

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

betreut am
Zentrum der Neurologie und Neurochirurgie
Funktionsbereich Neuroonkologie
Direktor: Prof. Dr. Joachim P. Steinbach

**Die Bedeutung der Integrierten Stressantwort für die
Adaptation humaner Glioblastomzellen an Bedingungen des
Tumormikromilieus**

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

vorgelegt von
Alina Christin Madeleine Sittig
aus Wiesbaden-Dotzheim

Frankfurt am Main, 2023

Dekan:	Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referent:	Prof. Dr. Dr. Michael Ronellenfitsch
Korreferent/in:	Prof. Dr. Elke Hattingen
Tag der mündlichen Prüfung:	07.12.2023

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Glioblastom Epidemiologie und Therapie.....	5
1.2	Gliommikromilieu und die Bedeutung der integrierten Stressantwort... 5	
1.3	ISR-Aktivierung über PERK und GCN2	7
1.4	Regulation der ATF4 Translation über den eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 2.....	7
1.5	Transkriptionelle Regulation von ATF4	10
1.6	Unter Mangelbedingungen führt ATF4 zu Anpassungsvorgängen, Proliferation und Zellüberleben in humanen Tumoren	11
1.7	Gesteigerte ATF4 Level führen zu einer verminderten TMZ Sensibilität humaner Glioblastomzellen.....	12
1.8	Pharmakologische Induktion der ISR.....	12
1.9	Pharmakologische Hemmung der UPR	13
1.10	Hypothese.....	14
2	Material und Methoden.....	15
2.1	Reagenzien, Zelllinien und Zellkultur	15
2.2	Mykoplasmentest	16
2.3	Bestimmung der Zelldichte mittels Kristallviolett färbung (KV)	16
2.4	Lentivirale Transduktion humaner GB Zellen zur Gensuppression von ATF4	17
2.5	Nährstoffmangelbedingungen	18
2.6	Untersuchung von Zellen in der Hypoxie	18
2.7	Proteinextraktion	18
2.8	Bestimmung der Proteinkonzentration	18
2.9	SDS-PAA-Gelelektrophorese.....	19
2.10	Immunoblot und verwendete Antikörper.....	20
2.11	RNA Extraktion und cDNA Synthese	20
2.12	Quantitative PCR Analyse und Primersequenzen.....	21
2.13	Quantifizierung des zellulären Überlebens.....	22
2.14	Klonogenitätsassay	23
2.15	Sauerstoffverbrauch.....	23
2.16	Statistische Berechnungen	23

3	Ergebnisse	24
3.1	Humane Glioblastomzelllinien unterscheiden sich in ihrer basalen <i>ATF4</i> mRNA Expression	24
3.2	Etablierung eines Antikörpers zur Bestimmung des <i>ATF4</i> Proteingehalts	25
3.3	Tunicamycin und Thapsigargin führen zur dosisabhängigen <i>ATF4</i> Induktion in humanen GB Zellen	25
3.4	Glutaminentzug führt zu einer gesteigerten <i>ATF4</i> Expression auf mRNA und Proteinebene	27
3.5	TMZ induziert <i>ATF4</i> Aktivierung	28
3.6	Gensuppression von <i>ATF4</i> führt zu reduzierter Aktivierung der ISR unter Bedingungen des Tumormikromilieus in humanen GB Zellen ..	29
3.7	<i>ATF4</i> Gensuppression sensibilisiert humane GB Zellen für Hypoxie- induzierten Zelltod und erhöht den Sauerstoffverbrauch.....	32
3.8	<i>ATF4</i> Gensuppression sensibilisiert GB Zellen für TMZ	34
3.9	Pharmakologische PERK-Inhibition führt unter Stressbedingungen zu einer verminderten <i>ATF4</i> Expression	36
4	Diskussion	40
5	Zusammenfassung	49
6	Summary	51
7	Literaturverzeichnis	53
8	Abbildungsverzeichnis.....	59
9	Tabellenverzeichnis	60
10	Schriftliche Erklärung	61
11	Lebenslauf.....	62

1 Einleitung

1.1 Glioblastom Epidemiologie und Therapie

Glioblastome (GB) sind mit einer Jahresinzidenz von 3,32 pro 100.000 (bei Männern) bzw. 2,24 pro 100.000 (bei Frauen) die häufigsten malignen primären Hirntumore Erwachsener und haben mit einer mittleren Überlebensrate von unter einem Jahr in nicht selektierten Kohorten eine schlechte Prognose (Ohgaki et al. 2004). Aktuelle Therapieansätze sind palliativ und setzen sich aus operativer (Teil-) Resektion sowie Strahlen- und Chemotherapie mit dem alkylierenden Chemotherapeutikum Temozolomid (TMZ) zusammen (Stupp et al. 2005). Die schlechte Prognose der Erkrankung resultiert aus einer ausgeprägten Therapieresistenz. Dabei lässt sich zwischen primärer Therapieresistenz, bei der die Tumorzellen bereits initial nicht auf die Therapie ansprechen und sekundärer, durch zelluläre Anpassungsmechanismen im Verlauf der Therapie entstehender, Therapieresistenz unterscheiden.

1.2 Gliomikromilieu und die Bedeutung der integrierten Stressantwort

Bedingt durch das oft schnelle Tumorstadium kommt es innerhalb des Tumormikromilieus zu Mangelbedingungen mit verminderter Sauerstoff- oder Nährstoffverfügbarkeit. Um dennoch das Zellüberleben zu sichern, ermöglichen verschiedene Anpassungsmechanismen die Aufrechterhaltung einer Homöostase. In diesem Zusammenhang stellt die integrierte Stressantwort (*integrated stress response*, ISR) einen wichtigen Adaptationsmechanismus dar. Diese kann durch zahlreiche Stressoren, wie z. B. die Akkumulation fehlgefalteter Proteine am endoplasmatischen Retikulum (ER-Stress), aber auch als Reaktion auf Hypoxie oder Aminosäure- und Glukosemangel induziert werden (Wek et al. 2006; Rzymiski et al. 2010; Pakos-Zebrucka et al. 2016; Peñaranda Fajardo et al. 2016). Mechanistisch katalysieren verschiedene Proteinkinasen wie PERK (*protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase*) oder GCN2 (*general control nonderepressible 2*) bei der ISR die Phosphorylierung der alpha Untereinheit des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors 2 (eIF2 α), was eine anschließende translationale Induktion des aktivierenden

Transkriptionsfaktors 4 (ATF4) bedingt (Rzymiski et al. 2010). ATF4 stellt den zentralen Effektor der ISR da und wird häufig als Marker für deren Aktivierung verwendet (Pakos-Zebrucka et al. 2016; Ameri und Harris 2008). Über eine Leucin-Zipper Region interagiert ATF4 mit zahlreichen anderen Transkriptionsfaktoren und aktiviert eine Vielzahl an Zielgenen mit Funktionen in der Aminosäuresynthese, Angiogenese, Metastasierung und Therapieresistenz und steuert so adaptive Programme (Abb. 1) (Ameri und Harris 2008; Pakos-Zebrucka et al. 2016).

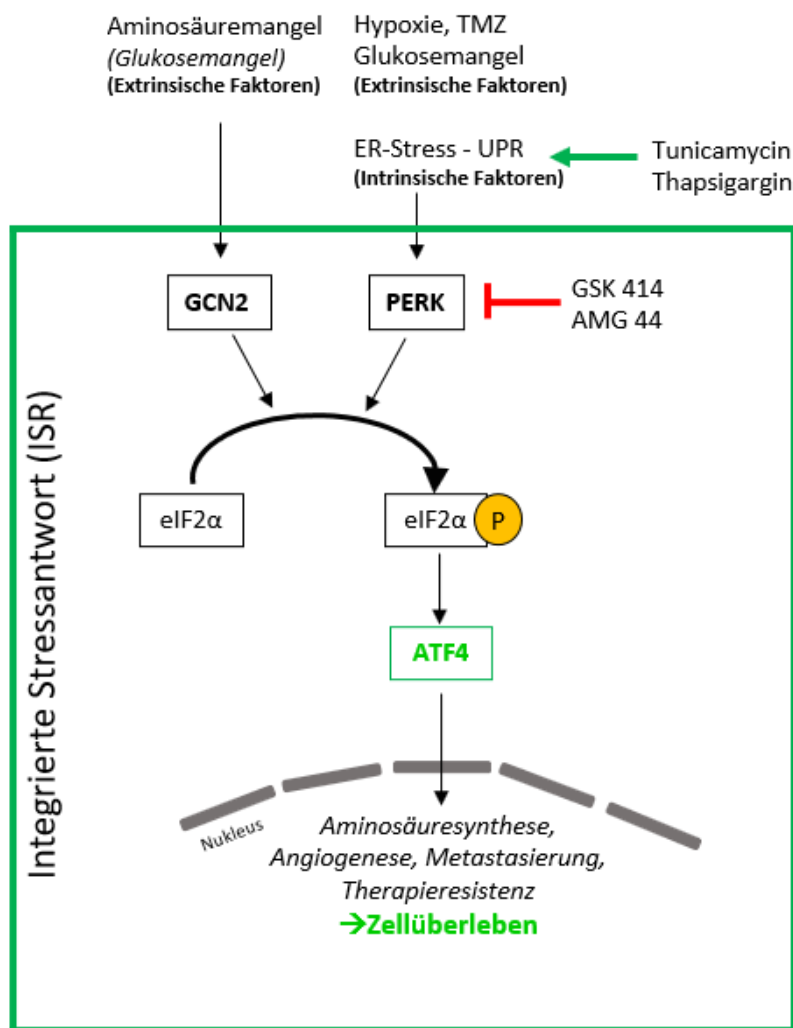


Abbildung 1 Schematische Darstellung der ISR.

Die ISR kann auf verschiedene Weisen induziert werden. Die Kinase PERK kann durch extrinsische Faktoren wie Hypoxie, TMZ und Glukosemangel, aber auch durch intrinsische Faktoren wie ER-Stress, der beispielsweise durch die Akkumulation fehl- oder ungefalteter Proteine entsteht, aktiviert werden. Unter

Aminosäuremangel, welcher indirekt auch durch Glukosemangel bedingt sein kann, kommt es über die Kinase GCN2 zur Aktivierung der ISR. Der zentrale Schritt der ISR ist die Phosphorylierung von eIF2 α . Dies führt zur Modulation der Translation und dadurch zur Induktion des zentralen Transkriptionsfaktors ATF4, welcher adaptive Programme steuert.

1.3 ISR-Aktivierung über PERK und GCN2

Vier Proteinkinasen (PERK, GCN2, PKR; HRI) können die Phosphorylierung von eIF2 α an Serin 51 katalysieren, was den zentralen Vorgang zur Aktivierung der ISR darstellt. Die Kinase PERK wird vor allem bei endoplasmatischem Retikulum Stress aktiviert. PERK liegt im ungestressten Zustand der Zelle in monomerer Form in der Membran des endoplasmatischen Retikulums vor und ist an der luminalen Seite mit dem Chaperon GRP78/BIP (*78-kDa Glukose-reguliertes Protein*) assoziiert (s. Kapitel 1.4). Kommt es beispielsweise zur Anhäufung ungefalteter Proteine (UPR), dissoziiert GRP78/BIP von der luminalen Domäne ab. Dies führt zu einer Dimerisierung zweier PERK Untereinheiten, was deren Autophosphorylierung bedingt. Diese Autophosphorylierung führt zur Aktivierung, wodurch dann eIF2 α phosphoryliert wird (s. Kapitel 1.4). Ein alternativer Mechanismus, der ebenso die Phosphorylierung und somit die Aktivierung von eIF2 α zur Folge hat, wird über die Kinase GCN2 katalysiert. Die Aktivierung von GCN2 wird hierbei durch die Akkumulation unbeladener tRNA unter Aminosäuremangel initiiert, was zur Dimerisierung von GCN2 und infolgedessen ebenfalls zur Phosphorylierung von eIF2 α führt (Abb. 1).

1.4 Regulation der ATF4 Translation über den eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 2

Der eukaryotische Translationsinitiationsfaktor 2 (eIF2) ist ein Heterotrimer aus drei Untereinheiten (alpha-, beta- und gamma- Untereinheit). Die alpha (α) Untereinheit enthält die wichtige Phosphorylierungsstelle an Serin 51. Die beta (β) Untereinheit enthält die Bindungsstelle für eIF2B, den Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor. Die gamma (γ) Untereinheit bindet die Guanin-Nukleotide GTP und GDP sowie die Met-tRNA (Komar und Merrick 2020).

Die Initiation der Translation erfordert die Bildung eines 80S-Initiationskomplexes. Dazu assoziiert, in nicht gestressten Zellen, unphosphoryliertes eIF2 α mit der Initiator-Methionyl-tRNA und GTP zu einem ternären Komplex. Dieser überträgt dann die Initiator-Methionyl-tRNA auf die 40S ribosomale Untereinheit. Dadurch bildet sich der 43S- Präinitiationskomplex. Durch die Erkennung des Startcodons auf der mRNA, durch den Präinitiator Komplex, erfolgt die GTP-Hydrolyse durch eIF2. eIF2-GDP dissoziiert und die 60S ribosomale Untereinheit bindet eIF2-GDP zur Bildung eines 80S-Initiationskomplexes. Vor Beginn eines nächsten Translationszyklus muss GDP über den Guanidin-Austauschfaktor eIF2B erneut durch GTP ersetzt werden (Wortham und Proud 2015).

Durch Stressbedingungen wie endoplasmatischer Retikulum Stress mit der Anhäufung fehl- oder ungefalteter Proteine, Hypoxie oder Aminosäuremangel kommt es über verschiedene Proteinkinasen wie PERK oder GCN2 zur Phosphorylierung von eIF2 α . Dadurch wird die Affinität von eIF2 für GDP gesteigert, was wiederum die Translationsinitiation und damit die Translation fast aller Proteine insgesamt limitiert. Im Gegensatz hierzu kommt es jedoch zu einer Steigerung der Translation der mRNA von ATF4, welches als Transkriptionsfaktor und Schlüsselmolekül die Anpassungsreaktionen der ISR koordiniert.

Maßgeblich für die gesteigerte Translation von ATF4 sind zwei upstream open reading frames (uORF) in der 5' Region seiner mRNA. uORF1 kodiert für ein Oligopeptid aus drei Aminosäuren. Dieses erleichtert den Scan-Prozess- und die Reinitiation der Ribosomen an der stromabwärts kodierenden Region der ATF4 mRNA. uORF2 kodiert für ein 59 Aminosäuren langes Polypeptid, welches mit dem Startcodon für ATF4 überlappt (Rzymiski et al. 2010). Im ungestressten Zustand ist eIF2 α in der Zelle unphosphoryliert, was höhere eIF2-GTP Level bedingt, weshalb die Translation nicht inhibiert ist. Unter diesen Bedingungen beginnt die Translation der ATF4 mRNA am uORF1 und reinitiiert am uORF2. Da dieser uORF2 mit dem eigentlichen ATF4 Startcodon überlappt wird hierunter die Translation von ATF4 mRNA inhibiert (Abb. 2).

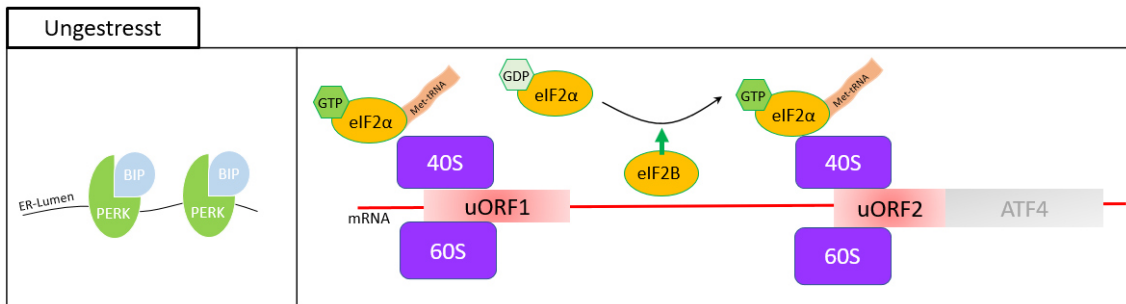


Abbildung 2 Translationale Regulation von ATF4 unter ungestressten Bedingungen.

Die Kinase PERK liegt im ungestressten Zustand der Zelle an das Chaperon BIP gebunden in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) vor.

Im ungestressten Zustand bindet unphosphoryliertes eIF2α die Initiator Met-tRNA sowie GTP und transportiert die Met-tRNA an das 40S Ribosom. Durch die Rekrutierung der 60S ribosomalen Untereinheit kommt es zur Bildung des 80S Ribosoms als Initiationskomplex. Es kommt zur Hydrolyse von GTP durch eIF2α und die Translation beginnt. Durch eIF2B wird GDP wieder durch GTP ersetzt.

Unter Stressbedingungen wird der eIF2α (phospho)-GDP Komplex durch höhere Level von phosphoryliertem eIF2α stabilisiert und es steht weniger GTP-gebundenes eIF2α zur Verfügung. Dies limitiert die generelle Translation, die dann nur verzögert abläuft. Dadurch findet auch die Reinitiation auf der ATF4 mRNA verzögert statt. Es steigt die Wahrscheinlichkeit, dass die Translation deswegen erst am ATF4 Startcodon reinitiiert und den uORF2 überspringt, sodass entsprechend ATF4 unter Stressbedingungen vermehrt translatiert wird (Abb. 3). Die Beendigung der Stressreaktion wird durch eine Rückkopplungsschleife über GADD34 und PP1 zur Dephosphorylierung von eIF2α erreicht. Im Falle irreparabler Schädigung der Zelle kann auch die Apoptose eingeleitet werden.

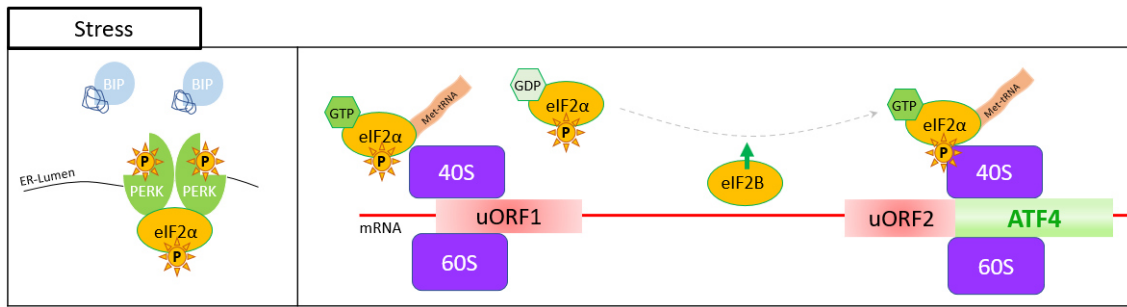


Abbildung 3 Translationale Regulation von ATF4 unter Stressbedingungen.

Unter Stressbedingungen akkumulieren un-/fehlgefaltete Proteine im ER, sodass sich das Chaperon BIP von der Kinase PERK löst, um die un-/fehlgefalteten Proteine zu binden. Dadurch kommt es zur Dimerisierung, Autophosphorylierung und Aktivierung der Kinase PERK, was dann zur Phosphorylierung von eIF2 α führt.

