
Aus der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Jörg-Christian Tonn

*Die Sensitivität von Gliomzellen und peripheren Krebszellen gegenüber
pharmakologisch induziertem Endoplasmatischem-Retikulum-Stress*

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Alisha Vanessa Haug

aus
(Geburtsort)

Horb am Neckar

Jahr

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Rainer Glaß

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Ralph Mocikat
PD Dr. Tobias A. Rupprecht

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Roland Kälin

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 19.05.2020

1. Inhaltsverzeichnis

1. INHALTSVERZEICHNIS	I
2. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
3. EINLEITUNG	1
3.1 Glioblastom	1
3.1.1 Symptome	1
3.1.2 Diagnostik.....	2
3.1.3 Therapie.....	2
3.1.4 Glioblastoma multiforme - Genetik.....	3
3.1.5 Die Rolle des TRPV1-Rezeptors in Glioblastomen.....	4
3.2 Das Endoplasmatische Retikulum	5
3.3 Endoplasmatischer-Retikulum-Stress	5
3.3.1 Erster Arm der ER-Stress-Kaskade- via IRE1	7
3.3.2 Zweiter Arm der ER-Stress-Kaskade – via PERK.....	7
3.3.3 Dritter Arm der ER-Stress-Kaskade – via ATF 6	7
3.3.4 Die Endeffekte der UPR.....	7
3.4 ER-Stress in Tumorzellen	8
3.4.1 ER-Stress in tumorassoziierten Stromazellen.....	9
3.4.2 PERK.....	10
3.4.3 IRE1	10
3.4.4 ATF6.....	11
3.5 Pharmakologische Interventionsmöglichkeiten in ER-Stress	11
3.6 ER-Stress Modulatoren	11
3.6.1 Gruppe I.....	12
3.6.2 Gruppe II.....	12
3.6.3 Gruppe III.....	12

3.6.4	Gruppe IV	13
3.6.5	Gruppe V	13
3.6.6	Weitere Substanzen	13
4.	ZIELSETZUNG	15
5.	MATERIALIEN	17
6.	METHODEN.....	22
6.1	Zellkultivierung	22
6.2	Passagieren von Monolayerkulturen.....	22
6.3	Funktionelle Assays.....	22
6.3.1	Zytotoxizitätsassay.....	22
6.3.2	Auswertung.....	23
6.4	Molekularbiologische Methoden	24
6.4.1	Reporter Gene Assay.....	24
6.4.2	Auswertung.....	25
6.4.3	Transiente Transfektion	25
6.5	Mikrobiologische Methoden.....	25
6.5.1	Kultivierung von E.coli Bakterien auf Agar.....	25
6.5.2	Kultivierung von Bakterien in flüssigem LB-Medium	25
6.5.3	Plasmid Transfektion	25
6.5.4	Transformation von E.coli mittels Hitzeschock	26
6.5.5	Isolation und Aufreinigung von Plasmid-DNA aus E.coli.....	27
6.6	Immuncytochemie (ICC).....	27
7.	ERGEBNISSE	28
7.1	Die Sensitivität von Gliomzellen und peripheren Krebszellen gegenüber pharmakologisch induziertem ER-Stress.....	28
7.2	Sensitivität von Gliomzellen auf ER-Stress Induktoren	29

7.3	Screening von ER-Stress-Modulatoren.....	33
7.4	Sensitivität von Gliomzellen auf eine Kombinationstherapie aus ER-Stress Induktoren	38
7.5	Sensitivität von Gliomzellen auf eine Kombinationstherapie aus ER-Stress Induktor und Modulator.	39
7.6	Sensitivität von Gliomzellen auf eine Kombinationstherapie aus einem ER-Stress Induktor und dem TRPV1-Rezeptor-Agonisten CBD	44
7.7	Sensitivität von Gliomzellen auf eine Kombinationstherapie aus einem ER-Stress Modulator und dem TRPV1-Rezeptor-Agonisten CBD	46
7.8	Sensitivität von Gliomzellen aus Patientenmaterial auf eine Kombinationstherapie aus dem ER-Stress Modulator Eeyarestatin I und dem TRPV1-Rezeptor-Agonisten CBD.....	47
7.9	Sensitivität von genetisch veränderten Gliomzellen auf eine Kombinationstherapie aus dem ER-Stress Modulator Eeyarestatin I und dem TRPV1-Rezeptor-Agonisten CBD.....	48
7.10	Genetische Untersuchungen der Gliomzellen zur Rekapitulation der Spezifität der Pharmakotherapie auf ER-Stress	49
7.11	Immunzytochemische Untersuchungen von Gliomzellen zur Rekapitulation der Spezifität der Pharmakotherapie auf ER-Stress	50
8.	DISKUSSION	51
9.	ZUSAMMENFASSUNG	54
10.	REFERENZEN.....	55

2. Abkürzungsverzeichnis

AEBSF	4-Benzensulfonylfluorid
AIC	5-(4)-Aminoimidazol-4(5)-carboxamid
ATF3	Activating transcription factor 3
ATF4	Activating transcription factor 4
ATF6	Activating Transcription factor 6
ATF6a	Activating Transcription Factor 6 fragment a
ATG6	Autophagy-related 6
ATRX	ATP-Dependent Helicase
BAK	BCL2 Antagonist/killer 1
BAX	BCL2 Associated X
BCL2	B-cell lymphoma 2
BIM	BCL2-like 11
bZIP	Basic leucin-Zipper Domäne
C2C12	Immortalisierte Myoblasten-Maus-Zelllinie
CBTRUS	Central Brain Tumor Registry of the United States
CCNU	Lomustin
CD44	Cell Surface Glycoprotein CD44
CDKN2A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
CDKN2B	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2B
CHOP	C/EBP-Homologous Protein
COPII	Coat protein II complex
CT	Computertomographie
CXCL3	Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 3
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EIF2a	Eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 2A
eIF2B	Eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 2B
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	Endoplasmatische Retikulum-Stress assoziierte Degradation
G2/M	G2/Mitosephase Kontrollpunkt
GADD34	Growth arrest and DNA damage-inducible protein 34
GBM	Glioblastom
GRP78	Glucose Regulated protein 78
HIF1a	Hypoxie-induzierbarer Faktor 1-alpha
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IDH1	Isocitrate Dehydrogenase 1
IDH2	Isocitrate Dehydrogenase 2
IL-17A	Interleukin 17A
IL-17L	Interleukin 17L
IL-23	Interleukin 23
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
IRE1	Inositol-requiring enzyme 1
KL	klassisch
LYS7	L-aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase-phosphopantetheinyl transferase

MCP1	Monocyte Chemotactic Protein 1
MEC1	Serine/threonine-protein kinase
MES	Mesenchymal
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MHCI	Major Histocompatibility Complex, Class I
MHCII	Major Histocompatibility Complex, Class II
MIP1a	Macrophage Inflammatory Protein 1-Alpha
MIP1B	Macrophage Inflammatory Protein 1-Beta
miRNA	Micro-Ribonukleinsäure
MKC	ManKindCorp
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomografie
MTIC	5-(3-N-methyltriazin-1-yl)-imidazol-4-carboxamid
N3-MeA	N3 adenine methylation
N7-MeG	N7 guanine methylation
NF1	Neurofibromin 1
NF-KB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NL	Neural
O6-MeG	O6 guanine methylation
PBA	4-Phenylbuttersäure
PDGFRA	Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha
PDIA5	Protein disulfide isomerase family A member 5
PERK	Protein kinase RNA-like ER kinase
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
PIK3R1	Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 1
PN	Proneural
PP1	Protein phosphatase 1
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
RB1	Retinoblastoma 1
RIDD	Regulated IRE-1 dependent decay
RTCB	RNA-Splicing Ligase Komplex
RYR	Ryanodine receptor
S1P	Site 1 Protease
S2P	Site 2 Prtease
SERCA	Calciumpumpe des sarcoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums
SOD1	Superoxid dismutase 1
SRBPs	Sterol regulatory element binding proteins
TAMs	Tumor-assoziierten Makrophagen und Mikrogliazellen
TERT	Telomerase
TMZ	Temozolomid
TNFa	Tumornekrosefaktor-a
TP53	Tumor suppressor p53
TPA	Tissue polypeptide antigen
TRPV1	Transient receptor potential vanilloid subfamily member 1
UPR	Unfolded Protein Response
VEGFA	Vascular Endothelial Growth Factor A
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
WHO	World Health Organisation

XBP1 X-box-Binding protein 1

3. Einleitung

3.1 Glioblastom

Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist der häufigste, primär maligne und gleichzeitig aggressivste Hirntumor und repräsentiert mehr als die Hälfte aller Gliome¹. Gliome sind Tumore des Zentralen Nervensystems, die Ähnlichkeiten zu glialen Zellen wie Astrozyten und Oligodendrozyten des ZNS aufweisen. Gemäß der World Health Organisation (WHO) Klassifikation 2016 werden Gliome abhängig davon mit welchen glialen Zellen sie am meisten übereinstimmen in Astrozytome, Oligodendrogliome und Oligoastrozytome eingeteilt¹. Die WHO kategorisiert weiter nach neuropathologisch-anatomischen, histologischen und genetischen Tumormerkmalen und insbesondere unter Einbezug molekulargenetischer und immunhistochemischer Veränderungen in die Einstufungsgrade I bis IV. Der WHO Grad I entspricht einem langsam wachsenden, gutartigen Tumor, beim WHO Grad IV handelt es sich dagegen um einen schnell wachsenden, besonders bösartigen Tumor². Bei Grad IV Gliomen handelt es sich um das Glioblastoma multiforme. Die Inzidenz in europäischen Regionen liegt bei 3 pro 100 000 Menschen jährlich. Glioblastome treten bevorzugt im höheren Lebensalter zwischen dem 65. und 70. Lebensjahr auf³. Nach Diagnosestellung beträgt das mittlere Überleben ca. 12 bis 15 Monate. Trotz eines aggressiven Therapieregimes erleiden ein Großteil der Patienten ein Rezidiv auf Grund der hohen molekularen Heterogenität von Glioblastomen. Außerdem stellt weiterhin die Penetration der Blut-Hirn-Schranke eine große Barriere für therapeutische Ansätze dar.

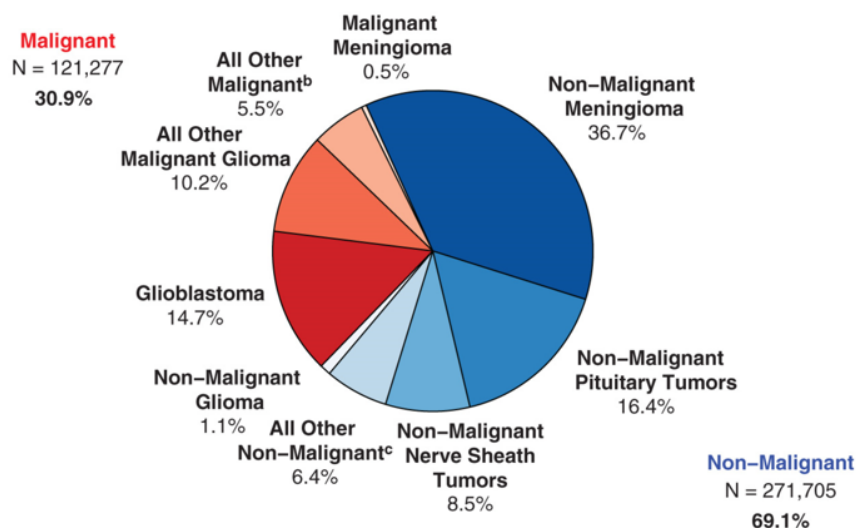


Abbildung 1 Hier graphisch dargestellt ist die prozentuale Verteilung von Hirntumoren. Entommen aus: CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011–2015 Quinn T Ostrom, Ph.D, M.P.H Haley Gittleman, M.S Gabrielle Truitt, B.S Alexander Boscia, B.S Carol Kruchko, B.A Jill S Barnholtz-Sloan, Ph.D Author Notes

3.1.1 Symptome

Die häufigsten Symptome verursacht durch das Glioblastom sind Hirndruckzeichen (z.B. Kopfschmerz, Schwindel, Erbrechen), neurologische Ausfälle (Sehstörungen, Sprachstörungen, Paresen), epileptische Anfälle und psychische Veränderungen (z.B. leichte Reizbarkeit, Desorientierung)⁴.

3.1.2 Diagnostik

Die initiale Diagnostik des GBM erfolgt mit bildgebenden Verfahren (cCT, cMRT). Hierbei stellt es sich in der Regel als kontrastmittelaufnehmender, raumfordernder Prozess von inhomogener Struktur, als Folge regressiver Veränderungen, dar. Oft zeigt sich begleitend ein ausgedehntes perifokales Ödem. Im Rahmen einer Biopsie erfolgt die Artdiagnose. Wesentlich ist neben der Artdiagnose die Zuordnung der biologischen Wertigkeit des Tumorgewebes. Dabei werden Zell- und Kernpolymorphie, erhöhte Zelldichte, erhöhte Mitoserate, das Auftreten pathologischer Mitosen, mikrovaskulärer Proliferate, sowie flächenhafter und strichförmiger Tumorgewebsnekrosen, in Abhängigkeit von der Artdiagnose als Zeichen der Anaplasie gewertet⁵. Die aktuelle Diagnostik von Glioblastomen schließt außerdem genetische Kriterien mit ein. Neue „Next Generation Sequencing Methoden“ konnten kürzlich zur Identifikation spezifischer molekularer Merkmale von Glioblastomen führen, die ein besseres Verständnis der Pathogenese hervorbrachten⁶. Einige molekulare Marker werden in der Diagnostik bereits eingesetzt und andere befinden sich in der Evaluation. Darunter O6-methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT), Isocitrate-Dehydrogenase (IDH), Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Tumor Suppressor Protein (TP53), Phosphatase und Tensin Homolog (PTEN), p16INK4a Gene und Phospholipid Metabolite. Auch Imaging Biomarker haben sich kürzlich in der GBM Diagnostik durchgesetzt. Die genetische Charakterisierung vereinfacht die Entwicklung einer personalisierten Krebstherapie⁷.

3.1.3 Therapie

Die Therapie beinhaltet die maximale chirurgische Entfernung mit anschließender Chemo- und Strahlentherapie. Neben supportiver medikamentöser Therapie wird typischerweise Temozolomid (TMZ) als Standard-Chemotherapeutikum eingesetzt. Zur Behandlung des tumorassoziierten Hirnödems wird mit Steroiden behandelt. Mittels Operation wird möglichst eine Komplettresektion angestrebt. Zur Verlängerung der Rezidiv-freien und absoluten Überlebenszeit schließt sich an die Operation praktisch immer eine Bestrahlung und häufig auch eine Chemotherapie an. Insbesondere Patienten mit Nachweis epigenetischer Veränderungen (Hypermethylierung) des Promotors des DNA-Reparaturenzyms O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) können von einer Chemotherapie mit Temozolomid profitieren⁸. Die Strahlentherapie erfolgt mit einer Gesamtdosis von 60 Gy, 1,8-2 Gy x 30 auf das Tumolvolumen, mit einem Sicherheitssaum von 2-3 cm, in Kombination mit niedrigdosierter Chemotherapie mit Temozolomid plus CCNU (oder Temozolomid alleine)⁹. Temozolomid (Handelsnamen Temodal, Temodar) wird adjuvant eingesetzt¹⁰ und ist ein oral und intravenös verabreichtes, alkylierendes Zytostatikum^{11,12}. Es wirkt als Prodrug, die erst im Körper durch Metabolisierung aktiviert wird. TMZ wird rasch resorbiert, die maximale Wirkstoffkonzentration wird bereits nach etwa 20 Minuten erreicht. Die Plasmahalbwertszeit liegt bei 1,8 Stunden. Weiterhin kann TMZ die Blut-Hirn-Schranke überwinden. Einst in den Körper gelangt wird TMZ spontan hydrolytisch gespalten, sodass MTIC (5-(3-N-methyltriazin-1-yl)-imidazol-4-carboxamid) entsteht. MTIC ist ebenfalls sehr instabil und reagiert mit Wasser und zerfällt rasch in die Produkte AIC(5(4)-aminoimidazol-4(5)-carboxamid) und das hoch reaktive Methylhydrazin. Methylhydrazin methyliert dann Basen der DNA an Position N7 in Guanin-Guanin reichen Regionen (N7-MeG; 70%), und methyliert N3 Adenine (N3-MeA; 9%) sowie O6 Guanin Residuen (O6-MeG; 6%). Liegt die methylierte Base in einer Promotorregion eines Gens, führt die Methylierung zu einer Inaktivierung des Gens, welches konsekutiv nicht mehr exprimiert wird. Auf diesem Weg wird in den meisten Fällen der Zelltod der Tumorzellen herbeigeführt. TMZ ergibt in der Behandlung von Hirntumoren einen signifikanten therapeutischen Benefit für Glioblastompatienten¹³. Präzise gesagt, verlängert TMZ die mediane Überlebenszeit von 12,1 Monate auf 14,6 Monate und erhöht die 2 Jahres-Überlebensrate von 10% auf 26%⁸. Vor allem Patienten mit Glioblastomen, die eine Methylierung des O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) Gens aufweisen, profitierten von der zusätzlichen Chemotherapie mit Temozolomid¹⁴. Jedoch besitzen manche Tumorzellen einen Reparaturmechanismus gegen die Methylierung durch TMZ, wodurch sie resistent gegenüber diesem Wirkstoff werden^{15,16}. Ohne Behandlung liegt die mittlere Überlebenszeit bei wenigen Monaten und rund 15 Monaten bei aktuell gängigen Therapiemethoden¹⁷.

