

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

betreut am
Zentrum der Neurologie und Neurochirurgie
Klinik für Neurologie
Dr. Senckenbergisches Institut für Neuroonkologie
Leiter: Prof. Dr. Joachim Steinbach

**Der mTORC1-Regulator DDIT4 als Angriffspunkt neuer Strategien zur
Überwindung von Chemotherapie- und Hypoxieresistenz maligner Gliome.**

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

vorgelegt von
Martha Foltyn

aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2019

Dekan:	Prof. Dr. Josef Pfeilschifter
Referent/in:	Prof. Dr. Joachim Steinbach
Korreferent/in:	Titel Vorname Nachname
[ggf. 2. Korreferent/in:	Titel Vorname Nachname] nur bei summa cum laude
Tag der mündlichen Prüfung:	TT.MM.JJJJ

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	- 4 -
2	Summary	- 6 -
3	Abkürzungsverzeichnis.....	- 8 -
4	Übergreifende Zusammenfassung	- 9 -
4.1	Einleitung	- 9 -
4.2	Ergebnisse	- 12 -
4.3	Diskussion.....	- 16 -
5	Übersicht der zur Veröffentlichung angenommenen Publikationen	- 21 -
6	Publikation	- 22 -
7	Darstellung des eigenen Anteils	- 33 -
8	Literatur	- 34 -
9	Anhang	- 41 -
10	Schriftliche Erklärung.....	- 46 -

1 Zusammenfassung

Glioblastome (GB) sind die häufigsten bösartigen primären Hirntumore im Erwachsenenalter. Das Therapiekonzept bei Erstdiagnose besteht aus einer maximalen Tumorresektion, gefolgt von einer Strahlentherapie mit konkomitanter und anschließend adjuvanter Chemotherapie mit dem Alkylanz Temozolomid in Zyklusform. Zusätzlich zur adjuvanten Chemotherapie werden inzwischen für supratentorielle GBs auch Tumortherapiefelder empfohlen, die über elektromagnetische Wechselfelder die Tumorzellteilung hemmen sollen. Trotz multimodaler Therapiekonzepte und Fortschritte im Verständnis der GB-Biologie ist die Prognose der Patienten bei einer 5-Jahresüberlebensrate von unter 5% sehr ernüchternd.

Eine mögliche Ursache für den ausbleibenden Erfolg neuer GB-Medikamente könnten die besonderen metabolischen Bedingungen des Tumormikromilieus sein. Unter diesen kann eine therapeutische zielgerichtete Inhibition bestimmter Kinasen, wie des Epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) oder mammalian Target of Rapamycin (mTOR), unerwünschte Tumorzell-protective Effekte entfalten, da bereits gezeigt werden konnte, dass sich Tumorzellen durch Suppression der mTORC1 abhängigen Signalkaskade an Energiemangelbedingungen, wie sie im Tumormikromilieu zu finden sind, anpassen, um zu überleben.

Ziel dieses Projektes war es den physiologischen mTORC1-Inhibitor DNA-damage-inducible transcript 4 (DDIT4) als möglichen intrinsischen Resistenzmechanismus gegenüber Strahlen- und Chemotherapie in GBs zu untersuchen. In verschiedenen GB-Zelllinien konnte eine Induktion von DDIT4 teilweise durch Bestrahlung, Temozolomid und generell durch die im Tumormikromilieu vorherrschende Hypoxie nachgewiesen werden. Dies gelang sowohl auf transkriptioneller Ebene als auch auf Proteinniveau. Zur Beurteilung der Relevanz dieses zellulären Anpassungsmechanismus wurden Zellen mit DDIT4 Gensuppression generiert und charakterisiert. Hier zeigte sich in klonalen Überlebensanalysen eine gesteigerte Sensibilität der Zellen mit verminderter

DDIT4 Expression gegenüber Temozolomid und Strahlentherapie. Darüber hinaus waren diese Zellen gegenüber Hypoxie-induziertem Zelltod sensibilisiert. Umgekehrt führte eine stabile oder Doxycyclin- induzierte DDIT4 Überexpression zu einer signifikanten Resistenz gegenüber Strahlentherapie, Temozolomid und Hypoxie-induziertem Zelltod.

Zusammenfassend beschreiben unsere Ergebnisse DDIT4 als Mediator von Therapieresistenz gegenüber den etablierten Komponenten der GB-Erstlinientherapie und zudem als Anpassungsmechanismus an das hypoxische Tumormikromilieu. DDIT4 stellt somit einen möglichen Angriffspunkt für eine therapeutische Inhibition beim GB dar.

2 Summary

Glioblastomas (GB) are the most common malignant primary brain tumors in adults. The therapeutic concept at initial diagnosis consists of a maximum tumor resection followed by radiotherapy with concomitant and later adjuvant chemotherapy administered in treatment cycles with the alkylating agent temozolomide. In addition to adjuvant chemotherapy tumor treating fields, which aim to inhibit tumor cell division via alternating electromagnetic fields, are now also recommended for supratentorial GBs. Despite multimodal therapy concepts and advances in the understanding of GB-biology, the prognosis of patients with a 5-year survival rate of less than 5% is very sobering.

The special metabolic conditions of the tumor microenvironment could represent one possible cause for the failure of some new GB drugs in clinical trials. Under these conditions a therapeutic targeted inhibition of kinases such as the epidermal growth factor receptor (EGFR) or mammalian target of rapamycin (mTOR) can exert tumor cell-protective effects. Accordingly, it has already been shown that tumor cells adapt to prevailing energy deficiency of the tumor microenvironment, by suppressing the mTORC1-dependent signaling cascade.

The aim of this project was to investigate the physiological mTORC1 inhibitor DNA-damage-inducible transcript 4 (DDIT4) as a possible cell intrinsic resistance mechanism against radio- and chemotherapy in GBs. In different GB cell lines irradiation, temozolomide and the typical hypoxia of the tumor microenvironment induced DDIT4 to some degree. This was detectable both on the transcriptional as well as on the protein level. The relevance of this cellular adaptation mechanism was further investigated using cells with DDIT4 gene suppression. Clonal survival analyses showed that cells with reduced DDIT4 levels were more sensitive to temozolomide and radiotherapy. Furthermore, these cells were sensitized to hypoxia-induced cell death. Conversely, stable and doxycycline-inducible DDIT4 overexpression of DDIT4 mediated significant resistance to radiotherapy and temozolomide as well as to hypoxia-induced cell death.

In summary, our results describe DDIT4 as a mediator of therapy resistance against established components of GB first-line therapy as well as an adaptation mechanism to the hypoxic tumor microenvironment. Thus, DDIT4 represents a potential target for therapeutic inhibition in GB.

3 Abkürzungsverzeichnis

4E-BP1	Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
CCNU	Chlorethyl-Cyclohexyl-Nitroso-Urea
CMV	Cytomegalievirus
DDIT4	DNA-damage-inducible transcript 4
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
eIF4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E
GB	Glioblastom
Gy	Gray
HA	Hämagglutinin
LDH	Lactatdehydrogenase
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
mTORC1	mammalian Target of Rapamycin complex 1
N2M2	NCT Neuro MASTER Match
NSCLC	non small cell lung carcinoma
RFP	Red Fluorescent Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RPS6	Ribosomal protein S6
rtTA	Reverse tetracycline-controlled transactivator
S6K1	Ribosomal protein S6 kinase beta-1
SDHA	Succinate Dehydrogenase Complex Flavoprotein Subunit A
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TMZ	Temozolomid
TSC1/2	Tuberöse Sklerose Komplex 1/2
tTA	Tetracycline-controlled transactivator
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organization

4 Übergreifende Zusammenfassung

4.1 Einleitung

Glioblastome (GB) sind mit 47,7% die häufigsten malignen Hirntumore und für 14,7% aller primären Hirntumore des Erwachsenen verantwortlich (1). Die Patienten sind bei Diagnosestellung im Durchschnitt 64 Jahre alt, wobei Männer 1,6-mal häufiger als Frauen betroffen sind (2).

Die Erstlinientherapie besteht, abhängig von Tumorlage und Allgemeinzustand der Patienten, aus einer maximalen Resektion sowie adjuvanter fraktionierter Strahlentherapie mit 2 Gray (Gy) Einzeldosis an 5 Tagen der Woche, über einen Zeitraum von ca. 6 Wochen, bis zu einer Gesamtdosis von 60 Gy. Konkomitant erfolgt täglich eine Chemotherapie mit dem Alkylanz Temozolomid (TMZ). An die Bestrahlung schließt sich, nach 4 Wochen Therapiepause, eine meist 6 Zyklen andauernde Erhaltungstherapie mit TMZ im 5/28 Zyklusschema an, wobei nur an 5 Tagen des 28 Tage langen Zyklus die Einnahme von TMZ erfolgt (3). Des Weiteren wird für supratentorielle GBs der Einsatz von Tumortherapiefeldern, die über elektromagnetische Wechselfelder die Tumorzellteilung hemmen, konkomitant zur Erhaltungstherapie mit TMZ empfohlen. In klinischen Studien konnte hierdurch sowohl eine Verlängerung des progressionsfreien- als auch Gesamtüberlebens gezeigt werden (4).

Die 5-Jahresüberlebensrate von GB-Patienten liegt unter 5% (5) und somit deutlich unter der vieler anderer bösartiger Krebsarten wie z.B. des Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (NSCLC), welches bei Patienten eine 5-Jahresüberlebensrate von 16% aufweist (6).

Einer der Gründe für diese schlechte Prognose ist die häufig schon primär bestehende und regelmäßig sekundär entstehende Therapieresistenz gegenüber TMZ, welches durch Alkylierung primär der O6 Position von Guaninen zytotoxisch wirkt. Dabei kommt es während der Desoxyribonukleinsäure (DNS)-Replikation zu einer Basenfehlpaarung des alkylierten Guanins mit Thymin. Das dadurch aktivierte DNS-Basenfehlpaarungsreperatur-System („DNA Mismatch Repair

System“) schneidet jedoch nur das fehlgepaarte Thymin im Tochterstrang heraus, während das alkylierte Guanin im Mutterstrang verbleibt. Vergebliche folgende Zyklen der Reinsertion und Exzision von Thymin führen zu anhaltenden DNS-Strangbrüchen, die schließlich zu einem Zusammenbruch der Replikationsgabel führen können (7). Es wird ein G2/M-Zellzyklus-Stopp ausgelöst, der letztlich in die Apoptose münden kann (8).

Die O6-Methylguanin-DNS-Methyltransferase (MGMT) ist ein DNS-Reparaturenzym, welches Alkylgruppen von der Position O6 des Guanins der DNS entfernt (9). Reguliert wird die Expression dieses Proteins in GBs im Wesentlichen über die Promotor Methylierung des entsprechenden Gens. Eine Hypermethylierung des Promotors gilt als einer der wichtigsten Mechanismen zur Reduzierung der Proteinexpression (10). Über die Hälfte aller GB-Patienten weist jedoch keine Promotor Methylierung des *MGMT*-Gens auf. Infolge kommt es zu einer relevanten Expressionsrate des Reparaturproteins und damit einhergehender primärer Resistenz gegenüber TMZ (11). Aber auch Tumore, die zu Beginn einer Therapie sensitiv auf TMZ reagiert haben, entwickeln oft sekundäre Resistenzen im Verlauf. Unter dem Selektionsdruck eines Chemotherapeutikums ist die Entwicklung resistenter Tumorzellklone durch Mutation und/oder epigenetische Veränderungen ein häufiges Phänomen (8, 12).

Die Therapiemöglichkeiten für GB-Rezidiv Tumore sind ebenfalls begrenzt und umfassen, falls möglich, eine Re-Resektion sowie häufig den Einsatz der lipophilen und somit gut die Blut-Hirn-Schranke durchdringenden Nitrosoharnstoffe wie z.B. Lomustin (CCNU) (13). Eine Verlängerung des Gesamtüberlebens durch Verabreichung des humanisierten monoklonalen Antikörpers Bevacizumab, welcher den Gefäßwachstumsfaktor Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) bindet, konnte in einer Phase-III Studie nicht nachgewiesen werden (14).

Im Laufe der letzten Jahre konnte ein enormer Wissenszuwachs über die GB-Biologie und Genetik generiert werden. So ist inzwischen bekannt, dass die Signaltransduktion ausgehend von dem Epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor

(EGFR) die am häufigsten veränderte Signalkaskade im GB ist. Veränderungen der Rezeptortyrosinkinase-Ras-PI 3-Kinase-AKT- Signalkaskade sind bei annähernd 90% der GBs zu finden (15, 16). Dieser Signalweg spielt eine zentrale Rolle bei der Regulierung verschiedener biologischer Vorgänge wie Proliferation, Apoptose oder des zellulären Stoffwechsels. Ein wichtiger Bestandteil dieses Signalweges ist der Multiproteinkomplex mammalian Target of Rapamycin complex 1 (mTORC1). mTORC1 ist ein bedeutender Wachstums- und Proliferationsregulator (17), der den translationalen Regulator eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) binding protein 1 (4E-BP1) und die S6 kinase 1 (S6K1) phosphoryliert, die wieder ihrerseits das ribosomale Protein S6 (RPS6) phosphoryliert und somit aktiviert (18).

Bei der autosomal-dominant vererbten Erkrankung Tuberöse Sklerose kommt es durch Genmutationen des negativen mTORC1-Regulators Tuberöse Sklerose Komplex 1/2 (TSC1/2) zu einer pathologisch gesteigerten mTORC1 Aktivität. Neben verschiedenen weiteren Symptomen kommt es bei betroffenen Patienten häufig zur Entstehung subependymaler Riesenzellastrozytome (19).