Durch die Phosphorylierung von eIF2 α unter Stressbedingungen wird der eIF2 α -GDP Komplex stabilisiert. Es liegt dadurch weniger eIF2 α /GTP vor, sodass die Reinitiation verzögert stattfindet. Der uORF2 wird (häufiger) übersprungen und die Ribosomen binden direkt am ATF4 Startcodon. Es kommt zu einer Inhibierung der globalen Translation mit gleichzeitig gesteigerter Translation der ATF4 mRNA

1.5 Transkriptionelle Regulation von ATF4

Analysen aus humanen Gliomzellen (LN-229) legen eine mTORC2-PKC-NRF2 abhängige Regulation von ATF4 nahe. In qPCR-Analysen zeigte sich unter Glutaminentzug einen Anstieg der ATF4 mRNA Expression. Auch die Proteinexpression von ATF4 war sowohl unter Glutaminentzug als auch durch die Behandlung mit dem NRF2-Aktivator AI-1 signifikant erhöht. Durch die Behandlung mit dem mTORC2 Inhibitor Torin, sowie durch die Behandlung mit Actinomycin D, einen Inhibitor der RNA-Synthese, konnte die ATF4 Expression vollständig aufgehoben- und durch den PKC-Inhibitor Ro31-8220 weitgehend reduziert werden (Li et al. 2022).

Darüber hinaus wird die Regulation von ATF4 mit dem Enzym Protein methyltransferase 5 (PRMT5) in Zusammenhang gebracht. PRMT5 spielt eine wesentliche Rolle bei der symmetrischen Dimethylierung von Arginin. Es beeinflusst eine breite Palette von Zielproteinen, einschließlich Histonen,

Transkriptionsfaktoren, Signalproteinen, Spleißosom-Assemblierungsfaktoren sowie vielen RNA-bindenden und -verarbeitenden Proteinen. Die vielfältigen Funktionen von PRMT5 umfassen die Regulation der DNA-Schadensreparatur, des Spleißens, der Transkription, der Translation, des Stoffwechsels und der Stressreaktion (Szewczyk et al. 2022).

PRMT5 ist in zahlreichen Karzinomzellen wie Glioblastom-, Lymphom- oder Brustkrebszellen überexprimiert. Die pharmakologische Hemmung von PRMT5 führte zur Expression instabiler ATF4 mRNA, welche im Zellkern zurückgehalten wurde. Gleichzeitig nahm der zytoplasmatische Anteil des gespleißten ATF4 Transkripts ab, sodass es zu niedrigeren ATF4 Proteinspiegeln und einer Herunterregulierung der ATF4 Zielgene kam. Dies führte zu Wachstumsstillstand und vermehrtem oxidativem Stress (Szewczyk et al. 2022). Auch in Glioblastomzellen konnte bereits gezeigt werden, dass die Ausschaltung oder Hemmung von PRMT5 *in vivo* GBM-Tumore wirksam unterdrückt (Braun et al. 2017). Dabei steht allerdings der Nachweis des Zusammenhangs zu ATF4 noch aus.

1.6 Unter Mangelbedingungen führt ATF4 zu Anpassungsvorgängen, Proliferation und Zellüberleben in humanen Tumoren

In verschiedenen humanen Tumoren, wie dem Glioblastom, dem Adenokarzinom der Brust, dem Zervixkarzinom und dem Melanom zeigte sich, verglichen mit nicht tumorös verändertem Gewebe, eine erhöhte ATF4 Expression. Unter hypoxischen Bedingungen kam es zu einer Inhibition der Translation der meisten Proteine bei gleichzeitiger Induktion der Translation von ATF4 via PERK (Bi et al. 2005; Koumenis et al. 2002). In den genannten Tumorentitäten ging ein gesteigerter ATF4 Spiegel mit Tumorprogression und Therapieresistenz einher (Bi et al. 2005; Singleton und Harris 2012; Blais et al. 2004; Rzymiski et al. 2010). Unter ATF4 Gensuppression kam es hingegen zur verminderten Proliferation und vermindertem Zellüberleben. Dieser Effekt ließ sich durch die Zugabe der nicht essenziellen Aminosäure Asparagin revertieren, während ein Asparagininmangel in ATF4-depletierten Zellen zu einer Phosphorylierung von GCN2 und eIF2 α führte (Ye et al. 2010). Da die Asparaginsynthetase (ASNS) ein direktes Zielgen

von ATF4 ist, wurde diese in ATF4 depletierten Zellen weniger exprimiert (Gjymishka et al. 2009; Siu et al. 2002). Zur Synthese von Asparagin benötigt die ASNS Glutamin und Aspartat. ATF4 gensupprimierte Zellen zeigten auch unter Glutaminmangel ein geringeres Überleben im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ye et al. 2010). Konnte in GCN2 depletierten Zellen unter Glutaminmangel die GCN2-eIF2 α -ATF4 Signalkaskade nicht induziert werden, resultierte dies in einem verminderten Zellüberleben und vermehrter Apoptose (Ye et al. 2010). Eine Aktivierung von ATF4 unter Glukosemangelbedingungen ist bisher vor allem über den PERK- eIF2 α -ATF4 -Signalweg beschrieben (Moore et al. 2011; La Cadena et al. 2014). Der GCN- eIF2 α -ATF4 Signalweg kann allerdings auch durch Glukosemangel induziert werden. Kommt es zu Glukosemangel kann das Kohlenstoffgerüst der Aminosäuren als alternative Energiequelle im Citratzyklus metabolisiert werden. Dadurch entsteht ein Aminosäuremangel. Unbeladene tRNA aktiviert als Folge dessen den GCN2-Signalweg. In Untersuchungen an HT1080 Zellen konnte gezeigt werden, dass GCN2 und ATF4 Depletion zu einer gesteigerten Empfindlichkeit auf Glukosemangel führt (Ye et al. 2010).

1.7 Gesteigerte ATF4 Level führen zu einer verminderten TMZ Sensibilität humaner Glioblastomzellen

TMZ wird zur Standardtherapie des Glioblastoms eingesetzt. In U87-MG und U251 GB Zelllinien führte eine Behandlung mit TMZ zu einem Anstieg des ATF4 Spiegels. Es konnte gezeigt werden, dass die Sensibilität ATF4 überexprimierender Zellen gegenüber der Therapie mit TMZ abnahm (Chen et al. 2017b). Umgekehrt reagierten ATF4 gensupprimierte Zellen sensibler auf TMZ Therapie. Die verminderte Sensibilität ATF4 überexprimierender Gliomzellen konnte unter anderem auf die ATF4-vermittelte Regulation des Glutamat/Cystein Antiporters (SLC7A11, xCT) zurückgeführt werden (Chen et al. 2017b).

1.8 Pharmakologische Induktion der ISR

Zur Modulation der ISR können verschiedene Substanzen, wie Tunicamycin und Thapsigargin, die pharmakologischen ER-Stress erzeugen, eingesetzt werden (Peñaranda Fajardo et al. 2016; Harding et al. 2000; Fusakio et al. 2016; Han et

al. 2013). Der Wirkmechanismus von Tunicamycin beruht auf der Inhibition des Enzyms DPAGT1, welches an der N-Glykosylierung von Proteinen im ER maßgeblich beteiligt ist. Durch die Inhibition der N-Glykosylierung entstehen vermehrt fehlgefaltete Proteine, was zu ER-Stress und zur Aktivierung der Unfolded Protein Response (UPR) führt (Bassik und Kampmann 2011). Thapsigargin hemmt die sarkoendoplasmatische Retikulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA). Dadurch kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, da kein Kalzium mehr ins endoplasmatische Retikulum gepumpt werden kann. Die Kalziumkonzentration im endoplasmatischen Retikulum sinkt. Durch die verschobenen Kalziumkonzentrationen können Proteine nicht mehr korrekt gefaltet werden und es kommt zur Akkumulation fehlgefalteter Proteine und zur Aktivierung der UPR (Wang und Kaufman 2014). Beide Substanzen wurden bereits häufig zur pharmakologischen Modulation der integrierten Stressantwort eingesetzt (Peñaranda Fajardo et al. 2016; Fusakio et al. 2016).

1.9 Pharmakologische Hemmung der UPR

Die Hemmung der ISR in humanen Glioblastom Zellen könnte einen vielversprechenden Therapieansatz darstellen. Die Kinase PERK ist maßgeblich an der Regulation der UPR, als Antwort auf die Akkumulation fehlgefalteter Proteine unter Stressbedingungen, beteiligt. Die Aktivierung der UPR konnte bereits in zahlreichen Tumorgeweben nachgewiesen werden. Die Hemmung der Funktion der Kinase PERK könnte zu einer verminderten Anpassungsfähigkeit von Tumorzellen an Bedingungen im Tumormikromilieu führen. Zur Untersuchung dieses Zusammenhangs wurden selektive Inhibitoren der Kinase PERK (GSK2606414 (im Folgenden GSK 414) und AMG PERK 44 (im Folgenden AMG 44)) entwickelt (Axten et al. 2012; Smith et al. 2015). Dabei war der Inhibitor GSK 414 zunächst für den präklinischen Gebrauch bestimmt, während AMG 44 oral verfügbar sein sollte (Smith et al. 2015).

SH-SY5Y und HAT-29 Zellen wiesen nach alleiniger Thapsigargin Behandlung deutlich höhere Level von phosphoryliertem eIF2 α auf als nach gleichzeitiger Behandlung mit Thapsigargin und GSK 414 (Rozpędek et al. 2017). In EMT

Zellen führte die Behandlung mit GSK 414 zu einer verstärkten Sensibilität der Zellen gegen Thapsigargin Behandlung (Feng et al. 2014).

1.10 Hypothese

Unsere Hypothese ist, dass ATF4-vermittelte molekulare Anpassungsmechanismen an Stressbedingungen des Tumormikromilieus (wie z.B. Hypoxie und Nährstoffentzug) im Glioblastom maßgeblich zur Therapieresistenz beitragen und auch die Empfindlichkeit von GB Zellen gegenüber TMZ beeinflussen. Mit genetischen (shRNA) und pharmakologischen (z.B. eIF2 α Inhibitoren, PERK Inhibitoren) Modellen wurden deswegen an Glioblastomzellkulturen in bestimmten Paradigmen Untersuchungen durchgeführt. Übergeordnetes Ziel ist es zu evaluieren, ob eine Inhibition der integrierten Stressantwort über den Transkriptionsfaktor ATF4 die bestehende Therapie verbessern könnte und einen möglichen therapeutischen Angriffspunkt im Glioblastom darstellt.

2 Material und Methoden

2.1 Reagenzien, Zelllinien und Zellkultur

Tunicamycin, Thapsigargin, AMG PERK 44 (AMG 44) und GSK 2606414 (GSK 414) wurden von Tocris (Bristol, UK) erworben. Alle weiteren, nicht spezifizierten Reagenzien wurden von Sigma (Taufkirchen, Deutschland) erworben.

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen Glioblastomzelllinien LNT-229 und G55T2 (in dieser Arbeit abgekürzt als G55) (Eckerich et al. 2009) wurden freundlicherweise von Dr. N. de Tribolet (Lausanne, Schweiz) sowie Manfred Westphal und Kathrin Lamszus (Hamburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die LNT-229-Zellen wurden mittels STR-Analyse von Multiplexion (Heidelberg, Deutschland) authentifiziert. Das STR-Profil der getesteten Zellen stimmte mit dem bekannten Profil für LN-229 überein. LNT-229- und LN-229-Zellen unterscheiden sich nur in ihrem p53-Status. Für die Zelllinie G55 wurde noch kein STR-Profil in den Datenbanken hinterlegt.

MGMT-Promotormethylierungsstatus und Mutationsstatus der Gene IDH1, p53 und PTEN in LNT-229 und G55 Zellen sind bekannt (Thiebold et al. 2017). Der Mutationsstatus der Isocitrat-Dehydrogenase (IDH) wurde durch Sequenzierung für LNT-229-Zellen ermittelt (Birner et al. 2014); (Michel Mittelbronn, persönliche Mitteilung) und durch IDH1 R132H-spezifische Immunfärbung von Zellpellets in allen anderen Zelllinien bestimmt (Thiebold et al. 2017). Der MGMT, IDH- p53- und PTEN Status der verwendeten Zellen ist in Tabelle 1 zusammengefasst.

	MGMT	IDH1	P53	PTEN
LNT-229	Methyliert	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp
G55	Unmethyliert	Wildtyp	Mutant	Unbekannt

Tabelle 1 Eigenschaften der verwendeten Glioblastomzelllinien

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Vollmedium, bestehend aus Dulbecco's modified eagle medium mit 25 mM Glukose und 4 mM Glutamin und Pyruvat (DMEM, Thermo Fisher Scientific, Dreieich), welches mit 10% fetalem Kälberserum (fetal calf serum, FCS) (Biochrom KG, Berlin, Deutschland) sowie

100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) supplementiert wurde.

Für die Untersuchungen unter Nährstoffmangel wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ohne Glukose, Glutamin und Pyruvat (Thermo Fisher Scientific, Dreieich) verwendet. Die Zelllinien wurden bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert.

2.2 Mykoplasmentest

Zur Durchführung eines Mykoplasmentests wurden 2 ml der Zellprobe bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurden 40 µl des Überstandes abgenommen und in ein frisches Gefäß überführt. Aus dem MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit (Lonza, Basel (Schweiz)) wurden 40 µl MycoAlert™ Reagenz zur Probe gegeben. Die Inkubationszeit betrug 5 min. Die Lumineszenz, die mit der ATP Konzentration der Probe korreliert, wurde vor und nach Zugabe des Reagenzes mittels eines Luminometers gemessen. Im Anschluss daran wurde das Verhältnis der erhaltenen Werte aus zweiter und erster Messung berechnet.

Interpretation:

< 0.9	Keine Mykoplasmen
0.9 - 1.2	Zellen Isolieren und nach 24 h erneut testen
> 1.2	Mykoplasmenkontamination

Tabelle 2 Auswertung des Mykoplasmentests

2.3 Bestimmung der Zelldichte mittels Kristallviolett färbung (KV)

Zur Zelldichtebestimmung, für das Erstellen von Wachstumskurven und um zu Versuchsbeginn die gleiche Zelldichte in verschiedenen Zelllinien gewährleisten zu können, wurden Kristallviolett färbungen durchgeführt (Grady et al. 1960; Roth et al. 1997). Kristallviolett (KV) (0,5% Kristallviolett, 20% Methanol) ist ein Triphenylmethanfarbstoff, der die adhärenen und somit vitalen Zellen anfärbt und als Indikator für die Zelldichte genutzt wird. Eine definierte Zellzahl wurde zu Versuchsbeginn pro Well in eine 96-well-, 24-well oder 6-well-Platte ausgesät und dann für 24 Stunden inkubiert. Zur Behandlung der Zellen wurde das Vollmedium abgesaugt, um es nach einem Waschschrift mit PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung) durch das für den jeweiligen Versuch benötigte

Medium zu ersetzen. Nach den angegebenen Intervallen wurde das Behandlungsmedium abgesaugt und die Zellen für 5 min mit KV-Färbelösung gefärbt (50 µl = 96-well Platte, 150 µl = 24-well Platte, 300 µl = 6-well Platte). Anschließend wurde die Kristallviolettlösung abgesaugt und alle Wells dreimal mit vollentsalztem (VE)-Wasser gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Mittels Natriumcitratpuffer (0,1 M Natriumcitrat; 50% Ethanol) wurde das KV nach Trocknung der Platten aus den Zellen gelöst (je nach Platte mit derselben Menge wie zur KV-Färbung) Die Platten wurden in einem Multiscan Photometer (Tecan) bei 595 nm gemessen (Grady et al. 1960). Die Absorption verhält sich dabei proportional zur Zellzahl. Als Leerwert wurden Wells ohne Zellen nach oben beschriebener Kristallviolettfärbung gemessen und der gemessene Wert jeweils abgezogen. Der Mittelwert und die Standardabweichung errechneten sich aus den in Triplets durchgeführten Ansätzen.

2.4 Lentivirale Transduktion humaner GB Zellen zur Gensuppression von ATF4

Die Herstellung von ATF4 gensupprimierten Zellen erfolgte mittels lentiviraler Transduktion unter Verwendung eines pLKO.1-basierten Vektorsystems (Addgene Watertown, USA). Hierzu wurden HEK293 Zellen mit pCMV-dR8.2 dvpr (Addgene, #8455) und pCMV-VSVG (Addgene, #8454) Plasmiden, die für Proteine zur Virusverpackung und Virushülle kodieren, sowie den pLKO.1 Plasmiden, mit der ATF4sh Sequenz (Sigma Aldrich, TRCN0000329695) oder zu Kontrollzwecken mit einer nicht gerichteten Zielsequenz (*non-targeted sh*, NTsh, Addgene #1864) gemäß dem auf Addgene hinterlegten Protokoll transduziert und der Virusüberstand geerntet (<https://www.addgene.org/protocols/plko/>). Als zusätzliches Transduktionsreagenz wurde Polybren eingesetzt. Die Selektion transduzierter ATF4sh- und NTsh-Zellen erfolgte in DMEM mit 2 µg/ml Puromycin (AppliChem, Darmstadt, Deutschland). Die Effizienz der Gensuppression wurde mittels quantitativer reverser Transkriptions-PCR-Analyse (qRT-PCR) und Immunoblot überprüft. Experimente wurden im Zellpool in früher Passage durchgeführt.

2.5 Nährstoffmangelbedingungen

In Versuchen, die unter Nährstoffmangelbedingungen durchgeführt wurden, wurde Serum-freies Medium (SFM) (DMEM mit Glutamin, Pyruvat, Glukose und Phenolrot, ohne Zugabe von FCS) oder Glukose-freies Medium (ohne: Glutamin, Pyruvat, Glukose und Phenolrot, ohne Zugabe von FCS) verwendet. Glukose (2 mM, oder 25 mM) und Glutamin (4 mM) wurden entsprechend den Versuchsbedingungen separat supplementiert.

2.6 Untersuchung von Zellen in der Hypoxie

Die Zellen wurden in Vollmedium ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumswechsel auf Serum-freies Medium mit 2 mM Glukose und 4 mM Glutamin. Die Zellen wurden dann unter normoxischen (21% O₂) oder hypoxischen (0,1% O₂) Bedingungen kultiviert. Zur Induktion eines stark hypoxischen Milieus wurden BD GasPak™ Beutel (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) verwendet (Wanka et al. 2012).

2.7 Proteinextraktion

Zur Proteinextraktion wurden 1.700.000 Zellen in eine 10 cm Platte ausgesät und entsprechend den Versuchsbedingungen behandelt. Nach der angegebenen Inkubationszeit wurde das Behandlungsmedium entfernt und die Zellen mit kaltem PBS gewaschen. Um die Zellmembran aufzubrechen, wurden die Zellkulturschalen in flüssigen Stickstoff gestellt. Mittels eines Zellschabers wurden die Zellen unter Zugabe von Lysepuffer P (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 130 mM NaCl; 0,5% NP-40; 5 mM EDTA pH 8,0, zusätzlich pro 10 ml Lysepuffer P 1 Tablette Protease/Phosphatase Inhibitor (Roche complete, Mini Protease Inhibitor Cocktail-Roche, Mannheim)) abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben für 10 min, 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.8 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung des Proteingehalts der Lysate erfolgte mittels Bradford-Methode. Diese beruht auf einem Farbumschlag des Nachweisreagenz

Coomassie Brilliant Blue von 465 nm nach 595 nm in Gegenwart von Proteinen. In eine 96-well Platte wurden pro Well 50 μl VE-Wasser vorgelegt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben erfolgte durch den Vergleich mit einer Standardreihe mit festgelegten Konzentrationen. Dafür wurde eine BSA-Stammlösung (10 mg/ml) 1:10 mit Wasser verdünnt und nach dem Pipettierschema (Tabelle 3) aufgetragen. Dann wurde von jeder zu bestimmenden Probe 1 μl pro Well als Triplett pipettiert. Das Bradford Reagenz wurde 1:4 mit VE-Wasser verdünnt und davon 150 μl in jedes Well der Platte gegeben. Nach 15-minütiger Inkubation erfolgte die Messung der Absorption bei 595 nm im Multiscan-Photometer (Tecan, Männedorf, Schweiz).