3.1.4 Glioblastoma multiforme - Genetik

Neuere Technologien mit möglicher Sequenzierung des kompletten Genoms, erbrachten in Tumoren und anderen Erkrankungen, einen bisher nie da gewesenen Einblick in die häufigsten genetischen Veränderungen und das genaue genetische Profil einer Zelle. Die neueste genetische Analyse von GBMs im „Genome Atlas Research Network (TCGA)“ fasst die häufigsten genetischen Veränderungen von GBMs zusammen. Hierzu zählen Amplifikationen im Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) und Platelet-derived Growth Factor Receptor alpha (PDGFRA), Mutationen im Tumor Protein 53 (TP53), der Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase A (PIK3CA), im Phosphatase und Tensin Homolog (PTEN), der Isocitrate-Dehydrogenase 1 (IDH1), im Retinoblastomgen (RB1) und dem Telomerase Reverse Transcriptase (TERT)-Promoter sowie Deletionen von PTEN, Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A / B (CDKN2A/B) und MGMT, und Alterationen in Genen des Chromatin-Remodellings. Auf Grundlage dieses genetischen Profils werden aktuell 4 Subtypen von GBMs unterschieden: Der proneurale (PN), der neurale (NL), der mesenchymale (MES) und der klassische (KL) Subtyp^{18 19}.

Der klassische Subtyp ist charakterisiert durch den Verlust des Chromosoms 10 und die Amplifikation des Chromosom 7 zusammen mit einer Amplifikation oder Mutation des EGFR Gens, variabel co-existent mit reduzierten Mengen an pro-apoptotischen Genen, Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK), und Neurogenic locus notch homolog protein 1 (Notch1) und Notch3 Proteinen²⁰.

Der proneurale Subtyp ist assoziiert mit Mutationen in PDGFRA, Cyclin-dependent-Kinase 6 (CDK6), Cyclin-dependent-Kinase 4MET (CDK4MET) und IDH1, mit einer Aktivierung der PI3K und Inhibierung des 4E-Binding-Protein 1 (4EBP1)²⁰.

Mesenchymale GBMs weisen regelmäßig Deletionen und Mutationen im Neurofibromatose Typ1-Gen (NF1) auf Chromosom 17q11.2 und Punktmutationen in PTEN auf, außerdem zeigen sich regelmäßig Aktivierungen des MAPK-Signalweges und eine Downregulation des „mammalian Target of Rapamycin“ (mTOR). Der neurale Subtyp ist deutlich schlechter charakterisiert. Dieser weist eine Expression des Neurofilament-light-Polypeptid, Synaptotagmin I sowie eine Überexpression des EGFR auf²¹.

Diese vier Subtypen unterscheiden sich nicht nur genotypisch, sondern auch phänotypisch und sind durch unterschiedliche klinische und radiologische Eigenschaften, sowie ihr unterschiedliches Therapieansprechen, gekennzeichnet^{22,23}. Die Subtypen unterscheiden sich klinisch insbesondere bezüglich der mittleren Überlebenszeit. Der proneurale Typ zeigt die längste Überlebensdauer, in absteigender Reihenfolge gefolgt von dem neuralen Subtyp, dem mesenchymalen Subtyp und, mit schlechtester mittlerer Überlebenszeit, dem klassischen Subtyp²⁰.

Unter Berücksichtigung der Entstehung werden Glioblastome außerdem in primäre und sekundäre Glioblastome kategorisiert. Primäre Glioblastome entstehen de novo als Grad IV Tumore. Sekundäre Glioblastome entstehen sekundär, aus den weniger malignen Vorstufen mit WHO Grad II und III. Die beiden Formen unterscheiden sich in der Aktivierung unterschiedlicher, onkogener Signalwege. Gemeinsam haben sie jedoch einen gleichen zellulären Phänotyp. Der Großteil der Patienten präsentiert sich mit de novo Grad IV GBMs, wohingegen nur ein Bruchteil von 5-10% sich, mit aus Vorstufen entstandenen, GBMs präsentiert. Klinisch unterscheiden sich diese zwei Formen vor allem durch ihr Auftreten und in der Progression. Sekundäre Glioblastome werden typischerweise im jüngeren Alter diagnostiziert (zwischen 45. und 62. Lebensjahr) und weisen einen längeren klinischen Verlauf, mit besserer Prognose bezüglich der Lebenserwartung auf (7,8 versus 4,7 Monate)²⁴. Primäre und sekundäre GBMs unterscheiden sich in ihrem genetischen Profil. Primäre GBMs weisen regelmäßig Amplifikationen und Mutationen des EGFR-Gens (36-60% in primären im Gegensatz zu 4% in sekundären GBMs), Mutationen von PTEN (25% in primären und 4% in sekundären GBMs) und CDKN2A-p16ink4a-Deletionen (31-78% in primären und 8% in sekundären GBMs) auf. Außerdem zeigen sich regelmäßig Mutationen von NF1, RB1, CDKN2B oder Mutationen im TERT-Promotor^{22,23}. Typisch für die sekundären Glioblastome sind Mutationen in IDH1 oder IDH2. Diese Mutationen haben einen wichtigen prognostischen Aussagewert, da sie typisch für low-grade Gliome sind und eine gute Prognose vorhersagen. Daher sind sie in der histopathologischen Diagnostik von immenser Bedeutung²⁰. In sekundären GBMs sind außerdem genetische Aberrationen in TP53 typisch (28% in primären und 65% in sekundären GBMs)²⁴. Primäre GBMs können in Form aller 4, weiter oben genannten, Subtypen auftreten und weisen nur sehr selten (5%) eine IDH1-Mutation auf²⁵. Die Entwicklung von sekundären Glioblastomen aus low-grade Gliomen, läuft über einen Evolutionsprozess

ab. Dieser Prozess beinhaltet den Verlust von RB1 oder CDKN2A und die Amplifikation von PDGFRA. Diese genetischen Alterationen akkumulieren auf die bereits vorhandenen Veränderungen der low-grade Gliome.

Im Folgenden dargestellt ist eine Landkarte über genetische Alterationen in Signaltransduktionswegen und Tumorsuppressor-Signalwegen in 251 GBMs. Es handelt sich hierbei um zusammengefasste Daten aus Whole Genome Exon Analysen und RNA Sequenzierungen. Die Daten zeigen eine signifikant veränderte Expression von Genen, in Folge von Amplifikationen und Deletionen mit konsekutiver Überexpression (rot) oder Down-Regulation (blau). Bei den involvierten Signalwegen handelt es sich um den p53-Signalweg (MDM2, MDM4 and TP53), den Rb-Signalweg (CDK4, CDK6, CCND2, CDKN2A/B and RB1), und verschiedene Komponenten die den PI3K Signalweg beeinflussen (PIK3CA, PIK3R1, PTEN, EGFR, PDGFRA, NF1)²⁶.

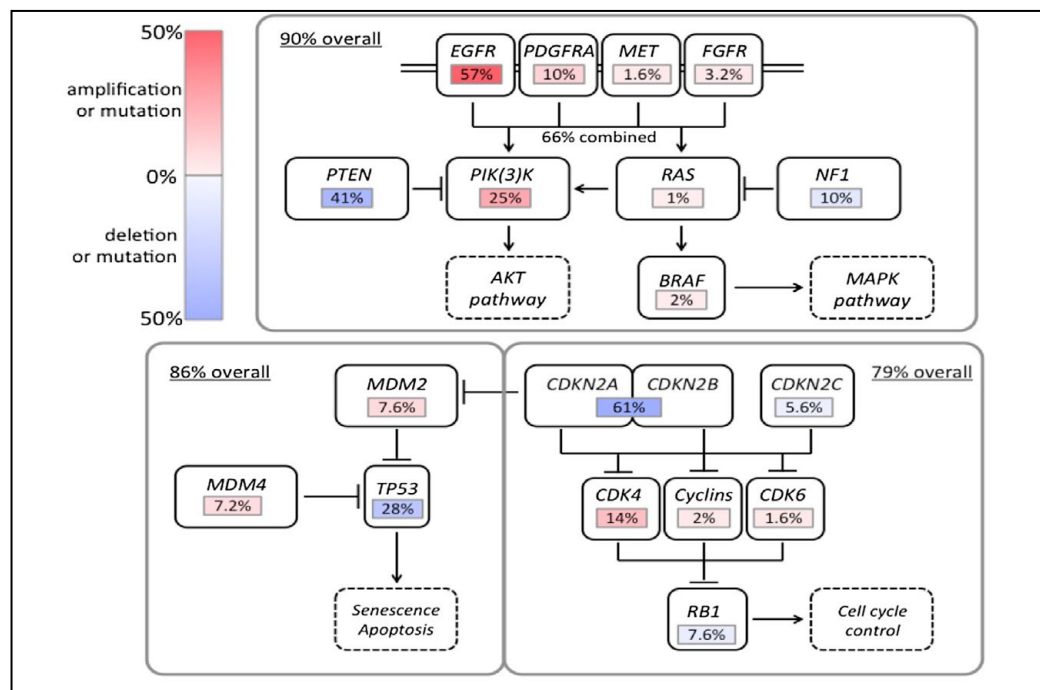


Abbildung 2 Hier zusammengefasst ist das Auftreten von Genveränderungen der häufigsten Signalwege im Glioblastom. Entnommen aus Cell 155, 462–477, October 10, 2013 ©2013 Elsevier Inc. RTK war in 67,3 % der Glioblastome verändert. EGFR war in 57,4 % verändert. Die PDGFRA war in 13% verändert, MET in 1,6 % verändert und FGFR2/3 in 3,2 % verändert. Die Hälfte der Tumoren wies eine lokale Amplifikation oder Mutation von PDGFRA coexistent mit EGFR-Alterationen (42,4 %) auf. PI3K Mutationen waren in 25,1 % der Glioblastome zu finden. Unter Betrachtung der RTK Gene, PI3K Gene und PTEN wiesen 89,6 % der Glioblastome zumindest eine Veränderung im PI3K Signalweg auf sowie 39 % zwei oder mehr. Das NF Gen war in 10 % der Fälle mutiert und trat fast nie gleichzeitig mit einer BRAF-Mutation auf (1%). P53 Signalwege waren in 85,3 % der Tumore betroffen. Hierbei handelte es sich am häufigsten um Mutationen und Deletionen von P53 mit 27,9 %, um Amplifikationen des MDM 1/2/4 in 15,1 % und oder um Deletionen von CDKN2A in 57,8 %. P53 Mutationen traten stets mit Amplifikationen der MDM Familiengene und CDKN2A auf. Mindestens 78,9 % der Tumoren zeigten eine Veränderung, welche die RB Funktion durch direkte Mutation des RB Genes in 7,6 %, durch Amplifikation von CDK4/6 oder Alteration in CDK2 (15,5 %) beeinträchtigte.

3.1.5 Die Rolle des TRPV1-Rezeptors in Glioblastomen

In juvenilen Mäusen konnte ein endogener Abwehrmechanismus gegen high-grade Astrozytome aufgezeigt werden. Im Gehirn befinden sich Stammzellnischen. Die subventrikuläre Zone ist hierbei die größte Stammzellnische und befindet sich in den lateralen Wänden beider Seitenventrikel. Die Nische dient als

Quelle neuraler Stammzellen. Neurale Vorläuferzellen haben ihre Funktion im Rahmen der adulten Neurogenese und in limitierter Form im Rahmen von Reparaturvorgängen nach Schädigungen. Kürzlich konnten anti-tumorigene Effekte der neuralen Vorläuferzellen aufgezeigt werden. Ein Tropismus von endogenen neuralen Vorläuferzellen aus der subventrikulären Zone, in Richtung Tumor, konnte in Mausmodellen visualisiert werden. Der Zellstrom in Richtung Tumor und die Akkumulation der neuralen Zellen um den Tumor herum, gingen mit einer Suppression des Tumorwachstums einher. Es konnte allerdings auch gezeigt werden, dass diese Form der Zellmigration, in Richtung Tumor, mit dem Alter der Mäuse abnimmt²⁷.

Bei näherer Betrachtung ergaben sich im Verlauf weitere Beobachtungen. Die neuralen Vorläuferzellen migrierten zu den Tumoren und induzierten dort über die Aktivierung von TRPV1-Rezeptoren den Zelltod in high-grade Astrozytomzellen. Die Stimulation der TRPV1-Rezeptoren erfolgte via Ausschüttung sogenannter Endovanilloide, die einen Vanilloid-Rezeptor (Transient Receptor Potential Vanilloid subfamily member-1 (kurz: TRPV1-Rezeptor)) aktivieren. TRPV1-Rezeptoren sind in Gliomzellen stark exprimiert wohingegen der Rezeptor auf tumorfreiem Hirngewebe kaum exprimiert ist. Die Aktivierung des TRPV1-Rezeptors führt über Endoplasmatischen Retikulum-Stress zum programmierten Zelltod der Tumorzelle. Der relevante Signalweg hierbei wird durch den „Activating Transcription Factor-3 (ATF3)“ kontrolliert.²⁸

3.2 Das Endoplasmatische Retikulum

Das Endoplasmatische Retikulum (ER) ist ein Organell der Zelle, welches als dynamisches, tubuläres Netzwerk organisiert ist. Es ist spezialisiert auf die Proteinfaltung und Reifung und ist in metabolische Prozesse, wie die Glukoneogenese und Lipidsynthese involviert²⁹. Sowohl Membranproteine als auch Proteine, die zu Lysosomen und in den extrazellulären Raum transportiert werden, werden im ER synthetisiert, aufbewahrt und sortiert. Im Rahmen der Proteinreifung finden im ER co- und posttranslationale Modifikationen der Proteine statt. Abgesehen davon ist das ER das größte intrazelluläre Calcium-Reservoir in der Zelle und hält innerhalb des ERs eine Calcium-Homeostase aufrecht, welche insbesondere für Calcium-abhängige Signalwege von immenser Bedeutung sind. Das ER trägt außerdem bei der Biogenese ganzer Organellen, wie den Peroxisomen und Vesikeln wie den Autophagosomen bei²⁹. Neu synthetisierte lysosomale, sekretorische und membrangebundene Proteine werden in das Lumen des ER transloziert und dort in einem oxidativen Environment, von dort residierenden Proteinen, gefaltet. Der Prozess der Proteinfaltung wird in spezialisierten, sekretorischen Zellen vollzogen. Sekretorische Zellen sind demgemäß durch die hohe Anforderung der Protein Synthese kontinuierlichem Stress ausgesetzt. Die Effizienz und Genauigkeit der Proteinfaltung werden kontinuierlich durch dynamische, integrative Prozesse aus der Umgebung und durch zelluläre Signale angepasst. So können diverse Feedback-Mechanismen eine effiziente Anpassung an Fluktuationen, bezüglich des Bedarfs an Proteinmodifikationen, gewährleisten³⁰.