Aufgrund seiner zentralen Rolle in wichtigen regulatorischen Netzwerken und der häufigen Aktivierung beim GB gilt mTORC1 auch als vielversprechender therapeutischer Angriffspunkt. Der Einsatz von mTOR-Inhibitoren wie Everolimus oder Temsirolimus bei Glioblastomen zeigte in klinischen Studien jedoch bisher keinen Vorteil gegenüber gängigen Therapieregimen (20–22). Bemerkenswert ist, dass in der größten bislang publizierten Studie, RTOG 0913, die Hinzunahme von Everolimus in das Therapieschema sogar zu einer Verringerung des Gesamtüberlebens führte (22).

Eine mögliche Ursache für den ausbleibenden Erfolg neuartiger GB-Medikamente könnte in der mangelnden Berücksichtigung metabolischer Gegebenheiten des *in vivo* Tumormikromilieus bei deren Entwicklung liegen. In Vorarbeiten des Labors konnte gezeigt werden, dass sowohl eine Suppression der mTORC1 abhängigen Signalkaskade durch Energiemangelbedingungen und Hypoxie, wie sie im Tumormikromilieu zu finden sind, als auch pharmakologische Hemmung von EGFR und mTORC1 metabolische Veränderungen hervorrufen, die zur Protektion

von Tumorzellen im hypoxischen Mikromilieu führen (23, 24). Eine Inhibition dieses Anpassungsmechanismus durch eine konstitutive Hyperaktivität von mTORC1, beispielsweise durch Inhibition des TSC1/2 Komplexes, wiederum sensibilisierte Gliomzellen gegenüber Hypoxie-induziertem Zelltod (25).

DNA-damage-inducible transcript 4 (DDIT4) wurde 2002 zum ersten Mal und unabhängig voneinander von zwei Arbeitsgruppen beschrieben (26, 27). Das *DDIT4* Gen wird ubiquitär in menschlichen Geweben exprimiert und seine Expression wird durch Hypoxie (26), DNS-Schäden (27), Energie-Stress (28) und Dexamethason (29) induziert. Außerdem konnte aufgezeigt werden, dass DDIT4 seinerseits mTORC1 inhibiert (30), indem es die Inhibierung des vorgeschalteten TSC1/2 Komplexes verringert, welcher in seiner aktiven Form ein negativer Regulator von mTORC1 ist (31).

Daher war es Ziel dieses Projektes, den physiologischen mTORC1-Inhibitor DDIT4 als möglichen Vermittler von metabolischer Zellanpassung sowie seine Rolle als möglicher Resistenzmechanismus gegenüber Strahlen- und Chemotherapie in GBs zu untersuchen.

4.2 Ergebnisse

Hypoxie, Temozolomid und Bestrahlung induzieren DDIT4 in Glioblastom-Zellen

Für die Versuche wurden humane GB-Zelllinien (LNT-229, G55 und LN-308) verwendet. Eine Inkubation dieser Zellen für 24 Stunden unter hypoxischen Bedingungen (0,1% O₂), wie man sie auch im Tumormikromilieu findet (32, 33), führte zu einer Steigerung der DDIT4 Transkription und Proteinmenge. Einhergehend mit der inhibitorischen Rolle auf mTORC1 zeigte sich eine verminderte Phosphorylierung von RPS6, das durch die direkt von mTOR abhängige S6K1 phosphoryliert wird (Fig. 1a*).

* Im Folgenden beziehen sich die Angaben auf die Abbildungen in der Publikation.

Basierend auf den Ergebnissen von Ellisen et al., dass eine Alkylierung der DNS in humanen Fibroblasten zu einer DDIT4 Induktion, unter anderem vermittelt durch das Protein p53, führt (27), untersuchten wir den Einfluss von TMZ auf die DDIT4 Expression in GB-Zellen. Auch in GB-Zellen zeigte sich eine Induktion der DDIT4 Transkription und Proteinmenge mit korrespondierender Inhibition der Phosphorylierung von RPS6 in LNT-229 und G55 Zellen (Fig. 1b). Ein entsprechender Effekt war in LN-308 Zellen jedoch nicht nachweisbar, was in Anbetracht der fehlenden p53 Expression in dieser Zelllinie (34) zu erwarten war (Fig. 1b). Bestrahlung mit 10 Gy führte nur in LNT-229 Zellen zu einer Induktion von DDIT4, jedoch nicht in G55 und LN-308 Zellen (Fig. 1c). Interessanterweise induzierte auch Dexamethason, welches häufig zur Therapie eines vasogenen Ödems bei GB-Patienten eingesetzt wird, in LNT-229 und LN-308 Zellen eine DDIT4 Expression (Supplementary Fig. 1H).

Effekte einer DDIT4 Gensuppression auf die Sensibilität von Glioblastom-Zellen gegenüber Temozolomid- und Strahlentherapie

Um die Effekte einer DDIT4 Gensuppression zu untersuchen, wurden stabile Subzelllinien mit einer DDIT4 Gensuppression hergestellt. Hierfür wurden LNT-229 und G55 Zellen, mit dem Plasmid pSuper Puro mit einer non-targeting shRNA (pSuper) als Kontrolle oder einer gegen DDIT4 gerichteten Sequenz (pSuper DDIT4sh) transfiziert. Die Gensuppression von DDIT4 konnte in den entsprechenden Subzelllinien sowohl auf RNA als auch Proteinniveau bestätigt werden (Fig. 2a und b). In Untersuchungen zum klonalen Überleben zeigte sich, in beiden Zelllinien, eine gesteigerte Sensibilität von Zellen mit supprimiertem DDIT4 (DDIT4sh) gegenüber TMZ mit einem geringeren Anteil überlebender Klone (Fig. 3a). Zusätzlich wurden LNT-229 und G55 DDIT4sh Zellen hinsichtlich ihres klonalen Überlebens unter Strahlentherapie untersucht. Auch hier zeigte sich eine gesteigerte Empfindlichkeit der Zellen unter DDIT4 Gensuppression mit einem

geringeren Anteil überlebender Klone nach Bestrahlung. Dieser Effekt war besonders bei einer Dosis von 2 Gy erkennbar (Fig. 3b).

Etablierung eines Tetracyclin-regulierten DDIT4 Systems in Glioblastom-Zellen

Mithilfe von Tetracyclin-regulierten Systemen kann die Expression eines „Gene of Interest“ durch den Zusatz von Tetracyclin, oder seines Derivats Doxycyclin (wie in dieser Arbeit), in das Zellkulturmedium gesteuert werden. Das verwendete System beruht auf regulatorischen Elementen, die aus der Tetracyclin-Resistenz von Bakterien bekannt sind und auf eukaryotische Systeme übertragen wurden (35). Man unterscheidet Tet-On Systeme und Tet-Off Systeme, bei denen Tetracyclin zur Induktion bzw. Suppression der Genexpression von abhängigen Promotoren führt (35, 36). Diese Systeme bieten den wesentlichen Vorteil, dass eine Gensuppression oder Überexpression kurzfristig induziert werden kann, was im Gegensatz zu nicht induzierbaren Systemen, den Zellen weniger Möglichkeiten einer langfristigen Adaptation bietet. Daher ist die Tetracyclin-vermittelte Regulation eher mit der Wirkung eines hypothetischen Pharmakons zu vergleichen, das DDIT4 reguliert.

G55 Tet-Off Zellen, die den Tetracycline-controlled transactivator (tTA) unter der Kontrolle eines CMV Promotors und eine Neomycin-Resistenz Kasette exprimieren, wurden von Till Acker (Neuropathologie Gießen) zur Verfügung gestellt (37). Eine mit Hämagglutinin (HA gelabelte DDIT4 Sequenz wurde von James Brugarolas in einem pcDNA3 Plasmid bereitgestellt (30) und in das pTRE2 hygro Plasmid unter Kontrolle eines Tet-responsive Promotors umklontiert. In Abwesenheit von Doxycyclin bindet tTA an diesen Promotor und aktiviert die Transkription, in Gegenwart von Doxycyclin findet diese Bindung und die daraus folgende transkriptionelle Aktivierung nicht mehr statt. Im letzten Schritt wurden G55 Tet-Off Zellen mit diesem pTRE2 hygro DDIT4 Plasmid transfiziert. G55 DDIT4 Tet-Off Zellen zeigten sowohl auf RNA als auch Proteinebene eine erkennbare Doxycyclin-abhängige DDIT4 Expression (Fig. 2c).

Effekte einer DDIT4 Überexpression auf die Sensibilität von Glioblastom-Zellen gegenüber Temozolomid – und Strahlentherapie

Um die Effekte einer DDIT4 Überexpression zu untersuchen, wurden, wie bereits oben beschrieben, Doxycyclin-abhängig DDIT4 überexprimierende G55 Zellen hergestellt. Außerdem wurden zur Herstellung einer stabilen DDIT4 Überexpression LNT-229 Zellen mit dem pcDNA3 oder pcDNA3 HA-DDIT4 Plasmid transfiziert (30). Eine dauerhafte Überexpression von DDIT4, nach Transfektion mit dem entsprechenden pcDNA3 Plasmid, konnte auf QPCR Niveau über 3 Passagen nachgewiesen werden (Supplementary Fig. 1G).

Das klonale Überleben von Zellen mit DDIT4 Überexpression nach Behandlung mit TMZ war in beiden Zelllinien gesteigert (Fig. 4a). In Zusammenschau mit der TMZ-vermittelten DDIT4 Induktion legen diese Ergebnisse eine Funktion von DDIT4 als physiologischer Resistenzmechanismus von Tumorzellen gegen TMZ nahe. In einem analog durchgeführten Koloniebildungstest, bei dem die Zellen mit 2 und 10 Gy bestrahlt wurden, führte die DDIT4 Überexpression in G55 Zellen zusätzlich zu einer verminderten Empfindlichkeit gegen Bestrahlung. Besonders ausgeprägt war dieser Effekt bei einer Dosis von 2 Gy. Bei den stabil DDIT4 überexprimierenden LNT-229 Zellen (pcDNA3 System) war nur ein leichter Trend, aber kein signifikanter Effekt erkennbar (Fig. 4b).

Effekte der DDIT4 Expression auf die Sensibilität von Glioblastom-Zellen gegenüber Hypoxie-induziertem Zelltod.

Unsere Ergebnisse bestätigten die vorab bereits beschriebene DDIT4 Induktion in Hypoxie (30) auch in GB-Zellen. Dieser Mechanismus ist maßgeblich an der Hypoxie-vermittelten mTORC1-Inhibition beteiligt (30). Des Weiteren wurde bereits gezeigt, dass sowohl shRNA als auch pharmakologisch vermittelte mTORC1-Inhibition Gliomzellen vor Hypoxie-induziertem Zelltod schützt (23).

Vor diesem Hintergrund untersuchten wir mittels der Lactatdehydrogenase (LDH)-Freisetzungsmethode (zur Zelltodquantifizierung) die Empfindlichkeit DDIT4

gensupprimierter Zellen gegenüber Hypoxie-induziertem Zelltod. Unter hypoxischen Bedingungen (0,1% O₂) zeigte sich, in beiden Zelllinien (LNT-229 und G55), eine gesteigerte Empfindlichkeit der Zellen mit DDIT4 Gensuppression (DDIT4sh) mit entsprechender gesteigerter LDH-Freisetzung im Vergleich zu den Kontrollzellen (Fig. 3d). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Hypoxie-vermittelte physiologische mTORC1 Inhibition ein wichtiger Mechanismus ist, um Zellüberleben unter hypoxischen Bedingungen zu gewährleisten. Zudem sind diese Ergebnisse in Einklang mit dem bereits beschriebenen Effekt einer GB-Zell Sensibilisierung gegenüber Hypoxie durch *TSC2*-Gensuppression, was gleichermaßen zu einem Defekt in der Hypoxie-vermittelten physiologischen mTORC1 Inhibition führt (Fig. 5) (25). Umgekehrt konnten wir zeigen, dass eine „präventive“ DDIT4 Induktion, ebenfalls in Einklang mit bekannten Daten einer „präventiven“ mTORC1-Inhibition durch Rapamycin (23), Zellen vor Hypoxie-induziertem Zelltod schützt (Fig. 4d). Für dieses Experiment wurden die zuvor beschriebenen G55 Tet-Off Zellen mit Doxycyclin-abhängiger DDIT4 Expression verwendet. Doxycyclin per se kann in gewissen höheren Konzentrationen vor Hypoxie-induziertem Zelltod schützen (38). In unserem Modell käme ein solcher potenzieller Effekt allerdings den Kontrollzellen zugute und würde den DDIT4-vermittelten Effekt im Vergleich eher verringern.

4.3 Diskussion

GBs sind nicht nur die häufigsten hirneigenen Tumore, sondern auch die mit der höchsten Letalität (39). Therapieresistenz gegenüber gängigen und neuen Therapeutika stellt eine besondere Herausforderung in der Behandlung des GB dar. In Vorarbeiten konnten wir zeigen, dass eine pharmakologische und genetische mTOR-Inhibition humane GB-Zellen vor Hypoxie-induziertem Zelltod schützen kann. Dies stellt eine mögliche Erklärung für die bisherige Wirkungslosigkeit von mTOR- Inhibitoren in klinischen Studien bei unselektionierten GB-Patientenkohorten dar (20).