0 μl	0 μl	0 μl	Probe	Probe	Probe						
1 μl	1 μl	1 μl	Probe 1	Probe 1	Probe 1						
2 μl	2 μl	2 μl	Probe 2	Probe 2	Probe 2						
4 μl	4 μl	4 μl	Etc.								
6 μl	6 μl	6 μl									
8 μl	8 μl	8 μl									
10 μl	10 μl	10 μl									
12 μl	12 μl	12 μl									

Tabelle 3 Pipettierschema

BSA-Standardreihe nach Pipettierschema aufgetragen;

Proben jeweils mit 1 μl / Well als Triplett pipettiert.

2.9 SDS-PAA-Gelelektrophorese

Mittels SDS-PAA-Gelelektrophorese erfolgte die Auftrennung von Proteinen anhand ihrer Molekülmasse und Mobilität (Steinbach et al. 2003). Für Immunoblot-Analysen wurden 20 μg Proteinlysate mit einem Drittel des Volumens an 4-fach konzentriertem Lämmli-Puffer (0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 8% SDS, 0,2% Bromphenolblau, 20% Glycerol) gemischt und für 10 min bei 95 °C auf einem Heizblock denaturiert. Die Elektrophorese wurde nach der Gelbeladung mit einer konstanten Spannung von 100 Volt gestartet. Die Gelkonzentration betrug 12%.

2.10 Immunoblot und verwendete Antikörper

Mittels Immunoblot erfolgte, nach Auftrennung der Proteine, die Übertragung auf eine Nitrozellulosemembran. Dies erfolgte unter einer konstanten Spannung von 100 Volt über 60 min im Wet/Tank-Blot Verfahren. Die Übertragung der Proteine wurde mit einer Ponceau Färbung verifiziert. Nach Auswaschen des Ponceaus mit VE-Wasser wurde die Membran mit 5% Milchpulver/TBST für 1 h bei RT geblockt. Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation mit den Primärantikörpern über Nacht bei 4 °C. Als primäre Antikörper wurden ATF4 (Proteintech, Rosemont, IL, USA, 10835-1-AP und Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA, #11815), HIF-1 α (Cell Signaling Technology, #3716) und Aktin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, #sc-1616) verwendet.

Die Membranen wurden nach der Inkubation dreimal für jeweils 10 min mit TBST gewaschen und dann für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (anti-Kaninchen-Antikörper, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA, #111-036-144 und anti-Ziege-Antikörper, Santa Cruz, #sc-2020) (1:5.000 in 5% Milch/TBST) inkubiert. Danach wurde die Membran erneut dreimal für 10 min mit TBST gewaschen.

Zum Nachweis der Proteinbanden wurde eine Chemilumineszenzlösung verwendet. Diese setzte sich aus 1 ml Lösung A (200 ml 0,1 M Tris-HCl pH 8,6, 50 mg Luminol) und 100 μ l Lösung B (11 mg p-Hydroxy-Coumarsiure, 10 ml DMSO) und 0,3 μ l H₂O₂ (30%) zusammen (Thiepold et al. 2017). Nach einigen Minuten Einwirkzeit konnte die Membran mit Filmen (Fuji Super RX-N) entwickelt werden.

2.11 RNA Extraktion und cDNA Synthese

Die Zellen wurden in einer 6-well Platte ausgesät und den Versuchen entsprechend behandelt. Nach der angegebenen Behandlungszeit wurde das Medium abgesaugt und 1 ml Trizol (Thermo Fisher Scientific, Hamburg, Deutschland) für eine Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben und diese anschließend aufgenommen. Danach wurden 200 μ l Chloroform hinzugegeben, für 15 Sekunden geschüttelt und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 13.000 rpm 15 min und 4 °C. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt

und 1:1 mit 70% Ethanol versetzt. Die RNA Aufreinigung erfolgte laut Herstellerprotokoll des EXTRACTME RNA Isolation Kits (Blirt, Gdansk, Poland). Für die cDNA Synthese wurde das Vilo cDNA Synthese Kit (Invitogen, Carlsbad, CA, USA) verwendet. Pro Probe wurden für die cDNA Synthese 1,5 µg RNA, 4 µl Vilo Master Mix (SuperScript VILO Master Mix, Invitrogen, Carlsbad) und die entsprechende Menge Wasser für ein Gesamtvolumen von 20 µl dazu pipettiert. Die cDNA Synthese erfolgte auf einem Heizblock für 10 min bei 25 °C und 2 h bei 42 °C. Um die Reaktion zu stoppen, wurden die Proben für 10 min bei 85 °C inkubiert. Erfolgte die PCR nicht unmittelbar im Anschluss, wurde die cDNA bei -20 °C gelagert.

2.12 Quantitative PCR Analyse und Primersequenzen

Zur Durchführung der quantitativen PCR (qPCR) wurde folgender Ansatz pipettiert: 2 µl cDNA Probe, 12,5 µl SYBR Green Fluorescein q-PCR Mastermix (ThermoFisher Scientific, Hamburg), 7 µl Wasser, 1,75 µl Primerlösung (jeweils „forward“ und „reverse“). Daraus ergab sich ein Gesamtvolumen von 25 µl. Die Primer der Referenz- /Housekeepinggene lagen in einer Stammkonzentration von 100 µM vor und wurden auf eine Konzentration von 1 µM in Wasser vorverdünnt. Die Primer der Testgene lagen ebenfalls in einer Stammkonzentration von 100 µM vor und wurden auf 2 µM in Wasser vorverdünnt. Alle Ansätze wurden in Tripletts pipettiert.

Zur Messung wurde ein iQ5 Real-Time PCR Gerät verwendet (Biorad, München, Deutschland). Die zum Nachweis verwendeten Primerpaare sind in Tabelle 4 aufgeführt. *SDHA* und *18S* dienten als Referenzgene zur Normalisierung. Die Berechnung der relativen Expression erfolgte nach der Vandesompele Methode (Vandesompele et al. 2002)

Gen	Primersequenzen
ATF4	fw: 5'-ATGACCGAAATGAGCTTCCTG-3' rev: 5'-GCTGGAGAACCCATGAGGT-3'
WARS1	fw: 5'-AGCACCTACCAGTAATCATGGC-3' rev: 5'-TCCAAACCGAACAATGAGCTT-3'
XPOT1	fw: 5'-AGGGAGACGCTCATATCATGG-3' rev: 5'-TTGGGCGGCTTTATTTTCGTAT-3'
TRIB3	fw: 5'-AAGCGGTTGGAGTTGGATGAC-3' rev: 5'-CACGATCTGGAGCAGTAGGTG-3'
18S	fw: 5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3' rev: 5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'
SDHA	fw: 5'-TGGGAACAAGAGGGCATCTG-3' rev: 5'-CCACCACTGCATCAAATTCATG-3'

Tabelle 4 Primersequenzen

2.13 Quantifizierung des zellulären Überlebens

Zur Bestimmung der Zellviabilität wurde die Laktatdehydrogenase (LDH)-Freisetzungsmethode sowie die Färbung mit Propidiumiodid und die anschließende durchflusszytometrische Analyse (PI-FACS) eingesetzt. Propidiumiodid dringt über die poröse Zellwand apoptotischer Zellen in die Zelle ein und kann daher als Zelltodindikator genutzt werden.

Die Quantifizierung freigesetzten LDHs erfolgte unter Verwendung des Cytotoxicity Detection Kit (LDH) (Roche, Mannheim, Deutschland).

Zur Messung via PI-FACS wurden die Zellen zu einer Dichte von 50.000 pro cm² in 24-well Platten ausgesät und entsprechend den Versuchsbedingungen behandelt. Die adhärennten Zellen wurden mit PBS gewaschen, mittels Trypsin vom Boden gelöst, in PBS resuspendiert und zu dem jeweiligen Überstand in das FACS-Röhrchen überführt. Die Proben wurden dann bei Raumtemperatur für 5 min bei 300 g zentrifugiert. der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde in 250 µl PI-Lösung (1 µg/ml in PBS verdünnt) aufgenommen. Die Analyse erfolgte im BD Canto II (BD, Heidelberg, Germany). PI-positive Zellen wurden als tote Zellen gewertet. Es wurde der Anteil toter Zellen bezogen auf alle analysierten

Zellen bestimmt. Die Datenauswertung erfolgte mit der BD FACS Diva-Software (Version 6.1.3).

2.14 Klonogenitätsassay

Um die Klonogenität zu bestimmen, wurden jeweils 500 Zellen in einer Kavität einer 6-well Platte ausgesät und über Nacht inkubiert. Im Anschluss erfolgte die jeweilige Behandlung der Zellen mit TMZ oder der Vehikelkontrolle (DMSO). Nach weiteren 24 Stunden wurde das Behandlungsmedium durch Vollmedium ersetzt. Das Experiment wurde mittels KV-Färbung nach fünf Tagen abgestoppt. Klone wurden manuell mit Hilfe der ImageJ Software ausgezählt (Fischer et al. 2014; Lorenz et al. 2021).

2.15 Sauerstoffverbrauch

Zur Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs wurden die Zellen in einer 24-well Platte mit Sauerstoffsensoren (PreSens, Regensburg, Germany) ausgesät und über Nacht inkubiert. Nach einem Mediumswechsel wurden die Wells mit Paraffinöl (600 μ l) überschichtet, was weiteren Sauerstoffeintrag ins Medium verhinderte. Der Sauerstoffgehalt im Medium wurde mit Hilfe einer fluoreszenz-basierten Messmethode bestimmt (Thiepold et al. 2017).

2.16 Statistische Berechnungen

Quantitative Daten werden als Mittelwert und Standardabweichung (SD) angegeben. Für die Berechnung von p-Werten wurde ein zweiseitiger t-Test verwendet. Die Werte von $p < 0,01$ (**) wurden als hochsignifikant, $p < 0,05$ (*) als signifikant und $p \geq 0,05$ als nicht signifikant (n.s.) angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Humane Glioblastomzelllinien unterscheiden sich in ihrer basalen *ATF4* mRNA Expression

Um zu untersuchen, ob die integrierte Stressantwort als Anpassungsmechanismus in humanen Gliomzelllinien wichtig ist, wurden zunächst die basalen *ATF4* mRNA Level verschiedener Zelllinien untersucht. Dabei zeigte sich in G55 Zellen ein, im Vergleich, höheres basales *ATF4* mRNA Level, während LNT-229 Gliomzellen ein eher niedriges basales *ATF4* mRNA Level aufwiesen. Um die Effekte der ISR sowohl in Zellen mit niedriger als auch hoher *ATF4* Expression zu analysieren, wurden die nachfolgenden Versuche mit LNT-229 und G55 durchgeführt.

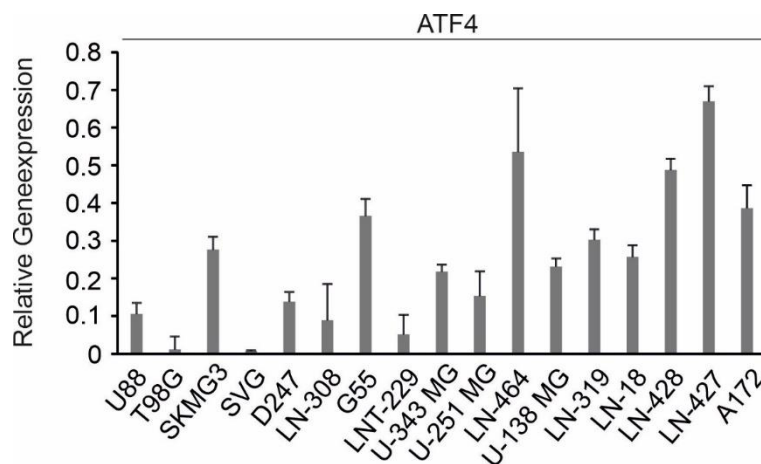


Abbildung 4 Ermittlung der basalen *ATF4* Expression in einem Panel humaner Gliomzelllinien

Humane Gliomzelllinien wurden unter Standardbedingungen in Vollmedium kultiviert. Die Analyse, der aus diesen Zellen isolierten cDNA erfolgte mittels qPCR mit Primern für *ATF4*. *SDHA* und *18S* wurden zur Normalisierung verwendet (n=3, Mittelwert \pm SD).

3.2 Etablierung eines Antikörpers zur Bestimmung des ATF4 Proteingehalts

Zum Nachweis von ATF4 im Immunoblot sollte zunächst ein spezifischer, primärer Antikörper etabliert werden. Es wurden hierzu zwei Antikörper verglichen (ProteinTech, Rosemont, IL, USA, 10835-1-AP und CellSignaling Technology, Danvers, MA, USA, #11815). Um die Spezifität der Antikörper zu überprüfen, wurden Lysate von LNT-229 und G55 Zellen eingesetzt, welche zuvor mit dem ISR Aktivator Tunicamycin behandelt worden waren. Es zeigte sich, dass der getestete ATF4 Antikörper der Firma ProteinTech im Immunoblot, zusätzliche, unspezifische Banden mit leicht gesteigerter Größe als das zu detektierende Protein ATF4 aufwies (Abb.5 linke Seite). Dagegen zeigte der zweite Antikörper der Firma CellSignaling keine unspezifischen Banden vergleichbarer Größe. Durch den ATF4 Antikörper von CellSignaling konnte die korrekte ATF4 Bande des ProteinTech Antikörpers bestätigt werden (Abb.5 rechte Seite).

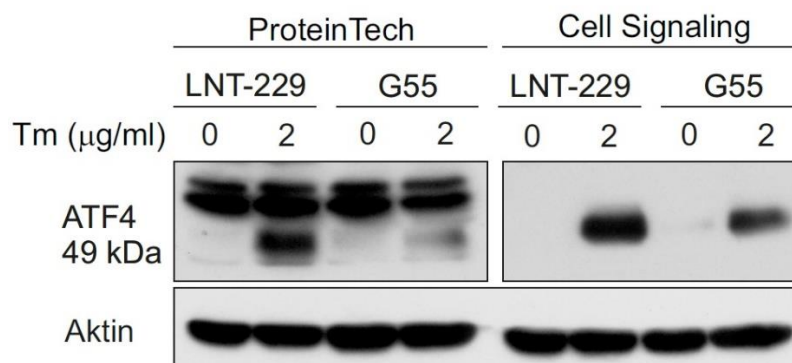


Abbildung 5 Etablierung eines geeigneten ATF4 Antikörpers

G55 und LNT-229 Zellen wurden für 8 Stunden in Serum-freiem Medium mit 2 µg/ml Tunicamycin (Tm) behandelt. Die Lysate wurden im Immunoblot mit Antikörpern gegen ATF4 und Aktin analysiert.

3.3 Tunicamycin und Thapsigargin führen zur dosisabhängigen ATF4 Induktion in humanen GB Zellen

Pharmakologisch lässt sich die ISR durch die ER-Stress Induktoren Tunicamycin, welches die Ausbildung N-glykosidischer Verbindungen hemmt, und Thapsigargin, welches die sarko- /endoplasmatische Retikulum Ca²⁺-ATPase hemmt, aktivieren (Fusakio et al. 2016; Peñaranda Fajardo et al. 2016). Die

Behandlung mit Tunicamycin oder Thapsigargin führte in G55 Zellen und LNT-229 (Daten nicht gezeigt) nach einer Behandlungszeit von 24 h zu einer verminderten Zelldichte im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe, die nach weiteren 72 h noch stärker ausgeprägt war (Abb. 6A). Vergleichbare Ergebnisse wurden mit der Zelllinie LNT-229 erzielt (nicht gezeigt). Auf Proteinebene zeigte sich durch die Behandlung der Zellen mit Tunicamycin oder Thapsigargin eine dosisabhängige ATF4 Aktivierung (Abb. 6B). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für die folgenden Versuche eine Konzentration von 2 µg/ml Tunicamycin (2,367 µM) und 1 µM Thapsigargin (0,65 µg/ml) zur Behandlung der Zellen verwendet.

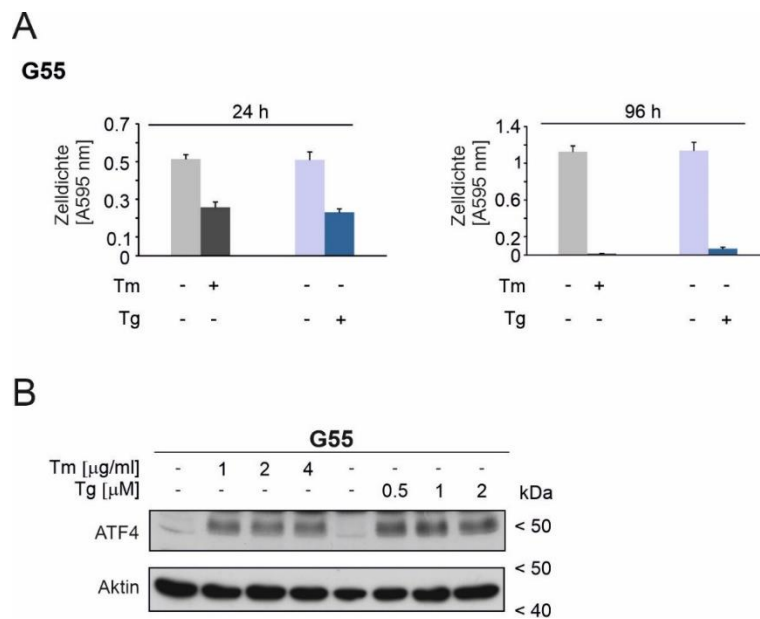


Abbildung 6 Tunicamycin und Thapsigargin induzieren die Aktivierung von ATF4 in humanen GB Zellen.

(A) G55 Zellen wurden in serumfreiem Medium für die angegebenen Zeiträume mit 2 µg/ml Tunicamycin (Tm) bzw. 1 µM Thapsigargin (Tg) behandelt. Die Zelldichten wurden mittels KV-Färbung ermittelt (n=3, Mittelwert ± SD). (B) G55 Zellen wurden in serumfreiem Medium mit steigenden Konzentrationen von Tunicamycin (Tm) und Thapsigargin (Tg) für 8 h behandelt. Die Lysate wurden im Immunoblot mit Antikörpern für ATF4 (hier ProteinTech, Rosemont, IL, USA, 10835-1-AP) und Aktin analysiert.

XPOT, *WARS1* und *TRIB3* sind in Zellmodellen als Zielgene von ATF4 beschrieben (Han et al. 2013). Auf Transkriptionsebene führte sowohl die

Behandlung mit Tunicamycin als auch mit Thapsigargin zu einer vermehrten Expression von *ATF4* und dessen Zielgenen *XPOT*, *WARS1* und *TRIB3* in G55- und LNT-229 Zellen (Daten nicht gezeigt) (Abb. 7).