3.3 Endoplasmatischer-Retikulum-Stress

Die Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen im Endoplasmatischen Retikulum, mit konsekutiver Induktion von zellulärem Stress, spielt eine zentrale Rolle in vielen Geweben und diversen Krankheiten. Zu diesen Krankheiten zählen Krebserkrankungen, als auch Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus sowie neurodegenerative Erkrankungen. Die Effizienz und Genauigkeit der Proteinfaltung werden konstant in der Zelle angepasst. Multiple Signale aus der Umgebung und der Zelle werden kontinuierlich dynamisch integriert³¹. So gibt es Feedback Mechanismen, die bei Fluktuationen der Proteinfaltung der Zelle ermöglichen darauf zu reagieren. Fluktuationen der Proteinfaltung sowie jegliche Störungen der Funktionen des ER führen zu ER-Stress. Jede Zelle verfügt über einen Anpassungsmechanismus gegenüber ER-Stress. Dieser Kompensationsmechanismus wird als „Unfolded Protein Response“ (UPR) bezeichnet. Hierbei aktiviert die Zelle als Reaktion auf ER-Stress eine Serie an komplementären Adaptationsmechanismen, um entsprechende Veränderungen, insbesondere die Veränderungen der Proteinfaltungsmaschinerie, zu bewältigen. Die UPR sendet Informationen über den aktuellen Status der Proteinfaltung im ER an den Zellkern und das Zytoplasma. Dies dient der Zelle dazu eine Überladung mit ungefalteten Proteinen zu puffern und die Proteostase der Zelle aufrechtzuerhalten. Abhängig von der Dauer und der Intensität von ER-Stress kommt es bei länger andauerndem Stress zu Irreversibilität. Irreversibler ER-Stress endet in der Elimination der geschädigten Zellen durch die Einleitung des programmierten Zelltods (Apoptose)^{29,30}.

Die UPR als Anpassungsmechanismus der Zelle läuft über die Aktivierung von drei Transmembranproteinen, die als Sensoren agieren, ab: Das Inositol-Requiring-Enzyme 1 (IRE1), den Activating Transcription Factor 6 (ATF6), und die Protein Kinase R-like ER Kinase (PERK) (Fig.1)³². Unter normalen Zellbedingungen verharren alle drei Sensoren (IRE1, ATF6, and PERK) in ihrem inaktiven Status durch die Assoziation mit dem ER-resident Glucose-Regulated Protein 78 (GRP78). Nur im Falle von ER-Stress kommt es zu einer Dissoziation von GRP78 und die UPR-Signalkaskaden laufen ab³³. Die UPR führt zu einer Erhöhung der Proteinfaltungskapazität im ER und, über die Reduktion der globalen Translation, zur Reduktion der Proteinüberladung der Zelle. Das Ziel hierbei ist die Wiederherstellung einer Homeostase der Proteinfaltung im ER und schließlich das Überleben der Zelle.

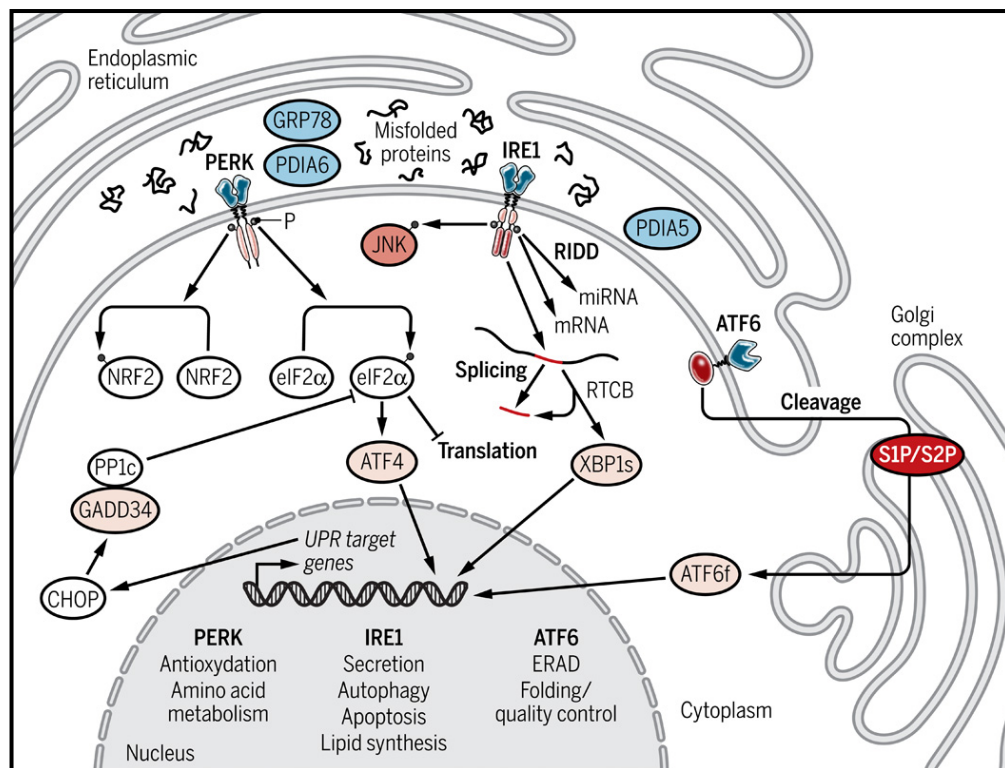


Abbildung 3 Die drei Arme der UPR. Im Ablauf von ER-Stress werden drei Transmembranproteine (IRE-1, PERK und ATF6), die unter normalen Zellbedingungen inaktiv assoziiert an das GRP78 vorliegen, durch Dissoziation von GRP78 aktiviert. Konsekutiv formt IRE-1 mit seiner zytoplasmatischen Domäne Multimere mit Serin/Threonin-Kinasen und Endoribonucleasen. Die RNase Domäne von IRE1 spaltet ein 26-Nukleotid-Intron der mRNA, die für XBP1 codiert. Hierdurch wird via RTCB ein gesplichtet (englisch von Splicing) Transkript generiert, welches in den aktiven Transkriptionsfaktor XBP1s translatiert wird. Außerdem unterstützt IRE-1 die Degradation von verschiedenen mRNAs und miRNA in einem Prozess der als RIDD bezeichnet wird. ER-Stress triggert außerdem die Translokation von ATF6 von der ER-Membran zum Golgi-Apparat. Hier wird ATF6 in seine aktive Form ATF6f durch SP1 und SP2 gespalten. ATF6f wird zum Nucleus transportiert und unterstützt die Expression seiner in die UPR involvierten Downstream Gene. Nach der Dissoziation wird auch der dritte ER-Stress-Sensor PERK aktiviert, durch Dimerisierung mit Autophosphorylierung und Phosphorylierung des eIF2 α . Dies führt schließlich zur reduzierten globalen Translation von Proteinen jedoch zur erhöhten Translation von ATF4 und der ATF4 abhängigen Transkription von diversen ER-Stress-Regulatoren. Die Aktivierung aller drei ER-Stress Arme erhöht die zelluläre, antioxidative Kapazität, inhibiert die globale Proteinsynthese und erhöht die Expression von Chaperonen und ER-Qualitäts-Kontroll-Proteinen durch verstärkte Proteinfaltungskapazitäten und vermehrter ERAD. Falls der ER-Stress nicht gelöst werden kann verendet die Zelle in Apoptose. Entnommen aus: Endoplasmic reticulum proteostasis in glioblastoma - From molecular mechanisms to therapeutic perspectives; Sci. Signal. 14 Mar 2017.

3.3.1 Erster Arm der ER-Stress-Kaskade- via IRE1

IRE1 ist ein funktionelles Multimer mit Serin- und Thyrosin-Kinase-Aktivität, sowie einer Endoribonuklease-Aktivität an der zytoplasmatischen Domäne. IRE1 dimerisiert unter ER-Stress und autophosphoryliert sich dadurch als eigenes Substrat³⁴. Aktives IRE1 verarbeitet die mRNA des Transkriptionsfaktors „X-Box-binding Protein 1 (XBP1). Die Endoribonuklease-Domäne von IRE1 spaltet ein 26-Nukleotid-Intron der mRNA, die für das X-Box binding Protein 1 (XBP1) codiert. In Koordination mit dem RNA-Splicing Ligase-Komplex (RTCB) entsteht ein gesplictes (aus dem englischen Splicing hergeleitet) Transkript, welches im Rahmen der Translation in den aktiven Transkriptionsfaktor XBP1s umgesetzt wird³⁵. XBP1s transloziert in den Zellkern und induziert dort die Hochregulation seiner Zielgene. Bei den Zielgenen handelt es sich um Produkte, die in die „ER-Stress assoziierte Degradation (kurz: ERAD)“ involviert sind. XBP1s hat zudem Einfluss auf die Steuerung der Zufuhr an Proteinen ins ER und auf die Proteinfaltung. Außerdem reguliert und moduliert es die Phospholipidsynthese, welche zur Expansion der ER-Membran bei ER-Stress benötigt wird^{29,30}. Ferner ist IRE1 in einen Prozess involviert, bezeichnet als „regulated IRE1-dependent decay (RIDD). In diesem Prozess beteiligt sich IRE1 an der Degradation verschiedener mRNAs und microRNAs (miRNAs)³⁶.

3.3.2 Zweiter Arm der ER-Stress-Kaskade – via PERK

Eine unmittelbare Reaktion nach Dissoziation von GRP78, ist die Aktivierung der Protein Kinase R-like ER Kinase (PERK). PERK autophosphoryliert sich selbst durch Dimerisierung sowie den eukaryontischen Translations-Initiations-Faktor 2 alfa (eIF2a). Dies resultiert in einer Reduktion der gesamten Proteintranslation der Zelle, wohingegen es die Translation von ATF4 und die Transkription von verschiedenen ER-Stress Regulatoren jedoch initiiert³⁷. ATF4 mRNA kodiert einen Transkriptionsfaktor der die Transkription von Genen kontrolliert, die in den Prozessen der Autophagie, Apoptose, im Aminosäuremetabolismus und in Antioxidationsprozessen involviert sind³⁰.

3.3.3 Dritter Arm der ER-Stress-Kaskade – via ATF 6

Eine weitere Signalweg-Kaskade im ER-Stress wird initiiert durch die Translokation von ATF6 - von der Membran des endoplasmatischen Retikulums zum Golgi-Apparat. Dort wird ATF6 dann durch Site 1 und Site 2 Proteasen (SP1 und SP2) in seine aktive Form ATF6f gespalten³⁴. ATF 6 besitzt einen „basic Leu Zipper (bZIP) Transkriptionsfaktor an seiner Zytoplastdomäne. In nicht gestressten Zellen ist ATF6 am ER lokalisiert. Unter ER-Stress wird ATF6 durch Interaktion mit dem „Coat Protein II (COP II) Complex“ zum Golgi-Apparat transportiert. Dort wird ATF6 durch die „Site 1 Protease (S1P)“ und „Site 2 Protease (S2P)“ bearbeitet. Hierdurch wird das „cytosolic domain fragment (ATF6f)“ weiter zum Nucleus transportiert und unterstützt dort die Expression seiner, in die UPR involvierten, Zielgene. ATF6f kontrolliert dabei auch die Hochregulation von Genen die ERAD-Komponenten und XBP1 kodieren³⁸.

3.3.4 Die Endeffekte der UPR

Die Endeffekte der drei Arme des ER-Stress mediiert über XBP1, ATF 4 und ATF6f steuern die Expression einer großen Menge an teilweise überlappenden Zielgenen, deren Expressionsprodukte die Anpassung an ER-Stress und die Induktion von Apoptose, unter langanhaltenden ER-Stress-Zuständen, modulieren. Zusammengefasst führt die Aktivierung der UPR, über die beschriebenen drei Arme, zunächst zur Erhöhung der antioxidativen Kapazitäten der Zelle, zur Behinderung der globalen Proteinsynthese und zur verstärkten Expression von Chaperonen und ER-Qualitätskontroll-Proteinen, um die Proteinfaltung und die ER assoziierte Proteindegradation (ERAD) zu verstärken³⁰. Es kommt zur Reduktion der globalen Translation von Proteinen, jedoch zu erhöhten Translation von ATF4 und der ATF4-abhängigen Transkription von diversen ER-Stress-Regulatoren. Kann die Proteostase jedoch nicht wiederhergestellt werden, so leitet die Zelle, bei irreversiblen ER-Stress, die Apoptose zur Elimination der geschädigten Zelle ein³⁹.

Die genauen Mechanismen die Apoptose initiieren, sind nur partiell verstanden und beinhalten eine Serie von komplementären Signalwegen. Zelltod durch ER-Stress läuft in den Endzügen über den mitochondrialen Apoptose-Signalweg ab. Dieser wird über die „B- Cell Lymphoma 2 (BCL2) protein family“ reguliert. Die Aktivierung der pro-apoptotischen Faktoren BAX und BAK, führt über die

Aktivierung von „BCL2-Homology 3 (BH3)-only proteins“, wie den „BCL2-interacting mediator of cell death BIM“, zur Aktivierung von Caspasen und darüber zur Induktion von Apoptose. Einer der proapoptotischen Hauptfaktoren, bezeichnet als C/EBP-homologous protein (CHOP), fördert die Transkription von BIM (BCL-2 Proteinfamilie mit proapoptotischer Wirkung) und die Down-Regulation der BCL-2 Expression, mit konsekutiver Induktion von Apoptose. CHOP ist reguliert durch den PERK-ATF4-Arm der UPR. CHOP, ATF4 und p53 sind nach aktuellen Kenntnissen direkt in die Hochregulation von „BH3-only proteins“ unter ER-Stress involviert. Welcher Mechanismus p53 und ER-Stress verbindet ist jedoch noch weitgehend unklar²⁹.

3.4 ER-Stress in Tumorzellen

In den letzten Jahrzehnten hat sich die Gesamtheit der ER-Stress-Kaskaden, als wichtiges Target in der Modulation der Genexpression einer Zelle herauskristallisiert. Bis zu einem gewissen Ausmaß, schützt ER-Stress die Zelle vor einer malignen Transformation, jedoch liefert er zugleich Krebszellen einen selektiven Vorteil.

Die Transformation und die Aufrechterhaltung einer malignen Zelle, erfordert die Aktivierung und ständige Unterstützung pro-onkologischer Signalwege sowie hohe Proliferationsraten. Hierdurch ist die Krebszelle hohen Anforderungen, insbesondere in Bezug auf die Proteinsynthese und Proteinfaltung, im Vergleich zu nicht malignen Zellen, ausgesetzt^{40,41}. Eine Krebszelle übergeht den Zellzyklus sowie Zellzyklus-Kontrollpunkte und gewinnt konsekutiv einen Proliferationsvorteil gegenüber anderen Zellen. Bei konsekutiv erhöhtem Energiebedarf, wird die Krebszelle schnell mit dem Mangel an Nährstoffen und Sauerstoff konfrontiert. Dieser Zustand beeinflusst die Proteinfaltung im ER und aktiviert die zunächst zytoprotektive UPR. Eine Krebszelle ist sowohl intrinsischem Stress (genomische Instabilität, erhöhter Metabolismus, pro-onkologische Genexpression) als auch extrinsischem Stress (Oxidativer Stress, Nahrungsmangel) ausgesetzt. Allem gemein ist ein erhöhtes Risiko für die Anhäufung fehlgefalteter Proteine und Störung der Proteostase in der Zelle^{37,42,43}.

