

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Zentrum der Neurologie und Neurochirurgie
Klinik für Neurochirurgie
Direktor: Prof. Dr. Marcus Czabanka

**Modulation von Stammzellcharakteristika in Gliom-initiierenden
Zellen durch GANT61 oder Arsentrioxid und (-)-Gossypol**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Andrej Wehle

aus Erfurt

Frankfurt am Main, 2023



Dieses Werk ist lizenziert unter einer Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Zentrum der Neurologie und Neurochirurgie
Klinik für Neurochirurgie
Direktor: Prof. Dr. Marcus Czabanka

**Modulation von Stammzellcharakteristika in Gliom-initiierenden
Zellen durch GANT61 oder Arsentrioxid und (-)-Gossypol**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Andrej Wehle

aus Erfurt

Frankfurt am Main, 2023

Dekan:	Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referent:	Prof. Dr. Donat Kögel
Korreferent:	Prof. Dr. Joachim Steinbach
Tag der mündlichen Prüfung:	09.06.2023

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	- 6 -
1.1 Glioblastom	- 6 -
1.2 Gliom-initiiierende Zellen	- 7 -
1.2.1 Glio- und Gliomgenese	- 9 -
1.2.2 Definition und funktionelle Charakteristika von Gliom-initiiierenden Zellen.....	- 13 -
1.2.3 Klinische Relevanz und zielgerichtete Therapie	- 16 -
1.3 Signalwege tumorpropagierender Zellen	- 18 -
1.3.1 Notch	- 18 -
1.3.2 Hedgehog	- 20 -
1.3.3 „ <i>Bone morphogenetic proteins</i> “	- 23 -
1.4 Relevante Zelltodmechanismen	- 26 -
1.4.1 Autophagie.....	- 27 -
1.5 Relevante niedermolekulare Verbindungen	- 31 -
1.5.1 GANT61	- 31 -
1.5.2 Arsentrioxid.....	- 32 -
1.5.3 (-)-Gossypol	- 34 -
1.6 Ziel der Dissertation	- 35 -
2. Material und Methoden.....	- 39 -
2.1 Material	- 39 -
2.1.1 Zellen und Kulturmedium	- 39 -
2.1.2 Chemikalien, Puffer und Lösungen.....	- 40 -
2.1.3 Kommerzielle Kits	- 43 -
2.1.4 Antikörper und Primer	- 44 -
2.1.5 Plasmide	- 46 -
2.1.6 Technische Ausstattung.....	- 46 -
2.1.7 Software.....	- 48 -
2.4 Zellbiologische Methoden	- 49 -
2.4.1 Zellkultur	- 49 -
2.4.2 MTT-Test	- 51 -
2.4.3 Analyse der Sphärenbildung.....	- 51 -
2.4.4 Analyse der Migrationskapazität.....	- 52 -
2.4.5 <i>Limiting Dilution Assay</i>	- 53 -
2.4.6 Organotypische Gewebekultur.....	- 54 -

2.5 Immunchemische Methoden	- 55 -
2.5.1 Proteinanalyse durch Western Blot.....	- 55 -
2.5.2 Immunfluoreszenz und Epifluoreszenzmikroskopie	- 57 -
2.5.3 Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie	- 58 -
2.6 Molekularbiologische Methoden.....	- 59 -
2.6.1 Quantitative Echtzeit-PCR	- 59 -
2.6.2 Lentivirale Transduktion.....	- 60 -
3. Ergebnisse	- 63 -
3.1 Steigerung antitumoraler Effekte von GANT61 und ATO durch Kombination mit Gossypol	- 63 -
3.1.1 Hh-/ Notch-Inhibition induziert Zelltod und reduziert Proliferation <i>in -vitro</i> und <i>ex -vivo</i>	- 63 -
3.1.2 Evaluation des Synergismus von ATO/ GANT61 und Gossypol ...	- 72 -
3.2 Limitierung stammzellassoziierter Eigenschaften durch Hh-/ Notch- Inhibition.....	- 74 -
3.2.1 Stammzelldepletion durch Inhibition des Hh- und Notch- Signalwegs	- 74 -
3.2.2 Reduktion der Expression relevanter Markerproteine	- 78 -
3.2.3 Hemmung der Migrationskapazität	- 85 -
3.2.4 Arsentrioxid und (-)-Gossypol steigern die Vulnerabilität von GSC gegen ionisierende Strahlung	- 91 -
3.2.5 CHRDL1-vermittelte Reduktion stammzelltypischer Markerproteine.....	- 98 -
4. Diskussion	- 100 -
4.1 Überlegenheit antitumoraler Effekte durch simultane Beeinträchtigung von Hh- und Notch-Signaling	- 100 -
4.1.1 Evaluation der Modulation von Stammzeleigenschaften und das Modell der Tumorstammzelle.....	- 103 -
4.2 Beurteilung des Synergismus zwischen (-)-Gossypol und Arsentrioxid	- 109 -
4.3 ATO/AT-101-vermittelte Radiosensitivierung durch Regulation von Checkpoint-Kinasen	- 113 -
4.4 CHRDL1 als zentraler Regulator eines Stammzellzustandes – ein Ausblick.....	- 116 -
4.5 Limitationen.....	- 120 -
5. Zusammenfassung	- 122 -
5.1 Summary.....	- 124 -
6. Literaturverzeichnis	- 126 -
7. Appendix	- 138 -

7.1 Liste der Abkürzungen	- 138 -
7.2 Abbildungsverzeichnis	- 143 -
7.3 Tabellenverzeichnis	- 145 -
Schriftliche Erklärung	- 146 -
Danksagung	- 147 -

1. Einleitung

1.1 Glioblastom

Als häufigste Manifestation primär maligner Hirntumore des Erwachsenen sind Gliome trotz relativer Seltenheit mit einer Inzidenz von 4,67 – 5,73 /100 000 Personen aufgrund ihrer hohen Mortalitätsraten von bedeutender klinischer Relevanz.¹ Die aktuelle Einteilung der Gliome erfolgt nach Weltgesundheitsorganisation (WHO) auf Basis kombinierter phänotypischer und genotypischer Klassifikation im Sinne „integrierter Diagnosen“.² Innerhalb dieser heterogenen Gruppe von Entitäten ist das Glioblastom (GB) (WHO Grad IV, ICD-O-3 9440–9442) von besonderer Bedeutung. Dies ergibt sich aus einem relativen Anteil des GB an allen primär malignen Hirntumoren von 45,6 %, sowie der verbundenen infausten Prognose mit einer Fünfjahresüberlebensrate aller Altersgruppen von 5 % und einem medianen Überleben von 15 Monaten unter Therapie.³ Die Präsentation von Symptomen ist vielgestaltig und umfasst Kopfschmerz, Persönlichkeitsänderung, dementielle Entwicklung, Gleichgewichts- und Gangstörungen, Inkontinenz, sowie zahlreiche fokale-neurologische Defizite wie Hemiparesen/ -hypästhesien, Gesichtsfeldausfälle oder epileptische Anfälle.⁴ Eine Definition eindeutiger patientenbezogener Risikofaktoren erweist sich schwierig. Hierzu zählen das männliche Geschlecht, sowie seltene hereditäre Tumorsyndrome wie die Neurofibromatose Typ 1 und 2, sowie das Turcot-, Cowden- oder Li–Fraumeni-Syndrom.⁵ Einziger gesicherter exogener Risikofaktor ist eine stattgehabte Exposition mit ionisierender Strahlung.⁴

Die etablierte Therapie des GB umfasst eine maximal mögliche chirurgische Resektion unter Schonung eloquenter Hirnstrukturen, sowie Radio- und Chemotherapie mit Temozolomid, abhängig von Alter und O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase-(MGMT)-Status.⁶⁻⁸ Seit Publikation der randomisierten, multizentrischen Phase-III-Studie^{9,10} durch Stupp et al. sind weitere Fortschritte hinsichtlich neuer erfolgsversprechender Therapieregime marginal. Zu nennen sei hier die Verwendung von „*Tumor-Treating-Fields*“ (TTF) bei denen eine Verbesserung des medianen Gesamtüberlebens von 20,9 Monaten vs. 16,0 Monaten gezeigt werden konnte und konsekutiv Erwähnung in der deutschen Gliom-Leitlinie finden.^{8,11,12}

Bestrebungen zur Identifizierung zielgerichteter Therapien mündeten unter anderem in Expressionsanalysen anhand derer eine Einteilung des GB in Subtypen (klassisch, neural, proneural, mesenchymal) möglich ist.^{13,14} Derartige Typisierungen erscheinen insbesondere im Sinne zunehmender Bemühungen um einen Wechsel von klassischer zytotoxischer Chemotherapie zu gezielter Krebstherapie („*targeted therapies*“) sinnvoll.¹⁵ Gesamtheitlich erscheint der Therapieerfolg durch bisherige Strategien unbefriedigend und wird maßgeblich durch eine intratumorale Heterogenität mit konsekutiver Invasivität, Rekurrenz und Resistenz bedingt.¹⁶ Zwei grundsätzliche Mechanismen der Genese einer heterogenen Tumorphypopulation werden diskutiert, darunter die klonale Evolution¹⁷ und die Existenz von Tumorstammzellen – oder stammzellartigen Tumorzellen.¹⁸ Letztere finden im Folgenden genauere Betrachtung.

1.2 Gliom-initiiierende Zellen

Schon vor Jahrtausenden waren maligne Erkrankungen bekannt; Ihr Ursprung allerdings ein Rätsel. Wurde es im antiken Ägypten noch Flüchen zugeschrieben, so machten die Ärzte des antiken Griechenlandes ein Missverhältnis von schwarzer Galle verantwortlich. Erst im Verlauf der jüngsten Zeitgeschichte kam es zu durchbrechenden Erkenntnissen im Feld maligner Erkrankungen. Erkenntnisse die uns den Ursprung von „Krebs“ deutlich genauer benennen lassen.¹⁹

Nahezu alle bösartigen Tumore teilen dezidierte zellbiologische Eigenschaften. Eigenschaften die uns umgangssprachlich vom „Bösen“ im Tumor sprechen lassen. Hierzu zählen eine Reihe designierter zellulärer Fähigkeiten wie Angiogenese, Deregulation des Metabolismus, Genominstabilität und Mutation, Immortalisierung, Immunevasion, invasives Wachstum, uneingeschränktes Proliferationspotential und Zelltodresistenz.¹⁹ Dieses klassische Grundgerüst, in etablierter Literatur auch als „hallmarks of cancer“²⁰ beschrieben, teilt eine Vielzahl von Tumoren unterschiedlicher Ursprungsgewebe. Erkenntnisse aktueller Forschung erweitern dabei die Perspektive um stetig neue Eigenschaften. So wurde in jüngster Zeit der Begriff der phänotypischen Plastizität als Pfeiler des beschriebenen Grundgerüsts ergänzt.²¹ Ein Begriff der im Rahmen dieser Arbeit von fulminanter Bedeutung ist und im Folgenden wiederholt dezidiert betrachtet unterliegt. Der Erwerb oder das Vorhandensein dieser Fähigkeiten ist ebenso

essenziell für Gliome. Ein Erwerb einzelner Eigenschaften kann maßgeblich durch eine Dedifferenzierung von Zellen erreicht werden. Das Vorhandensein allerdings setzt die Hypothese voraus, dass eine bereits dedifferenzierte Population von Zellen existiert, welche eine Reihe „maligner“ Eigenschaften besitzt. Letztere Hypothese, so banal sie auch klingt, existiert erst seit Ende des 19. Jahrhunderts und beschreibt das Konzept von Tumorstammzellen als Ursprung maligner Erkrankungen.²²

Erstmals 1994 konnten Lapidot et al.²³ Zellen der akut myeloischen Leukämie isolieren, welche maßgeblich verantwortlich sind für die Selbsterneuerung des Tumors, seine Therapieresistenz und seine Fähigkeit der Genese einer hierarchisch organisierten Zellpopulation. Aufgrund ihrer Dedifferenzierung und ihrer Ähnlichkeit zu Stammzellen wurde der Begriff von Tumorstammzellen („*cancer stem cells*“, CSC) geprägt. Letztlich fanden sich derartige Zellen in einer Vielzahl von Tumoren, so auch im GB.²⁴ Aufgrund der, im Gegensatz zu anderen Entitäten, allerdings schwierigen Definition dieser CSC im GB bestehen durchaus Kontroversen bezüglich ihrer Genese und Standardisierung.

Das GB zeigt mehr als andere Vertreter maligner Hirntumore eine inter- und intratumorale Heterogenität; Eine Tatsache, welche in der Vergangenheit den Begriff des Glioblastoma multiforme – des „vielgestaltigen“ GB prägte.²⁵ Diese Heterogenität erscheint nach Stand der aktuellen Forschung nicht willkürlich, vielmehr zeigt sich die bereits erwähnte hierarchische Organisation der Zellen auch im GB. Den Gipfel dieser Hierarchie bilden CSC.²⁶ Diesen Zellen wohnen nahezu alle oben genannten Eigenschaften inne und sie können durch Differenzierung verschiedene Zelllinien im GB hervorbringen sowie nach Transplantation erneute Gliome bilden.²⁴ Gliom-initiiierende Zellen oder Gliomstammzellen (GSC) rücken in jüngster Zeit vermehrt in das Rampenlicht der wissenschaftlichen Auseinandersetzung zum Auffinden zielgerichteter Therapien. Gleichzeitig beschäftigt sich die Literatur zunehmend mit der Frage der Definierbarkeit dieser Zellen, da auch diese selbst – ebenso wie das GB, immenses Potential zur Plastizität zeigen. Ihre Fähigkeiten tragen maßgeblich zur Rekurrenz und Resistenz von Gliomen bei. Entsprechend erscheint die Eliminierung, Reduktion oder Veränderung der Eigenschaften von GSC fundamental für eine erfolgreiche Therapie der Erkrankung.

1.2.1 Glio- und Gliomgenese

Komplementär zum Begriff der Gliogenese, bezeichnend für die physiologische Entwicklung von Gliazellen aus neuronalen Progenitorzellen, etabliert sich in der Literatur zunehmend die Bezeichnung der Tumorgenese von Gliomen als „*Gliomagenesis*“ oder Gliomgenese. Hinsichtlich dieser Gliomgenese herrscht größtenteils Einigkeit über die Hypothese einer Entstehung ausgehend von Gliom-initiiierenden Zellen.²⁷ Der aktuelle Forschungsstand legt nahe, dass Schlüsselmechanismen der Gliogenese und ein Verständnis für die physiologische Differenzierung von Gliazellen aufschlussreiche Hinweise zum Prozess der Gliomgenese liefern.²⁸

Die physiologische Entstehung von Gliazellen kann grundsätzlich in eine embryonale und adulte Gliogenese unterteilt werden. Sowohl Neuronen als auch Makroglia entstammen letzten Endes Vorläuferzellen des Neuroepithels als Teil des embryonalen Ektoderms.²⁹ Früh in der embryonalen Entwicklung kommt es zur Proliferation der neuroepithelialen Zellen mit Entstehung von radialen Glia-Progenitorzellen (RG) in der ventrikulären Zone. Während einer zunächst symmetrischen Teilungsphase wird die Masse an Progenitorzellen erhöht. Daraufhin kommt es zur Neurogenese durch eine asymmetrische Proliferationswelle. Diese mündet in der Entstehung von kortikalen Neuronen und RG in der subventrikulären Zone (SVZ).³⁰ Der anschließende Wechsel von Neurogenese zur Gliogenese wird maßgeblich durch den Prozess des „*gliogenic switch*“ (vgl. Abb. 1.1) hervorgerufen.²⁸ Im Rahmen dieser Änderung spielt der NOTCH-Signalweg eine entscheidende Rolle. Derart entscheidend, dass eine Inhibition des Signalweges in einem vollständigen Verlust von Gliazellen resultieren kann.²⁸ Darüber hinaus kommt es zu molekularen Veränderungen wie der Induktion von Proteinen wie Sox9 oder „*Nitrogen Fixation Specific Regulatory Protein*“ (NIFA). Über spezifische Progenitorzellen entstehen so letztlich Oligodendrozyten, Astrozyten sowie adulte Stammzellen der SVZ.³⁰ Die Prozesse dieser Differenzierung sind nicht vollständig geklärt. Eine Reihe von Signalwegen und Transkriptionsfaktoren nehmen bedeutenden Einfluss, hierunter der Hedgehog-Signalweg, Proteine der Sox-Familie³¹ und OLIG2.²⁸

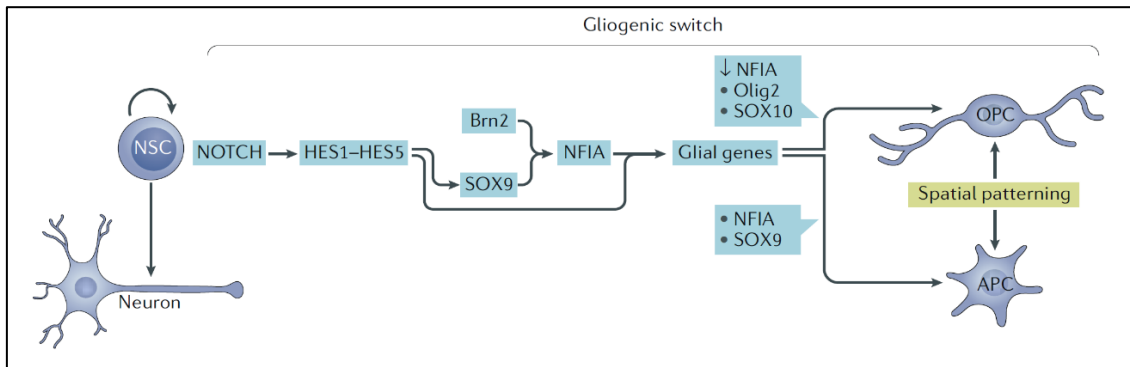


Abbildung 1.1. Illustration der Gliogenese aus neuronalen Progenitorzellen und der involvierten Signalwege
 Entscheidungen des Zellschicksals neuronaler Stammzellen werden präzise über unterschiedliche zelluläre Signale wie Notch-Signaling und Transkriptionsfaktoren der Sox-Familie gesteuert und ermöglichen die Entstehung von Vorläuferzellen von Astro- und Oligodendrozyten. Abk.: „Astrocyte progenitor cell“ (APC), „Neural stem cell“ (NSC), „Oligodendrocyte progenitor cell“ (OPC). (Quelle: Laug D, Glasgow SM, Deneen B. A glial blueprint for gliomagenesis. Nat Rev Neurosci. 2018;19(7):393-403. doi:10.1038/s41583-018-0014-3.)

Eine Vielzahl der Eigenschaften von RG teilen diese mit einer Population von Tumorstammzellen der Gliome, deren Beteiligung an der Gliomgenese maßgeblich diskutiert wird.²⁷ GSC zeigen ähnlich wie RG Pluripotenz, ein robustes Proliferationspotential, eine hohe Migrationskapazitäten und vermehrte embryonale Expressionsprofile.³² Ihre Fähigkeit erscheinen verantwortlich für die Gliomgenese und Kapazitäten zur Regeneration und Bildung einer intratumoralen Heterogenität tragen zur Aufrechterhaltung der Tumorphilipulation bei.³³ Der Ursprung der GSC ist nicht eindeutig geklärt. Diskutiert wird unter anderem die Entstehung durch Dedifferenzierung von Oligodendrozyten. Allerdings legt ihre Ähnlichkeit zu Glia-Progenitorzellen und adulten Stammzellen der SVZ, diese als Ausgangspunkt nahe.^{34,35}

Adulte Gliogenese erfolgt vornehmlich durch neuronale Stammzellen (NSC) der SVZ und der subglandulären Zone (SGZ) des Hippocampus. Diese Zellen ermöglichen neuronale Plastizität, anders als ehemals angenommen, auch noch im adulten Gehirn. Die Fähigkeiten der NSC zur Proliferation und Differenzierung werden minutiös durch intrinsische und extrinsische Signale gesteuert.³⁶

Intrinsische Regulationsmechanismen beinhalten die Steuerung von Transkriptionsfaktoren. Eine entscheidende Rolle konnte hierbei für SOX2 und seine Regulation über „Arsenic Resistance Protein 2“ nachgewiesen werden. Daneben konnten Gene der Hes-Familie als Effektoren des Notch-Signalweges mit Differenzierung und Zellzykluskontrolle der NSC in Verbindung gebracht werden.³⁶

Neben diesen, auch in GSC identifizierbaren, Signalwegen zeigten Untersuchung von Expressionsprofilen in beiden Zellarten Übereinstimmungen spezifischer Gene wie CD133, Nestin, GFAP, OLIG2 und Genen der Sox-Familie.³⁶

Diese komplementären Eigenschaften legen NSC als Ursprungszelle der GSC und damit des GB nahe. Neben diesen Gemeinsamkeiten zwischen NSC und Stammzellen des GB erscheinen insbesondere ihre Unterschiede von großer Bedeutung, um die Genese der Gliome zu entschlüsseln. Dementsprechend erfolgt in vielen Teilbereich maligner Eigenschaften der GSC von **Angiogenese** bis **Zell-** **todresistenz** intensive Forschung.

Hierbei zeigten Untersuchungen, dass Änderung des „*Epidermal Growth Factor*“ (EGF)-Signalweges in NSC zur Aktivierung der Proliferation führen und die Zellen zu Gliom-artiger Infiltration befähigen. Komplementär findet sich eine Amplifikation des EGF-Rezeptors in ca. 60% der GB und erscheint entsprechend entscheidend für die Gliomgenese. Dabei überwiegt insbesondere eine Mutationsvariante – EGFRvIII (EGFR variant III), welche mit konstitutiver Aktivität des Rezeptors einhergeht.³⁶ Eine „*Gain-of-Function*“-Mutation des Tumorsuppressors p53 konnte in Untersuchungen mit einer Migration frühreifer NSC in Verbindung gebracht werden. Obgleich die NSC hierdurch nicht maligne entartet scheint p53 beteiligt an der initialen Invasion der Zellen in andere Hirnareale. Eine ähnlich entscheidende Rolle wird der Regulation von Zelltodmechanismen zugeschrieben. Hierbei nimmt „*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*“ (STAT3) eine entscheidende Rolle ein. Seine Inhibition kann in GSC Invasionskapazität, Tumorüberleben und Stammzeleigenschaften reduzieren.³⁶

Einen weiteren Unterschied zu NSC stellt die räumliche Nische der GSC, mit entsprechend einzigartigem Mikromilieu, dar. Im Falle des GB zeigt sich eine zonale räumliche Ordnung mit Nekrose- und Infiltrationszonen. Daneben existieren periarteriolare Nischen in welchen die GSC vornehmlich lokalisiert sind.³⁷ Durch spezifische Eigenschaften des Mikromillieus wie Hypoxie werden Funktionen der GSC wie Angiogenese, Transdifferenzierung und Migration getriggert. Daneben zeigten Ko-Kulturen von Endothelzellen und GSC eine Erhöhung der Expression von Stammzellmarker-Proteinen wie SOX2, OLIG2 und CD133 als Zeichen der extrinsischen Wechselwirkungen.³⁷

Die grundsätzliche Frage der Gliomgenese wirft ebenso die Frage einer möglichen Einheitlichkeit in Genese und generierten Tumoren unterschiedlicher

Individuen auf. Im Rahmen der ätiologischen Auseinandersetzung mit Krankheiten sind dabei die wenigsten monofaktoriell, d.h. auf eine einzige Ursache zurückzuführen. Ebenso verhält es sich bei GB. Entsprechend besteht keine Einheitlichkeit, weder zwischen individuellen Tumoren noch zwischen ihrer Genese. Gleichzeitig besteht keine vollständige Uneinheitlichkeit. Zum Auffinden der Ähnlichkeiten im Hinblick auf die Tumorgenese verschiedener Tumore führten wissenschaftliche Bestrebungen zur Entwicklung des „*The Cancer Genome Atlas*“ (TCGA). Auch im Falle des GB kam es folglich zur Katalogisierung genetischer Veränderungen in einer großen Anzahl von Datensätzen. Anhand der Datenbanken des TCGA konnten im Verlauf unter anderen durch Verhaak et al.¹⁴ transkriptionelle Muster zur Subtypisierung des GB aufgefunden werden. Verschiedene Autoren beschreiben hierbei meistens drei oder vier Subtypen mit klinischen Implikationen für Überleben und Therapieresistenz.^{14,38} Neuere Betrachtungen, die der Plastizität des GB gerechter werden und gleichzeitig das Modell der unidirektionalen Entstehung eines Tumors aus einer kleinen Population von Krebsstammzellen damit weiter in Frage stellen, beschreiben nicht plastische Zustände des Tumors, sondern seiner Zellen. Diese zellulären Zustände ergeben sich ebenfalls aus transkriptionellen und genetischen Beurteilungen. Nefitel et al.³⁹ präsentieren hier vier Zustände ([1] *neural-progenitor-like*, [2] *oligodendrocyte-progenitor-like*, [3] *astrocyte-like*, und [4] *mesenchymal-like*), welche zeitgleich innerhalb eines Tumors vorkommen können und deren relativer Anteil im Tumor veränderlich ist.

Diese in 1.1 bereits erwähnte Subtypisierung lässt konsekutiv auch für die Fragen der Gliomgenese unterschiedliche Schlüsselmechanismen genetischer Veränderungen vermuten. Letztlich ergibt sich für die Entstehung des GB somit keine Monokausalität. Vielmehr erscheint eine Vielzahl von Mechanismen an der Gliomgenese beteiligt. Ein tiefreichendes Verständnis der Gliomgenese und damit einhergehend über Eigenschaften von GSC erscheint zur Identifikation von Angriffspunkten zielgerichteter Therapien und damit zum Schlüssel der erfolgreichen Therapie des GB von großer Bedeutung.

1.2.2 Definition und funktionelle Charakteristika von Gliom-initiiierenden Zellen

Im Vorherigen wurden bereits grundlegende Eigenschaften von GSC beschrieben. Dennoch verbleibt insbesondere im wissenschaftlichen Kontext und in Anbetracht von *in-vitro* Untersuchungen von GSC die Frage, welche Voraussetzungen eine Zelle erfüllen muss, um als GSC zu gelten.

Eine einheitliche, eindeutige und völlig trennscharfe Definition existiert bis dato nicht. Die Nomenklatur um GSC ist ebenso nicht eindeutig festgelegt. Einige Autoren wie Lathia et al.⁴⁰ verdeutlichen die Notwendigkeit einer grundsätzlichen Unterscheidung zwischen, in übriger Literatur, häufig Synonym verwendeten Begriffen. So wird die Unterscheidung zwischen Gliomstammzelle, Gliom-initiiierender Zelle und Gliom-propagierender Zelle vorgeschlagen. Um eine Robustheit der Begrifflichkeiten zu erreichen, sollten definierte Anforderungen erfüllt sein um eine Zelle tatsächlich als GSC bezeichnen zu können. Hierzu zählen Fähigkeiten der Selbsterneuerung, Proliferation, Tumorentstehung sowie die Expression von Stammzellmarkern und die Fähigkeit der Generation multipler Zelllinien. Werden diese Eigenschaften nicht vollumfänglich erfüllt sollte entsprechend nicht von GSC, sondern von Gliom-initiiierenden oder propagierenden Zellen gesprochen werden.⁴⁰ Obgleich die theoretische Forderung recht simpel erscheint, sind Modellversuche zum Nachweis notwendiger Charakteristika häufig ebenso uneindeutig und nicht klar definiert.

Unter diese Charakteristika fällt die Expression von CD133 als Oberflächenmarker. Als häufig verwendeter Stammzellmarker in GSC findet CD133 nahezu ubiquitär Erwähnung in der Literatur und wird im Rahmen von Zellsortierung zur Isolierung von GSC genutzt. Die Rolle von CD133 wird allerdings zunehmend kontrovers diskutiert. So vermag CD133 nicht zwischen Zellen mit tumorerzeugendem Potential und Jenen ohne zu differenzieren.⁴¹ Weitere Oberflächen- und Expressionsmarker mit häufiger Erwähnung sind CD44, Musashi, Nestin, Nanog, *OCT4* und *SOX2*.⁴¹ Grundsätzlich orientieren sich diese Marker an solchen neuralen Stammzellen, allerdings gibt es bis dato kein GSC-spezifisches Markerprotein.⁴⁰ Die bereits im Vorherigen dargestellte Plastizität der zellulären Zustände, welche sich aus transkriptionellen und genetischen Beobachtungen ergibt, lässt dabei zweifeln, ob ein GSC-spezifischer universeller Marker überhaupt existiert.

Expressionsprofile sind somit ein Anhalt und kein Beweis für GSC. Entscheidender sind funktionelle Charakteristika, welche die Definition eines GSC-Phänotyps möglich machen.^{26,40} Der Goldstandard funktioneller Assays, obgleich anspruchsvoll und zeitintensiv, stellt die Kultivierung der Zellen *in vivo* zur Identifikation ihres Potentials der Tumorerzeugung und Hervorbringen einer heterogenen Tumorphysion unter physiologischen Bedingungen dar. So sollte im Idealfall nach orthotoper Transplantation einer GSC einer Patientenprobe ein übereinstimmend komplexer Tumor erneut hervorgebracht werden.⁴⁰

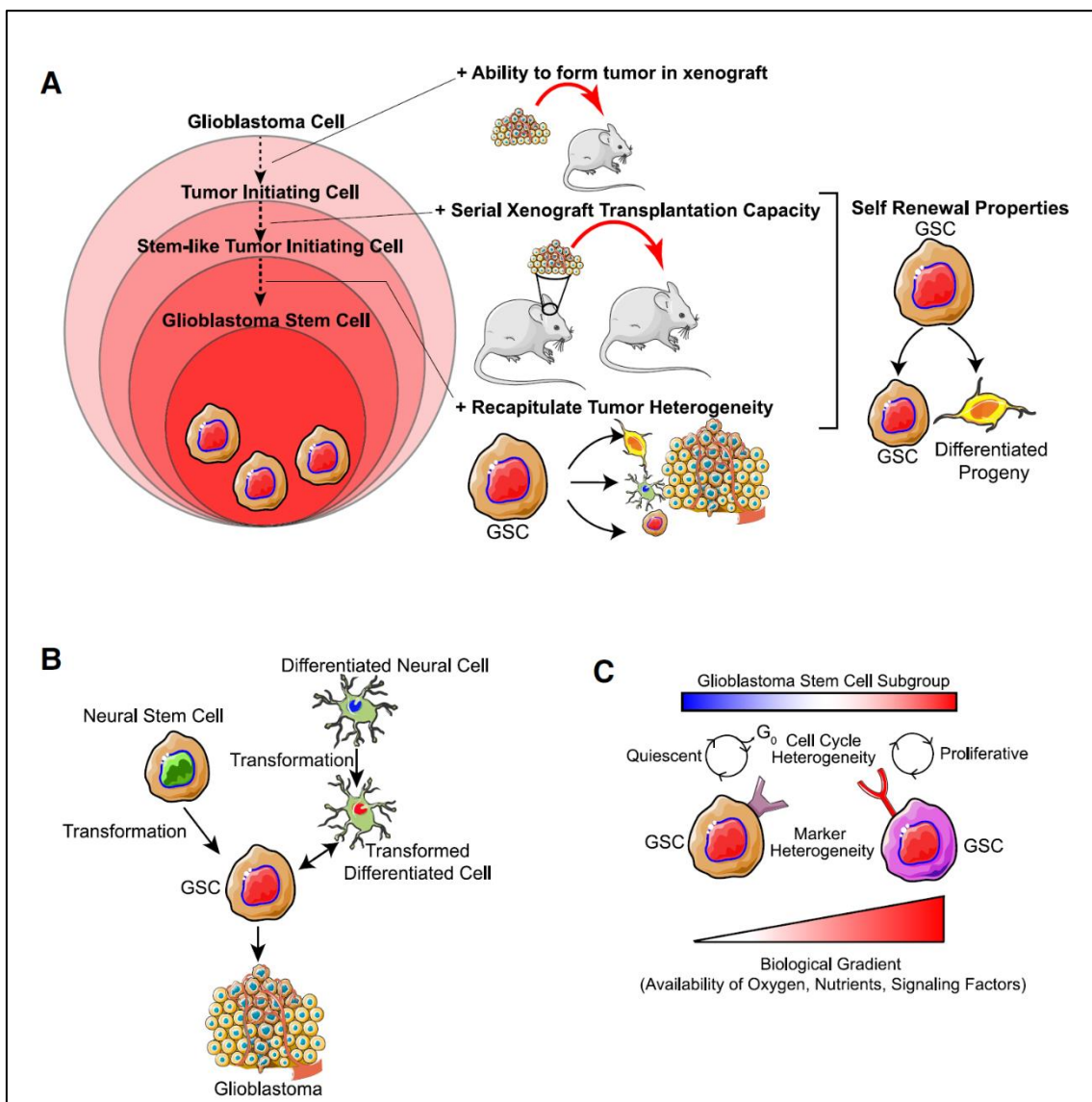


Abbildung 1.2. Funktionelle Eigenschaften von Gliom-initiiierenden Zellen

(A) GSC zeigen Kapazitäten der Tumorgenese nach Transplantation und können eine heterogene Tumorphysion hervorbringen. (B) Ursprünge der GSC sind unklar. Diskutiert werden NSC oder die Dedifferenzierung nicht-stammzellartiger Zellen. (C) GSC können unterschiedliche zelluläre Zustände durch intrinsische und extrinsische Reize annehmen und zeigen dadurch eine zelluläre Plastizität. (Quelle: Gimple RC, Bhargava S, Dixit D, Rich JN. Glioblastoma stem cells: lessons from the tumor hierarchy in a lethal cancer. *Genes Dev.* 2019;33(11-12):591-609. doi:10.1101/gad.324301.119)

Letzteres Modell ist im alltäglichen Kontext der Untersuchung von GSC nicht realisierbar. Alternativ sind *in-vitro* Verfahren wie Sphäroid-Kultivierung und Grenzverdünnungsanalysen („*limiting dilution assays*“; LDA) oder *ex-vivo* organotypische Kultivierung etabliert und praktikabel. Hierbei zeichnen sich GSC durch ein Wachstum als Tumorsphäre unter Serum-freien Bedingungen, Sphärenbildung nach Verdünnung und dreidimensionales Wachstum in organotypischen Gewebe aus.²⁶

Eine eindeutige Definition von GSC wird durch ihr massives Potential zur Plastizität erschwert. Zunehmende Bestrebungen der RNA-Sequenzierung auf Einzelzell-Ebene und genetischen Sequenzierung zeichnen das Bild einer weitaus größeren Heterogenität als die Idee einer einzelnen, maximal undifferenzierten, Zelle, welche stammbaumartig weitere Zellen in lediglich eine Richtung der Differenzierung hervorbringt.⁴² Vielmehr zeigen genomweite Untersuchungen einen Mischwald verschiedener Zustände von Differenzierung mit Clustern von Expressionsprofilen. Diese Cluster scheinen ineinander überführbar, da zahlreiche Zwischenzustände existieren.⁴² Somit gleicht die Hierarchie der Zellen nicht einer spitz zulaufenden Pyramide, sondern vielmehr einem Trapez mit einem breiten Pool undifferenzierter Zellen, welche sich mehr oder minder frei ineinander überführen lassen.⁴³

Ebenso wie GB an sich, zeigen auch unterschiedliche GSC spezifische genetische Veränderungen, welche sich teilweise zu Mustern harmonisieren lassen, allerdings grundsätzlich einzigartig bleiben.⁴⁴ Entsprechend muss im Kontext der Definition der GSC stets bedacht werden, dass auch hier ebenso wie im GB selbst keine Einheitlichkeit besteht. Im Rahmen der wissenschaftlichen Untersuchung einer GSC-Population besteht entsprechend fortwährend die Limitation einer nur teilweisen Übertragbarkeit auf andere Tumorproben. Trotz des oben genannten Verweises einer Trennschärfe der Begrifflichkeit wird im Rahmen dieser Arbeit aus Gründen des Pragmatismus im Weiteren hauptsächlich der Begriff GSC verwendet. Dabei sei hier explizit angemerkt, dass GSC im Kontext der weiteren theoretischen Auseinandersetzung mit der Thematik als Konzept zu verstehen sind – ein Konzept der Existenz von dedifferenzierten stammzellähnlichen Zellzuständen von Gliomzellen mit einem hohen Maß an eigener zellulärer Plastizität.

1.2.3 Klinische Relevanz und zielgerichtete Therapie

In jüngerer Zeit werden GSC zunehmend als zentraler Drehpunkt mit entscheidenden Schlüsselfunktionen für Entstehung, Progress und Rekurrenz des GB diskutiert. Die experimentellen Forschungsbestreben hinsichtlich GSC zeigten in den vergangenen 20 Jahren einen rasanten Anstieg. In der 2021 aktualisierten und aktuell gültigen Version der Leitlinie „Gliome“ der deutschen Gesellschaft für Neurologie finden Stammzellen unterdessen keine Erwähnung.⁸ Eine Diskrepanz, welche die Frage der tatsächlichen Relevanz von GSC in der Behandlung des GB aufwirft. Besteht diese Relevanz schlichtweg nicht oder sind vielmehr translationale Bestrebungen bisher nicht ausreichend?

Die Frage der Relevanz scheint hierbei deutlich zugänglicher. Das GB zeichnet sich insbesondere durch sein enormes Potential zur Progression und Rekurrenz aus.⁴⁵ Unter der etablierten Therapie kommt es nahezu immer innerhalb kurzer Zeit zu einer erneuten Tumorformation. Die Optionen zur wiederholten chirurgischen Therapie sind stark limitiert.⁸ Radio- und Chemotherapie zeigen sich in rekurrenten Tumoren ineffizient. Die mechanistischen Grundlagen dieser Resistenz in rekurrenten Tumoren sind komplex. Eine Entschlüsselung könnte zentrale Angriffspunkte aufweisen, um eine erfolgreiche Behandlung zu ermöglichen. Zunehmende Evidenz beschreibt GSC als Urheber dieser Resistenz und zugrundeliegende Mechanismen werden stetig ergänzt.⁴⁵

GSC weisen veränderte Zellzyklus- und DNA Reparaturmechanismen auf.⁴⁶ So konnte eine strahleninduzierte Aktivierung von Checkpoint-Kinasen (CHK1/2) in GSC nachgewiesen werden.⁴⁷ Zeitgleich kommt es zu einer tumorpropagierenden Autophagie nach fraktionierter Bestrahlung.⁴⁸ Hierdurch können, die durch ionisierende Strahlung hervorgerufenen, Strangbrüche effizienter detektiert, repariert und ein Zelluntergang verhindert werden.⁴⁷ Durch Inhibition GSC-typischer Signalwege wie NOTCH und Hedgehog zeigten unterschiedliche Autoren eine Radiosensitivierung CD133⁺ Zelllinien auf und verdeutlichten potentielle Therapieoptionen.⁴⁷

Neben der Resistenz gegenüber Strahlentherapie besteht diese ebenso gegenüber Chemotherapien in GSC. Die mechanistischen Grundlagen sind hierbei zunächst ähnlich. Die etablierte Therapie mit TMZ führt ebenfalls zur DNA-

Schädigung. GSC weisen neben den bereits erwähnten Mechanismen eine erhöhte MGMT-Expression auf mit konsekutiver effektiver Reparaturkapazität.⁴⁹ Grundsätzlich lässt sich die Chemoresistenz in intrinsische und extrinsische Faktoren einteilen. Intrinsische Faktoren bezeichnen dabei all jene, die durch zelluläre Mechanismen wie Genexpression und Signalweg-Steuerung geprägt sind.⁵⁰ Extrinsische Faktoren bezeichnen das individuelle Mikromillieu, Zellinteraktionen und funktionelle Barrieren wie die Blut-Hirnschranke. Ein GB typisches Charakteristikum des Mikromillieus ist die Hypoxie. GSC zeigen eine Hypoxie-induzierte Selbsterneuerung und Proliferation. Durch Strahlung induzierte freie Radikale sind in hypoxischen Arealen reduziert, wodurch GSC – welche sich vornehmlich in Letzteren finden – ebenfalls eine erhöhte Strahlenresistenz aufweisen. Zudem kommt es zur hypoxieabhängigen Aktivierung von „*Multi Drug Resistance*“-Genen wie *MDR1/ ABCB1*, wodurch ein unspezifischer Therapeutika-Efflux in GSC erreicht wird.⁵⁰

Bedeutenden Einfluss auf die Therapieresistenz nimmt zudem die Zell-Plastizität von GB ein. Unterschiedliche Autoren demonstrierten eine Konversion nicht-stammzellartigen Zellen zu GSC unter Hypoxie- und Säure-Stressoren. Ebenso ermöglicht ionisierende Strahlung eine Konversion in einen GSC-Zellstatus.⁴⁹

Die intratumorale Heterogenität der Zellen kann zu einem therapieinduzierten Wechsel der tumorweiten Expressionsprofile führen. So konnte eine vollständige Konversion von einem proneuralem GB-Subtyp in aggressivere Formen wie mesenchymal gezeigt werden. Letzteres legt die Möglichkeit eines Selektionsvorteils aggressiverer Zelltypen unter der etablierten Therapie nahe.

Das Model einer hierarchischen Struktur von Zelltypen innerhalb des GB legt die Elimination dieser aggressiven Zelltypen, vornehmlich GSC, als Bedingung um Therapieerfolge zu verzeichnen und Rekurrenz und Resistenz erfolgreich zu umgehen, nahe.

1.3 Signalwege tumorpropagierender Zellen

1.3.1 Notch

Als evolutionär hoch konservierter Signalweg findet sich der Notch-Signalweg in nahezu allen Zellen, obgleich in unterschiedlicher Ausprägung und Relevanz. Dabei reguliert er Funktionen wie Zellproliferation, Apoptose, Zellschicksal und Stammzellerhalt.⁵¹

Der Notch-Signalweg, entsprechend seinem Namen, zeichnet sich durch die Interaktion eines Notch-Rezeptors und seiner Liganden aus. Hierbei existieren vier bekannte Formen von Rezeptoren, NOTCH1-4 - sowie zwei Familien von Liganden, Delta-like1-4 und Jagged1 und -2.⁵¹

Im Rahmen des Signalweges kommt es zur mehrfachen Spaltung des Notchrezeptors, um eine Aktivierung von Zielgenen zu erreichen. Eine initiale Spaltung ermöglicht zunächst lediglich die Translokation des Rezeptors von intrazellulär in die Zellmembran. Der so entstehende reife Notch-Rezeptor präsentiert nach Bindung an einen Liganden seinen zweiten Spaltbereich und erfährt die Spaltung durch Proteine der „*A Disintegrin And Metalloproteinase*“ (ADAM)-Familie. Das hierdurch entstehende Rezeptor Fragment (NEXT) wird erneut an zwei unterschiedlichen Spaltbereichen durch eine γ -Sekretase prozessiert. Die entstehende intrazelluläre Notch-Domain (NICD) kann schließlich in den Zellkern translozieren. Nach Bindung unterschiedlicher DNA-bindender Proteine kann die Regulation der Zielgene erfolgen. Hierzu zählen in erster Linie Gene der „*Hairy Enhancer of Split*“ (HES)-Familie sowie „*HES-related*“ Proteine (HEY).⁵¹

Neben dieser kanonischen Signalkaskade existieren nicht-kanonische Prozesse, welche letztlich ebenfalls zur Aktivierung der Notch-Zielgene führen können. Diese Prozesse lassen sich übersichtlich im Rahmen dieses Kapitels nicht bündeln, jedoch sei hier beispielhaft eine Regulation von Notch-Zielgenen über NF- κ B oder BMP-Signaling genannt. Entscheidend vermittelt werden soll allerdings das grundlegende Konzept einer γ -Sekretase-unabhängigen Signalwegaktivierung. Im Umkehrschluss führt eine Inhibition der γ -Sekretase somit nicht in jedem Fall zu einer Inaktivierung der Notch-Zielgene.⁵¹

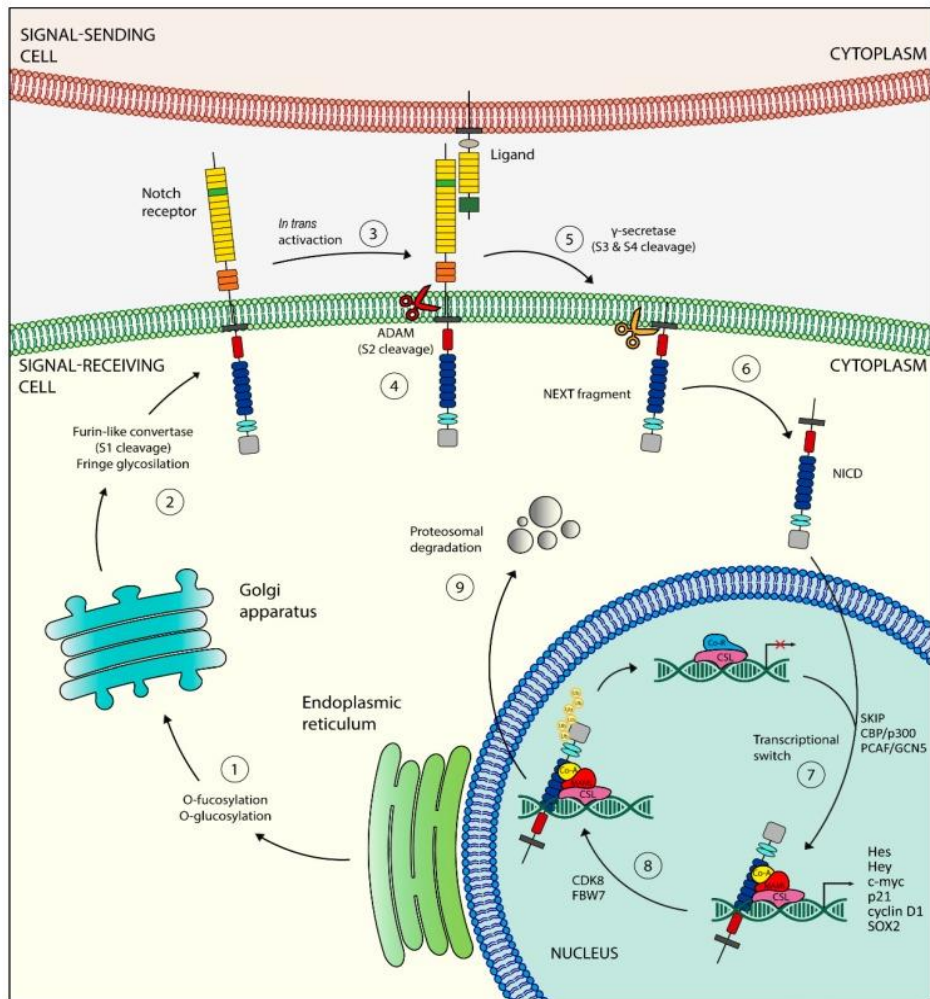


Abbildung 1.3. Kanonischer Notch-Signalweg und seine Komponenten

Abk.: „Ski-interacting Protein“ (SKIP), „ CREB-Binding Protein“ (CBP/p300), „P300/CBP-associated factor“ (PCAF), „General Control Non-repressed 5 protein“ (GCN5), „cyclin dependent kinase 8“ (CDK8), „F-box and WD repeat domain-containing 7“ (FBW7). (Quelle: Bazzoni R, Bentivegna A. Role of Notch Signaling Pathway in Glioblastoma Pathogenesis. *Cancers* (Basel). 2019;11(3):292. Published 2019 Mar 1. doi:10.3390/cancers11030292)

Die Rolle des Notch-Signalwegs für die embryonale Entwicklung des zentralen Nervensystems wurde in Teilen bereits in 1.2.1 beschrieben. Ergänzend soll die Rolle für das Glioblastom näher beleuchtet werden.

Rein deskriptiv konnte in Untersuchungen eine erhöhte Konzentration von NOTCH1, NOTCH4, Dll1, Dll4, Jagged1, Hey1, Hey2, sowie Hes1 in Hirntumoren gegenüber gesundem Hirngewebe nachgewiesen werden.⁵¹ Für unterschiedliche Rezeptoren konnte teils ebensolche Unterschiede ihrer Wirkungen innerhalb von Hirntumoren gezeigt werden. NOTCH1 und NOTCH4 zeigten positive Korrelationen mit GFAP und Vimentin als Ausdruck für die Wirkung hinsichtlich Zellschicksal-Entscheidungen. Die Expression von NOTCH4 zeigte sich erhöht je höher der Grad des primär malignen Tumors, stellvertretend für das Maß an Aggressivität. NOTCH2 zeigte positive Korrelation mit stammzelltypischen

Proteinen wie Nestin und SOX2 sowie antiapoptotischen Proteinen wie BCL6 und BCL-W. Gleichzeitig konnte eine negative Korrelation pro-apoptotischer Proteine nachgewiesen werden (BAX und BCLAF1) mit ableitbarer Wirkung auf Zellüberleben und Regeneration.⁵¹

Wang et al.⁵² erläuterten eine Sensitivierung für Radiotherapie unter Notch-Inhibition mittels γ -Sekretase-Inhibitor und konnten eine Notch-abhängige Radiore-sistenz via Akt-Signalweg und Expression von Mcl-1 mit konsekutiver antiapoptotischer Wirkung aufzeigen.

Der Notch-Signalweg scheint zudem entscheidenden Einfluss auf die Fähigkeit der Migration maligner Hirntumore zu haben. So zeigten Untersuchungen eine über Jagged1/ NOTCH1-Interaktion vermittelte Determination der Verteilung von GSC entlang Jagged1-exprimierender weißer Substanz im Randbereich der Tumore. Darüber hinaus erbrachten letztere Untersuchungen Hinweise auf einen positiven Feedback Loop zwischen *NOTCH1*, *SOX2* und *SOX9* Expression. Gleichzeitig konnte eine schlechtere Prognose bei hoher gemeinsamer *NOTCH1* und *SOX2* Expression gezeigt werden.⁵³

Eine Vielzahl von Untersuchungen erleuchteten den Einfluss des Notch-Signalweges auf weitere tumorerzeugende Prozesse wie Zellmigration, Proliferation, Angiogenese und Zellüberleben.⁵¹

Letzteres spiegelt sich auch in translationalen Bestrebungen wider. So publizierten Peereboom et al. Ergebnisse einer Phase-II Studie zur Therapie mittels γ -Sekretase-Inhibitor RO9729097. Leider konnten die *in vitro* Ergebnisse hier nicht klinisch reproduziert werden. Eine signifikante Besserung des progressionsfreien Überlebens (PFS) wurde nicht erreicht.⁵⁴

Trotz translationaler Misserfolge erscheint der Notch-Signalweg als nützlicher Angriffspunkt zielgerichteter Therapien und wirft die Notwendigkeit neuer, effektiver translationaler Protokolle auf um *in vitro* Erfolge auch klinisch zu reproduzieren.