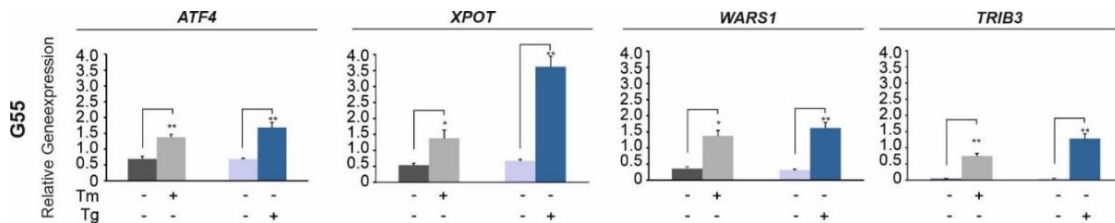


Abbildung 7 Tunicamycin und Thapsigargin induzieren die Aktivierung von *ATF4* und dessen Zielgenen *XPOT*, *WARS1* und *TRIB3* in humanen GB Zellen.

G55 Zellen wurden über 8 h mit 2 µg/ml Tunicamycin (Tm) bzw. 1 µM Thapsigargin (Tg) in serumfreiem Medium behandelt. Anschließend wurde die mRNA Expression von *ATF4* und den *ATF4* Zielgenen *XPOT*, *WARS1* und *TRIB3* mittels qPCR analysiert. (n = 3, Mittelwert ± SD, *p < 0.05, **p < 0.01).

3.4 Glutaminentzug führt zu einer gesteigerten *ATF4* Expression auf mRNA und Proteinebene

ATF4 ist ein wichtiger Regulator der ISR unter Aminosäuremangel (Ye et al. 2010). So zeigte sich in G55 Zellen und LNT-229 (Daten nicht gezeigt) unter vollständigem Glutaminentzug, eine gesteigerte *ATF4* Expression auf Proteinebene, während Glukosemangelbedingungen und gleichzeitiger Serumentzug nicht zu einer gesteigerten *ATF4* Expression führten (Abb. 8 A, B). Unter Glutaminentzug zeigte sich eine Zunahme der *ATF4* mRNA Expression sowie dessen Zielgenen *XPOT*, *WARS1* und *TRIB3*. Zusätzlicher Glukosemangel führte zu keiner weiteren Zunahme der Expression von *ATF4* sowie dessen Zielgenen (Abb. 8 C).

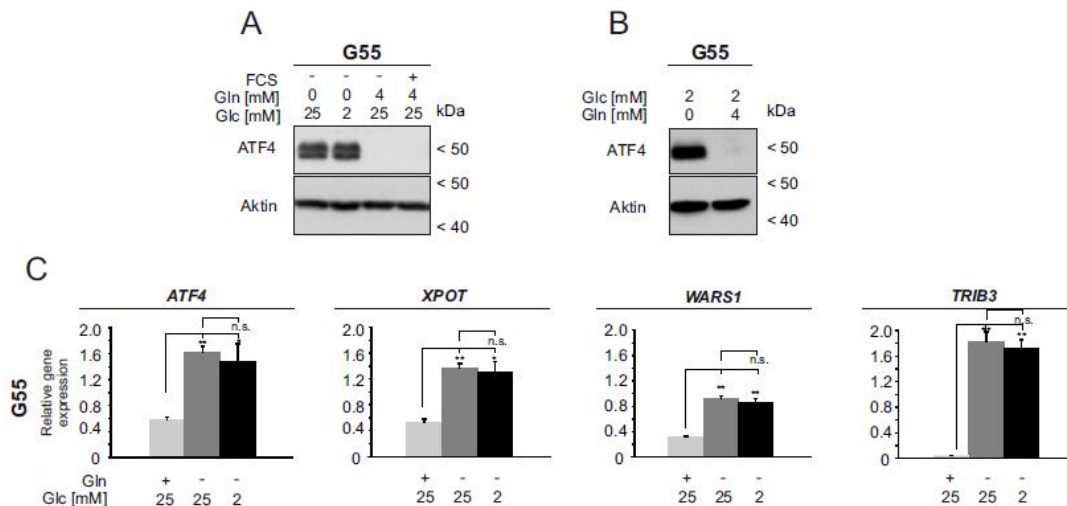


Abbildung 8 Glutaminentzug führt auf mRNA und Proteinebene zur gesteigerten ATF4 Expression in humanen GB Zellen.

(A) G55 Zellen wurden in DMEM mit und ohne 10% FCS, unter Zugabe von 2- oder 25 mM Glukose (Glc) und 0 mM oder 4mM Glutamin (Gln) wie angegeben über 8 h inkubiert. Die Zelllysate wurden dann im Immunoblot mit Antikörpern für ATF4 und Aktin analysiert. (B) G55 Zellen wurden mit serumfreiem Medium, unter Zugabe von 2 mM Glukose (Glc) und 0 mM oder 4mM Glutamin (Gln) wie angegeben über 8 h inkubiert. Die Zelllysate wurden daraufhin im Immunoblot mit Antikörpern für ATF4 und Aktin analysiert. (C) G55 Zellen wurden für 8 h mit serumfreiem Medium mit verschiedenen Glutamin- (Gln) und Glukosekonzentrationen (Glc) wie angegeben inkubiert. Mittels qPCR wurde die Expression von ATF4 und seinen Zielgenen *XPOT*, *WARS1* und *TRIB3* analysiert. (n=3, Mittelwert \pm SD, *p < 0.05, **p < 0.01).

3.5 TMZ induziert ATF4 Aktivierung

Nach Behandlung mit dem Chemotherapeutikum TMZ ist, als Folge einer ER-Stress vermittelten Aktivierung der ISR, bereits eine Zunahme der ATF4 Expression auf mRNA- und Proteinebene beschrieben (Chen et al. 2017b).

In unseren Versuchen konnte durch die Behandlung mit TMZ sowohl eine gesteigerte Expression von ATF4 auf Proteinebene als auch eine gesteigerte Transkription von *ATF4* und seinen Zielgenen *XPOT* und *WARS1* festgestellt werden (Abb. 9 A, B). Ähnliche Ergebnisse wurden in LNT-229 Zellen erzielt (Ergebnisse nicht gezeigt).

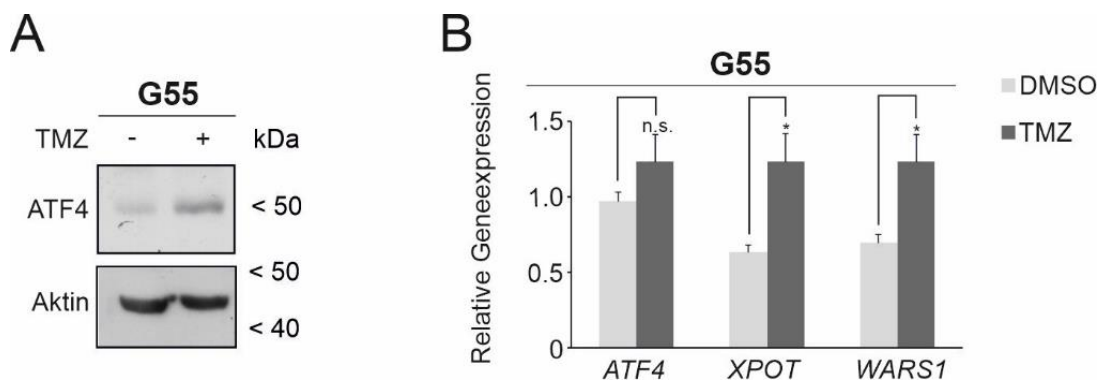


Abbildung 9 TMZ-Behandlung induziert die Aktivierung von ATF4 und dessen Zielgenen.

G55 Zellen wurden in serumfreiem Medium über 24 h mit Vehikel (DMSO) oder 400 μ M TMZ behandelt. (A) Die Lysate wurden im Immunoblot mit Antikörpern für ATF4 und Aktin analysiert. (B) cDNA der Zellen wurde mittels qPCR analysiert. Verwendet wurde Primer für *ATF4* und dessen Zielgene *XPOT* und *WARS1*. (n = 3, Mittelwert \pm SD, n.s. nicht signifikant, *p < 0.05).

3.6 Gensuppression von ATF4 führt zu reduzierter Aktivierung der ISR unter Bedingungen des Tumormikromilieus in humanen GB Zellen

Zur Analyse der Rolle von ATF4 für die Adaptation humaner GB Zellen an Mangelbedingungen des Tumormikromilieus wurden G55 und LNT-229 Zellen mit ATF4-Gensuppression (ATF4sh) sowie entsprechende Kontrollzellen (NTsh) hergestellt. Es konnte für G55 Zellen eine Gensuppression von ca. 50% und bei LNT-229 Zellen von ca. 70% im Vergleich zu den Kontrollzellen erreicht werden (Abb. 10 A, Daten für LNT-229 nicht gezeigt).

Mit Hilfe dieses Modells konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Tunicamycin zu einem starken Anstieg der Proteinexpression von ATF4 in NTsh Zellen führte, wohingegen ATF4sh Zellen nur mit einem geringen Anstieg von ATF4 auf die Behandlung reagierten (Abb. 10 B). Dieses Ergebnis konnte auf Transkriptionsebene bestätigt werden. Die Behandlung der NTsh Zellen mit Tunicamycin führte zu einem deutlicheren Anstieg der *ATF4* mRNA, sowie der Zielgene *XPOT*, *WARS1* und *TRIB3*. Im Vergleich dazu, war bei der Behandlung

der ATF4sh Zellen mit Tunicamycin ein signifikant geringerer Anstieg der *ATF4* mRNA sowie der Zielgene zu beobachten (Abbildung 10 C).

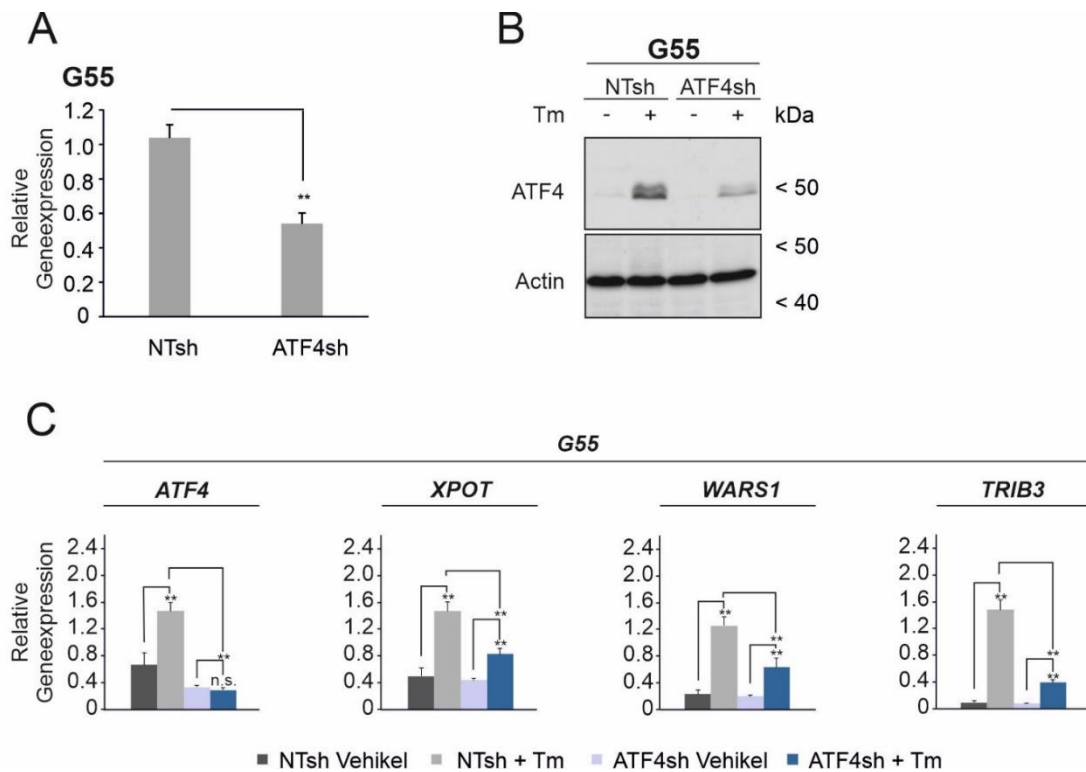


Abbildung 10 ATF4 gensupprimierte Zellen weisen ein reduziertes Ansprechen auf pharmakologische ISR Induktion auf.

(A) G55 Zellen wurden mit *Non-targeting Control* (NTsh) oder ATF4 Gensuppression (ATF4sh) Plasmiden transduziert. Die stabile ATF4 Gensuppression wurde in der qPCR mit Primern für *ATF4* nachgewiesen. (n=3, Mittelwert \pm SD, ** p < 0.01). (B) G55 NTsh und ATF4sh Zellen wurden über 8 h in serumfreiem Medium mit 2 μ g/ml Tunicamycin (Tm) behandelt. Zelllysate wurden im Immunoblot mit Antikörpern für ATF4 und Aktin untersucht. (C) G55 NTsh und ATF4sh Zellen wurden über 8 h in serumfreiem Medium mit 2 μ g/ml Tunicamycin (Tm) behandelt. cDNA wurde mit Primern für *ATF4*, *XPOT*, *WARS1* und *TRIB3* untersucht. (n = 3, Mittelwert \pm SD, n.s. nicht signifikant, **p < 0.01).

Glutaminentzug führte sowohl mit als auch ohne Glukosemangel zu einer gesteigerten ATF4 Translation in G55 NTsh Zellen. In ATF4sh Zellen war dieser Effekt deutlich weniger ausgeprägt. Glukosemangel allein führte dagegen zu keiner gesteigerten ATF4 Proteinexpression in G55 NTsh- und ATF4sh Zellen

(Abb. 11). In LNT-229 NTsh und ATF4sh Zellen zeigten sich ähnliche Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

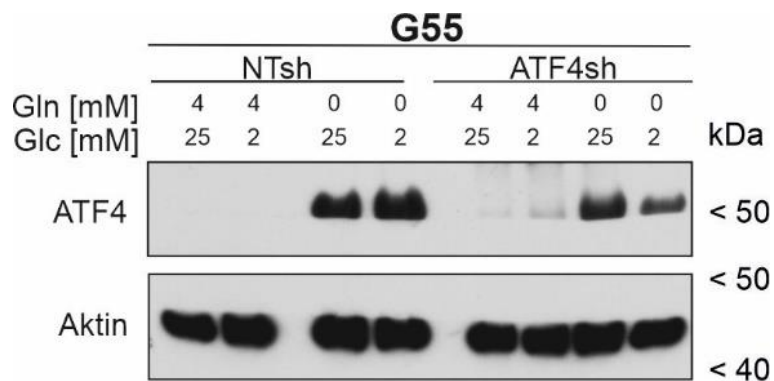


Abbildung 11 Glutaminentzug führt zu einem gesteigerten ATF4 Proteinlevel in humanen GB Zellen.

G55 NTsh und ATF4sh Zellen wurden für 8 h mit serumfreiem Medium mit Glukose (Glc) und Glutamin (Gln) wie angegeben behandelt. Die Zelllysate wurden im Immunoblot mit Antikörpern für ATF4 und Aktin analysiert.

Unter hypoxischen Bedingungen und gleichzeitigem Glukosemangel ohne Glutaminentzug konnte eine Aktivierung von ATF4 festgestellt werden, welche nur in NTsh Zellen, nicht aber in ATF4 gensupprimierten Zellen, nachgewiesen werden konnte (Abb. 12).

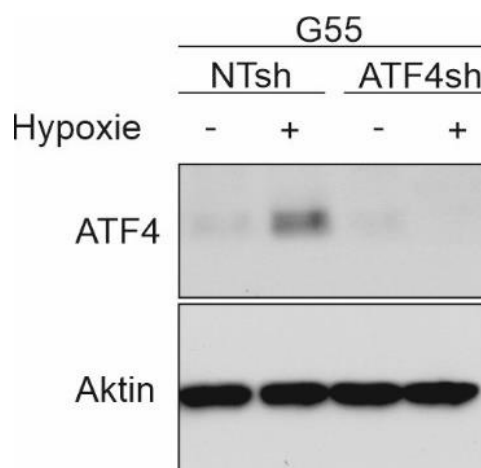


Abbildung 12 Hypoxie führt zu einer gesteigerten Translation von ATF4.

G55 NTsh und ATF4sh Zellen wurden in serumfreiem Medium mit 2 mM Glukose und 4 mM Glutamin über 8 h bei Normoxie oder Hypoxie (0,1% O₂) inkubiert. Die Zelllysate wurden im Immunoblot mit Antikörpern gegen ATF4 und Aktin untersucht.

3.7 ATF4 Gensuppression sensibilisiert humane GB Zellen für Hypoxie-induzierten Zelltod und erhöht den Sauerstoffverbrauch

Eine verminderte Sauerstoffkonzentration und Nährstoffmangel sind charakteristisch für das Mikromilieu maligner Gliomzellen (Jawhari et al. 2016). Durch diese Mangelbedingungen werden Signalkaskaden zur Adaptation aktiviert (Jawhari et al. 2016). Um die *in vivo* bestehenden Mangelbedingungen zu modellieren, behandelten wir die Zellen unter hypoxischen Bedingungen (0,1% O₂) und gleichzeitigem Glukosemangel (Steinbach et al. 2003). Unter diesen Bedingungen wurde die pharmakologische Aktivierung der ISR mittels Tunicamycin sowie der Effekt der Gensuppression von *ATF4* in humanen GB Zellen untersucht.

In G55 Zellen und LNT-229 (Daten nicht gezeigt), bei denen eine Behandlung mit Tunicamycin die Aktivierung von ATF4 auslöste, konnte im Kontext des Hypoxie-induzierten Zelltods eine reduzierte LDH Freisetzung und somit ein Schutz der Zellen durch Tunicamycin induzierte Aktivierung der ISR beobachtet werden (Abb. 13).

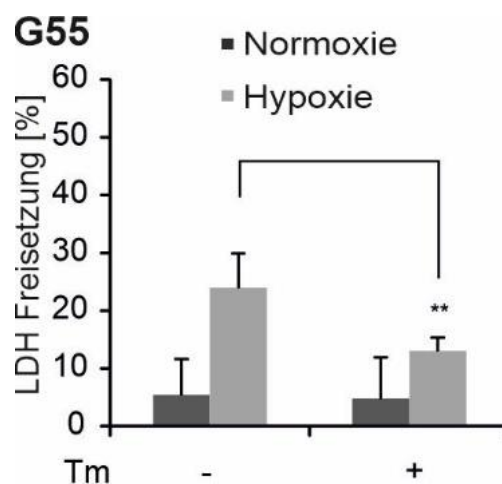


Abbildung 13 Tunicamycinbehandlung schützt humane GB Zellen vor Hypoxie-induziertem Zelltod.

G55 Zellen wurden in serumfreiem Medium unter Zugabe von 25 mM Glukose und 2 µg/ml Tunicamycin oder Vehikel (DMSO) für 4 h vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen in serumfreiem Medium mit 2 mM Glukose und 4 mM Glutamin sowie 2 µg/ml Tunicamycin oder Kontrolle (DMSO) in Normoxie oder Hypoxie

(0.1% O₂) inkubiert. Der Zelltod wurde mittels LDH Freisetzungssassay bestimmt (n=4, Mittelwert + SD, * p < 0.05, ** p < 0.01).

Im Gegensatz dazu, zeigten G55 ATF4sh und LNT-229 ATF4sh Zellen unter hypoxischen Bedingungen mit gleichzeitigem Glukosemangel eine erhöhte LDH Freisetzung und damit eine Sensibilisierung der Zellen gegenüber Hypoxie-induziertem Zelltod (Abb. 14).