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen den physiologischen mTORC1-Inhibitor DDIT4 als zellintrinsic Resistenzenmechanismus gegenüber der etablierten postoperativen GB-Therapie zu identifizieren. Einerseits konnte eine Induktion von DDIT4 zelllinienabhängig durch die Therapiekomponenten TMZ und Strahlentherapie nachgewiesen werden, andererseits gelang es mithilfe genmanipulierter Zellen die Relevanz dieser Induktion für das Tumorzellüberleben zu zeigen. So führte DDIT4 Gensuppression zu einer Sensibilisierung der Zellen gegen TMZ und Strahlentherapie (Fig. 3a, b). Diese Effekte zeigten sich in der Analyse des klonalen Überlebens, eine etablierte *in vitro* Methode bei der Bewertung der Toxizität von Chemo- und Strahlentherapie (40). Bemerkenswerterweise zeigten sich diese Effekte bei, mit gängigen Therapieschemata, physiologisch im Menschen auftretenden TMZ Konzentrationen ($< 40 \mu\text{M}$) (41, 42). Darüber hinaus zeigten Zellen mit DDIT4 Gensuppression eine erhöhte Sensibilität gegenüber Hypoxie-induziertem Zelltod (Fig. 3d). Hypoxie ist ein wesentlicher Bestandteil des Tumormikromilieus und trägt maßgeblich zu der typischen GB-Histologie mit Nekrosen, Pseudopallisaden und Gefäßneubildungen bei (43, 44). Von anderen soliden Tumorentitäten existieren Sauerstoffmessungen, die belegen, dass Sauerstoffkonzentrationen um 0 mm Hg in relevanten Tumoranteilen vorkommen (45).

Passend zu den Ergebnissen mit DDIT4 Gensuppression, führte umgekehrt eine DDIT4 Induktion zu einer zelllinienabhängigen Resistenz gegenüber TMZ, Strahlentherapie und Hypoxie-induziertem Zelltod (Fig. 4a, b, d). Entsprechend könnte die hypoxische DDIT4 Induktion einen potenziellen Mechanismus der Therapieresistenz hypoxischer Tumoren darstellen (46).

Die potenziell negative Auswirkung einer mTOR-Inhibitor Therapie wird durch die Ergebnisse der RTOG0913-Phase-II-Studie unterstrichen (22). In dieser Studie wurden 171 Patienten mit neu diagnostiziertem GB randomisiert, um zusätzlich zur Strahlentherapie und TMZ-Chemotherapie eine tägliche Dosis des mTORC1-Inhibitors Everolimus zu erhalten. Zusätzliche Therapie mit Everolimus bei teilweise gleichzeitiger Therapie mit Strahlentherapie und TMZ führte zu einer signifikanten Reduktion des Gesamtüberlebens (22). Diese Studienergebnisse

decken sich insofern mit unseren Ergebnissen, dass auch hier eine mTORC1-Inhibition (durch DDIT4 Überexpression) GB-Tumorzell-protektiv gegenüber Bestrahlung, TMZ und Hypoxie wirkte (Fig. 4a, b, d). In der EORTC26082 Phase-II Studie wurden 111 GB-Patienten mit unmethyliertem MGMT-Promotor in die beiden Behandlungsarme Standard Strahlenchemotherapie mit TMZ (3) oder Strahlentherapie mit wöchentlicher Gabe des Everolimus Derivats Temsirolimus randomisiert (21). Die Ergebnisse der Studie waren negativ und zeigten hinsichtlich der Behandlung der Gesamtkohorte der Studienpatienten keinen Vorteil einer Temsirolimus-Therapie. In einer nicht geplanten Subgruppenanalyse zeigte sich jedoch ein Nutzen der Temsirolimus-Therapie bei Patienten mit aktivierter mTORC1-Signalkaskade (21). Als Nachweismethode wurde dabei auf den immunhistochemischen Nachweis von Serin 2448 phosphoryliertem mTOR-Protein (P-mTOR^{Ser2448}) zurückgegriffen. Die entsprechende Phosphorylierung erfolgt durch die S6K1, welche selbst ein Zielprotein von mTORC1 darstellt (47). In ähnlicher Weise gelang es, über den immunhistochemischen Nachweis von P-RPS6, in der OSAG 101-BSA-05 Studienkohorte (48) eine Subgruppe von GB-Patienten zu identifizieren, die von der Hinzunahme, des gegen EGFR gerichteten therapeutischen Antikörpers Nimotuzumab zum Standard GB-Therapie regime, profitieren könnten (49).

Eine Analyse von GB-Patientendaten des Cancer Genome Atlas (TCGA) Konsortiums, bei der die Tumore unter Verwendung eines Median Splits für die Expression von DDIT4 in eine Hoch- und Niedriggruppe dichotomisiert wurden, zeigte keinen Effekt der initialen DDIT4-Genexpression auf das Überleben (Supplementary Fig. 2A). Bei niedrig gradigen Gliomen war eine gesteigerte DDIT4-Expression (Dichotomisierung wieder nach Median Split) hingegen sogar mit einem verlängerten Überleben verbunden (Supplementary Fig. 2B). Auf den ersten Blick mögen diese Ergebnisse im Widerspruch zu unserer Beschreibung von DDIT4 als Resistenzmechanismus stehen. Während jedoch die basale *DDIT4* Genexpression bei einigen (vor allem niedrig gradigen) Tumoren möglicherweise vorteilhaft sein kann, ist es doch am ehesten das Ausmaß der potenziellen adaptiven Hochregulierung von DDIT4 bei GBs das ausschlaggebend sein dürfte.

Auf diese Weise vermittelt ein intakter DDIT4-Sensor, der als Reaktion auf zelluläre Stressoren wie Bestrahlung, TMZ oder Hypoxie die mTORC1-Signalkaskade hemmt, Therapieresistenz (Fig. 5).

Zusammenfassend belegen unsere Ergebnisse eine Funktion von DDIT4 für Therapieresistenz und metabolische Zellanpassung. DDIT4 gewährt nicht nur Schutz gegen die gängigen Komponenten der GB-Therapie, sondern schützt auch Zellen unter Bedingungen des Tumormikromilieus mit Hypoxie und Nährstoffmangel. Solche Zustände treten physiologisch auf oder können durch neue Behandlungsansätze hervorgerufen werden (14, 50). DDIT4 stellt somit einen potenziellen Angriffspunkt für eine therapeutische Inhibition zur Störung von Tumorwachstum im Mikromilieu und zur Steigerung der Effektivität von Strahlentherapie und TMZ dar.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit unterstreichen, wie wichtig ein molekulares Profil des Tumors nicht nur bei Diagnosestellung, aber auch bei sekundärer Therapieresistenz ist. Die charakteristische genetische Instabilität sowie die hohe Rate an Mutationen im Therapieverlauf führen zu einer Heterogenität, die die Therapie des GB zu einer besonderen Herausforderung macht und nach individualisierten Therapieansätzen verlangt. Eine Entwicklung die sich auch in den neuen Diagnosekriterien der Weltgesundheitsorganisation (WHO) widerspiegelt, die inzwischen neben morphologischen und histologischen Kriterien auch den Einbezug molekularer Informationen bei Diagnosestellung fordert (51). Auch neue Studienkonzepte wie die einer Umbrella-Studie, bei der die molekulare Charakterisierung nach möglichen Treibermutation, den experimentellen Therapiearm festlegt, spiegeln die Individualisierung der Krebstherapie wider. Die aktuelle NCT Neuro MASTER Match (N2M2)-Studie, folgt diesem Konzept. Hier werden Patienten mit neu-diagnostiziertem GB ohne MGMT-Promotor Methylierung anhand ihres molekularen Profils in acht verschiedene medikamentöse Behandlungsarme konkomitant zur Strahlentherapie randomisiert (52).

In Anbetracht der molekularen Heterogenität des GB sehe auch ich die Zukunft der GB-Therapie in einer individualisierten, an das jeweilige molekulare Profil des

Tumors angepassten, Therapie. Kritisch wird darüber hinaus auch die zeitliche Integration der einzelnen Komponenten eines Therapieschemas sein, um ein Maximum an Synergie und ein Minimum an Toxizität und gegenseitiger Wirkungsinterferenz zu erzielen.

5 Übersicht der zur Veröffentlichung angenommenen Publikationen

Foltyn M, Luger A-L, Lorenz NI, Sauer B, Mittelbronn M, Harter PN, Steinbach JP and Ronellenfitsch MW The physiological mTOR complex 1 inhibitor DDIT4 mediates therapy resistance in glioblastoma. *British Journal of Cancer* 2019; 120(5):481-7. doi: 10.1038/s41416-018-0368-3.

6 Publikation



ARTICLE

Translational Therapeutics

The physiological mTOR complex 1 inhibitor DDIT4 mediates therapy resistance in glioblastoma

Martha Foltyn^{1,2,3}, Anna-Luisa Luger^{1,2,3,4}, Nadja I. Lorenz^{1,2,3,4}, Benedikt Sauer^{1,2,3,4}, Michel Mittelbronn^{5,6,7,8,9}, Patrick N. Harter^{2,3,4,9}, Joachim P. Steinbach^{1,2,3,4} and Michael W. Ronellenfitsch^{1,2,3,4}

BACKGROUND: Despite significant advances in the understanding of glioblastoma genetics and biology, survival is still poor. Hypoxia and nutrient depletion in the tumour microenvironment induce adaptive signalling and metabolic responses, which can influence sensitivity to therapeutic regimens. DNA damage-inducible transcript 4 (DDIT4) is a protein induced by hypoxia and in response to DNA stress. Mechanistically, DDIT4 inhibits mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signalling by activation of the tuberous sclerosis 1/2 (TSC1/2) complex.

METHODS: Using short hairpin RNA-mediated gene suppression as well as doxycycline-regulated gene induction, we developed a glioblastoma cell model to study effects of DDIT4 under conditions of the glioblastoma microenvironment and therapy.

RESULTS: We found an intact DDIT4-mTORC1 signalling axis in human glioblastoma cells that was inducible by hypoxia. Temozolomide and radiotherapy also induced DDIT4 and repressed mTORC1 activity in some glioblastoma cell lines. DDIT4 gene suppression sensitised glioma cells towards hypoxia-induced cell death, while DDIT4 overexpression protected them. Additionally, in clonogenic survival analyses, DDIT4 induction conferred protection from radiotherapy and temozolomide, while DDIT4 gene suppression sensitised cells.

CONCLUSIONS: We identified DDIT4 as a cell-intrinsic regulator for adaptive responses and therapy resistance in glioblastoma cells which may interfere with cell death induction by temozolomide, radiotherapy or hypoxia by inhibiting mTORC1 activity.

British Journal of Cancer <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0368-3>

BACKGROUND

With an incidence of ~3/100,000 glioblastoma (GB) is the most common primary malignant brain tumour in adults.¹ Although it has received much attention in clinical and laboratory research, the prognosis of GB patients is still sobering with a median survival of <1 year in unselected cohorts.² The current standard therapy is palliative and consists of surgical resection followed by radiotherapy and chemotherapy with temozolomide.³ Therapeutic options for recurrent disease are limited and frequently involve nitrosoureas.⁴ Bevacizumab, a humanised monoclonal antibody targeting vascular endothelial growth factor, has failed to prolong overall survival in pivotal phase III trials, possibly because it can lead to local hypoxia by inhibiting tumour-associated angiogenesis.^{5,6} An important reason for the dismal prognosis of GB is therapy resistance. In more than half of GBs, transcription of the DNA repair enzyme O6-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT) from an unmethylated gene promoter renders tumour cells resistant to temozolomide.⁷ Acquired resistance to temozolomide can involve defects in the DNA mismatch repair pathway reducing susceptibility to apoptosis.⁸ Adaptation to conditions of

the tumour microenvironment is a selective advantage mediated by cellular sensors. DNA damage-inducible transcript 4 (DDIT4) was first described in 2002 as a protein induced by hypoxia and DNA damage.^{9,10} Additional modes of regulation have been reported for other factors such as energy stress, reactive oxygen species and dexamethasone.¹¹ Mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) has been identified as a major downstream target inhibited by DDIT4.¹² Mechanistically, DDIT4 relieves inhibition of the tuberous sclerosis 1/2 (TSC1/TSC2) complex which in its active form is a negative regulator of mTORC1.¹³ mTORC1 is a multiprotein complex and a major regulator of cell growth, translation and metabolism.¹⁴ One important downstream target of mTORC1 is ribosomal protein S6 (RPS6), a component of the 40S ribosomal subunit. mTORC1 phosphorylates and activates RPS6 kinase 1 (S6K1), which then phosphorylates RPS6.

We have previously shown that activation of mTORC1 signalling correlates with sensitivity to hypoxia-induced cell death offering one potential explanation for the inefficacy of mTORC1 inhibitors in GB clinical trials.^{15–17} In the current study, we assessed the role of DDIT4 as a mediator of metabolic adaptation and therapy

¹Dr. Senckenberg Institute of Neurooncology, University Hospital Frankfurt, Goethe University, Frankfurt am Main, Germany; ²University Cancer Center Frankfurt (UCT), University Hospital Frankfurt, Goethe University, Frankfurt am Main, Germany; ³German Cancer Consortium (DKTK), Partner Site Frankfurt/Mainz, Frankfurt am Main, Germany; ⁴Frankfurt Cancer Institute (FCI), University Hospital Frankfurt, Goethe University, Frankfurt am Main, Germany; ⁵Department of Anatomic and Molecular Pathology and Luxembourg Centre of Neuropathology (LCNP), Dudelange, Luxembourg; ⁶Luxembourg Centre for Systems Biomedicine (LCSB), University of Luxembourg, Luxembourg, Luxembourg; ⁷NORLUX Neuro-Oncology Laboratory, Luxembourg Institute of Health (LIH), Luxembourg, Luxembourg; ⁸Laboratoire national de santé (LNS), Department of Anatomic and Molecular Pathology, Dudelange, Luxembourg and ⁹Institute of Neurology (Edinger-Institute), University Hospital Frankfurt, Goethe University, Frankfurt am Main, Germany
Correspondence: Michael W. Ronellenfitsch (M.Ronellenfitsch@gmx.net)

Received: 25 November 2018 Revised: 28 November 2018 Accepted: 4 December 2018
Published online: 12 February 2019

© Cancer Research UK 2019

Gene	Forward primer	Reverse primer
18S	5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'	5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'
SDHA	5'-TGGGAACAAGAGGGCATCTG-3'	5'-CCACCACTGCATCAAAATTCATG-3'
DDIT4	5'-GGATGGGTGCTGTTGCCG-3'	5'-GGCAGCTCTTGCCCTGCTCC-3'

resistance. We report that DDIT4 mediates GB cell protection from nutrient and oxygen deprivation as well as from temozolomide chemotherapy and radiotherapy, and therefore is a potential candidate for therapeutic inhibition.