Konstitutiver Zellstress führt zur konstitutiven Aktivierung der UPR. Diese Aktivierung der UPR konnte in vielen humanen Tumoren, hierunter in Brustkrebs, Glioblastomen, Lymphomen, Myelomen und verschiedenen Adenokarzinomen mehrfach aufgezeigt werden⁴⁴⁻⁵⁰. Ein häufiger Befund in Tumorgeweben ist die Überexpression des ER-Stress-Schlüssel-Regulators GRP78. Ferner wurde gezeigt, dass dessen Expression mit einer Reduktion der Überlebenszeit der Patienten assoziiert ist⁵¹⁻⁵³. Obwohl ER-Stress zur Aufrechterhaltung der Proteostase, ein Kompensationsmechanismus der gesunden Zelle ist, zeigt sich vermehrt, dass das Konzept der Aufrechterhaltung der Proteostase, das Tumorwachstum sowie die Transformation in eine maligne Zelle gleichermaßen unterstützt⁵⁴. Zum jetzigen Zeitpunkt der Forschung ist es weitreichend anerkannt, dass Krebszellen, das Überleben fördernde Signale der UPR, ausnutzen, um intrinsischen und extrinsischen Stress zu kompensieren und gleichzeitig der Apoptose zu entgehen sowie konsekutiv einen Proliferationsvorteil gegenüber anderen Zellen zu erhalten. Auch für weitere Eigenschaften und Fähigkeiten von Krebszellen, wie die Migration, Invasion, Angiogenese und die Inflammation nutzt die Krebszelle Signalwege der UPR, zur Erlangung eines Überlebensvorteils^{54,55}. Aktuell geht man sogar davon aus, dass Krebszellen die UPR für fast alle Eigenschaften einer Krebszelle verwenden⁵⁵. Jedoch gibt es hierbei ein Limit. Eine langanhaltende Aktivierung dieser Zellreaktion, als Zeichen einer Irreparabilität, führt auch in Tumorzellen zum Zelltod. Dies ist die Antwort auf genotoxischen Stress. Bildgebungen von soliden Tumoren im Kopfbereich, von Weichgewebstumoren, Brustkrebs und GBMs zeigen Hypoxieareale, vor allem im Zentrum der Tumoren, in welchen sowohl die Neoangiogenese, als auch die UPR initiiert werden. Hypoxie führt auch zur Akkumulation des proapoptotischen Tumorsuppressor p53. Ferner konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass die Aktivierung der UPR zur veränderten Sensitivität der Tumoren gegenüber Chemotherapien führt³⁰.

Obwohl die UPR dazu dient eine Zelle anpassungsfähiger und resistenter gegenüber Variationen der Umgebung zu machen, ist bekannt, dass diese UPR auch in nicht-tumorösen Krankheitsprozessen eine Rolle spielt. Bei der Alzheimer Erkrankung und der Creutzfeld-Jakob-Erkrankung kommt es zur Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen im Endoplasmatischen Retikulum⁵⁶. Auch in lysosomalen Speichererkrankungen kommt es zur Ablagerung von Gangliosiden im ER. Auch im Rahmen der Atherosklerose konnte gezeigt werden, dass eine konstitutive Calciumfreisetzung aus dem ER erfolgt und durch die Beeinträchtigung der Proteinfaltung, dadurch zur UPR führt. In verschiedenen Erkrankungen führt die chronische Aktivierung der UPR, auch zur Apoptose und somit zum Verlust von Zellen wie

Neuronen oder Makrophagen. Auch bei Virus-Infektionen wird die UPR aktiviert, wessen Ursache am wahrscheinlichsten darin gesehen wird, dass eine große Menge an viralen Proteinen im ER synthetisiert werden. Die UPR ist außerdem auch in normalen physiologischen Entwicklungsprozessen involviert. Dazu gehört die Regulation der Insulinsekretion in pankreatischen beta-Zellen, die Differenzierung von Immunglobulin-produzierenden Plasmazellen und die Proliferation von Hepatozyten⁵⁷.

3.4.1 ER-Stress in tumorassoziierten Stromazellen

Glioblastome zeichnen sich durch ihren Reichtum an nicht-neoplastischen Stromazellen aus. Die Tumorprogression hängt hierbei von einer ausgeprägten Kommunikation zwischen Tumorzellen und umgebenden Zellen ab. Darunter befinden sich Tumor-assoziierte Endothelzellen, myeloische dendritische Zellen, plasmazytoide dendritische Zellen, T-Zellen sowie Tumor-assoziierte Makrophagen und Mikrogliazellen^{58,59}. Die zuletzt genannten Tumor-assoziierten Makrophagen und Mikrogliazellen werden kurz als TAM bezeichnet. Hierbei handelt es sich um Immunzellen, die das Tumorgewebe infiltrieren und 30% der Tumormasse ausmachen⁶⁰. Statistische Analysen zeigen eine Korrelation zwischen der TAM-Infiltration und dem histologischen Grad sowie dem Outcome der Patienten^{61,62}. Bis zum jetzigen Zeitpunkt gibt es ausreichend Evidenz dafür, dass die UPR zur Tumorprogression durch die Formation eines speziellen Mikromilieus beiträgt. Hierbei führt die Aktivierung der beschriebenen drei Arme der UPR mit den Effektoren IRE1, XBP1, PERK und CHOP, zur verstärkten Produktion der pro-tumorigenen Zytokine IL-6 und TNF α in Makrophagen^{63,64}. Speziell in dendritischen Zellen führt CHOP zur vermehrten Produktion von IL-23 und unterstützt damit das Tumorstadium⁶⁵. Makrophagen, die mit einem Medium versetzt werden, das zuvor Tumorzellen unter ER-Stress enthalten hat, zeigten eine Hochregulation von GRP78, XBP1 und CHOP^{66,67}. Ferner ist in Mausmodellen mit tumortragenden Mäusen gezeigt, dass ein Verlust des Chaperons GRP78, welches ein Schlüsselaktivator der UPR ist, in Makrophagen zu einer starken Reduktion von IL-17A, IL-17F, IL-23 und TNF α führt. Außerdem konnte in diesen Zellen eine Hochregulation pro-inflammatorischer Zytokine (IL-6, IL23p19) sowie eine erhöhte Freisetzung von IL-6, IL-23 und TNF α gezeigt werden⁶⁸. Auch pro-inflammatorische Proteine in Makrophagen wie MIP1 α , MIP1 β und MCP1 wurden verstärkt freigesetzt^{66,67}.

Weiterhin konnte mehrfach gezeigt werden, dass die UPR die anti-tumorigenen Effekte des Immunsystems, durch die Beeinflussung der Antigen-Präsentation, behindert. ER-Stress führt dabei zur verminderten Präsentation von „Major Histocompatibility Complexes (MHC)“ der Klasse I und II (MHC I und MHCII)^{69,70}. Speziell der Verlust von XBP1 führt zur Schädigung des Phänotyps von dendritischen Zellen und behindert die Antigenpräsentation. XBP1 unterstützt unter normalen Umständen die Entwicklung und das Überleben von dendritischen Zellen⁷¹.

Neben Immunzellen gehören zu den Stromazellen der Gliome auch Endothelzellen, die Tumor-assoziiert vorliegen. Die UPR wird in Endothelzellen durch den VEGF-Rezeptor, unabhängig von der Akkumulation an fehlgefalteten Proteinen, aktiviert⁷². Über diesen Mechanismus wird die Endothelzellproliferation unterstützt und trägt zur Angiogenese in Tumoren bei⁷². Außerdem konnte eine Relevanz von IRE1 in der Produktion von pro-inflammatorischen Chemokinen, wie IL-6, IL-8 und CXCL3, beschrieben werden^{73,74}. Die meisten dieser Mechanismen der UPR in der Entwicklung und Reifung von Tumoren, konnte bisher in (peripheren) nicht-zentralnervösen Krebszellen beschrieben werden.

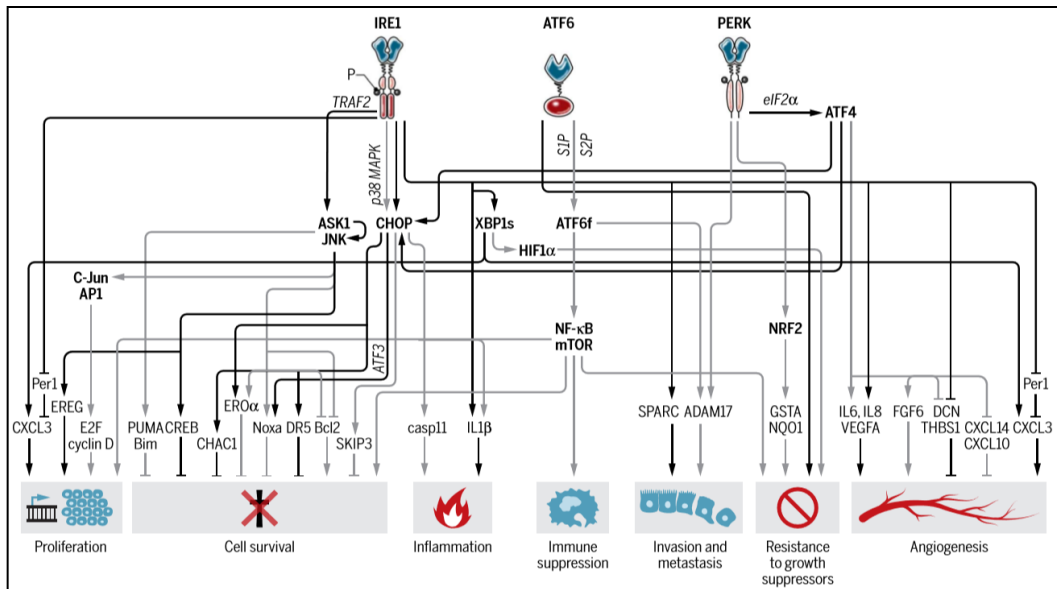


Abbildung 4 Auswirkungen der UPR in Krebszellen. In Krebszellen führt die Aktivierung der ER-Stress Sensoren PERK, IRE1 und ATF6 über die Integration verschiedener Signalwege zur Unterstützung typischer Krebseigenschaften wie zur unkontrollierten Zellproliferation, zum Entgehen des Zelltods, zur Unterstützung einer tumorsupportiven Inflammationsreaktion, zur Umgehung und Modulation der Immunantwort, zur Transformation in mesenchymähnliche Zellen für die Invasion von Geweben und Metastasenbildung, zur Resistenzbildung gegenüber Wachstumsinhibitoren und der Bildung eines tumorsupportiven vaskulären Netzwerkes durch Angiogenese. Die in Schwarz dargestellten Linien beschreiben hierbei spezielle Signalwege im humanen GBM. Entnommen aus: Review: Endoplasmic reticulum proteostasis in glioblastoma—From molecular mechanisms to therapeutic perspectives; *Sci. Signal.* 14 Mar 2017.

3.4.2 PERK

Nach aktuellem Stand der Forschung beeinflusst PERK die Tumorresistenz und Dormanz von Tumorzellen, sowie die Invasion und Metastasenbildung^{75–77}. PERK/eIF2a spielen eine entscheidende Rolle in der Initiierung der Progression zur Krebszelle durch Regulation des Stammzellpotenzials^{78,79}. Die Ablation von PERK führt zu erhöhtem oxidativen Stress, induziert negative Proliferation und unterstützt die G2/M Zellzyklusverzögerung in Mamma-Carcinom-Zellen.⁸⁰ Es wurden Daten erhoben, die zeigen, dass via PERK Signaltransduktion die Tumorzellen unter Hypoxie vor der Apoptose geschützt werden⁸¹. PERK induziert die Angiogenese durch sein „downstream target“ ATF4, welches an den Genpromotor von VEGFA bindet. Pharmakologisches Silencing von PERK schwächt das Tumorstadium und reduziert die Gefäßdichte im Mausmodell^{82,83}. Die Expression von „Epithelial-to-Mesenchymal-Transition (EMT)“-regulierenden Proteinen korreliert mit dem PERK-Target ATF4⁷⁵. Die Einleitung einer besonderen Form des programmierten Zelltods (Anoikis) in Zellen, die sich aus der Extrazellulären Matrix gelöst haben, kann durch die Induktion von Autophagie und die antioxidative Wirkung von PERK verhindert werden⁸⁴. Ferner reduziert PERK das Verhältnis von IκB-Inhibitoren zum nuklearen Faktor κB (NF-κB), mit konsekutiv verstärkter Transkription inflammatorischer Gene⁸⁵.

3.4.3 IRE1

IRE-1 scheint, nach bisherigem Kenntnisstand, die Progression von Krebszellen, durch die Unterstützung verschiedener wichtiger Krebszellmechanismen, zu regulieren. Hiervon eingeschlossen sind die Migration von Krebszellen, deren Toleranz gegenüber Hypoxie, die Inflammation im Tumorenvironment, und die Angiogenese. Außerdem ist IRE1 potentiell in die Tumorgenese involviert, was durch gelegentliche Mutationen von IRE1 in Tumorzellen suggeriert wird⁸⁶. Im Rahmen der Signaltransduktion bilden IRE1 und XBP1 eine Achse, die sowohl in die Zellmigration⁸⁷ als auch in die Zellinvasion⁷³ involviert zu sein scheint. IRE1/XBP1 führen zur verminderten Sensitivität von transformierten Zellen gegenüber Hypoxie-induziertem Zelltod⁸⁸. Insbesondere konnte hier eine direkte Interaktion zwischen XBP1 und dem Schlüsselmediator „Hypoxia-Inducible Factor 1a (HIF1a)“, mit konsekutiver Hochregulation der

Expression von VEGFA und anderen pro-tumorigenen Genen, nachgewiesen werden. Neben der Expression ist auch die Sekretion von VEGFA, Interleukin-6 und Interleukin-1b reguliert. IRE1 reguliert neben der Angiogenese auch die pro-tumorigene Inflammation⁸⁹. Die Kombination aus einem IRE1 RNase-Inhibitor und Bortezomib, als Proteasomeninhibitor, milderte das Wachstum von akut myeloischen Leukämiezellen durch Modulation von XBP1 mRNA Splicing⁸⁷.

3.4.4 ATF6

Die Funktion von ATF6 in Tumoren ist zum jetzigen Zeitpunkt weitgehend unklar. In Hepatozellulären Karzinomzellen konnte eine Relevanz von ATF6 für die Proliferation und Chemotherapieresistenz bzw. Sensitivität gezeigt werden^{90,91}. Ferner wird mehrfach die Rolle von ATF6 in der Bildung des Microenvironments von verschiedenen Tumoren beschrieben^{72,92}. ATF6 zeigt außerdem eine Assoziation mit der Induktion von Seneszenz und Schlafzuständen von Tumorzellen^{11,92}.