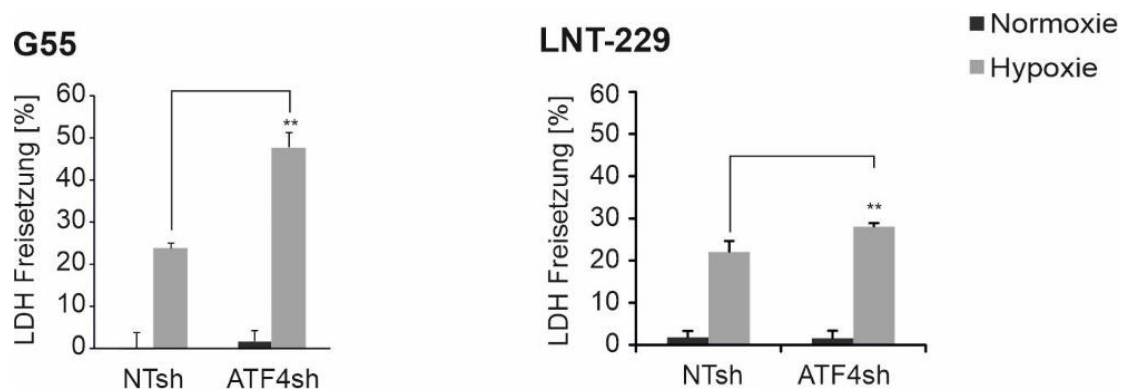


Abbildung 14 ATF4sh Zellen sind gegenüber Hypoxie-induziertem Zelltod sensibilisiert.

G55 und LNT-229 NTsh und ATF4sh Zellen wurden in serumfreiem Medium mit 2 mM Glukose und 4 mM Glutamin in Normoxie und Hypoxie (0.1% O₂) inkubiert. Der Zelltod wurde durch Quantifizierung der LDH Freisetzung bestimmt (n = 4, Mittelwert ± SD, **p < 0.01).

Unter gleichzeitigem Sauerstoff- und Glukosemangel zeigten G55 und LNT-229 (nicht gezeigt) ATF4sh Zellen im Vergleich zu den NTsh Zellen einen erhöhten Sauerstoffverbrauch (Abb. 15 A). Die pharmakologische Aktivierung der ISR mit Tunicamycin führte zum gegenteiligen Effekt: Hier zeigten Tunicamycin behandelte G55 und LNT-229 (nicht gezeigt) Wildtyp-Zellen einen verminderten Sauerstoffverbrauch im Vergleich zu Vehikel-behandelten Zellen. Dies zeigte sich sowohl unter Zugabe von Glukose als auch unter Glukosemangelbedingungen (Abb. 15 A, B).

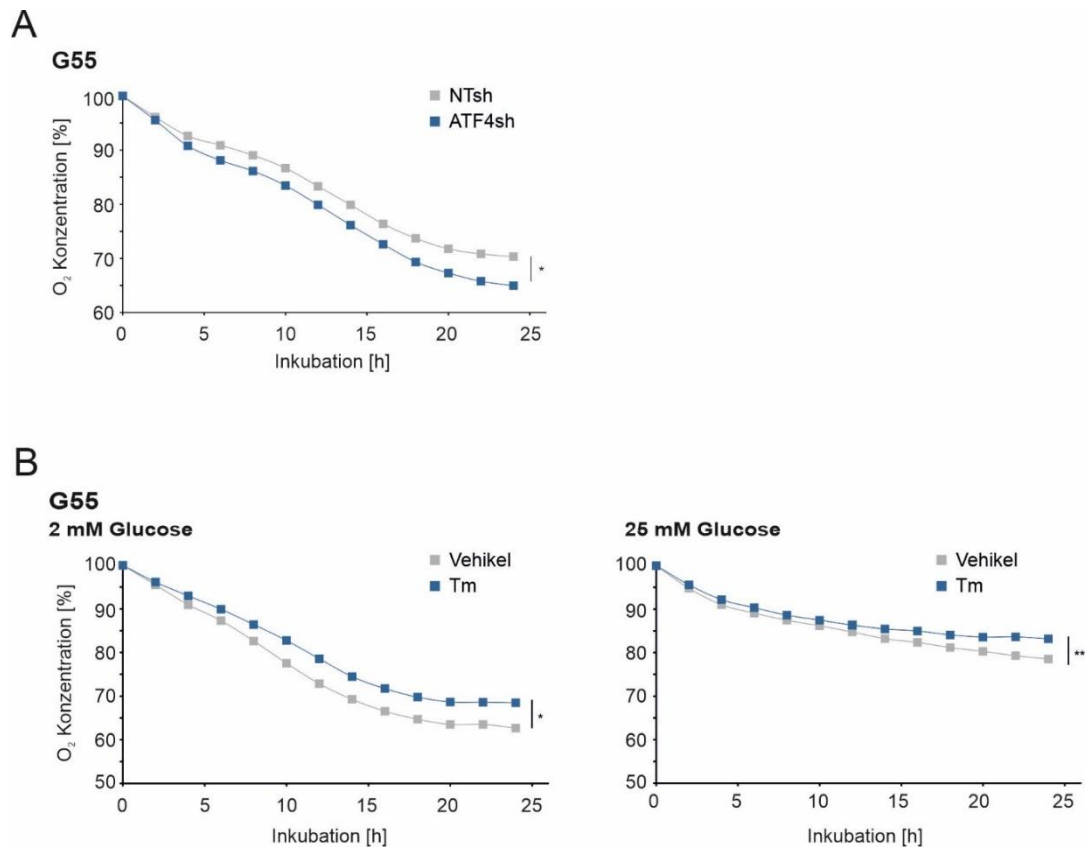


Abbildung 15 Der erhöhte Sauerstoffverbrauch ATF4 gensupprimierter Zellen lässt sich durch die pharmakologische Aktivierung der ISR umkehren.

(A) G55 NTsh und ATFsh Zellen wurden in serumfreiem Medium mit 2 mM Glukose und 4 mM Glutamin inkubiert. Der O₂-Verbrauch wurde mit Hilfe einer Fluoreszenzbasierten Messung bestimmt. Angezeigt ist die verbliebene Sauerstoffmenge relativ zum Beginn des Experiments. (n = 3, Mittelwert, *p < 0.05, **p < 0.01). (B) G55 Zellen wurden in serumfreiem Medium mit 4 mM Glutamin und 2 mM - oder 25 mM Glukose sowie 2 µg/ml Tunicamycin behandelt. Der Sauerstoffverbrauch wurde mittels Fluoreszenzbasierter Messung durchgeführt. (n = 3, Mittelwert, *p < 0.05, **p < 0.01).

3.8 ATF4 Gensuppression sensibilisiert GB Zellen für TMZ

Um den Effekt von ATF4 im Kontext der Resistenzentwicklung gegen TMZ zu untersuchen, wurden sowohl G55 NTsh und ATF4sh als auch LNT-229 NTsh und -ATF4sh (nicht gezeigt) Gliomzellen mit TMZ behandelt und die Expression von ATF4 untersucht. Dabei zeigten ATF4sh Zellen nach TMZ-Behandlung eine deutlich verminderte ATF4 Expression in Vergleich zu den NTsh Zellen (Abb. 16 A). Die Klonogenität von G55 und LNT-229 (nicht gezeigt) ATF4sh Zellen war

nach TMZ-Behandlung im Vergleich zu NTsh Zellen stark vermindert (Abb. 16 B). Weiterhin zeigten ATF4sh Zellen unter Behandlung mit TMZ einen deutlich erhöhten Zelltod im Vergleich zu entsprechenden Kontrollzellen (Abb. 16 C).

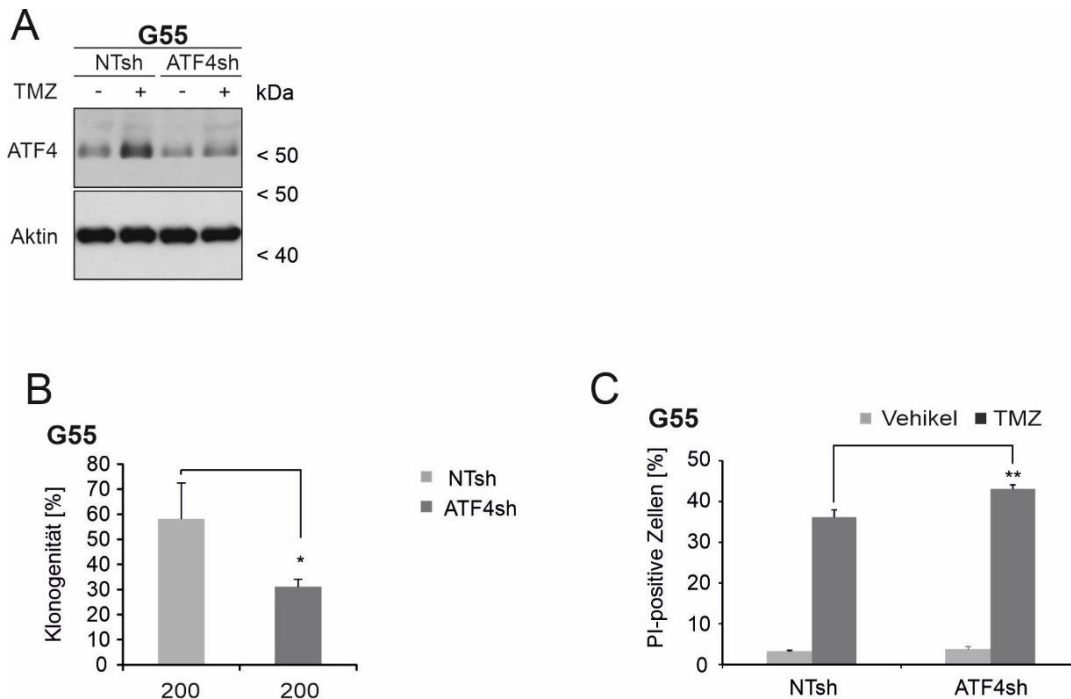


Abbildung 16 Unter TMZ-Behandlung zeigen ATF4sh Zellen einen reduzierten ATF4 Anstieg und eine größere Behandlungssensibilität im Vergleich zu NTsh Zellen.

(A) G55 NTsh und ATF4sh Zellen wurden in serumfreiem Medium für 8 h mit 400 μ M TMZ behandelt. Die Zelllysate wurden im Immunoblot mit Antikörpern gegen ATF4 und Aktin analysiert. (B) G55 NTsh und ATF4sh Zellen wurden über 24 h mit 200 μ M TMZ oder DMSO behandelt, im Anschluss wurden die Zellen in Vollmedium für weitere 5 Tage inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin mit KV gefärbt und die Anzahl der Klone ausgezählt. Die Klonogenität ist in Relativität zur Vehikelkontrolle dargestellt. (n = 3, Mittelwert \pm SD, *p < 0.05). (C) G55 NTsh und ATF4sh Zellen wurden für 72 h in serumfreiem Medium mit 800 μ M TMZ behandelt. Der Zelltod wurde mittels Propidiumiodid (PI)-Färbung analysiert und über die Durchflusszytometrie quantifiziert. (n = 3, Mittelwert \pm SD, *p < 0.05, **p < 0.01).

3.9 Pharmakologische PERK-Inhibition führt unter

Stressbedingungen zu einer verminderten ATF4 Expression

Zusätzlich zur genetischen Suppression, lässt sich die ATF4 Expression auch pharmakologisch mittels der Inhibition der Kinase PERK modulieren (Abb. 1). Dazu testeten wir zwei verschiedene PERK Inhibitoren (GSK 414 und AMG 44). Durch beide Substanzen wird selektiv die Phosphorylierung des Translationsfaktors eIF2 α gehemmt, wodurch die Translation von ATF4 nur vermindert stattfinden kann (Dadey et al. 2018; Feng et al. 2014; McGrath et al. 2018; Axten et al. 2012).

Zur Evaluation einer geeigneten Dosierung testeten wir den Einfluss der Inhibitoren auf das Zellwachstum von G55 und LNT-229 Zellen. Nach einer Inkubationszeit von 72 h konnte unter Verwendung und des PERK-Inhibitors GSK 414 bis zu einer Konzentration von 1 μ M sowohl bei LNT-229 als auch bei G55 Zellen kaum einen Einfluss auf das Zellwachstum festgestellt werden. Ebenso zeigte der PERK- Inhibitor AMG 44 nach einer Behandlungsdauer von 72 h in allen getesteten Konzentrationen keinen Einfluss auf das Zellwachstum (Abb. 17).

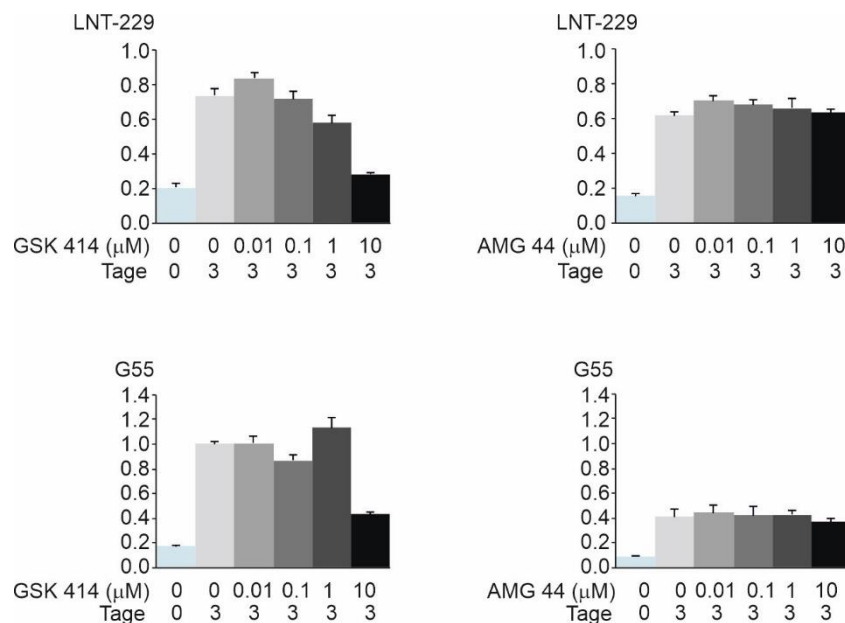


Abbildung 17 Toxizität der PERK Inhibitoren GSK 414 und AMG 44.

G55 und LNT-229 WT Zellen wurden für 72 h in serumfreiem Medium mit den angegebenen Konzentrationen der PERK Inhibitoren GSK 414 und AMG 44

behandelt. Die Zelldichten wurden mittels KV-Färbung bestimmt. (n=3, Mittelwert \pm SD).

Eine kombinierte Behandlung der Gliomzellen G55 und LNT-229 mit Tunicamycin und den PERK Inhibitoren GSK 414 und AMG 44 in aufsteigenden Konzentrationen führte in einem Konzentrationsbereich von 1 μ M bis 10 μ M zu einer verminderten ATF4 Expression auf Proteinebene (Abb. 18). Bei einer Konzentration von 0,1 μ M konnte keine ausreichende ATF4 Suppression mehr erreicht werden. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden für die Versuche 1 μ M GSK 414 und 1 μ M AMG 44 eingesetzt.

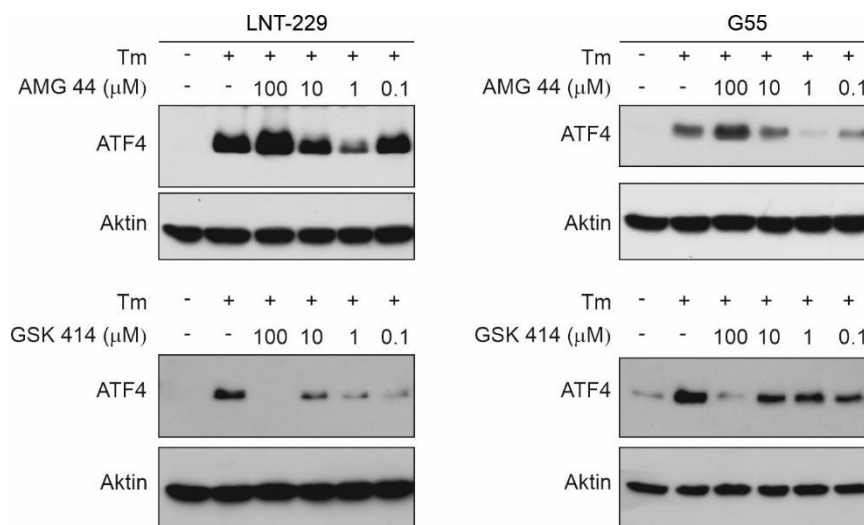


Abbildung 18 Die Behandlung mit pharmakologischen PERK Inhibitoren führt zu dosisabhängiger Reduktion des ATF4 Proteinlevels in humanen GB Zellen.

LNT-229 und G55 Zellen wurden in serumfreiem Medium für 8 h mit den angegebenen Konzentrationen der PERK Inhibitoren GSK 414 und AMG 44 sowie mit 2 μ g/ml Tunicamycin behandelt. Die Zelllysate wurden im Immunoblot mit Antikörpern gegen ATF4 und Aktin untersucht.

Durch die gleichzeitige Behandlung von G55 und LNT-229 Gliomzellen mit den pharmakologischen PERK Inhibitoren und Tunicamycin kam es zu einer deutlich verminderten ATF4 Aktivierung (Abb. 19). Die durch Glutaminentzug induzierte Aktivierung von ATF4 konnte durch die Behandlung mit den Inhibitoren ebenfalls deutlich vermindert werden (Abb. 19).

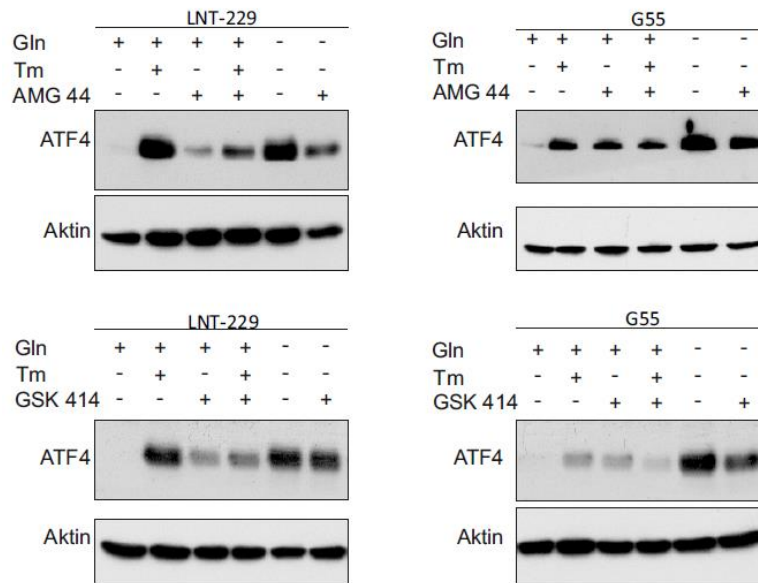


Abbildung 19 Die PERK Inhibitoren GSK 414 und AMG 44 hemmen die ATF4 Aktivierung in humanen GB Zellen.