MATERIALS AND METHODS

Reagents, cell lines and culture conditions

All reagents not specified otherwise were obtained from Sigma (Taufkirchen, Germany). LNT-229, LN-308 cells (both MGMT-methylated) and G55 cells (MGMT-unmethylated) have been described.¹⁶ Cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% foetal calf serum (FCS) (Biocrom KG, Berlin, Germany), 100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Life Technologies, Karlsruhe, Germany). For selection, 2 µg/ml puromycin, 400 µg/ml G418 or 50 µg/ml hygromycin B (Toku-E, Bellingham, USA) were added. When comparing different sub-cell lines, equal cell densities were confirmed by crystal violet (CV) staining in a parallel assay.¹⁵

Generation of DDIT4 gene-suppressed cells

The pSUPER plasmid with the puromycin resistance cassette has been described.¹⁵ For stable short hairpin RNA (shRNA)-mediated gene suppression, DDIT4-specific oligonucleotide sequences were cloned into the *Bgl*II and *Sall* sites (GATCCCCGATACTCACTGTT CATGAATTC AAGAGATTCATGAACAGTGAGTATCTTTTGGAAA (sense) and TCGATTTC AAAAAGATACTCACTGTT CATGAATCTCTGAATTCAT GAACAGTGAGTATCGGG (antisense)). Stable sub-cell lines were established by transfecting cells with the pSuper DDIT4sh or a pSuper plasmid with a non-targeting control sequence (NTsh) using Attractene (Qiagen, Venlo, The Netherlands) transfection reagent.

Generation of stable and inducible DDIT4-overexpressing cells

The pcDNA3 or pcDNA3 HA-DDIT4 plasmids were a gift of James Brugarolas and were used for DDIT4 overexpression.¹² G55 cells transfected with the pTet-Off plasmid (Clontech, #631017) were a gift of Till Acker (Gießen, Germany) and have been described.¹⁸ The HA-DDIT4 sequence was cloned into the pTRE2 hygromycin for inducible expression. This plasmid was then transfected in G55 cells with the pTet-off plasmid. 1 µg/ml of doxycycline was added to the medium for suppression of DDIT4 gene transcription. For DDIT4 induction, doxycycline was omitted from the medium 24 h prior to experiments, whereas for the control condition doxycycline was continued.

Induction of hypoxia

Experiments were performed in serum-free DMEM adjusted to 2 mM glucose under normoxia or 0.1% oxygen by incubation in Gas Pak pouches for anaerobic culture (Becton-Dickinson, Heidelberg, Germany).¹⁶

RNA extraction and quantitative reverse transcription-PCR analysis

The quantitative PCR (qPCR) was carried out as described previously¹⁶ with the IQ5 real-time PCR system (Bio-Rad, Munich, Germany) and corresponding primer pairs (Table 1). 18S and SDHA (succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A) RNA were both used for normalisation.¹⁹

Immunoblot analysis

Immunoblot was performed using a standard protocol as described previously.^{15,16} Briefly, cells were harvested and protein concentration determined by Bradford assay. Proteins were separated by SDS-PAGE on 12% acrylamide gels and blotted to nitrocellulose membranes. Membranes were incubated with antibodies to DDIT4 (Proteintech #10638-1-AP), hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α) (BD #610959), P-S6RP (Ser240/244; Cell Signalling #2215), P-S6K1 (Thr389; Cell Signalling #9205), S6K1 (Cell Signalling #9202), P-4E-BP1 (Thr37/46, Cell Signalling #9459), 4E-BP1 (Cell Signalling #9452) or actin (Santa Cruz Biotechnology #sc-1616). The secondary anti-rabbit and anti-goat antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology. Chemiluminescence was used for detection.¹⁶

Cell density, viability and clonal survival analyses

For cell growth analyses 5000 cells were seeded per well of a 96-well plate. Cell density was evaluated by CV staining.¹⁶ Cell viability analysis by lactate dehydrogenase (LDH) release assay was performed with the Cytotoxicity Detection Kit (LDH) (Roche, Mannheim, Germany).¹⁶ For evaluation of clonal survival, 500 cells were seeded per well of a 6-well plate. Cells were treated with temozolomide or irradiation in DMEM with 10% FCS. After 24 h, the medium was replaced with fresh DMEM and the experiment stopped by CV staining when clones reached close proximity to neighbouring clones.²⁰ Clones were counted manually under the microscope.

Irradiation

Irradiation was administered with single doses of X-rays ranging from 2 to 10 Gy. Control cells were also brought to the irradiation chamber but not exposed to radiotherapy.²⁰

Statistical analysis

Statistical analysis was done using Microsoft Excel. To calculate *P* values a two-tailed Student's *t* test was used. Values of *p* > 0.05 were regarded not significant (NS), and values of *p* < 0.05 significant (*) and values of *p* < 0.01 highly significant (**). Values are displayed as mean ± standard deviation if not otherwise specified.

Database analysis

Database analysis was performed using the GlioVis platform²¹ and the TCGA datasets for GB (TCGA_GBM) and low-grade gliomas (TCGA_LGG).

RESULTS

DDIT4 is induced by hypoxia, temozolomide and radiation in GB cells

To investigate levels of DDIT4, we examined protein content in commonly used glioma cell lines as well as HEK293 cells and one colorectal carcinoma cell line (HT29) (Supplementary Fig. 1A). For our experiments, we chose LNT-229, G55 and LN-308 cells. Incubation under hypoxic conditions (0.1% oxygen), as can be found in the tumour microenvironment,^{22,23} triggered HIF-1α stabilisation and induced DDIT4 gene expression and protein with decreased phosphorylation of RPS6 as evidence for mTORC1 inhibition (Fig. 1a). Withdrawal of glucose

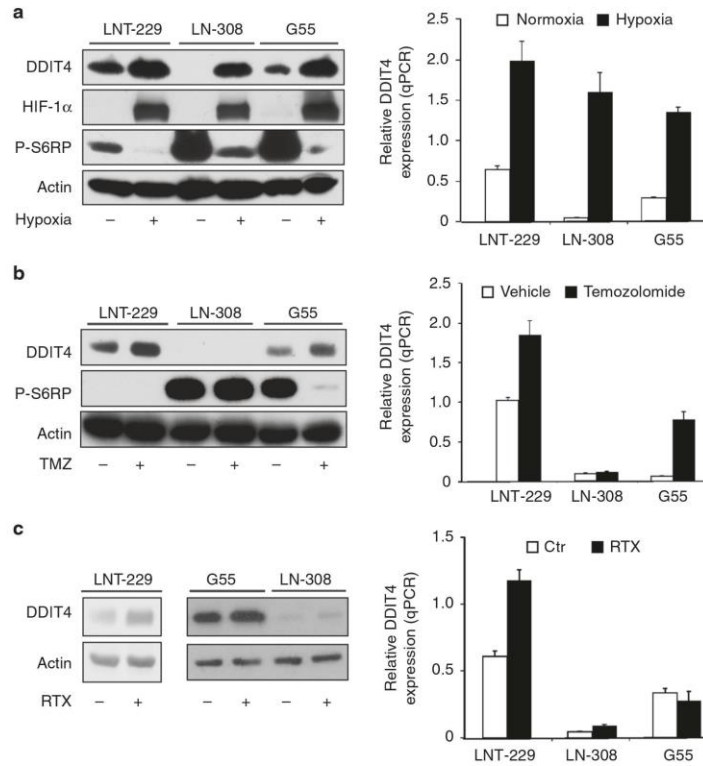


Fig. 1 DDIT4 is induced by hypoxia, temozolomide and radiation in human glioblastoma cells. **a** LNT-229, G55 and LN-308 cells were incubated for 24 h in serum-free DMEM under normoxic conditions (21% oxygen, normoxia) or 0.1% oxygen (hypoxia). Cellular lysates were analysed by immunoblot with antibodies for DDIT4, P-S6RP, HIF-1 α or actin (left panel), and cDNA was analysed for induction of DDIT4 gene expression by qPCR (right panel). **b** LNT-229, G55 and LN-308 cells were incubated for 24 h in serum-free medium containing 100 μ M temozolomide (TMZ) or 100 μ M DMSO (Vehicle). Cellular lysates were analysed by immunoblot with antibodies for DDIT4, P-S6RP or actin (left panel), and cDNA was analysed for induction of DDIT4 gene expression by qPCR (right panel). **c** LNT-229, G55 and LN-308 cells were irradiated (RTX+) with 10 Gy or brought to the irradiation chamber but were not placed under the X-ray beam (RTX-, Ctr). 24 h after irradiation, cellular lysates were prepared and analysed by immunoblot with antibodies for DDIT4 or actin (left panel). In a similar experiment, cells were irradiated with 10 Gy (LNT-229, LN-308) or 6 Gy (G55) and cDNA analysed for induction of DDIT4 gene expression by qPCR (right panel)

further increased DDIT4 protein in normoxic conditions, whereas addition of 10% FCS decreased it. In hypoxic conditions, DDIT4 was induced and glucose or serum withdrawal had no additional effect (Supplementary Fig. 1B). Since DDIT4 induction has also been described in response to DNA damage in human fibroblasts,⁹ we hypothesised that temozolomide-mediated DNA damage would also induce DDIT4 in GB cells. DDIT4 induction was detectable in LNT-229 cells as well as in G55 cells exposed to temozolomide at both the RNA and protein level (Fig. 1b). Notably, this effect was dose dependent in LNT-229 cells with concomitant inhibition of mTORC1 as indicated by reduced phosphorylation of S6K1 and a dephosphorylation-mediated mobility shift in 4E-BP1 (Supplementary Fig. 1C). No regulation was detectable in p53-null LN-308 cells (Fig. 1b). Irradiation resulted in induction of DDIT4 gene expression only in LNT-229 cells; in LN-308 and G55 cells, no difference between irradiated and non-irradiated cells was detectable for DDIT4 gene expression and protein content (Fig. 1c).

DDIT4 gene suppression sensitises human malignant glioma cells to temozolomide and irradiation

To study the effects of DDIT4 inhibition, stable sub-cell lines with DDIT4 gene suppression were generated. qPCR and immunoblot confirmed suppression of DDIT4 in LNT-229 and G55 (DDIT4sh) compared to control (NTsh) cells (Fig. 2a, b). DDIT4sh cells had increased mTORC1 signalling under basal conditions as indicated by a decreased mobility of 4E-BP1 as well as increased phosphorylation of S6K1 and RPS6 (Supplementary Fig. 1D). Notably, hypoxia- and temozolomide-mediated DDIT4 induction was also reduced in DDIT4sh cells (Supplementary Fig. 1E, F). Next, we analysed temozolomide effects on clonogenic survival and found a reduction in LNT-229 and G55 DDIT4sh cells (Fig. 3a). Further, we exposed LNT-229 and G55 cells to irradiation; again, there was an increased sensitivity with fewer surviving clones after irradiation with 2 Gy in DDIT4sh cells (Fig. 3b). Growth analyses under serum-containing (10% FCS) and serum-free culture conditions showed no clear difference in cell density in DDIT4sh cells (Fig. 3c).

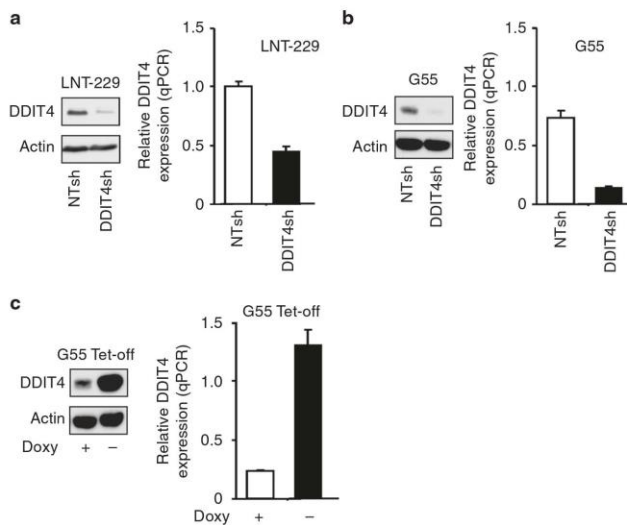


Fig. 2 Establishment of DDIT4 gene-suppressed and gene-overexpressing glioblastoma cells. **a**, **b** LNT-229 and G55 pSuper Puro DDIT4sh and control (non-targeting sequence, NTsh) cellular lysates were analysed by immunoblot with antibodies for DDIT4 or actin. cDNA was analysed by qPCR. **c** G55 DDIT4 Tet-off cells were incubated for 3 days in serum-free DMEM with and without 1 μ g/ml doxycycline. Cellular lysates were analysed by immunoblot with antibodies for DDIT4 or actin. cDNA was analysed by qPCR

DDIT4 gene suppression sensitises human GB cells to hypoxia-induced cell death

Hypoxia is a known inducer of DDIT4 gene expression via HIF-1 α -mediated transcription. This mechanism plays a key role in hypoxia-induced mTORC1 inhibition.¹² Pharmacological or shRNA-mediated mTORC1 inhibition protects cells from hypoxia-induced cell death.¹⁵ We hypothesised that cells with reduced levels of DDIT4 may be less susceptible to physiological mTORC1 inhibition under hypoxia and therefore more vulnerable towards hypoxia-induced cell death as has been reported for GB cells with dysregulated mTORC1 signalling.¹⁶ Both LNT-229 and G55 DDIT4sh cells displayed enhanced sensitivity to hypoxia-induced cell death as indicated by an increased LDH release (Fig. 3d).