3.5 Pharmakologische Interventionsmöglichkeiten in ER-Stress

Im folgenden Abschnitt wird das Ansprechen von Gliomen auf eine Chemo- und Radiotherapie sowie die aktuell vorhandenen Therapieansätze in der allgemeinen Krebstherapie zu ER-Stress behandelt. Es existieren aktuell zwei pharmakologische Strategien zur Beeinflussung der ER-Stress Proteostase. Die erste Variante zielt auf die unspezifische Erhöhung von ER-Stress ab, sodass die Tumorzellen das ER-Stress Level nicht mehr bewältigen können und sterben oder zumindest ihren Überlebensvorteil einbüßen. Die zweite Variante entwickelte sich über die letzten 5 Jahre und hat als Strategie die spezifische Interferenz in die UPR durch Inhibitoren und Effektoren, die direkt in die drei Arme der UPR eingreifen^{83,91,101–106,93–100}. Unter anderem wurden hierbei Substanzen entwickelt, die speziell auf Schlüsselsensoren der UPR abzielen und dadurch die Tumorzellen in den Tod führen. Beispiele dafür sind der PD-Inhibitor, der in den ATF6 Signalweg eingreift, indem er die Protein Disulfid Isomerase (PDIA5) inhibiert. Dieser Inhibitor in Kombination mit dem Antikörper Imantinib, welcher in der Leukämiebehandlung eingesetzt wird, führt zu einer Sensibilisierung der Tumorzellen auf die Imatinib-Behandlung⁹¹. Außerdem sind IRE1 Modulatoren entwickelt worden, welche die RNase-Aktivität von IRE1 beeinflussen und inhibieren können, wie das ManKindCorp Analog (MKC)¹⁰⁷. Dieser IRE1-Inhibitor führte in Kombination, mit dem in klinischer Verwendung befindlichen Proteasomen-Inhibitor Bortezomib, in der Therapie des Multiplen Myeloms zu synergistischen Effekten¹⁰². In meiner Arbeit habe ich sowohl unspezifische ER-Stress-Modulatoren, als auch spezifische, neu entwickelte UPR-Modulatoren, angewandt. Hierbei sind sowohl Substanzen, die ER-Stress induzieren, als auch Substanzen, die die UPR inhibieren von Bedeutung, da Subgruppen von Zellen innerhalb von Tumoren unterschiedlich auf ER-Stress reagieren. Als spezifische Substanzen habe ich hierbei ISRIB eingesetzt, welches zum einen den eIF2 β inhibiert, als auch via eIF2 α Phosphorylierung, die PERK Phosphorylierung beeinflusst¹⁰⁸. Außerdem habe ich als spezifische Substanz Salubrinal verwendet, welche die Protein-Phosphatase 1 (PP1) im Komplex mit CreP oder dem „growth arrest und DNA damage 34 Protein“ blockiert, was über die Dephosphorylierung von eIF2 α zur verzögerten mRNA Translation von UPR-Effektoren führt⁹⁵.

Zu den bekannten pharmakologischen ER-Stress Induktoren, die regelmäßig in der Forschung eingesetzt werden, jedoch nicht an Patienten applizierbar sind, zählen Thapsigargin, Tunicamycin und Brefeldin A. Thapsigargin ist ein SERCA-Inhibitor, welcher konsekutiv die Ca²⁺-Homeostase im Endoplasmatischen Retikulum stört. Tunicamycin beeinflusst direkt die Proteinfaltung und Proteinreifung im Endoplasmatischen Retikulum. Brefeldin A induziert hingegen einen retrograden Transport von Proteinen vom Golgi-Apparat zum Endoplasmatischen Retikulum, wodurch es zu einer Überladung des ER mit Proteinen kommt¹⁰⁹.

3.6 ER-Stress Modulatoren

ER-Stress-Modulatoren können in fünf Gruppen eingeteilt werden: (I) Substanzen, die direkt an ER-Stress-Moleküle binden; (II) Chemische Chaperone; (III) Inhibitoren des Proteinabbaus; (IV) Antioxidantien; (V) Substanzen, die in calciumabhängige Signalwegen interferieren. Generell ist bekannt, dass Modulatoren inhibitorisch wirken und in Zellen häufig zu erhöhter Viabilität führen, mit der Ausnahme, wenn Modulatoren auf Tumorzellen verabreicht werden.

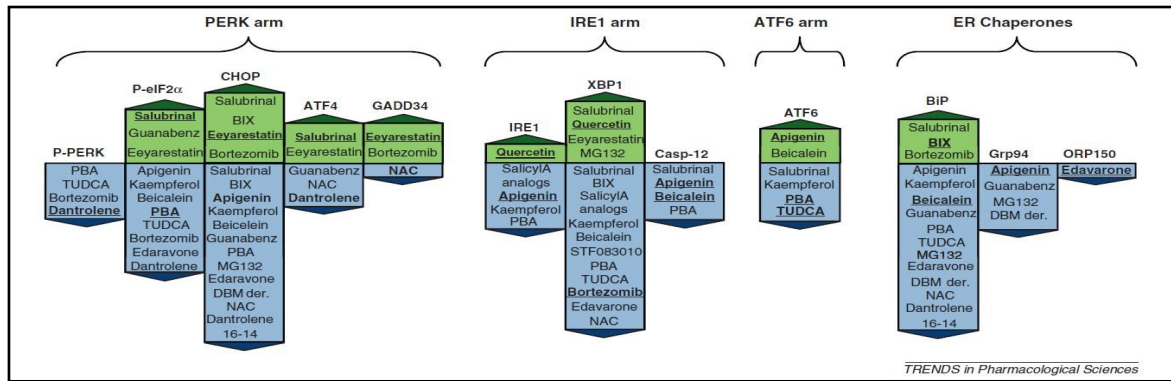


Abbildung 5 Zusammenfassung bekannter ER-Stress Modulatoren. Dargestellt ist eine Zusammenfassung der Effekte von bekannten Substanzen, die ER-Stress in Zellen modulieren (ER-Stress-Modulatoren). Dargestellt sind Substanzen aus allen 5 oben genannten Gruppen von ER-Stress-Modulatoren. Hier dargestellt von links nach rechts sind Substanzen die in den PERK-Arm, den IRE1-Arm, den ATF6-Arm eingreifen oder als Chaperone fungieren. In Zellen aus verschiedenen Geweben führen diese Substanzen entweder zur Hoch- oder Downregulation von ER-Stress. Die Wirkung nach Applikation auf Tumorzellen ist bisher nicht im Detail untersucht. Die grünen Boxen oberhalb der Mittellinie repräsentieren Substanzen, die zu einer Erhöhung der RNA oder Protein-Expression von ER-Stress-Effektoren führen. Die Blauen Boxen unterhalb der Mittellinie hingegen zeigen Substanzen die regelmäßig zur Downregulation von ER-Stress-Molekülen auf Protein und RNA-Ebene führen. Die Substanzen in hervorgehobener Schrift zeigten bisher den stärksten quantifizierbaren Effekt auf Protein oder RNA-Ebene. Entnommen aus: Interfering with ER-Stress (Review Cell Monorata Kraskiewicz and Una FitzGerald)

3.6.1 Gruppe I

Zur Gruppe I gehören direkte Interaktoren in ER-Stress-Signalwegen. Dazu gehören unter anderem Salubrinol. Salubrinol ist ein selektiver Inhibitor des GADD34-Phosphatase-Komplex, welcher den Translationinitiationfaktor 2 alpha (eIF2alpha) dephosphoryliert. Salubrinol führt somit zu erhöhter Menge des phosphorylierten eIF2alpha. Das therapeutische Potential von Salubrinol erstreckt sich sehr weitläufig, z.B.: wurde es in Bezug auf cerebrale Ischämie untersucht und die Vorabbehandlung mit Salubrinol reduzierte die Infarktgröße in Rattenhirnen^{110,111}. In anderen Krankheitsmodellen wie Multipler Sklerose, Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson führte es ebenfalls zu nachweislich erhöhter Viabilität neuronaler Zellen¹⁰⁹. Der Effekt auf Krebszellen ist jedoch nicht genau charakterisiert.

3.6.2 Gruppe II

Zur Gruppe II gehören die Chaperone. Dazu gehört unter anderem die 4-Phenylbuttersäure (PBA). Es konnte gezeigt werden, dass die Applikation von PBA in verschiedenen Zelltypen zur Abschwächung von ER-Stress führte. Zum Beispiel zeigte sich eine protektive Wirkung von PBA in vitro und in vivo Modellen des Diabetes und der cerebralen Ischämie¹⁰⁹. Der Effekt auf verschiedene Tumorzellen ist nicht beschrieben.

3.6.3 Gruppe III

Bei Gruppe III handelt es sich um Inhibitoren des intrazellulären Proteinabbaus, dazu gehört neben anderen Eeyarestatin I. Eeyarestatin I ist bekannt als spezifischer Inhibitor der „ER-associated Proteindegradation (ERAD)“. Über Eeyarestatin I ist bekannt, dass es die normale Funktion der p97 ATPase inhibiert. P97 führt zur Retrotranslokation fehlgefalteter Proteine vom ER zum Proteasom. Dies wird unterbunden und es kommt infolge zur Anhäufung fehlgefalteter Proteine¹¹². Das Ubiquitin-Proteasomen-System stellte sich kürzlich als wichtiges Target in der Entwicklung der Krebstherapie heraus. Der Proteasomeninhibitor Bortezomib ist eine Vorgängersubstanz von Eeyarestatin I und wird bereits klinisch in der Behandlung des Multiplen Myeloms und Mantelzelllymphoms angewandt. Eeyarestatin I

blockiert ER-Stress und hat anti-tumorigene und biologische Eigenschaften die Bortezomib gleich kommen¹⁰⁹.

3.6.3.1 Apigenin

Apigenin ist ein Proteinkinase-Inhibitor. Er aktiviert sowohl intrinsische, als auch extrinsische apoptotische Signalwege und spielt eine anti-inflammatorische und hypotensive Rolle. Außerdem zeigt es antioxidative Eigenschaften *in vivo* ¹¹³⁻¹¹⁶.

3.6.4 Gruppe IV

In der Gruppe IV befinden sich Substanzen die im Allgemeinen als Antioxydanzien wirken.

3.6.4.1 N-Acetyl-L-cysteine

N-Acetyl-L-cystein fungiert als Antioxydans. Es erhöht den zellulären Pool an freien Radikalfängern. Es wurde als Antioxydans zur Behandlung von C2C12 murinen Myoblasten eingesetzt. ¹¹⁷

3.6.5 Gruppe V

Der Gruppe V zugehörig sind Substanzen, die in calciumabhängigen Signalwegen interferieren.

3.6.5.1 Dantrolene

Dantolene verhindern die Ausschüttung von Calcium aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum durch Inhibition von Ryanodin-Rezeptoren (RYR1, RYR3).¹¹⁸⁻¹²⁰

3.6.6 Weitere Substanzen

3.6.6.1 PF429242

PF429242 ist ein Site-1-Protease-Inhibitor. ATF6 ist ein membrangebundener Transkriptionsfaktor. Er führt zur Aktivierung von Genen der ER-Stress Antwort. Sobald fehlgefaltete Proteine im ER akkumulieren, entlässt ATF6 seine zytoplasmatische Domäne ATF6f, welche in den Nucleus migriert. ATF6 wird hierbei durch Site 1 und Site 2 Proteasen prozessiert. S1P und S2P sind sowohl im ER-Stress-Signalweg, speziell im ATF6-Arm, als auch in der Lipidsynthese von Bedeutung ^{121, 113}.

3.6.6.2 4-(2-Aminoethyl) benzensulfonylfluorid - AEBSF

In humanen Zellen sind verschiedene Transkriptionsfaktoren exprimiert, die als transmembranöse Proteine in das ER eingebettet sind und die Proteolyse aktivieren. Hierzu gehört AEBSF. Aktuell sind zwei Typen von Proteinen gut untersucht. Zum einen die „Sterol Regulatory Element-binding Proteins (SREBP-1 und SREBP-2)“, zum anderen die „Activating Transcription Factors 6 alfa und beta (ATF6 α and ATF6 β)“, welche im Rahmen von ER-Stress aktiviert werden. Zuletzt konnte in einer Arbeit gezeigt werden, dass sowohl SREBP als auch ATF6 sequenziell durch S1P (Serinprotease) and danach durch S2P (Metalloprotease) gespalten werden und eine ER-Stress induzierte Spaltung von ATF6 α und ATF6 β schließlich zur Transkription von ATF6 Zielgenen führte ^{121,123}.

3.6.6.3 5-ethyl-7,8-dimethoxy-1H-pyrrolo[3,4-c]isoquinoline-1,3-(2H)-dione- 3F8

5-ethyl-7,8-dimethoxy-1H-pyrrolo[3,4-c]isoquinoline-1,3-(2H)-dione-3F8 ist ein selektiver Glycogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK-3)-Inhibitor. ¹²⁴

3.6.6.4 Integrated Stress Response (ISR) Inhibitor - ISRIB

ISRIB ist ein „Integrated Stress Response (ISR) Inhibitor“. ISRIB kehrt die Effekte der Phosphorylierung des eIF2 α um und führt folglich zur Aufrechterhaltung der Translationskapazität der Zelle. Es agiert downstream von PERK, indem es hier die Interaktion zwischen eIF2 α Kinasen und eIF2B beeinträchtigt. Außerdem blockiert es die Produktion von ATF4, ohne dabei die IRE1 oder ATF6 Signalwege *in vitro* zu beeinflussen.^{96,125,126}

3.6.6.5 Epigallocatechin gallate (EGCG)

Epigallocatechin gallate ist ein β -Sekretase-(BACE1)-Inhibitor. Er verhindert die Formation von Amyloidfibrillen durch Proteine. Außerdem inhibiert es die Glutamatdehydrogenase. Ferner inhibiert es Zellwachstum durch die selektive Induktion von Apoptose in A431 und humanen pankreatischen Krebszellen^{127–131}.

4. Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit dient zur Untersuchung der Sensitivität von Gliomzellen und nicht-zentralnervösen (peripheren) Krebszellen gegenüber pharmakologisch induziertem ER-Stress, sowie zur Entwicklung einer pharmakologischen Kombinationstherapie zur Behandlung von Glioblastomen. Glioblastome sind die häufigsten und aggressivsten, primär malignen Hirntumore und weisen eine ausgeprägte Therapieresistenz auf. Mit der Entwicklung der „Whole Genome Sequencing“-Methoden zeigten sich Glioblastome, analysiert auf Basis der Transkriptome, als sehr heterogene Tumore, mit Subgruppen an Tumor- und Stromazellen innerhalb eines Tumors. Die aktuelle Standardtherapie besteht in der radikalen, operativen Entfernung gefolgt von Radio- und Chemotherapie. Jedoch selbst unter maximaler Therapie liegt aktuell die mittlere Überlebensrate bei ca. 1 Jahr. Als Standardchemotherapeutikum wird das Alkylanz Temozolomid verwendet. Dieses methyliert DNA und führt nebenbei zu ER-Stress. Ein effizientes Kombinations-Chemotherapie-Schema, wie es bei anderen Krebserkrankungen vorliegt, existiert derzeit für Glioblastome nicht. Die Schwierigkeit einer adäquaten Therapie ist insbesondere der hohen Therapieresistenz und hohen Rezidivrate durch das Verbleiben von Tumorzellen nach Behandlung geschuldet. Der genaue Ursprung residualer Tumorzellen nach Therapie ist derzeit nicht bekannt.

In den letzten Jahrzehnten ergab sich ER-Stress und die konsekutive UPR als neues Target in der Behandlung von Krebserkrankungen. Insbesondere gilt ER-Stress-Signaling als wichtiges Target im Rahmen von nicht-zentralnervösen Krebserkrankungen. Die Relevanz in Hirntumoren ist bisher nur spärlich aufgezeigt. Kürzliche Erforschungen konnten zeigen, dass neurale Vorläuferzellen, aus den bekannten Stammzellnischen des menschlichen Gehirns, zu Hirntumoren migrieren und über die Ausschüttung von sogenannten Vanilloiden, zur Aktivierung von TRPV1-Rezeptoren führen. TRPV1 Rezeptoren werden von Gliomzellen exprimiert, jedoch kaum von Zellen aus gesundem Hirngewebe. TRPV1-Rezeptoren werden über Vanilloide als Liganden aktiviert. Zu den Vanilloiden zählen die Cannabinoide, die über den TRPV1-Rezeptor ER-Stress auslösen. Eine Folge von ER-Stress ist die Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen, welche schließlich in einer Reaktion der Zelle, bezeichnet als „Unfolded Protein Response (UPR)“, mündet. Im Rahmen der UPR versucht die Zelle eine balancierte Proteostase aufrechtzuerhalten, um ER-Stress zu kompensieren. Jedoch führt lang anhaltender ER-Stress schließlich zum programmierten Zelltod. Ziel der folgenden Arbeit ist es, die Relevanz von ER-Stress-Modulation in Gliomzellen untersuchen und weitere mögliche ER-Stress Induktoren und Modulatoren zu finden die einen anti-tumorigenen Effekt zeigen. Außerdem sollen verschiedene Kombinationstherapien auf mögliche synergistische Effekte untersucht werden. Insbesondere liegt der Fokus auf der Entwicklung eines Kombinationspartners für CBD, als ein dem Menschen applizierbares Cannabinoid, welches über TRPV1-Rezeptoren ER-Stress induziert. Ferner soll die Sensitivität auf pharmakologisch induzierten ER-Stress von Gliomzellen und peripheren Krebszellen verglichen werden. Zum jetzigen Zeitpunkt existieren in der Therapie von Gliomen bezüglich des Targets ER-Stress keine finalisierten Strategien und nur sehr wenige klinische Studien.