1.3.2 Hedgehog

Ebenso wie der Notch-Signalweg ist auch der Hedgehog-Signalweg (Hh) evolutionär hochkonserviert. Als komplexes Zusammenspiel seiner Faktoren, hierunter die Liganden Sonic Hh (Shh), Indian Hh (Ihh) und Desert Hh (Dhh), Patched-

Rezeptoren (PTCH1, PTCH2), dem Smoothened-Rezeptor (SMO) sowie „*Suppressor of fused homolog*“ (Sufu), Kinesin-Protein Kif7 und Proteinkinase A (PKA) wirkt letztlich auch der Hh-Signalweg über seine Transkriptionsfaktoren, „*glioma-associated Oncogene*“ (GLI)- 1-3, auf transkriptioneller Ebene.⁵⁵

Physiologische Funktionen beschränken sich überwiegend auf die embryonale Entwicklung. Hier reguliert der Hh-Signalweg Ausbildung von Gewebetypen und Organen sowie die Polarität des Organismus. Eine Dysregulation des Signalwegs kann zu schweren Fehlbildungen wie Holoprosenzephalie oder Missbildungen der Gliedmaßen führen. Im adulten Organismus ist der Hh-Signalweg weitestgehend inaktiv, spielt allerdings fortwährend eine wichtige Rolle zur Aufrechterhaltung pluripotenter Stammzellen unterschiedlicher Gewebetypen und deren Aktivierung beispielsweise im Rahmen der Regeneration von Gewebe.⁵⁶

Die kanonische Signalwegkaskade beginnt zunächst an Ptch1. Ohne Bindung an einen Liganden erfolgte über Ptch1 eine Inhibition von Smo. In dieser Konfiguration erfolgt keine Smo-Sufu-Interaktion, sodass Sufu mittels Sequestration von Gli eine Translokation des Letzteren in den Zellkern verhindert. Hierdurch ergibt sich eine Inaktivität des Signalweges. Erst nach Bindung eines Liganden erfährt der entstehende Ligand-Ptch1-Komplex eine Internalisierung und anschließende lysosomale Degradierung. Unter nunmehr fehlender Inhibition kann es zu einer Phosphorylierung von Smo kommen. Smo akkumuliert daraufhin im Primären Zilium, eine für den Hh-Signalweg bedeutende mikrotubuläre Struktur. Dort kommt es zur Dissoziation von Gli und seinem bindenden Komplex mit Sufu und Kif7. Eine direkte Interaktion vom Smo und Sufu scheint nicht zu existieren. Vielmehr scheinen weitere Komponenten die folgende Dissoziation zu vermitteln. Diskutiert wird in der Literatur hierbei eine Rolle von „*Ellis van Creveld Syndrome ciliary complex*“ Proteinen - EVC und EVC2. Letztlich kommt es zu einer Aktivierung von Zielgenen über die nun freien Gli-Transkriptionsfaktoren, welche ungebunden in den Nucleus translozieren können.⁵⁷

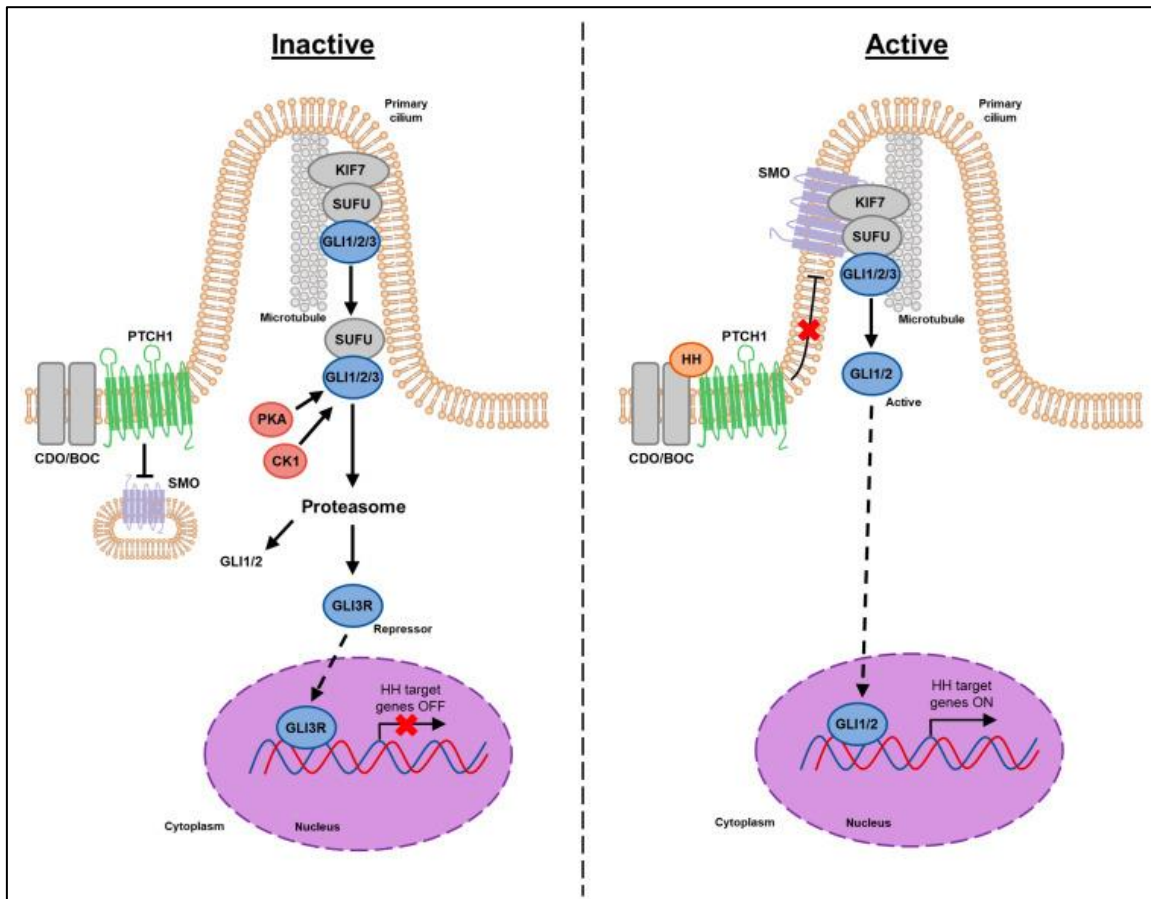


Abbildung 1.4. Kanonischer Hedgehog-Signalweg in inaktivem und aktivem Zustand

Abk.: „Brother of CDO“ (BOC), Casein Kinase 1 (CK1), „cell adhesion molecule-related / down-regulated by oncogenes“ (CDO). (Quelle: Doheny D, Manore SG, Wong GL, Lo HW. Hedgehog Signaling and Truncated GLI1 in Cancer. Cells. 2020;9(9):2114. Published 2020 Sep 17. doi:10.3390/cells9092114)

Für die Transkriptionsfaktoren Gli 1-3 konnten divergierende Effekte für den Signalweg festgestellt werden. So zeigt sich Gli1 als primärer Aktivator und Gli3 als primärer Repressor auf transkriptioneller Ebene, wohingegen Gli2 modulierend sowohl durch Aktivierung und Repression dienen kann. Eine hohe Gli1-Expression gilt hierbei als Maß der Aktivität, da die Expression maßgeblich von einer Aktivierung des Hh-Signalweges abhängt.⁵⁷ Auch hier muss in Kürze der Vermerk anlässlich einer nicht-kanonischen Signalweg-Aktivierung eingeschoben werden. Ebenso wie im Falle des Notch-Signaling gibt es auch für die Aktivierung der Gli-Transkriptionsfaktoren eine Vielzahl von Prozessen, die eine Smo-unabhängige Kaskade erlauben. Hierzu zählt beispielweise eine EGFR-vermittelte Gli-Aktivierung mittels PI3K-AKT-mTOR-Achse.⁵⁸

Wie bereits in 1.2.1 erwähnt fallen auch dem Hh-, ebenso wie dem Notch-Signalweg, entscheidende Funktionen während der physiologischen ZNS-Entwicklung

zu. Nachgewiesen wurden Einfluss auf Zellschicksal - insbesondere Oligodendrogenese, Stammzellerhalt und axonale Orientierung.⁵⁹

Die Hypothese einer zentralen Rolle auch im Rahmen der Entstehung und Aufrechterhaltung des GB erscheint einleuchtend, betrachtet man den Umstand, dass die Gli1-Amplifikation im Gliom gefunden wurde.⁶⁰ Seither wiesen vielreichende Untersuchungen dem Hh-Signalweg Schlüsselfunktionen für CSC-Erhalt in unterschiedlichen Tumoren beispielsweise der Brust, Lunge, des Kolon, Pankreas und Gehirns nach. Insbesondere für Gli1 wurde eine Regulierung, bereits im Vorherigen mehrfach erwähneter, Transkriptionsfaktoren wie OCT4, der Sox-Familie, CD44, Nanog und BMI1 nachgewiesen. Huang et al. zeigten zudem auch für Gli2 eine Förderung von Migrations- und Proliferations-Kapazität in Gliomen.⁶¹

Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass Shh-exprimierende Endothelzellen in Ko-Kultur mit Gliomproben zur vermehrten CD133-Expression und Ausbildung von Tumorsphären, als Ausdruck einer Steigerung eines stammzellartigen Phänotyps, führten.⁶² Bemühungen zur Untersuchung der Auswirkung einer Signalweg-Hemmung zeigten im Umkehrschluss eine Chemosensitivierung und vermehrte Apoptose in Gliomen durch Gli1-Inhibition.⁶³

Klinische Untersuchungen zu Hedgehog-Inhibitoren, insbesondere auf Ebene der Smo-Inhibition, sind aktuell noch laufend (NCT03466450) oder zeigen für Vismodegib keine Vorteile in der Therapie des Glioblastoms (NCT00980343).⁶⁴ Entsprechende translationale Ableitungen bedürfen weiterer Untersuchung.

1.3.3 „*Bone morphogenetic proteins*“

Komplementär zu den bereits Betrachteten, gibt es eine Vielzahl weiterer amplifizierter Signalwege im GB und insbesondere in GSC. Im Rahmen dieser Arbeit soll an dieser Stelle zuletzt ein Überblick über den BMP-Signalweg gewonnen werden.

„*Bone morphogenetic proteins*“ oder zu Deutsch knochenmorphogenetische Proteine (BMP) sind eine Gruppe sezernierter Zytokine mit Affinität zur Bindung an Rezeptoren der TGF-beta-Subfamilie. Die Interaktion dieser Bindung ist teils hochgradig promisk mit sich ergebenden komplexen und hochgradig kontextsensiblen nachgeschalteten Signalkaskaden.⁶⁵

BMPs regulieren insbesondere im Rahmen der embryonalen Entwicklung eine Vielzahl von Prozessen. Ihren Namen verdanken sie dabei der Tatsache ihrer Entdeckung als Proteine, die ektope Knochenformation induzieren können, obgleich BMPs eine Vielzahl weiterer entscheidender Aufgaben im Organismus zukommen und umgekehrt nicht jedes BMP tatsächlich Knochenformation induziert. Im Bereich des ZNS regulieren BMPs Apoptose, Zellschicksal, Reifung und Proliferation von NSC. Insbesondere im adulten Gehirn fällt ihnen eine kritische Rolle in der Regulation von NSC in der SVZ zu.⁶⁶

Im Sinne der Übersicht soll auch hier im Folgenden zunächst die kanonische Signalweg-Aktivierung beschrieben werden. Auch an dieser Stelle sei vermerkt, dass nicht kanonische Signalkaskaden existieren und gerade im Falle des BMP-Signaling aufgrund seiner hochgradig promiscuen Affinität und Kontextsensibilität unterschiedliche Signalwege, hierunter „*Wingless and Int-1*“ (Wnt)-, Notch- und STAT-Signaling, beeinflusst werden können.⁶⁵

Als Zytokine fungieren BMP in erster Linie als Liganden für zwei Typen von transmembranären Serin-Threonin-Kinase-Rezeptoren – sogenannte Typ I und Typ II Rezeptoren. Nach Bindung eines Liganden kommt es zur Bildung eines heterotetrameren Komplexes jeweils zweier Typ I und Typ II Rezeptoreinheiten. Letzteres ermöglicht die Aktivierung der weiteren Signalkaskade über rezeptor-regulierte „*Suppressor of Mothers against Decapentaplegic*“ (R-SMAD) 1,5 und 8. Diese wiederum binden zytosolisches SMAD4 und der Komplex transloziert in den Zellkern, um Zielgene zu regulieren. Hierzu zählen unter anderem „*inhibitor of DNA-binding*“ (Id)-Proteine 1-3. Diesen wird Einfluss auf Zellschicksal und Erhalt zugeschrieben. So führt eine BMP-vermittelte Id1-Expression beispielsweise zu Verhinderung der Differenzierung und dem Erhalt embryonaler Stammzellen.⁶⁶ Neben den BMP gibt es weitere extrazellulär sezernierte Faktoren, welche Einfluss auf die Signalkaskade nehmen können. Wichtige Inhibitoren sind beispielsweise Proteine wie Noggin, Gremlin, Chordin oder auch Chordin-like-1. Ependymale Zellen sezernieren, hier beispielhaft, Noggin zur Aktivierung humaner NSC und fördern so Zellschicksal-Entscheidungen.⁶⁷

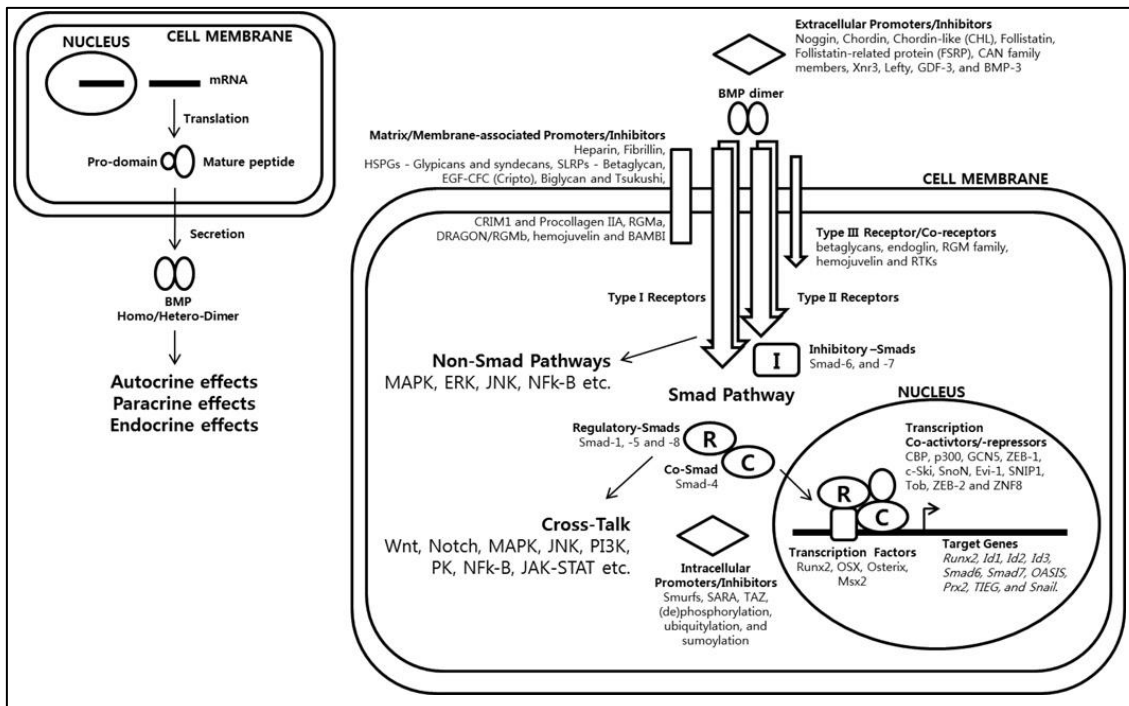


Abbildung 1.5. Überblick des BMP-Signaling

BMP-Liganden können kontextindividuell eine Vielzahl von zellulären Signalen bedienen. So bestehen Wechselwirkungen zu anderen zentralen Signalwegen wie Notch- oder Wnt-Signaling. Extrazelluläre Inhibitoren können um Bindungsstellen von BMPs konkurrieren und Signale modulieren. Abk.: „*extracellular-signal regulated kinases*“ (ERK), C-Jun-N-terminale Kinasen (JNK), „ Runt-related transcription factor 2“ (RunX2), „ Old astrocyte specifically induced substance“ (OASIS), Peroxiredoxin-2 (Prx2), „TGF-beta inducible early gene“ (TIEG), Zinkfinger Protein 8 (ZNF8), Zinkfinger E-Box-bindendes Homöobox Protein (ZEB). (Quelle: Kim M, Choe S. BMPs and their clinical potentials. BMB Rep. 2011;44(10):619-634. doi:10.5483/BMBRep.2011.44.10.619)

Im Gliom zeigen Expressionsanalysen BMP-abhängige Implikationen zur Ableitung von Prognose und Tumorstadium. *In -vitro* erbrachten Untersuchungen Hinweise auf BMP7-vermittelte Differenzierung von GSC mit einhergehender Reduktion von Stammzellmarkern und Selbsterneuerung. *In -vivo* konnte in der selben Untersuchung eine BMP7-vermittelte Reduktion der Kanzerogenität nach GSC-Transplantation in Mäusen beobachtet werden.⁶⁶

Für BMP4 konnte im Gliom eine signifikant niedrigere Expression nachgewiesen werden. Hier zeigte sich ebenfalls eine BMP4-vermittelte Reduktion von Proliferation und vermehrte Apoptose von GSC.⁶⁸ Gleichzeitig zeigen sich Korrelationen zwischen schlechter Prognose des GB und niedriger BMP4-Expression. Eben solche Beobachtungen wurden für eine Reihe pädiatrischer Hirntumore gemacht.⁶⁹ Auch Untersuchungen zu BMP2 zeigten eine vermittelte Chemosensitivierung für TMZ über HIF-1 Destabilisierung. Gleichzeitig scheinen GSC über Sezernierung von Inhibitoren wie Gremlin Strategien gegen BMP-vermittelte Differenzierung von GSC zu besitzen.⁶⁶

Diese beispielhaften, und weitere Ergebnisse weisen auch für den BMP-Signalweg interessante therapeutische Optionen aus, welche zukünftig weitere Forschungsbestreben als notwendig ausweisen. Eine klinische Repräsentation erfährt der BMP-Signalweg so beispielsweise in einer aktuell laufenden multizentrischen Phase-I Studie (NCT02869243) zur Therapie des GB mittels human-rekombinantem BMP4 über konvektionsverstärkte Zufuhr - ein erster Schritt zur notwendigen Prüfung klinischer Übertragbarkeit der *in-vitro* Implikationen.

1.4 Relevante Zelltodmechanismen

In Anbetracht der Tumortherapie ist ein selektiver Zelltod der Tumorzellen das präskriptive Ziel schlechthin. Aus wissenschaftlicher Sicht ist ein Sprechen vom Zelltod an sich allerdings ungenau und bedarf tiefgreifenderer Betrachtung.

Der programmierte Zelltod bezeichnet im Gegensatz zum ungerichteten Zelltod einen Mechanismus des Organismus zur Regulation von Zellzahl und Schutz vor ungewollten, beispielsweise defekten Zellen. Demgegenüber steht jener ungerichtete Zelltod – die (passive) Nekrose, welche unter anderem durch extreme physikalische Einwirkungen wie Hitze, Säure oder Druck ausgelöst werden kann.⁷⁰

Der Prototyp des gerichteten Zelltods ist die Apoptose. Diese lässt sich wiederum einteilen in eine intrinsische und extrinsische Kaskade, welche letztlich zum Zelltod führen. Die intrinsische Kaskade beginnt zumeist durch intrazelluläre Signale wie eine Anreicherung des Tumorsuppressors p53 nach DNA-Schädigung. Diese Signale führen zu einem Überhang an pro-apoptotischen Faktoren wie Bax, Bad, Bim und Bid - Proteinen der Bcl-2-Familie. Diese konkurrieren im Bereich der Mitochondrien mit anti-apoptotischen Faktoren wie dem Bcl-2-Protein und regulieren hierdurch den Cytochrom-c Efflux. Zytosolisches Cytochrom-c wiederum assoziiert mit Apaf-1 und Procaspase-9 und bildet das sogenannte Apoptosom, welches zur Aktivierung von Caspase-3 führt und die Apoptose schließlich auslöst. Hierdurch kommt es zur Auflösung des Zytoskeletts und Zerfall in Zellfragmente. Dem gegenüber beginnt der extrinsische Signalweg an Death-Rezeptoren wie CD95. Nach Bindung eines Liganden kommt es zur Bildung eines Komplexes mit dem „*Fas-associated death domain*“ (FADD)- Protein und Pro-Caspase-8 Molekülen. Dieser Komplex aktiviert daraufhin Caspase-8,

welche ihrerseits Caspase-3 aktiviert und sich extrinsische und intrinsische Kaskade treffen.⁷⁰

Neben diesem programmierten Zelltod von Typ I gibt es weitere Arten des programmierten Zelltodes, teils ihrerseits mit weiteren Unterscheidungsmöglichkeiten. Hierzu zählt, und soll im Folgenden genauer betrachtet werden, beispielsweise auch die Autophagie bzw. der Autophagie-abhängige Zelltod.

1.4.1 Autophagie

Der Begriff Autophagie beschreibt einen evolutionär konservierten Mechanismus einer Zelle zur eigenen Degradierung im Rahmen der zellulären Qualitätskontrolle. Derart können defekte, abnorme oder alte Organellen und Proteine entsorgt und eine zytoprotektive Wirkung entfaltet werden. Dabei behaftet die Autophagie ein Dualismus - denn neben einer zytoprotektiven Komponente kann sie ebenso an einem autophagischen Zelltod beteiligt sein.

Grundsätzlich wird der Mechanismus unter Substanz-/ Nahrungsmangel aktiviert. Durch die Degradierung überflüssiger Strukturen können die Bausteine des Metabolismus in ihrer ursprünglichen Form erneut der zellulären Maschinerie angeboten werden. Die Autophagie dient in dieser Funktion einem Erhalt der zellulären Homöostase und versorgt unter Auflösung nicht-essenzieller Komponenten jene essenziellen mit den notwendigen Grundstoffen. Darüber hinaus sichert die Autophagie das Überleben einer Zelle durch Entfernung schädlicher Bestandteile, defekter Organellen oder fehlerhafter Proteine.⁷¹

Eine Überaktivität der Autophagie im Sinne einer autophagischen Degradierung, über den positiven Beitrag zur Homöostase hinaus, wohnt die Funktion eines Zelltodmechanismus inne. Ein übermäßiger Abbau von Organellen, beispielsweise auch solchen, welche sich zum zellulären Überleben essenziell verhalten, kann den Einfluss der Autophagie von einer überlebensfreundlichen Prozedur in einen terminalen zellulären Akt überführen. Die Autophagie lässt sich dabei in Abhängigkeit ihrer mechanistischen Abläufe selbst erneut unterteilen - so existieren neben einer Makroautophagie die im Folgenden hauptsächlich Betrachtung findet, eine Mikroautophagie sowie eine Chaperon-abhängige Autophagie.⁷¹

Die zellulären Mechanismen der Makroautophagie, im Weiteren Autophagie genannt, sind komplex und werden minutiös über unterschiedliche Signalkaskaden

beeinflusst und durch eine Vielzahl von Stressoren ausgelöst. Diese Stressreize konfluieren zumeist in einer Aktivierung der „uncoordinated 51-like kinase 1“ ULK1 zur Bildung eines Autophagosoms. Abgeleitet vom endoplasmatischen Retikulum, genauer im Bereich des Omegasoms, kommt es durch ULK1 zur Rekrutierung der katalytischen Untereinheit VPS34 der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K). Die sich im Rahmen dieser Prozesse bildende Phagophore rekrutiert einen E3-Ubiquitin-ähnlichen Komplex - ATG12-ATG5-ATG16L1. Letzterer seinerseits katalysiert daraufhin die Bindung von Phosphatidylethanolamin (PE) und „microtubule associated protein 1 light chain 3“ LC3. Ebenso wird eine anschließende Konversion von zytosolischem LC3-I zu einem membranständigen LC3-II katalysiert. Hierdurch kommt es zur Elongation des Autophagosoms. Durch eine SNARE-vermittelte Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom kommt es zur Bildung des Autolysosoms und die Degradierung zellulärer Bestandteile wird ermöglicht.⁷²

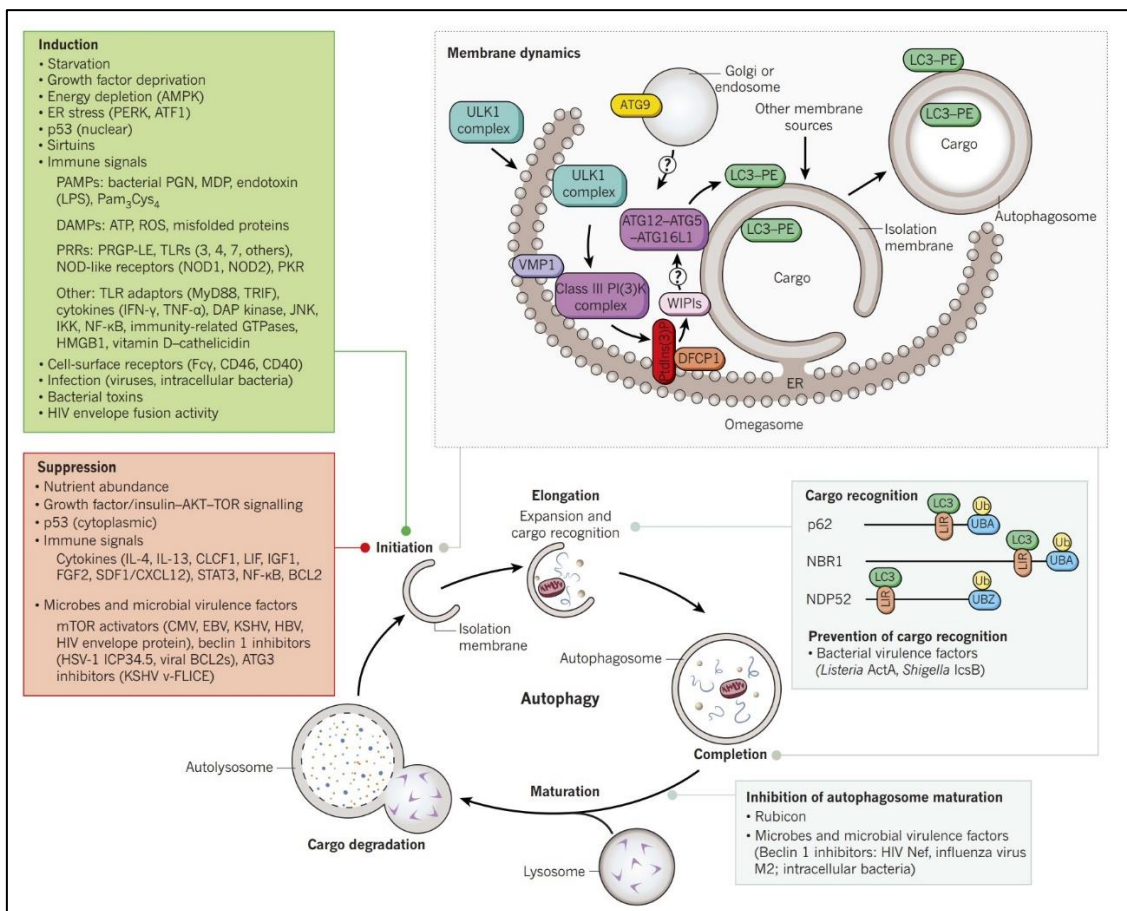


Abbildung 1.6. Autophagie-Maschinerie und Ausbildung des Autolysosoms

Abk. „Double FYVE-containing protein 1“ (DFCP1), „calcium binding and coiled-coil domain 2“ (NDP52), „Neighbor of BRCA1 gene 1 protein“ (NBR1), „Vacuole membrane protein 1“ (VMP1), „WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein“ (WIPI). (Quelle: Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. Nature. 2011;469(7330):323-335. doi:10.1038/nature09782)

Aufgrund ihrer massiven Auswirkungen auf die zelluläre Homöostase wird der Autophagie eine Schlüsselfunktion bei Tumorentstehung, -progress und Therapieresistenz zugeschrieben. Wichtige Bestandteile der autophagischen Maschinerie wie „*autophagy and beclin1 regulator 1*“ (AMBRA1) und Beclin1 gelten als Tumorsuppressoren. Gleichzeitig gehen mit intakter Autophagie weniger oxidativer Stress und eine höhere genomische Stabilität einher.⁷¹

Nichtsdestotrotz wird in der Literatur zunehmend eine tumorfördernde Rolle der Autophagie insbesondere in einer späteren Phase der Tumorentstehung und Erkrankung diskutiert. So erleichtert die Autophagie Tumorzellen Stress durch Substratmangel und Hypoxie zu überleben.⁷¹ Gleichzeitig entsteht zunehmend Evidenz hinsichtlich einer autophagischen Förderung eines stammzellartigen Phänotyps von Zellen innerhalb eines Tumors. Untersuchungen erwiesen Interaktionen von Autophagie und aktiven CSC-typischen Signalwegen. So existiert eine Hedgehog-vermittelte Einflussnahme auf die Proteinhomöostase über die Regulation der Autophagie und Prozesse der NOTCH1-Degradierung zeigen Abhängigkeit von Proteinen der Autophagie-Maschinerie wie ATG16L.⁷³ Gleichzeitig zeigen insbesondere CSC häufig, aufgrund ihrer räumlichen Nischen, Bedarf an alternativen Substratangebot und Mechanismen der Hypoxietoleranz, welche unter anderem durch die Autophagie geboten werden.⁷²

Die Waage der Gegensätzlichkeit scheint für die Autophagie nicht stets im Gleichgewicht. So lässt sich nicht eindeutig sagen, in welchen Fällen Autophagie als Überlebensvorteil dient und in welchen anderen sie einen Zelltod vorantreibt. Jedoch lassen sich durch voranschreitende Evidenz die Inhalte ihrer Waagschalen und damit die Treiber für eine tumorsupprimierende oder -fördernde Wirkung genauer benennen. So führt eine erhöhte Beclin-1 Expression in verschiedenen Gliomzellen zur Inhibition der Proliferation und Zellarrest.⁷⁴ Generell lässt sich für eine Vielzahl von ATG-Proteinen, darunter LC3, und p62, eine Überexpression insbesondere in perinekrotischen Arealen des GB nachweisen. Letzteres spricht in diesen Fällen für zellerhaltende Autophagie.⁷⁴ Ein zentraler Inhibitor der ULK1, der Komplex mTORC1 wird unter anderem über AMPK reguliert. Inhibitoren von mTOR zeigten in Brustkrebszellen eine Steigerung zellerhaltender Autophagie,⁷¹ gleichzeitig wurde in Gliomzellen eine tumorsupprimierende Autophagie durch Inhibition von mTOR via Rapamycin erzielt.⁷⁴ Eine Steigerung des, mTORC1

negativ regulierenden, AMPK induzierte in unterschiedlichen Tumoren durch entsprechende mTORC1 Reduktion wiederum tumorfördernde Autophagie.⁷¹

Diese Komplexität, allein bei Betrachtung des mTORC1-Komplexes, veranschaulicht auf einfache Weise wie unvorhersehbar Autophagie auf Tumorerhalt wirken kann. Teils paradoxe Wirkungen der Autophagie lassen sich nur auf die Existenz minutiöser, kontextsensibler Mechanismen zurückführen - Mechanismen, die aktuell nicht vollumfänglich verstanden werden.

Gleichzeitig bestehen Sonderformen der Autophagie, welche aufgrund ihrer dedizierten zellulären Vorgänge unterschieden werden können und das Konstrukt möglicher Prozesse der Selbstdegradierung mit zusätzlicher Komplexität behafteten. Hierzu zählt unter anderem der Prozess der selektiven Autophagie von Mitochondrien, die Mitophagie.⁷⁵ Morphologisches Charakteristikum der Mitophagie ist dabei die Lokalisation von Mitochondrien innerhalb eines Mitophagosoms. Die Abläufe zur Elimination von Mitochondrien können ihrerseits wiederum anhand zentraler Schlüsselmechanismen unterschieden werden, so existieren Ubiquitin-abhängige und -unabhängige Prozesse.⁷⁵ Eine gut verstandene Signalkaskade der Mitophagie ist maßgeblich abhängig von einer PTEN-induzierte Kinase 1 (PINK1)-vermittelten Rekrutierung von Parkin in das Mitochondrium. Parkin seinerseits bewirkt die Ubiquitinierung mitochondrialer Oberflächenproteine und führt dadurch zur Akkumulation von Autophagie-Rezeptoren, welche die Integration des Mitochondriums in das Autophagosom vermitteln.⁷⁵ Auch die Mitophagie kann in zunehmenden Evidenzen mit einem Vorgang des Zelltods durch eine exzessive mitochondriale Degradierung in Verbindung gebracht werden^{76,77} und veranschaulicht zusätzlich die tiefgreifende Komplexität autophagischer Vorgänge. So erscheint es im Rahmen der Forschung zu Fragen der Autophagie fortlaufend notwendig, die Autophagie stets im Kontext des individuellen Zelltyps, ihres Mikromilieus sowie ihrer spezifischen zellulären Prozesse zu interpretieren.

1.5 Relevante niedermolekulare Verbindungen

1.5.1 GANT61

GANT61 ist eine synthetische niedermolekulare Verbindung, welche im Bestreben des Auffindens einer Inhibition des Hh-Signalwegs auf Ebene der Gli-Transkriptionsfaktoren entdeckt wurde.⁷⁸ Die Implikationen einer Inhibition des Hh-Signalwegs zur effizienten Beeinträchtigung stammzellartiger Zellen wurden bereits in 1.2.1 und 1.3.2 dargestellt. Der erste Hedgehog-Inhibitor mit Zulassung zur therapeutischen Anwendung für maligne Erkrankungen - Vismodegib wirkt durch eine Inhibition von SMO und unterbindet dadurch die Aktivierung der Gli-Transkriptionsfaktoren.⁵⁶ Diese Signalwegmodulation betrifft in maßgeblicher Weise entsprechend den kanonischen Hh-Signalweg und zeigt effiziente antitumorale Effekte insbesondere im Basalzellkarzinom.⁷⁹ Das zunehmende Verständnis der ebenfalls möglichen nicht-kanonischen Aktivierung von Gli-Transkriptionsfaktoren und experimentelle Beobachtungen einer teilweise nur mangelnden Hh-Inhibition durch die Inhibition von SMO in anderen Tumoren, implizierten im Verlauf eine effektive Inhibition des Hh-Signalings durch die direkte Inhibition der Gli-Transkriptionsfaktoren.^{58,80} Tatsächlich weist eine jüngst veröffentlichte Phase II Studie der Behandlung mit Vesmodegib keine signifikanten klinischen Effekte auf Gesamtüberleben oder PFS für das GB nach.⁶⁴ Als weitmöglichstes „Downstream“-Ziel erscheint die direkte Inhibition der Gli-Transkriptionsfaktoren eine umfängliche Inaktivierung des Hh-Signalings zu ermöglichen. Die gezielte Suche nach spezifischen Inhibitoren dieses Angriffspunktes führte durch Lauth et al. zur Entdeckung von GANT61.⁷⁸ Im Rahmen eines zellbasierten Screenings in GLI1-exprimierenden HEK293-Zellen fanden die Autoren zwei Moleküle, GANT61 und GANT58 („Gli-Antagonist 61 bzw. 58“, NSC 136476 und NSC 75503), welche eine suffiziente GLI1-, sowie GLI2-Inhibition bewirkten. GANT61 ist dabei ein Hexahydropyrimidin-Derivat, welches zur Akkumulation von GLI1 im Nucleus ohne konsekutive Aktivierung der Zielgene führt.⁷⁸ Eine Vielzahl von Evidenzen zeigt seither antitumorale Effekte von GANT61 in unterschiedlichen Tumoren mit gleichzeitiger Überlegenheit gegenüber einer Inhibition auf Ebene von SMO.⁸¹ In humanen GB-Zellen U251MG und U87MG zeigten Li et al. eine Induktion von Apoptose, verminderte Proliferation und Sensitivierung

gegenüber TMZ durch Verwendung von GANT61.⁸² Obgleich klinische Erprobungen aktuell noch ausstehen, erweist sich die Verbindung als interessantes Therapeutikum zum Eingriff in die GSC-Population im GB, durch seine effiziente Inhibition des Hh-Signalings.

1.5.2 Arsentrioxid

Arsenitoxid (ATO) wird geschichtlich seit zwei Jahrtausenden durch Menschen zu medizinischen Zwecken genutzt. Bereits in der Antike wurde es von Hippokrates als Salbe verwendet. Der Pionier der Pharmakologie, Dioskurides beschrieb ATO als Medizin, welche abnorme Wucherungen unterdrücke und die Haare zum Ausfall treibe. Denkt man an heutige Chemotherapeutika, so weiß jeder Laie um genau diese Eigenschaften vieler Präparate.⁸³

Chemisch entsteht ATO bei der Verbrennung von freiem Arsen, wobei die Verbindung als weißes Pulver ausfällt. Neben seiner Verwendung als medizinische Substanz, wurde ATO seit jeher auch als Gift genutzt – entsprechend der Beiname Giftmehl.⁸⁴ Seine Blütezeit in der Verwendung als Medizin erfuhr ATO im neunzehnten Jahrhundert. Hier wurde es in Massen für eine Vielzahl von Erkrankungen, wie Leukämie, Asthma oder Psoriasis angewandt. Insbesondere für die Leukämie gab es allerdings bereits ab dem siebzehnten Jahrhundert eine zunehmende Verwendung als Therapeutikum.⁸³

Mit Einfuhr von klassischer Radio- und Chemotherapie kam es zu einer zunehmenden Ablehnung der Verwendung von ATO für medizinische Zwecke, insbesondere aufgrund seiner toxischen Eigenschaften. So waren in Folge seiner Blüte und großzügigen Verwendung eine Vielzahl von Nebenwirkungen entdeckt worden – hierunter insbesondere dermatologische Erkrankungen und maligne Entartungen. Erst durch Forschungsbestreben in China kam es zu einer Renaissance der Betrachtung von ATO als Therapeutikum. So konnten im späten zwanzigsten Jahrhundert Untersuchungen zur Verwendung von ATO bei der akuten Promyelozytenleukämie große Erfolge aufzeigen. Die Ergebnisse dieser Studien waren derart eindeutig, dass es weltweit zu einer Wiederentdeckung von ATO kam. Auch heute noch ist die Verwendung zur Therapie der akuten Promyelozytenleukämie etabliert.⁸³

Der zellulär wirksame Baustein des ATO ist das trivalente Arsen, welches chemisch insbesondere an Thiolgruppen des Cysteins binden kann. Hierdurch werden beispielweise Konformationsänderungen von Proteinen hervorgerufen, wodurch Alteration ihrer Funktionen resultieren. Die sich daraus ergebende fehlende Spezifität spiegelt sich in der Vielzahl der Mechanismen, auf die ATO Einfluss nehmen kann, wider.⁸³ ATO konnte in unterschiedlichen Gliomzell-Modellen sowohl Apoptose als auch einen autophagischen Zelltod auslösen.⁸⁵ So konnte eine ATO-vermittelte Expression des Todesrezeptors DR5 mit konsekutiver gesteigerter extrinsischer Apoptose nachgewiesen werden.⁸⁶ Nachfolgende Untersuchungen zeigten sich hier teils widersprüchlich, nichtsdestotrotz gibt es zunehmend Evidenz, dass ATO Prozesse der Apoptose und Autophagie regulieren kann.^{71,86}

Darüber hinaus zeigt sich in stetig wachsendem Umfang Evidenz für eine ATO-vermittelte Beeinflussung CSC-relevanter Signalwege. Mehrere Autoren zeigten eine Reduktion der Expression von Zielgenen des Notch- sowie Hedgehog-Signalweges in Tumoren und spezifisch in GSC.⁸⁷⁻⁹⁰ Gleichzeitig wurde hierdurch eine Reduktion von Stammzellmarker-Proteine wie SOX2 und CD133 in GSC beobachtet und Apoptose induziert.⁸⁹ Vermutet wird mechanistisch hier unter anderem eine direkte Bindung an Gli-Transkriptionsfaktoren mit konsekutiver Inaktivierung.⁹¹ *In -vitro* Erfolge und Beobachtungen führten auch für das ATO zur klinischen Prüfung. So erfolgte die Testung Arsentrioxids als Therapeutikum für das GB durch Kumthekar und Grimm et al. in einer Phase-II Studie.⁹² Es zeigte sich kein Benefit durch die Applikation von ATO bei Patienten mit GB. Die Autoren diskutieren ATO allerdings im Rahmen von Therapiekombinationen als eventuell sinnvolle Ergänzung. Han et al.⁹³ untersuchten in einer klinischen Phase-I Studie die Wirkung von ATO im GB nach lokaler Applikation mittels Ommaya⁹⁴-Reservoirs. Nach diesem Nachweis ausreichender klinischer Sicherheit können die zukünftigen Ergebnisse der sich anschließenden Phase-II Studie mit Spannung erwartet werden.

Ogleich seiner manifesten Wirkungen insbesondere auf GSC erscheint ATO aktuell kein Heilmittel des GB zu sein. Dennoch können molekulare Angriffspunkte für eventuell zielgerichtete Therapien aus Mechanismen und Beobachtungen der Wirkung von ATO abgeleitet werden, um künftig effizientere Strategien zur Behandlung des GB aufzufinden.

1.5.3 (-)-Gossypol

Gossypol ist ein pflanzliches Polyphenol, welches in Samen der Baumwollpflanze natürlich vorkommt. Es existieren zwei Enantiomere von denen (-)-Gossypol oder AT-101 wirksamere Eigenschaften besitzt. Die Verbindung zeigt zunehmenden Implikationen für die onkologische Forschung aufgrund ihrer zellbiologischen Wirkungen. AT-101 zeichnet sich durch eine spezifische Inhibition von Proteinen der Bcl-2 Familie aus – hierzu zählen Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, und Bcl-w. In einer Reihe von Tumorzellen zeigt AT-101 pro-apoptotische Effekte. Gleichzeitig besitzt AT-101 in Apoptose-resistenten Zelllinien steigernde Effekte auf einen Caspase-unabhängigen, wahrscheinlich autophagischen, Zelltod.⁹⁵

Insbesondere Gliomzellen zeichnen sich durch eine Deregulation der Zelltodmechanismen und eine hohe Resistenz gegenüber Apoptose aus. Hierfür wird unter anderem eine Überexpression anti-apoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie verantwortlich gemacht.⁹⁵ Untersuchungen zeigten einen AT-101-vermittelten Zelltod in Apoptose-resistenten Gliomzellen, welcher sich unter anderem auf die Regulation und Inaktivierung oben genannter Proteine zurückführen lässt. Zunehmende Evidenz zeigt hier Caspase-unabhängige Zelltodmechanismen als zugrundeliegend auf. So scheint maßgeblich eine Steigerung der Autophagie mit entsprechenden autophagischen Zelltod in Gliomzellen durch AT-101 induziert zu werden.⁹⁵ Meyer et al.⁹⁶ wiesen nach ATG5 Depletion in MZ-54 und U343 Gliomzellen eine signifikante Reduktion von Zelltod durch AT-101 nach. Letzteres impliziert eine starke Abhängigkeit der Effekte von AT-101 von zentralen Bestandteilen der autophagischen Maschinerie. Gleichzeitig zeigte sich letzterer Effekt unabhängig von pro-apoptotischen Proteinen wie BAK1 und BAX. Darüber hinaus konnte die Arbeitsgruppe Evidenzen generieren, welche eine AT-101-vermittelte Überaktivierung von HMOX1 mit konsekutiver mitochondrialer Dysfunktion⁹⁷ maßgeblich verantwortlich für die Auswirkungen auf den Zelltod macht. Offenbar scheint die Auslösung eines mitophagischen Zelltodes, als Sonderfall der Autophagie, die AT-101-vermittelte Wirkung auf Apoptose-resistente Gliomzellen zu erklären.

Die Frage nach einer spezifischen Wirkung von AT-101 auf GSC lässt sich aufgrund eines Mangels an Evidenzen nicht zu Genüge elaborieren. AT-101 führt in stammzellartigen U251MG und U87MG zu einer Chemosensitivierung

gegenüber TMZ, dabei deutlich stärker als in ihren nicht-stammzellartigen Gegenstücken.⁹⁸ Die Mechanismen dieser Wirkung sind allerdings unklar. Interessanterweise zeigt sich eine AT-101-vermittelte Inhibition des Hh-Signalweges.⁹⁹ Diese Inhibition wird vermutlich durch eine Interaktion mit SMO bewirkt und könnte als mögliche Erklärung der oberen Beobachtung dienen. Zu einer genaueren Beschreibung von Einflüssen auf GSC, ihrer Signalwege und Auswirkungen auf Apoptose und Autophagie in GSC, wird aktuell weitere Forschung benötigt. Aufgrund seiner Implikationen für die Tumorthherapie erfolgte die klinische Erprobung von AT-101 in der Therapie des GB. Ergebnisse dieser Untersuchung (NCT 00540722) mit Abschluss im Jahr 2017 wurden bisher nicht ausreichend publiziert. Es lässt sich eine entsprechende geringe klinische Relevanz vermuten. Dabei zeigen Untersuchungen in anderen Tumoren durchaus positive Effekte einer Therapie mit AT-101. So konnte für gastroösophageale Tumore eine deutliche Besserung des Gesamtüberlebens gezeigt werden.¹⁰⁰ Ähnlich wie ATO ist auch (-)-Gossypol kein Allheilmittel. Aufgrund seiner distinktiven Eigenschaften erscheint es allerdings im Rahmen von Kombinationsbehandlung und zur Auffindung mechanistischer Angriffspunkte fortwährend als interessantes Objekt weiterer Forschungsbemühungen.

1.6 Ziel der Dissertation

Gliomstammzellen sind maßgeblich beteiligt an Rekurrenz, Resistenz und Progress des Glioblastoms.⁴⁰ Die etablierte Therapie des GB beinhaltet keine zielgerichtete Strategien zur Elimination der GSC innerhalb der Tumore.⁸ Die Diskrepanz zwischen experimentellen Implikationen einer GSC-involvierenden Therapie und den aktuellen klinischen Maßnahmen ergibt sich unter anderem aus dem Fehlen vielversprechender Angriffspunkte.

Im Rahmen dieser Untersuchung soll ein Beitrag geleistet werden, um neue Angriffspunkte zu identifizieren und das Verständnis im Bereich der GSC zu vertiefen. Hierzu finden drei niedermolekulare Verbindungen Betrachtung, darunter Arsentrioxid, GANT61 und AT-101.

ATO ist ein Molekül mit mannigfaltigen Wirkungen auf zelluläre Prozesse. Hierzu zählen unter anderem die Induktion von Apoptose und Autophagie.⁸⁵ Gleichzeitig zeigt ATO regulierende Einflüsse auf zentrale Signalwege tumorpropagierender

Zellen, wie den Notch⁸⁷- und Hh⁹⁰-Signalweg. Bereits bestehende Evidenz zeigt eine ATO-vermittelte Reduktion von Proliferation und Regeneration von GSC.⁸⁷ Gleichzeitig besitzt ATO in der klinischen Erprobung keine therapeutische Wirksamkeit.

GANT61 ist ein spezifischer niedermolekularer Inhibitor der Gli-Transkriptionsfaktoren und wurde 2007 durch Lauth et al. im Bestreben des Auffindens einer suffizienten Hh-Signalweg-Blockade entdeckt.⁷⁸ Viele Tumore zeigen eine erhöhte Aktivität des Hh-Signalweges und insbesondere für CSC wird eine Bedeutung des Signalweges aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu Stammzellen postuliert.⁵⁶ Erste Versuche der Einflussnahme auf den Hh-Signalweg erfolgten durch Inhibition des SMO, teilweise ohne suffiziente Signalweg-Inhibition. Das Bild einer nicht-kanonischen Signalweg-Aktivierung gewann an zunehmender Relevanz in einer Vielzahl von Tumoren.⁵⁸ Als „*Downstream*“-Ziel sind die Gli-Transkriptionsfaktoren ein vielversprechender Angriffspunkt einer GANT61-vermittelten Inhibition des Hh-Signalweges. Eine Vielzahl von Tumoren zeigt unter GANT61 Behandlung reduzierte Proliferation und vermehrten Zelltod. Dabei gibt es sowohl Hinweise auf Apoptose als auch einen autophagischen Zelltod unter Verwendung von GANT61.¹⁰¹ In Gliomzellen konnte zudem eine Chemosensitivierung durch die Substanz gezeigt werden.⁸²

Sowohl Hh- als auch Notch-Signalweg kommen entscheidende Funktionen bei Erhalt und Aktivität von CSC zu.⁴⁰ Als genetisch hochkonservierte Signalwege üben sie Einfluss auf eine Vielzahl zellulärer Prozesse aus. So sind sie beteiligt an Regulation von Zellzyklus, Differenzierung, Migration^{33,51,53} sowie Apoptose und Autophagie¹⁰¹ - Schlüsselmechanismen der Entstehung und Resistenz von Tumoren.

Eine zentral zu prüfende Hypothese der Arbeit stellt die Frage nach einer durch Notch- und Hh-Inhibition vermittelten Reduktion von Stammzeleigenschaften mit konsekutiver Reduktion zellerhaltender Funktionen. Dabei lassen sich durch die Unterschiedlichkeit der Substanzen eventuelle Ableitungen der Relevanz der einzelnen Signalwege machen. Im ersten Fall des ATO besteht eine unspezifische direkte Einflussnahme auf beide Signalwege sowie weitere zelluläre Mechanismen (u.a. Autophagie und Apoptose) und im zweiten Fall des GANT61 besteht eine spezifische Inhibition des Hh-Signalwegs. Hierdurch stellt sich die zentrale Frage, nach einer Überlegenheit einer Inhibition mehrerer Signalwege gegenüber

einer einfachen Hh-Inhibition. Ist der Hedgehog-Signalweg essenziell für den Erhalt von GSC? Lassen sich Stammzellcharakteristika suffizient durch eine alleinige Hh-Signalwegblockade reduzieren? Besteht ein Benefit aus einer Beeinflussung von sowohl Hh- als auch Notch-Signalweg?

Des Weiteren wird im Rahmen dieser Arbeit eine Effektpotenzierung mittels AT-101 geprüft. (-)-Gossypol ist eine natürliche Substanz die als pan-Bcl-2-Inhibitor in Zellen fungieren kann.⁹⁶ Unter Applikation von AT-101 können zentrale Schalter der Apoptose und Autophagie unmittelbar beeinflusst werden. Es zeigt sich eine AT-101-vermittelte Mitophagie in Gliomzellen mit potenzierenden Effekten auf die Therapie mit TMZ.⁹⁶ In seiner Funktion zur Beeinflussung des Gleichgewichts zwischen zellerhaltender und -zerstörender Autophagie/ Mitophagie erschien AT-101 als vielversprechende Ergänzung zur Standardtherapie, allerdings auch hier klinisch ohne manifesten Erfolg. Im Rahmen der Untersuchung wird geprüft, ob der Einsatz von (-)-Gossypol unter Behandlung mit ATO oder GANT61 zur Potenzierung der Effekte führt. Können Effekte der Reduktion stammzellassoziierter Eigenschaften und Proliferation, sowie Steigerung von Zelltod unter ATO oder GANT61 mittels Zugabe von AT-101 gesteigert werden? Lässt sich eine Synergie in Kombination der Substanzen feststellen?

Zentrale Zielgrößen der Stammzeleigenschaften, welche Betrachtung finden, sind Fähigkeiten der Proliferation und Regeneration; Fähigkeiten zur Bildung von Tumorsphären; Kapazität der Migration; die Expression typischer Markerproteine sowie die Resistenz gegenüber Radiotherapie.

Die Hypothesen der Arbeit werden an, durch Günther et al.¹⁰² beschriebenen, Gliomstammzell-Linien geprüft - im weiteren GS-Zellen genannt. Diese Zelllinien entstammen ursprünglich insgesamt neun Proben von Glioblastomen, welche nach Isolierung auf Einzelzell-Ebene in Neurosphären-Medium kultiviert wurden. Dabei finden im Rahmen dieser Arbeit die entstandenen GS-Linien 3, 5 und 8 Verwendung. Alle Tumorproben letzterer Zelllinien entstammen dabei primären Resektionen neu diagnostizierter, unbehandelter Patienten.

Charakteristika, phänotypische Eigenschaften und Expressionsprofile der Zelllinien wurden detailliert durch Günther et al. beschrieben. Hierbei zeichnen sich die Zelllinien GS-5, -3 und -8 phänotypisch durch Wachstum als Neurosphären aus. Die drei sphärischen Zelllinien zeigen eine Expression relevanter

Stammzell-Marker wie CD133 (insb. GS-3 und -8), SOX2 (insb. GS-5 und -8), Nestin und OLIG2, allerdings nur eine geringe Expression von CD44.¹⁰²

Nach sechstägiger Kultivierung in 10% fötalem Rinderserum zur Prüfung einer Differenzierung in unterschiedliche Zelltypen wurde für alle sphärischen Zelllinien eine signifikante Steigerung von Neurofilament (NF), Galactocerebrosidase (GalC) und „*glial fibrillary acidic Protein*“ (GFAP) auf Einzelzell-Ebene beobachtet. Entsprechend ist von der Möglichkeit einer Differenzierung der Zellen in Neurone, Oligodendrozyten und Gliazellen auszugehen.¹⁰²

Nach xenogener Transplantation in Mäuse von 1000 Zellen der entsprechenden Zelllinie kam es bei allen sphärischen GS-Zellen in 100% der Fälle zu einer Tumormorphose mit Versterben nach 81-125 Tagen und diffusem Wachstumsmuster.¹⁰²

Zusätzlich erfolgt die Prüfung an einer, durch die Arbeitsgruppe generierten, Zelllinie – 17/02. Diese Zelllinie entstammt Tumorzellen eines männlichen Patienten mittleren Alters mit Glioblastom-Rezidiv. Es erfolgten zwei Zyklen Radiation mit 60 und 36 Gy, sowie eine Chemotherapie mit TMZ. Molekularbiologisch wurde eine MGMT-Promotermethylierung nachgewiesen. Die Zelllinie entstand nach laboreigenem Protokoll. Letztlich soll hierdurch geprüft werden, ob Ergebnisse der Behandlung mit AT-101 und GANT61 oder ATO in GSC unterschiedlicher ursprünglicher Tumore reproduzierbar sind. Hieran schließen sich Fragen nach einer divergierenden Wirkung auf GSC, welche bereits einem Selektionsdruck durch Radiation und Chemotherapie ausgesetzt waren.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellen und Kulturmedium

Tabelle 1.1.1. Zellen.

Zellen	Beschreibung und Herkunft	Kulturmedium
GS-3, -5, -8	Humane Gliomzellen (Grad IV) ¹⁰² (Zur Verfügung gestellt durch Kathrin Lamszus, Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf)	Neurobasal + Zusätze
MZ-54	Humane Gliomzellen (Grad IV) ¹⁰³	DMEM Glutamax, hoher Glukosegehalt
HEK293T	Immortalisierte humane embryonale Nierenzellen ¹⁰⁴	DMEM Glutamax, hoher Glukosegehalt
17/02	Humane Gliomzellen (Grad IV) generiert durch Linder et al. ¹⁰⁵	Neurobasal + Zusätze

Tabelle 1.1.2. Kulturmedium.

Medium	Inhaltstoffe	Katalognummer
DMEM	<i>"Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture"</i> 500 ml DMEM (+1 g/L Glukose, +L-Glutamin +Pyruvat) 50 ml FBS 5 ml Penicillin-Streptomycin Lösung 10,000 U/ml	31885023
DMEM Glutamax, hoher Glukosegehalt	500 ml DMEM, hoher Glukosegehalt (+4.5 g/L Glukose, +L- Glutamin, -Pyruvat) 50 ml <i>Fetal Bovin Serum</i> (FBS) 5 ml Penicillin-Streptomycin 10,000 U/ml 5 ml Glutamin 200 mM	61965026
DPBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung von Dulbecco: ohne CaCl ₂ , MgCl ₂ , Phenolrot	14190094
Neurobasal + Zusätze	Neurobasal-A Medium 1x GlutaMAX 1x B27 Supplement 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 20 ng/ml EGF 20 ng/ml FGF shRNA Knockdown: 0.5 µg/ml Puromycin	10888-022
Opti-MEM	Serumreduziertes Medium + L-Glutamin, + HEPES, - Phenolrot	11058021

OTC-Medium	DMEM/F-12 1x B27 Supplement 1x N-2 Supplement 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin	31885023
------------	--	----------

Tabelle 1.1.3. Bakterien.