DDIT4 confers protection against temozolomide and radiotherapy in GB cells

Tetracycline-regulated systems allow acute induction of gene expression limiting long-term cellular adaptive or compensatory mechanisms. In G55 DDIT4 Tet-off cells, gene induction was detectable at both the mRNA and protein level when doxycycline was removed from the medium (Fig. 2c). To study the sensitivity of DDIT4-overexpressing cells to temozolomide, a clonogenicity assay was performed. Both LNT-229-stable and G55 doxycycline-inducible DDIT4-overexpressing cells showed increased clonal survival, confirming a lower sensitivity to temozolomide (Fig. 4a). In conjunction with the temozolomide-mediated DDIT4 induction, these results suggest DDIT4 as a physiological resistance mechanism of tumour cells to temozolomide. Further, we exposed cells to irradiation and again G55 cells showed a lower sensitivity when DDIT4 was induced, whereas LNT-229-stable DDIT4-overexpressing cells showed only a slight trend for a survival advantage (Fig. 4b). At least for LNT-229 cells a radiation-induced DDIT4 induction had already been detected (Fig. 1c); therefore, DDIT4 is also a plausible regulator of physiological adaptation to cellular radiation damage. Notably, in LNT-229 cells, DDIT4 overexpression remained detectable over several passages

(Supplementary Fig. 1G). Growth of G55 cells was not affected by DDIT4 induction (Fig. 4c).

DDIT4 protects glioma cells from hypoxia-induced cell death
Pharmacological or shRNA-mediated mTORC1 inhibition protects cells from hypoxia-induced cell death.¹⁵ Furthermore, we have found that DDIT4 gene suppression sensitised GB cells to hypoxia-induced cell death (Fig. 3d). Conversely, DDIT4 overexpression protected cells from hypoxia-induced cell death (Fig. 4d).

DISCUSSION

While the quest for targeted therapies for GB has been unsuccessful and treatment resistance also to established drugs remains a major problem, epidermal growth factor receptor (EGFR) and mTOR remain plausible candidates as therapeutic targets. We have previously shown that pharmacological and genetic mTOR inhibition can protect human GB cells from hypoxia-induced cell death as one potential explanation for the reduced efficacy of mTOR or EGFR inhibitors in GB clinical trials in unselected patients.^{15,17} In our current study, we report a cell-intrinsic mTOR inhibitory mechanism via the regulatory protein DDIT4 that mediates mTOR-dependent therapy resistance. Notably, DDIT4 induction conferred GB cell resistance to external stimuli such as temozolomide and radiotherapy as well as tumour-intrinsic stimuli such as nutrient and oxygen deprivation (Fig. 4a, b, d). Hypoxic DDIT4 induction is therefore a potential mechanism contributing to the frequently observed reduced treatment efficacy in hypoxic tumours.²⁴ Conversely, we also demonstrate that DDIT4 gene suppression sensitises GB cells to temozolomide, radiation and hypoxia-induced cell death (Fig. 3a, b, d).

Symptomatic treatment for GB frequently involves dexamethasone to reduce vasogenic oedema. It is interesting to note that dexamethasone also induced DDIT4 in LNT-229 and LN-308 cells (Supplementary Fig. 1H). This effect might contribute to the dexamethasone-mediated temozolomide resistance via the

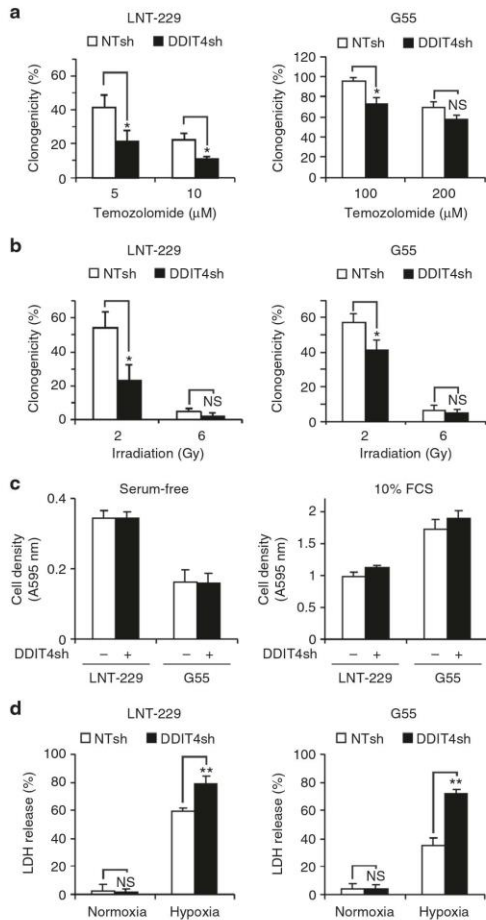


Fig. 3 DDIT4 gene suppression sensitises human glioblastoma cells to temozolomide, irradiation and hypoxia-induced cell death. **a** LNT-229 or G55 NTsh or DDIT4sh cells were incubated for 24 h with vehicle or temozolomide as indicated. After 24 h, the medium was replaced with fresh DMEM without temozolomide. Experiments were stopped by CV staining and clones counted manually under the microscope. Clonogenicity is depicted relative to the vehicle condition ($n = 3$, mean \pm S.D., NS = not significant, $^*p < 0.05$, Student's t test). **b** Cells were seeded as in **a**, irradiated with 2 or 6 Gy, and 24 h thereafter, the medium was replaced with fresh DMEM. After an incubation period of 8 days, cells were stained with CV and clones counted manually as in **a**. Clonogenicity is depicted relative to unirradiated cells ($n = 3$, mean \pm SD, NS = not significant, $^*p < 0.05$, Student's t test). **c** LNT-229 or G55 NTsh and DDIT4sh cells were incubated in serum-free (left panel) or serum-containing (10% FCS, right panel) culture conditions without glucose restriction (25 mM glucose) for 4 days in normoxia. Cell density was measured by CV staining ($n = 6$). **d** LNT-229 or G55 NTsh and DDIT4sh cells were incubated for 32 h under normoxia or 0.1% oxygen (hypoxia) in serum-free DMEM with glucose restriction (2 mM glucose). Cell death was quantified by LDH release ($n = 4$, mean \pm SD, NS = not significant, $^*p < 0.01$, Student's t test)

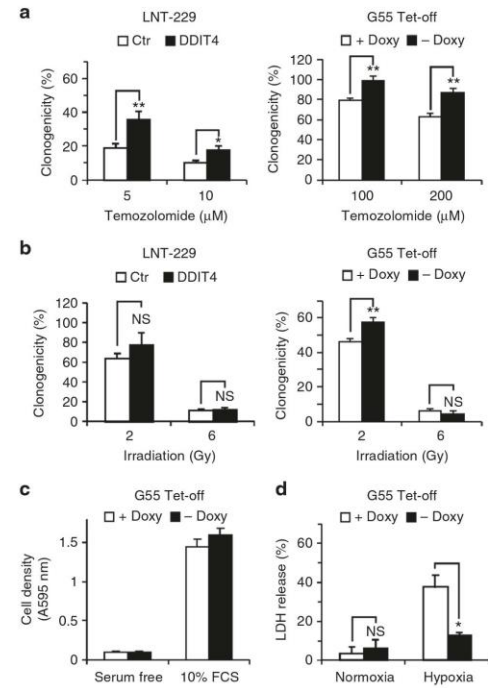


Fig. 4 DDIT4 protects glioblastoma cells from temozolomide, irradiation and hypoxia-induced cell death. **a** LNT-229 control (Ctr, empty pcDNA3 plasmid) and HA-DDIT4-overexpressing cells (pcDNA3 HA-DDIT4 plasmid) or G55 DDIT4 Tet-off either in the presence or absence of doxycycline (right panel) were treated with temozolomide as indicated. Clonogenicity is depicted relative to the vehicle control condition ($n = 3$, mean \pm SD, NS = not significant, $^*p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, Student's t test). **b** Cells were seeded as in **a** and exposed to irradiation as indicated. Clonogenicity is depicted relative to the unirradiated control condition ($n = 3$, mean \pm SD, NS = not significant, $^*p < 0.01$, Student's t test). **c** G55 DDIT4 Tet-off cells were incubated in serum-free medium or DMEM with 10% FCS without glucose restriction (25 mM glucose) for 4 days under normoxia. Cell density was measured by CV staining after 4 days ($n = 6$). **d** G55 DDIT4 Tet-off cells were exposed to glucose-restricted (2 mM glucose) serum-free DMEM under normoxic conditions or 0.1% oxygen either with or without doxycycline (+Doxy and -Doxy, respectively). Cell death was quantified by LDH release ($n = 4$, mean \pm SD, NS = not significant, $^*p < 0.05$, Student's t test)

indirect mTORC2 target N-myc downstream-regulated gene ¹²⁵ and the evolving negative effect of dexamethasone exposure with adverse outcomes in GB patients.²⁶

Potentially adverse effects of mTOR inhibition in unselected patients are highlighted by the recent results of the RTOG0913 phase II trial. This trial included 171 patients with newly diagnosed GB that were randomised to receive a daily dose of the mTORC1 inhibitor everolimus in addition to radiotherapy and temozolomide chemotherapy. Inclusion of everolimus to the treatment regimen reduced overall survival.²⁷ Similar to our results with a physiological mTORC1 inhibitor, it appears possible that pharmacological mTORC1 inhibitors also render GB cells less sensitive to temozolomide (or radiation). Therefore, to effectively incorporate

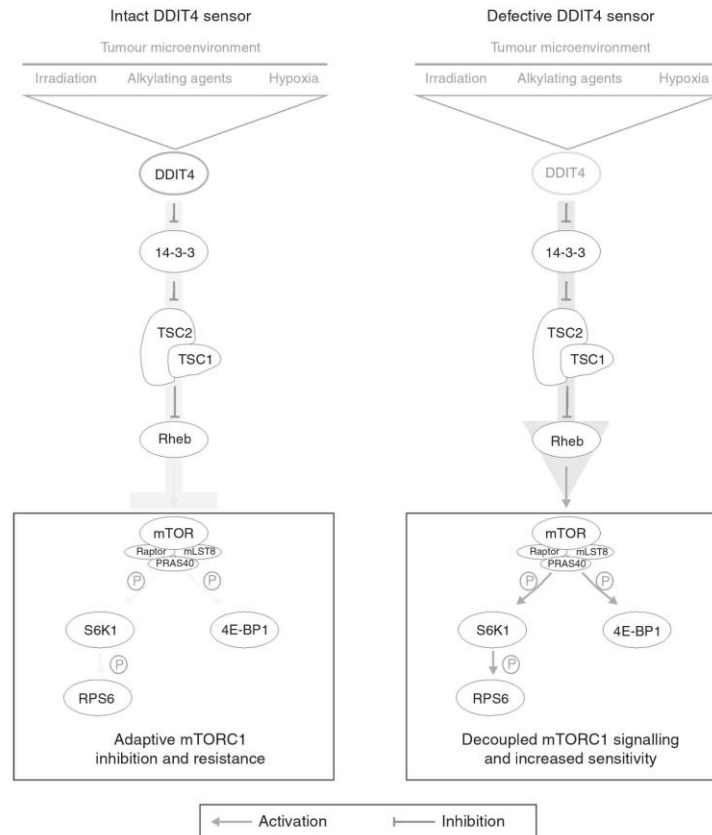


Fig. 5 Schematic diagram illustrating DDIT4 effects on mTORC1 signalling and cellular adaptation. Irradiation, alkylating agents and hypoxia induce DDIT4 in glioblastoma cells. DDIT4 relieves 14-3-3-mediated inhibition of the TSC1/2 complex. Active TSC1/2 inhibits Rheb and ultimately mTORC1. This causes a decline in phosphorylation of the mTORC1 targets S6K1, RPS6 and 4E-BP1. An intact DDIT4 sensor effectively inhibits mTORC1 (left panel) and promotes therapy resistance. A defective DDIT4 sensor impairs induction of adaptive programmes prohibiting tumour-protective mTORC1 inhibition (right panel)

mTOR inhibitors in GB therapy regimes, a coordinated treatment schedule appears crucial. The results of the RTOG0913 trial argue against a (parallel) co-treatment of mTOR inhibitors with radiotherapy and temozolomide in unselected patients. However, the EORTC26082 trial that investigated the everolimus derivative temsirolimus as part of primary therapy for MGMT-unmethylated GB reported a benefit for patients with activated mTORC1 signalling in a retrospective analysis.²⁸ Notably, in this trial patients were only treated with radiotherapy.

Dichotomising tumours in TCGA datasets into DDIT4 high and low groups using a median split, there was no effect on survival of GB patients (Supplementary Fig. 2A). In lower grade gliomas DDIT4 gene expression was associated with prolonged survival (Supplementary Fig. 2B). These results do not contradict our findings where DDIT4 regulates a resistance mechanism and therefore is expected to be associated with reduced patient survival. While basal DDIT4 gene expression might be beneficial in

some (low-grade) tumours, it is the degree of potential adaptive upregulation of DDIT4, that is, the efficacy of an intact DDIT4 sensor to inhibit mTORC1 signalling in response to cellular stressors, that mediates therapy resistance (Fig. 5) as exemplified by the increased sensitivity of DDIT4sh cells to radiotherapy and chemotherapy (Fig. 3a, b).