Die vorliegende Arbeit enthält zunächst eine Etablierung einer Basisbehandlung mit pharmakologischen Substanzen, die bereits als ER-Stress Induktoren erforscht sind. Hier wird deren Wirkung auf Gliomzellen analysiert und die Relevanz von pharmakologisch induziertem ER-Stress in Gliomzellen mit nicht-zentralnervösen (peripheren) Krebszellen verglichen. Nachfolgend erfolgt ein ausgiebiges Screening von ER-Stress Modulatoren, deren Effekt auf Gliomzellen bisher unbekannt ist. Im Anschluss erfolgt die Auswahl der besten Substanzen zu einer möglichen Kombinationstherapie, insbesondere in Hinblick auf mögliche Kombination mit CBD. Nur potenziell anti-tumorigene Substanzen wurden weiterverwendet und schließlich mit CBD kombiniert. Im Rahmen des pharmakologischen Screenings der Substanzen wurden generell verschiedene Konzentrationen verwendet, um für eine Kombinationstherapie die geeigneten Schwellenwerte an Dosierungen zu definieren und auf additive bis synergistische Effekte, im Vergleich zur Einzeltherapie, zu untersuchen. Die Spezifität der pharmakologischen Therapie wurde mittels Reporter-Gene-Assays und immunzytochemischen Färbungen der bekannten ER-Stress Gene ATF3 und ATF4, verifiziert.

Mit dieser Arbeit sollen folgende Fragen beantwortet werden:

Wie sensitiv sind Gliomzellen im Vergleich zu nicht-zentralnervösen (peripheren) Krebszellen gegenüber pharmakologisch induziertem ER-Stress?

Ergeben sich additive und synergistische Effekte durch Kombination von ER-Stress Induktoren und ER-Stress Modulatoren in Richtung Zelltod der Gliomzelle? Gibt es weitere potenzielle Kombinationspartner, welche sich bereits in klinischer Anwendung befinden bzw. dem Menschen nebenwirkungsarm applizierbar und Blut-Hirn-Schranke-gängig sind?

Können mittels genetischer Manipulation der Zelle die pharmakologischen Effekte rekapituliert werden? Also ist unsere pharmakologische Therapie spezifisch?

Sehen wir ein unterschiedliches Ansprechen der Tumorzellen auf eine spezifische UPR-Modulation im Vergleich zur unspezifischen ER-Stress Induktion?

5. Materialien

Tabelle 1 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav	KSG
BioPhotometer	Eppendorf
Blockthermostat BT 1301	HLC
Brutschrank L106841	Binder
Brutschrank L106390	Heraeus
Brutschrank CD150	Binder
Brutschrank	Heraeus
Gefrierschrank -80°C HFU 86 450	Heraeus
Gefrierschrank Premium	NoFrost
Kühlschrank Comfort	Liebherr
Kühlschrank Economy	Liebherr
Kühlschrank Premium No Frost	Liebherr
Infinite F200 Pro	TECAN
Kurzzeitmesser (Stoppuhr)	VWR
Laminar flow hood Hera safe	Heraeus
Laminar flow hood thermo scientific (L106840)	Heraeus
Magnetrührer VMS-C7	VWR
Mikroskop Axioskop 2	Zeiss
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss
Mikroskop Axiovert 35	Zeiss
Mikroskop Axiovert 135 TV	Zeiss
Mikrowellenherd	Siemens
Minishaker MS2	IKA Labortechnik
Multipette	Eppendorf
Pipetten (10, 20, 200, 1000µl)	Eppendorf
Pipettierhilfe Easypet	Eppendorf
Multipette Plus	Eppendorf
Röhrchengestell	TPP
Schüttler Polymax 1040	Heidolph
Stickstofftank Chronos	Messer
Thermocycler vapo. Protect	Eppendorf
Vakuum-Pumpe	BioRad
Vortex-Mixer	VWR
Waage AG204 Mettler	Toledo
Waage PB 3002 Mettler	Toledo
Wärmeschrank	Heraeus
Wasserbad	Memmert
Wasserbad TW20	Julabo
Zählkammer, Neubauer improved	VWR
Zellsuspensionsrotator	Labor Brand
Zentrifuge 1-15	Sigma
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf

Gerät	Hersteller
Zentrifuge Universal 30 RF	Hettich
Ultraschallreiniger Sonorex	Bandelin

Tabelle 2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
5L Kanister schwarz zur Entsorgung / Abfallbehälter	Wirtschaftslager
Becherglas 50ml	Schott Duran
Becherglas 150ml	Schott Duran
Becherglas 250ml	Schott Duran
Becherglas 400ml	Schubert & Weiß
Becherglas 600ml	VWR
Becherglas 1000ml	VWR
Combitips advanced-Biopur steril 5ml	Eppendorf
Combitips advanced-Biopur steril 1ml	Eppendorf
Deckgläser für Haemoctom (für Neubauer Zählkammer)	ZEFA Laborservice
Entsorgungsbox (gelb für Kanülen etc.)	Heisig
Injektionsspritzen	Braun
Laborflasche klar mit Kappe und Gewinde 500ml	Schott Duran
Laborflasche klar mit Kappe und Gewinde 250ml	Schott Duran
Laborflasche klar mit Schraubverschluss 100ml	Schott Duran
Messzylinder 1000ml	Wagner & Munz
Messzylinder 100ml	ZEFA Laborservice
Müllbehälter 50L gelb	Wirtschaftslager
Objektträger 76x26 Superfrost	Wagner & Munz
Petrischale	Sarstedt
Pipettenspitzen blau 1000µl steril	Sarstedt
Pipettenspitzen Eppendorf crystal 0,5-20µl steril	Eppendorf
Pipettenspitzen DIAMOND Tower Pack	Gilson
Präparate Kasten schwarz f. 100 Objektträger	ZEFA Laborservice
Präparatmappe grau mit Deckel für 20 OT (Pappe)	Wagner & Munz
Reaktionsgefäß 1,5ml	Sarstedt
Reaktionsgefäß safe lock 2ml	Eppendorf
Reaktionsgefäß safe lock 0,5ml	Eppendorf
Falconröhrchen 15ml	TPP
Falconröhrchen blau 50ml	BD
Produkt	Hersteller
Culture Slides	BD
Spritzenfilter 0,22µm	Roth
Stripetten (5, 10, 25ml)	Schubert & Weiß
Zellstofftücher Kimberly/Clark (blau)	Bauer Papier
Poly-Flachbeutel 80 x 120 mm transparent	Günther D.U.E.
Krankenunterlage 40x60cm Molinea Plus-E	Molinea
Krankenunterlagen 60x90cm Molinea Plus	Molinea
Nitrilhandschuhe pud.fr. latexfrei S	Cardinal Health
Handschuhe klein S semper care	SATRA Technology Centre
Spritzen (5, 10ml)	BD

Tabelle 3 Zellkultur

Produkt	Hersteller
Kryoröhrchen	Kisker
Fetales Kälberserum (FKS) (Charge 0344X)	Biochrom AG
DMEM - Medium 1,0 g/l + L-Glutamin	Biochrom AG
RPMI Medium	Gibco
DMEM F12 Medium	Gibco
Trypsin/ EDTA (10x) (0,5%/0,2%)	Biochrom AG
PBS pH 7,4	Apotheke
MEM Eagle NEAA (100x)	Gibco
Penicillin/ Streptomycin- Lösung	Gibco
G418-Sulfat	CalbioChem.
hEGF	R&D
bFGF	PeptoTech
B27	Gibco
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Einfrierbox für Kryoröhrchen	Nunc
Trypan-Blau	Sigma
Zellkulturflasche TPP mit Filter 25cm \varnothing	TPP
Zellkulturflasche TPP mit Filter 75cm \varnothing	TPP
Zellkulturflasche TPP mit Filter 150cm \varnothing	TPP
Zellkulturtestplatte 6-well	TPP
Zellkulturtestplatte 12-well	TPP
Zellkulturtestplatte 24-well	TPP
Zellkulturtestplatte 96-well	TPP
Assayplatte 384-well, black, flat bottom	Corning
Assayplatte 96-well, white, flat bottom	Costar

Tabelle 4 Substanzen

Produkt	Hersteller
Thapsigargin	Sigma-Aldrich
Tunicamycin	Sigma-Aldrich
Brefeldin A	Sigma-Aldrich
Eyarestatin I	Tocris
Salubrinal	Tocris
Dantrolene	Tocris
4-Penybutyric acid (PBA)	Sigma-Aldrich
Apigenin	Tocris
N-Acetyl-L-cysteine (NAC)	Sigma-Aldrich
Bay11-7085	Tocris
Bay11-7821	Tocris
3F8	Tocris
2-(4-Chlorphenoxy)-N-((1r,4r)-4-{2-(4-chlorophenoxy)acetamido}cyclohexyl)	Aobvious INC
(-)-Epigallocatechin gallate	Sigma-Aldrich
PF429242	Tocris
4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonylfluoride hydrochloride (AEBSF)	Sigma-Aldrich

Tabelle 5 Assays

Artikel	Firma
CytoTox Fluor Cytotoxicity Assay (#G9260)	Promega
LightSwitchLuciferase Assay Reagent (LS010)	SwitchGearGenomics/ BioCat

Table 6 Immunozytochemie

Artikel	Artikelnummer	Firma
4% PFA		Fischer
1% Triton	#10789704	Roche
Protein-Block	#X0909	Dako

Tabelle 7 Antikörper

Primäre Antikörper	Artikelnummer	Firma
anti-ATF3 Antikörper	#HPA001562	Atlas
Sekundäre Antikörper Alexa Fluor 488	#711-545-152	Dianova

Tabelle 8 Transformation/ Transfektion

Primäre Antikörper	Zusatz	Firma
ATF5 Reporter Construct	LightSwitch GoClone Promotor	BioCatGmbH
ATF5 Reporter Construct	LightSwitch GoClone 3'UTR	
ATF4 Reporter Construct	LightSwitch GoClone Promotor	
ATF3 Reporter Construct	LightSwitch GoClone Promotor	
ATF3 Reporter Construct	Light Switch GoClone 3'UTR	
Positive Control Construct	LightSwitch Positive Control Promotor Construct	
Negative Control Construct	LightSwitch GoClone Negative Control Random Sequence Promotor Reporter Construct	
E.coli	JM 109 kompetente Zellen	Promega
LB		Sigma
Agar		Sigma
Plasmid Maxi Kit	Maxi-Präp	Qiagen
Lipofectamine	LTX with Plus Reagent	Life technologies

Tabelle 9 Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Ursprungsgewebe	Firma
U87	Human	Tumorzelllinie aus GBM	ATTC
Gl261wt	Maus	Gliomzelllinie aus der Maus	ATTC
GBM 10	Human	Tumorzelllinie aus GBM	Patient
GBM 10a	Human	Tumorzelllinie aus GBM	Patient
GBM 20	Human	Tumorzelllinie aus GBM	Patient
GBM	Human	Tumorzelllinie aus GBM	Patient
GBM	Human	Tumorzelllinie aus GBM	Patient
NCH588j	Human	Tumorzelllinie aus Rezidiv-GBM	Rezidivpatient
MCF-7	Human	Tumorzelllinie aus Mammakarzinom	ATTC
HepG2	Human	Tumorzelllinie aus Hepatozellulärem Karzinom	ATTC

Zelllinie	Ursprung	Ursprungsgewebe	Firma
M21/2b	Human	Tumorzelllinie aus Melanompatient	ATTC
DLD1	Human	Tumorzelllinie aus Kolonkarzinom	AG A. Herbst
BN 175	Murin	Tumorzelllinie aus Sarkompatient	ATTC
A498	Human	Tumorzelllinie aus Nierenzellkarzinom	ATTC
786-0	Human	Tumorzelllinie aus Nierenzellkarzinom	ATTC
OCI-AML-3	Human	Tumorzelllinie aus akut myeloischem Leukämiepatient	AG Helmholtz
KG1	Human	Tumorzelllinie aus akut myeloischem Leukämiepatient	AG Helmholtz

Tabelle 10 Medium

Zelllinie	Kulturmedium
Humane Gliomzelllinie U87	DMEM + 10 % FCS + 1 % Pen/Strep/Glut (PSG) + 1 % MEM NEAA
Murine Gliomzelllinie GI261wt	DMEM + 10 % FCS + 1 % Pen/Strep/Glut (PSG) + 1 % MEM NEAA
Primärkulturzellen (GBM 10, GBM 10a, GBM20, NCH588j)	DMEM F12 + 1 % PSG+ 10ng/ml hEGF+ 10 ng/ml bFGF +1x B27
Mammakarzinomzelllinie (MCF-7)	RPMI 1640+ 10 % FCS+ 1 % PSG
Hepatozelluläre Karzinomzelllinie (HepG2)	DMEM+ 10 % FCS+ 1 % PSG + 1 % MEM NEAA
Melanomzelllinie (M21/2b)	RPMI 1640+ 10 % FCS+ 1 % PSG
Kolonkarzinomzelllinie (DLD1)	DMEM + 10 % FCS + 1 % PSG + 1 % MEM NEAA
Sarkomzelllinie (BN 175)	RPMI 1640 + 10 % FCS + 1 % PSG
Nierenkarzinomzelllinien (A498 und 786-0)	DMEM + 10 % FCS + 1 % PSG + 1 % MEM NEAA
Leukämiezelllinien (OCI-AML-3 und KG1)	RPMI 1640+ 10 % FCS+ L-Glutamine+ 1% PSG + GM-CSF
Einfriermedium Primärkulturzellen	90 % DMEM F12 10 % DMSO Einfriermedium
Einfriermedium der DMEM kultivierten Zelllinien	40ml FKS (Biochrom AG) 20 ml DMSO (Merck)

6. Methoden

6.1 Zellkultivierung

Die verwendeten Zelllinien werden als Monolayerkultur, in Kulturflaschen mit einer Fläche von 175cm² im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit, kultiviert. Die Kulturmedien sowie die regelmäßige Passage der Zellen dienen dazu, dass den Zellen essenzielle Substanzen hinzugefügt und Abbauprodukte neutralisiert werden.

Die humane Gliomzelllinie (U87) und murine Gliomzelllinie (Gl261wt) werden in 10% FKS/Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) kultiviert. Als Medium für Primärkulturzelllinien (GBMs) wird Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) mit F12 verwendet. Als Wachstumsfaktoren werden 10ng/ml hFGF + 10ng/ml bEGF + 1xB27 hinzugegeben, um die physiologischen Bedingungen in vitro zu schaffen (siehe Kapitel 4, Tabelle 10).

Die peripheren Krebszelllinien werden je nach Zellart in 10% FKS/ Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), oder in 10 % FKS/ RPMI Medium kultiviert (siehe Kapitel 4, Tabelle 10).

Um die Zellen und das Medium vor eventuellem Bakterienbefall zu schützen, wird eine Kombination aus Penicillin/Streptomycin-Antibiotika (PS) zugegeben. Hierbei handelt es sich um 1 % PSG. Ferner werden nichtessenzielle Aminosäuren (MEM NEAA) dem Medium als Supplement zugeführt. Vor der Verabreichung des frischen Mediums werden die Medien grundsätzlich zuvor im Wasserbad auf 37 ° erwärmt. Jegliche Arbeiten werden stets unter sterilen Bedingungen an der Sterilbank durchgeführt.