Bakterien	Genotyp	Firma	Katalognummer
<i>E. coli</i> - DH5αT1R	F- φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 endA1 recA1 relA1 gyrA96hsdR17 (r _k ⁻ , m _k ⁺) phoA supE44 thi-1 tonA	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	C7373-03

Tabelle 1.1.4. Medium und Agar für Bakterien.

Name	Firma	Katalognummer
LB-Agar	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	X969.1
LB-Medium	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	X968.1

2.1.2 Chemikalien, Puffer und Lösungen

Tabelle 1.2.1. Chemikalien zur Behandlung der Zellen.

Substanz	Synonym	Firma	Katalognummer
(-)-Gossypol	AT-101	Tocris Bioscience, Bristol, UK	1964
Arsentrioxid	ATO, As ₂ O ₃	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	1327-53-3
Dimethylsulfoxid	DMSO	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	A994.1
GANT61	NSC 136476	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	500579-04-4
Staurosporin	STS	Enzo Life Science, Lausen, Schweiz	380-014-M001

Tabelle 1.2.2. Liste aller Chemikalien, Zusätze und Enzyme der Experimente.

Substanz	Firma	Katalognummer
Agarose	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland	11406.02
Ammonium-Persulfat (APS)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland	A2941
B-27 Supplement	Gibco, Darmstadt, Deutschland	12587-010
<i>Bovine Serum Albumin (BSA)</i>	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	8076.3
Deck-Medium mit DAPI	Dianova, Hamburg, Deutschland	SCR-38448
DEPC-H ₂ O	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	T143.1
dNTP-Mix 10 mM	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA	18427088
EGTA	AppliChem, Darmstadt, Deutschland	A0878
Ethanol (99.8%)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	32205
<i>FastStart Universal Probe Master-Mix</i>	Roche Diagnostics, Risch, Schweiz	4913957001
Fötales Kälberserum (FBS)	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA	10270106
Glukose	AppliChem, Darmstadt, Deutschland	A3666,1000
Glutamin (Glutamax Supplement)	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA	35050038
Glycerol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland	A2926,0100
Glycin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland	A1067,5000
HEPES	AppliChem, Darmstadt, Deutschland	A1069,1000
Humaner Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	Peptotech, Hamburg, Deutschland	AF-100-15-1MG
Humaner Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF)	Peptotech, Hamburg, Deutschland	AF-100-18C.500UG
<i>Imperial Protein Stain</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	24615
Isopropanol	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	67-63-0
KCL-Lösung	AppliChem, Darmstadt, Deutschland	A1164.0250
Laminin	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland	L2020-1MG
L-Glutamin (200 mM)	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA	25030024
Methanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	322415
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	T145.2
N-2 Supplement	Gibco, Darmstadt, Germany	17502048
NaCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	433209
NaOH	AppliChem, Darmstadt, Deutschland	A6829,0500

Natriumlaurylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	CN30.3
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland	A0964,9100
<i>PhosphoSTOP</i> Phosphatase-Inhibitor	Roche Diagnostics, Risch, Schweiz	4906845001
<i>Phusion High-fidelity</i> DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	F-530S
<i>Precision Plus Protein ALL BLUE Standard</i>	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA	1610373
Protease-Inhibitor <i>complete</i>	Roche Diagnostics, Risch, Schweiz	4693159001
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	P8340
Puromycin	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland	sc-108071B
<i>Random primer</i>	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA	48190011
Salzsäure 37%	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA	130278
<i>Superscript III reverse transcriptase</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	18080085
T4 Ligase	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA	M0202S
TCEP-Lösung pH 7	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	646541
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	T9281
Triethylamin (TEA)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	1862986
Trifluoressigsäure (TFA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	302031
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	252859
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	T8787
Trypsin-EDTA (0.25%)	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA	25200056
Tween 20	AppliChem, Darmstadt, Deutschland	A1389,0500

Tabelle 1.2.3. Fluoreszenz-Farbstoffe der Durchflusszytometrie.

Fluoreszenz-Farbstoff	Firma	Katalognummer
Annexin-V-APC	BD Pharmingen, Allschwil, Switzerland	550475
PI	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	P4864

Tabelle 1.2.4. Puffer der Durchflusszytometrie.

Puffer	Zusammensetzung
FACS-Puffer	10 mM HEPES/NaOH pH 7.4, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl ₂

Tabelle 1.2.5. Puffer für Western-Blotting.

Puffer	Zusammensetzung
<i>5 x Loading-Puffer</i>	250 mM Tris/HCl pH 6.8 10% SDS 30% glycerol 0.02% Bromophenolblau 5% β -Mercaptoethanol
<i>2 x SDS-PAGE Lysis-Puffer</i>	137 mM Tris/HCl pH 6.8 4% SDS 20% Glycerol 1 mM Protease/Phosphatase-Inhibitor-Cocktail
<i>Gel Electrophoresis Running-Puffer</i>	25 mM Tris 192 mM Glycine 0.1% SDS
<i>SDS-PAGE Separation-Gel</i>	10/12/15% Polyacrylamid (PAA) 375 mM Tris pH 8.8 0.1% SDS, 0.1% APS 0.05% TEMED
<i>SDS-PAGE Stacking-Gel</i>	5% PAA 120 mM Tris/HCl pH 6.8 0.1% SDS 0.1% APS, 0.05% TEMED
Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS)	50 mM Tris 150 mM NaCl, pH 7.4
TBS-Tween (TBS-T)	TBS 0.05% Tween 20
Transfer-Puffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 20% Methanol

2.1.3 Kommerzielle Kits

Tabelle 1.3. Kommerzielle Kits.

Kit	Katalognummer	Firma
<i>EndoFree Plasmid Maxi-Kit</i>	12362	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>EXTRACTME Total RNA-Kit</i>	EM09-100	7Bioscience, Hartheim, Deutschland
<i>Micro BCA Protein Assay-Kit</i>	23235	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
<i>Pierce BCA Protein Assay-Kit</i>	23225	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
<i>QIAamp DNA Mini-Kit</i>	51304	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>QIAquick Gel Extraction-Kit</i>	28704	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>QIAshredder</i>	79656	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>RNeasy Mini-Kit</i>	74106	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.1.4 Antikörper und Primer

Tabelle 1.4.1. Primäre Antikörper für Western-Blotting.

Antikörper	Firma	Katalognummer	Sekundärer Antikörper	Verdünnung
AKT1	Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA	9272	anti-rabbit	1:1000
CHRD1	R&D Systems, Minneapolis, USA	AF1808	anti-goat	1:2000
GAPDH	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland	CB1001	anti-mouse	1: 10,000
LC3	Waltham, Massachusetts, USA	PA1- 16930	anti-rabbit	1:1000
OLIG2	R&D Systems, Minneapolis, USA	AF2418	anti-mouse	1:10000
phospho-AKT1	Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA	4060	anti-rabbit	1:2000
SOX2	R&D Systems, Minneapolis, USA	MAB2018	anti-mouse	1:250
SOX9	abcam, Cambridge, UK	ab185966	anti-rabbit	1:5000
Tubulin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	T6199	anti-mouse	1:5000

Tabelle 1.4.2. Sekundäre Antikörper für Western-Blotting.

Sekundärer Antikörper	Firma	Konjugat	Katalognummer	Verdünnung
Donkey anti-goat	LI-COR, Bad Homburg, Deutschland	IRDye 800CW	926-32214	1:10000
Goat anti-mouse	LI-COR, Bad Homburg, Deutschland	IRDye 800CW	926-32210	1:10000
Goat anti-mouse	LI-COR, Bad Homburg, Deutschland	IRDye 680RD	926-68070	1:10000
Goat anti-rabbit	LI-COR, Bad Homburg, Deutschland	IRDye 800CW	926-32211	1:10000
Goat anti-rabbit	LI-COR, Bad Homburg, Deutschland	IRDye 680RD	926-68071	1:10000

Tabelle 1.4.3. Primäre Antikörper für die Immunfluoreszenz.

Antikörper	Firma	Katalognummer	Sekundärer Antikörper	Verdünnung
OLIG2	R&D Systems, Minneapolis, USA	AF2418	anti-goat	1:5000
SOX2	R&D Systems, Minneapolis, USA	MAB2016	anti-mouse	1:200
SOX9	abcam, Cambridge, UK	ab185966	anti-rabbit	1:250

Tabelle 1.4.4. Sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenz.

Sekundärer Antikörper	Konjugat	Firma	Katalognummer	Verdünnung
Donkey anti-goat	Alexa Fluor 594	Thermo Fisher, Massachusetts, USA	A-11020	1:500
Donkey anti-goat	Alexa Fluor 488	Santa Cruz, Dallas, TX, USA	sc2042	1:10000
Goat anti-mouse	Alexa Fluor 594	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	A-11020	1:750
Goat anti-mouse	Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	A-11029	1:750
Goat anti-rabbit	Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	A-11017	1:750

Tabelle 1.4.5. Primer der Taqman-basierten qRT-PCR.

Zielgen	Primer	Firma
CHK1	Hs00967506_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
CHRD1	Hs01035484_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
GLI1	Hs00608023_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
HES5	Hs01372226_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
HEY1	Hs00969291_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
NOTCH1	Hs01062014_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
NOTCH2	Hs01050702_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
NOTCH3	Hs01128537_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
OLIG2	Hs00300164_s1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
PTCH1	Hs00188949_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
SOX2	Hs01053049_s1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
SOX9	Hs00165814_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
TBP	Hs00427620_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

2.1.5 Plasmide

Tabelle 1.5. Plasmide zur Transduktion.

Plasmid	TRC-Nummer	Sequenz
shCHRDL1_A	N0000150226	CCGGGTCCAAATGTTTCATTGCCTTTCTCGA-GAAAGGCAATGAACATTTGGACTTTTTTG
shCHRDL1_B	N0000149739	CCGGGAGAACTGTCATGGGAACATTCTCGAGAAT-GTTCCCATGACAGTTCTCTTTTTTG
shCHRDL1_C	N0000148679	CCGGCATCAGGAACCATTGTGCAAACCTCGAGTTT-GCACAATGGTTCCTGATGTTTTTTG
shCHRDL1_D	N0000371790	CCGGACGCCATGCACAGCATAATTTCTCGAGAAAT-TATGCTGTGCATGGCGTTTTTTG
shCHRDL1_E	N0000371791	CCGGACTCAAATGCAGTCAATTATT-CTCGAGAATAATTGACTGCATTTGAGTTTTTTG

2.1.6 Technische Ausstattung

Tabelle 1.6. Laborausstattung.

Objekt/ Beschreibung	Firma
Autoklav: DX23	Systec, Linden, Deutschland
Autoklav: Varioklav	Biomedis, Gießen, Deutschland
Automatischer Zellzähler: <i>Scepter</i>	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
<i>Chamberslides</i>	Corning Brand, Corning, New York, USA
Deckgläser	NeoLab Migge, Heidelberg, Deutschland
Durchflusszytometer: <i>BD FACS Canto II</i>	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Eismaschine: <i>Scotsman AS80</i>	Hubbars, Ice Systems, Ipswich, UK
Elektrophoresesystem: <i>Mini PROTEAN system</i>	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA
Filterpapier: <i>Whatman 3 MM</i>	Whatman, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK
Flüssig-Stickstoff-Tank: <i>CBS Cryosystems 6000</i>	CBS Cryosystems, Osaka, Japan
Gefrierhilfe: <i>Mr. Frosty</i>	Nalgene, Rochester, USA
Gefrierröhrchen (<i>cryo tubes</i>)	Nalgene, Rochester, USA
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank -80°C: Thermo Electron Hera freeze	Heraeus, Hanau, Deutschland
Glasflaschen	Fisherbrand (Thermo Fisher Scientific GmbH), Waltham, Massachusetts, USA
Handschuhe	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland

Infrarot Bildsystem: Li-cor reader Odyssey	LI-COR (Odyssey), Lincoln, Nebraska, USA
Inkubator (Bakterien)	Heraeus, Hanau, Deutschland
Inkubator (Zellkultur): <i>Hera Cell 150</i>	Heraeus, Hanau, Deutschland
Konzentrator	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kühlschrank 4°C	Liebherr, Bulle, Schweiz
Magnetmixer: <i>RCT basic</i>	IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland
Mikroskop: Fluoreszenz- Mikroskop <i>Nikon eclipse TE2000-S</i>	Nikon, Tokio, Japan
Mikroskop: Konfokal-Mikroskop <i>Nikon C1i</i>	Nikon, Tokio, Japan
Mikroskop: <i>Nikon eclipse TS100</i>	Nikon, Tokio, Japan
Multistep-Pipette: <i>Handystep</i>	Gilson, Middleton, Wisconsin, USA
<i>Neubauer Chamber</i>	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Objektträger	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik, Edermünde, Deutschland
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, Illinois, USA
Pasteurpipette	WU, Mainz, Deutschland
PCR 96 <i>Fast Plate halfskirt</i>	Sarstedt, Nürnbrecht, Gemany
<i>PCR tube strips</i> 0.2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Petrischale	Greiner Bio-one, Kremsmünster, Österreich
Pipette: <i>Pipetus</i>	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Pipettenspitzen	Starlab, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäß: 0.2, 0.5, 1.5 und 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäß: 15 ml und 50 ml	Greiner Bio-one, Kremsmünster, Österreich
<i>Real time PCR System Step ONE Plus</i>	Applied Biosciences, Foster City, Kalifornien, USA
Rotierer: <i>Roller mixer SRT9</i>	Stuart (Bibby Scientific Limited), Stone, Staffordshire, UK
Schüttel-Inkubator (Bakterien)	New Brunswick Scientific, Edison, New Jersey, USA
Schüttler: KM-2	Edmund Bühler, Bodelshausen, Deutschland
<i>Semi-dry Blotter: Bio Rad Transblot SD Semi-Dry-Transfer-Cell</i>	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA
<i>Sonificator</i>	Bandelin electronic, Berlin, Deutschland
<i>Spark multimode microplate reader</i>	Tecan, Männedorf, Schweiz
Sterile Filter: <i>Steriflip (50 ml) und Steritop-GP (500 ml) 0.22 µm Express TM Membrane</i>	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Tecan Reader Genios	Tecan, Männedorf, Schweiz
<i>Thermocycler: Mastercycler</i>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Thermomixer: <i>Comfort</i>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ultramikrotom: <i>Leica Ultracut UCT</i>	Leica, Deerfield, Illinois, USA
<i>Vacuum Extraction Manifold, 20pos, 16x100mm tubes</i>	Waters, Milford, Massachusetts, USA
Vakuum-Konzentrator plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vakuum-Pumpe: <i>Sonorex RK 100 H</i>	Bandelin electronic, Berlin, Deutschland
Vortexer: <i>Vortex-2 Genie</i>	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
Wasseraufbereitung: <i>Milli-Q</i>	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Wasserbad	Köttermann, Uetze, Deutschland
Werkbank: 2F120-II Tecnoflow	Integra Biosciences, Zizers, Schweiz
Werkbank: Herasave	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zellkulturflasche: Cellstar	Greiner Bio-one, Kremsmünster, Österreich
Zellkultur-Platten (6-Well, 24-Well und 96-Well): Cellstar	Greiner Bio-one, Kremsmünster, Österreich
Zellzähler-Chip	Tecan, Männedorf, Schweiz
Zentrifuge: <i>Biofuge fresco (Microliter rotor, 24 X 2 ml PP, radius 8.5 cm, order no: 7500 3328)</i>	Kendro (Heraeus), Hanau, Deutschland
Zentrifuge: <i>Biofuge stratos (Swing-out rotor 4x180 ml, order no: 75003047)</i>	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge: <i>Mini Spin Table Zentrifuge (Rotor F-45-12- 11, Radius 6 cm, Kat.-Nr.: 5452727007)</i>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

2.1.7 Software

Tabelle 1.7. Software.

Software	Firma/ Bezug
BD Accuri C6 Software	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA
BioRender	https://biorender.com
ELDA: <i>Extreme Limiting Dilution Analysis</i>	http://bioinf.wehi.edu.au/software/limdil
GraphPad Prism 7	GraphPad Software, Inc., La Jolla, Kalifornien, USA
ImageJ Fiji	NIH, Bethesda, Maryland, USA
Microsoft Excel 2007	Microsoft, Redmond, Washington, USA
Microsoft Word 2007	Microsoft, Redmond, Washington, USA
CompuSyn Software	https://www.combosyn.com/
NIS Elements AR 3.2	Nikon, Tokio, Japan

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Zellkultur

Die Kultivierung der GS-Zellen, sowie der primären Zelllinie 17/02 erfolgte in Kulturmedium bestehend aus Neurobasal Medium mit B27 (20 µl/ml), Glutamax (10 µl/ml), Fibroblasten-Wachstumsfaktor-2 (FGF, 20 ng/ml) und Epidermalem Wachstumsfaktor (EGF, 20 ng/ml), sowie Penicillin-Streptomycin-Lösung (Endkonzentration: 100 U/ml). Ein Passagieren erfolgte bei Sphärengrößen von 200-500 µM, wobei eine Passagenzahl von <30 angestrebt wurde. Hierzu wurde die Zellsuspension in konische Zentrifugenröhrchen überführt, für 3 Minuten bei 195xg zentrifugiert und durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren in neuem Kulturmedium resuspendiert. Die dadurch dissoziierten Zellen wurden anschließend in definierter Anzahl in neue Kulturflaschen überführt und mit der entsprechenden Menge Kulturmedium versorgt. Die stammzellartigen Gliomzellen GS-3, -5 und -8 standen der Arbeitsgruppe als Geschenk durch Kathrin Lamszus (Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zur Verfügung. Die Gliomlinie MZ-54 wurde in „*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*“ (DMEM) mit Glucose (4,5g/l), Fetalem Bovinem Serum (FBS, 100 µl/ml), Glutamax (10 µl/ml) und Penicillin-Streptomycin-Lösung (Endkonzentration: 100 U/ml) kultiviert.

Alle adhärenenten Zellen wurden bei einer Konfluenz von >90% passagiert. Nach Abnahme des Kulturmediums und Waschen mit sterilem „*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*“ (DPBS) erfolgte die Dissoziation mittels Trypsin-EDTA für 5-10 Minuten bei 37°C. Zur Inaktivierung des Trypsin-EDTA wurde Kulturmedium zugefügt. Entsprechend des bereits beschriebenen Vorgehens bei sphärenbildenden Zellen wurde mit der gewonnene Zellsuspension weiter verfahren. Die Aufbewahrung aller Zelllinien erfolgte in Inkubatoren bei 37°C, 5% CO₂ und relativer Luftfeuchtigkeit von 95% mit einem Wechsel des Kulturmediums ca. alle 72 Stunden. Monatlich fanden Überprüfungen auf Mykoplasmen-spezifische rRNA mittels Testkit zum Ausschluss einer möglichen Kontamination statt.

Die Bestimmung der Zellzahl zur Aussaat für Experimente wurde mithilfe eines „*Spark® Multimode Microplate Reader*“ realisiert. Alternativ konnte auf die Verwendung einer Neubauer-Zählkammer ausgewichen werden. Beide Verfahren

ermöglichen durch Trypanblau-Färbung eine Einschätzung des Lebendzellanteils und dementsprechend eine möglichst exakte Aussaat. Nach Dissoziation der Zellen durch Accutase und wiederholtes Auf- und Abpipettieren bei sphärenbildenden Kulturen oder Trypsin-EDTA im Falle adhärenter Kulturen erfolgte eine Zentrifugation von 3 Minuten bei 195xg. Das entstandene Zellpellet wurde nach Verwurf des Überstandes in einer angemessenen Menge Kulturmedium resuspendiert. Nachfolgend wurden 50 µl der Suspension in 50 µl Trypanblau verdünnt, um tote Zellen anzufärben, wobei wiederum 10 µl der verdünnten Suspension zur Auswertung in eine Zählkammer oder einen Zellzähler-Chip überführt wurden. Die anschließende Zählung wurde im Falle der Zählkammer manuell durchgeführt. Die maschinelle Zählung und Erfassung der Zellviabilität erfolgte anhand von acht Einzelbildern automatisiert. Zusätzlich konnte auf eine automatische Zellzählung mittels automatischen Zellzähler „Scepter 2.0“ nach Herstellerangaben ausgewichen werden, wobei keine Trypanblau-Färbung erfolgt.

Das Einfrieren der Zellen erfolgte zur Kryokonservierung bei absehbar langer Lagerungszeit bei -195°C in flüssigem Stickstoff. Sphärenbildende Zellen wurden hierbei als Pellets von 3-5x10⁶ Zellen in 1,5-2,5 ml kaltem Kulturmedium resuspendiert und anschließend Kulturmedium mit Dimethylsulfoxid (DMSO, 200 µl/ml) in gleicher Menge unter vorsichtigem Schwenken langsam zugegeben. Bei adhärenter Zellen wurde vor dem Pelletieren auf 70-90% Konfluenz einer T175 Zellkulturflasche geachtet und nach Resuspension 20% des Gefriermedium bestehend aus FBS und DMSO (4:1) zugegeben. Ein initiales Gefrieren der in 3-5 Kryoröhrchen überführten Suspension erfolgte nachfolgend mithilfe eines Isopropanolbehältnisses mit annähernd konstanter Kühlungsrate von -1°C/min bei -80°C über Nacht. Sich Letzterem anschließend erfolgte nach präziser Beschriftung die Überführung der Zellen in einen Stickstofftank.

Das Auftauen gefrorener Zellen erfolgte durch eiliges Erwärmen der Kryoröhrchen in einem Wasserbad von 37°C, dem sich das Überführen der Zellsuspension in ein konisches Zentrifugenröhrchen mit 20 ml des passenden vorgewärmten Kulturmediums anschloss. Nach Zentrifugation von 3 Minuten bei 195xg und Verwurf des Überstandes, insbesondere zur Elimination des DMSO, wurden die Zellen in neuem Medium resuspendiert. Zur Aussaat wurde eine möglichst hohe

Zellzahl angestrebt. Um etwaige tote Zellen zu entfernen, wurde das Kulturmedium abschließend nach 24 Stunden erneut gewechselt.

2.4.2 MTT-Test

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Tests erfolgten durch Aussaat von 8×10^3 Zellen pro Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte mit transparentem glattem Boden in 100 μ l Kulturmedium. Nach 24 Stunden Inkubation erfolgte die Zugabe der zu untersuchenden Verbindungen als Zweifachkonzentrat in 100 μ l Kulturmedium und weitere Kultivierung für 24 Stunden. Nachfolgend wurde das MTT-Reagenz (Endkonzentration: 0.83 mg/ml) für 3-4 Stunden unter üblichen Inkubationsbedingungen zugefügt. Im Weiteren erfolgte die Zentrifugation der 96-Well-Mikrotiterplatte zur Sedimentation der nicht adhären wachsenden Zellen und ein achtsames Abpipettieren des Kulturmedium-MTT-Gemisches. Nach Zugabe von N-Propanol-HCl-Lösung (24:1, 1 M HCl) für 30-60 Minuten unter Schütteln auf einem mechanischen Schüttler zur Solubilisation des enzymatisch entstandenen (E, Z)-5-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan (Formazan), wurde die Absorption per Well bei einer Wellenlänge von 560 nm photometrisch mithilfe eines „Spark® Multimode Microplate Reader“ gemessen.

Die Quantifikation des Synergismus mittels Chou-Talalay Methode¹⁰⁶ erfolgte durch oben beschriebene MTT-Testung zu untersuchender Zelllinien in konstanten Verhältnissen der Substanzkombinationen und Aufbereitung der gewonnenen Daten zur computergestützten Berechnung der „Combination-Indizes“ (CI)-Werte mithilfe der frei zugänglichen Software „CompuSyn“.¹⁰⁷

2.4.3 Analyse der Sphärenbildung

Die Untersuchung der Sphärenbildung erfolgte mittels Aussaat von 6×10^3 Zellen pro Well einer 6-Well-Mikrotiterplatte mit transparentem glattem Boden. Die Zugabe der zu untersuchenden Verbindungen schloss sich unmittelbar an, sodass ein Endvolumen von 2 ml pro Well erreicht wurde. Daraufhin wurden die Zellen für 10 Tage unter üblichen Konditionen inkubiert und anschließend

lichtmikroskopisch systematisch fotografiert (15 Fotos/ Well). Die Auswertung der erfassten primären Sphärenbildung geschah mittels Vermessung in „ImageJ“ unter Verwendung des Linientools und einer Referenzstrecke von 500 µm. Nach Zugabe von 2 ml neuen Kulturmediums erfolgte die erneute Inkubation für 10 Tage mit folgender fotografischer Erfassung und beschriebener Auswertung. Hierdurch wurde die Kapazität der Genesung nach einer Verdünnung der Behandlung festgehalten. Letztlich erfolgte die Dissoziation der Sphären an Tag 20 mit anschließender erneuter Aussaat in 2 ml Kulturmedium und Inkubation von 10 Tagen. Zur Evaluation der sekundären Sphärenbildung ohne erneute Behandlung wurden auch hier lichtmikroskopische Bilder gewonnen und wie beschrieben ausgewertet.

2.4.4 Analyse der Migrationskapazität

Zur Erfassung des Umfangs an stattgehabter Migration der Zellen wurden *in vitro* Migrationstests durchgeführt. Hierzu wurden 2×10^3 sphärenbildende Zellen pro Well in eine 96-Well-Mikrotiterplatte mit transparentem rundem Boden in 100 µl Kulturmedium ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Wells auf das Vorhandensein von Sphären geprüft und gegebenenfalls durch sanftes Abklopfen Zellen zum Boden des Wells bewegt. Letzteres wurde wiederholt, falls sich auch am darauffolgenden Tag nicht ausreichend Sphären präsentierten. Gleichzeitig wurde eine 96-Well-Mikrotiterplatte mit transparentem glattem Boden pro Well mit 150 µl Laminin (10 µg/ml) in sterilem DPBS über Nacht bei 4°C inkubiert. Die dadurch beschichtete 96-Well-Mikrotiterplatte wurde darauffolgend bei 37°C für 30 Minuten vorgewärmt und der Überstand entfernt. Suffiziente Sphären wurden mithilfe einer 8-Kanal-Pipette in 50 µl Medium in beschichtete Wells überführt. Die Sphären wurden nachfolgend zur hinreichenden Adhäsion 30 Minuten bei üblicher Inkubation ruhig gelagert, woraufhin eine fotografische Erfassung der Wells als Startpunkt der Migration mithilfe eines „Spark® Multimode Microplate Reader“ bei 37°C erfolgte und die Behandlung zugegeben wurde. Letztere Erfassung wurde zu den beobachteten Zeiträumen wiederholt, wobei die Zellen zwischen den Messungen ebenfalls wie üblich inkubiert wurden. Die Auswertung der gewonnenen Bilder erfolgte mittels Pseudofärbung und Messung der Wegstrecke in „ImageJ“. Hierbei wurden Bilder der gemessenen Zeitpunkte überlagert und

der Abstand vom äußeren Rand einer Sphäre zum ersten aufgenommenen Zeitpunkt bis zur weitesten migrierten Zelle des späteren Zeitpunktes gemessen, wobei die Messung in vier Quadranten (oben, unten, links, rechts) stattfand. Dies erfolgte mittels Operation in „ImageJ“ von folgenden Befehlen: „*Process > Find Edges > Overlay via Image > Color > Merge Channels > Messung via Straight-Line Tool*“ unter Nutzung *magnifying tool*.“ Als Referenzgröße diente der Well-Durchmesser.

2.4.5 Limiting Dilution Assay

Grenzverdünnungsanalysen (LDA) ermöglichen quantitative Aussagen zur Frequenz von Zelleigenschaften innerhalb einer heterogenen Zellkultur und dienen damit im Kontext dieser Arbeit der quantitativen Einschätzung befähigter Zellen zu stammzellcharakteristischer Bildung von Tumorsphären. Da hinsichtlich notwendiger niedriger Zellzahlen eine exakte Bestimmung der genauen Zellzahl vor der Aussaat kritisch für die Verlässlichkeit der Ergebnisse ist, wurde die übliche Zellzahlbestimmung, wie in 2.4.1 beschrieben, um eine zweite Messung ergänzt. Dabei wurde der Mittelwert beider Zellzahlergebnisse zur weiteren Durchführung genutzt. Es erfolgte die Aussaat von ca. 1×10^3 bzw. 2×10^3 Zellen pro Well in 12 Wells einer Reihe (Reihe 1) von insgesamt sechs 96-Well-Platten in 200 μ l Kulturmedium. Alle weiteren Wells wurden mit 100 μ l Kulturmedium befüllt. Nachfolgend wurde mithilfe einer 8-Kanal-Pipette eine kontinuierliche Verdünnung der Zellsuspension angelegt. Hierzu wurden 100 μ l von Reihe 1 in die nächste Reihe (Reihe 2) und folgend erneute 100 μ l von Reihe 2 in Reihe 3 überführt. Zwischen jedem Überführen erfolgte ein dreimaliges Auf- und Abpipettieren zur Gewährleistung einer möglichst homogenen Suspension. Derart wurde bis Reihe 8 verfahren, welche wiederum um 100 μ l geleert und der entnommene Anteil verworfen wurden. Dadurch ergab sich eine serielle Verdünnung der anfänglichen Zellzahl von ca. 4-500 bzw. 8-1000 Zellen pro Well. Die Zellzahl in Reihe 1 entsprach dabei 2x der Zellzahl in Reihe 2, 4x der Zellzahl in Reihe 3, bis zu 128x der Zellzahl in Reihe 8. Anschließend wurden alle 96 Wells einer Mikrotiterplatte mit 100 μ l des Kulturmediums und einem Zweifachkonzentrat der jeweiligen zu untersuchender Verbindung befüllt. Unter üblichen Bedingungen erfolgte die Inkubation der Zellen für 7 Tage. Anschließend wurden alle Wells lichtmikroskopisch

auf das Vorhandensein einer Sphäre >30 µm überprüft. Entsprechende Wells wurden als positiv hinsichtlich monoklonaler Populationsgenese gewertet. Die Auswertung der gewonnenen Beobachtungen erfolgte mittels „*Extreme Limiting Dilution Analysis*“-Software.¹⁰⁸

Die LDA mit Bestrahlung erfolgten hinsichtlich Ihrer Durchführung weitestgehend kongruent zu dem bereits beschriebenen Verfahren. Im Unterschied zu Letzterem wurde die Aussaat auf insgesamt vierundzwanzig 96-Well-Mikrotiterplatte ausgedehnt und jeweils vier Platten identisch mit der jeweiligen Verbindung behandelt. Dadurch ergaben sich insgesamt vier identische Gruppen mit je sechs unterschiedlichen Behandlungskonditionen. Nachfolgend wurden diese für 24 Stunden inkubiert und anschließend mit je 2, 4 und 6 Gray bestrahlt, wobei eine Gruppe keiner Bestrahlung ausgesetzt wurde. Der Transport zur externen Bestrahlung erfolgte dabei die Gesamtheit der Platten umfassend um einen möglichen Wachstumsvorteil der nicht bestrahlten Zellen, aufgrund fehlender Unterbrechung der Inkubation, zu verhindern. Die Auswertung wurde wie bereits beschrieben durchgeführt.

2.4.6 Organotypische Gewebekultur

Eine relative Limitierung jeglicher *in vitro* Analyse besteht unter anderem in der lediglich zweidimensionalen Orientierung, fehlender Matrix-Zell-Interaktionen und interzellulären Interaktionen verschiedener Zelltypen beispielsweise durch parakrine Aktivität, die durch einfache Co-Kultursysteme nicht ausreichend erfassbar sind. Eine etablierte Methode zur *ex vivo* Simulation und Annäherung an *in vivo* Bedingungen ohne ebendiesen Ressourcenaufwand sind organotypische Gewebekulturen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte dies durch Kultivierung von Tumorsphären auf Schnitten von Gehirngewebe der Maus. Hierzu erfolgte nach Euthanasie adulter Mäuse und Exstirpation des Gehirns sowie Entfernung der Meningen die Fixierung in zweiprozentiger „*low-melting*“ Agarose. Der Aushärtung auf Eis folgte sodann der Schnitt des Gewebes mittels Vibratom (Leica VT1200 S) bei einer Maximalgeschwindigkeit von 0,3 mm/s, Vibrationsfrequenz auf Stufe 8/10 und 250 µM Schnittdicke. Anschließend wurden die Schnitte durch einen Pinsel auf „*millicell inserts*“ in einer 6-well-Mikrotiterplatte mit

entsprechendem Kulturmedium aus DMEM/F12 sowie B27 und N2 überführt. Am folgenden Tag erfolgte der Transfer von zuvor kultivierten grün fluoreszierenden Protein (GFP)-exprimierenden Sphären. Hierzu wurden im Vorfeld 2×10^3 bzw. 4×10^3 sphärenbildende Zellen pro Well in eine 96-Well-Mikrotiterplatte mit transparentem rundem Boden in 100 μ l Kulturmedium ausgesät und eine Woche unter üblichen Bedingungen inkubiert. Nach Überführen der so gewonnenen Sphären in eine Petrischale mit warmen DPBS erfolgte die Aufnahme und der Transfer von ca. 10 Sphären mittels Pipette unter Sicht durch ein Binokular in möglichst regelmäßigen Abständen und in möglichst kleinen Flüssigkeitsvolumina auf die erwähnten Hirnschnitte. Nach eintägiger Inkubation unter üblichen Bedingungen erfolgte die Fotodokumentation mittels Epifluoreszenz-Mikroskopie und anschließende Behandlung mit den zu untersuchenden Verbindungen. Ein Mediumwechsel fand an jedem zweiten Tag statt. Die Fotodokumentation erfolgte je nach Zelllinie über 1-4 Wochen mit identischen Einstellungen. Die Auswertung wurde durch Ausmessung der Sphärengröße in „ImageJ“ und Normalisierung zur Größe an Tag 1 realisiert. Dies erfolgte mittels folgender Befehle: „Markierung des Tumoreals mittels *freehand tool* > *Analyze* > *Measure* > Nutzung des Parameter *Area* zur weiteren Berechnung.“

2.5 Immunchemische Methoden

2.5.1 Proteinanalyse durch Western Blot

Die Gewinnung von Lysaten der Zellen umfasste zunächst die Aussaat von 5×10^5 Zellen pro Well einer 6-Well-Mikrotiterplatte in 4 ml Kulturmedium mit anschließender Behandlung der Zellen am folgenden Tag mit den zu untersuchenden Substanzen. Hinsichtlich der sphärenbildenden Zellen erfolgte eine Überführung der Zellen in konische Zentrifugenröhrchen durch einfaches Pipettieren und folgendes Waschen der Wells mittels DPBS. Adhärente Zellen wurden in einem Zwischenschritt mittels Inkubation mit Trypsin-EDTA dissoziiert und anschließend überführt. Nach 3-minütiger Zentrifugation bei 195xg wurden die Zellpellets auf Eis in 2xSDS-Lysepuffer unter mehrmaligem Auf- und Abpipettieren lysiert. Zur Vermeidung etwaiger Proteindegradierung erfolgte die konsequente

Lagerung der gewonnenen Proben auf Eis. Ein weiterer Zellaufschluss wurde mithilfe einer Exposition gegenüber Ultraschall gewährleistet. Bei standardisierter Ultraschallamplitude wurden die Zellen in 2 separaten Zyklen mit je 10 Impulsen unter ständiger Kühlung behandelt. Anschließend erfolgte die erneute Zentrifugation der Lysate bei 16200xg für 5 Minuten. Nach Verwurf des Überstandes wurden die Zelllysate bei -20°C gelagert oder sofort zur Proteinquantifikation verwendet. Eine längere Lagerung erfolgte bei -80°C.

Die Proteinquantifikation erfolgte nach Herstelleranweisung des genutztem „Pierce BCA protein assay kit“. Alle folgenden Schritte wurden in Duplikaten erzeugt. Zunächst erfolgte die Anlage einer standardisierten Verdünnungsreihe von bovinen Serumalbumin in einer 96-Well-Mikrotiterplatte. Zur Generierung einer Blindprobe wurde ein Well ausschließlich mit Lysepuffer gefüllt. Daraufhin wurden je 3 µl der Probelysate entsprechend angelegt und allen Wells 150 µl NaCl 0,9 % sowie 150 µl BCA-Lösung zugegeben. Die Absorption bei 560 nm wurde nach 45-minütiger Inkubation bei 37°C unter üblichen Bedingungen mittels „Spark® Multimode Microplate Reader“ gemessen. Anhand der erzeugten Standardkurve mit bekannter Proteinkonzentration konnte sodann unter Beachtung der Blindprobe die Probenkonzentration ermittelt werden. Die anschließenden Methoden erfolgten mit Hinsicht auf die verwendete Proteinkonzentration in konsequent gleichen Mengen.

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) ist ein etabliertes Verfahren zur Trennung von Proteinen anhand ihres molekularen Gewichtes.¹⁰⁹ Hierzu erfolgte zunächst die Denaturierung von 35 µg - 60 µg Protein durch 5xSDS-Ladepuffer mit fünfprozentig β-Mercaptoethanol und Hitze von 95°C für 4 Minuten (Phospho-Antikörper: 1 Minute). Nach Vorbereitung der Proben wurden diese anschließend je in eine eigene Tasche des im Elektrophoresepuffer getauchten Gels gegeben. Zusätzlich wurde ein gefärbter kDa-Größenmarker in eine weitere Tasche zugefügt. Die durch Verlust von Wasserstoff- und Disulfidbrücken mit einhergehender Auflösung der Tertiär- und Sekundärstruktur linearisierten Proteine können durch Bindung des im Überschuss vorhandene anionische Tensid SDS negativ geladen werden und durch Anlage eines elektrischen Feldes anhand ihrer Größe aufgrund sich entsprechend

unterscheidenden Geschwindigkeiten ihrer Wanderung zur Anode im Gel getrennt werden. Die verwendeten Elektrophoresegele bestanden aus Sammel- und Trenngel, welche durch Polymerisation von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid unter Verwendung des Katalysators N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin (TEMED) und Initiators Ammoniumperoxodisulfat (APS) erzeugt wurden. Die Menge an Polyacrylamid variierte je nach Zielprotein zwischen 8% und 15%. Die Trennung erfolgte bei einer Spannung von 85 V für 30 Minuten und anschließender Erhöhung der Spannung auf 135 V.

Der Western Blot zur Übertragung der Proteine auf eine Trägermembran^{110,111} und anschließender immunchemischer Detektion und Quantifizierung erfolgte auf eine Cellulosenitratmembran „*semi-dry*“ bei 15 V für 35 Minuten. Nach Blockung der Membran mittels einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur mit 5 % BSA in TBS-Tween (TBS-T) oder 5 % Milch und im Falle einer Blockung mit Milch dreimaliger Waschung mit TBS-T für 10 Minuten wurden die Membranen über Nacht bei 4°C mit dem entsprechenden primären Antikörper in zuvor festgelegter Verdünnung inkubiert. Nach Entfernung der Antikörperlösung erfolgte die dreimalige Waschung der Membranen in TBS-T zur vollständigen Elimination von nicht gebundenen Antikörperrückständen. Nach Zugabe des sekundären Antikörpers in einer Verdünnung von 1:10.000 für eine Stunde bei Raumtemperatur wurde die Detektion mittels „*Li-cor Odyssey reader*“ realisiert. Die Quantifizierung erfolgte anhand gemessener Signalintensitäten mit entsprechender Normalisierung zu einem Haushaltsgen.

2.5.2 Immunfluoreszenz und Epifluoreszenzmikroskopie

Die Auflichtmikroskopie nach Immunfärbung ist ein probates Mittel zur Erfassung von Lokalisation und Änderungen der Konzentration etwaiger zu untersuchender Proteine auf Einzelzellebene. Hierzu wurde zunächst eine Lamininbeschichtung jeder Kammer eines 8-Well-Objektträgers durch Inkubation mit 10 µg/ml Laminin in PBS über Nacht bei 4°C und anschließendem Waschen mit PBS realisiert. Daraufhin erfolgte die Aussaat von 1×10^4 Zellen pro Well in 250 µl Kulturmedium und nach 24-stündiger Inkubation die Behandlung der Zellen mit den zu untersuchenden Substanzen. Einer erneuten Inkubation über 3 Tage schloss sich die

Fixierung der Zellen an. Letztere wurde nach Verwurf des Mediums und Waschung mit warmen PBS durch Zugabe von 4 % PFA für 20 Minuten bei Raumtemperatur erreicht. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit TBS-T für 5 Minuten erfolgte die Permeabilisierung und Blockung mittels 0,3 % Triton X-100 und 5 % BSA in TBS-T für eine Stunde. Anschließend wurden die Objektträger mit dem primären Antikörper in Blockungslösung verdünnt über Nacht bei 4°C inkubiert, gefolgt von dreimaligem Waschen mit TBS-T für 5 Minuten. Nach erneuter Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur nach Zugabe des sekundären Antikörpers und abschließender Waschung erfolgte die Bedeckung der Objektträger mit Eindeck-Medium mit DAPI. Die Auswertung erfolgte durch auflichtmikroskopische Auszählung.

2.5.3 Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht eine Sortierung von Einzelzellen einer homogenen Zellsuspension durch Laserbestrahlung jeder einzelnen Zelle und Messung des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtes sowie der Fluoreszenzeigenschaften nach unterschiedlichen Parametern. Hierzu zählen das Volumen, die Granularität, sowie die stattgehabte Emission nach Anregung mit Licht durch fluoreszierende Farbstoffe. Zur Erfassung des Zelltods erfolgte eine Sortierung nach stattgehabter Annexin-V-Bindung und Propidiumiodid-Aufnahme. Propidiumiodid (PI) wirkt als Interkalator von Nukleinsäuren und wird vornehmlich bei defekter Zellmembran von spät-apoptotischen oder nekrotischen Zellen aufgenommen. Annexin-V bindet Phosphatidylserin. Letzteres ist ein biologischer Bestandteil von Zellmembranen und durch eine Phospholipid-Flippase in lebensfähigen Zellen streng im inneren Monolayer somit zytoplasmatisch direktionsiert. Im Rahmen des programmierten Zelltods in früh-apoptotischen Zellen wird Phosphatidylserin allerdings durch einen weiteren Phospholipidtranslokator, die Scramblase, externalisiert und dient so als Phagozytosesignal. Zunächst erfolgte die Aussaat von $2,5 \times 10^4$ Zellen pro Well einer 24-Well-Mikrotiterplatte in 0,5 ml Kulturmedium in Triplikaten mit anschließender Behandlung am folgenden Tag. Die Zellen wurden daraufhin in spezielle Durchflusszytometrie-Röhrchen überführt. Sphärenbildende Zellen wurden hierzu durch Pipettieren als Suspension in ihrem Medium überführt, wohingegen adhärenente Zellen zunächst durch Trypsin-EDTA

dissoziiert werden mussten. Die Dissoziation der sphärenbildenden Zellen erfolgte erst nach stattgehabter Zentrifugation mit 195xg für 3 Minuten durch Accutase gefolgt von einer Waschung zur Deaktivierung der Accutase mittels DPBS. Die erzeugten Zellpellets wurden sodann in 50 µL einer Pufferlösung mit 0.8 µL APC-Annexin-V und 0.8 µg/ml PI resuspendiert. Die Messung von 1×10^4 Zellen erfolgte daraufhin mittels BD Accuri C6. Nach standardisiertem *Gating* erfolgte die Zuordnung der Zellen in folgende Konstellationen (I) PI⁻ / Annexin-V⁻, (II) PI⁺ / Annexin-V⁻, (III) PI⁻ / Annexin-V⁺ und (IV) PI⁺ / Annexin-V⁺ und Festlegung des Zelltodes in Gesamtheit bestehend aus den Konstellationen (II)-(IV).

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Quantitative Echtzeit-PCR

Mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen ermöglicht die quantitative Echtzeit-RT-PCR eine Aussage über die relative Menge einer synthetisierten Ziel-DNA und gleichsam indirekt über die synthetisierte mRNA einer Probe. Während der exponentiellen Phase der Polymerase-Kettenreaktion erfolgte die Quantifizierung im Rahmen dieser Arbeit mittels TaqMan-Sondierung. Spezifische TaqMan-Sonden hybridisieren mit einem komplementären Ziel-Amplicon. Die Sonde enthält ein Reporter-Fluorophor am 5'-Ende, dessen Emission durch Energieübertragung auf einen ebenfalls enthaltenen Quencher zunächst gelöscht wird. Diese reversible Form der Fluoreszenzlöschung kann durch Entfernung des Quenchers aufgehoben werden. Durch die 5'-Nuklease Aktivität der DNA-Polymerase erfolgt die Hydrolyse der TaqMan-Sonde und konsekutiv die Trennung von Reporter und Quencher, sodass ein Fluoreszenzsignal gemessen werden kann. Dieses Signal ist direkt proportional zur Anzahl der Moleküle zu Beginn des laufenden Zyklus. Nach Aussaat von 1.5×10^4 Zellen pro Well einer 6-Well-Mikrotiterplatte und Behandlung am folgenden Tag erfolgte die Probengewinnung nach Pelletieren und Waschung mittels *ExtractMe Total RNA-Kit* nach Herstellerinstruktionen. Die isolierte RNA wurde sodann zur Synthese komplementärer DNA (cDNA) weiterverwendet. Hierzu wurden 2 µg der RNA je 1 µl random primers (3 µg/µl) sowie 1 µl 50 mM Oligo(dT)20 und 1 µl 10 mM *dNTP-Mix* zugegeben. Die Proben wurden

mit DEPC-H₂O auf ein Gesamtvolumen von 14 µl aufgefüllt. Nach anschließender Inkubation bei 65°C für 5 Minuten und einer Minute Kühlung auf Eis erfolgte die Zugabe von 4 µl First Strand Buffer, 1 µl 0.1 M DTT und 0.5 µl Superscript III reverse transcriptase sowie 0.5 µl DEPC-H₂O. Die Synthese der cDNA erfolgte in einem Thermocycler bei 25°C für 5 Minuten gefolgt von 50°C bei 60 Minuten und 70°C bei 15 Minuten. Die Proben wurden mit 180 µl DEPC-H₂O verdünnt. Anschließend erfolgte der TaqMan Genexpressions-Assay unter Verwendung von 5 µl cDNA und Zugabe von 1 µl FAM-MGP primer sowie 10 µl 2x FastStart Universal Probe Master-mix und Transfer in eine 96-well-qRT-PCR-Platte. Die Echtzeit-PCR verlief mit einem Zyklus von 50°C für 2 Minuten, gefolgt von 95°C für 10 Minuten sowie 40 Zyklen im Wechsel von 95°C für 15 Sekunden und 60°C für 1 Minute.

2.6.2 Lentivirale Transduktion

Die lentivirale Transduktion erlaubt das Einbringen eines Plasmids mittels viralen Vektors in eine Zielzelle zur Übertragung von genetischen Informationen. Dabei integrieren Lentiviren die übertragene Information in das Genom der Zielzelle enzymatisch. Auf diese Weise kann, bspw. über Einbringen spezifischer „*small hairpin*“ (sh)RNA, ein genetisches Silencing eines Zielgens erreicht werden. Die shRNA-vermittelte RNA-Interferenz führt zu einer Verminderung der Translation der entsprechenden Ziel-mRNA und entsprechender Reduktion eines Zielproteins. Derart können weitestgehend stabile genetische *Knockdowns* innerhalb einer Zellkultur erreicht werden, um eine gezielte Untersuchung der vermittelten Auswirkung der Reduktion dieses Zielproteins zu erlauben. Die lentivirale Transduktion ist dabei methodisch der letzte Schritt einer Abfolge von Prozessen, welche zunächst der Vervielfältigung eines extern erworbenen Plasmids und seiner „Verpackung“ in einen Lentivirus dienen. So erfolgte in einem ersten Schritt die Transformation von Bakterien, hier E. coli-Stämmen, da aufgrund ihrer kurzen Replikationszyklen eine einfache Vervielfältigung von Plasmiden erreicht wird. Zur anschließenden Isolierung der Plasmide aus den Bakterienkulturen erfolgte sodann die Plasmidpräparation. Hiernach konnte die gewonnene Menge von Plasmid-DNA zur weiteren Transfektion von, in diesem Fall, HEK293T-Zellen mit Co-Transfektion von entsprechenden lentiviraler Plasmiden zur Generierung

viraler Kulturüberstände erfolgen. Letztere wiederum wurden zur anschließenden Transduktion der Zielzellen verwendet.

Die Transformation erfolgte dabei in *Escherichia coli* (E. coli) DH5 α . Diese wurden zunächst auf Eis aufgetaut. Daraufhin wurden 7.5 ng des DNA-Plasmids zugegeben und vorsichtig resuspendiert. Es erfolgte eine Inkubation auf Eis für 30 Minuten. Anschließend erfuhren die Zellen einen Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42°C. Nach erneuter Inkubation auf Eis für 2 Minuten wurde 1 ml Antibiotikafreies LB-Medium hinzugefügt. Die anschließende Inkubation erfolgte bei 37°C für 60 Minuten. Die transformierten E. coli wurden daraufhin pelletiert (Zentrifugation: 1 Minute, 16000 x g) und ein Teil des Überstands verworfen. Die Resuspension erfolgte in ca. 150 μ l restlichem Kulturüberstand und die Zellen wurden auf LB-Agar-Platten (1% Ampicillin) ausgesät. Die Agar-Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag auf Kolonien geprüft.

Zur Prüfung der regelrechten Transformation erfolgte die PCR-gestützte Untersuchung auf adäquate Vektoren in insgesamt 3 Kolonien. Diese wurden in 50 μ l H₂O resuspendiert. Je PCR-Probe wurden 10x *Taq* Puffer, 200 μ M *dNTPs*, 0.2 μ M *U6-fwd* Primer und 0.2 μ M des Antisense-Guide-Oligo sowie 0.5 U *Taq* Polymerase und 0.5 μ l Bakteriensuspension in PCR-Röhrchen überführt und bis zu 20 μ l mit DNase freiem Wasser gefüllt. Zur Separierung, Denaturierung und Extension erfolgte ein Standard-PCR-Programm aus: 1x 95°C für 5 Minuten, je 35x 95°C, 52°C und 68°C für je 30 Sekunden sowie 1x 68°C für 2 Minuten. Die Proben wurde anschließend in einem 2% Agarosegel bei 110V für 30 Minuten separiert und Vektorbanden detektiert.

Die Plasmidpräparation erfolgte mittels „*EndoFree Plasmid Maxi Kit*“ nach Herstelleranweisung. Zunächst wurden adäquate Kolonien in 100 ml LB-Medium über Nacht bei 37°C expandiert. Die Bakterien wurden mittels Zentrifugation (5 Minuten, 6000x g) gesammelt und die Zellyse unter alkalischer Lyse erreicht. Anschließend wurden die Lysate filtriert und gereinigt. Die Extraktion der Plasmid-DNA erfolgte mittels *QIAGEN-Tip* und sich anschließender Waschung. Anschließend wurde die Plasmid-DNA durch salzhaltige Puffer gelöst, konzentriert und mittels Isopropanol-Präzipitation entsalzt. Nach anschließender Waschung erfolgten die Trocknung und erneute Lösung in Endotoxin-freiem Puffer.

Die Transfektion von HEK293T-Zellen erfolgte wie bereits beschrieben zur Gewinnung lentiviraler Kulturüberstände und anschließenden Transduktion der Zielzellen. Hierzu erfolgte die Aussaat von 1.5×10^5 Zellen in einer 6-Well-Platte mit anschließender üblicher Inkubation über Nacht. Anschließend wurde auf eine ca. 90-prozentige Konfluenz der Zellen geachtet. Die Transfektion erfolgte sodann durch Zugabe eines Gemischs aus 2 μg shRNA-beinhaltenen bzw. nicht-codierenden Ctrl-shRNA-beinhaltenen Plasmid-DNA (pLKO.1-puro), 1.5 μg gag/pol Plasmid (psPAX2) und 0.5 μg VSV Hüll-Plasmid (pMD2.G) in 57 μl Opti-MEM sowie 6 μl FuGENE HD (Promega, Fitchburg, WI, USA) Transfektionsreagenz. Nach 16 und 40 Stunden wurde das Medium gewonnen und durch einen 0.45 μM Filter filtriert.

Die lentivirale Transduktion von GS-5-Zellen erfolgte durch Nutzung der genannten Überstände 1:1 mit üblichem Kulturmedium. Hierzu wurden 3×10^4 Zellen frisch dissoziiert und für 48 Stunden in virushaltigem Medium unter Zugabe von 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Protaminsulfat inkubiert. Anschließend erfolgte die Selektion erfolgreich transduzierter Zellen durch Zugabe von 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Puromycin. Dabei kam es unter vier der fünf verwendeten Plasmide zum Zelluntergang. Lediglich bei einem Plasmid gelang die adäquate Transduktion mit Sequenz: CCGGACGCCATGCACAGCATAATTTCTCGAGAAATTATGCTGTGCATGGCGTTTTTTG. Das erfolgreiche *Knockdown* wurde mittels Western-Blot Proteinanalysen verifiziert.