In summary, we here describe DDIT4 as a mediator of cellular adaptive therapy resistance. DDIT4 conferred protection against the standard treatment regimens for GB including radiotherapy and temozolomide chemotherapy (Fig. 4a, b). Furthermore, DDIT4 also protected cells under conditions of tumour microenvironment with glucose and oxygen deprivation (Fig. 4d). Such conditions occur physiologically or can be enhanced by new treatment approaches aiming to starve tumour cells like antiangiogenic treatments. Therefore, DDIT4 is a potential target for therapeutic inhibition to disrupt tumour cell adaptation and sensitise GBs to the effects of the established treatment regimens.

ACKNOWLEDGEMENTS

The Dr. Senckenberg Institute of Neurooncology is supported by the Dr. Senckenberg Foundation. A.-L.L. has received funding by the Frankfurt Research Funding (FFF) within the framework of the 'Patenschaftmodell' and a fellowship in the programme 'Clinician Scientist' by the Else Kröner-Forschungskolleg (EKf) supported by The Else Kröner-Fresenius Foundation. M.W.R. and P.N.H. have received a fellowship by the University Cancer Center Frankfurt (UCT). M.W.R. has also received funding by the Frankfurt Research Funding (FFF) 'Clinician Scientists Program'. J.P.S. and M.W.R. have received funding by the State of Hessen within the LOEWE program. M.M. would like to thank the Luxembourg National Research Fond (FNR) for the support (FNR PEARL P16/BM/11192868 grant).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.W.R. and J.P.S. conceived the study; M.F., A.-L.L., N.J.L., B.S. and M.W.R. carried out the experiments; M.F., M.W.R., A.-L.L., N.J.L., B.S., P.N.H., M.M. and J.P.S. analysed the data; M.W.R., A.-L.L., P.N.H., M.M. and J.P.S. coordinated the study; M.F., M.W.R. wrote the manuscript; all authors helped drafting the manuscript and read and approved the final version.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0368-3>.

Competing interests: The authors declare no competing interests.

Ethics approval and consent to participate: The human cell lines used in this study are all commercially or academically available and were not generated in the course of this study, and therefore no ethics approval was necessary for the cell line experiments. The anonymised patient survival data are in whole based upon data generated by the TCGA Research Network: <http://cancergenome.nih.gov/> and are available without limitations.

Data availability: The Gliovis platform²¹ is available online at: <http://gliovis.bioinfo.cnio.es/> and the TCGA datasets for glioblastoma (TCGA_GBM) and low-grade gliomas (TCGA_LGG) (generated by the TCGA Research Network: <http://cancergenome.nih.gov/>) are accessible via the website.

Note: This work is published under the standard license to publish agreement. After 12 months the work will become freely available and the license terms will switch to a Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).

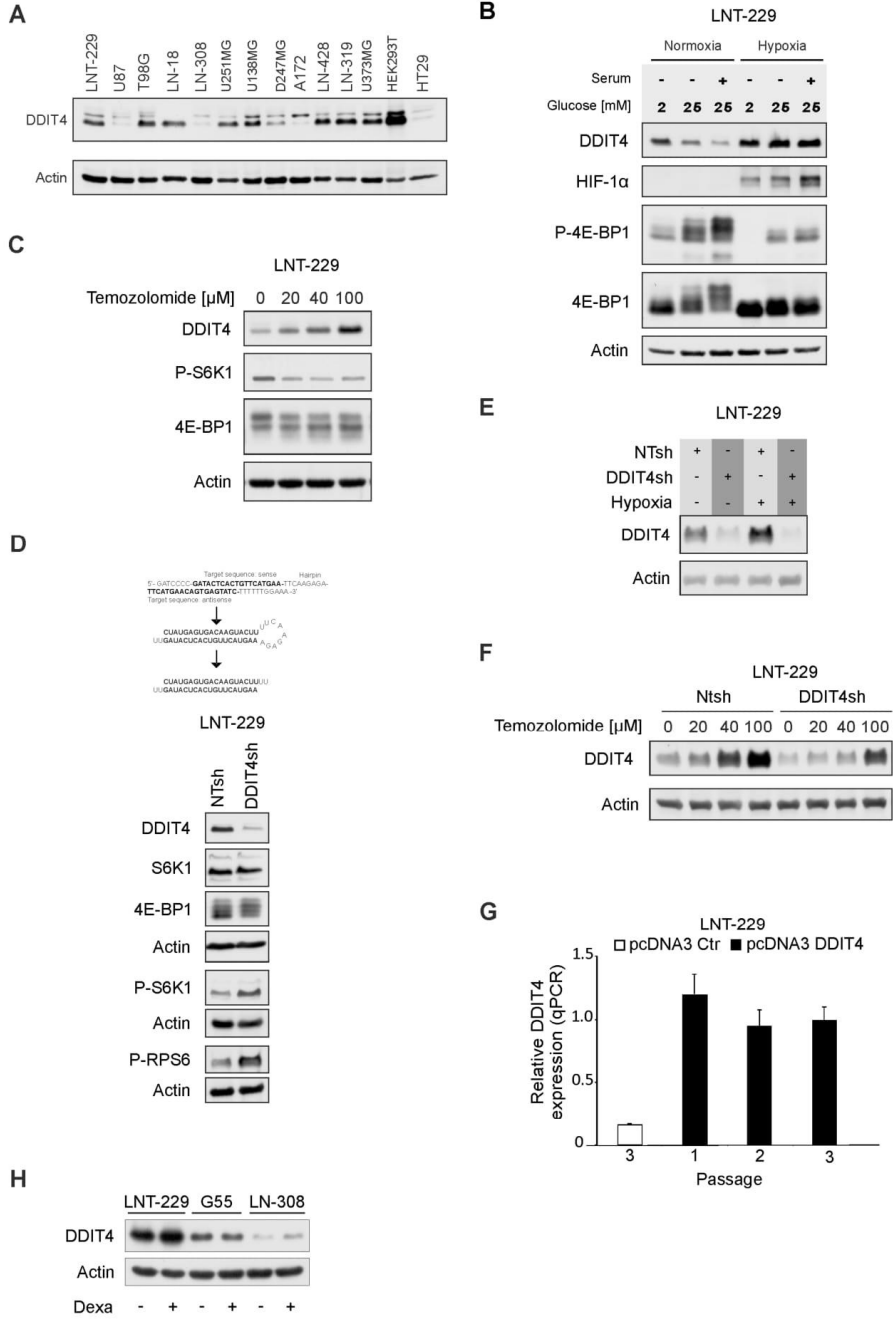
Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

REFERENCES

- Ostrom, Q. T. et al. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011. *Neuro Oncol.* **16** (Suppl. 4), iv1–63 (2014).
- Ohgaki, H. et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res.* **64**, 6892–6899 (2004).
- Stupp, R. et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **352**, 987–996 (2005).
- Weller, M., Cloughesy, T., Perry, J. R. & Wick, W. Standards of care for treatment of recurrent glioblastoma—are we there yet? *Neuro Oncol.* **15**, 4–27 (2013).
- Chinot, O. L. et al. Bevacizumab plus radiotherapy—temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **370**, 709–722 (2014).

- Rapisarda, A. et al. Increased antitumor activity of bevacizumab in combination with hypoxia inducible factor-1 inhibition. *Mol. Cancer Ther.* **8**, 1867–1877 (2009).
- Hegi, M. E. et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **352**, 997–1003 (2005).
- Happold, C. et al. Distinct molecular mechanisms of acquired resistance to temozolomide in glioblastoma cells. *J. Neurochem.* **122**, 444–455 (2012).
- Ellisen, L. W. et al. REDD1, a developmentally regulated transcriptional target of p63 and p53, links p63 to regulation of reactive oxygen species. *Mol. Cell* **10**, 995–1005 (2002).
- Shoshani, T. et al. Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene, RTP801, involved in apoptosis. *Mol. Cell Biol.* **22**, 2283–2293 (2002).
- Sofer, A., Lei, K., Johannessen, C. M. & Ellisen, L. W. Regulation of mTOR and cell growth in response to energy stress by REDD1. *Mol. Cell Biol.* **25**, 5834–5845 (2005).
- Brugarolas, J. et al. Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev.* **18**, 2893–2904 (2004).
- DeYoung, M. P., Horak, P., Sofer, A., Sgroi, D. & Ellisen, L. W. Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes Dev.* **22**, 239–251 (2008).
- Laplante, M. & Sabatini, D. M. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* **149**, 274–293 (2012).
- Ronellenfetsch, M. W. et al. Antagonism of the mammalian target of rapamycin selectively mediates metabolic effects of epidermal growth factor receptor inhibition and protects human malignant glioma cells from hypoxia-induced cell death. *Brain* **132**(Part 6), 1509–1522 (2009).
- Thiebold, A. L. et al. Mammalian target of rapamycin complex 1 activation sensitizes human glioma cells to hypoxia-induced cell death. *Brain* **140**, 2623–2638 (2017).
- Ronellenfetsch, M. W., Steinbach, J. P. & Wick, W. Epidermal growth factor receptor and mammalian target of rapamycin as therapeutic targets in malignant glioma: current clinical status and perspectives. *Target Oncol.* **5**, 183–191 (2010).
- Seidel, S. et al. A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 alpha. *Brain* **133**(Part 4), 983–995 (2010).
- Vandesompele, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**, RESEARCH0034 (2002).
- Fischer, S. et al. Hypoxia enhances the antiglioma cytotoxicity of b10, a glycosylated derivative of betulinic Acid. *PLoS ONE* **9**, e94921 (2014).
- Bowman, R. L., Wang, Q., Carro, A., Verhaak, R. G. & Squatrito, M. Gliovis data portal for visualization and analysis of brain tumor expression datasets. *Neuro Oncol.* **19**, 139–141 (2017).
- Collingridge, D. R., Piepmeyer, J. M., Rockwell, S. & Knisely, J. P. Polarographic measurements of oxygen tension in human glioma and surrounding peritumoral brain tissue. *Radiother. Oncol.* **53**, 127–131 (1999).
- Hockel, M. & Vaupel, P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J. Natl Cancer Inst.* **93**, 266–276 (2001).
- Vaupel, P., Thews, O. & Hoeckel, M. Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia. *Med. Oncol.* **18**, 243–259 (2001).
- Weiler, M. et al. mTOR target NDRG1 confers MGMT-dependent resistance to alkylating chemotherapy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **111**, 409–414 (2014).
- Pitter, K. L. et al. Corticosteroids compromise survival in glioblastoma. *Brain* **139** (Part 5), 1458–1471 (2016).
- Chinnaiyan, P. et al. A randomized phase II study of everolimus in combination with chemoradiation in newly diagnosed glioblastoma: results of NRG Oncology RTOG 0913. *Neuro Oncol.* **20**, 666–673 (2017).
- Wick, W. et al. Phase II study of radiotherapy and temsirolimus versus radiochemotherapy with temozolomide in patients with newly diagnosed glioblastoma without MGMT promoter hypermethylation (EORTC 26082). *Clin. Cancer Res.* **22**, 4797–4806 (2016).

Supplementary Fig. 1

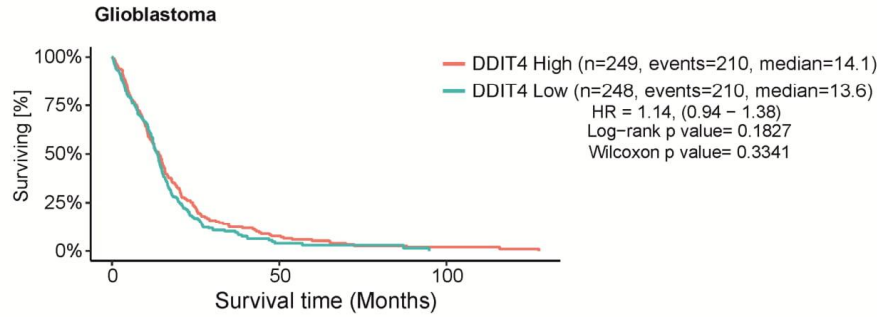


Supplementary Figure 1. DDIT4 expression and mTORC1 regulation.

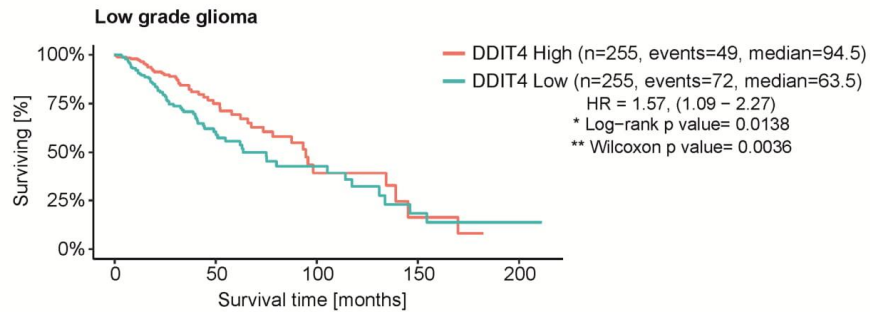
A, DDIT4 protein content in common glioma cell lines (LNT-229, U87, T98G, LN-18, LN-308, U251MG, U138MG, D247MG, A172, LN-428, LN-319, U373MG), HEK293T and HT29 colon carcinoma cells. Cellular lysates were analysed by immunoblot with antibodies for DDIT4 or actin. B, LNT-229 cells were incubated in DMEM with different glucose concentrations with or without 10% FCS under normoxic or hypoxic (0.1% oxygen) conditions for 8 h as indicated. Cellular lysates were analysed with antibodies for DDIT4, HIF-1 α , P-4EBP1, 4EBP1 and actin. C, LNT-229 cells were incubated in DMEM containing 10% FCS for 24 h. Cellular lysates were analysed with antibodies for DDIT4, P-S6K1, 4EBP1 and actin. D, LNT-229 NTsh and DDIT4sh cells were incubated in DMEM with 10%FCS, cellular lysates were analysed with antibodies to DDIT4, P-S6K1, S6K1, P-4EBP1, 4EBP1, P-RPS6 and actin. E, LNT-229 NTsh and DDIT4sh cells were incubated in 2 mM glucose DMEM for 8 h under normoxic or hypoxic (0.1% oxygen) conditions, cellular lysates were analysed with antibodies to DDIT4 and actin. F, LNT-229 NTsh and DDIT4sh cells were incubated in DMEM with 10%FCS for 24 h with vehicle or temozolomide as indicated, cellular lysates were analysed with antibodies to DDIT4 and actin. G, cDNA was prepared after the indicated passage number from LNT-229 cells transfected with the plasmids pcDNA3 or pcDNA3 HA-DDIT4 and analysed by QPCR. H, LNT.229, G55 and LN-308 cells were incubated for 24 h in serum free medium containing 5 μ M dexamethasone (Dexa). Cellular lysates were analysed by immunoblot with antibodies for DDIT4 or actin.