6.2 Passagieren von Monolayerkulturen

Wird die Zelldichte und somit der jeweilige zur Verfügung stehende Raum der einzelnen Zellen grenzwertig, verändert sich deren Stoffwechsel. Zellen sterben ab oder stoppen die Zellteilung durch Kontaktinhibition. Dem zu Folge wird bei 80%-iger Konfluenz der Zellen eine Subkultivierung (Passage) der Zellen erforderlich. Ferner dient die Farbe des Mediums (Verfärbung von rot nach gelb) als Indikator für einen notwendigen Wechsel des Mediums. Für die Passage wird zunächst das verbrauchte Medium mit einer sterilen Stripette abgesaugt. Um Mediumreste und tote Zellen zu entfernen werden die adhären Zellen dann mit 5ml sterilem PBS gewaschen. Anschließend wird der Flaschenboden mit 3ml Trypsin-EDTA-Lösung bedeckt und in den 37°C temperierten Inkubator gestellt, bis ein Ablösen der Zellen zu erkennen ist. Wenn die Zellen sich abgelöst haben, wird die Wirkung von Trypsin, durch Zugabe der doppelten Menge FCS, sprich 6ml an frischem serumhaltigem Medium inaktiviert. Eine längere Einwirkzeit von Trypsin würde in den Zellen zu irreversiblen Schäden führen und ist daher stets zu vermeiden. Für eine effizientere Vereinzelung der Zellen, werden diese auch noch mechanisch mit einer sterilen Stripette mehrfach resuspendiert. Je nach Zelltyp und Proliferationsverhalten der Zellen wird eine entsprechende Menge der Zellsuspension in frischem, nährstoffreichem Medium weiterkultiviert und die übrigen Zellen für Experimente verwendet oder verworfen.

6.3 Funktionelle Assays

6.3.1 Zytotoxizitätsassay

Der „Cytotox-Fluor Assay“ von Promega ist ein Fluoreszenz-Assay, der zur Messung der relativen Zelltodrate einer Zellpopulation dient. Hierbei misst der Assay die Aktivität einer bestimmten Protease, die bei Verlust der Membranintegrität, aus der Zelle freigesetzt wird. Die Membranintegrität ist der entscheidende Faktor in der Definition einer viablen Zelle. Bei Verlust der Membranintegrität im Rahmen des Zelltods kommt es zur Ausschüttung der Protease aus der Zelle. Mithilfe eines Substrats kann im Rahmen dieses Assays, die Aktivität der freigesetzten Protease gemessen und somit der Verlust der Membranintegrität und somit die relative Zelltodrate in einer Population bestimmt werden. Zur Visualisierung wird bei Hinzugabe des Substrats R110, welches nicht membranpermeabel ist, bei enzymatischer Umsetzung ein messbares Fluoreszenzsignal erzeugt. Auf diese Weise kann die Zytotoxizität quantifiziert werden.

Im Rahmen der Durchführung des Assays werden adhärenente Zellen, wie bereits im Kapitel der Zellkultivierung beschrieben, abgelöst, gewaschen und in frischem Medium resuspendiert. Im Rahmen des Experiments werden 10 000 Zellen pro Well, d.h. pro 500µl Medium, in eine 24-Well Platte ausgesät. Danach werden die Zellen in den Platten für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ zum Anwachsen belassen. Diese Zeitspanne dient den Zellen sich die bestmöglichen Lebensbedingungen zu schaffen und wieder adhärenent zu werden. Das Medium wird anschließend abgesaugt und durch frisches Inkubationsmedium mit den entsprechenden Substanzkonzentrationen ersetzt. Sind Substanzen in DMSO gelöst, wird ein Kontrollansatz mit der entsprechenden DMSO-Konzentration angesetzt und über das gesamte Experiment hinweg mitgeführt. Als Positivkontrolle werden 6 Replikate mit 300ng/ml Digitonin, 2 Stunden vor der Messung, behandelt.

Die Zytotoxizität in den Wells wird nach 24, 48 und 72 Stunden Inkubationszeit gemessen. Hierfür wird eine Abänderung der zur Verfügung gestellten Methode von Promega verwendet. Es werden 20ul jedes Wells in eine 384-well-Platte überführt. Danach werden 20ul der Substratassaylösung zu jedem Well hinzugegeben und nach 1 ½ stündiger Inkubation bei 37°C, wird die Fluoreszenz in einem Fluoreszenzmessgerät gemessen. Somit bleibt das Verhältnis an zu messender Lösung und Substratlösung 1:1, wie im ursprünglichen Protokoll von Promega vorgesehen, jedoch unter sparsamerer Verwendung der Assaylösung.

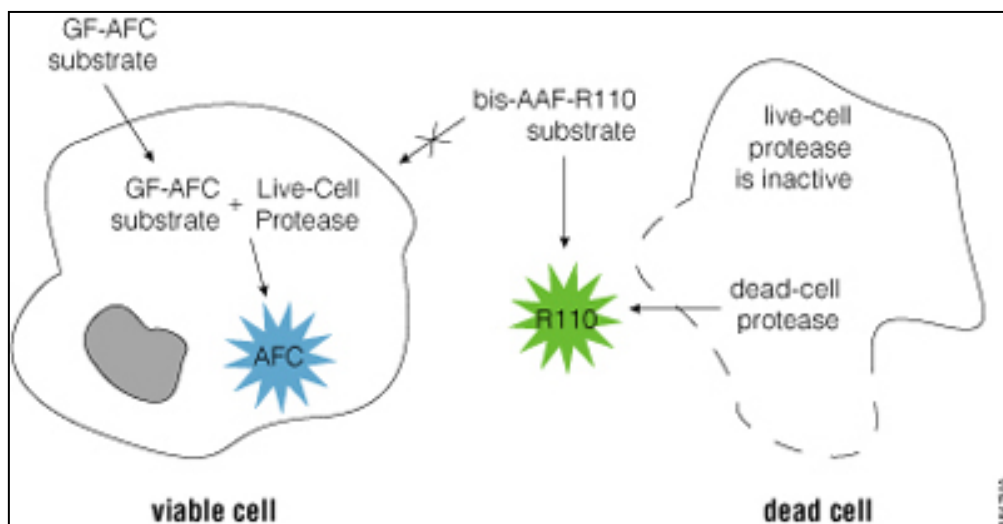


Abbildung 6 Schematische Darstellung des Prinzips, des in dieser Arbeit verwendeten Zytotoxizitätsassays. Tote Zellen (rechts) setzen auf Grund der zerstörten Zellmembran ein Enzym frei (R110 (grün dargestellt)). Durch Hinzugabe eines Substrats (bis-AAF-R110) wird dieses durch das freigesetzte Enzym umgesetzt und ein Fluoreszenzsignal entsteht. Hierdurch kann die Zytotoxizität nach Applikation von Substanzen auf Zellen quantifiziert werden. Vitale Zellen mit intakter Zellmembran setzen kein Enzym frei und folglich ist bei vitalen Zellen keine Zytotoxizität messbar. Das hinzugegebene Substrat ist außerdem nicht membrangängig. Entommen aus Promega.

6.3.2 Auswertung

Von den gemessenen Fluoreszenzwerten wird zunächst der Leerwert („blank“) subtrahiert. Um die Zelltodrate der Zellen zu bestimmen, werden die Mittelwerte und die Standardabweichung der Kontroll- und der Testwerte gebildet. Die Mittelwerte der behandelten Proben werden auf den Mittelwert der DMSO-Kontrolle normalisiert. Hierbei wird der gemessene Fluoreszenzwert der unbehandelten Kontrolle gleich 1 gesetzt und somit entsprechen die behandelten Probenmesswerte dann einem Vielfachen dieser 1. Stets wird die Positivkontrolle mit Digitonin als technische Kontrolle herangezogen, um zu verifizieren, dass der Versuch verwendet werden kann. Ausreißer der Messwerte werden unter Zuhilfenahme eines Ausreißertests von der Software Graph Pad PRISM (Grubb's test) entfernt. In den Experimenten werden 3 bis 6 Replikate angesetzt und das Experiment wird mehrfach (n-fach) in voneinander unabhängigen Experimenten durchgeführt. Die Ergebnisse werden dann in einem Diagramm aufgeführt. Hierbei werden, beim Vorliegen einer Gauß'schen Normalverteilung der Messwerte, statistische Analysen je nach

Konstellation mittels one-way ANOVA-Test oder two-way-ANOVA-Test durchgeführt. Liegt keine Gauß'sche Normalverteilung der Messwerte vor, wird ein nicht parametrischer Test angewandt. Die angewandten Tests werden in den jeweiligen Abbildungen in der Legende aufgeführt.

6.4 Molekularbiologische Methoden

6.4.1 Reporter Gene Assay

Der im folgenden beschriebene Assay wurde verwendet, um die Reaktion der Zellen auf genetischer Ebene, infolge der Pharmakotherapie zu rekapitulieren. Hierzu wurde der Reporter Gene Assay von Switch Gear Genomics verwendet. Zunächst wurden hierfür 10.000 Zellen in 100ul Medium pro Well in weiße 96-Well Platten ausgesät, über Nacht belassen und mit Lipofectamine transient transfiziert. Die Zellen erhalten während der Transfektion, die zuvor amplifizierte Promotor- und 3'UTR-Konstrukte in Form eines Plasmids. Das Transfektionsmedium wird nach 24 Stunden Inkubationszeit abgesaugt und durch frisches Inkubationsmedium, mit den entsprechenden Substanzkonzentrationen, ersetzt. Sind Substanzen in DMSO gelöst, wird ein Kontrollansatz mit der entsprechenden DMSO-Konzentration angesetzt und über das gesamte Experiment hinweg mitgeführt. Die transient transfizierten Plasmide enthalten ein Luziferase-Gen, welches bei der Aktivierung des vorgeschalteten Promotors (in diesem Fall ATF 3 oder 4) transkribiert und translatiert wird. Bei Hinzugabe des Luziferasesubstrats wird dieses dann umgesetzt. Hierbei entsteht ein Lichtsignal, welches als Lumineszenzsignal in einem Messgerät gemessen werden kann. Das Lumineszenzsignal entspricht hierbei der Promotoraktivität der transfizierten Zellen. Als Positivkontrolle wird ein Plasmidkonstrukt verwendet, welches einen konstitutiv aktiven Promotor enthält und damit dauernd aktiv ist. Als negative Kontrolle wird der „housekeeping-Vektor“ Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) verwendet, welcher nur den Promotor oder das 3'UTR für die üblichen „housekeeping“ Gene, die dem Luciferasereporter nachgeschaltet sind, enthält. Nach 48 Stunden Inkubation mit den jeweiligen substanzhaltigen Medien wird ein MasterMix hergestellt, der pro 1 ml Puffer 10ul Substrat des Reporter Gene Assays enthält. Die MasterMix-Lösung wird in Form von 100ul pro Well zu dem Medium und den Zellen in den Platten hinzugegeben. Die Platten werden dann in eine feuchte Dunkelkammer gestellt. Nach 1,5 Stunden Inkubationszeit werden die Platten in das Messgerät gestellt und das Lumineszenz-Signal gemessen.

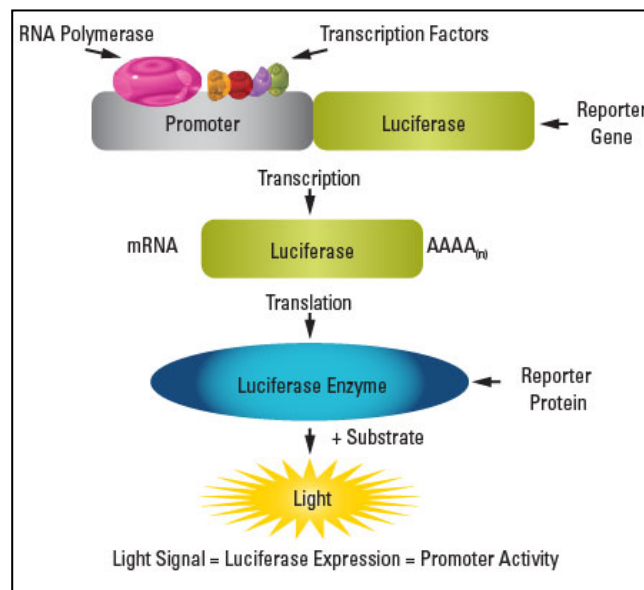


Abbildung 7 Schematische Darstellung des Luciferase Reporter Gene Assays. Oben im Bild dargestellt ist eine Promotorregion mit nachgeschaltetem Luciferase-Reporter-Gen. In Abhängigkeit der Promotor-Aktivität wird das Luciferase-Gen transkribiert und in Luciferase-Enzym (Reporter-Protein) translatiert. Durch Hinzugabe eines Substrats wird dieses durch das Luciferase-Reporter-Enzym umgesetzt und ein Lichtsignal (Lumineszenz) wird messbar. Somit kann indirekt die Promotoraktivität, via Entstehung eines Lumineszenz-Signals gemessen werden. Entnommen aus ThermoFisherScientific.

6.4.2 Auswertung

Um das Lumineszenzsignal und somit die Genaktivität der Komponenten ATF 3 und 4 in den behandelten Zellen zu bestimmen, werden die Mittelwerte und die Standardabweichung der Kontroll- und der Testwerte gebildet. In den behandelten Zellkammern sind nach Behandlung mit der jeweiligen Pharmakotherapie wesentlich weniger Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen aufzufinden. Jedes Signal pro Well wird daher auf das Signal des house keeping genes normalisiert und verglichen. Die Messwerte werden dann in einem Diagramm im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle als Vielfaches der Kontrolle aufgeführt.

6.4.3 Transiente Transfektion

Für die Transfektion mit Lipofectamine wird ein Lipid-DNA-Komplex hergestellt, um die Zellen mit der gewünschten DNA zu transfizieren. Das Reagenz besteht aus Lipid-Untereinheiten, die Liposomen ausbilden und die Membran von Zellen passieren können. Hierfür wurden zunächst 10.000 Zellen in 100ul Medium pro Well in weiße 96-Well-Platten ausgesät und 24 Stunden belassen. Nachdem die Zellen nach 24 Stunden adhärent waren wurde ein Master-Mix an Lipofectamine Reagenz hergestellt. Hierfür wurden entsprechend dem Lipofectamine Transfektionsprotokoll, je nach Bedarf ein Vielfaches folgender Komponenten angesetzt: Als Lösung 1 wurden 25 ul Opti-MEM Medium mit 2,5 ul Lipofectamine Reagent angesetzt. Parallel wurde Lösung 2 mit 125ul Opti-MEM und 2,5ul PlusReagent Medium angesetzt und darin 2,5ug der DNA gelöst. Anschließend wurde 25ul von Lösung 1 mit 25ul von Lösung 2 gemischt. Die daraus entstandene DNA-Lipid-Lösung wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 100ul der Lösung pro Well auf die Zellen gegeben.

6.5 Mikrobiologische Methoden

6.5.1 Kultivierung von E.coli Bakterien auf Agar

Zur Kultivierung von E.coli Bakterien auf Agar wurden mit Agar beschichtete Platten hergestellt. Dafür wurde LB-Agar-Medium entsprechend den Angaben des Herstellers angesetzt. Das flüssige LB-Medium für die Agarplatten wurde mit 100µg/ml Ampicillin versetzt und danach in die Platten ausgegossen (LBamp). Bei Raumtemperatur wurden die Platten dann bis zum Aushärten des Agars belassen und anschließend bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Als Kontrolle dienen LB-Agar-Platten ohne Ampicillin-Zusatz (LB ohne Amp). Die transformierten Bakterien wurden dann auf die hergestellten Agarplatten gegeben und nach 24 Stunden Inkubation bei 37° wurden die Klone gepickt und in flüssiges LB-Medium überführt.