3. Ergebnisse

3.1 Steigerung antitumoraler Effekte von GANT61 und ATO durch Kombination mit Gossypol

3.1.1 Hh-/ Notch-Inhibition induziert Zelltod und reduziert Proliferation *in -vitro* und *ex -vivo*

Im Vorherigen wurde bereits die Rolle des Hh- sowie Notch-Signalweges für stammzellartige Zellen dargestellt. Zusammenfassend zeigen sich wichtige regulative Mechanismen hinsichtlich Proliferation, Zellerhalt und Regeneration. Zur Evaluation und Bestätigung der zu erwartenden Auswirkungen einer Inhibition genannter Signalwege auf Proliferation und Zelltod in Gliom-initiiierenden Zellen mit ausgeprägtem stammzellartigem Charakter wurden MTT-Assays durchgeführt. Als kolorimetrisches Testverfahren der Zellviabilität nutzen MTT-Assays die Reduktion des wasserlöslichen Tetrazoliumsalzes MTT in metabolisch aktiven Zellen zum wasserunlöslichen Formazan. Im Rahmen dessen ergibt sich eine messbare Farbänderung des initialen gelben Farbstoffes in das blau-violette Formazan.¹¹² Wie jüngere Untersuchungen zeigen erfolgt die Reduktion hauptsächlich durch NAD(P)H sowie glykolytische Enzyme des endoplasmatischen Retikulums. Maßgebliche Testgröße ist somit im eigentlichen Sinne die Cofaktor-Produktion von NAD(P)H, welche allerdings unter bestehenden Limitationen als indirektes Maß für die Zellviabilität dienen kann.¹¹³

Die vorliegenden Daten sind dabei in Analogie zu weiteren Ergebnissen¹⁰⁵ der Arbeitsgruppe entstanden. Diese Ergebnisse zeigen weitestgehende konforme Auswirkungen der Substanzen auf verschiedene GS-Zelllinien, sowie auf die primäre Zelllinie 17/02. Im Folgenden findet sich eine Gegenüberstellung von GS-5 Zellen nach Transduktion von GFP-Luciferase und nicht-transduzierten GS-5 Zellen. Der unmittelbare Vergleich der Zelllinien war zur weiteren Nutzung der transduzierten GS-5 Zellen im *ex -vivo* Modell notwendig.

Nach 24-stündiger Behandlung der Zelllinien GS-5 bzw. GS-5^{GFP-Luc} mit steigenden Konzentrationen von ATO oder GANT61 in Kombination mit AT-101 zeigt sich eine erhebliche Verminderung der Zellviabilität. Eine Reduktion Letzterer

ergibt sich sowohl unter Mono-Behandlung mit ATO bzw. GANT61 als auch unter Kombinationsbehandlung mit zusätzlicher Steigerung des Effektes. Eine eindeutige Linearität ist nicht unmittelbar ableitbar, obgleich sich grundsätzlich dosisabhängige Effekte zeigen (vgl. Abb. 2.1.1).

Hinsichtlich der Äquivalenztestung von transduzierten GS-5 Zellen zeigt sich nach Transduktion keine erhebliche Änderung der Ergebnisse. Sowohl GS-5 als auch GS-5^{GFP-Luc} Zellen präsentieren eine dosisabhängige Reduktion der Zellviabilität unter ATO, GANT61 und AT-101. Insbesondere in niedrigerer Dosierung erwirkt hierbei GANT61 nur geringe Effekte in der Einzelbehandlung. Erst bei einer Dosis von 10 µM kommt es zu einer deutlichen Reduktion (ca. 50%) der Viabilität. Die eher milden Effekte werden unter Kombination mit AT-101 potenziert. Insbesondere ab einer Dosis von 7.5 µM AT-101 zeigt sich ein deutlich additiver Effekt der Substanzen. Bereits bei mittlerer Dosierung der Substanzen (5 µM ATO und GANT61, 7.5 µM AT-101) zeigt sich ein nahezu maximaler Effekt, der durch höhere Dosierung kaum gesteigert wird.

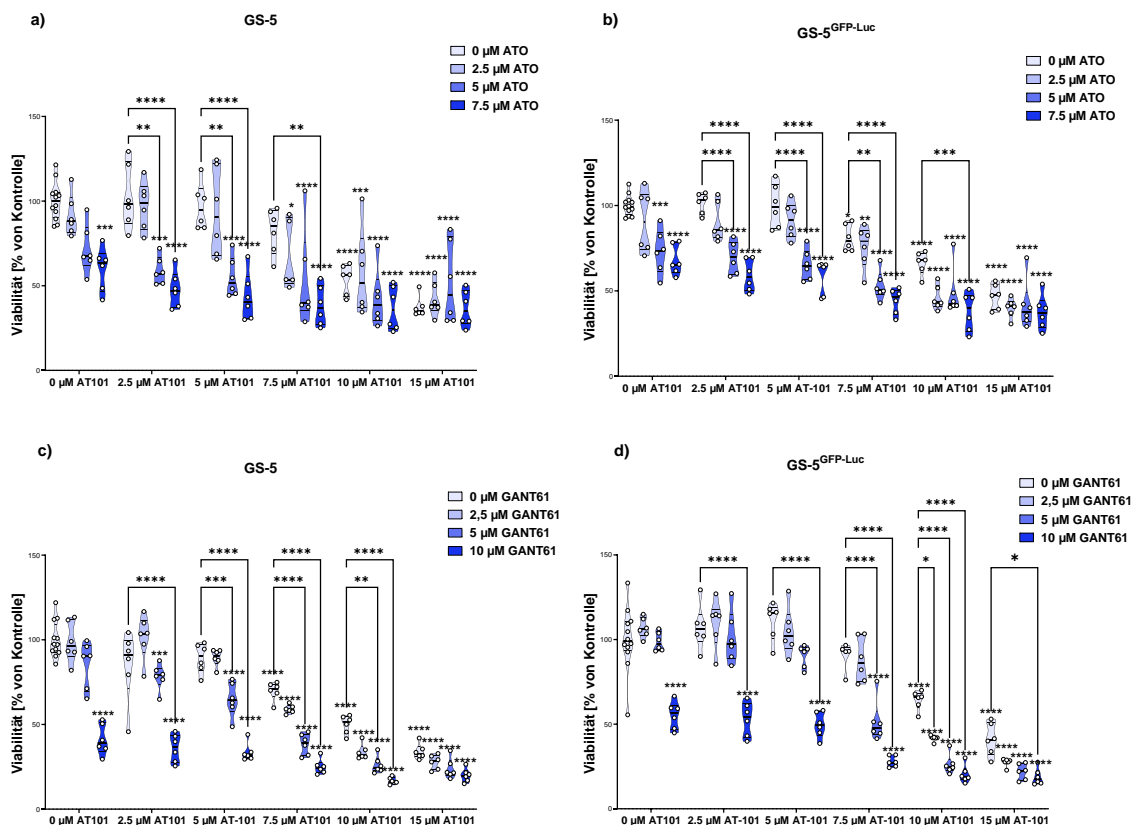


Abbildung 2.1.1. Analyse der Zellviabilität mittels MTT-Assay

Violin-Plot der Zellviabilität von [a+c] GS-5-Zellen oder [b+d] GS-5^{GFP-Luc}-Zellen mit [a+b] ATO und AT-101 oder [c+d] GANT61 und AT-101 für 24 Stunden. Kumulative Daten von 6 Kulturen (n=6). Statistische Beurteilung mittels Two-way-ANOVA und post-hoc Test nach Tukey (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; **** p < 0.0001).

Eine genauere Betrachtung der Zellviabilität auf Einzelzebene ist mittels Annexin-V/PI-Färbung und Analyse per Durchflusszytometrie möglich. Letztere ermöglicht wie in 2.5.3 beschrieben die Sortierung der Zellen anhand unterschiedlicher Parameter und nach Fluoreszenzmarkierung von Annexin-V und PI insbesondere die Einteilung von Zellen einer homogenen Suspension in apoptotische (früh- und spätapoptotisch) bzw. lebende Zellen. Auch hier erfolgte die Messung nach 24-stündiger Behandlung. Entsprechend der bisher dargestellten Ergebnisse bestätigt die Analyse eine dosisabhängige Initiierung der Apoptose mit zusätzlicher Steigerung des Effektes in Kombinationsbehandlung. Die Fraktion spät-apoptotischer Zellen zeigt sich insgesamt höher als jene der früh-apoptotischen Zellen. Eine große Fraktion von früh-apoptotischen Zellen zeigt sich unter hohen Konzentrationen und Mono-Behandlung mittels AT-101 und GANT61 sowie in Kombination letzterer, wohingegen der Anteil früh-apoptotischer Zellen lediglich unter Behandlung mit 2,5 μ M ATO vergleichbar andernfalls deutlich geringer ist (vgl. Abb. 2.1.2 und 2.1.3-a).

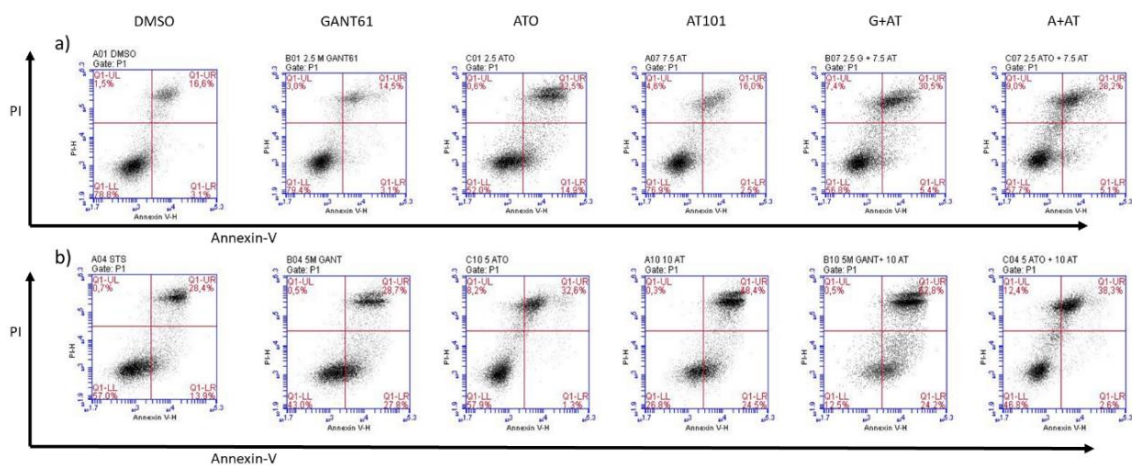


Abbildung 2.1.2. Gating der Durchflusszytometrie nach Annexin-V/ PI-Färbung von GS-5 Zellen

Dot-Plot von APC-Annexin-V/ PI Färbung von GS-5-Zellen mit [a] niedriger Dosierung ATO oder GANT61 und AT-101 oder [b] hoher Dosierung von ATO oder GANT61 und AT-101 für 24 Stunden. Die Plots zeigen folgende Gates: PI negativ/ APC-Annexin-V negativ (links unten), PI-positiv/ APC-Annexin-V negativ (links oben), PI negativ/ APC-Annexin-V positiv (rechts unten) und PI positiv/ APC-Annexin-V positiv (rechts oben).

Deutliche additive Effekte zeigen sich hier nicht eindeutig in Kombination von ATO/AT-101, allerdings durchaus durch Kombination von GANT61 und AT-101. Hinsichtlich einer adäquaten Elimination von Zellen ergibt sich eine signifikante Induktion des Zelltodes (jeweils >60% der Zellen) insbesondere unter Monotherapie mit 5 μ M GANT61 und ATO, sowie 10 μ M AT-101. Maximale Effekte mit einem Anteil sterbender Zellen von ca. 80% werden unter hohen Konzentrationen der Kombinationsbehandlung erreicht. In niedrigen Konzentrationen zeigt sich ein deutlich geringerer Anteil sterbender Zellen. Lediglich ATO führt bei 2.5 μ M zu einem signifikanten Zelltod-Anstieg von ca. 50%, wohingegen niedrige Dosierungen von GANT61 und AT-101 keine signifikante Änderung gegenüber der Kontrollgruppe zeigen (vgl. Abb. 2.1.3-b).

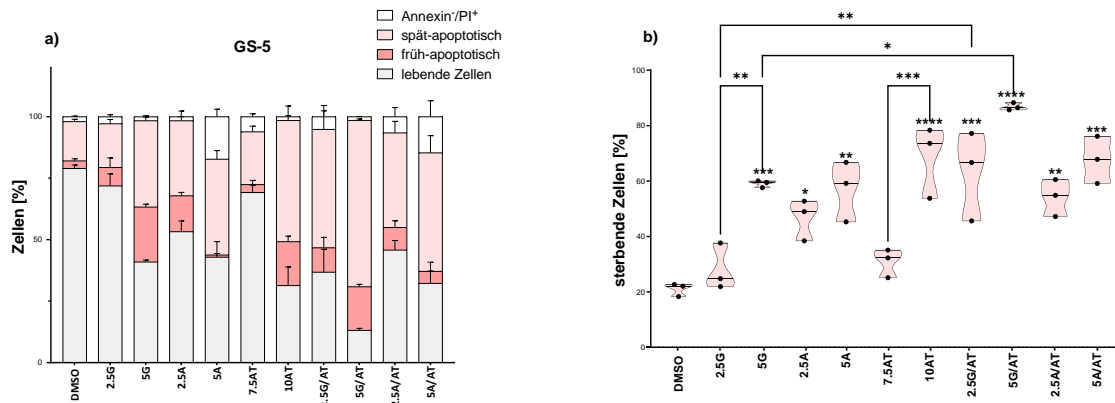


Abbildung 2.1.3. Analyse des Zelltods von GS-5 Zellen mittels FACS

[a] *Staggered Bar-Plot* von Annexin-V/PI Färbung von GS-5-Zellen nach Gating-Strategie in früh- und spät-apoptotische Zellen sowie lebende Zellen und [b] Violin-Plot des prozentualen Anteils sterbender Zellen (100 - Anteil lebender Zellen). Kumulative Daten von 3 Kulturen (n=3). Statistische Auswertung mittels One-way-ANOVA und post-hoc Test nach Tukey (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

Selbige Analyse erfolgte an einer nicht-stammzellartigen Zelllinie, den MZ-54, zur Evaluation einer Stammzellspezifität. Hier zeigt sich unter jeglicher Behandlung sowie in Kombination bei üblichen Konzentrationen deutlich geringere Anteile apoptotischer Zellen als Ausdruck einer größeren Resistenz dieser nicht-stammzellartigen Zellen gegenüber der Stammzell-gerichteten Therapie. Ein signifikanter Anteil sterbender Zellen wird lediglich unter hohen Dosierungen von ATO und dessen Kombination mit AT-101 erreicht. Selbst die Kombination von 5 μ M ATO und 7.5 μ M AT-101, welche in GS-5 Zellen zu Zelltod in ca. 70% der Zellen führt, induziert in MZ-54 lediglich zu ca. 30% Zelltod (vgl. Abb. 2.1.4-d). Die

Behandlung mit hoher Dosierung von GANT61/AT-101 führt analog in GS-5 Zellen zu einem Anteil des Zelltods von ebenfalls ca. 70%, wohingegen in MZ-54 dieser Anteil bei ca. 20% liegt. Dieser fulminante Unterschied ist in niedrigeren Substanzkonzentrationen ebenso deutlich (vgl. Abb. 2.1.4-b). Zur Prüfung der adäquaten Induzierbarkeit eines Zelltodes in MZ-54 wurde hier zudem Staurosporin (STS) verwendet. Hierbei lässt sich ein signifikanter Anteil sterbender Zellen von ca. 85% beobachten. Letzteres verdeutlicht die weitestgehend selektive Induktion von Zelltod in stammzellartigen Zellen durch die untersuchten Substanzen.

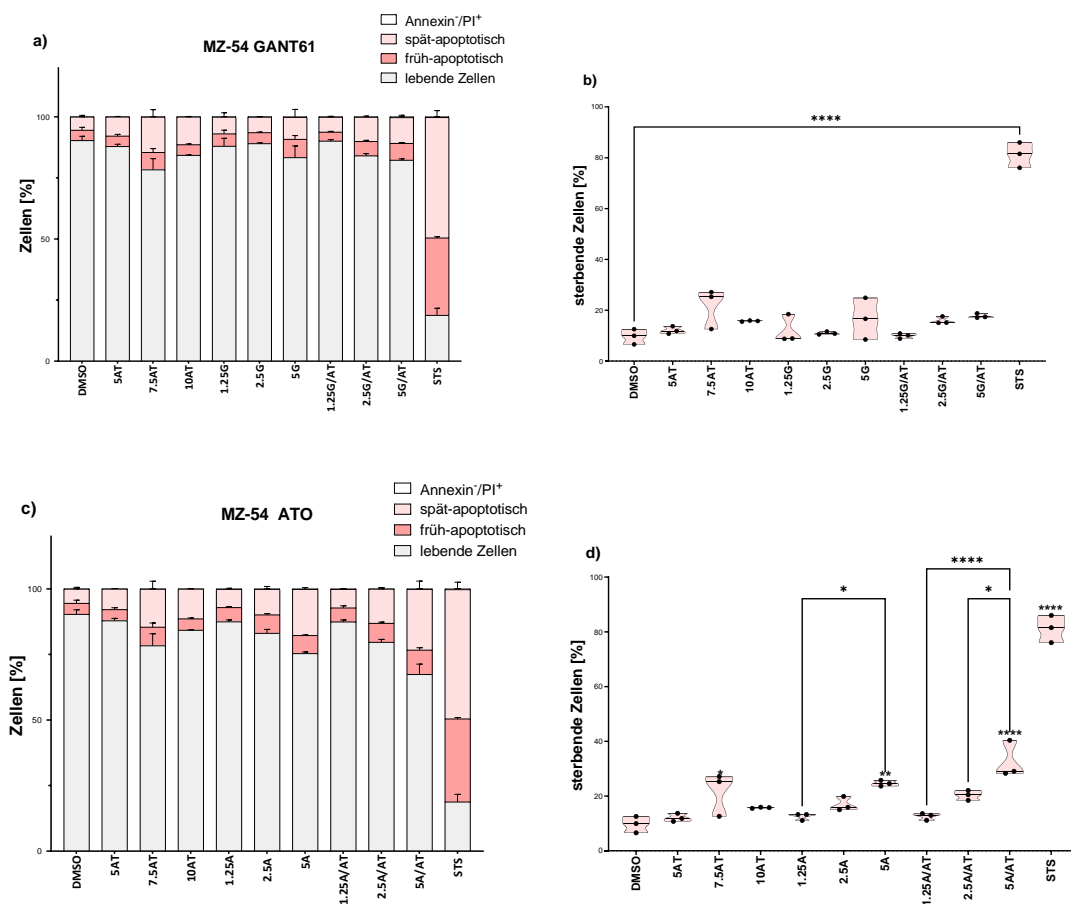


Abbildung 2.1.4. Analyse des Zelltods von MZ-54 Zellen mittels FACS

Staggered Bar-Plot von Annexin-V/PI Färbung von MZ-54 Zellen unter Behandlung mit GANT61 [a] oder ATO [c] und AT-101 und Violin-Plot des prozentualen Anteils sterbender Zellen (100 - Anteil lebender Zellen) unter GANT61 [b] und ATO [d]. Kumulative Daten von 3 Kulturen (n=3). Statistische Auswertung mittels One-way-ANOVA und post-hoc Test nach Tukey (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; **** p < 0.0001). Verwendung von Staurosporin (STS) als Apoptose-Induktor zur Positiv-Kontrolle.

Zur weiteren Annäherung an *in vivo* Verhältnisse wurden *ex vivo* Untersuchungen des Tumorwachstums an organotypischen Kulturen durchgeführt. Diese Annäherung ermöglicht eine adäquatere Übertragbarkeit der Ergebnisse in translationaler Hinsicht. Zwar unterliegen auch *ex vivo* Modelle Limitationen, nichtsdestotrotz lassen sich *in vivo* Verhältnisse hierdurch effizient simulieren. Insbesondere Zell-Zell-Interaktionen mit eventuellen extrinsischen Wechselwirkungen, welche *in vitro* kaum abgebildet werden, können *ex vivo* erfolgreich modelliert werden. Zusätzlich ermöglicht das Modell Aussagen zur Gewebepenetranz der Substanzen, obgleich die klassische Barriere der Blut-Hirn-Schranke nicht nachempfunden werden kann. *Ex vivo* kultivierte Zellen unterliegen des Weiteren einer vermehrten Konkurrenz mit entsprechend größerem Substratmangel. Außerdem lassen sich Fähigkeiten der Invasion hervorragend in *ex vivo* Modellen abbilden.

Entsprechend erfolgte die Kultivierung von GS-5^{GFP-Luc}, GS-8^{GFP-Luc} und CellTracker™ CM-Dil-Farbstoff markierten 17/02 auf Hirnschnitten adulter Mäuse. Eine derartige „Markierung“ der Zellen erlaubt auf effiziente Weise das Tumorwachstum fortlaufend zu beobachten, ohne die Notwendigkeit einer histologischen Aufarbeitung. Vor Verwendung der transduzierten Zellen erfolgte, wie bereits dargestellt eine Testung auf weitgehende Äquivalenz, sodass die Effekte auch auf nicht-transduzierte Zellen übertragbar erscheinen.

Hierbei zeigte sich eine Reduktion der Tumorgroße von GS-5 Zellen insbesondere unter Behandlung mit ATO, sowie in Kombination von ATO/AT-101; teilweise konnte sogar eine vollständige Elimination der Tumore erreicht werden (vgl. Abb. 2.1.5-a). Die Einzelsubstanzen AT-101 und GANT61 führten zu keiner Reduktion der Tumore. Hier kam es lediglich zu einer geringeren Ausdehnung im Vergleich zu unbehandelten Tumoren. Die Kombination von GANT61/AT-101 bewirkte hingegen eine adäquate Reduktion der Tumorgroße (vgl. Abb. 2.1.5-a). Diese Ergebnisse konnten in GS-8-Zellen weitestgehend reproduziert werden, wobei hier auch in Kombination von GANT61/AT-101 keine Reduktion der Tumorgroße erreicht werden konnte (vgl. Abb. 2.1.5-b). In der primären Zelllinie 17/02 wiederum zeigte sich lediglich eine Verminderung des Tumorwachstums durch die Behandlungen. Eine Reduktion der Tumorgroße ergab sich in keiner der untersuchten Behandlungen. Lediglich ATO/AT-101 führte zu einem

weitestgehenden Sistieren des Tumorwachstums (vgl. Abb. 2.1.5-c). Dabei sei vermerkt, dass die primäre Zelllinie 17/02 wie bereits beschrieben einem rekurrenten Tumor entstammen, der bereits zweimaliger Radiatio und einmaliger Chemotherapie unterlief. Letzteres legt eine besondere Resistenz der Zellen gegenüber Therapiemaßnahmen nahe.

Die Untersuchung erfolgte für GS-5 Zellen insgesamt in besonders detaillierter Weise. So wurde das Tumorwachstum für 28 Tage beobachtet und für 9 Zeitpunkte ausgewertet. Interessanterweise zeigt sich in dieser Zeit ein rascher Eintritt der Effekte durch ATO, ATO/AT-101 und GANT61/AT-101. Tatsächlich führen nur Behandlungsregime mit ATO zu einer weiteren Reduktion der Tumormasse über den gesamten Zeitraum hinweg. Nach initial starkem Effekt unter GANT61/AT-101 kann im Verlauf nur ein Sistieren des Wachstums verzeichnet werden. Diese Beobachtung deckt sich insbesondere in Hinblick auf die Ergebnisse in GS-8 Zellen. Hier besteht bereits initial die Wirkung von GANT61/AT-101 in einer Verminderung des Tumorwachstums. Ein umfänglicher Zelluntergang kann hier bereits zu Beginn nicht verzeichnet werden. Demgegenüber findet sich für beide Behandlungen mit ATO auch für GS-8 Zellen eine initiale Reduktion der Tumorgrößen mit entsprechendem Zelluntergang. Zusätzlich lassen sich anhand der organotypischen Kulturen, zumindest deskriptiv, Ergebnisse von Migrationsanalysen reproduzieren (vgl. Kapitel 3.2.3). Bereits hier sei erwähnt, dass eine reduzierte Zellmigration durch die Substanzen beobachtet werden konnten. Obgleich im Vorliegenden keine detaillierte Betrachtung der Invasion erfolgte, zeigt sich im Randbereich insbesondere unbehandelter Tumore ein lichtetes Zellverteilungsmuster als mögliches Korrelat einer Invasion der Zellen (vgl. Abb. 2.1.6). Einige Tumorzellen präsentierten darüber hinaus eine Verteilung entlang organisierten Strukturen der Hirnschnitte. Insbesondere Tumoren unter Behandlung mit ATO und ATO/AT-101 fehlten diese Verteilungsmuster. Diese Beobachtungen verstehen sich als rein deskriptive Beschreibung, sind allerdings ein erster Hinweis auf mögliche Ableitungen für die Fähigkeiten der Zellen zur Invasion.

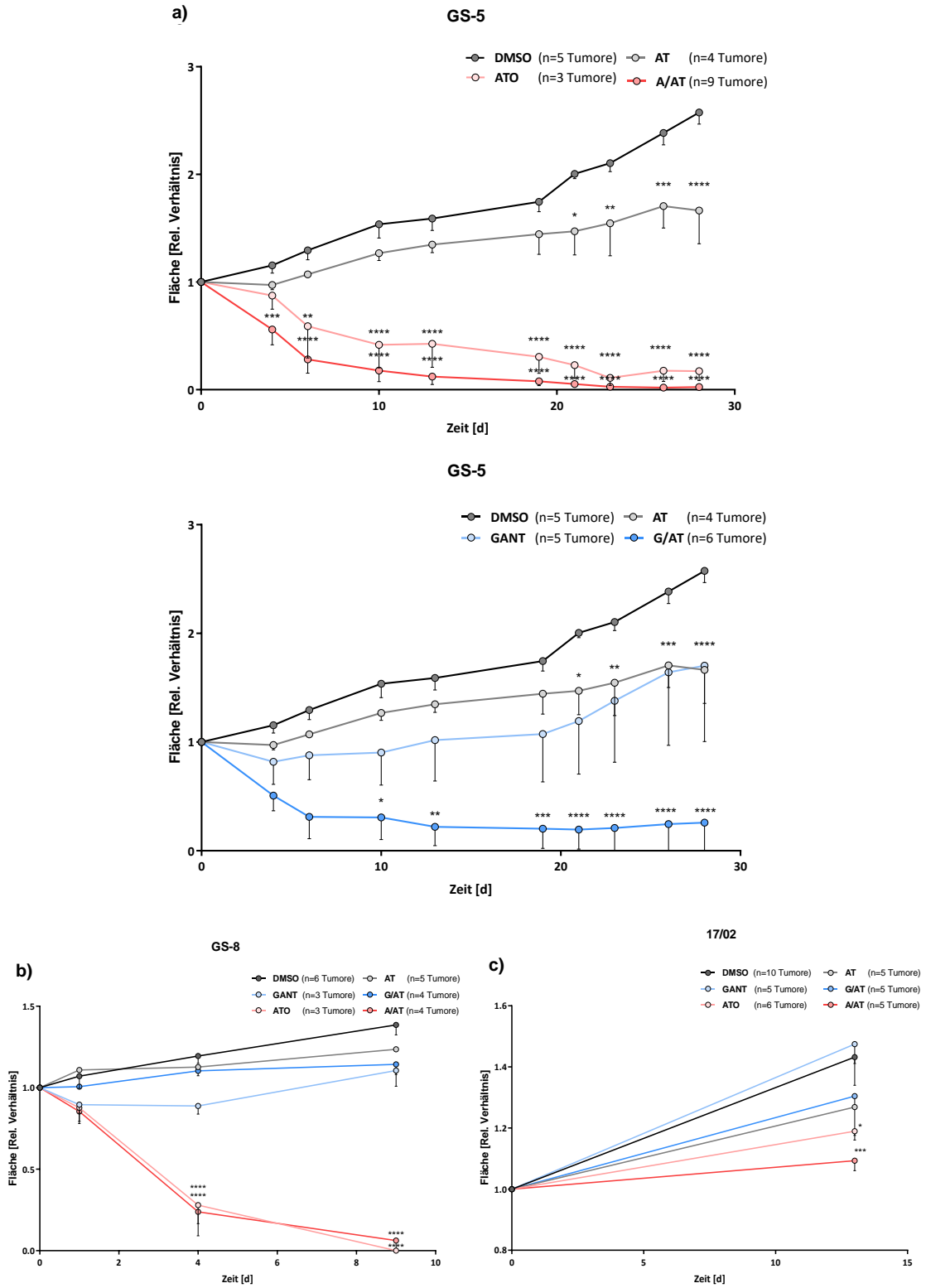


Abbildung 2.1.5. Tumorwachstum von GS-5 Zellen

Point-Plot (+SEM) des Tumorwachstums von GS-5^{GFP-Luc} [a], GS-8^{GFP-Luc} [b] und 17/02 [c] Tumorsphären in organotypischer Kultur unter Behandlung von 2.5 μ M ATO und 5 μ M AT-101 [a] und 2.5 μ M GANT61 und 5 μ M AT-101 [b]. Statistische Auswertung mittels One-way-ANOVA und post-hoc Test nach Tukey (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

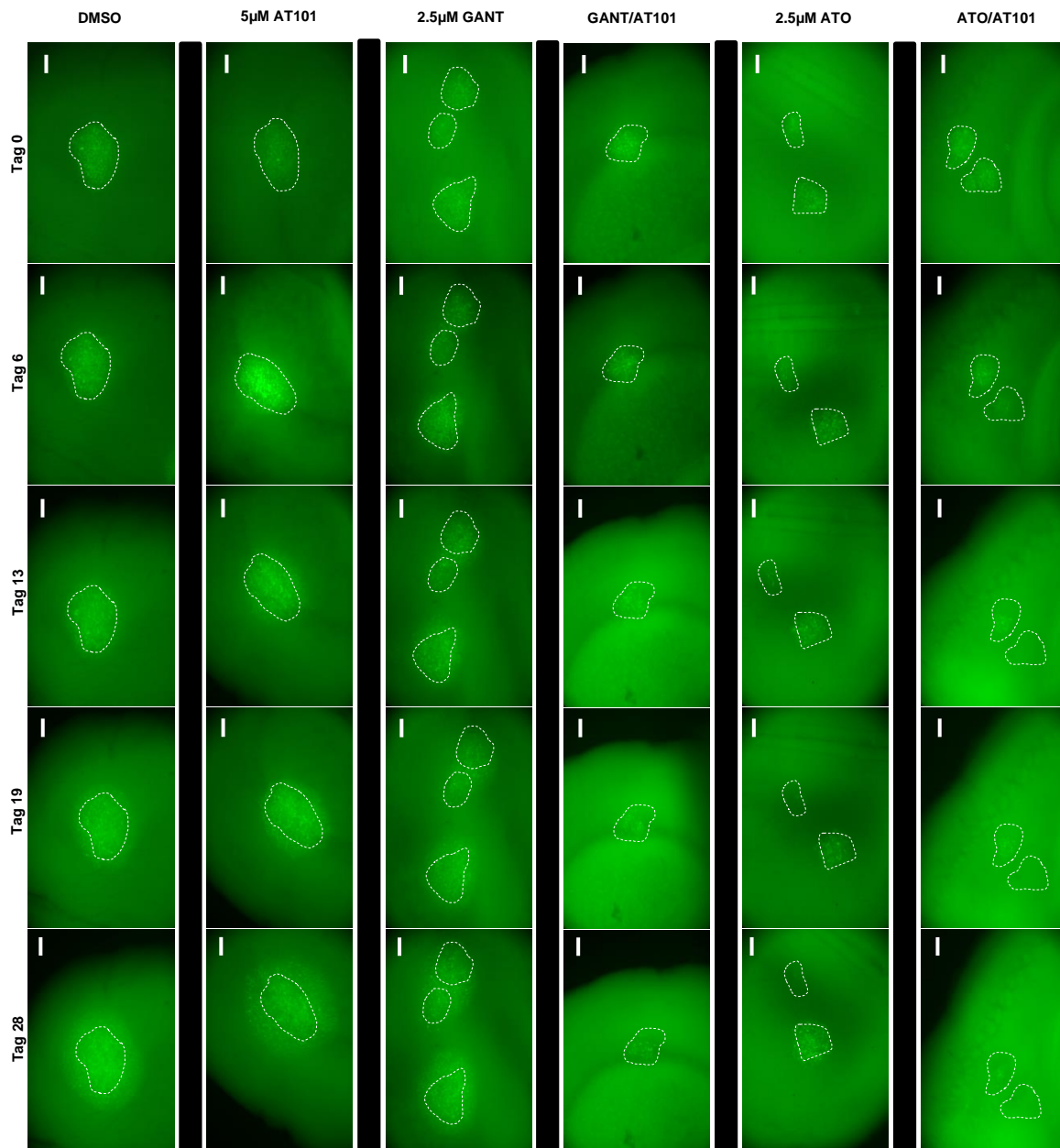


Abbildung 2.1.6. Reduktion von GSC-Tumorwachstum in organotypischer Gewebekultur

Repräsentative Bilder der Mikroskopie des Tumorwachstums von GS-5^{GFP-Luc}-Spähren in organotypischen Kulturen für Tag 0, Tag 6, Tag 13 und Tag 28 unter Behandlung mit 2,5 µM GANT61 oder ATO und 5 µM AT-101 bzw. deren Kombinationen. Skalierungsbalken: 500 µm. Overlay des Areals der Tumorausdehnung an Tag 0 in Weiß.

3.1.2 Evaluation des Synergismus von ATO/ GANT61 und Gos-sypol

Bei Betrachtung der bisher präsentierten Ergebnisse ergibt sich die Frage nach einer möglichen Synergie der Effekte der Einzelsubstanzen in Kombination. Augenscheinlich ist in jeder untersuchten Konzentration die Kombinationsbehandlung der Behandlung der jeweiligen Einzelsubstanzen überlegen; Letztlich erlaubt dies jedoch keine Aussage darüber, ob der beobachtete Effekt ein bloß additiver ist oder vielmehr eine tatsächliche Synergie besteht. Dem Problem der Definition des Synergismus widmeten sich in der Vergangenheit viele Untersuchungen. Eine etablierte und weitläufig anerkannte Definition und Methodik zur Evaluation von Synergismus wurde durch Chou und Talalay bereits vor Jahrzehnten ausgearbeitet¹⁰⁶ und im weiteren Verlauf re-evaluiert und verfeinert.¹¹⁴ Die Frage nach Synergismus ist demnach keine primär statistische mit signifikantem Ergebnis der Hypothesen $A + B > A$ oder $A + B > B$, da Letzteres ebenfalls für rein additive Effekte gilt. Vielmehr stellt sich die Frage nach einem Effekt, der diesen rein additiven übersteigt (Synergismus) oder ihm unterliegt (Antagonismus). Zur Quantifizierung und mathematischen Betrachtung dieser Grundlage erfolgte die Einführung des „*Combination Index*“ (CI) mit Definition von Synergismus bei $CI < 1$, Antagonismus bei $CI > 1$ und additivem Effekt bei $CI = 1$. Theoretische Basis dieser Überlegung ist die Vereinbarkeit mit dem Massenwirkungsgesetz und die Betrachtung von Enzymkinetik bzw. Dosis-Effekt-Kurven. Grundsätzlich besteht bei zwei rein additiv wirkenden Substanzen eine definierte mittlere effektive Dosis (ED50), die zunächst für jede Substanz alleinig bestimmt werden kann. Unter Zugabe der jeweils anderen Substanz wird der halbmaximale Effekt der Beobachteten früher erreicht (kleinere ED50) je näher einer Annäherung an die ED50 der anderen Substanz erfolgt. Hieraus lässt sich jeder Anteil der ED50 von Substanz 1 gegen jeden Anteil der ED50 von Substanz 2 modellieren. Zeigt sich anhand der beobachteten Werte einer Untersuchung nun ein Erreichen des halbmaximalen Effektes bei kleineren Werten der ED50 von Substanz 1 und 2 als jenen zuvor erwarteten unter der Bedingung eines rein additiven Effektes ist von einem Synergismus auszugehen. Mittels der Software „*CompuSyn*“ erfolgte die Berechnung der CI-Werte anhand der oben dargestellten Datensätze der MTT-Analysen.

Es zeigt sich in beiden untersuchten Zelllinien insbesondere bei hoher Effektstärke ein synergistischer Effekt sowohl bei Kombination von ATO und AT-101 als auch bei GANT61 und AT-101 (vgl. Abb. 2.2). Die kleinsten Dosen hingegen zeigen teilweise antagonistische Effekte. Letzteres präsentiert wie durch Chou et al. beschrieben eine häufige Begebenheit und ist von geringer klinischer Relevanz. Eine genauere Betrachtung erfolgt in Kapitel 4.2. Diese Ergebnisse decken sich weitestgehend mit dem im Hauptwerk¹⁰⁵ zu dieser Arbeit publizierten Untersuchungen an einer größeren Anzahl von MTT-Messungen.

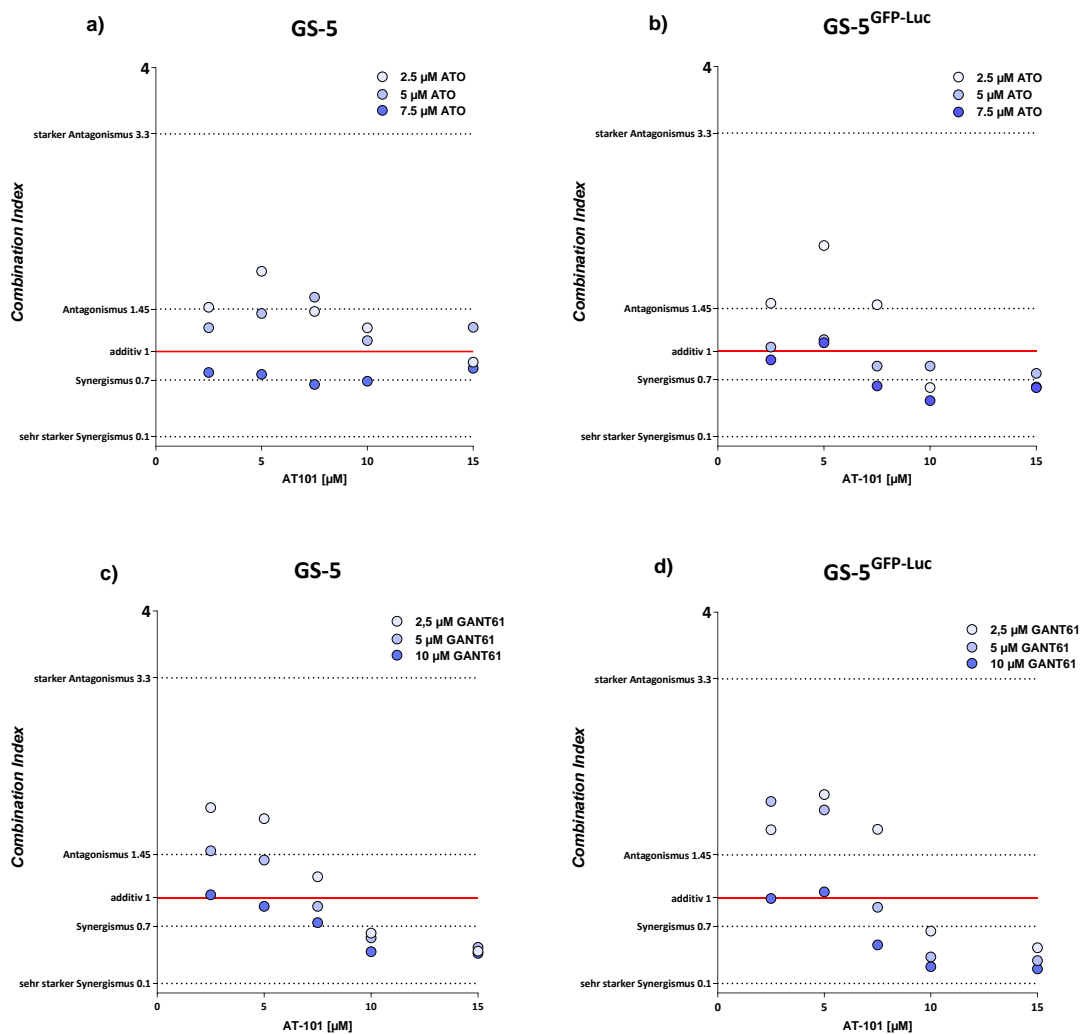


Abbildung 2.2. Vergleich der *Combination-Indizes* für GS-5 und GS-5^{GFP-Luc}

[a] *Point-Plot* der CI-Werte von GS-5-Zellen anhand der MTT-Assays (vgl. Abb. 2.1.1) für die Behandlung mit ATO und AT-101 nach 24 Stunden. [b] *Point-Plot* der CI-Werte von GS-5^{GFP-Luc}-Zellen anhand der MTT-Assays für die Behandlung mit ATO und AT-101 nach 24 Stunden. [c] *Point-Plot* der CI-Werte von GS-5-Zellen anhand der MTT-Assays für die Behandlung mit GANT61 und AT-101 nach 24 Stunden. [d] *Point-Plot* der CI-Werte von GS-5^{GFP-Luc}-Zellen anhand der MTT-Assays für die Behandlung mit GANT61 und AT-101 nach 24 Stunden.

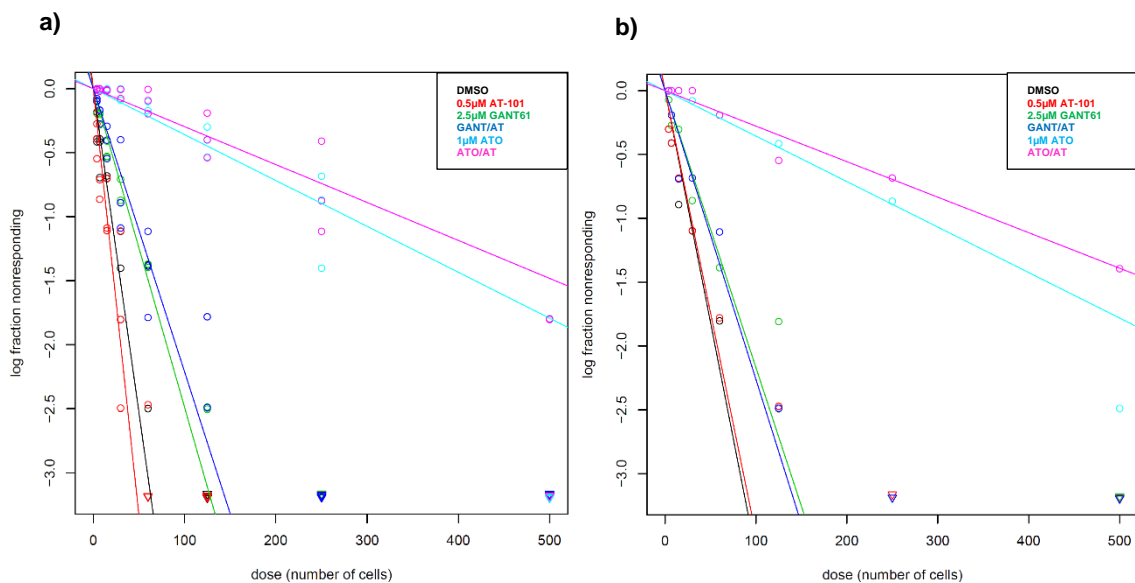
3.2 Limitierung stammzellassoziierter Eigenschaften durch Hh-/Notch-Inhibition

3.2.1 Stammzelldepletion durch Inhibition des Hh- und Notch-Signalwegs

Obgleich die untersuchten Zelllinien wie bereits beschrieben grundsätzlich als stammzellartige Zellen gelten können, so unterscheiden sich Einzelzellen dieser Populationen doch im Ausmaß ihrer stammzelltypischen Eigenschaften. Ein etabliertes Verfahren, um in einer heterogenen Suspension eine quantitative Aussage über Zellen mit starker Ausprägung eines bestimmten Merkmals treffen zu können sind LDA. Hierbei erfolgt die serielle Verdünnung der Zellsuspension und anschließende Untersuchung auf Positivität des zu untersuchenden Charakteristikums in jeder Verdünnungsstufe. Ist bei unverdünnten oder wenig verdünnten Suspensionen noch davon auszugehen, dass das Charakteristikum anzutreffen ist, so sinkt diese Wahrscheinlichkeit mit zunehmender Verdünnung abhängig davon, wie oft ein Merkmal grundsätzlich existiert. Als Parameter für das Ausmaß an stammzelltypischer Kapazität kann die Fähigkeit einer Einzelzelle zur Bildung einer Tumorsphäre gewertet werden. Die quantitative Untersuchung dieser Fähigkeit unter Behandlung erlaubt demnach eine Aussage darüber, ob die zu untersuchende Substanz stammzellartige Zellen beeinträchtigt und ihr charakteristisches Potential zur Bildung einer Tumorsphäre inhibiert. Als deskriptiver Begriff für die Anzahl der Zellen einer heterogenen Suspension mit ausgeprägtem Potential zur Sphärenbildung soll hier die „Stammzellfrequenz“ eingeführt werden.

Es zeigt sich eine signifikante Reduktion der Stammzellfrequenz der GS-5 Zellen unter Behandlung mit ATO ($p=1,41e^{-17}$) bzw. Kombination von ATO und AT-101 ($p=5,97e^{-21}$). So präsentiert sich das Merkmal der adäquaten Sphärenbildung in der Kontrollgruppe initial bei 1/28 Zellen. Dieses Merkmal wird unter Anwendung von ATO nur noch in 1/280 Zellen beobachtet. Die Sphärenbildung wird unter ATO somit ca. 10-mal seltener und unter ATO/AT-101 12-mal seltener nachgewiesen als in unbehandelten Zellsuspensionen. Weniger ausgeprägt allerdings ebenfalls signifikant ist die Reduktion nach Behandlung mit GANT61 (2-fach;

p=0,0477). Ein nicht signifikanter Trend wird unter GANT61 und AT-101 (2-fach; p=0,0711) erreicht. Ebenfalls nicht signifikant ohne merkliche Änderung der Stammzellfrequenz ist die alleinige Behandlung mit AT-101 (vgl. Abb. 2.3.1-a). Wie bereits in 2.1.1 beschrieben erfolgte in der transduzierten Zelllinie GS-5^{GFP-Luc} die Äquivalenztestung hinsichtlich Zellviabilität. Wie im Folgenden gezeigt erfolgte Letzteres ebenfalls hinsichtlich der Stammzellfrequenz. Die Ergebnisse präsentieren sich komplementär zur nicht transduzierten Zelllinie der GS-5. Eine signifikante Reduktion kann auch hier für die Behandlung mit ATO (14-fach; p=1,99e⁻⁶⁶), ATO und AT-101 (13-fach; p=1,07e⁻⁶¹), GANT61 (3-fach; p=1,49e⁻¹³) und zusätzlich für die Behandlung mit GANT61 und AT-101 (3-fach; p=6,56e⁻¹⁵) nachgewiesen werden. Auch in transduzierten GS-5 Zellen zeigt sich ein initiale Sphärenbildung in 1/20 Zellen und wird analog durch ATO auf 1/290 Zellen um mehr als den Faktor 10 reduziert (vgl. Abb. 2.3.1-b).

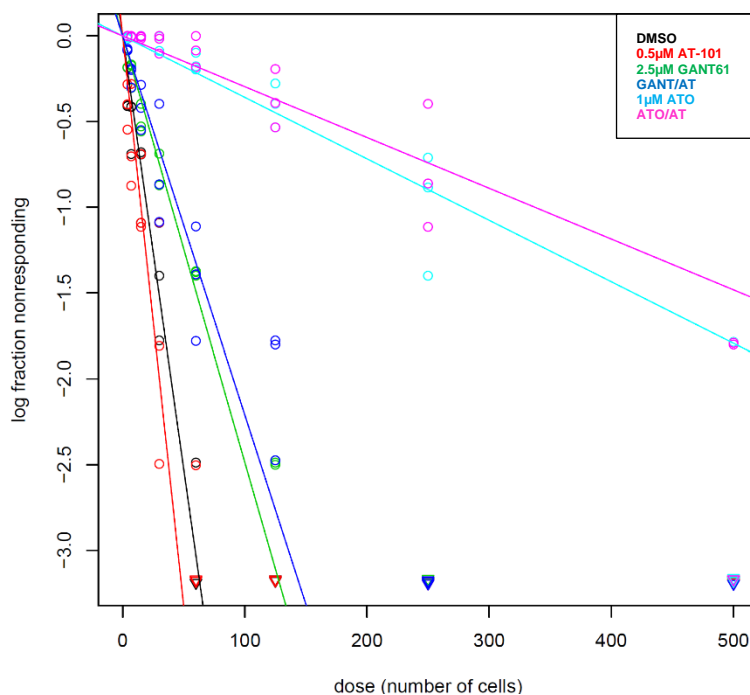


GS-5	Stammzellfrequenz (1/x)	p-Wert	GS-5 ^{GFP-Luc}	Stammzellfrequenz (1/x)	p-Wert
DMSO	28.0	-	DMSO	20.2	-
AT-101	29.2	0.868	AT-101	19.6	0.849
GANT61	46.6	0.0477	GANT61	60.0	1.49e ⁻¹³
GANT/AT-101	44.7	0.0711	GANT/AT-101	64.6	6.56e ⁻¹⁵
ATO	281.2	1.41e ⁻¹⁷	ATO	293.8	1.99e ⁻⁶⁶
ATO/AT-101	360.0	5.97e ⁻²¹	ATO/AT-101	257.1	1.07e ⁻⁶¹

Abbildung 2.3.1. Stammzelledepletion in GS-5 Zellen durch Arsentrioxid und (-)-Gossypol

Log-Fraction-Plot von [a] GS-5 (1 Experiment) und [b] GS-5^{GFP-Luc} Zellen (3 Experimente) nach sieben-tägiger Behandlung. Tabellarische Listung von Stammzellfrequenz und p-Werten nach statistischer Analyse mittels Chi-Quadrat-Test via ELDA-Software. Kumulative Daten von 3 Kulturen (n=3).

Ähnliche Ergebnisse weist die Untersuchung der Zelllinie GS-8 auf. Eine signifikante Reduktion ergibt sich auch hier unter Behandlung mit ATO (14-fach; $p=1,41e^{-60}$), ATO und AT-101 (15-fach; $p=2,71e^{-68}$) sowie GANT61 (2-fach; $p=4,6e^{-6}$) und zusätzlich unter Behandlung mit GANT61 und AT-101 (2-fach; $p=8,3e^{-8}$). Auch in GS-8 Zellen führt AT-101 allein zu keiner Änderung der Stammzellfrequenz. Interessanterweise zeigen sich die absoluten Werte der Stammzellfrequenz sehr robust. So besitzt auch in GS-8 Zellen 1/20 Zellen die Fähigkeit zur Sphärenbildung. Analog zu GS-5 Zellen ergibt auch hier ATO eine Änderung der Frequenz auf 1/280 Zellen (vgl. Abb. 2.3.2).

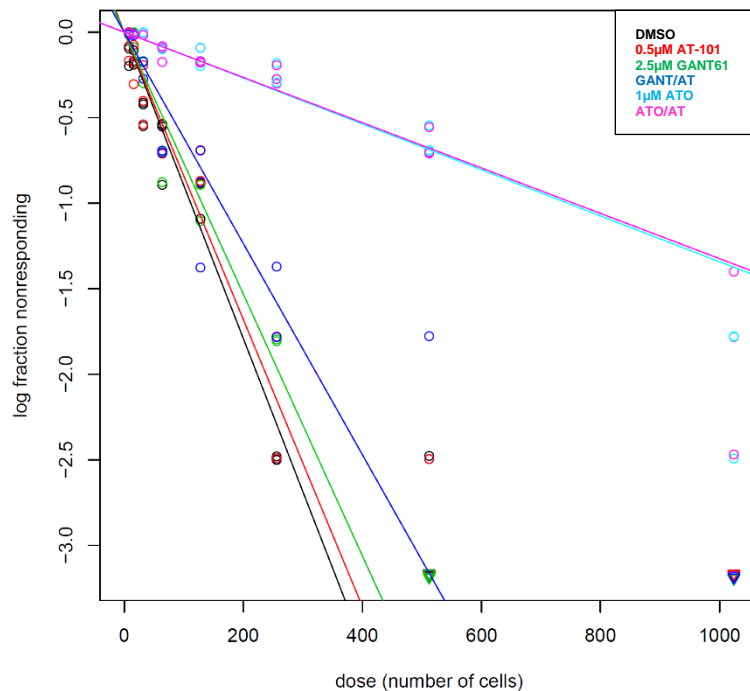


GS-8	Stammzellfrequenz (1/x)	p-Wert	Stammzellfrequenz (1/x)	p-Wert	
DMSO	20.3	-	AT-101	15.5	0.0778
GANT61	40.7	4.6e-06	GANT/AT-101	45.8	8.3e-08
ATO	279.3	1.41e-60	ATO/AT-101	337.9	2.71e-68

Abbildung 2.3.2. Stammzelldepletion in GS-8 Zellen durch Arsentrioxid und (-)-Gossypol

Log-Fraction-Plot von GS-8 Zellen (3 Experimente) nach siebentägiger Behandlung. Tabellarische Listung von Stammzellfrequenz und p-Werten nach statistischer Analyse mittels Chi-Quadrat-Test via *ELDA-Software*. Kumulative Daten von 3 Kulturen (n=3).