Supplementary Fig. 2

A



B



Supplementary Figure 2. Correlation analyses of DDIT4 gene expression.

A,B, correlation of DDIT4 gene expression (median split for high and low DDIT4 expressing tumours) and patient survival in the TCGA glioblastoma (primary tumours) (A) and TCGA low grade glioma (B) dataset.

7 Darstellung des eigenen Anteils

Ich habe die Versuche zu den Fig. 1, 2, 3, 4 sowie Supplementary Fig.1 G und H durchgeführt und ausgewertet.

Des Weiteren habe ich eine Primärfassung des Manuskripts verfasst, die als Grundlage für die Publikation diene.

8 Literatur

1. Ostrom QT, Gittleman H, Truitt G, Boscia A, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011-2015. *Neuro-oncology* 2018; 20(suppl_4):iv1-iv86. doi: 10.1093/neuonc/noy131.
2. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre P-L et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* 2004; 64(19):6892–9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1337.
3. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352(10):987–96. doi: 10.1056/NEJMoa043330.
4. Stupp R, Taillibert S, Kanner A, Read W, Steinberg D, Lhermitte B 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):2306–16. doi: 10.1001/jama.2017.18718.
5. Vleeschouwer Sd, Hrsg. Glioblastoma. Brisbane, Australia: Codon Publications; 2017.
6. Testa U, Castelli G, Pelosi E. Lung Cancers: Molecular Characterization, Clonal Heterogeneity and Evolution, and Cancer Stem Cells. *Cancers (Basel)* 2018; 10(8). doi: 10.3390/cancers10080248.
7. Mojas N, Lopes M, Jiricny J. Mismatch repair-dependent processing of methylation damage gives rise to persistent single-stranded gaps in newly replicated DNA. *Genes Dev* 2007; 21(24):3342–55. doi: 10.1101/gad.455407.
8. Zhang J, Stevens MFG, Bradshaw TD. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Curr Mol Pharmacol* 2012; 5(1):102–14.
9. Gerson SL. MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(4):296–307. doi: 10.1038/nrc1319.

10. CABRINI G, FABBRI E, Lo NIGRO C, DECHECCHI MC, GAMBARI R. Regulation of expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase and the treatment of glioblastoma (Review). *Int J Oncol* 2015; 47(2):417–28. doi: 10.3892/ijo.2015.3026.
11. Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, Hamou M-F, Tribolet N de, Weller M et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352(10):997–1003. doi: 10.1056/NEJMoa043331.
12. Alvino E, Castiglia D, Caporali S, Pepponi R, Caporaso P, Lacal PM et al. A single cycle of treatment with temozolomide, alone or combined with O(6)-benzylguanine, induces strong chemoresistance in melanoma cell clones in vitro: role of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase and the mismatch repair system. *Int J Oncol* 2006; 29(4):785–97.
13. Weller M, Cloughesy T, Perry JR, Wick W. Standards of care for treatment of recurrent glioblastoma--are we there yet? *Neuro-oncology* 2013; 15(1):4–27. doi: 10.1093/neuonc/nos273.
14. Chinot OL, Wick W, Mason W, Henriksson R, Saran F, Nishikawa R et al. Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med* 2014; 370(8):709–22. doi: 10.1056/NEJMoa1308345.
15. Brennan CW, Verhaak RGW, McKenna A, Campos B, Nounshmehr H, Salama SR et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 2013; 155(2):462–77. doi: 10.1016/j.cell.2013.09.034.
16. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 2008; 455(7216):1061–8. doi: 10.1038/nature07385.
17. Akhavan D, Cloughesy TF, Mischel PS. mTOR signaling in glioblastoma: lessons learned from bench to bedside. *Neuro-oncology* 2010; 12(8):882–9. doi: 10.1093/neuonc/noq052.
18. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 2012; 149(2):274–93. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.017.

19. Orlova KA, Crino PB. The tuberous sclerosis complex. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1184:87–105. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05117.x.
20. Ronellenfitsch MW, Steinbach JP, Wick W. Epidermal growth factor receptor and mammalian target of rapamycin as therapeutic targets in malignant glioma: current clinical status and perspectives. *Target Oncol* 2010; 5(3):183–91. doi: 10.1007/s11523-010-0154-5.
21. Wick W, Gorlia T, Bady P, Platten M, van den Bent MJ, Taphoorn MJB et al. Phase II Study of Radiotherapy and Temsirolimus versus Radiochemotherapy with Temozolomide in Patients with Newly Diagnosed Glioblastoma without MGMT Promoter Hypermethylation (EORTC 26082). *Clin Cancer Res* 2016; 22(19):4797–806. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-3153.
22. Chinnaiyan P, Won M, Wen PY, Rojiani AM, Werner-Wasik M, Shih HA et al. A randomized phase II study of everolimus in combination with chemoradiation in newly diagnosed glioblastoma: results of NRG Oncology RTOG 0913. *Neuro-oncology* 2018; 20(5):666–73. doi: 10.1093/neuonc/nox209.
23. Ronellenfitsch MW, Brucker DP, Burger MC, Wolking S, Tritschler F, Rieger J et al. Antagonism of the mammalian target of rapamycin selectively mediates metabolic effects of epidermal growth factor receptor inhibition and protects human malignant glioma cells from hypoxia-induced cell death. *Brain* 2009; 132(Pt 6):1509–22. doi: 10.1093/brain/awp093.
24. Steinbach JP, Klumpp A, Wolburg H, Weller M. Inhibition of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Protects Human Malignant Glioma Cells from Hypoxia-Induced Cell Death. *Cancer Res* 2004; 64(5):1575–8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-3775.
25. Thiebold A-L, Lorenz NI, Foltyn M, Engel AL, Divé I, Urban H et al. Mammalian target of rapamycin complex 1 activation sensitizes human glioma cells to hypoxia-induced cell death. *Brain* 2017; 140(10):2623–38. doi: 10.1093/brain/awx196.
26. Shoshani T, Faerman A, Mett I, Zelin E, Tenne T, Gorodin S et al. Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene, RTP801, involved in apoptosis. *Mol Cell Biol* 2002; 22(7):2283–93.

27. Ellisen LW, Ramsayer KD, Johannessen CM, Yang A, Beppu H, Minda K et al. REDD1, a developmentally regulated transcriptional target of p63 and p53, links p63 to regulation of reactive oxygen species. *Mol Cell* 2002; 10(5):995–1005.
28. Sofer A, Lei K, Johannessen CM, Ellisen LW. Regulation of mTOR and Cell Growth in Response to Energy Stress by REDD1. *Mol Cell Biol* 2005; 25(14):5834–45. doi: 10.1128/MCB.25.14.5834-5845.2005.
29. Wang Z, Malone MH, Thomenius MJ, Zhong F, Xu F, Distelhorst CW. Dexamethasone-induced gene 2 (dig2) is a novel pro-survival stress gene induced rapidly by diverse apoptotic signals. *J Biol Chem* 2003; 278(29):27053–8. doi: 10.1074/jbc.M303723200.
30. Brugarolas J, Lei K, Hurley RL, Manning BD, Reiling JH, Hafen E et al. Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev* 2004; 18(23):2893–904. doi: 10.1101/gad.1256804.
31. DeYoung MP, Horak P, Sofer A, Sgroi D, Ellisen LW. Hypoxia regulates TSC1/2–mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14–3–3 shuttling. *Genes Dev* 2008; 22(2):239–51. doi: 10.1101/gad.1617608.
32. Collingridge DR, Piepmeier JM, Rockwell S, Knisely JP. Polarographic measurements of oxygen tension in human glioma and surrounding peritumoural brain tissue. *Radiother Oncol* 1999; 53(2):127–31.
33. Hockel M, Vaupel P. Tumor Hypoxia: Definitions and Current Clinical, Biologic, and Molecular Aspects. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 2001; 93(4):266–76. doi: 10.1093/jnci/93.4.266.
34. Ishii N, Maier D, Merlo A, Tada M, Sawamura Y, Diserens AC et al. Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. *Brain Pathol* 1999; 9(3):469–79.
35. Berens C, Hillen W. Gene regulation by tetracyclines. Constraints of resistance regulation in bacteria shape TetR for application in eukaryotes. *Eur J Biochem* 2003; 270(15):3109–21. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03694.x.

36. T. Das A, Tenenbaum L, Berkhout B. Tet-On Systems For Doxycycline-inducible Gene Expression. *CGT* 2016; 16(3):156–67. doi: 10.2174/1566523216666160524144041.
37. Seidel S, Garvalov BK, Wirta V, Stechow L von, Schänzer A, Meletis K et al. A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 alpha. *Brain* 2010; 133(Pt 4):983–95. doi: 10.1093/brain/awq042.
38. Luger A-L, Sauer B, Lorenz NI, Engel AL, Braun Y, Voss M et al. Doxycycline Impairs Mitochondrial Function and Protects Human Glioma Cells from Hypoxia-Induced Cell Death: Implications of Using Tet-Inducible Systems. *Int J Mol Sci* 2018; 19(5). doi: 10.3390/ijms19051504.
39. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* 2007; 21(21):2683–710. doi: 10.1101/gad.1596707.
40. Franken NAP, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* 2006; 1(5):2315–9. doi: 10.1038/nprot.2006.339.
41. Hammond LA, Eckardt JR, Baker SD, Eckhardt SG, Dugan M, Forral K et al. Phase I and pharmacokinetic study of temozolomide on a daily-for-5-days schedule in patients with advanced solid malignancies. *J Clin Oncol* 1999; 17(8):2604–13. doi: 10.1200/JCO.1999.17.8.2604.
42. Rosso L, Brock CS, Gallo JM, Saleem A, Price PM, Turkheimer FE et al. A new model for prediction of drug distribution in tumor and normal tissues: pharmacokinetics of temozolomide in glioma patients. *Cancer Res* 2009; 69(1):120–7. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2356.
43. Monteiro AR, Hill R, Pilkington GJ, Madureira PA. The Role of Hypoxia in Glioblastoma Invasion. *Cells* 2017; 6(4). doi: 10.3390/cells6040045.
44. Rong Y, Durden DL, van Meir EG, Brat DJ. 'Pseudopalisading' necrosis in glioblastoma: a familiar morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006; 65(6):529–39.

45. Vaupel P, Höckel M, Mayer A. Detection and characterization of tumor hypoxia using pO₂ histography. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9(8):1221–35. doi: 10.1089/ars.2007.1628.
46. Vaupel P, Thews O, Hoekel M. Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia. *Med Oncol* 2001; 18(4):243–59. doi: 10.1385/MO:18:4:243.
47. Chiang GG, Abraham RT. Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by p70S6 kinase. *J Biol Chem* 2005; 280(27):25485–90. doi: 10.1074/jbc.M501707200.
48. Westphal M, Heese O, Steinbach JP, Schnell O, Schackert G, Mehdorn M et al. A randomised, open label phase III trial with nimotuzumab, an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in the treatment of newly diagnosed adult glioblastoma. *Eur J Cancer* 2015; 51(4):522–32. doi: 10.1016/j.ejca.2014.12.019.
49. Ronellenfitch MW, Zeiner PS, Mittelbronn M, Urban H, Pietsch T, Reuter D et al. Akt and mTORC1 signaling as predictive biomarkers for the EGFR antibody nimotuzumab in glioblastoma. *Acta Neuropathol Commun* 2018; 6(1):81. doi: 10.1186/s40478-018-0583-4.
50. Rapisarda A, Hollingshead M, Uranchimeg B, Bonomi CA, Borgel SD, Carter JP et al. Increased antitumor activity of bevacizumab in combination with hypoxia inducible factor-1 inhibition. *Mol Cancer Ther* 2009; 8(7):1867–77. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0274.
51. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, Deimling A von, Figarella-Branger D, Cavenee WK et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* 2016; 131(6):803–20. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1.
52. Wick W, Dettmer S, Berberich A, Kessler T, Karapanagiotou-Schenkel I, Wick A et al. N2M2 (NOA-20) phase I/II trial of molecularly matched targeted therapies plus radiotherapy in patients with newly diagnosed non-MGMT hypermethylated glioblastoma. *Neuro-oncology* 2019; 21(1):95–105. doi: 10.1093/neuonc/noy161.