G55 und LNT-229 Zellen wurden in serumfreiem Medium für 8 h mit Tunicamycin 2 µg/ml oder 1 µM GSK 2606414 bzw. 1 µM AMG 44 oder einer Kombination aus beiden Substanzen, wie angegeben, behandelt. Zusätzlich wurden G55 und LNT-229 Zellen sowohl unter alleinigem Glutaminzug als auch unter Glutaminzug kombiniert mit 1 µM GSK 414 oder 1 µM AMG 44 inkubiert. Die Zelllysate wurden im Immunoblot mit Antikörpern gegen ATF4 und Aktin analysiert.

Ebenso wie die pharmakologische ATF4 Induktion ließ sich die TMZ-vermittelte ATF4 Expression durch Kombinationsbehandlung mit den PERK-Inhibitoren vermindern. Während alleinige TMZ-Therapie zu einem Anstieg der ATF4 Expression führte, konnte diese durch die Zugabe der Inhibitoren abgeschwächt werden (Abb. 20).

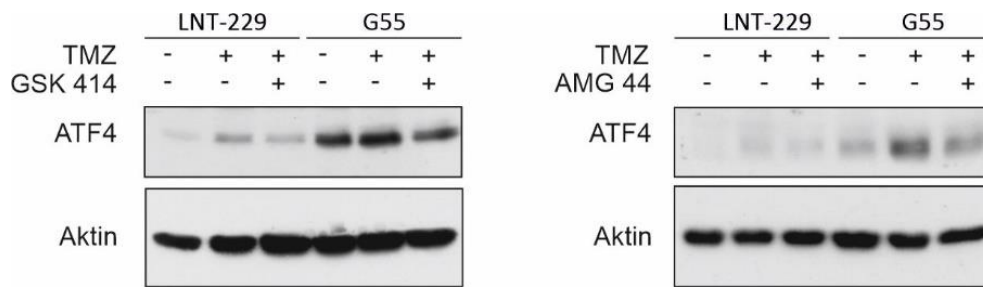


Abbildung 20 Reduzierte TMZ vermittelte ATF4 Expression nach Ko-Behandlung mit den PERK Inhibitoren.

G55 und LNT-229 Zellen wurden in serumfreiem Medium für 24 h mit 400 μ M TMZ und/oder jeweils 1 μ M GSK 414/ 1 μ M AMG 44 wie angegeben behandelt. Die Zelllysate wurden im Immunoblot mit Antikörpern gegen ATF4 und Aktin analysiert.

4 Diskussion

Um unter den im Tumormikromilieu vorherrschenden Mangelbedingungen überleben zu können, müssen Glioblastomzellen Strategien zur Anpassung entwickeln. Diese Adaptationsmechanismen der Tumorzellen zielen auf die Sicherstellung des Zellüberlebens und -wachstums. Einer dieser Anpassungsmechanismen ist die ISR, deren zentraler Mediator der Transkriptionsfaktor ATF4 darstellt. Die ISR kann durch ER-Stress, bedingt durch die Akkumulation fehl- oder ungefalteter Proteine, Hypoxie, Glukosemangel oder Chemotherapie und durch Aminosäuremangel ausgelöst werden. Über verschiedenen Signalkaskaden kommt es zu einer Phosphorylierung von eIF2 α und dadurch zur Reduktion der allgemeinen Translation.

Durch spezielle Eigenschaften der ATF4 mRNA kommt es, trotz der generellen Translationsinhibition, zu einer gesteigerten Expression von ATF4 und dessen Zielgenen, die für die Anpassung an Mangelbedingungen verantwortlich sind (Peñaranda Fajardo et al. 2016; Wek et al. 2006; Pakos-Zebrucka et al. 2016). Eine Überexpression von ATF4 in humanen Glioblastomzellen und dessen Beteiligung an der Entstehung möglicher Therapieresistenzen konnte bereits gezeigt werden (Bi et al. 2005; Chen et al. 2017b). Es scheint daher naheliegend, dass die Inhibition von ATF4 einen möglichen therapeutischen Angriffspunkt zur Sensibilisierung der Tumorzellen gegenüber Mangelbedingungen im Tumormikromilieu darstellen könnte. Von dieser Hypothese ausgehend wurde die Rolle des Transkriptionsfaktors ATF4 für die Adaptation humaner Glioblastomzelllinien an Bedingungen des Tumormikromilieus sowie für die Entstehung von Therapieresistenzen gegenüber TMZ untersucht.

In unseren Untersuchungen zeigte sich, dass ATF4 in den humanen Glioblastomzelllinien G55 und LNT-229 sowohl pharmakologisch, durch Tunicamycin und Thapsigargin, als auch durch Sauerstoffmangel induziert werden kann (Abb. 6, 12). Humane GB-Zelllinien mit stabiler ATF4 Gensuppression (ATF4sh) zeigten, im Vergleich zu Kontrollzellen, unter Bedingungen des Glioblastommikromilieus, mit Sauerstoff- und Nährstoffmangel, eine Sensibilisierung gegenüber Hypoxie-induziertem Zelltod (Abb. 14). Diese Ergebnisse zeigen die ATF4 vermittelten, protektiven Eigenschaften der ISR für

das Zellüberleben unter Mangelbedingungen. Gleichzeitig zeigte sich in *ATF4sh* Zellen, im Vergleich zur Kontrollzelllinie, ein erhöhter Sauerstoffverbrauch (Abb. 15A), was auf eine größere Sauerstoffabhängigkeit *ATF4* gensupprimierter Zellen hindeutet. Der Zusammenhang zwischen einem erhöhten Sauerstoffverbrauch und der Sensibilisierung von Gliomzelllinien gegen Hypoxie induzierten Zelltod konnte bereits gezeigt werden (Bruns et al. 2019). Die Behandlung der Glioblastomzellen mit dem pharmakologischen ISR Induktor Tunicamycin führte, im Gegensatz dazu, zu einem verminderten Sauerstoffverbrauch (Abb. 15B). Dieses Verhalten könnte darauf hindeuten, dass Glioblastomzellen mit intakter ISR unter Stressbedingungen ihren Sauerstoffverbrauch reduzieren, um sich so an die Sauerstoffmangelbedingungen im Tumormikromilieu besser anpassen zu können.

Eine weitere, häufig in humanen Glioblastomen aktivierte Signalkaskade geht von der Kinase mTOR aus. In kürzlich publizierten Daten konnte gezeigt werden, dass sich die Zielgene des mTOR Signalwegs und die der ISR überlappen (Klann et al. 2020). Unter entsprechenden Bedingungen sensibilisierte eine Inhibition der physiologischen Hemmung von mTOR, bedingt durch Glukosemangel, humane Glioblastomzellen auf ähnliche Weise für Hypoxie-induzierten Zelltod wie eine gestörte ISR (Abb. 14).

Eine Störung beider Stressreaktionen war mit einem erhöhten Sauerstoffverbrauch verbunden (Abb. 15A) (Thiepold et al. 2017). Diese Ergebnisse weisen auf eine schützende Rolle der ISR und der Expression dessen zentralen Mediators *ATF4* bei der Anpassung der Glioblastomzellen an Bedingungen des Tumormikromilieus hin.

In *ATF4sh* Zellen war, im Vergleich zu den Kontrollzellen, die pharmakologische Induktion durch Tunicamycin und Thapsigargin sowohl für *ATF4* als auch für dessen Zielgene stark reduziert (Abb. 10 B, C).

Neben der pharmakologischen Induktion von *ATF4* kann die ISR auch durch Aminosäuremangel induziert werden (Ye et al. 2010). So ist eine Hochregulierung von *ATF4* über die GCN2/P-eIF2 α /*ATF4*-Achse unter Glutaminmangelbedingungen auch in kolorektalen Adenokarzinomzellen und in Fibrosakromzellen beschrieben (Ye et al. 2010). Auch in unseren Versuchen

konnte ATF4 durch den Entzug der nicht essenziellen Aminosäure Glutamin induziert werden, wohingegen alleiniger Glukosemangel nicht zu einer Induktion von ATF4 führte (Abb. 8A, B und 11).

Glutamin ist eine nicht essenzielle Aminosäure, die in Tumorzellen als vielseitiges biosynthetisches Substrat unter anderem Kohlenstoff- und Stickstoffatome zur Synthese von Nukleotiden, Proteinen und anderen nicht essenziellen Aminosäuren bereitstellt. Von Glutamin abgeleitetes α -Ketoglutarat kann im Zitratzyklus weiter verstoffwechselt werden und dient als zusätzliche Energiequelle der ATP Produktion. Darüber hinaus kann Glutamin zu Glutamat, einem Substrat der Glutathionsynthese, verstoffwechselt werden. Als wichtiges Antioxidans schützt Glutathion die Zelle vor oxidativem Stress.

Unter veränderten Glutaminkonzentrationen ist zudem ein verändertes Methylierungsmuster der DNS und dadurch eine veränderte Genexpression beschrieben (Jiang et al. 2019). In der menschlichen Fibrosarkom-Zelllinie HT1080 führte der Glutaminmangel in ATF4 gensupprimierten Zellen zu einer 50% Reduktion des Zellüberlebens, während es in den Kontrollzellen nur zu einer 25% Reduktion des Zellüberlebens kam (Ye et al. 2010). Unsere Ergebnisse unterstreichen die Rolle des Glutaminmangels im Zusammenhang mit der ISR in menschlichen GB-Zellen, wobei eine ATF4-Hochregulierung den Tumorzellen möglicherweise hilft, sich an die veränderte Nährstoffverfügbarkeit anzupassen.

In der Behandlung des Glioblastoms spielt das alkylierende Chemotherapeutikum TMZ eine zentrale Rolle. Frühere Studien konnten eine erhöhte ATF4 Expression in humanen Glioblastomzelllinien unter Behandlung mit TMZ zeigen (Chen et al. 2017a; Chen et al. 2017b). In unseren Versuchen bestätigte sich in G55 und LNT-229 Zellen die Aktivierung von *ATF4* und dessen Zielgenen nach TMZ-Behandlung auf Transkriptions- und Proteinebene (Abb.9 A, B). In *ATF4* gensupprimierten G55 und LNT 229 Zellen dagegen, war unter TMZ-Behandlung keine erhöhte ATF4 Expression zu beobachten, weshalb diese Zellen als gutes Modell zur Untersuchung von ATF4-abhängigen Effekten der TMZ-Sensitivität verwendet werden können (Abb. 16A).

Verglichen mit den entsprechenden Kontrollzellen führte die TMZ-Behandlung in *ATF4sh* Zellen zu einer reduzierten Klonogenität (Abb. 16 B). Unter TMZ-Behandlung war die Zelldichte der *ATF4sh* Zellen im Vergleich zu den

Kontrollzellen vermindert (Abb. 16B). Dies deutet auf eine höhere Empfindlichkeit ATF4 gensupprimierter Zellen auf Chemotherapie mit TMZ hin. Zudem zeigte sich eine höhere Sensibilität der ATF4sh Zellen gegen TMZ-induzierten Zelltod (Abb. 16 C). Dies belegt eine mögliche Relevanz der Induktion von ATF4 für die Entstehung von Resistenzmechanismen in humanen Glioblastomzellen gegen die Behandlung mit TMZ.

Durch ihre Bedeutung bei der Anpassung von Tumorzellen an das Tumormikromilieu stellt die ISR einen potenziellen therapeutischen Zielort dar. Der zentrale Vorgang zur Anpassung an ER-Stress ist die Phosphorylierung von eIF2 α durch die Kinase PERK. Einige Studien zeigten bereits, dass eine Inhibition der Kinase PERK ein möglicher Ansatz in der Tumorthherapie sein kann (Soni et al. 2020; Atkins et al. 2013; Dey et al. 2015). Beispielsweise konnte in Glioblastomzelllinien eine PERK abhängige Regulation der proangiogenetischen Peptidylglyzin alpha-Amidating Monooxygenase (PAM) gezeigt werden (Soni et al. 2020). In EMT Zellen (Übergang vom Epithel zum Mesenchym) verringerte sich, durch die Inhibition von PERK, sowohl die Fähigkeit der EMT-Zellen Tumorsphären zu bilden als auch die Migrationsfähigkeit der Zellen. Weiterhin führte im Mausmodell die Vorbehandlung metastasierender 4T1-Zellen mit dem PERK-Inhibitor GSK 414 zu einer signifikant verringerten Metastasierungsfähigkeit. Im Zusammenhang mit Prioneninfektionen in Mausmodellen hatte die Behandlung mit dem PERK Inhibitor GSK 414 neuroprotektive Effekte (Moreno et al. 2013).

In unseren Versuchen wurden die PERK Inhibitoren GSK 414 und AMG 44 getestet. Ein Einfluss auf das Zellwachstum humaner Glioblastomzellen zeigte sich lediglich in der höchsten untersuchten Konzentration des PERK-Inhibitors GSK 414 (Abb.17). Nach pharmakologischer ER-Stress Induktion waren die Effekte für den Inhibitor GSK 414 bei 100 μ M am stärksten. Der Inhibitor AMG 44 zeigte sich bei einer Konzentration von 1 μ M am potentesten. Für die weiteren Versuche wählten wir, zur Vergleichbarkeit und um off-target Effekte bei hohen Konzentrationen zu minimieren, dennoch die Konzentration von 1 μ M für beide Inhibitoren. Sowohl die durch Tunicamycin induzierte, als auch die durch Glutaminentzug gesteigerte Expression von ATF4 ließen sich durch Behandlung

mit den jeweiligen PERK Inhibitoren abmildern (Abb. 19). Es war ebenfalls ein Effekt auf die durch TMZ-Behandlung gesteigerte ATF4 Expression erkennbar (Abb. 20). Allerdings zeigte sich unter alleiniger Behandlung mit den Inhibitoren, besonders in hohen Konzentrationen, auch eine geringe Zunahme der ATF4 Konzentration, was auf einen off-Target Effekt der PERK-Inhibitoren hindeuten könnte (Abb. 18).

Der Inhibitor GSK 414 wird mit einer *in vitro* IC50 von weniger als 1 nM als hoch wirksamer PERK Inhibitor beschrieben (Mahameed et al. 2019). Unter extremem ER-Stress waren jedoch 30 nM GSK 414 erforderlich, um die Autophosphorylierung von PERK vollständig zu blockieren (Axten et al. 2012). Aufgrund der Ausrichtung des Inhibitors GSK 414 auf die ATP-Bindungsstelle von PERK wurden bereits Bedenken hinsichtlich seiner Selektivität beschrieben (Mahameed et al. 2019). In der Charakterisierung von GSK 414 zeigte sich der Tyrosinkinase-Rezeptor KIT mit einer IC50 von 154 nM als empfindlichste Kinase nach PERK (Axten et al. 2012). KIT spielt eine entscheidende Rolle bei Wachstum, Entwicklung, Zellüberleben, Stoffwechsel und Differenzierung. In bestimmten Tumorentitäten, wie gastrointestinalen Stromatumoren oder Mastozytose, ist KIT das Hauptziel der Therapie (Stankov et al. 2014). Es konnte nachgewiesen werden, dass GSK 414 die KIT-Signalübertragung bei submikromolaren Konzentrationen, die normalerweise zur Hemmung von PERK verwendet werden, hemmt (Mahameed et al. 2019). Durch GSK 414 wurde demnach auch die Lebensfähigkeit von Zellen (MEL526, HepG2 und 293T Zellen) beeinträchtigt, die auf die KIT-Signalübertragung angewiesen sind (Mahameed et al. 2019).

Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass GSK 414 auch RIPK1 hemmt. Diese Kinase ist am TNF α -vermittelten Zelltod beteiligt. Eine vollständige Hemmung des TNF α -vermittelten RIPK1-abhängigen Zelltods trat schon bei Konzentrationen auf, unter denen die PERK-Aktivität der Zellen nicht beeinträchtigt wurde (Mahameed et al. 2019; Rojas-Rivera et al. 2017). Diese Ergebnisse deuten auf eine teilweise eingeschränkte Spezifität des PERK Inhibitors GSK 414 hin und es besteht die Gefahr von Fehlinterpretationen bei der Verwendung im Zusammenhang mit ER-Stress und Zelltod.

Neben der fraglichen Selektivität kam es bei der Behandlung mit dem Inhibitor GSK 414 in Mausmodellen auch zu toxischen Effekten an der

Bauchspeicheldrüse, da Pankreaszellen aufgrund der hohen Proteinsyntheselast zur Bewältigung von ER-Stress auf die P-eIF2 α vermittelte Translationsrepression angewiesen sind (Halliday et al. 2015). Die Toxizität äußerte sich in Hyperglykämie, Zerstörung des exokrinen Pankreasgewebes und Reduktion des Gesamtgewichtes der Bauchspeicheldrüse (Halliday et al. 2015).

AMG 44 zeigte im Gegensatz zu GSK 414 bis zu einer Konzentration von 20 μ M keinen Einfluss auf die KIT-Phosphorylierung und reduzierte auch nicht die KIT-Expression der Zelloberfläche (Mahameed et al. 2019). Allerdings weist GCN2 in der Kinasedomäne eine enge Homologie mit PERK auf. In der Entwicklung des Inhibitors AMG 44 ergab sich das Problem, dass der Inhibitor sowohl PERK als auch GCN2 inhibierte (Smith et al. 2015). Die finale Struktur des Inhibitors war *in vitro* allerdings 1000-fach selektiver für PERK und es ergaben sich keine messbaren Effekte einer GCN2-Hemmung (Smith et al. 2015). In unserer Untersuchung zeigte sich dennoch ein Effekt der beiden PERK Inhibitoren auf ATF4 unter Glutaminentzug. Dies ist in der Literatur bislang nicht beschreiben und weitere Untersuchungen stehen aus.

Die Hemmung der ISR könnte ein vielversprechender therapeutischer Ansatz sein. Aufgrund der beschriebenen toxischen Wirkung des Inhibitors GSK 414 an der Bauchspeicheldrüse und der fraglichen Spezifität beider getesteter Inhibitoren ist es allerdings notwendig, weitere Inhibitoren der ISR zu etablieren. Ein Kandidat hierfür stellt ISRIB (Integrated Stress Response Inhibitor) dar (Halliday et al. 2015). ISRIB unterdrückt durch die Inhibition von eIF2B, das als Guanidin-Nukleotid-Austauschfaktor im Translationsinitiationsprozess benötigt wird, die Wirkung der eIF2 α -Phosphorylierung (Rabouw et al. 2019; Sidrauski et al. 2015). Durch die Behandlung humaner Glioblastomzellen mit ISRIB kam es zu einer Sensibilisierung der Zellen für Hypoxie. Eine ISR-Hemmung führt demnach zu einer erhöhten Sensibilität gegenüber Bedingungen des Tumormikromilieus (Hypoxie, Nährstoffmangel) und einer Beeinträchtigung des Tumorzellüberlebens (Lorenz et al. 2021). Unter Verwendung einer kombinierten TMZ- und ISRIB-Behandlung kam es zu einer erhöhten TMZ-Empfindlichkeit (Lorenz et al. 2021). Dies unterstreicht die Bedeutung der ISR- und insbesondere

der ATF4-Induktion für die TMZ-Resistenz in humanen Glioblastomzellen (Lorenz et al. 2021).

In vivo konnten bei mit Prionen infizierten Mäusen, durch die Behandlung mit ISRIB, neuroprotektive Effekte erzielt werden wodurch sich das Gesamtüberleben verlängerte (Halliday et al. 2015). Im Vergleich zur Behandlung mit GSK 414 kam es nach der Behandlung mit ISRIB nicht zu toxischen Effekten am Pankreas (Halliday et al. 2015).