Zusätzlich erfolgte die Untersuchung der ebenfalls sphärenbildenden Zelllinie 17/02. Hier zeigt sich eine grundsätzlich seltenere Stammzellfrequenz im Vergleich zu den GS-Linien. Eine signifikante Reduktion wird hier komplementär zu den bereits beschriebenen Ergebnissen unter Behandlung mit ATO (7-fach; $p=8,9e^{-31}$), ATO und AT-101 (7-fach, $p=2,6e^{-32}$) erreicht. Die alleinige Behandlung mit GANT61 zeigt hier keine signifikante Reduktion; Letztere kann allerdings durch die Kombinationsbehandlung erzielt werden (2-fach; $p=0,0145$). Interessanterweise lässt sich trotz einer relativen Seltenheit des Merkmals bereits ohne Behandlung in 1/110 Zellen, dennoch durch ATO eine enorme Reduktion um den Faktor 7 auf 1/750 Zellen erzielen (vgl. Abb. 2.3.3).



17/02	Stammzellfrequenz (1/x)	p-Wert		Stammzellfrequenz (1/x)	p-Wert
DMSO	112	-	AT-101	120	0.673
GANT61	131	0.31	GANT/AT-101	162	0,0145
ATO	746	8,9e-31	ATO/AT-101	756	2,6e-32

Abbildung 2.3.3. Stammzelldepletion in 17/02 Zellen durch Arsentrioxid und (-)-Gossypol

Log-Fraction-Plot von 17/02 Zellen (3 Experimente) nach sieben-tägiger Behandlung. Tabellarische Listung von Stammzellfrequenz und p-Werten nach statistischer Analyse mittels Chi-Quadrat-Test via *ELDA-Software*. Kumulative Daten von 3 Kulturen (n=3).

3.2.2 Reduktion der Expression relevanter Markerproteine

Eine Betrachtung relevanter Markerproteine stammzellartiger Zellen ermöglicht eventuelle Rückschlüsse auf eine statthabende Differenzierung und damit einhergehenden Verlust von Stammzeleigenschaften. Letzteres ist insbesondere hinsichtlich des klinischen Ansprechens bei multimodaler Therapie, sowie der Reduktion einer Rekurrenz der Erkrankung relevant. Im Folgenden sind exemplarische Ergebnisse der Proteinbestimmung mittels Western Blot dargestellt, sowie die Quantifizierung Letzterer für GS-5 Zellen. Es zeigt sich insbesondere unter Behandlung mit ATO eine deutliche Reduktion stammzellassoziierter Markerproteine wie OLIG2, SOX2 und SOX9 (vgl. Abb. 2.4.2). Auch in GS-8 und 17/02 Zellen präsentiert sich dieses Ergebnis wie in Abb. 2.4.1 dargestellt. Die Mono-Behandlung mit GANT61 führt bei keiner der Zelllinien zu einer Reduktion der betrachteten Proteine. Letztere kann allerdings durch Kombination mit AT-101 erreicht werden. Zusätzlich lässt sich der Trend einer Induktion von GFAP als Zeichen einer glialen Differenzierung in den GS-Zellen zeigen.

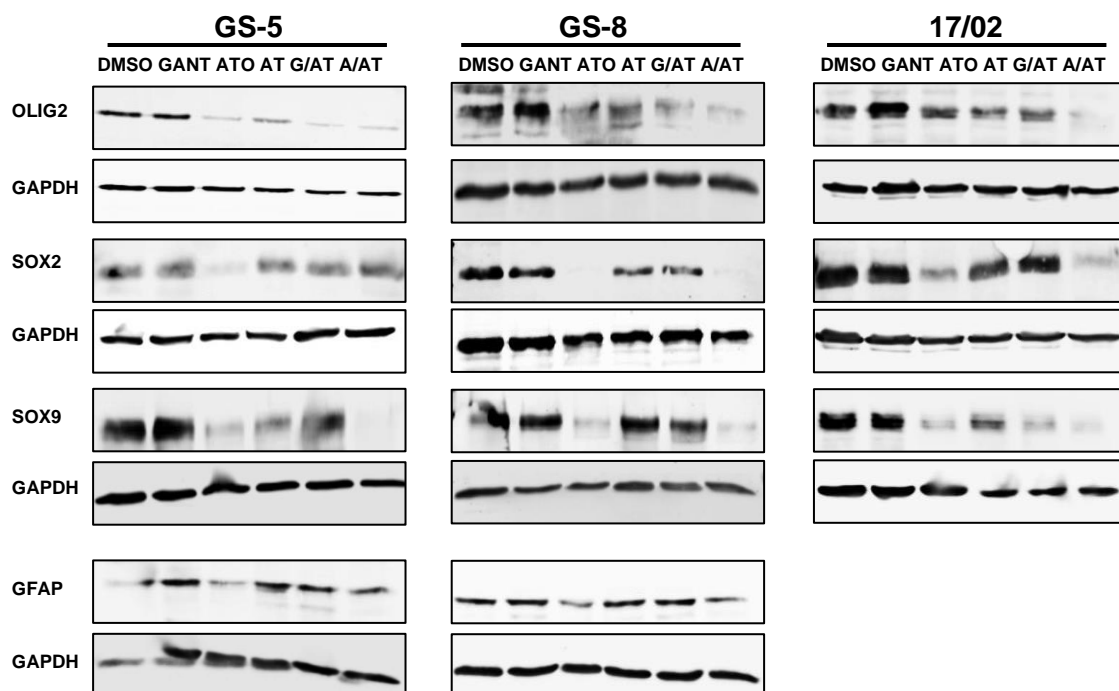


Abbildung 2.4.1. Proteinanalysen von stammzell- und Differenzierungs-assoziierten Proteinen

Repräsentative Ergebnisse der Proteinanalysen von SOX9, SOX2, OLIG2 und GFAP nach 24-stündiger Behandlung von GS-5, GS-8 und 17/02 Zellen mit 5 μ M GANT61, 7.5 μ M AT-101 und 5 μ M ATO bzw. deren Kombinationen. Ladekontrolle mittels GAPDH.

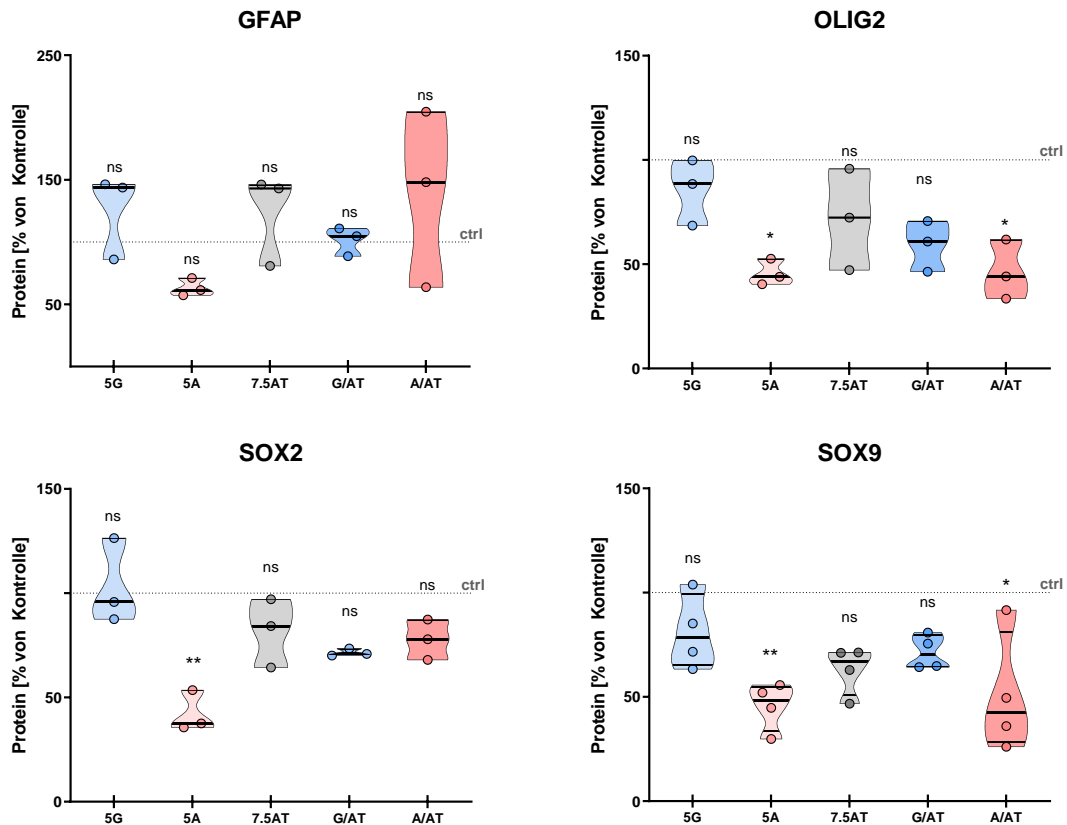


Abbildung 2.4.2. Reduktion der Expression von stammzell- und Differenzierungs-assoziierten Proteinen durch ATO und AT-101

Violin-Plot der Quantifizierung von drei unabhängigen Proteinanalysen mittels Western-Blot von GFAP, OLIG2, SOX2 und SOX9 nach 24-stündiger Behandlung von GS-5 Zellen mit 5 μ M GANT61, 7.5 μ M AT-101 und 5 μ M ATO bzw. deren Kombinationen. Kumulative Daten von 3 Kulturen (n=3). Statistische Analyse mittels One-way-ANOVA und post-hoc Test nach Tukey (* p < 0.05; ** p < 0.01).

Zusätzlich erfolgten Proteinanalysen zweier zentraler Proteine der autophagischen Maschinerie – LC3 und p62. Hierdurch sollten grundlegende Informationen zur Induktion von Autophagie durch die eingesetzten Substanzen gewonnen werden. Eine entscheidende Limitation dieser Proteinanalyse ist die fehlende Aussagekraft bezüglich des „Charakters“ der Autophagie - so kann nicht unterschieden werden, ob eine mögliche Induktion zu einer tumorpropagierenden oder antitumorale Autophagie beiträgt. Die Untersuchungen zeigten hierbei eine deutlich vermehrte Konversion von LC3-I zu LC3-II (vgl. Abb. 2.4.3-b), sowie eine Induktion von p62 als Ausdruck einer vermehrten Autophagie insbesondere unter AT-101 und ATO (vgl. Abb. 2.4.3-a). Des Weiteren erfolgte die Analyse des Proteins Akt bzw. seines phosphorylierten aktiven Korrelats, welches unter anderen am PI3K-Akt Signaling beteiligt ist und eine Vielzahl zellulärer Prozesse steuert. Hier wird eine deutliche Reduktion des phosphorylierten Akts unter ATO erreicht.

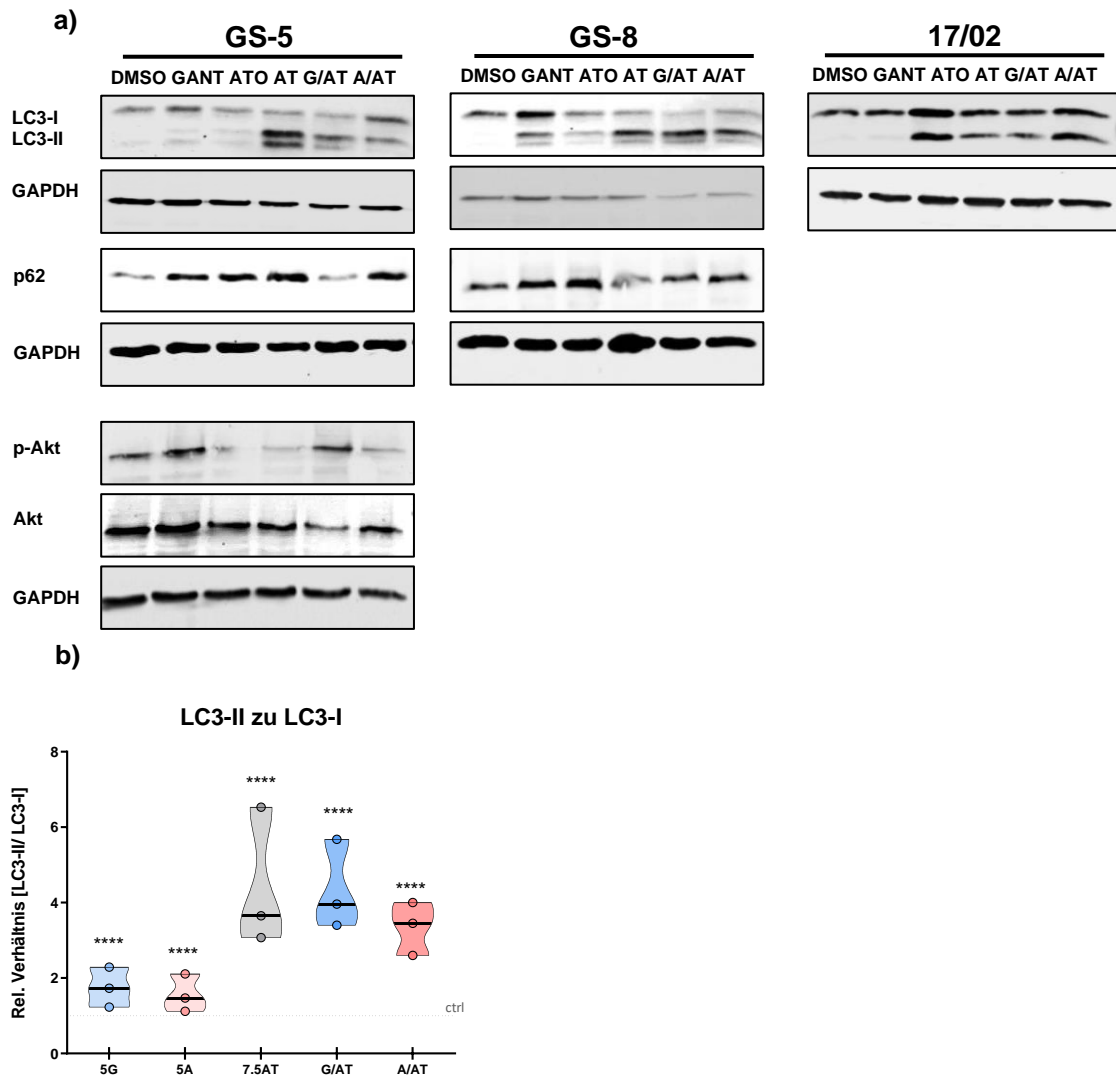
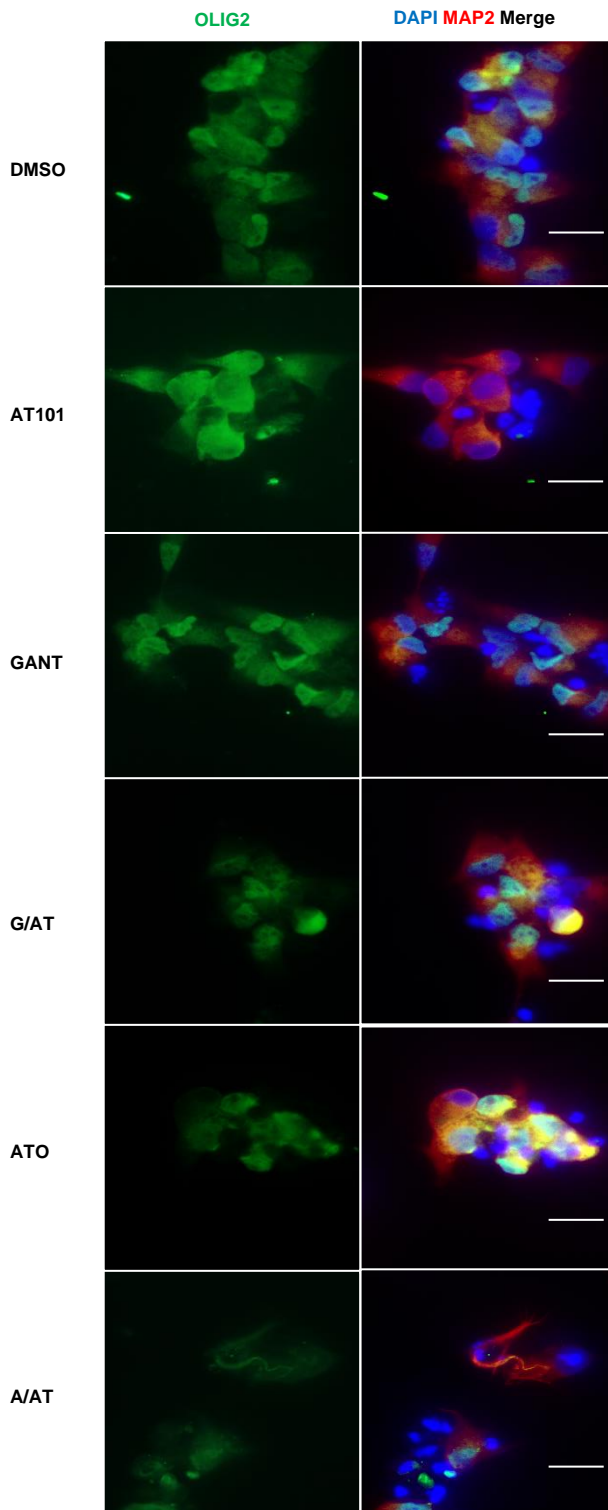


Abbildung 2.4.3. Proteinanalysen von Autophagie-assoziierten Proteinen und Akt

[a] Repräsentative Ergebnisse der Proteinanalysen von LC3-I und -II, p62 und p-Akt/Akt nach 24-stündiger Behandlung von GS-5, GS-8 und 17/02 Zellen mit 5 μ M GANT61, 7.5 μ M AT-101 und 5 μ M ATO bzw. deren Kombinationen mit Ladekontrolle mittels GAPDH und [b] *Violin-Plot* der Quantifizierung von drei unabhängigen Proteinanalysen mittels Western-Blot von LC3 nach 24-stündiger Behandlung von GS-5 Zellen mit 5 μ M GANT61, 7.5 μ M AT-101 und 5 μ M ATO bzw. deren Kombinationen. Kumulative Daten von 3 Kulturen (n=3). Statistische Analyse mittels One-way-ANOVA und post-hoc Test nach Tukey (**** p < 0.0001).

Zur Prüfung der Expression von Stammzellmarker-Proteinen auf Einzelzellebene erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Zelllinie GS-5. Auch hier zeigt sich insbesondere unter Behandlung mit ATO eine deutliche Reduktion OLIG2⁺, SOX2⁺ sowie SOX9⁺-Zellen. Eine weitere Steigerung wird durch Kombination mit AT-101 erreicht (vgl. Abb. 2.4.4-a und 2.4.5). Ebenfalls bestätigt sich keine deutliche Minderung positiver Zellen unter alleiniger Behandlung mit GANT61, sondern lediglich unter Kombination von GANT61 und AT-101. Insbesondere die Kombination von ATO und AT-101 senkt den Anteil OLIG2⁺, SOX2⁺ sowie SOX9⁺-Zellen signifikant um jeweils ca. 50% (vgl. Abb. 2.4.4-b).

a)



b)

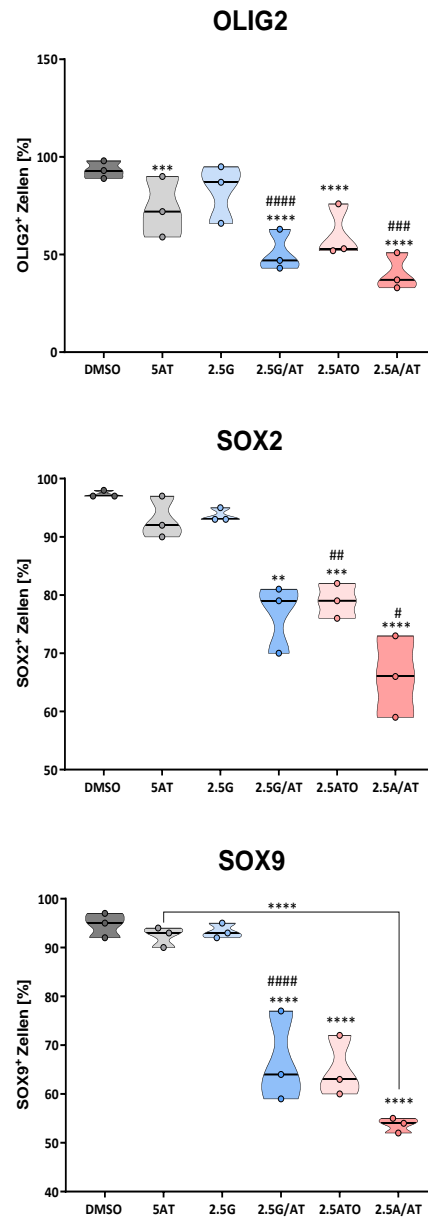


Abbildung 2.4.4. Analyse stammzellassoziierter Markerproteine in GS-5-Zellen

[a] Repräsentative Bilder der Epifluoreszenzmikroskopie für die Färbung von OLIG2 (grün), DAPI (blau) und MAP2 (rot) und [b] *Violin-Plot* der Quantifikation 3 unabhängiger Experimente nach Immunfärbung von SOX2, SOX9 und OLIG2 in GS-5 Zellen und 72-stündiger Behandlung mit 2.5 μ M GANT61, 5 μ M AT-101 und 2.5 μ M ATO bzw. deren Kombinationen. Skalierungsbalken: 20 μ m. Statistische Auswertung mittels One-way-ANOVA und post-hoc Test nach Tukey (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ und # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$; #### $p < 0.0001$ zur Mono-Behandlung).

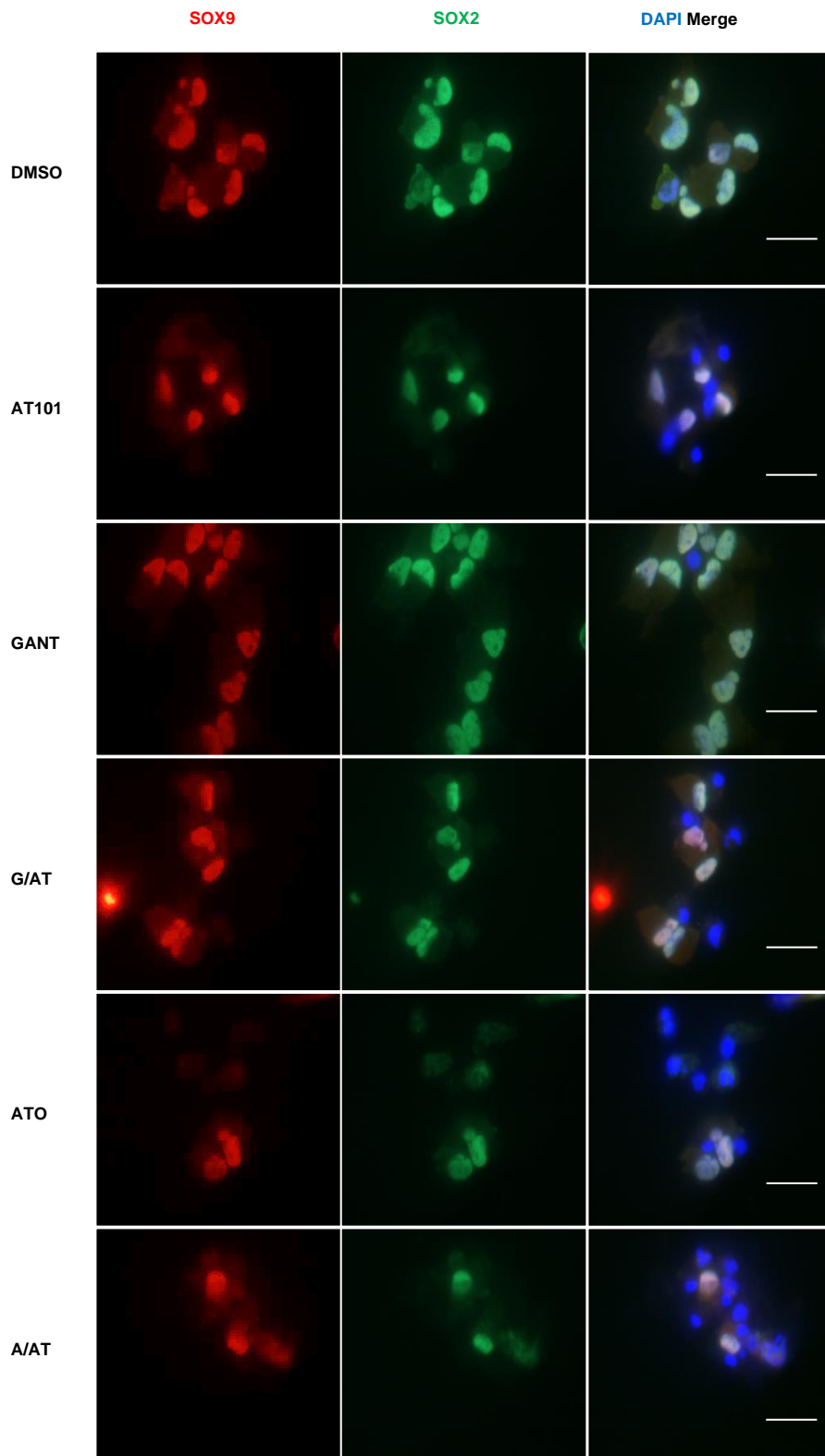


Abbildung 2.4.5. Epifluoreszenzmikroskopie von GS-5 Zellen nach Färbung für SOX9 und SOX2
 Repräsentative Bilder der Mikroskopie nach 72-stündiger Behandlung von GS-5 Zellen für Färbung von SOX9 (rot) und SOX2 (grün). Skalierungsbalken: 20 µm.

Darüber hinaus erfolgte die Prüfung der Ergebnisse bezüglich einer Reduktion stammzell-assoziiierter Gentranskripte auf Ebene der Expression mittels qPCR. Exemplarisch sind hier Ergebnisse der Zelllinie GS-8 dargestellt. Im Rahmen der Untersuchung konnten ähnliche Ergebnisse in weiteren Versuchen der Arbeitsgruppe bestätigt werden und sind weitestgehend konform mit den bereits beschriebenen Ergebnissen der Proteinanalyse und Fluoreszenzmikroskopie. Diese Untersuchung fanden an Zellen der Linien GS-5 und 17/02 statt.¹⁰⁵

In den präsentierten Untersuchungen der GS-8 Zellen zeigt sich für die stammzell-assoziierten Marker *OLIG2* und *SOX9* eine signifikante Reduktion unter Behandlung mit ATO sowie ATO und AT-101 in Kombination. Für *SOX2* kann lediglich ein Trend zur Reduktion ohne Signifikanz verzeichnet werden (vgl. Abb. 2.4.6-a). Die Verteilungsmuster spiegeln weitestgehend die Ergebnisse der Proteinanalysen mittels Western-Blot wider.

Im Rahmen der Expressionsanalysen erfolgte zusätzlich eine Evaluation der Zielgene von Hh- und Notch-Signaling. Anders als in den bereits erwähnten zusätzlichen Ergebnissen der Expressionsanalysen konnte hierbei in GS-8 Zellen lediglich eine *PTCH1* und keine *GLI1*-Reduktion gezeigt werden (vgl. Abb. 2.4.6-c). In GS-5 und 17/02 präsentieren die übrigen Untersuchungen durchaus eine Reduktion von *GLI1* mittels ATO und AT-101-Kombination, sowie alleiniger ATO-Behandlung in 17/02. Auch die negative Regulation von *CHK1* zeigte sich in übrigen Expressionsanalysen deutlicher, während in GS-8 Zellen lediglich ein Trend zur Reduktion ohne Signifikanz gesehen werden kann (vgl. Abb. 2.4.6-d). Als überaus eindeutig erweist sich eine negative Regulation von Notch-Zielgenen und -Rezeptoren durch Behandlungen mit ATO. Entsprechend kann für die Expression der Notch-Rezeptoren *NOTCH1-3* in allen Fällen eine Reduktion um >50% durch ATO und ATO/AT-101 erzielt werden. Analog verhält sich die Reduktion hinsichtlich *HES5* und *HEY1* (vgl. Abb. 2.4.6-b). Auch hier wird unter jeder Therapie mit ATO eine sehr deutliche Verminderung bewirkt. Zusätzlich führt AT-101 allein und in Kombination mit GANT61 jeweils zu einer signifikanten Reduktion von *HES5*.

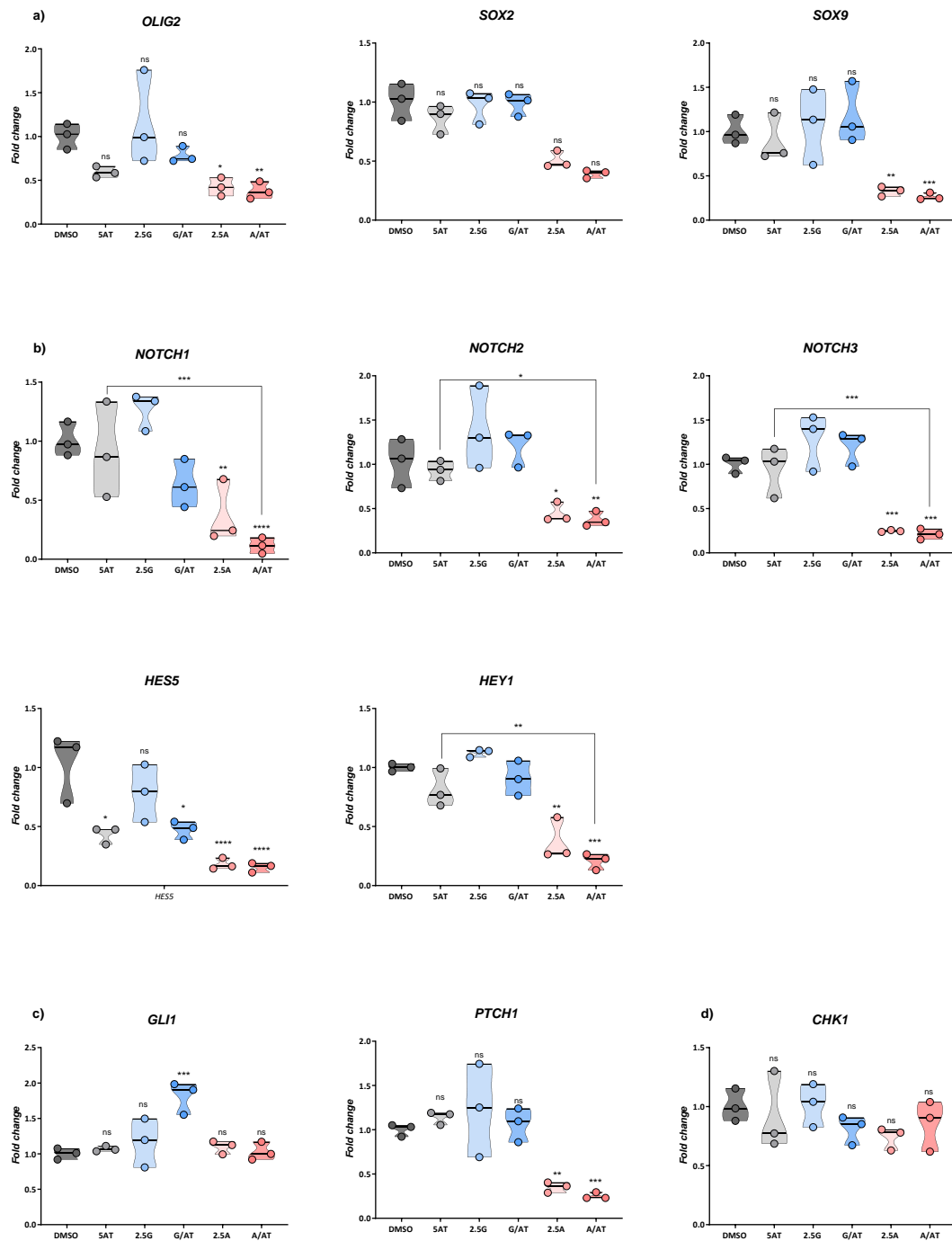


Abbildung 2.4.6. Expressionsanalyse von GS-8 Zellen

Violin-Plot von Taqman-basierten Expressionsanalysen von GS-8 Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit 2.5 μ M GANT61, 5 μ M AT-101 und 2.5 μ M ATO bzw. deren Kombinationen für [a] stammzell-assoziierte Marker, [b] Notch-Signaling, [c] Hh-Signaling und [d] *CHK1*. Kumulative Daten von 3 Kulturen (n=3). Statistische Auswertung mittels One-way-ANOVA und post-hoc Test nach Tukey (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

3.2.3 Hemmung der Migrationskapazität

Zentrales Merkmal des GB ist insbesondere sein diffuses und infiltratives Wachstum. Hierdurch wird häufig eine primäre in toto Resektion verhindert und das Risiko einer zeitnahen Rezidivsteigerung steigt. Untersuchungen des Proteoms zeigten insbesondere unter ATO und ATO/AT-101 eine massive Reduktion von Proteinen mit Verbindung zum „Gene Ontology Biological Processes“ (GO-BP) -Begriff: „Movement“ – dt. Bewegung.¹⁰⁵ Entsprechend ergab sich die Hypothese einer möglichen fulminanten Beeinträchtigung von Invasion und Migration von stammzellartigen Zellen durch die verwendeten Substanzen. Eine eindeutige Untersuchung einer diffusen, infiltrativen Zellbewegung ist nur unter großem Aufwand im Rahmen von *ex vivo* oder *in vivo* Untersuchungen möglich, da hierbei annähernd physiologische Bedingungen herrschen und unter anderem Zell-Zell-Interaktionen divergierender Zelltypen möglich sind. Ein *in vitro* untersuchbarer Surrogatparameter, welcher indirekte Rückschlüsse auf Letztere Fähigkeiten zulässt, ist die Untersuchung der Zellmigration. Aufgrund des sphäroiden Wachstumsmusters der untersuchten Zelllinien erfolgte die Beobachtung der Migration in Form von „Sphere Migration Assays“. Hierbei wird die Migration der Zellen aus ihrer ursprünglichen Tumorsphäre in zwei Dimensionen, entlang einer gedachten x- und y-Achse, betrachtet.

Übliche Untersuchungen zur Migration wie Scratch-Assays ließen sich in den untersuchten Zellen nicht etablieren. Aufgrund der Notwendigkeit der Lamininbeschichtung, um ein adhärentes Wachstum zu induzieren, verhindert das notwendige Kratzen eine anschließende Migration - wahrscheinlich aufgrund der Entfernung ebendieser Beschichtung. Interessanterweise erwiesen sich Bestrebungen der Etablierung eines Migrationsassays unter Verwendung von Silikoneinsätzen ebenfalls als frustrierend. Trotz wahrscheinlich intakter Lamininbeschichtung zeigten GS-Zellen nach Entfernung des *Inserts* keine Migration. Eine adäquate Erklärung hierfür konnte nicht gefunden werden. Letztlich führte lediglich die Aussaat als Sphäre in einem lamininbeschichteten *Well* zur Migration in GS-Zellen. Hypothesen der Gründe dieser Beobachtung beinhalten einen höheren „Migrationsdruck“ aufgrund des vermehrt hypoxischen Milieus im Zentrum der Tumorsphären oder die Möglichkeit der unzulänglichen Beschichtung unter Verwendung von Kultur-*Inserts*.

Die Dosierung der Zugabe der Substanzen wurde im Vorfeld so gewählt, dass nach 24-stündiger Inkubation unter der gewählten Behandlung ein nur geringer Anteil avitaler Zellen zu erwarten ist. Letzteres soll einer Verfälschung der Messungen, durch eine nicht stattfindende Migration aufgrund eines Untergangs der Zellen, entgegenwirken. Entsprechend erfolgte die Behandlung mit 5 μM AT-101, sowie jeweils 2,5 μM GANT61 und ATO. Hierbei präsentiert sich sowohl in MTT- als auch Annexin/PI-Untersuchungen ein nur geringer Anteil avitaler Zellen.

Nach 24-stündiger Behandlung der Zelllinien GS-3, -5, -8 und 48-stündiger Behandlung von 17/02 Zellen lässt sich in allen Linien eine signifikante Verminderung der Migration in allen Mono- sowie Kombinationsbehandlungen feststellen (vgl. Abb. 2.5.1-2.5.8). Insbesondere ATO führt in allen Zelllinien zu einer deutlichen Abnahme der Migrationskapazität. Interessanterweise divergieren die Zellen in ihrer ursprünglichen Kapazität zur Migration. So zeigen insbesondere die GS-8 Zellen eine weite Migration von über einem halben Millimeter innerhalb von 24 Stunden, sodass gerade in diesen Zellen der Effekt der Verminderung der Migration fulminant erscheint. Zusätzlich ergibt sich in allen Zelllinien eine signifikante Verminderung der Migration im Vergleich von Mono- und Kombinationsbehandlung. So führt die zusätzliche Gabe von AT-101 in jedem Fall zu einer weiteren signifikanten Reduktion der Migration, sowohl unter Behandlung mit ATO als auch mit GANT61.

Sowohl in GS-3 als auch GS-8 und 17/02 Zellen wird unter Behandlung mit ATO eine nahezu vollständige Unterbindung der Migration erreicht. Migrieren die Zellen zuvor noch zwischen ca. 0.2 (GS-3) und 0.7 (GS-8) Millimetern, so reduziert sich die Migrationsstrecke unter ATO drastisch auf unter 0.1-0.2 Millimetern in allen drei Zelllinien (vgl. Abb. 2.5.1, 2.5.5 und 3.57). Dieses nahezu vollständige Sistieren der Migration ist durch die Kombination von ATO und AT-101 zusätzlich verstärkt. Im Gegensatz dazu zeigt sich in GS-5 Zellen eine robustere Fähigkeit zur Migration (vgl. Abb. 2.5.4). Zwar lässt sich auch hier eine signifikante Reduktion erwirken, jedoch wird die Migration weniger effizient unterbunden. Die Wegstrecke von GS-5 Zellen lässt sich nahezu halbieren, dennoch migrieren die Zellen selbst unter kombinierter Behandlung von ATO und AT-101 noch über 0.2 Millimeter.

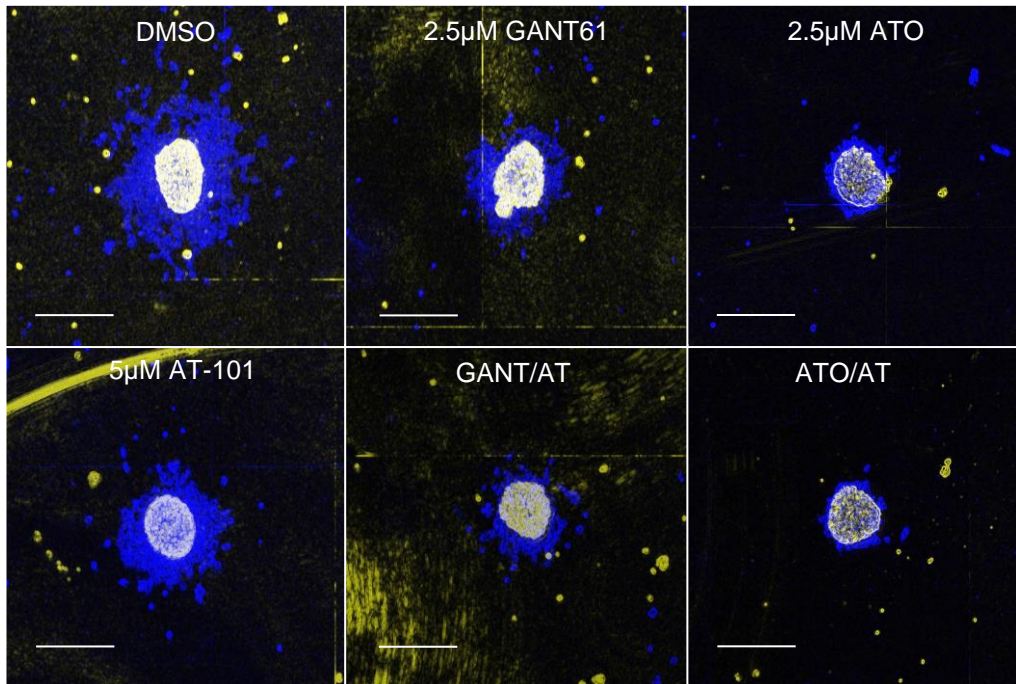


Abbildung 2.5.1. Reduktion der Migration in GS-3 Zellen

Repräsentative Bilder der Sphärenmigration mittels „Spark Multimode Microplate Reader“ von GS-3 nach 24-stündiger Behandlung mit GANT61 oder ATO und AT-101. Gezeigt ist eine Pseudokolorierung mit Startpunkt t_0 (gelb) und Endpunkt t_{24} (blau). Skalierungsbalken: 500 μm .

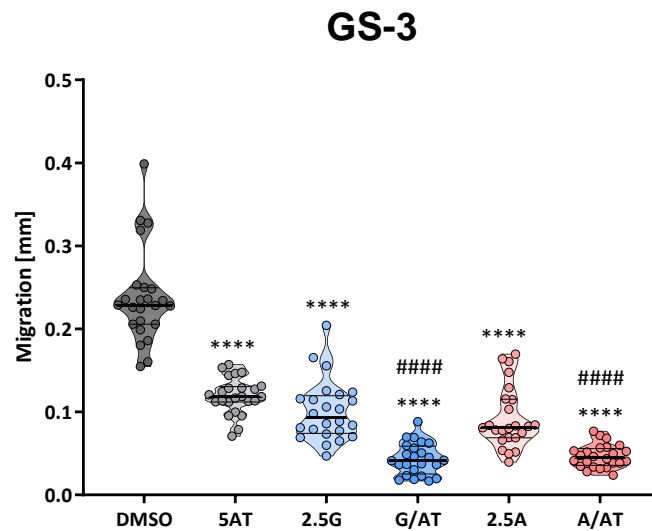


Abbildung 2.5.2. Migrationskapazität von GS-3 Zellen

Violin-Plot der Migration von GS-3 Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit GANT61 oder ATO und AT-101. Kumulative Daten von 1 Kultur ($n=1$). Statistische Auswertung mittels One-way-ANOVA und post-hoc Test nach Tukey (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ und # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$; #### $p < 0.0001$ zur Mono-Behandlung).

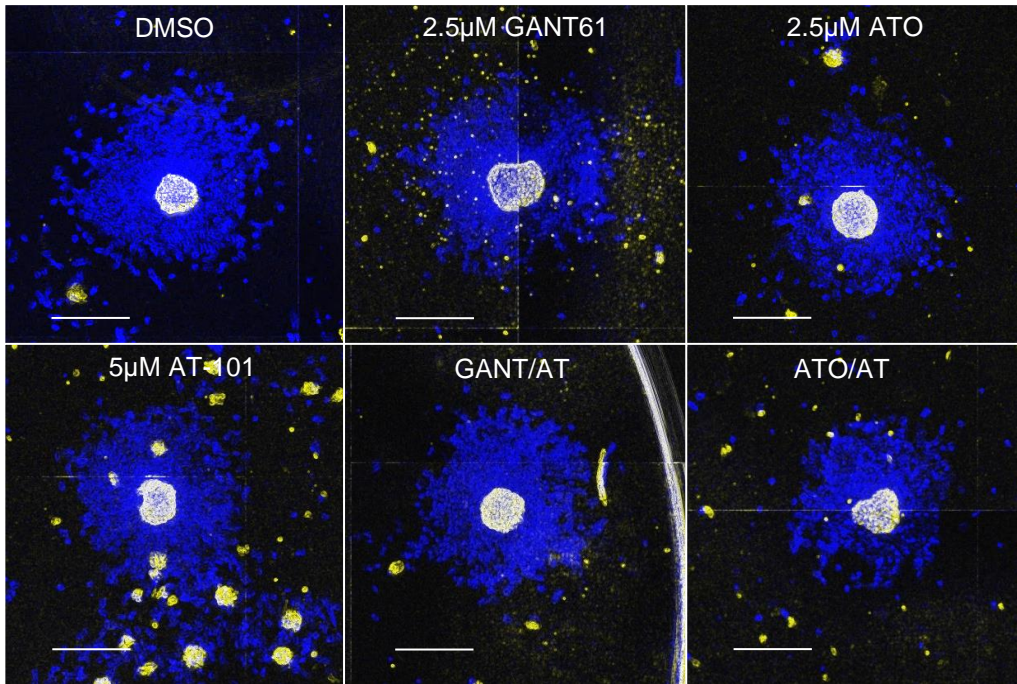


Abbildung 2.5.3. Reduktion der Migration in GS-5 Zellen
 Repräsentative Bilder der Sphärenmigration mittels „Spark Multimode Microplate Reader“ von GS-5 nach 24-stündiger Behandlung mit GANT61 oder ATO und AT-101. Gezeigt ist eine Pseudokolorierung mit Startpunkt t_0 (gelb) und Endpunkt t_{24} (blau). Skalierungsbalken: 500 μm .

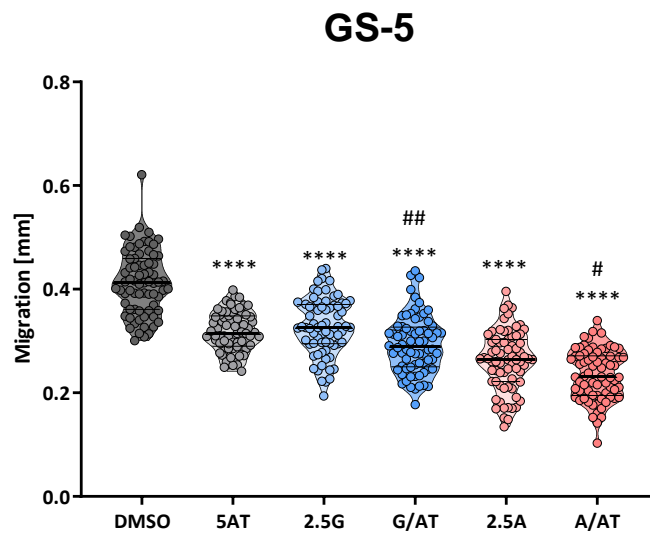


Abbildung 2.5.4. Migrationskapazität von GS-5 Zellen
 Violin-Plot der Migration von GS-5 Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit GANT61 oder ATO und AT-101. Kumulative Daten von 3 Kulturen ($n=3$). Statistische Auswertung mittels One-way-ANOVA und post-hoc Test nach Tukey (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ und # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$; #### $p < 0.0001$ zur Mono-Behandlung).

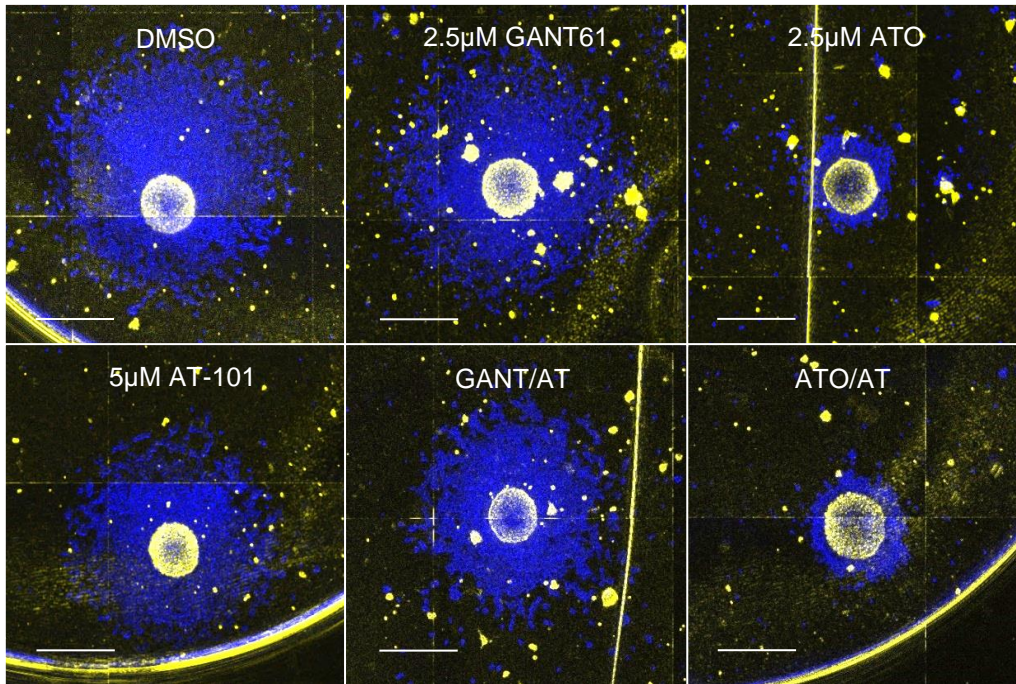


Abbildung 2.5.5. Reduktion der Migration in GS-8 Zellen

Repräsentative Bilder der Sphärenmigration mittels „Spark Multimode Microplate Reader“ von GS-8 nach 24-stündiger Behandlung mit GANT61 oder ATO und AT-101. Gezeigt ist eine Pseudokolorierung mit Startpunkt t_0 (gelb) und Endpunkt t_{24} (blau). Skalierungsbalken: 500 μm .

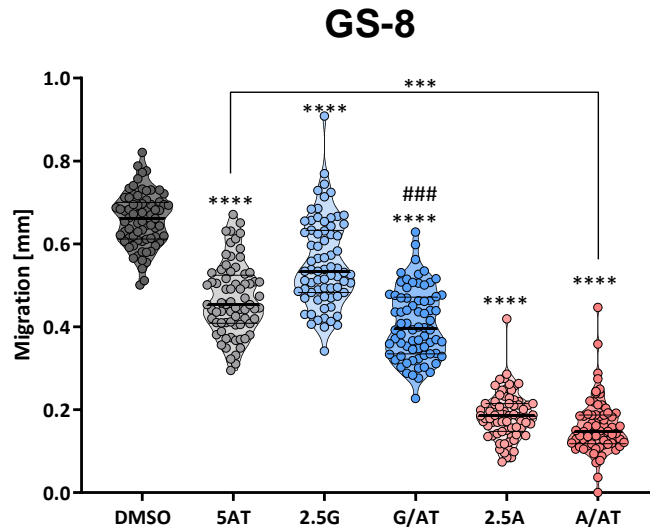


Abbildung 2.5.6. Migrationskapazität von GS-8 Zellen

Violin-Plot der Migration von GS-8 Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit GANT61 oder ATO und AT-101. Kummulative Daten von 3 Kulturen ($n=3$). Statistische Auswertung mittels One-way-ANOVA und post-hoc Test nach Tukey (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ und # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$; #### $p < 0.0001$ zur Mono-Behandlung).

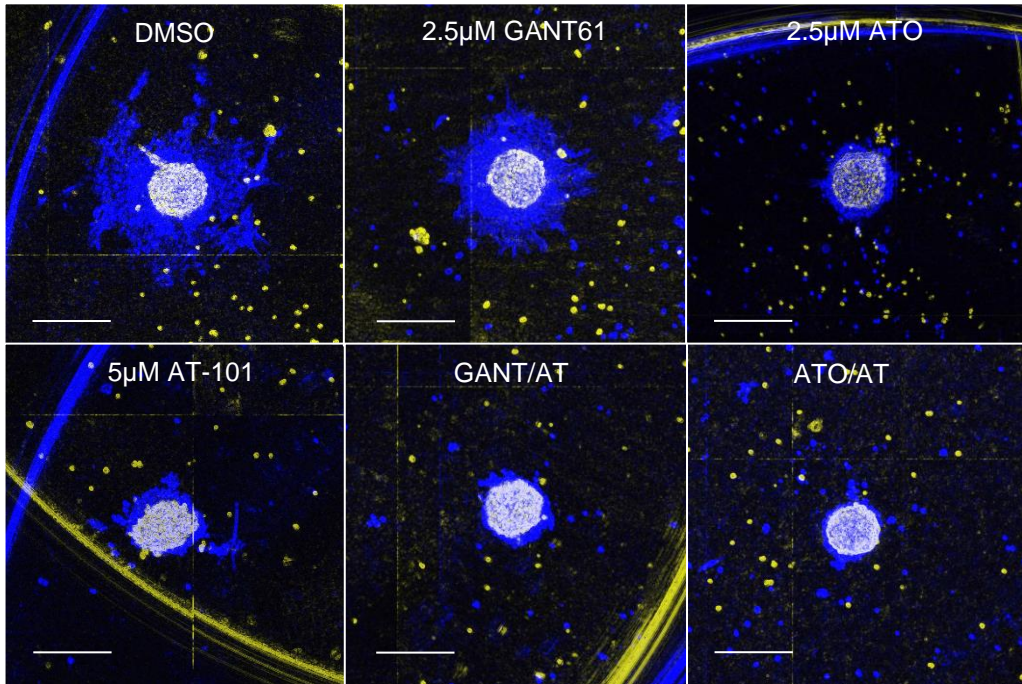


Abbildung 2.5.7. Reduktion der Migration 17/02 Zellen

Repräsentative Bilder der Sphärenmigration mittels „Spark Multimode Microplate Reader“ von 17/02 nach 48-stündiger Behandlung mit GANT61 oder ATO und AT-101. Gezeigt ist eine Pseudokolorierung mit Startpunkt t_0 (gelb) und Endpunkt t_{24} (blau). Skalierungsbalken: 500 μm .