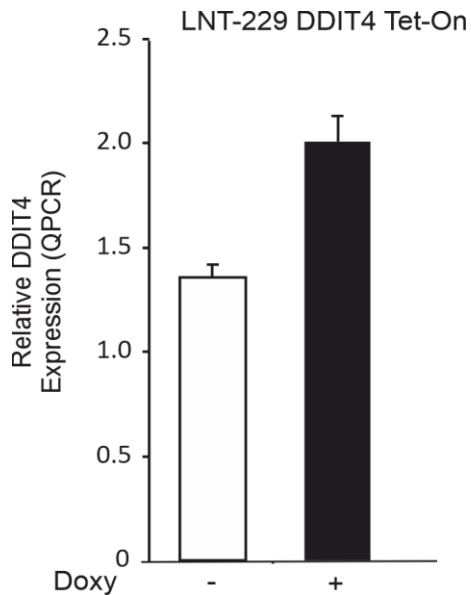
53. Weiler M, Bähr O, Hohlweg U, Naumann U, Rieger J, Huang H et al. BCL-xL: time-dependent dissociation between modulation of apoptosis and invasiveness in human malignant glioma cells. *Cell Death Differ* 2006; 13(7):1156–69. doi: 10.1038/sj.cdd.4401786.

9 Anhang

Weitere zur Charakterisierung von DDIT4 durchgeführte Experimente, die nicht in die Publikation mit aufgenommen wurden.

A) Herstellung von LNT-229 DDIT4 Tet-On Zellen

LNT-229 Zellen, die den reverse Tetracycline-controlled transactivator (rtTA) unter Kontrolle eines CMV Promotors und einer Neomycin-Resistenz Kasette exprimieren, waren bereits vorhanden und ein Geschenk von Markus Weiler (53). Analog zu den G55 DDIT4 Tet-Off Zellen wurden diese mit dem pTRE2 hygro Plasmid mit der HA-DDIT4 Sequenz unter einem Tet-responsiven Promotor transfiziert. In Anwesenheit von Doxycyclin bindet rtTA an diesen Promotor und aktiviert die Transkription, in Abwesenheit von Doxycyclin findet diese Bindung und die daraus folgende Aktivierung nicht mehr statt. LNT-229 DDIT4 Tet-On Zellen zeigten auf RNA Ebene eine Doxycyclin-abhängige DDIT4 Überexpression (Anhang Fig. 1).



Anhang Fig. 1. Induktion einer DDIT4-Transkription in LNT-229 DDIT4 Tet-On Zellen.

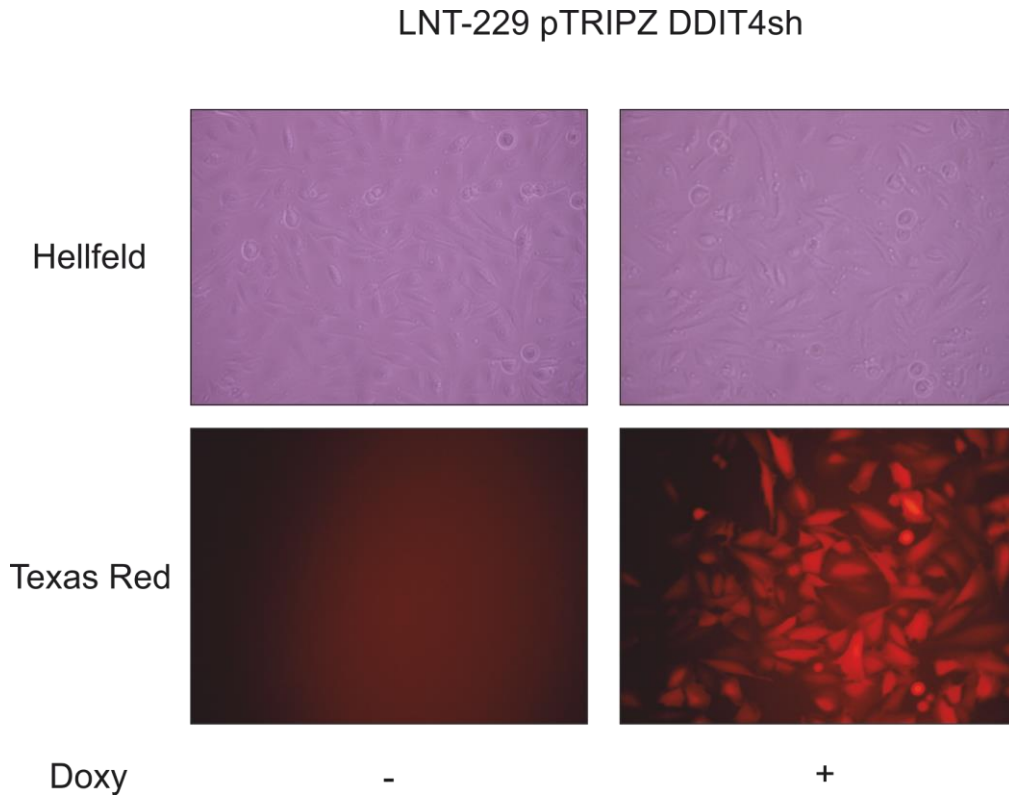
LNT-229 DDIT4 Tet-On Zellen wurden 3 Tage in serumfreiem Medium mit und ohne 1 µg / ml Doxycyclin (Doxy) inkubiert. Die Genexpression wurde mittels QPCR gemessen. DDIT4 Expression normalisiert auf 18S und SDHA.

Im Gegensatz zu den G55 DDIT4 Tet-Off Zellen, war das Ausmaß der DDIT4 Regulation geringer, weswegen die LNT-229 Tet-On Zellen nicht weiterverwendet wurden.

B) Herstellung von LNT-229 Zellen mit induzierbarer DDIT4 Gensuppression

Mithilfe des Plasmidsystems pTRIPZ (Openbiosystem) mit einer gegen DDIT4 gerichteten shRNA Sequenz gelang es LNT-229 Zellen mit einer Tetracyclin-induzierten Gensuppression herzustellen. Auch hierbei handelt es sich, wie in Teil A des Anhangs, um ein Tet-On System, das jedoch alle relevanten Komponenten auf nur einem Plasmid vereint: Einen konstitutiv-aktiven Promotor zur Expression von rtTA, welches in Anwesenheit von Doxycyclin an das ebenfalls auf dem Plasmid codierte Tetracycline response Element bindet, um die Transkription der nachgeschalteten Gene zu induzieren. Diese wiederum umfassen einerseits das „Gene of Interest“, in unserem Fall eine DDIT4sh Sequenz, sowie ein *Red*

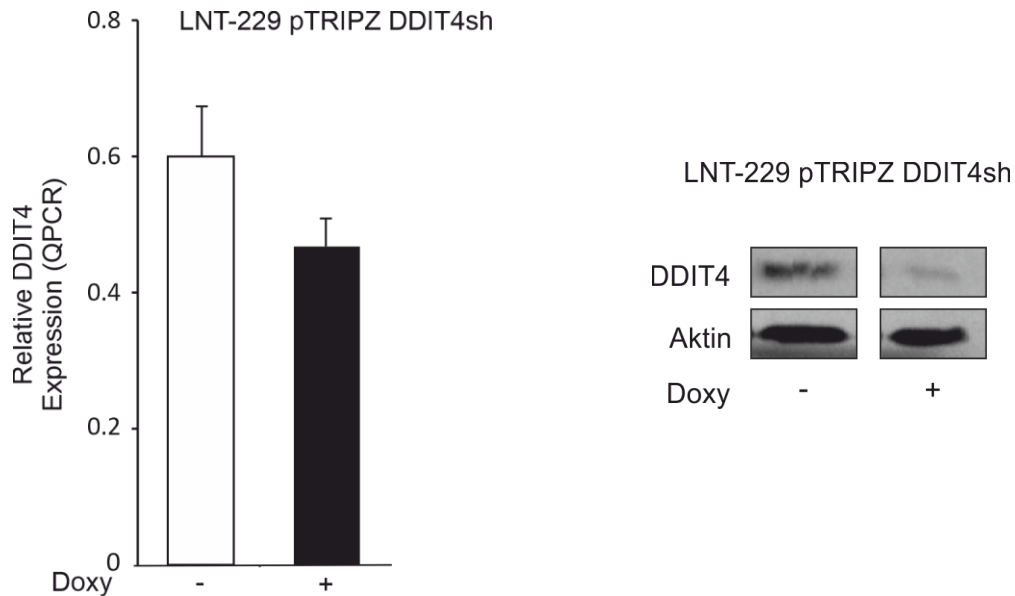
Fluorescent Protein (RFP) Gen. Somit lassen sich entsprechend transfizierte Zellen in Anwesenheit von Doxycyclin durch Fluoreszenzmessung an der roten Farbe erkennen (Anhang Fig. 2).



Anhang Fig. 2. Nachweis einer roten Fluoreszenz in LNT-229 pTRIPZ DDIT4sh Zellen.

LNT-229 pTRIPZ DDIT4sh Zellen wurden 3 Tage in serumfreiem Medium mit und ohne 1 µg / ml Doxycyclin (Doxy) inkubiert. Am. 3. Tag wurden Fotos in 1000-facher Vergrößerung mittels Hellfeldmikroskopie und Einsatz eines Fluoreszenzfilters für Texas Red akquiriert. Zellen, die das pTRIPZ DDIT4sh Plasmid exprimieren, leuchten in Anwesenheit von Doxycyclin, unter Verwendung des Fluoreszenzfilters für Texas Red, rot.

Eine Gensuppression konnte sowohl auf Protein- als auch RNA Niveau nachgewiesen werden (Anhang Fig. 3)



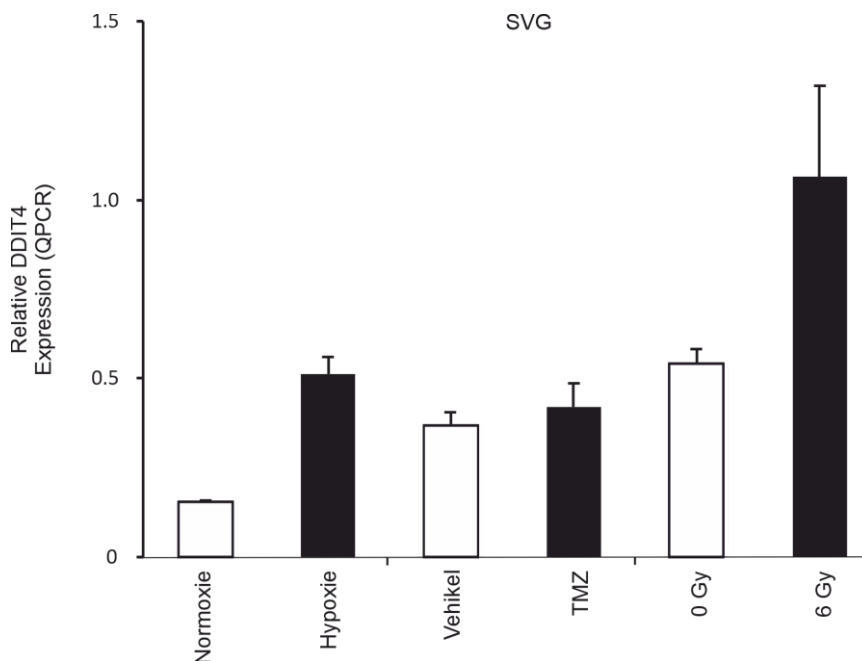
Anhang Fig. 3. Induktion einer DDIT4-Gensuppression mit dem Plasmid pTRIPZ in LNT-229 Zellen.

LNT-229 pTRIPZ DDIT4sh Zellen wurden 3 Tage in serumfreiem Medium mit und ohne 1 µg / ml Doxycyclin (Doxy) inkubiert. Die hergestellte cDNA wurde in der QPCR analysiert und die DDIT4 Expression, normalisiert auf 18S und SDHA, bestimmt (linke Seite). Lysate wurden mit dem Antikörper gegen DDIT4 und Aktin im Westernblot untersucht (rechte Seite).

Das Ausmaß der DDIT4 Gensuppression war vergleichsweise gering, so dass mit den LNT-229 pTRIPZ DDIT4sh Zellen keine weiteren Experimente durchgeführt wurden.

C) DDIT4 Regulation in immortalisierten Astrozyten

Um zu untersuchen, ob es sich bei den beobachteten Regulationsmechanismen um einen GB zellspezifischen Effekt handelt, wurden Experimente mit der immortalisierten Astrozyten-Zelllinie SVG durchgeführt. Auf Genexpressionsebene konnte in SVG Zellen ebenfalls eine DDIT4 Induktion durch Hypoxie und Bestrahlung gezeigt werden. Hingegen war eine Regulierung durch TMZ nicht nachweisbar (Anhang Fig. 4).



Anhang Fig. 4. DDIT4 Regulation in SVG Zellen.

SVG Zellen wurden 24 Stunden in serumfreiem Medium unter normoxischen Bedingungen (21% Sauerstoff, Normoxie) oder 0,1% Sauerstoff (Hypoxie) inkubiert. In einem zweiten Versuch wurden die Zellen für 24 Stunden in serumfreiem Medium, das 100 μ M TMZ oder 100 μ M DMSO (Vehikel) enthielt, inkubiert. SVG Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt oder in die Bestrahlungskammer gebracht, und nicht unter den Röntgenstrahl gestellt (0 Gy). DDIT4 Expression normalisiert auf 18S und SDHA.

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

Der mTORC1-Regulator DDIT4 als Angriffspunkt neuer Strategien zur Überwindung von Chemotherapie- und Hypoxieresistenz maligner Gliome

am Dr. Senckenbergischen Institut für Neuroonkologie am Zentrum der Neurologie und Neurochirurgie unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Joachim Steinbach mit Unterstützung durch Dr. Dr. Michael Ronellenfitsch 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:

Foltyn M, Luger A-L, Lorenz NI, Sauer B, Mittelbronn M, Harter PN, Steinbach JP and Ronellenfitsch MW, The physiological mTOR complex 1 inhibitor DDIT4 mediates therapy resistance in glioblastoma, British Journal of Cancer, 120(5),481-487, 2019

Frankfurt am Main,

(Ort, Datum)

(Unterschrift)