Dies lässt sich vor allem durch eine weniger starke Hemmung der Phospho-eIF2 α vermittelten Translationsunterdrückung durch ISRIB erklären. Während ISRIB nur als partieller Inhibitor der Translationshemmung wirkt, erfolgt durch die Behandlung mit GSK 414 die vollständige Unterdrückung der Phospho-eIF2 α vermittelten Translationshemmung. Die für das Zellüberleben des Pankreas notwendige Translation kann daher auch nach der Behandlung mit ISRIB weiterhin stattfinden (Halliday et al. 2015).

Verglichen mit gesundem Hirngewebe deuten Datenbankanalysen auf eine erhöhte ATF4-Expression in Gliomen hin. Zudem besteht eine Assoziation zwischen einer erhöhten ATF4-Transkription und einem schlechteren Gesamtüberleben (Chen et al. 2017a; Chen et al. 2017b). ATF4 wurde bereits in mehreren *in vitro* Untersuchungen sowohl mit einer zytoprotektiven als auch mit einer zytotoxischen Rolle in Verbindung gebracht. Es konnte gezeigt werden, dass ATF4 die Ferroptose unter Dihydroartemisinin-induziertem ER-Stress oder Sorafenib-Behandlung abschwächt, um das Überleben von Gliomzellen zu sichern. Eine Hemmung dieser Achse wurde daher als therapeutische Strategie in Erwägung gezogen (Chen et al. 2019). Eine weitere Studie zeigte im Gegensatz dazu eine nach Loperamidbehandlung durch ATF4-vermittelte Induktion des autophagischen Zelltods durch Retikulophagie (d. h. den selektiven Abbau des endoplasmatischen Retikulums) in GB Zellen. Zur Tumorthherapie wurde in diesem Zusammenhang die Aktivierung von ATF4 als vorteilhaft angesehen. Diese Studien unterstreichen den ambivalenten Charakter der ATF4-vermittelten Stressreaktion in Abhängigkeit vom experimentellen Kontext. Ein tieferes Verständnis der ATF4-vermittelten Effekte ist daher vor Durchführung klinischer Studien dringend erforderlich. In unserer Untersuchung haben wir die Tumormikromilieu Bedingungen im Hinblick auf Metabolische- (Sauerstoff- und

Glukosemangel) und auf Behandlungsstrategien (mit TMZ als Standard-Chemotherapeutikum für Glioblastome) untersucht. In beiden Szenarien vermittelte ATF4 eine schützende Anpassung in GB-Zellen. Ein nächster Schritt besteht darin, die Vorteile eines kombinierten TMZ- und anti-ATF4-Ansatzes (z.B. durch ISRIB-Behandlung) *in vivo*-GB-Mausmodellen zu validieren.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass die ISR und ATF4 in humanen Glioblastomzellen maßgeblich an der Resistenz gegen Mikromilieubedingungen (Nährstoffmangel und Hypoxie) sowie gegen Temozolomid beteiligt ist und die entsprechende Inhibition einen therapeutischen Angriffspunkt darstellt (Abb. 21).

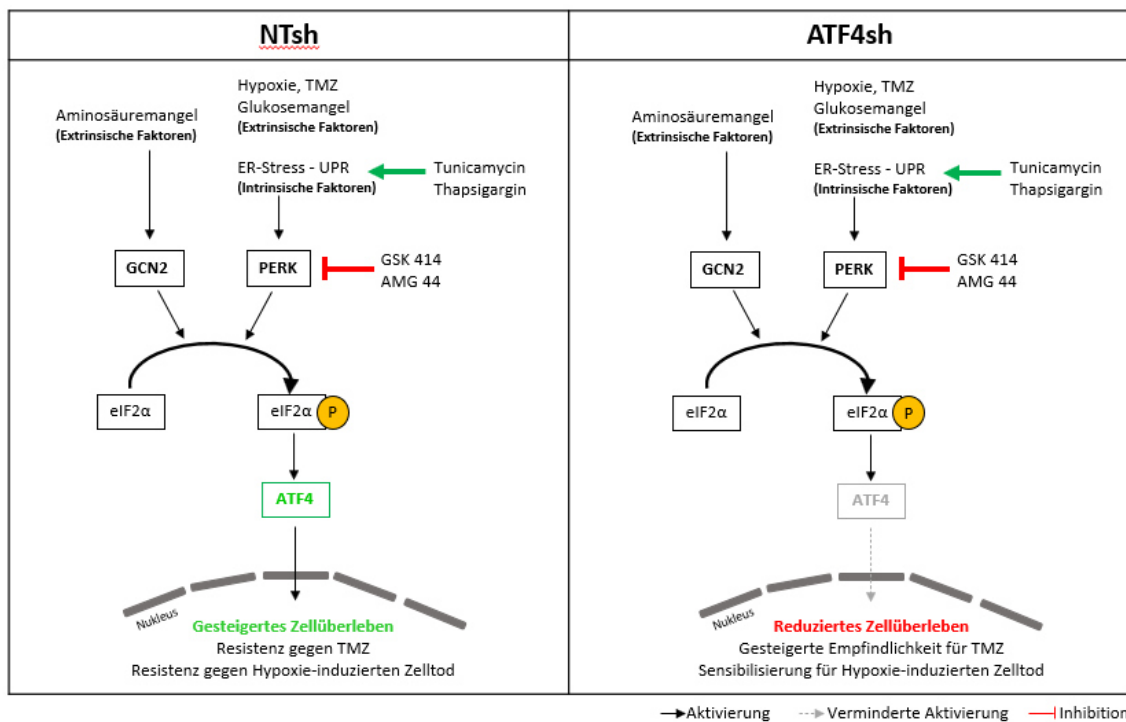


Abbildung 21 Aktivierung von ATF4 in NTsh – und ATF4sh Zellen.

Die integrierte Stressantwort (ISR) wird durch verschiedene Faktoren wie Mangelbedingungen (Aminosäuremangel) oder ER-Stress aktiviert. ER-Stress lässt sich pharmakologisch durch Tunicamycin/Thapsigargin oder durch Bedingungen des Tumormikromilieus, wie Hypoxie oder Glukosemangel, auslösen. Auch die Behandlung mit dem Chemotherapeutikum TMZ führt zu ER-Stress. Infolgedessen kommt es zur PERK-vermittelten Phosphorylierung von eIF2α. Auch Aminosäuremangel führt über die Serin/Threonin Kinase GCN2 zur eIF2α Phosphorylierung. Dadurch wird in NTsh Zellen (linkes Bild) ATF4 induziert

und bedingt die Expression von Zielgenen, die das Zellüberleben erhöhen. Im Gegensatz dazu können ATF4sh Zellen (rechtes Bild) ATF4 nur stark vermindert exprimieren. Dadurch unterbleibt auch die ATF4-vermittelte Anpassungsreaktion. Die pharmakologische PERK-Hemmung mit GSK 414 oder AMG 44 reduziert die PERK vermittelte ATF4-Induktion. Zellen mit gestörter ATF4-Induktion, z. B. durch ATF4-Gensuppression (ATF4sh) oder GSK 414 oder AMG 44-Behandlung, sind für Hypoxie und TMZ-Behandlung sensibilisiert (rechtes Bild).

5 Zusammenfassung

Das schnelle und unkontrollierte Wachstum von Tumorzellen bedingt beim Glioblastom ein heterogenes Tumormikromilieu, mit lokalem Sauerstoff- und Nährstoffmangel. Lokaler Selektionsdruck bedingt eine Evolution besonders anpassungsfähiger Klone. Die integrierte Stressantwort (integrated stress response, ISR) ist ein zelluläres Programm, das durch zahlreiche Stressoren, wie endoplasmatische Retikulum Stress (ER-Stress), durch die Akkumulation ungefalteter Proteine, Hypoxie, Glukose- oder Aminosäuremangel aktiviert wird. Ein zentraler Schritt zur Aktivierung der ISR ist die Phosphorylierung der alpha Untereinheit des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors 2 (eIF2 α) an Serin 51. Die Phosphorylierung von eIF2 α führt zur Modulation der Translation mit Induktion des Transkriptionsfaktors ATF4 (*Activating Transcription Factor 4*), der dann zelluläre Anpassungsvorgänge einleitet.

Unsere Hypothese lautete, dass ATF4-vermittelte molekulare Anpassungsmechanismen menschlicher Glioblastom (GB)-Zellen an die Bedingungen der Tumormikroumgebung (wie z.B. Hypoxie und Nährstoffentzug) maßgeblich zur Therapieresistenz beitragen und auch die Empfindlichkeit gegen TMZ-Chemotherapie beeinflussen. Somit könnte eine Inhibition der integrierten Stressantwort über den zentralen Mediator ATF4 zu einem gesteigerten Ansprechen auf Therapiebedingungen führen.

Um die ISR und ATF4 als mögliche therapeutische Angriffspunkte im Glioblastom zu evaluieren, wurde die ATF4 Induktion in Glioblastomzellen pharmakologisch und genetisch moduliert und im Zusammenhang mit TMZ-Behandlung sowie Glukose- und Sauerstoffentzug untersucht. Unter Glutaminentzug, Hypoxie und TMZ-Behandlung, welche Aspekte der GB-Mikroumgebung widerspiegeln, zeigten sich erhöhte ATF4 Proteinspiegel. ATF4-gensupprimierte GB-Zellen (ATF4sh) exprimierten unter gleicher Behandlung wesentlich weniger ATF4.

Im Einklang mit der Hypothese, dass ATF4 zur Therapieresistenz humaner Glioblastomzellen beiträgt, waren ATF4-gensupprimierte GB-Zellen (ATF4sh) im Vergleich zur Kontrollzelllinie empfindlicher gegen Hypoxie-induzierten Zelltod und zeigten einen erhöhten Sauerstoffverbrauch. Umgekehrt zeigten GB-Zellen nach pharmakologischer ISR Induktion einen verminderten Sauerstoffverbrauch. Auch nach Behandlung mit TMZ war die Überlebensrate in ATF4sh Zellen im

Vergleich zur Kontrollgruppe geringer. Zur Hemmung der ISR wurden verschiedenen Inhibitoren der Kinase PERK (*Protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase*) entwickelt. In unseren Untersuchungen war nach der Behandlung der GB-Zelllinien eine verminderte ATF4 Expression festzustellen. Dabei kam es allerdings gleichzeitig bei der Behandlung mit höheren Inhibitorkonzentrationen zu einer Induktion von ATF4. Für den PERK-Inhibitor GSK 414 wurde in der Literatur auch die Hemmung anderer Kinasen wie KIT und RIPK1 gezeigt. Daher konnte bei den Konzentrationen, die für eine vollständige PERK-Inhibition erforderlich waren, keine selektive Hemmung von PERK mehr gewährleistet werden. Besonders aufgrund ihrer Toxizität auf die Funktion des Pankreas eignen sich diese Inhibitoren nicht für eine *in vivo* Erprobung. Da aber durch die Inhibition der ISR eine neuroprotektive Wirkung beschrieben ist, besteht die Notwendigkeit, weitere Inhibitoren zur Hemmung der ISR zu entwickeln. ISRIB (*Integrated Stress Response Inhibitor*) ist ein partieller ISR Inhibitor, der eIF2B angreift, was als Guanidin-Nukleotid-Austauschfaktor im Translationsinitiationsprozess benötigt wird. Für ISRIB wurde bereits *in vitro* und *in vivo* eine neuroprotektive, aber keine toxische Wirkung beschrieben. Zusammenfassend lieferten unsere Untersuchungen Hinweise auf die wichtige Rolle von ATF4 für die Anpassung humaner GB-Zellen an Bedingungen der Tumormikroumgebung und für die Entstehung von TMZ-Resistenzen. Die Hemmung der ISR in GB-Zellen könnte daher ein vielversprechender Therapieansatz sein.

6 Summary

The rapid growth of glioblastoma cells results in a heterogeneous composition of the tumor microenvironment with local oxygen and nutrient deficiency. Local selection pressure triggers an evolution of particularly adaptive clones. The Integrated Stress Response (ISR) is a cellular adaptive program activated by numerous stressors such as endoplasmic reticulum stress through accumulation of unfolded proteins, hypoxia, glucose or amino acid starvation. A central step in activating the ISR is the phosphorylation of the alpha subunit of the eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2 α) at serine 51. The phosphorylation of eIF2 α leads to the modulation of translation with the induction of the transcription factor ATF4 (Activating Transcription Factor 4), which then initiates cellular adaptation processes. Our hypothesis was that ATF4-mediated molecular adaptation mechanisms of human glioblastoma (GB) cells to the condition of the tumor microenvironment (such as hypoxia and nutrient deprivation) contribute significantly to therapy resistance and also influence the sensitivity to temozolomide (TMZ) chemotherapy. Thus, inhibition of the integrated stress response via the central mediator ATF4 could lead to an improved response to therapy conditions.

In order to evaluate ISR and ATF4 as possible therapeutic targets in glioblastoma, ATF4 induction in glioblastoma cells was modulated pharmacologically and genetically. Sensitivity to TMZ treatment and glucose and oxygen deprivation was analyzed. ATF4 was induced by glutamine deprivation, and hypoxia. Also, TMZ treatment resulted in ISR induction via ATF4. ATF4 expression was significantly reduced in ATF4 gene-suppressed GB (ATF4sh) cells. In line with the hypothesis that ATF4 contributes to therapy resistance of human glioblastoma cells, in ATF4 gene-suppressed GB cells (ATF4sh) sensitivity to hypoxia-induced cell death was increased. Additionally, ATFsh cells showed an increased oxygen consumption compared to the control cells and pharmacological ISR induction with tunicamycin led to reduced oxygen consumption. Treatment with TMZ led to reduced survival of ATF4sh cells compared to control cells. To inhibit ISR, various inhibitors of the kinase PERK (Protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase) have already been developed. In our investigations, ATF4 expression was decreased by

pharmacological PERK inhibition using the established compounds GSK 414 and AMG 44. At the same time however, treatment with higher inhibitor concentrations led to an induction of ATF4. For the PERK inhibitor GSK 414 an off-target inhibition of other kinases has previously been demonstrated in the higher concentration range. Therefore, it is plausible that concentrations required for a complete PERK inhibition in our cell models also influence other kinases. Especially because of the toxicity to the function of the pancreas, these inhibitors are not suitable for an *in vivo* evaluation. However, since a neuroprotective effect has been described by inhibiting the ISR, novel compounds for inhibiting the ISR need to be established. ISRIB (Integrated Stress Response Inhibitor) is a partial ISR inhibitor targeting eIF2B, which is required as a guanidine nucleotide exchange factor in the translation initiation process. A neuroprotective but no toxic effect has yet been described for ISRIB *in vitro* and *in vivo*. In summary, our experimental study provides evidence for an important role of ATF4 in the adaptation of human GB cells under conditions of the tumor microenvironment, such as low oxygen and nutrient availability, and in the development of TMZ resistance. Inhibition of ISR in GB cells could therefore be a promising therapeutic approach.

7 Literaturverzeichnis

Ameri, Kurosh; Harris, Adrian L. (2008): Activating transcription factor 4. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 40 (1), S. 14–21. DOI: 10.1016/j.biocel.2007.01.020.

Atkins, Charity; Liu, Qi; Minthorn, Elisabeth; Zhang, Shu-Yun; Figueroa, David J.; Moss, Katherine et al. (2013): Characterization of a novel PERK kinase inhibitor with antitumor and antiangiogenic activity. In: *Cancer research* 73 (6), S. 1993–2002. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3109.

Axten, Jeffrey M.; Medina, Jesús R.; Feng, Yanhong; Shu, Arthur; Romeril, Stuart P.; Grant, Seth W. et al. (2012): Discovery of 7-methyl-5-(1-{3-(trifluoromethyl)phenylacetyl}-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-amine (GSK2606414), a potent and selective first-in-class inhibitor of protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase (PERK). In: *Journal of medicinal chemistry* 55 (16), S. 7193–7207. DOI: 10.1021/jm300713s.

Bassik, Michael C.; Kampmann, Martin (2011): Knocking out the door to tunicamycin entry. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (29), S. 11731–11732. DOI: 10.1073/pnas.1109035108.

Bi, Meixia; Naczki, Christine; Koritzinsky, Marianne; Fels, Diane; Blais, Jaime; Hu, Nianping et al. (2005): ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth. In: *The EMBO journal* 24 (19), S. 3470–3481. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600777.

Birner, Peter; Pusch, Stefan; Christov, Christo; Mihaylova, Stiliana; Toumangelova-Uzeir, Kalina; Natchev, Sevdalin et al. (2014): Mutant IDH1 inhibits PI3K/Akt signaling in human glioma. In: *Cancer* 120 (16), S. 2440–2447. DOI: 10.1002/cncr.28732.

Blais, Jaime D.; Filipenko, Vasilisa; Bi, Meixia; Harding, Heather P.; Ron, David; Koumenis, Costas et al. (2004): Activating transcription factor 4 is translationally regulated by hypoxic stress. In: *Molecular and cellular biology* 24 (17), S. 7469–7482. DOI: 10.1128/MCB.24.17.7469-7482.2004.

Braun, Christian J.; Stanciu, Monica; Boutz, Paul L.; Patterson, Jesse C.; Calligaris, David; Higuchi, Fumi et al. (2017): Coordinated Splicing of Regulatory Detained Introns within Oncogenic Transcripts Creates an Exploitable Vulnerability in Malignant Glioma. In: *Cancer cell* 32 (4), 411–426.e11. DOI: 10.1016/j.ccell.2017.08.018.

Bruns, Ines; Sauer, Benedikt; Burger, Michael C.; Eriksson, Jule; Hofmann, Ute; Braun, Yannick et al. (2019): Disruption of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator (PGC)-1 α reverts key features of the neoplastic phenotype of glioma cells. In: *The Journal of biological chemistry* 294 (9), S. 3037–3050. DOI: 10.1074/jbc.RA118.006993.

Chen, D.; Fan, Z.; Rauh, M.; Buchfelder, M.; Eyupoglu, I. Y.; Savaskan, N. (2017a): ATF4 promotes angiogenesis and neuronal cell death and confers ferroptosis in a xCT-dependent manner. In: *Oncogene* 36 (40), S. 5593–5608. DOI: 10.1038/onc.2017.146.