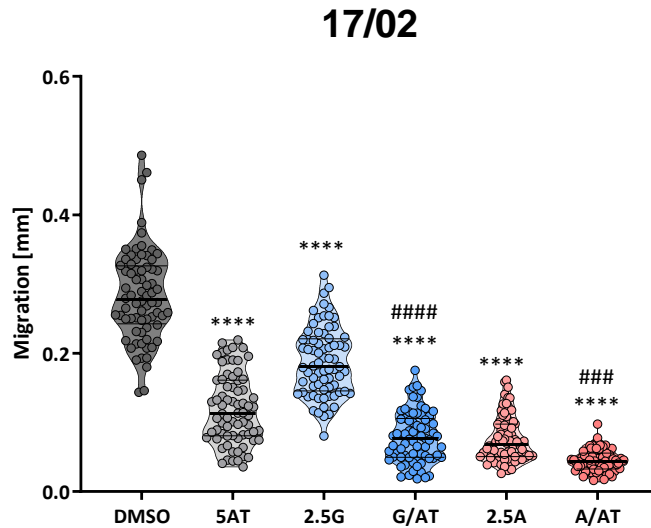


Abbildung 2.5.8. Migrationskapazität von 17/02 Zellen

Violin-Plot der Migration von 17/02 Zellen nach 48-stündiger Behandlung mit GANT61 oder ATO und AT-101. Kumulative Daten von 3 Kulturen ($n=3$). Statistische Auswertung mittels One-way-ANOVA und post-hoc Test nach Tukey (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ und # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$; #### $p < 0.0001$ zur Mono-Behandlung).

3.2.4 Arsentrioxid und (-)-Gossypol steigern die Vulnerabilität von GSC gegen ionisierende Strahlung

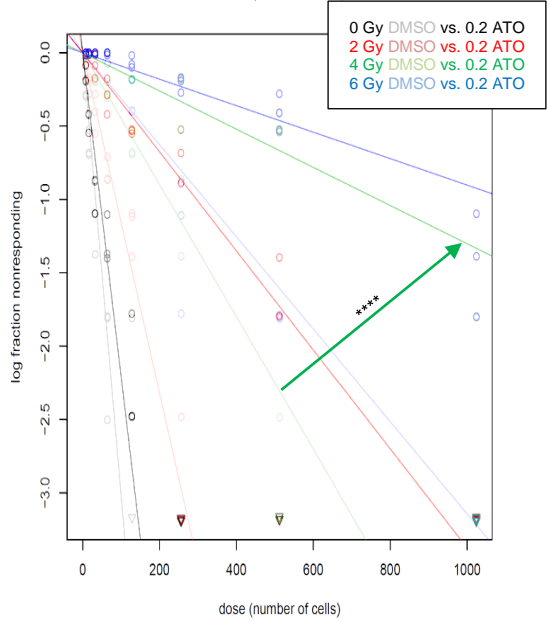
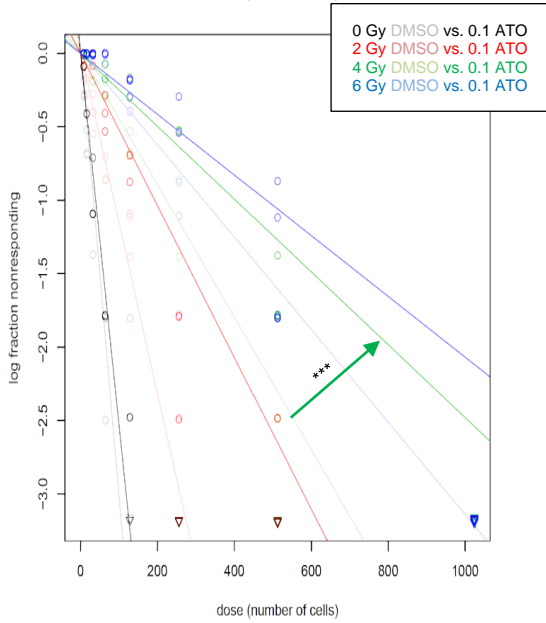
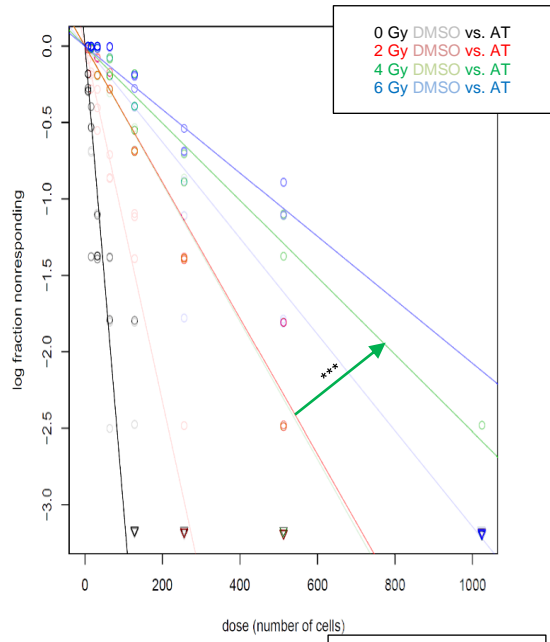
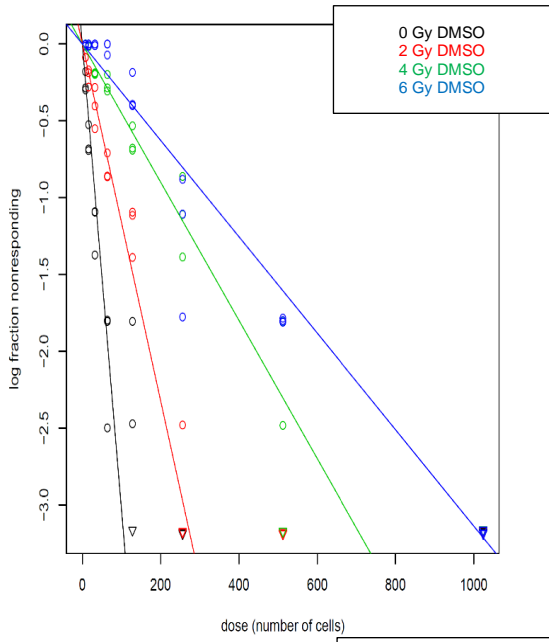
Proteomanalysen zur Annäherung an mechanistische Zusammenhänge der Wirkungsweise der untersuchten Substanzen erbrachten Hinweise auf eine Beeinträchtigung von DNA-Reparatur bei gleichzeitiger Vermittlung von oxidativem Stress unter Therapie mit den untersuchten Substanzen. Als ein zentral reduziertes Protein, insbesondere unter Therapie mit ATO sowie Kombination von ATO und AT-101, erwies sich CHK1.¹⁰⁵ Diese maßgebliche Deregulation von Systemen die insbesondere beteiligt an Resistenzmechanismen gegenüber einer Radiotherapie sind, legt die Hypothese einer möglichen Radiosensitivierung durch die Verwendung der Substanzen nahe.

Die Untersuchung der Effekte ionisierender Strahlung nach Behandlung der Zelllinien GS-5 und 17/02 erfolgte als LDA. Aufgrund der zusätzlichen Therapiemodalität erfolgte die Reduktion der Dosierung der Substanzen. Derart sollten die eigentliche Messgröße - der Kapazität zur Sphärenbildung - durch Zelltodeffekte weitestgehend unbeeinflusst bleiben. Die Dosierung wurde folglich auf 0.1 und 0.2 μM Arsentrioxid, sowie 0.5 μM AT-101 angepasst. Sowohl in GS-5 als auch 17/02 Zellen zeigt sich eine strahleninduzierte Reduktion der Stammzellfrequenz. Dieser Effekt wird durch den Einsatz von ATO dosisabhängig deutlich gesteigert. Auch die Mono-Behandlung mit AT-101 beeinträchtigt die Empfindlichkeit gegenüber Radiotherapie in GS-5 Zellen deutlich. Die Einzeleffekte lassen sich durch Kombination teilweise weiter steigern, zeigen sich jedoch nicht signifikant. Insbesondere bei hoher Strahlendosis lässt sich dabei allerdings keine weitere Steigerung in GS-5 erreichen. Aufgrund des seltenen Auftretens des untersuchten Merkmals sind hier aufgrund methodischer Limitationen jedoch Schwankungen möglich. So kann die Methode des LDA für absolute Werte nur genau sein, wenn die Verdünnungsreihe auch in der Nähe des zu erwartenden Wertes erfolgt. Aufgrund der starken Effekte auf die Stammzellfrequenz ergibt sich hier aber eine weite Verteilung der Messwerte, sodass gerade im oberen Bereich eine gewisse Ungenauigkeit eingeräumt werden muss.

Zusammenfassend erscheint insbesondere ATO in höherer Dosis von 0.2 μM als effektives Mittel zur Radiosensitivierung und scheint dabei selbst der Kombination von ATO/AT-101 überlegen. Der ursprüngliche Verlauf der Stammzellfrequenz mit zunehmender Strahlendosis zeigt sich in unbehandelten Zellen als initial 1/30 Zellen mit Potential zur Sphärenbildung ohne Bestrahlung und steigt auf 1/90 Zellen unter 2 Gy, 1/200 Zellen unter 4 Gy bis zu 1/300 Zellen unter 6 Gy. Dieser Verlauf lässt sich effizient durch den Einsatz von 0.2 μM ATO alterieren. Bei initial kaum Änderung der Stammzellfrequenz ohne Bestrahlung mit 1/40 Zellen mit Potential zur Sphärenbildung präsentiert sich im Verlauf unter Bestrahlung ein deutlicher additiver Effekt durch die Verwendung von ATO. Bereits bei 2 Gy verdreifacht sich die Stammzellfrequenz gegenüber unbehandelten Zellen auf 1/300 Zellen im Vergleich zu 1/90 Zellen. Bei einer Strahlendosis von 4 Gy zeigt sich das Potential zur Sphärenbildung unter ATO nur noch bei 1/750 Zellen und unter 6 Gy bei 1/1100 Zellen. ATO (0.2 μM) vermittelt somit eine Sensitivierung gegenüber den Effekten ionisierender Strahlung um den Faktor 3-4.

Aufgrund der multiplen Behandlungskonditionen soll zu Gunsten der Übersichtlichkeit lediglich eine detaillierte Betrachtung aller Substanzeffekte für die Bestrahlung mit 4 Gy für GS-5 Zellen erfolgen. Übrige Vergleiche von Stammzellfrequenzen und deren Signifikanz können Abb. 2.6.2 und 2.6.4 entnommen werden. Die Auswirkungen der Behandlungskonditionen bei 4 Gy sind exemplarisch in Abb. 2.6.1 und 2.6.3 durch Pfeile dargestellt. Die alleinige Radiatio mit 4 Gy bewirkt in GS-5 bereits eine deutliche Reduktion der Stammzellfrequenz (ca. 7-fach, $p=3.9 \times 10^{-34}$). Sowohl AT-101 (ca. 1,7-fach, $p=2.8 \times 10^{-4}$) als auch ATO (0.1 μM : ca. 1.8-fach, $p=2.2 \times 10^{-4}$ und 0.2 μM : ca. 3.5-fach, $p=2.01 \times 10^{-13}$) führen in der Monotherapie zu einer weiteren Steigerung dieser Effekte. Die zusätzliche Kombination der Substanzen potenziert ihre Wirkung bei 4 Gy nur im Falle der niedrigeren Einzeldosis (0.1 μM), dabei nicht signifikant (ca. 1,1-fach bzgl. ATO, $p=0.21$). In höherer Einzeldosis (0.2 μM) ergibt sich kein additiver Effekt bei 4 Gy. Letzteres entspricht den Tendenzen bei einer Strahlendosis von 6 Gy. Lediglich unter 2 Gy zeigen sich additive Effekte durch die Kombination der Substanzen auch in hoher Dosierung.

GS-5



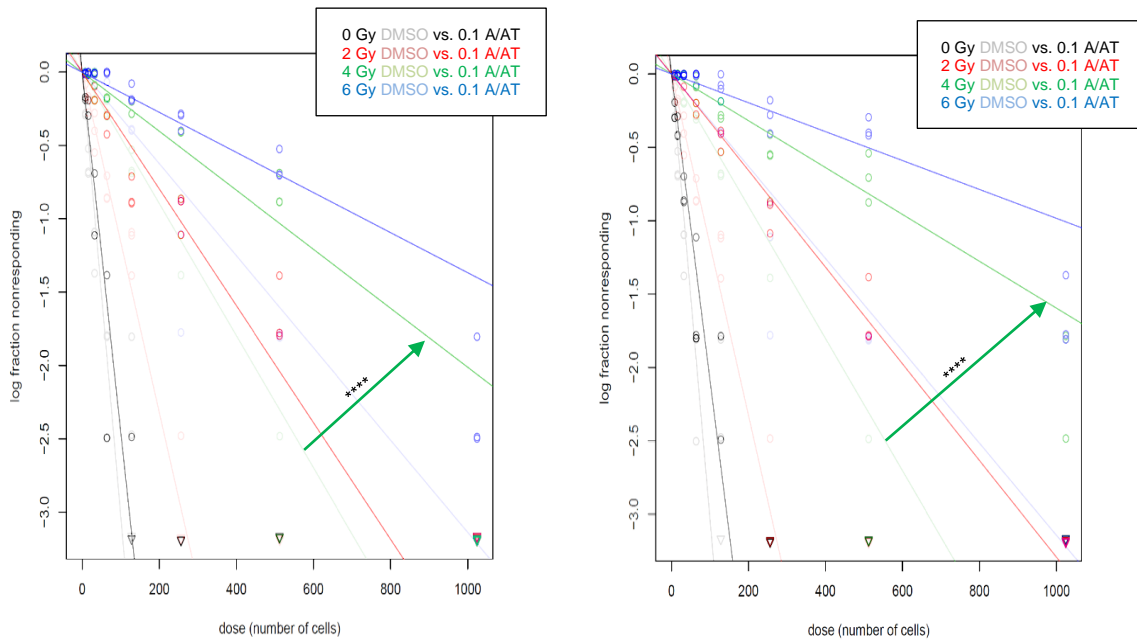


Abbildung 2.6.1. Strahlensensitivierung in GS-5 Zellen durch ATO und AT-101

Log-Fraction-Blot der Untersuchung zur Radiosensitivierung. Je Grafik Darstellung der einzelnen Konditionen nach 7-tägiger Behandlung (DMSO; 0.5 μ M AT-101; 0.1 μ M ATO; 0.2 μ M ATO, 0.1 μ M ATO + 0.5 μ M AT-101 und 0.2 μ M ATO + 0.5 μ M AT-101) mit Overlay von DMSO-Gruppe (blass) und der jeweiligen Behandlung (gesättigt) zu jeder Strahlendosis; 0 Gy (schwarz), 2 Gy (rot), 4 Gy (grün), 6 Gy (blau). Beispielhafte Darstellung der Sensitivierung bei 4 Gy im Vergleich zu DMSO mittels Pfeils (***) $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$). Statistische Analyse mittels Chi-Quadrat-Test via *ELDA*-Software.

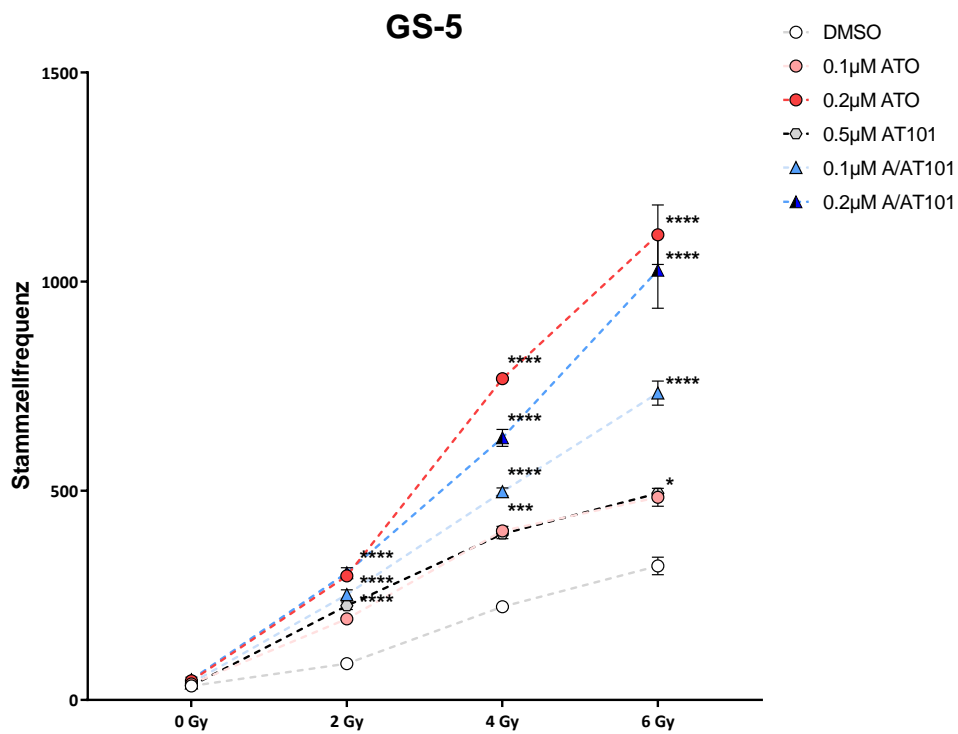


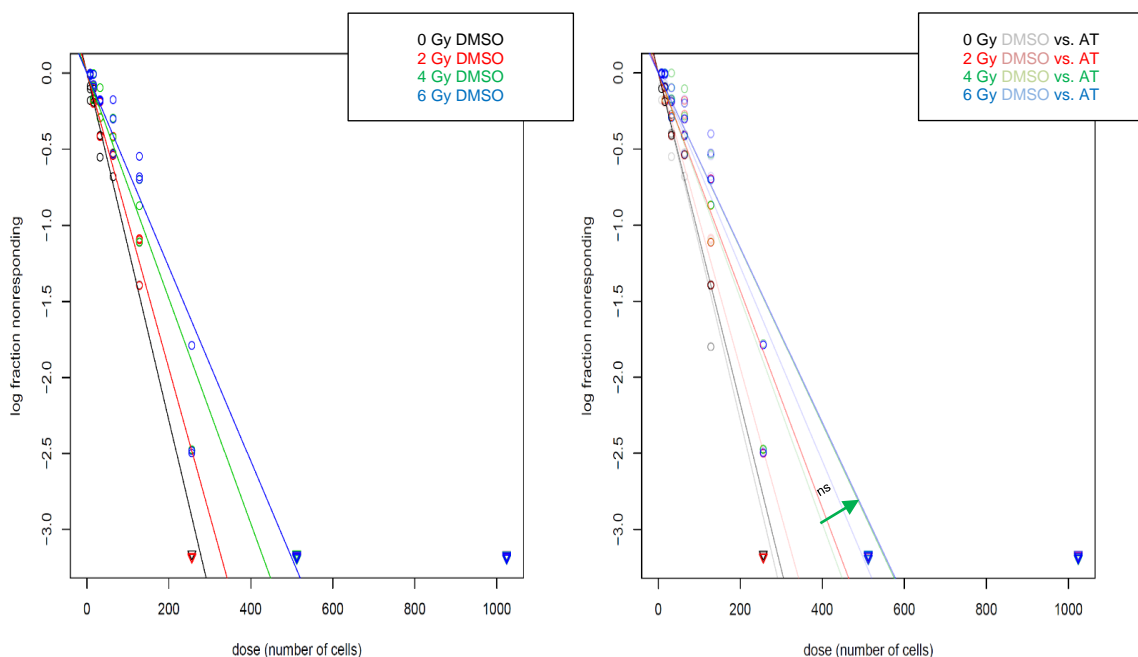
Abbildung 2.6.2. Übersicht der Stammzellfrequenz (1/x) in GS-5 Zellen unter ATO und AT-101

Staggered-Dot-Blot mit SEM der Stammzellfrequenz von GS-5 Zellen nach Behandlung mit Arsenitoxid und AT-101. Kumulative Daten von 3 Kulturen ($n=3$). Statistische Analyse mittels Chi-Quadrat-Test via *ELDA*-Software (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

Insbesondere in den 17/02 Zellen scheint eine stärkere Strahlenresistenz zu bestehen. Die beobachteten Effekte der Bestrahlung sind deutlich milder als jene in GS-5 Zellen. So führt die alleinige Bestrahlung mit 4 Gy hier zu einer deutlich geringeren Reduktion der Stammzellfrequenz (ca. 1.5-fach, $p=6.5 \times 10^{-4}$). Die Therapie mit AT-101 (ca. 1.3-fach, $p=0.12$) und ATO (ca. 1.2-fach, $p=0.25$) in geringer Dosis ergeben eine nicht signifikante Modulation der Effekte der ionisierenden Strahlung. Lediglich in höherer Dosis bewirkt ATO eine signifikante zusätzliche Reduktion der Stammzellfrequenz bei 4 Gy (ca. 1,4-fach, $p=0.033$). Die Kombination beider Substanzen zeigt eine weitere Potenzierung dieses Effektes allerdings ebenfalls ohne Signifikanz (ca. 1,4-fach, $p=0.51$).

Zusammenfassend scheint in 17/02 Zellen somit die Wirkung von AT-101 eine untergeordnete Rolle zu spielen. Insbesondere die höhere Dosierung von ATO bewirkt in den 17/02 Zellen eine deutliche Sensitivierung gegenüber der Strahlentherapie. Dabei scheint der additive Effekt insbesondere unter hoher Strahlendosis von 6 Gy zum Tragen zu kommen. Sind unbehandelte Zellen hierbei nur wenig beeinflusst mit einer Änderung der Stammzellfrequenz von 1/90 Zellen unter 0 Gy auf 1/150 Zellen unter 6 Gy, so zeigt sich unter Einsatz von 0.2 μM ATO eine Reduktion der Stammzellfrequenz um das Doppelte auf 1/300 Zellen.

17/02



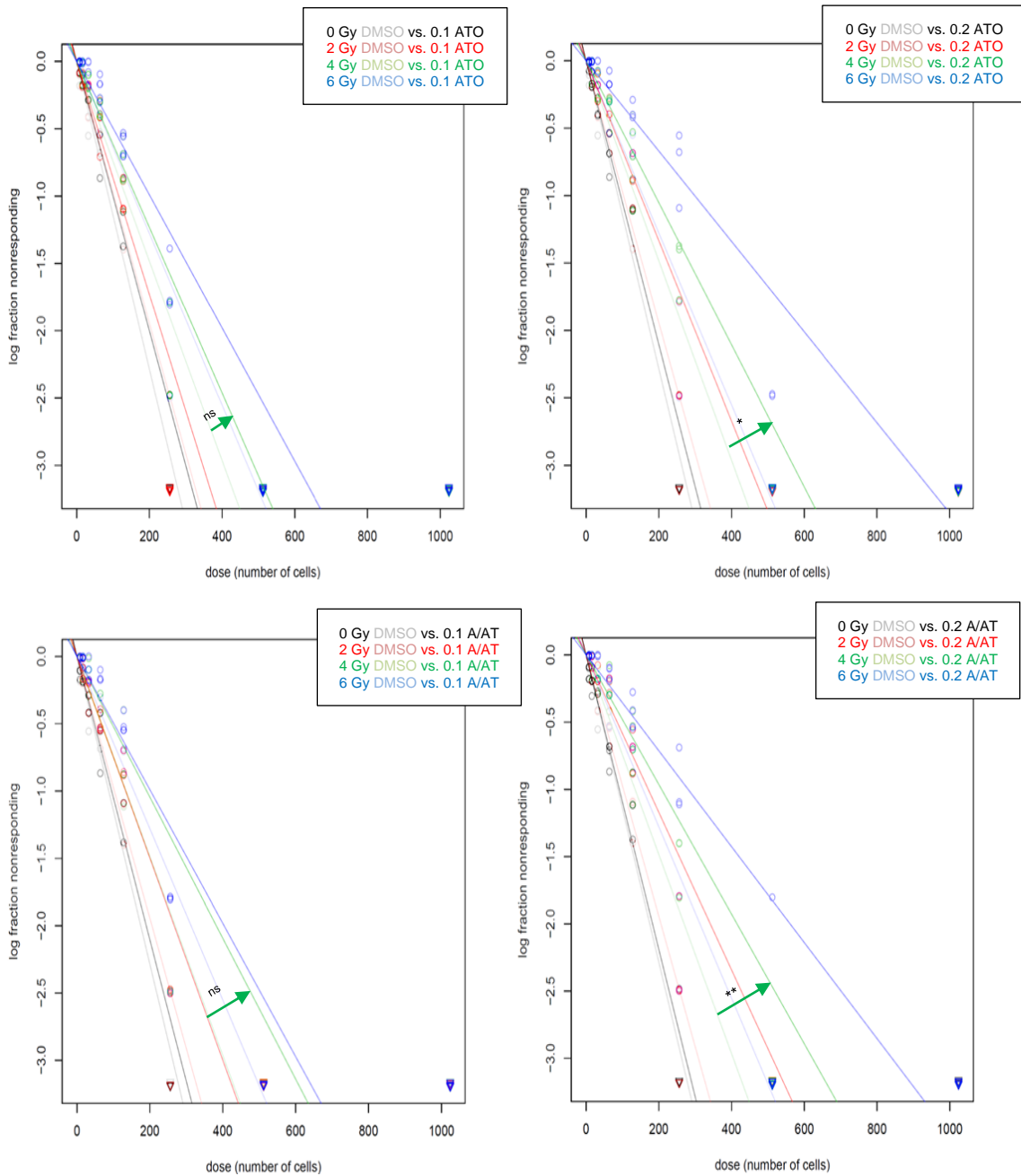


Abbildung 2.6.3. Strahlensensitivierung in 17/02 Zellen durch ATO und AT-101

Log-Fraction-Blot der Untersuchung zur Radiosensitivierung. Je Grafik Darstellung der einzelnen Konditionen nach 7-tägiger Behandlung (DMSO; 0.5 μ M AT-101; 0.1 μ M ATO; 0.2 μ M ATO, 0.1 μ M ATO + 0.5 μ M AT-101 und 0.2 μ M ATO + 0.5 μ M AT-101) mit Overlay von DMSO-Gruppe (blass) und der jeweiligen Behandlung (gesättigt) zu jeder Strahlendosis; 0Gy (schwarz), 2Gy (rot), 4 Gy (grün), 6 Gy (blau). Beispielhafte Darstellung der Sensitivierung bei 4 Gy im Vergleich zu DMSO mittels Pfeils (** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$). Statistische Analyse mittels Chi-Quadrat-Test via ELDA-Software.

17/02

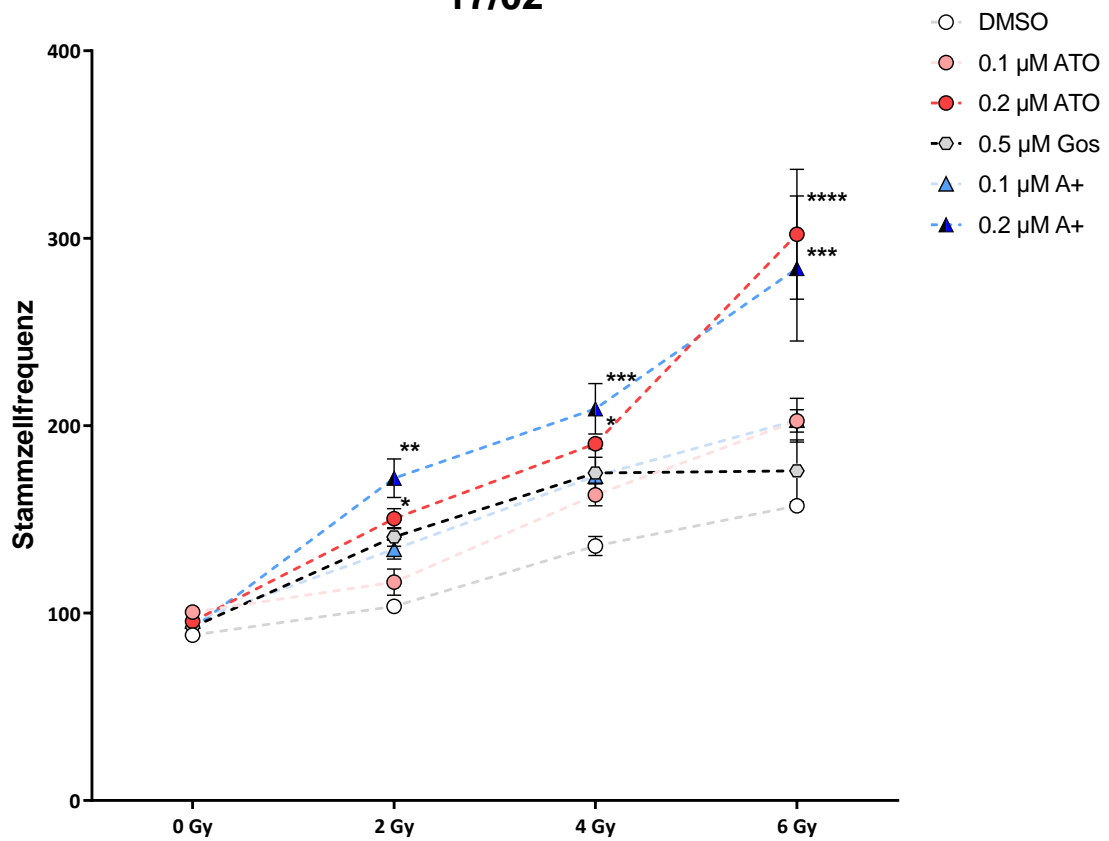


Abbildung 2.6.4. Übersicht der Stammzellfrequenz (1/x) in 17/02 Zellen unter ATO und AT-101
Staggered-Dot-Blot mit SEM der Stammzellfrequenz von 1702 Zellen nach Behandlung mit Arsenitrioxid und AT-101. Kumulative Daten von 3 Kulturen (n=3). Statistische Analyse mittels Chi-Quadrat-Test via *ELDA*-Software (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; **** p < 0.0001).

3.2.5 CHRDL1-vermittelte Reduktion stammzelltypischer Markerproteine

Im Rahmen des Projektes fanden durch die Arbeitsgruppe simultane Untersuchungen des zellweiten Proteoms statt. Analysen dieser Proteomik-Daten zeigten unter anderem eine massive Reduktion des sezernierten Proteins CHRDL1 durch die Behandlung mit ATO und (-)-Gossypol.¹⁰⁵ Als sezernierter Antagonist kann CHRDL1 eine Inhibition der BMP4-vermittelten Signalkaskade bewirken. Die entsprechende Reduktion des CHRDL1 via ATO und AT-101 sollte entsprechend zu einem suffizienterem BMP-Signaling führen. Zur Untersuchung der Auswirkungen einer ausschließlichen CHRDL1-Reduktion erfolgte ein entsprechendes genetisches Silencing in Form eines *CHRDL1*-Knockdowns mittels lentiviraler Transduktion von GS-5-Zellen mit entsprechender shRNA.

Zunächst erfolgte die Bestätigung der Proteomik-Daten mittels Proteinanalyse durch Western-Blot, sowie Expressionsanalysen mittels PCR. Hier zeigte sich in den untersuchten Zelllinien GS-8 und GS-5 eine relevante Reduktion des CHRDL1 als Bestätigung der Proteomik-Daten insbesondere durch ATO und (-)-Gossypol.

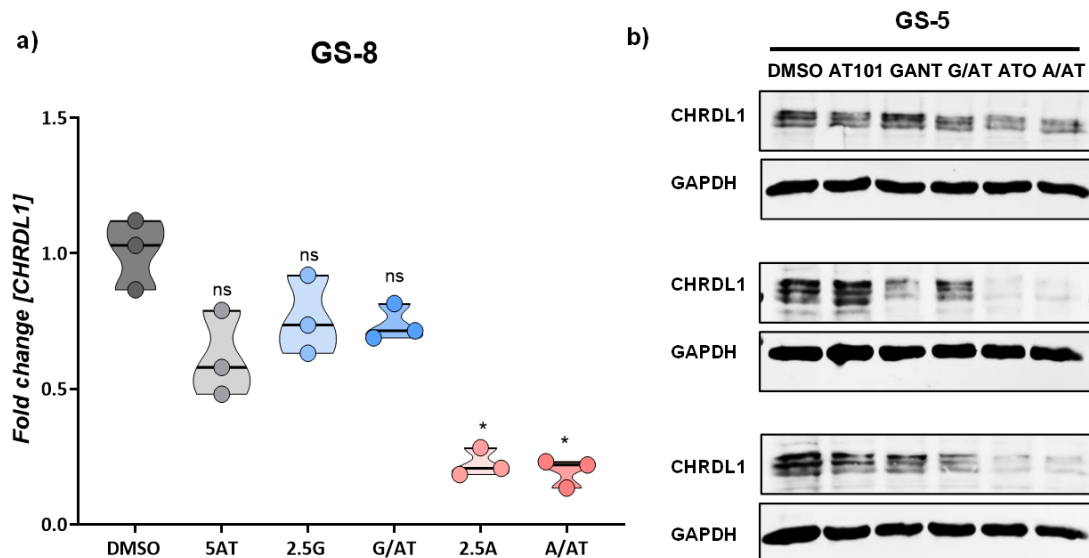


Abbildung 2.7.1. Reduktion von CHRDL1 durch Behandlung mit ATO

[a] Ergebnis einer Taqman-basierten Expressionsanalyse von *CHRDL1* in GS-8 Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit 2.5 μ M GANT61, 5 μ M AT-101 und 2.5 μ M ATO bzw. deren Kombination und [b] Proteinanalyse mittels Western-Blot von CHRDL1 in GS-5 Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit 5 μ M GANT61, 7.5 μ M AT-101 und 5 μ M ATO bzw. deren Kombination. Kumulative Daten von 3 Kulturen (n=3). Statistische Auswertung mittels One-way-ANOVA und post-hoc Test nach Tukey (* $p < 0.05$). Ladekontrolle mittels GAPDH.

Nach lentiviraler Transduktion zeigten Proteinanalysen mittels Western-Blot eine suffiziente Reduktion von CHRDL1 der transduzierten Zellen gegenüber transduzierten Zellen mit nicht-codierender shRNA. Gleichzeitig offenbarten Letztere Proteinanalysen eine Reduktion von SOX2, sowie SOX9 in diesen Zellen.

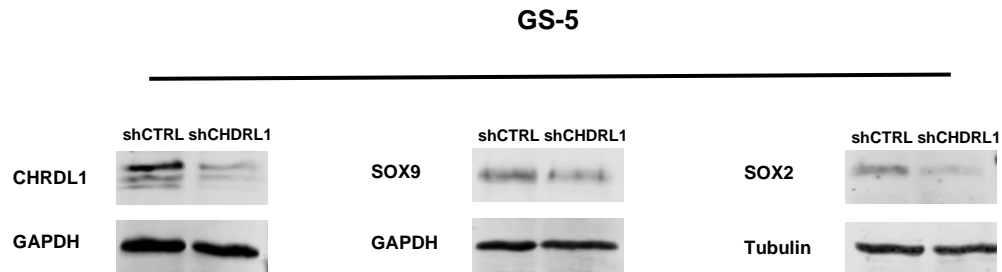


Abbildung 2.7.2. Reduktion von stammzellassoziierten Markerproteinen nach *CHRD1*-Knockdown
Ergebnisse der Proteinanalyse mittels Wester-Blot 24 Stunden nach lentiviraler Transduktion von GS-5 mit shCHDR1 und einer nicht-codierenden Kontroll-shRNA. Ladekontrolle mittels GAPDH bzw. Tubulin.

4. Diskussion

4.1 Überlegenheit antitumoraler Effekte durch simultane Beeinträchtigung von Hh- und Notch-Signaling

Gliom-initiierende Zellen bilden den Gipfel der Hierarchie einer Glioblastom-typischen Zellorganisation. Mehr als ihre differenzierten Gegenstücke präsentieren GSC tumorpropagierende Fähigkeiten, wie Regeneration, Migration und Therapieresistenz. Regulierende Mechanismen steuern minutiös den stammzellartigen Zustand dieser Zellen und tragen maßgeblich dazu bei, ein adaptives System auf unterschiedliche äußere Einflüsse, aufrechtzuerhalten. Diese Mechanismen, zu denen auch der Hedgehog- und Notch-Signalweg gehören, sind beteiligt an Chemo- und Radioresistenz, Invasivität und Progress des Glioblastoms.^{24,40,45}

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen anschaulich antitumorale Effekte einer Inhibition dieser stammzelltypischen Signalwege. Interessanterweise präsentiert sich eine deutliche Überlegenheit einer suffizienten simultanen Hh- und Notch-Inhibition gegenüber einer alleinigen Hh-Inhibition. So präsentiert sich sowohl in Untersuchungen der Proliferation, des Zelltods, der Migration als auch in der Evaluation der Radiosensitivierung durchweg die ATO-vermittelte Beeinträchtigung von Hh- und Notch-Signalweg als effizienter. Darüber hinaus zeigen diese Ergebnisse teilweise nur marginale Wirkungen einer alleinigen Hh-Inhibition durch den selektiven Gli-Inhibitor GANT61. Letzteres wirft die Frage auf, wodurch eine solche Überlegenheit vermittelt wird, obgleich der Hh-Signalweg bereits an sich als essenziell für GSC gilt.⁵⁵

Mehrere Autoren beschrieben den massiven regulativen Einfluss des Hh-Signaling auf Gliome. So ist ein intakter Signalweg notwendig für zentrale tumorpropagierende Eigenschaften.¹¹⁵ Gleichzeitig präsentieren unterschiedliche Evidenzen eine suffiziente Reduktion dieser Eigenschaften, wie bspw. Proliferation unter Hh-Inhibition.^{82,116-118} Ebendieser Effekt konnte nur teilweise reproduziert werden. Gesamtheitlich verbleibt das Fazit einer eher ineffizienten Beeinflussung durch die alleinige Hh-Inhibition mittels GANT61. Mögliche Erklärungen setzen an unterschiedlichen Aspekten der resultierenden Hh-Inhibition an.

Erstens wurden in den hier präsentierten Untersuchungen teils niedrigere Dosierungen von GANT61 verwendet als im Vergleich zu übriger Literatur⁸², weshalb eine nicht ausreichende Signalweg-Blockade diskutiert werden kann. Letzteres ist Resultat der Untersuchung von Kombinationsbehandlungen, da hierbei Dosierungen der Einzelsubstanzen reduziert werden. Zweitens weisen Pietrobono et al.⁵⁸ in ihrer Darstellung des Hh-Signalwegs alternative Isoformen des Gli-Transkriptionsfaktors mittels alternativen Splicing auf (GLI Δ N und tGLI1). Diese wiederum zeigen teils divergierende Zielgene. Die spezifische Bindung von GANT61 an Gli1 ist dabei zu Genüge belegt¹¹⁹, allerdings stellt sich die Frage einer suffizienten Bindung auch an diese Gli1-Alternativen, die in bisheriger Literatur nicht ausreichend dargestellt ist. Drittens ist GANT61 ein Pro-Drug, welches zunächst mittels Hydrolyse in seine aktive Form überführt werden muss.¹¹⁹ Eine mögliche verminderte Hydrolyse in GSC kann Urheber einer reduzierten Wirkung in diesen Zellen sein. Letztlich viertens, und dies lässt sich unmittelbar aus den Ergebnissen ableiten, erscheint die alleinige Hh-Inhibition in den untersuchten Zelllinien schlichtweg nicht ausreichend, um umfassende antitumorale Effekte zu erzielen. Ergebnisse der zusätzlichen Notch-Inhibition durch ATO deuten darauf hin, suffiziente antitumorale Effekte nur unter gemeinsamer Signalwegbeeinträchtigung zu erreichen. Darüber hinaus besteht in Hinblick auf die Wirkung von ATO keine Spezifität. So kann ATO eine Vielzahl von Proteinen binden und deren Funktionen beeinflussen. Die Ursachen einer Überlegenheit von ATO lassen sich somit auch außerhalb von Notch- und Hh-Signaling vermuten. Insbesondere unter Betrachtung des Hh-Signalweges zeigt die Literatur beispielhaft Resistenzmechanismen einer einseitigen Signalwegblockade auf. So kann es beispielweise unter Anwendung von SMO-Inhibitoren zur Überwindung der Blockade, über eine nicht-kanonische Aktivierung von Gli-Transkriptionsfaktoren, kommen.⁸⁰ Derartige Erkenntnisse führten beispielsweise für das Medulloblastom zu Bemühungen einer vollständigen Blockierung des Signalwegs durch gleichzeitige Inhibition von SMO und Gli-Transkriptionsfaktoren. Interessanterweise zeigen entsprechende Ergebnisse von *in-vivo* Untersuchungen über einen Zeitraum von 18 Tagen zwar ein vermindertes Wachstum der Tumore, jedoch wachsen auch diese trotz anzunehmender effizienter Hh-Blockade weiter.¹²⁰ Dementsprechend scheint der Hh-Signalweg nicht ausschließlich verantwortlich für alle tumorpropagierenden Eigenschaften der Tumorzellen.

Dies spiegelt sich auch in der Vielzahl amplifizierter Signalwegen in GSC wider - jeder mit eigenen Implikationen. So wurde bereits in 1.3.1 die Rolle des Notch-Signalings für GSC erläutert. Auch eine Inhibition des Notch-Signalwegs ging in Untersuchungen mit verminderter Proliferation und Invasion von GSC einher. So zeigten Yi et al. eine Reduktion der Tumormasse *in vivo* unter *NOTCH1*-Silencing.¹²¹ Tatsächlich veranschaulichen Jacobs und Huang¹²² komplexe Wechselwirkungen zwischen Notch- und Hh-Signalweg. So werden beispielweise Zielgene des Notch-Signalings und Liganden der Notch-Rezeptoren direkt durch den Hh-Signalweg reguliert. Gleichzeitig konnte wiederum für den Notch-Signalweg ein Einfluss auf die Akkumulationen von SMO, einem zentralen Bestandteil der Hh-Kaskade, gezeigt werden.¹²³ Diese minutiösen Wechselwirkungen verdeutlichen die Möglichkeit von Mechanismen der Gegenregulation bei einseitiger Blockade der Signalwege – eine Gegenregulation die womöglich in GSC besteht und durch gleichzeitige Beeinträchtigung beider Signalwege unterbunden werden kann. Die vorliegenden Ergebnisse weisen daher auf die Notwendigkeit eines komplexen Eingriffs in unterschiedliche, jedoch miteinander verbundene, Prozesse zur effizienten Eliminierung der GSC-Population hin. Diese Ergebnisse decken sich mit Untersuchungen zur Kombination von SMO- und γ -Sekretase Inhibitoren in CD133⁺ Gliomzellen durch Ulasov et al.¹²⁴, wobei eine suffiziente Chemosensitivierung gegenüber TMZ durch die gemeinsame Hh- und Notch-Inhibition gezeigt werden konnte. Somit erscheint die Aufrechterhaltung des stammzellartigen Phänotyps in den untersuchten Zellen dieser Arbeit sowohl abhängig von Signalen des Notch- als auch des Hh-Signalings zu sein. Die phänotypischen bzw. funktionellen Eigenschaften lassen sich entsprechend der vorliegenden Ergebnisse nur durch eine gemeinsame Notch- und Hh-Beeinträchtigung modulieren.

4.1.1 Evaluation der Modulation von Stammzeleigenschaften und das Modell der Tumorstammzelle

Eine kritische Auseinandersetzung mit der Theorie von Tumorstammzellen und ihren Eigenschaften ist komplex und kann im Folgendem nur versuchsweise erfolgen. Die Ergebnisse dieser Arbeit erlauben dabei keine definitive Beantwortung von zentralen Fragen der Hypothesen, die in 1.2 dargestellt wurden.

Gewiss beschreibt die aktuelle Literatur Populationen von Zellen innerhalb des Glioblastoms, welchen mehr als anderen Zellen stammzellartige Eigenschaften zugeordnet werden können. Hierzu zählen die bereits beschriebenen Markerproteine, phänotypische Wachstumsmuster und insbesondere funktionelle Fähigkeit, wie das Hervorbringen neuer Tumore nach Transplantation mit erneuten heterogenen Zellpopulationen.²⁶ Gleichzeitig konkurrieren diese Erkenntnisse mit einer Vielzahl an Evidenzen, deren Fazit das einfache Bild eines Tumors, als ausgehend von einer einzelnen Tumorstammzelle mit unidirektionaler Differenzierung in alle weiteren Tumorzellen, in Frage stellen.

So zeigt sich insbesondere für das Glioblastom eine tumorweite Plastizität, die nicht allein stammzellartigen Zellen vorbehalten ist. Im Gegenteil scheint es sich bei GSC eher um einen zeitweiligen Zustand zu handeln, welcher auch in nicht-GSC induziert und ebenso von GSC abgelegt werden kann.⁴³ Anders als in Neuro- und Gliogenese ist dabei ein Ablegen dieses Stammzellzustandes für Zellen des GB nicht terminal. Eine Rückkehr in einen stammzellartigen Zustand wurde von unterschiedlichen Autoren beschrieben und zeichnet das Bild einer komplexen intratumoralen Steuerung der Subgruppen einer Tumorzellpopulation – je nach sich ergebendem aktuellem Bedarf und in Folge von unterschiedlichen zellulären Reizen wie Hypoxie, Radiatio oder Chemotherapie.^{125,126} Der aktuelle Stand der Forschung lässt somit für die Betrachtung des GB weder das Modell der reinen klonalen Evolution noch einer unidirektionalen Tumorgenese aus CSC als wahrscheinlich erscheinen. Vielmehr ergibt sich die Hypothese einer bidirektionalen Plastizität, welche von Zellen des GB durch eine maligne Transformation mit Dedifferenzierung unter Induktion von „Pluripotenz-Genen“ erreicht wird.¹²⁶ Zentrale Schalter dieser Prozesse sind unter anderem Signalwege, die bereits im Vorherigen ausführlich dargestellt wurden. Die Nutzung dieser Schalter wiederum führt zu Veränderungen in Zellen, welche durchaus erfasst werden können

und im Rahmen dieser Arbeit eine Diskussion der Ergebnisse mit Relevanz für GSC und das GB erlauben. Durch die Verwendung der dargestellten Substanzen konnte eine Beeinträchtigung zentraler Eigenschaften stammzellartiger Zellen gezeigt werden. Insbesondere die Verwendung von ATO mit weiterer Steigerung der Effekte durch Kombination mit (-)-Gossypol führt in den untersuchten GSC zu einer Verminderung dieser Eigenschaften. Letztere Wortwahl soll insbesondere auch einer translationalen Übertragbarkeit gerecht werden. So erscheint eine dauerhafte Elimination der stammzellartigen Eigenschaft aktuell nicht vollständig, lediglich zeitlich begrenzt möglich.²⁶ Es besteht eine große Anzahl unterschiedlicher Strategien dieser Modulation. Eine Beständigkeit der Auswirkungen konkurriert dabei mit jener erwähnten Plastizität und lässt sich aktuell dauerhaft durch keine Therapie erreichen. Nichtsdestotrotz erscheint bereits die temporäre Blockade stammzellartiger Eigenschaften als vielversprechender Ansatz Therapieregime zu verbessern.

Analog zeigen die im Hauptwerk dargestellten Analysen der Sphärenformation, insbesondere nach Beendigung der Therapie mit ATO, keine Erholung der Zellen.¹⁰⁵ Tatsächlich präsentiert sich auch im Bereich der sekundären und tertiären Sphärenformation eine bleibende Beeinträchtigung stammzellartiger Zellen durch die Therapie mit ATO als Ausdruck eben jenes angedeuteten Verlusts deziderter Eigenschaften durch eine initiale temporäre Blockade essenzieller Signalwege. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen der organotypischen Gewebekultur. Nach initial starkem Effekt unter GANT61/AT-101 kann im Verlauf nur ein Sistieren des Wachstums verzeichnet werden, wohingegen ATO zu einer fortwährenden Reduktion der Tumormasse führt. Letzteres legt eine ATO-vermittelte fulminante Beeinträchtigung der Tumorzellen bei gleichzeitig unzulänglicher „Anpassung“ der Zellen auf diesen Reiz nahe, wohingegen einer kleinen Restpopulation von Zellen unter GANT61/AT-101 zumindest eine „Resistenz“ gegenüber einem dauerhaften Zelluntergang unterstellt werden kann (vgl. 3.1.1). Zulässig erscheint somit die Hypothese einer eventuell ausreichenden einmaligen allerdings umfassenden Beeinträchtigung stammzellartiger Zellen im GB durch eine zeitlich begrenzte, über wenige Tage anhaltende, Therapie mit ATO um antitumorale Effekte zu erzielen. Hierdurch könnten womöglich Rezidiv vermindert und PFS verlängert werden. Klinische Studien weisen allerdings auf die Notwendigkeit weiterer Therapiemodalität hin, da ATO allein keine

signifikanten Effekte auf das PFS besitzen zu scheint.⁹² Diese Diskrepanz zwischen experimentellen Ergebnissen und klinischer Beobachtung lässt sich in maßgeblicher Weise wohl durch die weitaus umfänglichere Plastizität eines tatsächlichen GB gegenüber eines GSC-Zellmodells erklären.

Zu den veränderbaren zellulären Eigenschaften zählt des Weiteren die Reduktion von Proteinen der SOX-Familie. Aldaz et al.¹²⁷ verdeutlichen in ihrer Arbeit eine Abhängigkeit des Erhalts eines stammzellartigen Zustandes von einer SOX9-vermittelten Induktion einer PML- und STAT3-abhängigen Signalkaskade mit positivem Feedback-Loop. Interessanterweise ist insbesondere ATO in seiner Nutzung bei der APL bekannt für eine direkte Bindung an Cystein-Bausteine des PML, wodurch eine Konformationsänderung hervorgerufen und die Degradierung induziert wird.¹²⁸ Somit könnte ein Dualismus, bestehend aus (I) einer SOX9-Reduktion durch Alteration von Hh- und Notch-Signalweg sowie (II) eine direkte Bindung von ATO an PML, letzteren Feedback-Loop effizient in GSC unterbinden und zur Differenzierung beitragen. Tatsächlich zeigen CSC in gastro-ösophagealen Tumoren auch eine AT-101-vermittelte Reduktion von SOX9 mit konsekutivem Verlust stammzellartiger Eigenschaften¹²⁹ - ein Beispiel der Parallelen Wirkungen von ATO und AT-101, welche in 4.3 genauere Betrachtung finden.

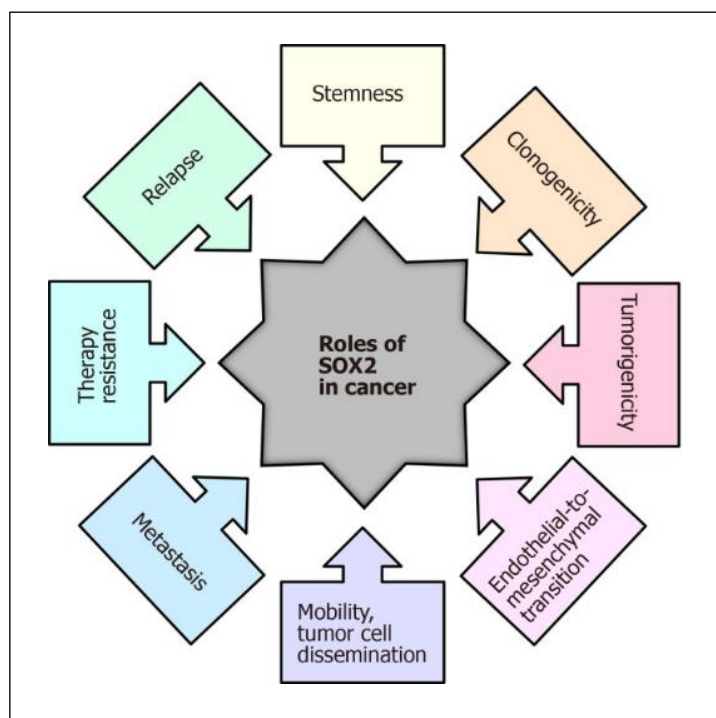


Abbildung 3.1. SOX2 – zentraler Regulator eines Stammzellzustandes

(Quelle: Stevanovic M, Kovacevic-Grujicic N, Mojsin M, Milivojevic M, Drakulic D. SOX transcription factors and glioma stem cells: Choosing between stemness and differentiation. *World J Stem Cells*. 2021;13(10):1417-1445. doi:10.4252/wjsc.v13.i10.1417)

Des Weiteren ist insbesondere SOX2, neben OCT4 und NANOG, ein Kernfaktor eines Netzwerks zur Induktion von Pluripotenz-Genen – seine Rolle für das Glioblastom wurde detailliert durch Stevanovic et al.¹³⁰ erläutert. Die erfolgreiche Reduktion von SOX2 in den vorliegenden Ergebnissen kann somit, neben weiteren Effekten, als zentraler Schlüssel der Reduktion des stammzellartigen Zustandes angesehen werden.

