, Lukas C, Kitagawa R, Melander F, Kastan MB, Bartek J, Lukas J. Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. *J Cell Biol.* 2006;173(2):195–206. doi:10.1083/jcb.200510130
189. Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, Evangelista C, Kim IF, Tomashevsky M, Marshall KA, Phillippy KH, Sherman PM, Holko M, Yefanov A, Lee H, Zhang N, Robertson CL, Serova N, Davis S, Soboleva A. NCBI GEO: Archive for functional genomics data sets—update. *Nucleic Acids Res.* 2012;41(D1):D991-D995. doi:10.1093/nar/gks1193
190. Lancini C, Gargiulo G, van den Berk PCM, Citterio E. Quantitative analysis by next generation sequencing of hematopoietic stem and progenitor cells (LSK) and of splenic B cells transcriptomes from wild-type and *Usp3*-knockout mice. *Data Brief.* 2016;6556–61. doi:10.1016/j.dib.2015.12.049
191. Citterio E, Lancini C, Gargiulo G, van den Berk PCM, de Rink I. Quantitative Analysis by Next Generation Sequencing of LSK (Lin- Sca1+ cKit+) hematopoietic progenitors and splenic B cells (naive and in vitro LPS activated) transcriptomes from Wild Type and *Usp3*<sup>-/-</sup> mice: Accession GSE58495 [Internet]: NCBI Gene Expression Omnibus. 2014 [updated 2019 May 15; cited 2023 Jul 28]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE58495>

## 7 Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>USP3</i> -Expression in klassischen Gliomzelllinien.....	50
Abbildung 2: IHC-Färbung von <i>USP3</i> in Normalhirngewebe und Tumorschnitten .....	51
Abbildung 3: IHC: Punktwertung nach Lokalisation der Färbung .....	53
Abbildung 4: IHC: Wertung nach Intensität der Kernfärbung.....	54
Abbildung 5: <i>USP3</i> -Überexpression und -Knockdown in U251 auf Proteinebene.....	55
Abbildung 6: Relative RNA- und Proteinmengen nach Transfektion .....	56
Abbildung 7: Übersichtsschema der Western Blots mit Protein- und Histonextrakten.....	57
Abbildung 8: Ubiquitinierung von H2A nach siRNA- oder Plasmid-DNA-Transfektion..	58
Abbildung 9: PCAs der Expressionsdaten der RNA-NGS.....	59
Abbildung 10: Proliferation transfizierter Zellen im BrdU-Assay .....	61
Abbildung 11: Apoptose-Aktivität im Caspase-Assay .....	62
Abbildung 12: EC-50-Kurven nach <i>USP3</i> -Regulation und Lomustinbehandlung .....	63
Abbildung 13: Ergebnisse des Chemosensitivitäts-Assays mit Lomustin .....	64
Abbildung 14: Western Blots nach <i>USP3</i> -Knockdown und Lomustinbehandlung .....	65
Abbildung 15: H2Aub in siRNA-transfizierten Zellen nach Lomustinbehandlung .....	66
Abbildung 16: $\gamma$ H2AX bei siRNA-transfizierten Zellen nach Lomustinbehandlung.....	67

### 7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zelllinien.....	28
Tabelle 2: Plasmid-DNA .....	29
Tabelle 3: PCR-Primer.....	29
Tabelle 4: siRNAs .....	29
Tabelle 5: Primäre Antikörper.....	30
Tabelle 6: Sekundäre Antikörper .....	30
Tabelle 7: Chemikalien.....	31
Tabelle 8: Protokolle verwendeter Pufferlösungen.....	32
Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien .....	33
Tabelle 10: kommerzielle Reagenzien Sätze (Kits).....	34
Tabelle 11: Laborausstattung .....	35
Tabelle 12: Software .....	36

## Anhang

Tabelle 13: PCR-Schema.....	42
Tabelle 14: Antikörper Western Blot.....	46
Tabelle 15: Kriterien der Punktwertung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte .....	48

### 7.3 Danksagung

Mein großer Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Markus J. Riemenschneider für die Ermöglichung dieses Dissertationsprojekts. Ich bedanke mich für die Überlassung des interessanten Forschungsthemas sowie für die Chance in der Abteilung für Neuropathologie des Universitätsklinikums Regensburg zu promovieren. Seine zuverlässige Fachexpertise hat diese Arbeit von Beginn der Projektskizzierung bis hin zur abschließenden Korrektur des Manuskripts begleitet und mitgetragen.

Herrn Prof. Dr. Eugen Kerkhoff danke ich für die Bereitschaft, diese Arbeit als Zweitbegutachter zu prüfen.

Ganz herzlich möchte ich meiner wissenschaftlichen Betreuerin und Mentorin Dr. Julia Lorenz danken, die mich auf dem manchmal beschwerlichen Weg durch sämtliche Höhen und Tiefen stets fachlich wie menschlich mit Geduld und Verständnis begleitet hat. Ich bedanke mich sowohl für die Einführung in die theoretischen Aspekte des wissenschaftlichen Arbeitens als auch für die praktische Einarbeitung in die experimentellen Labortätigkeiten. Durch kollegiale Gespräche, ihre kritischen Fragen und ihre optimistische, bestärkende Art wurde nach und nach diese Dissertation geformt und geschliffen. Nicht zuletzt danke ich ihr für den für mich prägenden gemeinsamen Wegabschnitt und den warmen und freundschaftlichen Austausch auch nach meiner Zeit in Regensburg, als sie stets ein offenes Ohr und Mailpostfach für mich hatte.

Ich bedanke mich beim gesamten Team der Abteilung für Neuropathologie, besonders bei Dr. Tanja Rothhammer-Hampl, Dr. Markus Schulze und Dr. Sabine Hoja für die fachlichen Hilfestellungen und die herzliche Aufnahme. Maria Hirblinger, Susanne Brüggemann und Anja Sabo danke ich für ihre exzellente und sorgfältige technische Unterstützung im Laboralltag sowie Gabriele Sommer und Gerlinde Hiltl für ihre Hilfsbereitschaft in sämtlichen organisatorischen Belangen.

Außerdem danke ich dem Kompetenzzentrum für Fluoreszenz Bioanalytik (KFB) mit allen Mitarbeitern für die Durchführung der Hochdurchsatzsequenzierungen.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich stets bedingungslos auf meinem bisherigen Lebensweg unterstützt hat. Besonders danke ich meiner Mutter Brigitte, die mich als Vorbild und mit Zutrauen begleitet hat und meinem Bruder Philipp für seine unerschütterliche und ansteckende Gelassenheit.

Ebenso möchte ich meiner Kollegin und Freundin Steffi, meiner Weggefährtin und Leidensgenossin auf dem Weg zur Promotion Miri sowie meiner treuen Freundin Ria für all die aufmunternden Gespräche, geteilten Erinnerungen und zukünftigen Momente in unseren Freundschaften danken.

Von Herzen danke ich meinem Partner Thomas, der mich wie kein anderer versteht, unterstützt und ergänzt und mich mit unvergleichlicher Geduld und Ruhe die letzten Jahre begleitet hat.