- Chen, Daishi; Rauh, Manfred; Buchfelder, Michael; Eyupoglu, Ilker Y.; Savaskan, Nicolai (2017b): The oxido-metabolic driver ATF4 enhances temozolamide chemo-resistance in human gliomas. In: *Oncotarget* 8 (31), S. 51164–51176. DOI: 10.18632/oncotarget.17737.
- Chen, Yibing; Mi, Yanjun; Zhang, Xiaofei; Ma, Qian; Song, Yucen; Zhang, Liwei et al. (2019): Dihydroartemisinin-induced unfolded protein response feedback attenuates ferroptosis via PERK/ATF4/HSPA5 pathway in glioma cells. In: *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 38 (1), S. 402. DOI: 10.1186/s13046-019-1413-7.
- Dadey, David Y. A.; Kapoor, Vaishali; Khudanyan, Arpine; Thotala, Dinesh; Hallahan, Dennis E. (2018): PERK Regulates Glioblastoma Sensitivity to ER Stress Although Promoting Radiation Resistance. In: *Molecular cancer research : MCR* 16 (10), S. 1447–1453. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-18-0224.
- Dey, Souvik; Sayers, Carly M.; Verginadis, Ioannis I.; Lehman, Stacey L.; Cheng, Yi; Cerniglia, George J. et al. (2015): ATF4-dependent induction of heme oxygenase 1 prevents anoikis and promotes metastasis. In: *The Journal of clinical investigation* 125 (7), S. 2592–2608. DOI: 10.1172/JCI78031.
- Eckerich, Carmen; Schulte, Alexander; Martens, Tobias; Zapf, Svenja; Westphal, Manfred; Lamszus, Katrin (2009): RON receptor tyrosine kinase in human gliomas: expression, function, and identification of a novel soluble splice variant. In: *Journal of neurochemistry* 109 (4), S. 969–980. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2009.06027.x.
- Feng, Yu-Xiong; Sokol, Ethan S.; Del Vecchio, Catherine A.; Sanduja, Sandhya; Claessen, Jasper H. L.; Proia, Theresa A. et al. (2014): Epithelial-to-mesenchymal transition activates PERK-eIF2 α and sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress. In: *Cancer discovery* 4 (6), S. 702–715. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-13-0945.
- Fischer, Sebastian; Ronellenfitsch, Michael W.; Thiepold, Anna-Luisa; Harter, Patrick N.; Reichert, Sebastian; Kögel, Donat et al. (2014): Hypoxia enhances the antiglioma cytotoxicity of B10, a glycosylated derivative of betulinic acid. In: *PloS one* 9 (4), e94921. DOI: 10.1371/journal.pone.0094921.
- Fusakio, Michael E.; Willy, Jeffrey A.; Wang, Yongping; Mirek, Emily T.; Al Baghdadi, Rana J. T.; Adams, Christopher M. et al. (2016): Transcription factor ATF4 directs basal and stress-induced gene expression in the unfolded protein response and cholesterol metabolism in the liver. In: *Molecular biology of the cell* 27 (9), S. 1536–1551. DOI: 10.1091/mbc.E16-01-0039.
- Gjymishka, Altin; Su, Nan; Kilberg, Michael S. (2009): Transcriptional induction of the human asparagine synthetase gene during the unfolded protein response does not require the ATF6 and IRE1/XBP1 arms of the pathway. In: *The Biochemical journal* 417 (3), S. 695–703. DOI: 10.1042/BJ20081706.
- Grady, J. E.; Lummis, W. L.; Smith, C. G. (1960): An improved tissue culture assay. III. Alternate methods for measuring cell growth. In: *Cancer research* 20, S. 1114–1117.
- Halliday, M.; Radford, H.; Sekine, Y.; Moreno, J.; Verity, N.; Le Quesne, J. et al. (2015): Partial restoration of protein synthesis rates by the small molecule

- ISRIB prevents neurodegeneration without pancreatic toxicity. In: *Cell death & disease* 6, e1672. DOI: 10.1038/cddis.2015.49.
- Han, Jaeseok; Back, Sung Hoon; Hur, Junguk; Lin, Yu-Hsuan; Gildersleeve, Robert; Shan, Jixiu et al. (2013): ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. In: *Nature cell biology* 15 (5), S. 481–490. DOI: 10.1038/ncb2738.
- Harding, H. P.; Novoa, I.; Zhang, Y.; Zeng, H.; Wek, R.; Schapira, M.; Ron, D. (2000): Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. In: *Molecular cell* 6 (5), S. 1099–1108. DOI: 10.1016/s1097-2765(00)00108-8.
- Jawhari, Soha; Ratinaud, Marie-Hélène; Verdier, Mireille (2016): Glioblastoma, hypoxia and autophagy: a survival-prone 'ménage-à-trois'. In: *Cell death & disease* 7 (10), e2434. DOI: 10.1038/cddis.2016.318.
- Jiang, Jie; Srivastava, Sankalp; Zhang, Ji (2019): Starve Cancer Cells of Glutamine: Break the Spell or Make a Hungry Monster? In: *Cancers* 11 (6). DOI: 10.3390/cancers11060804.
- Klann, Kevin; Tascher, Georg; Münch, Christian (2020): Functional Translatome Proteomics Reveal Converging and Dose-Dependent Regulation by mTORC1 and eIF2 α . In: *Molecular cell* 77 (4), 913-925.e4. DOI: 10.1016/j.molcel.2019.11.010.
- Komar, Anton A.; Merrick, William C. (2020): A Retrospective on eIF2A-and Not the Alpha Subunit of eIF2. In: *International journal of molecular sciences* 21 (6). DOI: 10.3390/ijms21062054.
- Koumenis, Constantinos; Naczki, Christine; Koritzinsky, Marianne; Rastani, Sally; Diehl, Alan; Sonenberg, Nahum et al. (2002): Regulation of protein synthesis by hypoxia via activation of the endoplasmic reticulum kinase PERK and phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 α . In: *Molecular and cellular biology* 22 (21), S. 7405–7416. DOI: 10.1128/MCB.22.21.7405-7416.2002.
- La Cadena, Selene García de; Hernández-Fonseca, Karla; Camacho-Arroyo, Ignacio; Massieu, Lourdes (2014): Glucose deprivation induces reticulum stress by the PERK pathway and caspase-7- and calpain-mediated caspase-12 activation. In: *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 19 (3), S. 414–427. DOI: 10.1007/s10495-013-0930-7.
- Li, Ruizhi; Wilson, Kristin F.; Cerione, Richard A. (2022): Elucidation of an mTORC2-PKC-NRF2 pathway that sustains the ATF4 stress response and identification of Sirt5 as a key ATF4 effector. In: *Cell death discovery* 8 (1), S. 357. DOI: 10.1038/s41420-022-01156-5.
- Lorenz, Nadja I.; Sittig, Alina C. M.; Urban, Hans; Luger, Anna-Luisa; Engel, Anna L.; Münch, Christian et al. (2021): Activating transcription factor 4 mediates adaptation of human glioblastoma cells to hypoxia and temozolomide. In: *Scientific reports* 11 (1), S. 14161. DOI: 10.1038/s41598-021-93663-1.
- Mahameed, Mohamed; Wilhelm, Thomas; Darawshi, Odai; Obiedat, Akram; Tommy, Weiss-Sadan; Chintha, Chetan et al. (2019): The unfolded protein

response modulators GSK2606414 and KIRA6 are potent KIT inhibitors. In: *Cell death & disease* 10 (4), S. 300. DOI: 10.1038/s41419-019-1523-3.

McGrath, Eoghan P.; Logue, Susan E.; Mnich, Katarzyna; Deegan, Shane; Jäger, Richard; Gorman, Adrienne M.; Samali, Afshin (2018): The Unfolded Protein Response in Breast Cancer. In: *Cancers* 10 (10). DOI: 10.3390/cancers10100344.

Moore, Claire E.; Omikorede, Omotola; Gomez, Edith; Willars, Gary B.; Herbert, Terence P. (2011): PERK activation at low glucose concentration is mediated by SERCA pump inhibition and confers preemptive cytoprotection to pancreatic β -cells. In: *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 25 (2), S. 315–326. DOI: 10.1210/me.2010-0309.

Moreno, Julie A.; Halliday, Mark; Molloy, Colin; Radford, Helois; Verity, Nicholas; Axten, Jeffrey M. et al. (2013): Oral treatment targeting the unfolded protein response prevents neurodegeneration and clinical disease in prion-infected mice. In: *Science translational medicine* 5 (206), 206ra138. DOI: 10.1126/scitranslmed.3006767.

Ohgaki, Hiroko; Dessen, Pierre; Jourde, Benjamin; Horstmann, Sonja; Nishikawa, Tomofumi; Di Patre, Pier-Luigi et al. (2004): Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. In: *Cancer research* 64 (19), S. 6892–6899. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1337.

Pakos-Zebrucka, Karolina; Koryga, Izabela; Mnich, Katarzyna; Ljujic, Mila; Samali, Afshin; Gorman, Adrienne M. (2016): The integrated stress response. In: *EMBO reports* 17 (10), S. 1374–1395. DOI: 10.15252/embr.201642195.

Peñaranda Fajardo, Natalia M.; Meijer, Coby; Kruyt, Frank A. E. (2016): The endoplasmic reticulum stress/unfolded protein response in gliomagenesis, tumor progression and as a therapeutic target in glioblastoma. In: *Biochemical pharmacology* 118, S. 1–8. DOI: 10.1016/j.bcp.2016.04.008.

Rabouw, Huib H.; Langereis, Martijn A.; Anand, Aditya A.; Visser, Linda J.; Groot, Raoul J. de; Walter, Peter; van Kuppeveld, Frank J. M. (2019): Small molecule ISRIB suppresses the integrated stress response within a defined window of activation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116 (6), S. 2097–2102. DOI: 10.1073/pnas.1815767116.

Rojas-Rivera, Diego; Delvaeye, Tinneke; Roelandt, Ria; Nerinckx, Wim; Augustyns, Koen; Vandenaabeele, Peter; Bertrand, Mathieu J. M. (2017): When PERK inhibitors turn out to be new potent RIPK1 inhibitors: critical issues on the specificity and use of GSK2606414 and GSK2656157. In: *Cell death and differentiation* 24 (6), S. 1100–1110. DOI: 10.1038/cdd.2017.58.

Roth, W.; Fontana, A.; Trepel, M.; Reed, J. C.; Dichgans, J.; Weller, M. (1997): Immunochemotherapy of malignant glioma: synergistic activity of CD95 ligand and chemotherapeutics. In: *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 44 (1), S. 55–63. DOI: 10.1007/s002620050355.

Rozpędek, Wioletta; Pytel, Dariusz; Dziki, Łukasz; Nowak, Alicja; Dziki, Adam; Diehl, J. Alan; Majsterek, Ireneusz (2017): Inhibition of PERK-dependent pro-adaptive signaling pathway as a promising approach for cancer treatment. In: *Polski przegląd chirurgiczny* 89 (3), S. 7–10.

- Rzymiski, T.; Milani, M.; Pike, L.; Buffa, F.; Mellor, H. R.; Winchester, L. et al. (2010): Regulation of autophagy by ATF4 in response to severe hypoxia. In: *Oncogene* 29 (31), S. 4424–4435. DOI: 10.1038/onc.2010.191.
- Sidrauski, Carmela; McGeachy, Anna M.; Ingolia, Nicholas T.; Walter, Peter (2015): The small molecule ISRIB reverses the effects of eIF2 α phosphorylation on translation and stress granule assembly. In: *eLife* 4. DOI: 10.7554/eLife.05033.
- Singleton, Dean C.; Harris, Adrian L. (2012): Targeting the ATF4 pathway in cancer therapy. In: *Expert opinion on therapeutic targets* 16 (12), S. 1189–1202. DOI: 10.1517/14728222.2012.728207.
- Siu, Fai; Bain, Perry J.; LeBlanc-Chaffin, Rene; Chen, Hong; Kilberg, Michael S. (2002): ATF4 is a mediator of the nutrient-sensing response pathway that activates the human asparagine synthetase gene. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (27), S. 24120–24127. DOI: 10.1074/jbc.M201959200.
- Smith, Adrian L.; Andrews, Kristin L.; Beckmann, Holger; Bellon, Steven F.; Beltran, Pedro J.; Booker, Shon et al. (2015): Discovery of 1H-pyrazol-3(2H)-ones as potent and selective inhibitors of protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK). In: *Journal of medicinal chemistry* 58 (3), S. 1426–1441. DOI: 10.1021/jm5017494.
- Soni, Himanshu; Bode, Julia; Nguyen, Chi D. L.; Puccio, Laura; Neßling, Michelle; Piro, Rosario M. et al. (2020): PERK-mediated expression of peptidylglycine α -amidating monooxygenase supports angiogenesis in glioblastoma. In: *Oncogenesis* 9 (2), S. 18. DOI: 10.1038/s41389-020-0201-8.
- Stankov, Karmen; Popovic, Stevan; Mikov, Momir (2014): C-KIT signaling in cancer treatment. In: *Current pharmaceutical design* 20 (17), S. 2849–2880. DOI: 10.2174/13816128113199990593.
- Steinbach, J. P.; Wolburg, H.; Klumpp, A.; Probst, H.; Weller, M. (2003): Hypoxia-induced cell death in human malignant glioma cells: energy deprivation promotes decoupling of mitochondrial cytochrome c release from caspase processing and necrotic cell death. In: *Cell death and differentiation* 10 (7), S. 823–832. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401252.
- Stupp, Roger; Mason, Warren P.; van den Bent, Martin J.; Weller, Michael; Fisher, Barbara; Taphoorn, Martin J. B. et al. (2005): Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. In: *The New England journal of medicine* 352 (10), S. 987–996. DOI: 10.1056/NEJMoa043330.
- Szewczyk, Magdalena M.; Luciani, Genna M.; Vu, Victoria; Murison, Alex; Dilworth, David; Barghout, Samir H. et al. (2022): PRMT5 regulates ATF4 transcript splicing and oxidative stress response. In: *Redox biology* 51, S. 102282. DOI: 10.1016/j.redox.2022.102282.
- Thiebold, Anna-Luisa; Lorenz, Nadja I.; Foltyn, Martha; Engel, Anna L.; Divé, Iris; Urban, Hans et al. (2017): Mammalian target of rapamycin complex 1 activation sensitizes human glioma cells to hypoxia-induced cell death. In: *Brain : a journal of neurology* 140 (10), S. 2623–2638. DOI: 10.1093/brain/awx196.
- Vandesompele, Jo; Preter, Katleen de; Pattyn, Filip; Poppe, Bruce; van Roy, Nadine; Paepe, Anne de; Speleman, Frank (2002): Accurate normalization of

real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. In: *Genome biology* 3 (7), RESEARCH0034. DOI: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034.

Wang, Miao; Kaufman, Randal J. (2014): The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. In: *Nature reviews. Cancer* 14 (9), S. 581–597. DOI: 10.1038/nrc3800.

Wanka, C.; Brucker, D. P.; Bähr, O.; Ronellenfitsch, M.; Weller, M.; Steinbach, J. P.; Rieger, J. (2012): Synthesis of cytochrome C oxidase 2: a p53-dependent metabolic regulator that promotes respiratory function and protects glioma and colon cancer cells from hypoxia-induced cell death. In: *Oncogene* 31 (33), S. 3764–3776. DOI: 10.1038/onc.2011.530.

Wek, R. C.; Jiang, H-Y; Anthony, T. G. (2006): Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. In: *Biochemical Society transactions* 34 (Pt 1), S. 7–11. DOI: 10.1042/BST20060007.

Wortham, Noel C.; Proud, Christopher G. (2015): eIF2B: recent structural and functional insights into a key regulator of translation. In: *Biochemical Society transactions* 43 (6), S. 1234–1240. DOI: 10.1042/BST20150164.

Ye, Jiangbin; Kumanova, Monika; Hart, Lori S.; Sloane, Kelly; Zhang, Haiyan; Panis, Diego N. de et al. (2010): The GCN2-ATF4 pathway is critical for tumour cell survival and proliferation in response to nutrient deprivation. In: *The EMBO journal* 29 (12), S. 2082–2096. DOI: 10.1038/emboj.2010.81.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Darstellung der ISR.....	6
Abbildung 2 Translationale Regulation von ATF4 unter ungestressten Bedingungen.....	9
Abbildung 3 Translationale Regulation von ATF4 unter Stressbedingungen. ..	10
Abbildung 4 Ermittlung der basalen ATF4 Expression in einem Panel humaner Gliomzelllinien	24
Abbildung 5 Etablierung eines geeigneten ATF4 Antikörpers	25
Abbildung 6 Tunicamycin und Thapsigargin induzieren die Aktivierung von ATF4 in humanen GB Zellen.....	26
Abbildung 7 Tunicamycin und Thapsigargin induzieren die Aktivierung von ATF4 und dessen Zielgenen <i>XPOT</i> , <i>WARS1</i> und <i>TRIB3</i> in humanen GB Zellen.	27
Abbildung 8 Glutaminentzug führt auf mRNA und Proteinebene zur gesteigerten ATF4 Expression in humanen GB Zellen.	28
Abbildung 9 TMZ-Behandlung induziert die Aktivierung von ATF4 und dessen Zielgenen.....	29
Abbildung 10 ATF4 gensupprimierte Zellen weisen ein reduziertes Ansprechen auf pharmakologische ISR Induktion auf.....	30
Abbildung 11 Glutaminentzug führt zu einem gesteigerten ATF4 Proteinlevel in humanen GB Zellen.	31
Abbildung 12 Hypoxie führt zu einer gesteigerten Translation von ATF4.....	31
Abbildung 13 Tunicamycinbehandlung schützt humane GB Zellen vor Hypoxie-induziertem Zelltod.....	32
Abbildung 14 ATF4sh Zellen sind gegenüber Hypoxie- induziertem Zelltod sensibilisiert.....	33
Abbildung 15 Der erhöhte Sauerstoffverbrauch ATF4 gensupprimierter Zellen lässt sich durch die pharmakologische Aktivierung der ISR umkehren.	34
Abbildung 16 Unter TMZ-Behandlung zeigen ATF4sh Zellen einen reduzierten ATF4 Anstieg und eine größere Behandlungssensibilität im Vergleich zu NTsh Zellen.	35
Abbildung 17 Toxizität der PERK Inhibitoren GSK 414 und AMG 44.....	36

Abbildung 18 Die Behandlung mit pharmakologischen PERK Inhibitoren führt zu dosisabhängiger Reduktion des ATF4 Proteinlevels in humanen GB Zellen. ..	37
Abbildung 19 Die PERK Inhibitoren GSK 414 und AMG 44 hemmen die ATF4 Aktivierung in humanen GB Zellen.	38
Abbildung 20 Reduzierte TMZ vermittelte ATF4 Expression nach Ko-Behandlung mit den PERK Inhibitoren.	39
Abbildung 21 Aktivierung von ATF4 in NTsh – und ATF4sh Zellen.	47

Teile der Ergebnisse dieser Disputation wurden bereits veröffentlicht. Die Abbildungen 4; 6A,B; 7; 8 A,B,C; 9; 10 A,B,C; 11; 13; 14; 15 A,B; 16 A,B,C und 21 wurden teilweise in unveränderter, teilweise in leicht abgewandelter Form aus folgendem Artikel übernommen:

Nadja I. Lorenz*, Alina C. M. Sittig* (* "equal contribution"), Hans Urban, Anna-Luisa Luger, Anna L. Engel, Christian Münch, Joachim P. Steinbach & Michael W. Ronellenfitsch

„Activating transcription factor 4 mediates adaptation of human glioblastoma cells to hypoxia and temozolomide“

Scientific Reports **volume 11**, Article number: 14161 (2021)

Eine Genehmigung des Verlegers wurde eingeholt.

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Eigenschaften der verwendeten Glioblastomzelllinien.....	15
Tabelle 2 Auswertung des Mykoplasmentests	16
Tabelle 3 Pipettierschema	19
Tabelle 4 Primersequenzen.....	22

10 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:

Die Bedeutung der Integrierten Stressantwort für die Adaptation humaner Glioblastomzellen an Bedingungen des Tumormikromilieus

Im Zentrum der Neurologie und Neurochirurgie
Funktionsbereich Neuroonkologie

unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. 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:

Nadja I. Lorenz*, Alina C. M. Sittig* (* equal contribution), Hans Urban, Anna-Luisa Luger, Anna L. Engel, Christian Münch, Joachim P. Steinbach & Michael W. Ronellenfitsch

„Activating transcription factor 4 mediates adaptation of human glioblastoma cells to hypoxia and temozolomide“

Scientific reports 11, Artikelnummer: 14161 (2021)

(Ort, Datum)

(Unterschrift)

11 Lebenslauf



Publiziert unter der Creative Commons-Lizenz Namensnennung (CC BY) 4.0 International.
Published under a Creative Commons Attribution (CC BY) 4.0 International License.
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>