Die bereits im Vorherigen erwähnten Untersuchungen des zellweiten Proteoms zeigten insbesondere eine Reduktion von Proteinen, welche mit Zellmotilität und Migration verknüpft sind.¹⁰⁵ In der dargestellten Migrationsanalyse spiegelt sich dies in einem massiven Verlust der Migrationskapazität wider. Unterschiedliche Autoren beschreiben eine Abhängigkeit der Glioblastomzell-Migration von einer intakten Hh-Aktivität.^{131,132} Chang et al.¹³³ erbrachten dabei Evidenzen einer Hh-induzierten Steigerung der Migration sowie Invasion unter Akt-vermittelter Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen. Interessanterweise zeigen Ergebnisse der Proteinanalysen insbesondere unter ATO eine deutliche Reduktion des phosphorylierten Akt - Ausdruck einer verminderten Signalweg-Aktivität - als mögliches mechanistisches Korrelat der eingeschränkten Migration auf (vgl. Abb. 3.4.3). Wie bereits in 1.3.1 beschrieben besteht zudem eine Notch-SOX2-abhängige Induktion der Invasion von GB-Zellen entlang weißer Substanz.⁵³ Obgleich im Vorliegenden keine direkte Invasionsanalysen erfolgten zeigen Beobachtungen der organotypischen Kultivierung auch hier Anzeichen einer verminderten Invasion bzw. Tumorausdehnung unter Nutzung der Substanzen im *ex-vivo* Modell. Dreidimensionale Analysen der tatsächlichen Invasion unter Verwendung von ATO ergeben sich hier als fruchtbares Forschungsvorhaben. Tatsächlich zeigen Bestrebungen der Arbeitsgruppe, mit noch ausstehender Veröffentlichung, basierend auf diesen ersten Beobachtungen eine ATO-vermittelte Reduktion der Gewebeinfiltration von GSC in *ex-vivo* Schnittkulturen. Analog präsentieren Gwak et al. eine verminderte *in-vitro* Invasion von U87MG-, U251MG-, U373MG-, und LN428-Zellen durch die Verwendung von As₄O₆ via Reduktion von Matrix-Metalloproteinasen.¹³⁴

Die Analysen der Proteom-Daten präsentierten darüber hinaus eine deutliche Wirkung auf Proteine des „DNA Damage Response“ (DDR)-Systems.¹⁰⁵ Sowohl Hh- als auch Notch-Signalweg nehmen massiven regulativen Einfluss auf dieses System.^{135,136} Durch die Modulation dieser Signalwege, insbesondere mittels

ATO, lässt sich somit eine erfolgreiche Reduktion der stammzelltypischen Mechanismen, zum Selbsterhalt und zur Zellerneuerung in Folge von DNA-Schädigung, bewirken. Hierdurch ergibt sich unter anderem die präsentierte Sensitivierung für Radiotherapie, welche in 4.3 genauere Betrachtung findet. Untersuchungen zur Sphärenformation und Regeneration, die im Hauptwerk¹⁰⁵ zu dieser Arbeit publiziert wurden, stützen die Beobachtungen einer Reduktion des Erhalts und der Selbsterneuerung weiter.

Die Verminderung der Stammzellfrequenz durch ATO weist dabei auf eine forcierte Differenzierung von GSC hin. Gleichzeitig lässt sich Letzterer Effekt durch die alleinige Nutzung von AT-101 nicht erreichen. Nichtsdestotrotz spricht die weitere Steigerung der Effekte durch die Kombination beider Substanzen auch für eine AT-101-vermittelte Limitation stammzellartiger Eigenschaften, obgleich ohne Induktion eines umfänglichen Verlusts letzterer.

Die theoretische Überlegung einer Stammzellfrequenz spiegelt mehr als andere Beobachtungen die oben beschriebene Kritik der Hypothese einer Tumorgenese allein durch GSC wider. In einer monoklonalen Zellkultur von Zellen - unter der Annahme einer Entstehung aus einer einzelnen Tumorstammzelle - müsste theoretisch davon auszugehen sein, dass innerhalb weniger Reproduktionszyklen ohne starke Reize zur Differenzierung, nahezu alle Zellen dieser Kultur befähigt sind Tumorsphären zu bilden. Gleichzeitig zeichnen die Ergebnisse der LDA ein anderes Bild. So kann anhand dieser Ergebnisse nur einem, mehr oder minder, kleinem Anteil der Zellen innerhalb dieser Kultur unterstellt werden tatsächlich die Fähigkeit zu besitzen, Tumore hervorzubringen. Diese Diskrepanz spricht selbst im Zellmodell und umso mehr im Lebendem für eine Heterogenität selbst innerhalb der Population von Zellen, denen grundsätzlich ein Stammzellzustand unterstellt wird. Die Plastizität ihrer genetischen und transkriptionellen Profile und einhergehend damit auch ihrer phänotypischen Eigenschaften erscheint omnipräsent und muss stets bei Betrachtung und Interpretation der Ergebnisse beachtet werden. Es erscheint somit nur teilweise richtig bspw. von einer Depletion von Stammzellen durch ATO, GANT61 oder AT-101 zu sprechen. Vielmehr verbleibt die Idee einer Zustands-Modulation dieser Zellen, durch Eingriffe in das komplexe Geflecht von Signalwegen, die dazu beiträgt stammzellartige phänotypische und funktionelle Fähigkeiten abzulegen und so einen Beitrag leistet an einem Verlust von tumorpropagierenden Eigenschaften.

Insbesondere in der translationalen Übertragung auf die Behandlung des GB muss diese bereits genuine Heterogenität der Zellen, aufgrund der darüber hinaus bestehenden inter- und intratumoralen sowie interindividuellen Heterogenität, umso mehr hervorgehoben und die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus experimentellen Untersuchungen mit Vorsicht betrachtet werden.

Die beobachtete *in-vitro* sowie *ex-vivo* Modulation von Stammzeleigenschaften lässt sich somit momentan nicht eindeutig in die Klinik transponieren. Es muss grundsätzlich davon ausgegangen werden, dass eventuell Zellen innerhalb der komplexen Tumorphosphon bestehen, welche aufgrund ihres gegenwärtigen Zustandes „immun“ sind gegenüber einer Differenzierung, oder sogar Prozesse der Dedifferenzierung durch Elimination anderer stammzellartiger Subpopulationen ausgelöst werden können.¹³⁷ Gleichzeitig erscheint die Überlegung, dass durch eine effiziente Blockade eines stammzellartigen Zustandes insbesondere nicht-kurative Größen, wie das rezidivfreie Überleben, eventuell deutlich verbessert werden können, ebenso legitim. Insbesondere die Ergebnisse der organotypischen Kultivierung unter ATO/AT-101 zeigen eine unzulängliche „Anpassung“ der Zellen, trotz einer zeitlich langen Exposition gegenüber den Substanzen. Hypothesen, die eine einmalige umfassende Blockade stammzellartiger Eigenschaften mit dem eventuell fortwährenden Verlust der Fähigkeit zur erneuten Dedifferenzierung verbinden, erscheinen zwar optimistisch allerdings durchaus berechtigt.

4.2 Beurteilung des Synergismus zwischen (-)-Gossypol und Arsenitoxid

Wie bereits in 3.1.2 erläutert erfolgte die Betrachtung des möglichen Synergismus der Kombinationsbehandlung nach Chou-Talalay^{106,114}-Methode. Insbesondere im Hauptwerk¹⁰⁵ zur vorliegenden Arbeit erfolgte die mathematische Aufarbeitung an einem größeren Datensatz und liefert entsprechend verlässlichere Ergebnisse. Eine erste Limitation soll an dieser Stelle gleich zu Beginn Erwähnung finden: So erfolgte die Berechnung an MTT-Datensätzen, aufgrund ihrer einfachen Durchführbarkeit und der verbundenen großen Datenmengen mit ableitbaren Effekten insbesondere auf die Zellviabilität – ein wichtiger Surrogatparameter zur Ableitung zytotoxischer Effekte der Substanzen. Ein Beleg für synergistische Effekte lässt sich somit in erster Linie für Aussagen zur Zytotoxizität machen. In umfänglichem und mathematisch-fundiertem Ausmaß gilt dies also nicht für Aussagen zu anderen Assays, welche beispielsweise Stammzellmarker, Migration oder Stammzellfrequenz untersuchen. Um in jedem dieser Aspekte Synergismus nachzuweisen, müsste folglich eine an Chou-Talalay angelehnte Berechnung mit Datensätzen jedes einzelnen Assays erfolgen – Letzteres scheitert an einer praktikablen Durchführbarkeit. Wird im Folgendem also von Überlegungen des Synergismus gesprochen, bezieht sich dies maßgeblich auf Effekte der Zytotoxizität obgleich auch Hypothesen zur gemeinsamen Wirkung der Substanzen auf andere Messgrößen erläutert werden sollen – in diesen Fällen sind dies aber richtigerweise Überlegungen zum steigernden Effekt durch die Kombination und nicht zum bewiesenen Synergismus.

Zum Auffinden möglicher Erklärungen für den nachgewiesenen Synergismus erfolgten simultan Untersuchungen zur Änderung des zellweiten Proteoms. Wie bereits in 4.2.1 beschrieben, zeigten diese Analysen eine Beeinträchtigung von Bestandteilen des DDR-Systems. Gleichzeitig fand sich eine Erhöhung von Proteinen mit Verbindung zum GO-BP-Begriff „*response to oxidative stress*“ (dt. „Antwort auf oxidativen Stress“; GO.0006979). Folgeuntersuchungen bestätigten eine Induktion von DNA-Schädigung durch die Therapien und insbesondere in Kombination der Substanzen.¹⁰⁵ Letzteres lässt die Hypothese einer Induktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) als Urheber von DNA-Schädigung mit gleichzeitiger Reduktion von DDR und konsekutivem Zelluntergang durch die

dargestellten Behandlungen zu. Dabei wurde für alle untersuchten Substanzen bereits einzeln die Bildung von ROS erwiesen.¹³⁸⁻¹⁴⁰ Bei detaillierter Betrachtung der zitierten Arbeiten wird interessanterweise eine mitochondrial-vermittelte Erhöhung von ROS beschrieben. Die Autoren zeigen hierbei teilweise detailliert eine Störung der mitochondrialen Membranintegrität.

Aufgrund der physiologischen Akkumulation von ROS durch den natürlichen Metabolismus von Mitochondrien bestehen komplexe Regulationsmechanismen, welche einer übermäßigen Anhäufung ersterer entgegenwirken. Hierbei spielen unter anderem mitochondriale Permeabilität-Transition-Poren (mPTP) eine entscheidende Rolle. Eine massive Akkumulation von ROS kann dabei zu einer prolongierten mPTP-Öffnung mit konsekutivem ROS-Burst führen und einen mitochondrialen Zelluntergang, durch Apoptose oder Mitophagie, auslösen.¹⁴¹ Interessanterweise wird eine Änderung des mitochondrialen Membranpotentials für ATO und AT-101 in oben genannten Arbeiten beschrieben. Darüber hinaus erläutern Meyer et al.⁹⁶ und Meyer ausführlich in zugehöriger Dissertationsschrift¹⁴² eine AT-101-vermittelte Erhöhung des Proteins HMOX1 in Gliomzellen mit einhergehender Induktion eines mitophagischen Zelltods und diskutieren eine eventuelle HMOX1-vermittelte mPTP-Öffnung als zugrundeliegenden Mechanismus. Obgleich im Rahmen der vorliegenden Untersuchung nicht in dieser detaillierten Weise betrachtet, zeigten Analysen der Proteom-Daten HMOX1 als stärkstes induziertes Protein nach Behandlung mit ATO sowie ATO/AT-101 in Kombination. Letzteres legt die Überlegung eines, eventuell auch in den untersuchten Zellen, ausgelösten mitophagischen Zelltods durch entsprechende Induktion von HMOX1 via ATO und AT-101 Behandlung nahe. Eindeutige Hinweise der Auslösung eines autophagischen Zelltods in der vorliegenden Untersuchung sind unzureichend und bedürfen genauerer Untersuchungen, allerdings bietet die nachgewiesene Konversion von LC3-I zu LC3-II und Induktion von p62 unter Einsatz der Substanzen einen ersten Anhalt (vgl. Abb. 3.4.3). Zudem präsentieren Untersuchungen, neben der durch AT-101-induzierten Mitophagie, ebenfalls eine ATO-vermittelte Mitophagie in Gliomzellen.¹⁴³ In beiden Fällen wird die Induktion von BNIP3, einem Mitglied der Bcl-2-Familie und Regulator des mitochondrialen Membranpotentials, als ursächlich beschrieben. Eine mögliche Erklärung des Synergismus lässt entsprechend eine effiziente gemeinsame Modulation dieser Maschinerie durch ATO und AT-101 vermuten. Wissenschaftliche Erkenntnisse zur

Untermauerung dieser Hypothese finden sich kaum. Evidenzen zeigen in gesunden Leberzellen eine effektive Induktion von Mitophagie durch ATO.¹⁴⁴ Hu et al.¹⁴⁵ beschreiben eine ATO-vermittelte Effektkaskade, welche durch Bindung des Komplexes I der Atmungskette zur exzessiven ROS-Formation mit anschließender Auslösung einer mPTP-getriggerten Mitophagie führt. Letzteres ergibt zumindest eine theoretische Analogie zur beschriebenen Mitophagie durch AT-101. Des Weiteren zeigen Evidenzen auch für andere pan-Bcl2-Inhibitoren eine effektive Induktion eines mitophagischen Zelltodes. So führt Sabutoclastin in oralen Plattenepithelkarzinomen zur Auslösung eines Zelltodes durch Mitophagie. Die Autoren vermuten eine BNIP3-vermittelte Induktion, beweisen diese allerdings nicht.¹⁴⁶

Darüber hinaus ergeben sich weitere Parallelen der resultierenden Effekte von ATO und AT-101 in einer regulativen Wirkung auf andere Mitglieder der Bcl-2-Familie. (-)-Gossypol ist wie bereits in 1.5.3 dargestellt ein direkter Inhibitor des BCL2 Proteins. BCL2 ist ein entscheidender Faktor hinsichtlich Zelltodentscheidungen und spielt eine kritische Rolle in Apoptose und Autophagie.¹⁴⁷ Neben der AT-101-vermittelten Inhibition beschreibt die aktuelle Literatur eine Regulation der Expression von BCL2 über den Hedgehog-Signalweg, dabei insbesondere über die Gli-Transkriptionsfaktoren.⁷³ Letztere wiederum können effektiv durch ATO inhibiert werden⁸⁹, sodass ebenfalls eine Reduktion von BCL2 erreicht werden kann. Diese Reduktion des BCL2-Proteins durch ATO wurde in nicht-Gliomzellen bereits eindeutig nachgewiesen.¹⁴⁸ Sowohl für ATO als auch AT-101 lässt sich somit eine synchrone Wirkung beschreiben, die ebenfalls Einfluss auf Zelltodentscheidungen nimmt.

In analoger Weise zeigen Evidenzen eine AT-101-vermittelte Inhibition des Hedgehog-Signalwegs durch Bindung an SMO.⁹⁹ Die Hypothese einer verstärkten Modulation des Hh-Signalings durch AT-101, auf anderer Ebene als ATO, mit konsekutiver Modulation von Stammzeleigenschaften wie in 4.2.1 beschrieben, erscheint zulässig. Zusätzlich beschreiben Lan et al.¹⁴⁹ eine negative Regulation des Notch-Signalwegs durch AT-101. Dabei beschreiben sie eine direkte Bindung von AT-101 an Musashi-1. Aufgrund der konsekutiven Reduktion präsentieren sie eine Inhibierung des Notch-Signalings in Kolonkarzinom-Zellen. Interessanterweise ist Musashi-1 ebenfalls einer jener Marker, die einem stammzellartigen Phänotyp von Gliomzellen zugeschrieben werden.¹⁵⁰ Entsprechend

ergeben sich mögliche Beeinträchtigungen sowohl von Hh- als auch Notch-Signalweg durch AT-101, welche die Wirkung von ATO möglicherweise zusätzlich verstärken. Abb. 4.2 verdeutlicht dabei Kernprozesse der Beeinflussung von GSC durch ATO und AT-101 mit ihren resultierenden Effekten auf zelluläre Fähigkeiten.

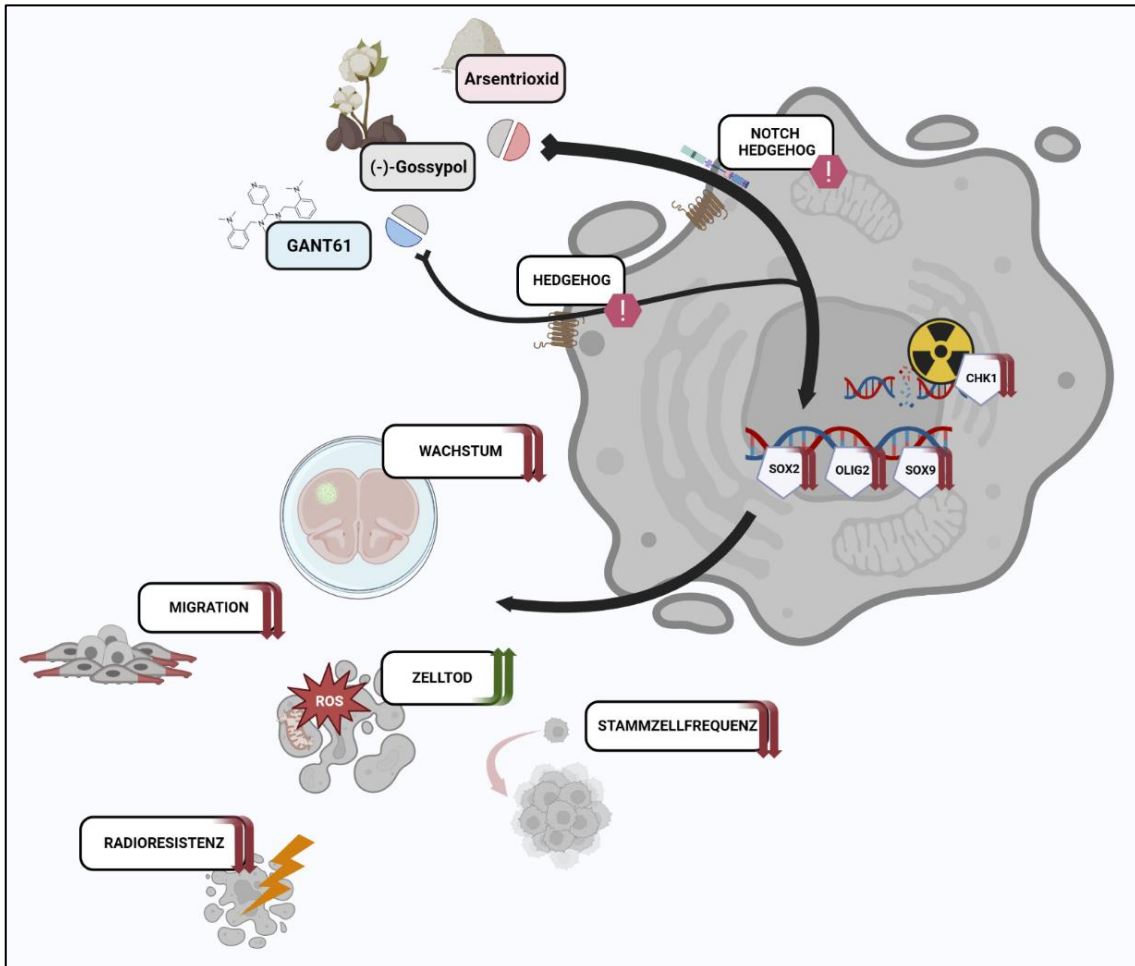


Abbildung 3.2. Zusammenfassende Darstellung der hypothetischen Wirkmechanismen von ATO, GANT61 und AT-101 in GSC

Arsentrioxid und (-)-Gossypol führen durch eine Inhibition von Hh- und Notch-Signalweg zu einer effektiven Modulation von Stammzeleigenschaften und des DDR-Systems und reduzieren Radioresistenz, Migration, Wachstum und Regeneration der Zellen. (Abbildung erstellt mit „BioRender.com“)

Zusammenfassend können anhand der Ergebnisse dieser Arbeit lediglich Hypothesen der mechanistischen Grundlagen des Synergismus der Substanzen abgeleitet werden. Tiefere Einblicke in mechanistische Geschehen erfordern eine detaillierte experimentelle Auseinandersetzung mit der Regulation der Bestandteile unterschiedlicher Signalkaskaden. Ein allumfassender Überblick aller denkbarer Verflechtungen der Wirkungen von ATO und (-)-Gossypol erscheint

utopisch. Aufgrund ihrer pleiotropischen Bindung einer Vielzahl unterschiedlicher Proteine und Transkriptionsfaktoren können nach realistischer Betrachtung nicht alle erfasst werden. Nichtsdestotrotz legt dieser Umstand den Schluss der Notwendigkeit eines Multi-Targetings der Signalkaskaden von GSC zur erfolgreichen Elimination dieser nahe. Da bis zum heutigen Tag kein monokausaler Angriffspunkt für die Therapie des GB gefunden wurde, erscheint eine zielgerichtete Wirkung auf unterschiedliche amplifizierte Prozesse vielversprechender als die alleinige Beeinträchtigung nur eines Prozesses. Ganz in diesem Sinne finden sich auch aktuelle Forschungsbestrebungen zu unkonventionellen Therapien des Glioblastoms mittels Kombination multipler Pharmaka. Im Geiste eines „mehr ist mehr“-Prinzips wird so zum Beispiel unter dem Therapieregime: „*Coordinated Undermining of Survival Paths combining 9 repurposed non-oncological drugs with metronomic temozolomide-version 3-(CUSP9v3)*“ eine Multi-Targeting-Strategie untersucht.¹⁵¹ Obgleich die Auswahl der Substanzen in genanntem Beispiel kritisch hinterfragt werden muss, erscheint die grundsätzliche Idee kombinierter Therapien durchaus berechtigt.

4.3 ATO/AT-101-vermittelte Radiosensitivierung durch Regulation von Checkpoint-Kinasen

Die etablierte Therapie des Glioblastoms umfasst neben der möglichst vollständigen Resektion die Radiotherapie der erweiterten Tumorregion und begleitende Chemotherapie. Trotz dieses multimodalen Therapiekonzepts kommt es häufig bereits nach kurzer Zeit zur Rekurrenz.

Diese Rekurrenz wird unter anderem der Resistenz von stammzellartigen Gliomzellen zugeschrieben. Resistenzmechanismen von GSC gegenüber Radio- und Chemotherapie wurden bereits in 1.2.3 dargestellt. Hierzu zählen die Induktion von Checkpoint-Kinasen (CHK1/2), sowie eine tumorpropagierende Autophagie nach fraktionierter Bestrahlung.^{46,47} Bao et al. verdeutlichen in ihren Untersuchungen eine vermehrte Induktion von Checkpoint-Kinasen, sowie weiteren Regulatoren des DDR-Systems wie RAD17, nach Bestrahlung CD133⁺ gegenüber CD133⁻ Zellen. Gleichzeitig präsentieren sie eine vier- bis neunfach effizientere DNA-Reparatur in CD133⁺ Zellen.⁴⁶ Diese Ergebnisse weisen auf eine in CD133⁺

Zellen - stellvertretend für einen stammzellartigen Zustand - effizient induzierbare Antwort auf Radiatio hin, welche Überleben und Zellintegrität sichert.

In Anlehnung an die, bereits im Vorherigen angesprochene, tumorweite Plastizität präsentieren Tsai et al.¹⁵² eine Induktion eines stammzellartigen Phänotyps durch Bestrahlung von Gliomzellen. In ihren Untersuchungen zeigen sie eindrücklich einen strahleninduzierten Anstieg GSC-typischer Proteine wie SOX2, Nestin, CD133 und CD44. Gleichzeitig wurde eine tumorpropagierende Autophagie in diesen Zellen beobachtet. Somit erscheint insbesondere die genuine Vielfältigkeit zellulärer Antworten von GSC auf Bestrahlung in Kombination mit induzierbaren GSC-typischen Prozessen in nicht-stammzellartigen Zellen zur Resistenz und anschließenden Rekurrenz des GB beizutragen. Darüber hinaus besteht eine Reihe regulatoriver Mechanismen des Mikromilieus die ebenfalls Einfluss auf Induktion von tumorpropagierenden Signalwegen nehmen¹⁵³⁻¹⁵⁵ und Beitrag leisten zur überwältigenden „Unbeugsamkeit“ von Gliomen gegenüber dieser Therapiemodalität. In erstaunlichem Detail zeigen Lee et al.¹⁵⁶ Konzepte der Induktion von CSC für eine Vielzahl von Signalwegen auf (vgl. Abb. 3.3).

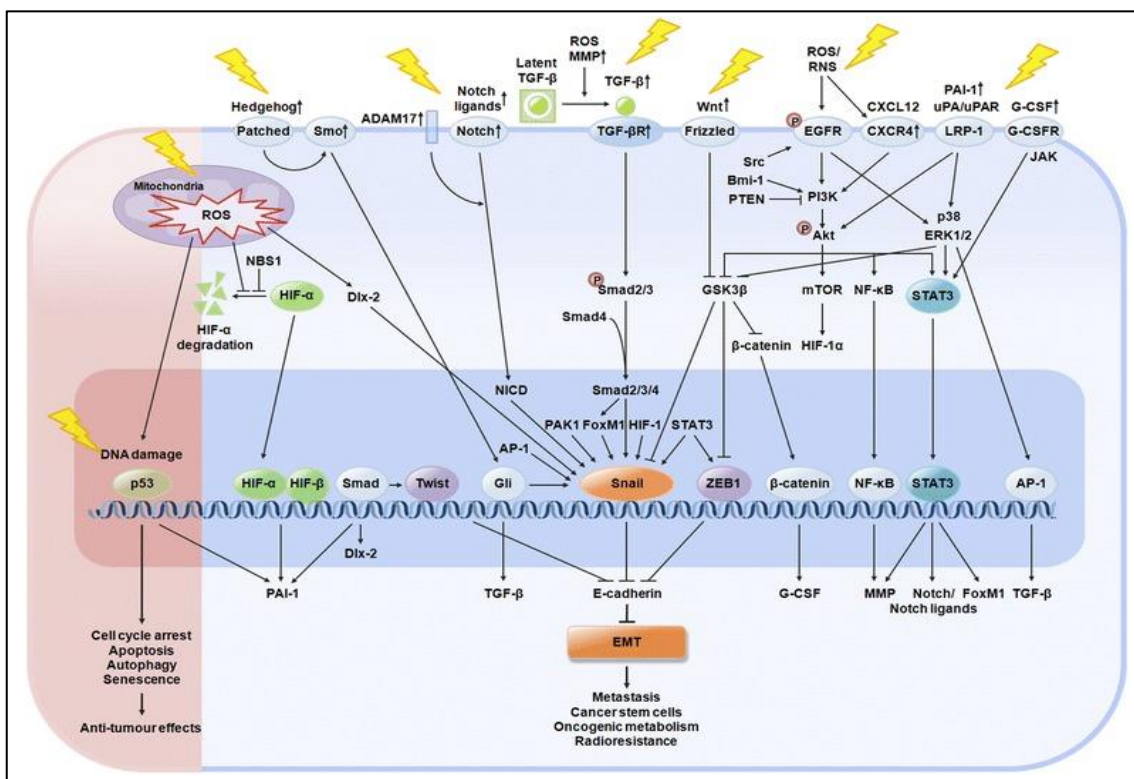


Abbildung 3.3. Induktion eines stammzellartigen Zustandes durch Strahlung

Multiple Signalwege erfahren eine strahleninduzierte Induktion. Hierzu zählen auch Hh- und Notch-Signalweg, welche wiederum effektiv durch ATO moduliert werden. Abk: Aktivator-Protein-1 (AP-1), Homöoboxprotein DLX-2 (Dlx-2), Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1 (PAI-1). (Quelle: Lee SY, Jeong EK, Ju MK, et al. Induction of metastasis, cancer stem cell phenotype, and oncogenic metabolism in cancer cells by ionizing radiation. Mol Cancer. 2017;16(1):10. Published 2017 Jan 30. doi:10.1186/s12943-016-0577-4)

Die Rolle von Checkpoint-Kinasen für Radioresistenz in Tumoren wurde ausführlich von Hauge et al. dargestellt.¹⁵⁷ Dabei lässt sich für CHK1 eine zentrale Rolle in Zellzyklus-Kontrolle und DNA-Reparatur ableiten. So ist CHK1 nach Bestrahlung beteiligt an dem Eintritt der Zellen in einen S- sowie G2-Phase Checkpoint mit konsekutiver Reduktion der DNA-Replikation und Aktivierung von Bestandteilen des DDR-Systems. Mittels Phosphorylierung kann CHK1 derart RAD51, ein Protein beteiligt an Reparatur mittels homologer Rekombination, aktivieren und Schäden effizient beseitigen.

Die Daten der Proteom-Analysen erbrachten in den untersuchten Zelllinien den Nachweis einer signifikanten Reduktion von CHK1, insbesondere unter ATO und ATO/AT-101. Diese Ergebnisse wurden im Weiteren auf Ebene der Expression bestätigt und zeigten darüber hinaus eine Reduktion anderer Bestandteile des DDR- und Zellzykluskontroll-Systems (CHK2, RAD51, ATM und Survivin).¹⁰⁵ Diese massive Deregulation von zentralen Mechanismen der zellulären Antwort auf strahleninduzierte Schäden erscheint wahrscheinlichster Urheber der in 3.2.4 präsentierten Radiosensitivierung durch die untersuchten Substanzen zu sein. Interessanterweise deuten die Ergebnisse von Wang et al.⁵² auf eine zusätzliche Radiosensitivierung durch eine Inhibition des Notch-Signalwegs, welche unabhängig von Bestandteilen des DDR-Systems ist, hin. So präsentierten sie eine intakte Aktivität von CHK1 und CHK2 bzw. ihrer phosphorylierten aktiven Korrelate bei Inhibition des Notch-Signalings und dennoch vermehrten Zelluntergang nach Bestrahlung. Dabei diskutieren sie eine Notch-vermittelte Modulation des PI3K/Akt-Signalwegs als Urheber dieser Sensitivierung. Wie bereits in 4.2.1 erwähnt zeigen Proteinanalysen der vorliegenden Arbeit ebenfalls eine Reduktion des phosphorylierten Akts bei gleichzeitiger Reduktion von *NOTCH1*, -2 und -3 unter Behandlung mit ATO. Zusätzlich präsentieren Untersuchungen zur Beeinträchtigung des Hh-Signalwegs eine Sensitivierung von Gliomzellen gegenüber Bestrahlung nach Hh-Inhibition.¹⁵⁸ Obgleich hier, an nachfolgendem Zelluntergang beteiligte, Signalwege der aktuellen Literatur nicht ausreichend zu entnehmen sind, ergibt sich dennoch die Hypothese der fulminanten Sensitivierung durch ATO über unabhängige Mechanismen. Dabei ergibt sich sowohl für Notch-¹⁵⁹ als auch Hh-¹⁶⁰ Signalweg eine Regulation des oben genannten Proteins Survivin. Survivin korreliert in Gliomen negativ mit dem Gesamtüberleben.¹⁶¹ Für T98 Zellen konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass ein genetisches Silencing

von *Survivin* zu einer Sensitivierung gegenüber Radiotherapie führte.¹⁶² Nach Bestrahlung konnte zudem eine Translokation von *Survivin* in den Nucleus mit Verbesserung der DNA-Reparatur nachgewiesen werden.¹⁶³ Somit erscheint eine ATO-induzierte Reduktion von *Survivin* durch Modulation von Hh- und Notch-Signalweg ebenfalls zur Radiosensitivierung in GSC beizutragen.

Untersuchungen an U87MG Zellen präsentierten gleichzeitig eine Induktion eines am ehesten autophagischen Zelltods durch (-)-Gossypol nach Bestrahlung.¹⁶⁴ AT-101 wurde zudem in einer Vielzahl anderer Tumore mit einer Radiosensitivierung in Verbindung gebracht.¹⁶⁵⁻¹⁶⁷ Die zugrundeliegenden Mechanismen erscheinen dabei unklar. Aufgrund seiner bereits erläuterten massiven Auswirkungen auf Autophagie und unter anderem auch Mitophagie erscheint eine Beeinflussung dieser Mechanismen auch hier vorstellbar. So könnte die Modulation der Autophagie-Maschinerie durch AT-101 das Gleichgewicht einer sonst strahleninduzierten tumorpropagierenden Autophagie in GSC zu Gunsten einer dann antitumoralen Autophagie verlagern. Letzteres versteht sich als Hypothese und erfordert weitere experimentelle Auseinandersetzung mit der Thematik.

Auf diese Weise lassen sich interessante Implikationen aus der gezeigten Sensitivierung gegenüber Strahlentherapie in GSC mittels ATO und AT-101 ableiten. Eingriffe in Zellzyklus und DDR-Systeme sowie die Modulation einer sonst üblichen tumorpropagierenden Autophagie nach Bestrahlung, welche die genuine Resistenz gegenüber Radiatio bedingen, ergeben effektive Angriffspunkte, um Rekurrenz möglicherweise zu vermeiden.

4.4 CHRDL1 als zentraler Regulator eines Stammzellzustandes – ein Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit, sowie der Proteom-Daten deuten auf interessante Implikationen des BMP4-Inhibitors CHRLD1 für die Modulation stammzellartiger Zellen hin. Unter Therapie mit ATO/AT-101 ist CHRDL1 in den untersuchten stammzellartigen Zellen eines der Proteine, welche eine maßgebliche Reduktion erfahren. Gleichzeitig zeigen die Ergebnisse der Untersuchung zentraler Markerproteine nach lentiviralem *Knockdown* eine deutliche *CHRDL1-Knockdown*-vermittelte Reduktion dieser Proteine. Die Diversität der von SOX2 und SOX9 regulierten Zellvorgänge, insbesondere in GSC, wurde dabei bereits in 4.1.1

beschrieben - ein erster Hinweis auf eine womöglich zentrale Rolle des *CHRD1* für die Modulation eines stammzellartigen Zustandes ins GSC. Tatsächlich zeigen Folgeuntersuchungen durch Berglar et al.¹⁶⁸, welche sich an diese ersten Ergebnisse anschlossen, eine Vielzahl an Veränderungen in GSC durch die Reduktion von *CHRD1* mittels ebensolchen *Knockdowns*. So konnte die Reduktion relevanter Marker in einer weiteren stammzellartigen Zelllinie über Expressionsanalysen nachgewiesen werden. Der *Knockdown* von *CHRD1* vermittelte darüber hinaus relevante Änderungen in funktionellen Eigenschaften wie Sphärenbildung, Regeneration, Stammzellfrequenz und Sensitivität hinsichtlich strahleninduzierter Schäden.¹⁶⁸ Die Betrachtung zugrundeliegender Signalweg-Modulationen zeigte dabei eine Reaktivierung eines suffizienten BMP4-Signalings entsprechend des kanonischen BMP-Signalwegs über SMAD1 und -5 bzw. ihrer aktiven phosphorylierten Zustände durch die Reduktion von *CHRD1*. Letzteres weist im Umkehrschluss auf eine *CHRD1*-vermittelte Aufrechterhaltung eines stammzellartigen Phänotyps in GSC, durch die Modulation des BMP-Signalwegs unter anderem unter Inhibition von BMP4, hin. Wie bereits in 1.2.1 beschrieben ergeben sich aus physiologischen Vorgängen in neuronalen Stammzellen durchaus Implikationen für aberrante Systeme innerhalb von Gliomen. Interessanterweise weisen Akkermann et al.¹⁶⁹ eine BMP-vermittelte Ruhigstellung von NSC auf. Dieser Ruhezustand wird unter anderem durch Sekretion von *CHRD1* über Gliazellen aufgehoben.¹⁶⁹ Die Rolle von BMP-Liganden und *CHRD1* erscheint allerdings unter physiologischen Bedingungen komplex. So zeigten Untersuchungen durch Gao et al.¹⁷⁰ eine *CHRD1*-vermittelte Differenzierung von NSC in neuronale Vorläufer durch Reduktion einer kanonischen BMP4-Signalkaskade. Diese *CHRD1*-vermittelte Differenzierung lässt sich in GSC derart nicht vermuten, vielmehr wird hier ein Dedifferenzierung gefördert. Tatsächlich erwähnen die Autoren auch in NSC einen kontextsensiblen Dualismus des BMP-Signalings bereits in physiologischen Vorgängen, sodass sich diese Widersprüchlichkeit gerade unter aberranten Voraussetzungen, wie sie in GSC herrschen, zerstreut. Panchision et al.¹⁷¹ verdeutlichen dabei anschaulich eine entscheidende Rolle eines intakten BMP-Signalings für neuronale und astrozytäre Zellschicksale und beschreiben interessanterweise eine Dialektik zwischen BMP- und Hh-Signalweg für Zellschicksal-Entscheidungen unter physiologischen Bindungen.

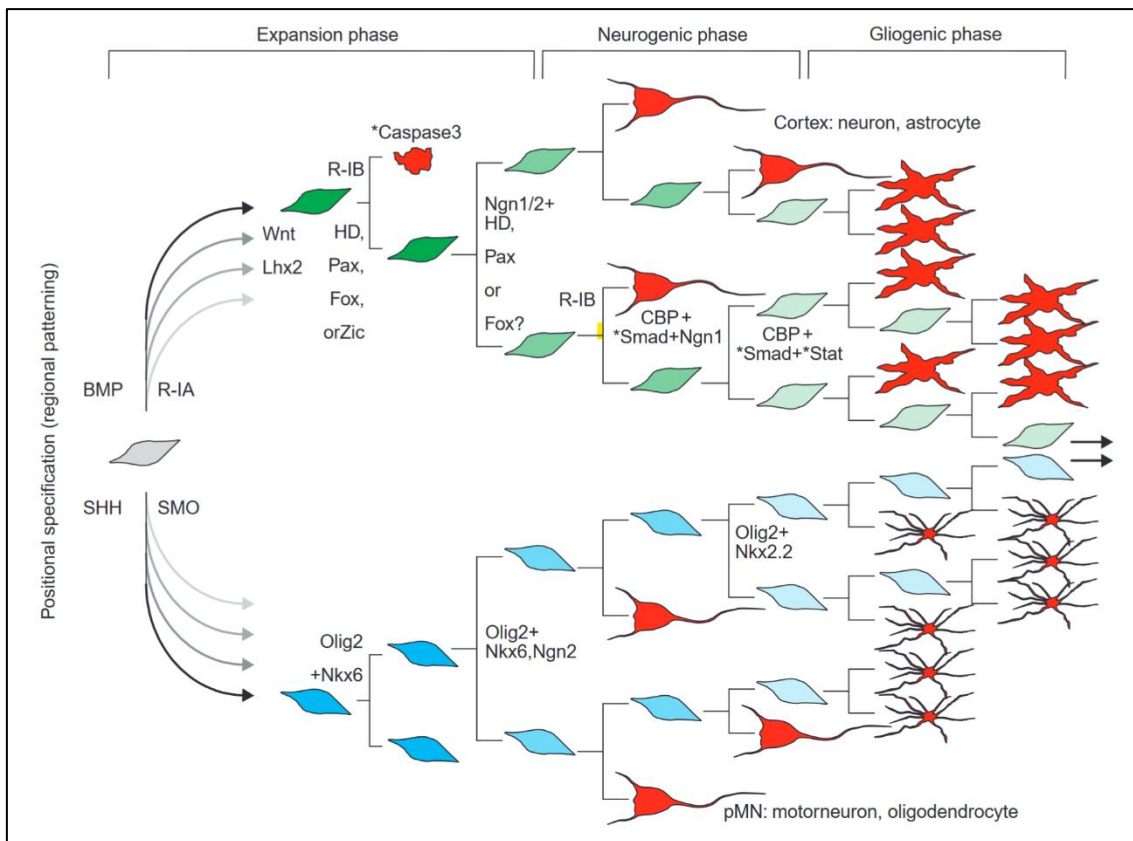


Abbildung 3.4. Zellschicksal von NSC in Abhängigkeit von Hh- und BMP-Signaling

Ein intaktes BMP-Signal ist unter physiologischen Bedingungen regionsspezifisch verantwortlich für ein neuronales oder astrozytäres Zellschicksal von NSC. Dabei steht dem BMP- ein aktives Hh-Signaling gegenüber und fördert eine Differenzierung zu Oligodendrozyten. Abk: Paired-Box-Protein (Pax), Forkhead-Box-Protein (Fox), „Neurogenin“ (Ngn), „Homeobox Protein Nkx“ (Nkx). (Quelle: Panchision DM, McKay RD. The control of neural stem cells by morphogenic signals. *Curr Opin Genet Dev.* 2002;12(4):478-487. doi:10.1016/s0959-437x(02)00329-5.)

Diese kontextsensiblen Wirkungen des CHRDL1 spiegeln sich auch in Untersuchungen des Mammakarzinoms wider. Hierbei fungiert CHRDL1 durch eine Inhibition des BMP-Signalings als Mediator für eine Reduktion von Migration und Invasion. Eine hohe CHRDL1-Expression geht dabei mit einer günstigen Prognose des Mammakarzinoms einher.¹⁷² In Gliomen zeigt sich dies umgekehrt. Hier korreliert eine hohe CHRDL1-Expression mit einer entsprechend ungünstigen Prognose.¹⁶⁸ Das Bild einer zellspezifischen und kontextsensiblen Wirkung von CHRDL1 verfestigt sich. Entsprechend lohnt der Blick spezifisch zu Erkenntnissen der Auswirkungen hinsichtlich maligner Zellen des ZNS. Bereits 2006 wiesen Piccirillo et al.⁶⁸ eine BMP4-vermittelte Reduktion von Proliferation und Kapazität einer Tumorgenese nach Transplantation von Gliomzellen *in vitro* und *in vivo* durch eine Reaktivierung von SMAD-Signalen nach. Gleichzeitig zeigen sie eine Reduktion von CD133⁺ Zellen, stellvertretend für eine Reduktion

stammzellartiger Zellen innerhalb des Zellpools. Liu et al.¹⁷³ erbrachten Hinweise der Induktion von Differenzierung und Apoptose in U251MG und U87MG Zellen durch eine Reaktivierung des BMP-Signalings via SMAD-Proteine. Sie präsentierten zudem eine Korrelation von geringem Anteil von phosphoryliertem, entsprechend aktivem, SMAD1, -5 und -8 und schlechter Prognose von GB. In Folge ihrer ersten Arbeiten entwickelten sie effektive Modelle zur Reaktivierung des BMP-Signalings in Gliomen mittels Einbringens von BMP4-überexprimierenden NSC, welche gezielt GB-Zellen invadieren. Sie zeigten dabei eine erfolgreiche Invasion der BMP4-exprimierenden NSC in humane GSC nach Xenotransplantation und eine, durch Reaktivierung von SMAD1, -5 und -8 vermittelte, Inhibition von Wachstum mit Induktion von Differenzierung und Apoptose.¹⁷⁴ Evidenzen im Bereich pädiatrischer Hirntumore, insbesondere für das diffuse intrinsische Ponsgliom, weisen ein Ausnutzen der Überexpression von CHRDL1 zur effizienten Reduktion von BMP-Signalen aus, um einen stammzellartigen Zustand aufrechtzuerhalten.¹⁷⁵ In ebensolcher Weise erscheint die Expression von CHRDL1 in GSC eine effektive Strategie zur Aufrechterhaltung ebenjener Zustandes. Wie durch Berglar et al. beschrieben könnte CHRDL1 ein Hauptregulator des Stammzellzustandes sein – seine effektive Elimination ergibt eine aussichtsreiche Möglichkeit zur Eliminierung letzterer. Tatsächlich können Ergebnisse einer klinischen Phase I und der sich anschließenden Untersuchungen zur Therapie von GB mit rekombinantem BMP4 mit Spannung erwartet werden (NCT02869243). Eventuelle klinische Implikationen für komplementäre Ansätze hinsichtlich einer CHRDL1-Inhibition lassen sich gegebenenfalls ableiten und zeigen interessante zukünftige Forschungsoptionen. Derart könnte eine theoretische Überlegenheit einer Inhibition von CHRDL1 gegenüber einer reinen Reaktivierung des BMP4-Signalings aus der zusätzlichen Funktion von CHRDL1 als Inhibitor weiterer BMP-Liganden¹⁷⁶ spekuliert werden; entsprechende Untersuchungen erscheinen erstrebenswert.

4.5 Limitationen

Die Ergebnisse dieser Arbeit ergeben, wie im Vorherigen beschrieben, aufschlussreiche Erkenntnisse hinsichtlich GSC. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig eine effiziente Modulation von Stammzeleigenschaften in GSC durch die Therapie mit ATO und insbesondere durch die Kombination von ATO und AT-101 gezeigt werden. Nichtsdestotrotz ergeben sich methodische und theoretische Limitationen, die im Sinne der kritischen Evaluation nicht unerwähnt bleiben sollen. Zuvorderst ergibt sich eine maßgebliche Limitation aller Hypothesen bezugnehmend auf GSC aus der theoretischen Überlegung der Existenz und Definition dieser Zellen. Wie bereits ausführlich dargestellt erscheinen die Evidenzen der aktuellen Literatur ausreichend, um die Existenz von Zellen mit stammzellartigen Zuständen anzuerkennen. Gleichzeitig ergibt sich, diese Zellen betreffend, eine extreme Uneinheitlichkeit. Es fehlt eine klare Definition. Uneindeutigkeit und Polyvalenz um Begriffe und Fähigkeiten der Zellen sind Ausdruck ihrer enormen Plastizität. Dadurch relativieren sich die abgeleiteten Erkenntnisse zu Stammzellzuständen stark. Ein Sprechen von bspw. Differenzierung ergibt vielmehr eine Momentaufnahme als einen definitiven Zustand. Wird diese Differenzierung beobachtet kann die translationale Übertragung durchaus eine Vielzahl von Auswirkungen zulassen. Eine Differenzierung *in -vitro*, *ex -vivo* oder *in -vivo* darf nicht als eindeutig übertragbar auf eine Differenzierung im Menschen gesehen werden. Die räumliche Unzugänglichkeit einer Therapie zum Tumor, die reine größere Tumormasse und die vielfältigere Heterogenität können Beitrag leisten an einer womöglich stärkeren Anpassung und Flexibilität von stammzellartigen Zellen als die Beobachtete. Eine Überwindung einer zeitweilig induzierten Differenzierung erscheint so im Rahmen des Möglichen und lässt sich ebenso auf Konzepte von Induktion von Zelltod und Sensitivität gegenüber strahleninduzierten Schäden transponieren. Ein GSC-Modell kann nur einen Teil der Plastizität eines tatsächlichen Glioblastoms reproduzieren und erlaubt damit gerade hinsichtlich der Modulation dieser Plastizität nur sehr begrenzte Aussagen. Dabei erscheint insbesondere das Glioblastom-betreffend diese Plastizität Urheber der bislang wenig erfolgreichen klinischen Konzepte zu sein – eine etabliertes multimodales Therapiekonzept aus Chirurgie, Radiatio und Chemotherapie hinsichtlich dessen das Fazit verbleibt der Plastizität nur in winzigem Umfang gerecht zu werden,

bedenkt man die wenig individuellen Therapieprinzipien. Im Rahmen der detaillierten Auseinandersetzung mit Fragen der Existenz und Gestalt von GSC in Bezug auf das Glioblastom verbleibt der Eindruck der Notwendigkeit, die Plastizität von Zellen und die Modulation ebendieser durch die Therapien, vermehrt in den Mittelpunkt der wissenschaftlichen Auseinandersetzung rücken zu müssen.

Limitationen anderer Ursache sind insbesondere bedingt durch die eingesetzten Substanzen. Sowohl ATO als auch AT-101, anders als GANT61, mangelt es an Spezifität ihrer Wirkung. Dadurch sind Ableitungen der tatsächlichen zellulären Vorgänge schwierig. Teilweise konnten im Rahmen dieser Arbeit Ideen über die Beeinträchtigung von Prozessen wie Notch- und Hh-Signaling gewonnen werden. Übliche Verfahren zur Interpretation einer relevanten Inhibition erfuhren in diesem Bezug Verwendung. Auf Fragen bezüglich einer Vielzahl von Prozessen, welche in der Diskussion der Ergebnisse ebenfalls Erwähnung finden, muss auf eine weiterreichende Untersuchung verwiesen werden. Diesbezüglich verlangt es insbesondere detaillierte Auseinandersetzung mit entsprechend ebenfalls etablierten Methoden zur Untersuchung der zugrundeliegenden Mechanismen, bspw. von Autophagie und Apoptose, Migration und Differenzierung entlang multipler Zellschicksale, um etwaige Ableitungen der Induktion Letzterer genauer einzuordnen. Sowohl ATO als auch AT-101 können durch Beeinflussung von multiplen, nicht beobachteten Prozessen ihre Wirkung entfalten, dementsprechend schwierig fallen kausale mechanistische Ableitungen. Daher verleiht hier die Kritik einer weitestgehend deskriptiven Beschreibung von resultierenden Effekten und gleichzeitig nur unzureichenden Aufklärung zugrundeliegender Prozesse. Im Unterschied zu spezifischen zielgerichteten Therapien lässt sich die Fülle an Vorgängen aufgrund der großen Pleiotropie der Substanzen nur schwerlich überblicken.

5. Zusammenfassung

Das Glioblastom ist eine tödliche maligne Erkrankung des zentralen Nervensystems. Etablierte Therapiekonzepte resultieren in einer Fünfjahresüberlebensrate von fünf Prozent.¹⁷⁷ Die derart infauste Prognose wird unter anderem bedingt durch die Heterogenität des Tumors. Insbesondere einer Population stammzellartiger Zellen wird die Verantwortung für Resistenz und Rekurrenz des Glioblastoms zugesprochen.²⁶ Die genuine Plastizität des Glioblastoms mit entsprechender Fähigkeit zur Änderungen tumorweiter Expressionsprofile und Ausbildung einzigartiger funktioneller Fähigkeiten kann ohne gezielte Beeinträchtigung von stammzellartigen Zellen womöglich nicht ausreichend überwunden werden.¹⁵ Als Urheber kritischer Eigenschaften erscheint die erfolgreiche Elimination dieser Population innerhalb des Glioblastoms notwendig um nachhaltige Therapieerfolge zu erzielen. Mögliche Strategien der Elimination stammzellartiger Zellen setzen an Differenzierung und Ausbeutung stammzelltypischer Signalwege zur Modulation dieser Zellen an.⁴⁵ Hierdurch sollen zentrale Fähigkeiten der Population stammzellartiger Zellen, wie Selbsterneuerung, Resistenz gegenüber Strahlen- und Chemotherapie und erneute Formation heterogener Tumore, überwunden werden.

Zentrale zelluläre Prozesse, welche zum Erhalt des stammzellartigen Zustandes dieser Zellen beitragen, sind unter anderem der Hedgehog- und Notch-Signalweg.⁶⁶ Einer Beeinträchtigung dieser Signalwege wohnt womöglich die Fähigkeit der effektiven Modulation zentraler Eigenschaften stammzellartiger Zellen inne. Neben diesen Signalwegen gibt es eine Reihe weiterer Prozesse, welchen eine Urheberschaft an der Resistenz der Zellen zugesprochen wird. Hierzu zählt beispielweise der Prozess der Autophagie. Die Autophagie ist ein hochkonservierter zellulärer Mechanismus zur Selbsterneuerung durch Selbstdegradation fehlerhafter zellulärer Komponenten.⁷¹ Gleichzeitig kann die Autophagie durch eine Überaktivität zu einem spezifischen, autophagischen Zelltod beitragen. Die Modulation dieses Dualismus kann in einer Vielzahl von Tumoren, so auch im Glioblastom, das Schicksal einer tumorfördernden Autophagie in eine antitumorale Autophagie ändern.⁷⁴

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig eine Modulation zentraler Eigenschaften stammzellartiger Zellen durch die Beeinflussung ihrer zellulären Prozesse

mittels kombinierter Therapie durch Arsentrioxid oder GANT61 und (-)-Gossypol gezeigt. Arsentrioxid wirkt unspezifisch unter anderem als Inhibitor von Notch- und Hedgehog-Signalweg.⁸⁹ Diese Inhibition wurde auch in den untersuchten Zellen nachgewiesen und führte zu einer Reduktion von stammzelltypischen Markerproteinen und Fähigkeiten der Tumorgenese *in vitro* und *ex vivo*, sowie zur Sensitivierung gegenüber strahleninduzierten Schäden. Gegenüber einer spezifischen¹¹⁹ Hedgehog-Inhibition durch eine GANT61-vermittelte Bindung an Gli-Transkriptionsfaktoren zeigten sich deutliche Vorteile der dualen Inhibition durch Arsentrioxid hinsichtlich der genannten Eigenschaften. Die Kombination der Substanzen mit dem pan-Bcl2-Inhibitor (-)-Gossypol führte zu einer synergistischen Steigerung der antitumoralen Effekte. (-)-Gossypol wird in Gliomzellen insbesondere mit der Modulation der autophagischen Maschinerie und Auslösung eines autophagischen Zelltodes in Verbindung gebracht.⁹⁶ Die Ergebnisse weisen parallele Signalweginteraktionen mit effektiver Modulation des DNA-Damage-Response-Systems durch die Reduktion des Proteins CHEK1 als kausalen Mechanismus des Synergismus der Substanzen aus.

Die beobachteten Änderungen der typischen Eigenschaften stammzellartiger Zellen durch die Therapie mit Arsentrioxid und (-)-Gossypol implizieren lohnende Folgeuntersuchungen zur weiteren Evaluation dieser Effekte *in vivo*, um zukünftig translationale Ableitungen zu erlauben. Die Heterogenität des Glioblastoms und seine genuine Plastizität lassen sich womöglich erfolgreich durch multiple Eingriffe in unterschiedliche zelluläre Prozesse, hierunter Notch- und Hedgehog-Signaling, modulieren. Hierdurch könnten zentrale Eigenschaften des Glioblastoms eventuell effektiv verändert und Resistenz sowie Rekurrenz überwunden werden.

5.1 Summary

Glioblastoma is a fatal malignant disease of the central nervous system. Established therapy concepts result in a five-year survival rate of five percent. This dissatisfying prognosis is mainly caused by tumor heterogeneity. Particularly a population of stem cell-like cells is responsible for resistance and recurrence of glioblastoma. To overcome the native plasticity of glioblastoma, with its corresponding ability to alter tumor-wide expression profiles and develop unique functional capabilities, targeted therapies regarding stem cell-like cells appear necessary. Possible strategies for the elimination of stem cell-like cells include a forced differentiation of these cells and the exploitation of stem cell-typical signaling pathways to further modulate pivotal abilities of the population of stem cell-like cells, such as self-renewal or resistance to radio- and chemotherapy. Cellular regiments that contribute to the maintenance of the stem cell-like state of these cells include the Hedgehog and Notch signaling pathways. Disruption of these signaling pathways may lead to effective modulation of crucial properties of stem cell-like cells. In addition to these signaling pathways, numerous distinctive programs are further involved in therapy resistance - one of these being autophagy. Autophagy is a highly conserved cellular mechanism ensuring self-renewal through self-degradation of damaged cellular components. At the same time, autophagy can contribute to specific autophagic cell death through overactivation. Effective modulation of this dualism can convert tumor-promoting autophagy into antitumoral autophagy through induction of autophagic cell death in a variety of tumors, including glioblastoma.

The effective loss of stemness-associated properties by disruption of stem cell-typical processes via combined therapy of arsenic trioxide or GANT61 and (-)-gossypol was demonstrated in this thesis. Arsenic trioxide acts nonspecifically as an inhibitor of Notch and Hedgehog signaling. This inhibition was also demonstrated in the examined cells and led to a reduction of stem cell-typical marker proteins as well as reduced abilities of tumorigenesis *in vitro* and *ex vivo* and sensitization to radiotherapy. In comparison to specific hedgehog inhibition by GANT61-mediated binding to Gli transcription factors, dual inhibition by arsenic trioxide was more effective. The combination of arsenic trioxide or GANT61 and the pan-Bcl2 inhibitor (-)-gossypol resulted in a synergistic enhancement of

antitumor effects. (-)-Gossypol is particularly associated with modification of the autophagic machinery and triggering of autophagic cell death in glioma cells. The results indicate parallel pathway interactions with effective modulation of DNA damage response through reduction of the protein CHEK1 as an underlying mechanism of synergistic action.

The observed changes in typical properties of stem cell-like cells by therapy with arsenic trioxide and (-)-gossypol indicate that follow-up studies to further evaluate these effects *in vivo* and to further allow translational deductions in the future are necessary. The heterogeneity of glioblastoma and its native plasticity may be successfully overcome by intervening multiple different cellular pathways, including Notch and Hedgehog signaling. This may effectively alter key properties of glioblastoma and overcome resistance and recurrence.

6. Literaturverzeichnis

References

1. Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, et al. 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. Louis DN, Perry A, Wesseling P, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-oncology*. 2021;23(8):1231-1251. doi:10.1093/neuonc/noab106.
3. Wirsching H-G, Galanis E, Weller M. Glioblastoma. *Handb Clin Neurol*. 2016;134:381-397. doi:10.1016/B978-0-12-802997-8.00023-2.
4. Omuro A, DeAngelis LM. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. *JAMA*. 2013;310(17):1842-1850. doi:10.1001/jama.2013.280319.
5. Ohgaki H, Kim Y-H, Steinbach JP. Nervous system tumors associated with familial tumor syndromes. *Curr Opin Neurol*. 2010;23(6):583-591. doi:10.1097/WCO.0b013e3283405b5f.
6. Miltner F. 030-099I_S2k_Gliome_2015-06-abgelaufen.
7. Siegelin MD, Schneider E, Westhoff M-A, Wirtz CR, Karpel-Massler G. Current state and future perspective of drug repurposing in malignant glioma. *Semin Cancer Biol*. 2019. doi:10.1016/j.semcan.2019.10.018.
8. Wick W. et al. Gliome: S2k-Leitlinie. www.dgn.org/leitlinien (abgerufen am 01.08.2022).
9. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352(10):987-996. doi:10.1056/NEJMoa043330.
10. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *The Lancet Oncology*. 2009;10(5):459-466. doi:10.1016/S1470-2045(09)70025-7.
11. Stupp R, Taillibert S, Kanner A, et al. Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2017;318(23):2306-2316. doi:10.1001/jama.2017.18718.
12. Fabian D, Guillermo Prieto Eibl MdP, Alnahhas I, et al. Treatment of Glioblastoma (GBM) with the Addition of Tumor-Treating Fields (TTF): A Review. *Cancers (Basel)*. 2019;11(2). doi:10.3390/cancers11020174.
13. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell*. 2006;9(3):157-173. doi:10.1016/j.ccr.2006.02.019.
14. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 2010;17(1):98-110. doi:10.1016/j.ccr.2009.12.020.
15. Fedele M, Cerchia L, Pegoraro S, Sgarra R, Manfioletti G. Proneural-Mesenchymal Transition: Phenotypic Plasticity to Acquire Multitherapy Resistance in Glioblastoma. *Int J Mol Sci*. 2019;20(11). doi:10.3390/ijms20112746.

16. Tamimi AF, Juweid M. *Glioblastoma: Epidemiology and Outcome of Glioblastoma*. Brisbane (AU); 2017.
17. McGranahan N, Swanton C. Biological and therapeutic impact of intratumor heterogeneity in cancer evolution. *Cancer Cell*. 2015;27(1):15-26. doi:10.1016/j.ccell.2014.12.001.
18. Dawood S, Austin L, Cristofanilli M. Cancer stem cells: implications for cancer therapy. *Oncology (Williston Park, N Y)*. 2014;28(12):1101-7, 1110.
19. Senga SS, Grose RP. Hallmarks of cancer-the new testament. *Open Biol*. 2021;11(1):200358. doi:10.1098/rsob.200358.
20. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
21. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 2022;12(1):31-46. doi:10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
22. Capp J-P. Cancer Stem Cells: From Historical Roots to a New Perspective. *J Oncol*. 2019;2019:5189232. doi:10.1155/2019/5189232.
23. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 1994;367(6464):645-648. doi:10.1038/367645a0.
24. Sundar SJ, Hsieh JK, Manjila S, Lathia JD, Sloan A. The role of cancer stem cells in glioblastoma. *Neurosurg Focus*. 2014;37(6):E6. doi:10.3171/2014.9.FOCUS14494.
25. Natsume A, Kinjo S, Yuki K, et al. Glioma-initiating cells and molecular pathology: implications for therapy. *Brain Tumor Pathol*. 2011;28(1):1-12. doi:10.1007/s10014-010-0011-3.
26. Gimple RC, Bhargava S, Dixit D, Rich JN. Glioblastoma stem cells: lessons from the tumor hierarchy in a lethal cancer. *Genes Dev*. 2019;33(11-12):591-609. doi:10.1101/gad.324301.119.
27. Cahill D, Turcan S. Origin of Gliomas. *Semin Neurol*. 2018;38(1):5-10. doi:10.1055/s-0037-1620238.
28. Laug D, Glasgow SM, Deneen B. A glial blueprint for gliomagenesis. *Nat Rev Neurosci*. 2018;19(7):393-403. doi:10.1038/s41583-018-0014-3.
29. Kriegstein A, Alvarez-Buylla A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci*. 2009;32:149-184. doi:10.1146/annurev.neuro.051508.135600.
30. Ma J, Shen Z, Yu Y-C, Shi S-H. Neural lineage tracing in the mammalian brain. *Curr Opin Neurobiol*. 2018;50:7-16. doi:10.1016/j.conb.2017.10.013.
31. La Rocha AMA de, Sampron N, Alonso MM, Matheu A. Role of SOX family of transcription factors in central nervous system tumors. *Am J Cancer Res*. 2014;4(4):312-324.
32. Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS. Neural stem cells and the origin of gliomas. *N Engl J Med*. 2005;353(8):811-822. doi:10.1056/NEJMra043666.
33. Lan X, Jörg DJ, Cavalli FMG, et al. Fate mapping of human glioblastoma reveals an invariant stem cell hierarchy. *Nature*. 2017;549(7671):227-232. doi:10.1038/nature23666.
34. Modrek AS, Bayin NS, Placantonakis DG. Brain stem cells as the cell of origin in glioma. *World J Stem Cells*. 2014;6(1):43-52. doi:10.4252/wjsc.v6.i1.43.
35. Capdevila C, Rodríguez Vázquez L, Martí J. Glioblastoma Multiforme and Adult Neurogenesis in the Ventricular-Subventricular Zone: A Review. *J Cell Physiol*. 2017;232(7):1596-1601. doi:10.1002/jcp.25502.

36. Bakhshinyan D, Savage N, Salim SK, Venugopal C, Singh SK. The Strange Case of Jekyll and Hyde: Parallels Between Neural Stem Cells and Glioblastoma-Initiating Cells. *Front Oncol.* 2020;10:603738. doi:10.3389/fonc.2020.603738.
37. Hira VVV, Aderetti DA, van Noorden CJF. Glioma Stem Cell Niches in Human Glioblastoma Are Periarteriolar. *J Histochem Cytochem.* 2018;66(5):349-358. doi:10.1369/0022155417752676.
38. Teo W-Y, Sekar K, Seshachalam P, et al. Relevance of a TCGA-derived Glioblastoma Subtype Gene-Classifer among Patient Populations. *Sci Rep.* 2019;9(1):7442. doi:10.1038/s41598-019-43173-y.
39. Neftel C, Laffy J, Filbin MG, et al. An Integrative Model of Cellular States, Plasticity, and Genetics for Glioblastoma. *Cell.* 2019;178(4):835-849.e21. doi:10.1016/j.cell.2019.06.024.
40. Lathia JD, Mack SC, Mulkearns-Hubert EE, Valentim CLL, Rich JN. Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes Dev.* 2015;29(12):1203-1217. doi:10.1101/gad.261982.115.
41. Codrici E, Enciu A-M, Popescu I-D, Mihai S, Tanase C. Glioma Stem Cells and Their Microenvironments: Providers of Challenging Therapeutic Targets. *Stem Cells Int.* 2016;2016:5728438. doi:10.1155/2016/5728438.
42. Suvà ML, Tirosh I. The Glioma Stem Cell Model in the Era of Single-Cell Genomics. *Cancer Cell.* 2020;37(5):630-636. doi:10.1016/j.ccell.2020.04.001.
43. Yabo YA, Niclou SP, Golebiewska A. Cancer cell heterogeneity and plasticity: A paradigm shift in glioblastoma. *Neuro-oncology.* 2022;24(5):669-682. doi:10.1093/neuonc/noab269.
44. Nakano I. Stem cell signature in glioblastoma: therapeutic development for a moving target. *J Neurosurg.* 2015;122(2):324-330. doi:10.3171/2014.9.JNS132253.
45. Liebelt BD, Shingu T, Zhou X, Ren J, Shin SA, Hu J. Glioma Stem Cells: Signaling, Microenvironment, and Therapy. *Stem Cells Int.* 2016;2016:7849890. doi:10.1155/2016/7849890.
46. Bao S, Wu Q, McLendon RE, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature.* 2006;444(7120):756-760. doi:10.1038/nature05236.
47. Liu Y, Shen Y, Sun T, Yang W. Mechanisms regulating radiosensitivity of glioma stem cells. *Neoplasma.* 2017;64(5):655-665. doi:10.4149/neo_2017_502.
48. Lubensky IA, Vortmeyer AO, Kim S, et al. Identification of tumor precursor cells in the brains of primates with radiation-induced de novo glioblastoma multiforme. *Cell Cycle.* 2006;5(4):452-456. doi:10.4161/cc.5.4.2482.
49. Auffinger B, Spencer D, Pytel P, Ahmed AU, Lesniak MS. The role of glioma stem cells in chemotherapy resistance and glioblastoma multiforme recurrence. *Expert Rev Neurother.* 2015;15(7):741-752. doi:10.1586/14737175.2015.1051968.
50. Biserova K, Jakovlevs A, Uljanovs R, Strumfa I. Cancer Stem Cells: Significance in Origin, Pathogenesis and Treatment of Glioblastoma. *Cells.* 2021;10(3). doi:10.3390/cells10030621.
51. Bazzoni R, Bentivegna A. Role of Notch Signaling Pathway in Glioblastoma Multiforme Pathogenesis. *Cancers (Basel).* 2019;11(3). doi:10.3390/cancers11030292.

52. Wang J, Wakeman TP, Lathia JD, et al. Notch promotes radioresistance of glioma stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2010;28(1):17-28. doi:10.1002/stem.261.
53. Wang J, Xu S-L, Duan J-J, et al. Invasion of white matter tracts by glioma stem cells is regulated by a NOTCH1-SOX2 positive-feedback loop. *Nature neuroscience*. 2019;22(1):91-105. doi:10.1038/s41593-018-0285-z.
54. Peereboom DM, Ye X, Mikkelsen T, et al. A Phase II and Pharmacodynamic Trial of RO4929097 for Patients With Recurrent/Progressive Glioblastoma. *Neurosurgery*. 2021;88(2):246-251. doi:10.1093/neuros/nyaa412.
55. Skoda AM, Simovic D, Karin V, Kardum V, Vranic S, Serman L. The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review. *Bosn J Basic Med Sci*. 2018;18(1):8-20. doi:10.17305/bjbms.2018.2756.
56. Pak E, Segal RA. Hedgehog Signal Transduction: Key Players, Oncogenic Drivers, and Cancer Therapy. *Dev Cell*. 2016;38(4):333-344. doi:10.1016/j.devcel.2016.07.026.
57. Doheny D, Manore SG, Wong GL, Lo H-W. Hedgehog Signaling and Truncated GLI1 in Cancer. *Cells*. 2020;9(9). doi:10.3390/cells9092114.
58. Pietrobono S, Gagliardi S, Stecca B. Non-canonical Hedgehog Signaling Pathway in Cancer: Activation of GLI Transcription Factors Beyond Smoothened. *Front Genet*. 2019;10:556. doi:10.3389/fgene.2019.00556.
59. Luca A de, Cerrato V, Fucà E, Parmigiani E, Buffo A, Leto K. Sonic hedgehog patterning during cerebellar development. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(2):291-303. doi:10.1007/s00018-015-2065-1.
60. Kinzler KW, Bigner SH, Bigner DD, et al. Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. *Science*. 1987;236(4797):70-73. doi:10.1126/science.3563490.
61. Huang D, Wang Y, Xu L, et al. GLI2 promotes cell proliferation and migration through transcriptional activation of ARHGEF16 in human glioma cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018;37(1):247. doi:10.1186/s13046-018-0917-x.
62. Yan G-N, Yang L, Lv Y-F, et al. Endothelial cells promote stem-like phenotype of glioma cells through activating the Hedgehog pathway. *J Pathol*. 2014;234(1):11-22. doi:10.1002/path.4349.
63. Melamed JR, Morgan JT, Ioele SA, Gleghorn JP, Sims-Mourtada J, Day ES. Investigating the role of Hedgehog/GLI1 signaling in glioblastoma cell response to temozolomide. *Oncotarget*. 2018;9(43):27000-27015. doi:10.18632/oncotarget.25467.
64. Sloan AE, Nock CJ, Ye X, et al. ABTC-0904: targeting glioma stem cells in GBM: a phase 0/II study of hedgehog pathway inhibitor GDC-0449. *J Neurooncol*. 2022. doi:10.1007/s11060-022-04193-3.
65. Kim M, Choe S. BMPs and their clinical potentials. *BMB Rep*. 2011;44(10):619-634. doi:10.5483/BMBRep.2011.44.10.619.
66. Drakulic D, Schwirtlich M, Petrovic I, et al. Current Opportunities for Targeting Dysregulated Neurodevelopmental Signaling Pathways in Glioblastoma. *Cells*. 2022;11(16). doi:10.3390/cells11162530.
67. Katagiri T, Watabe T. Bone Morphogenetic Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;8(6). doi:10.1101/cshperspect.a021899.
68. Piccirillo SGM, Reynolds BA, Zanetti N, et al. Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature*. 2006;444(7120):761-765. doi:10.1038/nature05349.

69. Nayak S, Mahenthiran A, Yang Y, et al. Bone Morphogenetic Protein 4 Targeting Glioma Stem-Like Cells for Malignant Glioma Treatment: Latest Advances and Implications for Clinical Application. *Cancers (Basel)*. 2020;12(2). doi:10.3390/cancers12020516.
70. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000;407(6805):770-776. doi:10.1038/35037710.
71. Linder B, Kögel D. Autophagy in Cancer Cell Death. *Biology (Basel)*. 2019;8(4). doi:10.3390/biology8040082.
72. Beljanski V, Grinnemo K-H, Österholm C. Pleiotropic roles of autophagy in stem cell-based therapies. *Cytotherapy*. 2019. doi:10.1016/j.jcyt.2019.02.007.
73. Zeng X, Ju D. Hedgehog Signaling Pathway and Autophagy in Cancer. *Int J Mol Sci*. 2018;19(8). doi:10.3390/ijms19082279.
74. Batara DCR, Choi M-C, Shin H-U, Kim H, Kim S-H. Friend or Foe: Paradoxical Roles of Autophagy in Gliomagenesis. *Cells*. 2021;10(6):1411. doi:10.3390/cells10061411.
75. Doblado L, Lueck C, Rey C, et al. Mitophagy in Human Diseases. *Int J Mol Sci*. 2021;22(8). doi:10.3390/ijms22083903.
76. Sentelle RD, Senkal CE, Jiang W, et al. Ceramide targets autophagosomes to mitochondria and induces lethal mitophagy. *Nat Chem Biol*. 2012;8(10):831-838. doi:10.1038/nchembio.1059.
77. Wang W, Wang Y, Chen H, et al. Orphan nuclear receptor TR3 acts in autophagic cell death via mitochondrial signaling pathway. *Nat Chem Biol*. 2014;10(2):133-140. doi:10.1038/nchembio.1406.
78. Lauth M, Bergström A, Shimokawa T, Toftgård R. Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(20):8455-8460. doi:10.1073/pnas.0609699104.
79. Frampton JE, Basset-Séguin N. Vismodegib: A Review in Advanced Basal Cell Carcinoma. *Drugs*. 2018;78(11):1145-1156. doi:10.1007/s40265-018-0948-9.
80. Metcalfe C, Sauvage FJ de. Hedgehog fights back: mechanisms of acquired resistance against Smoothed antagonists. *Cancer Res*. 2011;71(15):5057-5061. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0923.
81. Didiasova M, Schaefer L, Wygrecka M. Targeting GLI Transcription Factors in Cancer. *Molecules*. 2018;23(5). doi:10.3390/molecules23051003.
82. Li J, Cai J, Zhao S, et al. GANT61, a GLI inhibitor, sensitizes glioma cells to the temozolomide treatment. *J Exp Clin Cancer Res*. 2016;35(1):184. doi:10.1186/s13046-016-0463-3.
83. Beauchamp EM, Uren A. A new era for an ancient drug: arsenic trioxide and Hedgehog signaling. *Vitam Horm*. 2012;88:333-354. doi:10.1016/B978-0-12-394622-5.00015-8.
84. Lengfelder E, Schultheis B, Büchner T, Hehlmann R. Arsentrioxid: "ein erfolgreiches Gift" bei Patienten mit akuter Promyelozytenleukämie. *Dtsch Med Wochenschr*. 2007;132(7):330-336. doi:10.1055/s-2007-959329.
85. Kanzawa T, Kondo Y, Ito H, Kondo S, Germano I. Induction of autophagic cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide. *Cancer Res*. 2003;63(9):2103-2108.
86. Fang Y, Zhang Z. Arsenic trioxide as a novel anti-glioma drug: a review. *Cell Mol Biol Lett*. 2020;25:44. doi:10.1186/s11658-020-00236-7.

87. Zhen Y, Zhao S, Li Q, Li Y, Kawamoto K. Arsenic trioxide-mediated Notch pathway inhibition depletes the cancer stem-like cell population in gliomas. *Cancer Lett.* 2010;292(1):64-72. doi:10.1016/j.canlet.2009.11.005.
88. Wu J, Ji Z, Liu H, et al. Arsenic trioxide depletes cancer stem-like cells and inhibits repopulation of neurosphere derived from glioblastoma by downregulation of Notch pathway. *Toxicol Lett.* 2013;220(1):61-69. doi:10.1016/j.toxlet.2013.03.019.
89. Ding D, Lim KS, Eberhart CG. Arsenic trioxide inhibits Hedgehog, Notch and stem cell properties in glioblastoma neurospheres. *Acta Neuropathol Commun.* 2014;2:31.
90. Klinger PHS, Andrade AF, Delsin LEA, et al. Inhibition of SHH pathway mechanisms by arsenic trioxide in pediatric medulloblastomas: a comprehensive literature review. *Genet Mol Res.* 2017;16(1). doi:10.4238/gmr16019412.
91. Raju GP. Arsenic: a potentially useful poison for Hedgehog-driven cancers. *J Clin Invest.* 2011;121(1):14-16. doi:10.1172/JCI45692.
92. Kumthekar P, Grimm S, Chandler J, et al. A phase II trial of arsenic trioxide and temozolomide in combination with radiation therapy for patients with malignant gliomas. *J Neurooncol.* 2017;133(3):589-594. doi:10.1007/s11060-017-2469-x.
93. Han D, Teng L, Wang X, et al. Phase I/II trial of local interstitial chemotherapy with arsenic trioxide in patients with newly diagnosed glioma. *Frontiers in Neurology.* 2022;13:1001829. doi:10.3389/fneur.2022.1001829.
94. Ommaya AK. Implantable devices for chronic access and drug delivery to the central nervous system. *Cancer Drug Deliv.* 1984;1(2):169-179. doi:10.1089/cdd.1984.1.169.
95. Voss V, Senft C, Lang V, et al. The pan-Bcl-2 inhibitor (-)-gossypol triggers autophagic cell death in malignant glioma. *Mol Cancer Res.* 2010;8(7):1002-1016. doi:10.1158/1541-7786.MCR-09-0562.
96. Meyer N, Zielke S, Michaelis JB, et al. AT 101 induces early mitochondrial dysfunction and HMOX1 (heme oxygenase 1) to trigger mitophagic cell death in glioma cells. *Autophagy.* 2018;14(10):1693-1709. doi:10.1080/15548627.2018.1476812.
97. Warnsmann V, Meyer N, Hamann A, Kögel D, Osiewacz HD. A novel role of the mitochondrial permeability transition pore in (-)-gossypol-induced mitochondrial dysfunction. *Mech Ageing Dev.* 2018;170:45-58. doi:10.1016/j.mad.2017.06.004.
98. Caylioglu D, Meyer RJ, Hellmold D, Kubelt C, Synowitz M, Held-Feindt J. Effects of the Anti-Tumorigenic Agent AT101 on Human Glioblastoma Cells in the Microenvironmental Glioma Stem Cell Niche. *Int J Mol Sci.* 2021;22(7). doi:10.3390/ijms22073606.
99. Wang J, Peng Y, Liu Y, Yang J, Huang M, Tan W. AT-101 inhibits hedgehog pathway activity and cancer growth. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2015;76(3):461-469. doi:10.1007/s00280-015-2812-x.
100. Renner O, Mayer M, Leischner C, et al. Systematic Review of Gossypol/AT-101 in Cancer Clinical Trials. *Pharmaceuticals (Basel).* 2022;15(2). doi:10.3390/ph15020144.
101. Gonnissen A, Isebaert S, Haustermans K. Targeting the Hedgehog signaling pathway in cancer: beyond Smoothed. *Oncotarget.* 2015;6(16):13899-13913. doi:10.18632/oncotarget.4224.

102. Günther HS, Schmidt NO, Phillips HS, et al. Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria. *Oncogene*. 2008;27(20):2897-2909. doi:10.1038/sj.onc.1210949.
103. Hetschko H, Voss V, Senft C, Seifert V, Prehn JHM, Kögel D. BH3 mimetics reactivate autophagic cell death in anoxia-resistant malignant glioma cells. *Neoplasia*. 2008;10(8):873-885. doi:10.1593/neo.07842.
104. Bae DH, Marino M, Iaffaldano B, et al. Design and Testing of Vector-Producing HEK293T Cells Bearing a Genomic Deletion of the SV40 T Antigen Coding Region. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2020;18:631-638. doi:10.1016/j.omtm.2020.07.006.
105. Linder B, Wehle A, Hehlhans S, et al. Arsenic Trioxide and (-)-Gossypol Synergistically Target Glioma Stem-Like Cells via Inhibition of Hedgehog and Notch Signaling. *Cancers (Basel)*. 2019;11(3). doi:10.3390/cancers11030350.
106. Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul*. 1984;22:27-55. doi:10.1016/0065-2571(84)90007-4.
107. *CompuSyn for drug combinations: PC Software and User's Guide: a computer program for quantitation of synergism and antagonism in drug combinations, and the determination of IC50 and ED50 and LD50 values*. Paramus (NJ); 2005.
108. Hu Y, Smyth GK. ELDA: extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays. *J Immunol Methods*. 2009;347(1-2):70-78. doi:10.1016/j.jim.2009.06.008.
109. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-685.
110. Burnette W. "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*. 1981;112(2):195-203. doi:10.1016/0003-2697(81)90281-5.
111. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(9):4350-4354.
112. Stockert JC, Horobin RW, Colombo LL, Blázquez-Castro A. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem*. 2018;120(3):159-167. doi:10.1016/j.acthis.2018.02.005.
113. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. In: El-Gewely MR, ed. *Biotechnology annual review. vol. 11*. Vol. 11. Amsterdam, New York: Elsevier; 2005:127-152. *Biotechnology Annual Review*.
114. Chou T-C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res*. 2010;70(2):440-446. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1947.
115. Clement V, Sanchez P, Tribolet N de, Radovanovic I, Ruiz i Altaba A. HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity. *Curr Biol*. 2007;17(2):165-172. doi:10.1016/j.cub.2006.11.033.

116. Santoni M, Burattini L, Nabissi M, et al. Essential role of Gli proteins in glioblastoma multiforme. *Curr Protein Pept Sci.* 2013;14(2):133-140. doi:10.2174/1389203711314020005.
117. Takezaki T, Hide T, Takanaga H, Nakamura H, Kuratsu J-I, Kondo T. Essential role of the Hedgehog signaling pathway in human glioma-initiating cells. *Cancer Sci.* 2011;102(7):1306-1312. doi:10.1111/j.1349-7006.2011.01943.x.
118. Cherepanov SA, Cherepanova KI, Grinenko NF, Antonova OM, Chekhonin VP. Effect of Hedgehog Signaling Pathway Activation on Proliferation of High-Grade Gliomas. *Bull Exp Biol Med.* 2016;161(5):674-678. doi:10.1007/s10517-016-3483-2.
119. Calcaterra A, Iovine V, Botta B, et al. Chemical, computational and functional insights into the chemical stability of the Hedgehog pathway inhibitor GANT61. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2018;33(1):349-358. doi:10.1080/14756366.2017.1419221.
120. Lospinoso Severini L, Quaglio D, Basili I, et al. A Smo/Gli Multitarget Hedgehog Pathway Inhibitor Impairs Tumor Growth. *Cancers (Basel).* 2019;11(10). doi:10.3390/cancers11101518.
121. Yi L, Zhou X, Li T, et al. Notch1 signaling pathway promotes invasion, self-renewal and growth of glioma initiating cells via modulating chemokine system CXCL12/CXCR4. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019;38(1):339. doi:10.1186/s13046-019-1319-4.
122. Jacobs CT, Huang P. Complex crosstalk of Notch and Hedgehog signaling during the development of the central nervous system. *Cell Mol Life Sci.* 2021;78(2):635-644. doi:10.1007/s00018-020-03627-3.
123. Kong JH, Yang L, Dessaud E, et al. Notch activity modulates the responsiveness of neural progenitors to sonic hedgehog signaling. *Dev Cell.* 2015;33(4):373-387. doi:10.1016/j.devcel.2015.03.005.
124. Ulasov IV, Nandi S, Dey M, Sonabend AM, Lesniak MS. Inhibition of Sonic hedgehog and Notch pathways enhances sensitivity of CD133(+) glioma stem cells to temozolomide therapy. *Mol Med.* 2011;17(1-2):103-112. doi:10.2119/molmed.2010.00062.
125. Dirkse A, Golebiewska A, Buder T, et al. Stem cell-associated heterogeneity in Glioblastoma results from intrinsic tumor plasticity shaped by the microenvironment. *Nat Commun.* 2019;10(1):1787. doi:10.1038/s41467-019-09853-z.
126. Iwadate Y. Plasticity in Glioma Stem Cell Phenotype and Its Therapeutic Implication. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 2018;58(2):61-70. doi:10.2176/nmc.ra.2017-0089.
127. Aldaz P, Martín-Martín N, Saenz-Antoñanzas A, et al. High SOX9 Maintains Glioma Stem Cell Activity through a Regulatory Loop Involving STAT3 and PML. *Int J Mol Sci.* 2022;23(9). doi:10.3390/ijms23094511.
128. Zhang X-W, Yan X-J, Zhou Z-R, et al. Arsenic trioxide controls the fate of the PML-RARalpha oncoprotein by directly binding PML. *Science.* 2010;328(5975):240-243. doi:10.1126/science.1183424.
129. Song S, Chen Q, Li Y, et al. Targeting cancer stem cells with a pan-BCL-2 inhibitor in preclinical and clinical settings in patients with gastroesophageal carcinoma. *Gut.* 2021;70(12):2238-2248. doi:10.1136/gutjnl-2020-321175.
130. Stevanovic M, Kovacevic-Grujicic N, Mojsin M, Milivojevic M, Drakulic D. SOX transcription factors and glioma stem cells: Choosing between stemness

- and differentiation. *World J Stem Cells*. 2021;13(10):1417-1445. doi:10.4252/wjsc.v13.i10.1417.
131. Lin Y, Guo L. GLI1 is involved in HIF-1 α -induced migration, invasion, and epithelial-mesenchymal transition in glioma cells. *Folia Histochem Cytobiol*. 2022;60(2):156-166. doi:10.5603/FHC.a2022.0014.
 132. Uchida H, Arita K, Yunoue S, et al. Role of sonic hedgehog signaling in migration of cell lines established from CD133-positive malignant glioma cells. *J Neurooncol*. 2011;104(3):697-704. doi:10.1007/s11060-011-0552-2.
 133. Chang L, Zhao D, Liu H-B, et al. Activation of sonic hedgehog signaling enhances cell migration and invasion by induction of matrix metalloproteinase-2 and -9 via the phosphoinositide-3 kinase/AKT signaling pathway in glioblastoma. *Mol Med Rep*. 2015;12(5):6702-6710. doi:10.3892/mmr.2015.4229.
 134. Gwak H-S, Park M-J, Park I-C, et al. Tetraarsenic oxide-induced inhibition of malignant glioma cell invasion in vitro via a decrease in matrix metalloproteinase secretion and protein kinase B phosphorylation. *J Neurosurg*. 2014;121(6):1483-1491. doi:10.3171/2014.8.JNS131991.
 135. Palle K, Mani C, Tripathi K, Athar M. Aberrant GLI1 Activation in DNA Damage Response, Carcinogenesis and Chemoresistance. *Cancers (Basel)*. 2015;7(4):2330-2351. doi:10.3390/cancers7040894.
 136. Vermezovic J, Adamowicz M, Santarpia L, et al. Notch is a direct negative regulator of the DNA-damage response. *Nat Struct Mol Biol*. 2015;22(5):417-424. doi:10.1038/nsmb.3013.
 137. Hu X, Ghisolfi L, Keates AC, et al. Induction of cancer cell stemness by chemotherapy. *Cell Cycle*. 2012;11(14):2691-2698. doi:10.4161/cc.21021.
 138. Ko C-H, Shen S-C, Yang L-Y, Lin C-W, Chen Y-C. Gossypol reduction of tumor growth through ROS-dependent mitochondria pathway in human colorectal carcinoma cells. *Int J Cancer*. 2007;121(8):1670-1679. doi:10.1002/ijc.22910.
 139. Lim CB, Prêle CM, Baltic S, et al. Mitochondria-derived reactive oxygen species drive GANT61-induced mesothelioma cell apoptosis. *Oncotarget*. 2015;6(3):1519-1530. doi:10.18632/oncotarget.2729.
 140. Woo SH, Park I-C, Park M-J, et al. Arsenic trioxide induces apoptosis through a reactive oxygen species-dependent pathway and loss of mitochondrial membrane potential in HeLa cells. *Int J Oncol*. 2002;21(1):57-63.
 141. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev*. 2014;94(3):909-950. doi:10.1152/physrev.00026.2013.
 142. Meyer N. *Molecular targeting of autophagy in glioblastoma: Dissertation Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften*.
 143. Kanzawa T, Zhang L, Xiao L, Germano IM, Kondo Y, Kondo S. Arsenic trioxide induces autophagic cell death in malignant glioma cells by upregulation of mitochondrial cell death protein BNIP3. *Oncogene*. 2005;24(6):980-991. doi:10.1038/sj.onc.1208095.
 144. Zhong G, Wan F, Wu S, et al. Arsenic or/and antimony induced mitophagy and apoptosis associated with metabolic abnormalities and oxidative stress in the liver of mice. *Sci Total Environ*. 2021;777:146082. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.146082.
 145. Hu Y, Li J, Lou B, et al. The Role of Reactive Oxygen Species in Arsenic Toxicity. *Biomolecules*. 2020;10(2). doi:10.3390/biom10020240.

146. Maji S, Samal SK, Pattanaik L, et al. Mcl-1 is an important therapeutic target for oral squamous cell carcinomas. *Oncotarget*. 2015;6(18):16623-16637. doi:10.18632/oncotarget.3932.
147. Tsujimoto Y, Shimizu S. Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett*. 2000;466(1):6-10. doi:10.1016/s0014-5793(99)01761-5.
148. Akao Y, Yamada H, Nakagawa Y. Arsenic-induced apoptosis in malignant cells in vitro. *Leuk Lymphoma*. 2000;37(1-2):53-63. doi:10.3109/10428190009057628.
149. Lan L, Appelman C, Smith AR, et al. Natural product (-)-gossypol inhibits colon cancer cell growth by targeting RNA-binding protein Musashi-1. *Mol Oncol*. 2015;9(7):1406-1420. doi:10.1016/j.molonc.2015.03.014.
150. Dahlrot RH, Hansen S, Herrstedt J, Schrøder HD, Hjelmberg J, Kristensen BW. Prognostic value of Musashi-1 in gliomas. *J Neurooncol*. 2013;115(3):453-461. doi:10.1007/s11060-013-1246-8.
151. Halatsch M-E, Kast RE, Karpel-Massler G, et al. A phase Ib/IIa trial of 9 repurposed drugs combined with temozolomide for the treatment of recurrent glioblastoma: CUSP9v3. *Neurooncol Adv*. 2021;3(1):vdab075. doi:10.1093/noajnl/vdab075.
152. Tsai C-Y, Ko H-J, Huang C-YF, et al. Ionizing Radiation Induces Resistant Glioblastoma Stem-Like Cells by Promoting Autophagy via the Wnt/ β -Catenin Pathway. *Life (Basel)*. 2021;11(5). doi:10.3390/life11050451.
153. Mannino M, Chalmers AJ. Radioresistance of glioma stem cells: intrinsic characteristic or property of the 'microenvironment-stem cell unit'? *Mol Oncol*. 2011;5(4):374-386. doi:10.1016/j.molonc.2011.05.001.
154. Fletcher-Sananikone E, Kanji S, Tomimatsu N, et al. Elimination of Radiation-Induced Senescence in the Brain Tumor Microenvironment Attenuates Glioblastoma Recurrence. *Cancer Res*. 2021;81(23):5935-5947. doi:10.1158/0008-5472.CAN-21-0752.
155. Thomas JG, Parker Kerrigan BC, Hossain A, et al. Ionizing radiation augments glioma tropism of mesenchymal stem cells. *J Neurosurg*. 2018;128(1):287-295. doi:10.3171/2016.9.JNS16278.
156. Lee SY, Jeong EK, Ju MK, et al. Induction of metastasis, cancer stem cell phenotype, and oncogenic metabolism in cancer cells by ionizing radiation. *Mol Cancer*. 2017;16(1):10. doi:10.1186/s12943-016-0577-4.
157. Hauge S, Eek Mariampillai A, Rødland GE, Bay LTE, Landsverk HB, Syljuåsen RG. Expanding roles of cell cycle checkpoint inhibitors in radiation oncology. *Int J Radiat Biol*. 2021:1-10. doi:10.1080/09553002.2021.1913529.
158. Chiang M-F, Chen H-H, Chi C-W, et al. Modulation of Sonic hedgehog signaling and WW domain containing oxidoreductase WOX1 expression enhances radiosensitivity of human glioblastoma cells. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2015;240(3):392-399. doi:10.1177/1535370214565989.
159. Chen Y, Li D, Liu H, et al. Notch-1 signaling facilitates survivin expression in human non-small cell lung cancer cells. *Cancer Biol Ther*. 2011;11(1):14-21. doi:10.4161/cbt.11.1.13730.
160. Vlčková K, Ondrušová L, Vachtenheim J, et al. Survivin, a novel target of the Hedgehog/GLI signaling pathway in human tumor cells. *Cell Death Dis*. 2016;7(1):e2048. doi:10.1038/cddis.2015.389.
161. Zhang S, Zhang C, Song Y, Zhang J, Xu J. Prognostic role of survivin in patients with glioma. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(17):e0571. doi:10.1097/MD.0000000000010571.

162. Li J, Han Y, Zhou D, et al. Downregulation of Survivin Gene Expression Affects Ionizing Radiation Resistance of Human T98 Glioma Cells. *Cell Mol Neurobiol.* 2018;38(4):861-868. doi:10.1007/s10571-017-0560-7.
163. Chakravarti A, Zhai GG, Zhang M, et al. Survivin enhances radiation resistance in primary human glioblastoma cells via caspase-independent mechanisms. *Oncogene.* 2004;23(45):7494-7506. doi:10.1038/sj.onc.1208049.
164. Keshmiri-Neghab H, Goliaei B, Nikoofar A. Gossypol enhances radiation induced autophagy in glioblastoma multiforme. *Gen Physiol Biophys.* 2014;33(4):433-442. doi:10.4149/gpb_2014017.
165. Xu L, Yang D, Wang S, et al. (-)-Gossypol enhances response to radiation therapy and results in tumor regression of human prostate cancer. *Mol Cancer Ther.* 2005;4(2):197-205.
166. Moretti L, Li B, Kim KW, Chen H, Lu B. AT-101, a pan-Bcl-2 inhibitor, leads to radiosensitization of non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2010;5(5):680-687. doi:10.1097/JTO.0b013e3181d6e08e.
167. Zerp SF, Stoter TR, Hoebbers FJP, et al. Targeting anti-apoptotic Bcl-2 by AT-101 to increase radiation efficacy: data from in vitro and clinical pharmacokinetic studies in head and neck cancer. *Radiat Oncol.* 2015;10:158. doi:10.1186/s13014-015-0474-9.
168. Berglar I, Hehlgans S, Wehle A, et al. CHRDL1 Regulates Stemness in Glioma Stem-like Cells. *Cells.* 2022;11(23):3917. doi:10.3390/cells11233917.
169. Akkermann R, Azim K. Insights into ligand expression heterogeneity across multiple cell types in the adult forebrain that regulates neural stem cell behavior. *Neural Regen Res.* 2019;14(8):1369-1371. doi:10.4103/1673-5374.251304.
170. Gao W-L, Zhang S-Q, Zhang H, Wan B, Yin Z-S. Chordin-like protein 1 promotes neuronal differentiation by inhibiting bone morphogenetic protein-4 in neural stem cells. *Mol Med Rep.* 2013;7(4):1143-1148. doi:10.3892/mmr.2013.1310.
171. Panchision DM, McKay RDG. The control of neural stem cells by morphogenic signals. *Curr Opin Genet Dev.* 2002;12(4):478-487. doi:10.1016/s0959-437x(02)00329-5.
172. Cyr-Depauw C, Northey JJ, Tabariès S, et al. Chordin-Like 1 Suppresses Bone Morphogenetic Protein 4-Induced Breast Cancer Cell Migration and Invasion. *Mol Cell Biol.* 2016;36(10):1509-1525. doi:10.1128/MCB.00600-15.
173. Liu S, Tian Z, Yin F, et al. Expression and functional roles of Smad1 and BMPR-IB in glioma development. *Cancer Investigation.* 2009;27(7):734-740. doi:10.1080/07357900802620786.
174. Liu S, Yin F, Zhao M, et al. The homing and inhibiting effects of hNSCs-BMP4 on human glioma stem cells. *Oncotarget.* 2016;7(14):17920-17931. doi:10.18632/oncotarget.7472.
175. Sun Y, Yan K, Wang Y, et al. Context-dependent tumor-suppressive BMP signaling in diffuse intrinsic pontine glioma regulates stemness through epigenetic regulation of CXXC5. *Nat Cancer.* 2022;3(9):1105-1122. doi:10.1038/s43018-022-00408-8.
176. Nakayama N, Han CE, Scully S, et al. A novel chordin-like protein inhibitor for bone morphogenetic proteins expressed preferentially in mesenchymal cell lineages. *Dev Biol.* 2001;232(2):372-387. doi:10.1006/dbio.2001.0200.

177. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016;131(6):803-820. doi:10.1007/s00401-016-1545-1.

7. Appendix

7.1 Liste der Abkürzungen

ABCB1	ATP binding cassette subfamily B member 1
ADAM	A disintegrin and metalloproteinase
AKT1	AKT serine/threonine kinase 1
AMBRA1	Autophagy and beclin 1 regulator 1
AMPK	Protein kinase AMP-activated
ANOVA	Analysis of variance
AP1	Aktivator-Protein-1
APC	Astrocyte progenitor cell
APL	Akute Promyelozytenleukämie
ATG	Autophagy-related gene
ATM	Ataxia-telangiectasia mutated
ATO	Arsentrioxid
BAD	BCL2 associated agonist of cell death
BAG3	BCL2 associated athanogene 3
BAK1	BCL2 antagonist/killer 1
BAX	BCL2 associated X
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
BECN1	Beclin 1
BID	BH3 interacting domain death agonist
BMI1	Polycomb Gruppe RING finger protein 4
BMP	Bone morphogenetic protein
BNIP3	BCL2 interacting protein 3
BOC	Brother of CDO
BSA	Bovines Serumalbumin
CBP	CREB-Binding Protein
CDK8	Cyclin dependent kinase 8
CDO	Cell adhesion molecule-related/ down-regulated oncogenes
CHK1	Checkpoint-Kinase 1
CHRDL1	Chordin-like 1
CI	Combination Index

CSC	Tumorstammzelle
Da	Dalton
DDR	DNA Damage Response
DFCP1	Double FYVE-containing protein 1
DII1	Delta-like Protein 1
DLX2	Homöoboxprotein DLX-2
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Balanced Salt Solution
DR5	Todesrezeptor 5
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ERK	Extracellular-signal regulated kinases
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FADD	FAS-assoziierte Todesdomänenprotein
FAS	tumor necrosis factor receptor superfamily member 6
FBS	Fötales Rinderserum
FBW7	F-box and WD repeat domain-containing 7
FGF	Fibroblast Growth Factor
FOX	Forkhead-Box-Protein
GalC	Galactocerebrosidase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GB	Glioblastom
GCN5	General Control Non-repressed 5 protein
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GFP	Green fluorescent protein
GLI1	Glioma-associated oncogene 1
GO-BP	Gene Ontology Biology Processes
GSC	Gliomstammzelle
HES	Hairy and enhancer of split
HEY1	HES Related with YRPW Motiv-Protein 1
HIF1	Hypoxia-inducible factor-1

HMOX1	Heme oxygenase 1
ICD	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten
ID-1	DNA-binding protein inhibitor ID-1
IDH1	Isocitratdehydrogenase
IGF1	Insulin-like growth factor 1
JAK	C-Jun-N-terminale Kinasen
KCL	Kaliumchlorid
LC3	Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
LDA	Limiting Dilution Assay
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MCL1	Induced Myeloid Leukemia Cell Differentiation Protein
MDR1	Multidrug-Resistance-Protein 1
MGMT	O6-methylguanine methyltransferase
mTORC1	Mammalian target of rapamycin complex 1
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NaCl	Natriumchlorid
NANOG	Homeobox protein NANOG
NaOH	Natriumhydroxid
NBR1	Neighbor of BRCA1 gene 1 protein
NDP52	Calcium binding and coiled-coil domain 2
NEXT	Notch extracellular truncation
NGN	Neurogenin
NICD	Notch intracellular domain
NIFA	Nitrogen Fixation Specific Regulatory Protein
NKX	Homeobox Protein Nkx
NSC	Neurale Stammzelle
OASIS	Old astrocyte specifically induced substance
OCT4	Octamer-binding transcription factor
OLIG2	Oligodendrocyte transcription factor
OPC	Oligodendrocyte progenitor cell
PAI1	Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1
PAX	Paired-Box-Protein
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung

PCAF	P300/CBP-associated factor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phosphatidylethanolamine
PFS	Progressionsfreies Überleben
PI	Phosphatidylinositol
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKA	Protein kinase A
PML	Promyelocytic Leukemia Protein
PRX2	Peroxiredoxin-2
RAD51	DNA repair protein RAD51 homolog 1
RG	Glia-Progenitorzellen
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RUNX2	Runt-related transcription factor 2
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SGZ	Subglanduläre Zone
siRNA	Small interfering RNA
SKIP	Ski-interacting Protein
SMAD	Suppressor of Mothers against Decapentaplegic
SMO	Smoothened
SNARE	Soluble NSF attachment receptor
SOX	SRY-box transcription factor
STAT	Signal transducer and activator of transcription
Sufu	Suppressor des fusionierten Homologs Protein
SVZ	Subventrikuläre Zone
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF	Transforming Growth Factor
TIEG	TGF-beta inducible early gene
TMZ	Temozolomide
TNF	Tumornekrosefaktor
TTF	Tumor treating fields
ULK1	Unc-51 like autophagy activating kinase 1

VMP1	Vacuole membrane protein 1
WHO	Weltgesundheitsordnung
WIPI	WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein
ZEB	Zinc-finger E-box binding homeobox
ZNF8	Zinkfinger Protein 8
ZNS	Zentrales Nervensystem

7.2 Abbildungsverzeichnis

1.1. Illustration der Gliogenese aus neuronalen Progenitorzellen und der involvierten Signalwege	- 10 -
1.2. Funktionelle Eigenschaften von Gliom-initiiierenden Zellen	- 14 -
1.3. Kanonischer Notch-Signalweg und seine Komponenten.....	- 19 -
1.4. Kanonischer Hedgehog-Signalweg in inaktivem und aktivem Zustand .	- 22 -
1.5. Überblick des BMP-Signalings	- 25 -
1.6. Autophagie-Maschinerie und Ausbildung des Autolysosoms	- 28 -
2.1.1. Analyse der Zellviabilität mittels MTT-Assay	- 64 -
2.1.2. Annexin-V/PI-Staining von GS-5 Zellen.....	- 65 -
2.1.3. Analyse des Zelltods von GS-5 Zellen mittels FACS.....	- 66 -
2.1.4. Analyse des Zelltods von MZ-54 Zellen mittels FACS.....	- 67 -
2.1.5. Tumorwachstum von GS-5 Zellen	- 70 -
2.1.6. Reduktion von GSC-Tumorwachstum in organotypischer Gewebekultur	- 71 -
2.2. Vergleich der Combination-Indizes für GS-5 und GS-5GFP-Luc.....	- 73 -
2.3.1. Stammzelldepletion in GS-5 Zellen durch Arsentrioxid und (-)-Gossypol.....	- 75 -
2.3.2. Stammzelldepletion in GS-8 Zellen durch Arsentrioxid und (-)-Gossypol.....	- 76 -
2.3.3. Stammzelldepletion in 17/02 Zellen durch Arsentrioxid und (-)-Gossypol.....	- 77 -
2.4.1. Proteinanalysen von stammzell- und Differenzierungs-assoziierten Proteinen.....	- 78 -
2.4.2. Reduktion der Expression von stammzell- und Differenzierungs-assoziierten Proteinen durch ATO und AT-101	- 79 -
2.4.3. Proteinanalysen von Autophagie-assoziierten Proteinen und Akt	- 80 -
2.4.4. Analyse stammzellassoziierter Markerproteine in GS-5-Zellen	- 81 -
2.4.5. Epifluoreszenzmikroskopie von GS-5 Zellen nach Färbung für SOX9 und SOX2	- 82 -
2.4.6. Expressionsanalyse von GS-8 Zellen.....	- 84 -
2.5.1. Reduktion der Migration in GS-3 Zellen.....	- 87 -

2.5.2. Migrationskapazität von GS-3 Zellen.....	- 87 -
2.5.3. Reduktion der Migration in GS-5 Zellen.....	- 88 -
2.5.4. Migrationskapazität von GS-5 Zellen.....	- 88 -
2.5.5. Reduktion der Migration in GS-8 Zellen.....	- 89 -
2.5.6. Migrationskapazität von GS-8 Zellen.....	- 89 -
2.5.7. Reduktion der Migration in 17/02 Zellen.....	- 90 -
2.5.8. Migrationskapazität von 17/02 Zellen.....	- 90 -
2.6.1. Strahlensensitivierung in GS-5 Zellen durch ATO und AT-101	- 94 -
2.6.2. Übersicht der Stammzellfrequenz (1/x) in GS-5 Zellen unter ATO und AT-101.....	- 94 -
2.6.3. Strahlensensitivierung in 17/02 Zellen durch ATO und AT-101.....	- 96 -
2.6.4. Übersicht der Stammzellfrequenz (1/x) in 17/02 Zellen unter ATO und AT-101.....	- 97 -
2.7.1. Reduktion von CHRDL1 durch Behandlung mit ATO	- 98 -
2.7.2. Reduktion von stammzellassozierten Markerproteinen nach CHRDL1-Knockdown	- 99 -
3.1. SOX2 – zentraler Regulator eines Stammzellzustandes	- 105 -
3.2 Zusammenfassende Darstellung der hypothetischen Wirkmechanismen von ATO, GANT61 und AT-101 in GSC	- 112 -
3.3. Induktion eines stammzellartigen Zustandes durch Strahlung	- 114 -
3.4 Zellschicksal von NSC in Abhängigkeit von Hh- und BMP-Signaling ...	- 118 -

7.3 Tabellenverzeichnis

1.1.1. Zellen.....	- 39 -
1.1.2. Kulturmedium	- 39 -
1.1.3. Bakterien	- 40 -
1.1.4 Medium und Agar für Bakterien.....	- 40 -
1.2.1. Chemikalien zur Behandlung der Zellen.....	- 40 -
1.2.2. Liste aller Chemikalien, Zusätze und Enzyme der Experimente.....	- 41 -
1.2.3. Fluoreszenz-Farbstoffe der Durchflusszytometrie	- 42 -
1.2.4. Puffer der Durchflusszytometrie	- 42 -
1.2.5. Puffer für Western-Blotting.	- 43 -
1.3. Kommerzielle Kits.....	- 43 -
1.4.1. Primäre Antikörper für Western-Blotting.....	- 44 -
1.4.2. Sekundäre Antikörper für Western-Blotting	- 44 -
1.4.3. Primäre Antikörper für die Immunfluoreszenz.	- 44 -
1.4.4. Sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenz.....	- 45 -
1.4.5. Primer der Taqman-basierten qRT-PCR	- 45 -
1.5. Plasmide zur Transduktion.....	- 46 -
1.6. Laborausstattung.....	- 46 -
1.7. Software	- 48 -

Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Modulation von Stammzellcharakteristika in Gliom-initiiierenden Zellen durch GANT61 oder Arsen trioxid und (-)-Gossypol“

am Zentrum der Neurologie und Neurochirurgie, Klinik der Neurochirurgie, Universitätsklinikum Frankfurt, Experimentelle Neurochirurgie unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Donat Kögel mit Unterstützung durch Dr. Benedikt Linder ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

„Linder B, Wehle A, Hehlhans S, Bonn F, Dikic I, Rödel F, Seifert V, Kögel D. Arsenic Trioxide and (-)-Gossypol Synergistically Target Glioma Stem-Like Cells via Inhibition of Hedgehog and Notch Signaling. *Cancers (Basel)*. 11(3):350. 2019.“

„Berglar I, Hehlhans S, Wehle A, Roth C, Herold-Mende C, Rödel F, Kögel D, Linder B. *CHRD1 Regulates Stemness in Glioma Stem-like Cells. Cells*. 11(23):3917. 2022.“

(Ort, Datum)

(Unterschrift)

Danksagung

Die vorliegende Dissertation ist untrennbar mit einem wesentlichen Maß an Dankbarkeit verbunden. Dankbarkeit insbesondere hinsichtlich all Jenen, die durch ausgezeichnete Betreuung, kritische Auseinandersetzung und kluge Anregungen unentbehrlich waren. Deshalb gilt entsprechender Dank Prof. Dr. Donat Kögel und Dr. Benedikt Linder. Er gilt darüber hinaus allen weiteren Mitgliedern der Experimentellen Neurochirurgie.

Untrennbar mit Dank verbunden ist meine Person des Weiteren, wie Sie untrennbar mit den Menschen selbst, denen dieser Dank gilt, verbunden ist - Einer geliebten und liebenden Familie.

Diese Verbindung, dieser Dank betrifft in maßgeblicher Weise meine Eltern und das von Ihnen vermittelte Gedankengut, welches ich ehre und schätze. Er betrifft meine Geschwister und den unendlichen Rückhalt, der durch sie dargeboten wird. Er betrifft meine Großeltern.

In Erinnerung unaufdringlichster Genügsamkeit danke ich Peter Wehle.