6.5.2 Kultivierung von Bakterien in flüssigem LB-Medium

Zur Kultivierung von Bakterien wurde flüssiges LB-Medium entsprechend der Angaben des Herstellers angesetzt. Hierfür wurde das LB-Medium-Pulver in H₂O gelöst und bei 121°C autoklaviert. Im autoklavierten flüssigen LB-Medium wurde dann der Escherichia coli (E.coli)-Stamm bei 37°C angezüchtet. Zur Selektion der Ampicillin-resistenten Transformanten erfolgte der Zusatz von 100µg/ml Ampicillin zum flüssigen LB-Medium. Flüssigkulturen wurden im Schüttler bei 250U/min inkubiert.

6.5.3 Plasmid Transfektion

Folgende Plasmide wurden wie beschrieben in E.coli-Zellen transformiert und aufgereinigt.

Wie in Abbildung 8 dargestellt, enthalten alle Vektoren folgende Informationen: Multiple Cloning Site,

RenSP (Luziferase Gene), PolyA, ORI, Ampicillin-Sequenz zur bakteriellen Selektion.

Vektorspezifische Plasmidinformationen:

Promotor: ATF3 oder ATF4

(Quelle: www.switchgeargenomics.com)

3'UTR: ATF3 oder ATF4

(Quelle: www.switchgeargenomics.com)

Das Plasmid konnte anschließend mit Hilfe einer Lipofectamine-Transfektion in U87-Zellen eingeschleust werden.

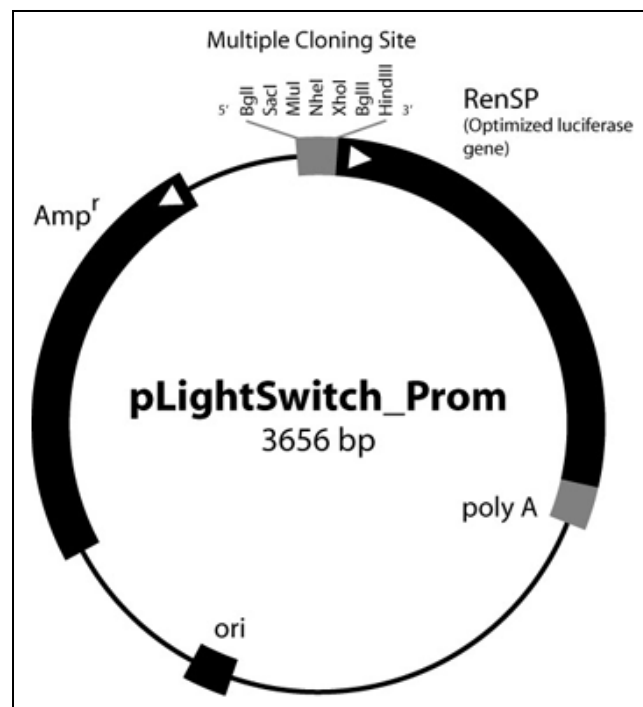


Abbildung 8 ATF-Basis-Konstrukt Darstellung des pLightSwitch_Prom Plasmids. Das Plasmid enthält multiple Cloning sites als Schnittstellen zur Insertion verschiedener Nukleotidsequenzen und demzufolge zur Insertion potenzieller, zu untersuchender Promotoren. Den Cloning sites nachgeschaltet befindet sich, wie oben beschrieben, das Luciferase-Gen mit Poly-A-Schwanz. Ferner befindet sich im Plasmid zur bakteriellen Selektion ein Ampicillinresistenzgen und eine Sequenz (ORI) die als Replikationsursprung dient und es dem Plasmid ermöglicht unabhängig von der chromosomalen DNA in Bakterien repliziert zu werden.

6.5.4 Transformation von E.coli mittels Hitzeschock

Um den Transformationsansatz herzustellen wurden kompetente E.coli-Zellen in einem Reaktionsgefäß auf Eis aufgetaut. Im nächsten Schritt wurde die DNA den Zellen hinzugefügt und bei 4°C über 5 min inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte der Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden und eine erneute Inkubation bei 4°C für 5 Minuten.

Nach dem Hitzeschock wird 1ml LB-Medium zu den E.coli-Bakterien hinzugegeben und diese dann bei 37°C für 30-60 Minuten kultiviert. Dieser Schritt dient dazu, dass die kodierte Antibiotikaresistenz auf der eingesetzten DNA ausgeprägt wird.

Der finale Transformationsansatz wurde dann auf zwei LB-Ampicillin-Agarplatten und einer Kontroll-LB ohne Amp-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert.

Am Folgetag wurden die Einzelkolonien mit einer Pipettenspitze von den LB-Amp-Platten gepickt und jeweils in 5ml Ampicillin versetztes LB-Medium in 15ml-Falconröhrchen überführt und bei 37°C im Rüttler kultiviert. Nach ca. 8 Stunden Inkubation war eine trübe Verfärbung als Indikator für das Wachstum Ampicillin-resistenter Bakterien, die das Plasmid aufgenommen haben, sichtbar. Im nächsten Schritt wurde ein Milliliter dieser Flüssigkultur in ein Erlenmeyerkolben mit 200ml LB-Amp-Medium überführt und über Nacht bei 37°C im Rüttelgerät kultiviert. Und schließlich erfolgte dann die Isolation der eingesetzten Plasmid-DNA aus der Flüssigkultur.

6.5.5 Isolation und Aufreinigung von Plasmid-DNA aus E.coli

Für die Transfektionen wurden größere Mengen an Plasmid benötigt, deren Aufreinigung mit Hilfe des Qiagen Maxi-Preparation-Kits nach Herstellerangaben durchgeführt wurde.

6.6 Immuncytochemie (ICC)

Nach Kultivierung der gewünschten Zellen in einer T75-Zellkulturflasche, wurde die Zellzahl, mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer, bestimmt. Jeweils 10.000 Zellen wurden im Arbeitsvolumen von 500ul in 8- Glaskammer-Objektträger pipettiert und zum Anwachsen über Nacht im Brutschrank belassen. Nach Inkubation wurde das Medium abgenommen und anschließend erfolgte die Spülung in PBS. Im nächsten Schritt erfolgte die Fixierung der Zellen durch 4%-iges PFA. Danach folgte die erneute Inkubation für 15min bei 4°C im Kühlschrank.

Anschließend folgte ein Waschschriff mit eisgekühltem PBS. Nach den Waschschriffen werden die Zellen dann bei Raumtemperatur kurz zum Auftauen belassen. Daraufhin konnte die Permeabilisierung der Zellen mit 1% Triton X-100 erfolgen. Danach werden die Zellen für 1 Stunde mit einem Protein-Block bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Der Protein-Block wird anschließend abgekippt und der primäre Antikörper wird verdünnt in Antikörperlösung auf die Zellen gegeben. In dieser Konstellation werden die Zellen über Nacht bei 4°C inkubiert.

Nach der Inkubation werden die Zellen am Folgetag dreimal für 10 Minuten mit PBS gewaschen und mit dem Fluoreszenz-gekoppelten sekundären Antikörper verdünnt in Antikörperdiluent für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend werden die Zellen erneut dreimal für 10 Minuten mit PBS gewaschen und danach mit DAPI (oder Hoechst 1:10000) für 5 Minuten gegengefärbt, um die Zellkerne darzustellen. Schließlich werden die Zellen ein letztes Mal mit Tris/Tween gewaschen. Die Objektträger werden mit Deckgläsern eingedeckt und anschließend unter dem Mikroskop analysiert.

7. Ergebnisse

7.1 Die Sensitivität von Gliomzellen und peripheren Krebszellen gegenüber pharmakologisch induziertem ER-Stress

Um einen Eindruck über die Empfindlichkeit von verschiedenen Krebszellen gegenüber ER-Stress zu erlangen, wurde mittels eines Zytotoxizitätsassays die Toxizität nach Applikation bekannter und allgemein anerkannter ER-Stress induzierender Substanzen gemessen. Die verschiedenen Krebszelllinien wurden mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe über gewisse Zeiträume (24-72 Stunden) behandelt. Als ER-Stress Induktoren wurden die Substanzen Tunicamycin, welches direkt die Proteinfaltung und Reifung¹ beeinflusst sowie Thapsigargin welches die Calcium-Homeostase in der Zelle² beeinträchtigt, verwendet. In diesem Kontext wurde die Zelltodrate der behandelten Zellen mittels Zytotoxizitätsassays erfasst. Die Quantifizierung von Zelltod, in Folge der Behandlung mit Tunicamycin, zeigte eine signifikant höhere Zytotoxizität und somit ein höheres Ansprechen der Gliomzellen verglichen zu Krebszellen aus peripheren (nicht-zentralnervösen) Organsystemen (siehe Abb.9). Die Quantifizierung von Zelltod nach Behandlung der Zellen mit Thapsigargin zeigte signifikant höhere Zelltodraten in diversen Gliom- und peripheren Krebszelllinien verglichen mit den unbehandelten Kontrollen (siehe Abb.10), jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gliomzelllinien und den peripheren Krebszelllinien.

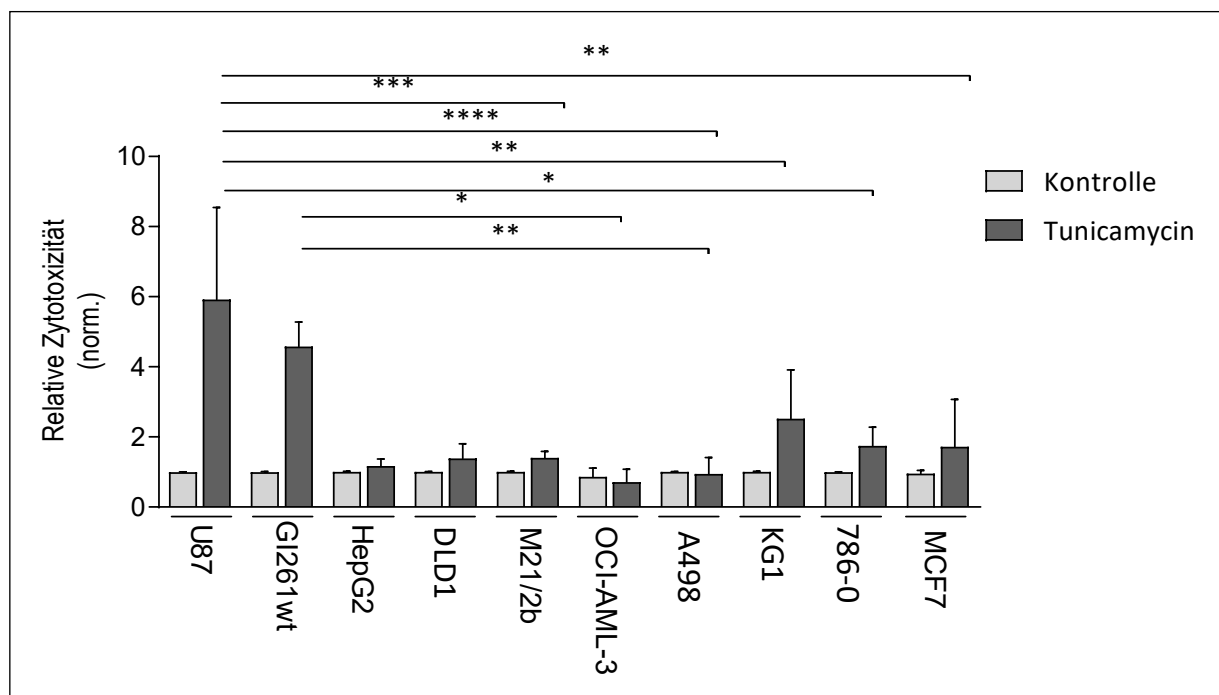


Abbildung 9 Die Sensitivität von Gliomzellen und peripheren Krebszellen gegenüber pharmakologisch induziertem Endoplasmatischem Retikulum Stress durch die Inhibierung von Proteinfaltung und -reifung mit Tunicamycin. Quantifizierung von Zelltod verschiedener Krebszellarten nach Applikation von Tunicamycin (100ng/ml) in geringen Konzentrationen verglichen zur unbehandelten Kontrolle. Gliom Zelllinien: U87 und GL261wt; Mammakarzinom Zelllinie: MCF-7; Hepatozelluläre Karzinomzelllinie: HepG2; Colonkarzinom Zelllinie: DLD1; Nierenkarzinom Zelllinien: A498 und 786-0; Leukämiezelllinien: OCI-AML 3 und KG1; Melanomzelllinie: M21/2b. (n=3) Signifikante Unterschiede verglichen mit der unbehandelten Kontrolle (sidak's multiple comparison test) und multipler Vergleich (Tukey's multiple comparison test) wurde mittels two-way ANOVA bestimmt. Signifikante Unterschiede sind mit * markiert. (GP:0,1234(ns), 0,0332 (*), 0,0021(**), 0,0002(***), <0,0001(***)). n= Anzahl an separaten Experimenten.

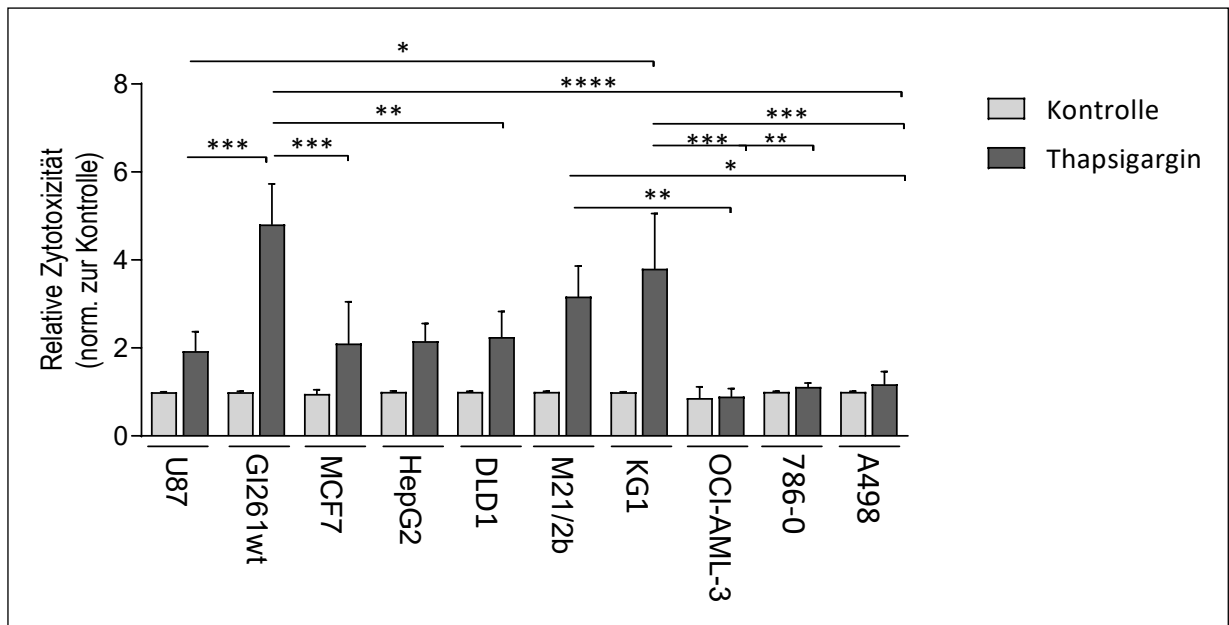


Abbildung 10 Gliomzellen gehören zu den sensitivsten Krebszellen gegenüber pharmakologisch induziertem Endoplasmatischem Retikulum Stress. Hier gezeigt durch Störung der Calciumhomeostase mit Thapsigargin als SERCA-Inhibitor. Quantifizierung von Zelltod verschiedener Zellarten nach Behandlung mit geringen Konzentrationen Thapsigargin (10ng/ml), normalisiert auf die unbehandelten Kontrolle. n=3. Gliom Zelllinien: U87 und GI261wt; Mammakarzinom Zelllinie: MCF-7; Hepatozelluläres Karzinom Zelllinie: HepG2; Colonkarzinom Zelllinie: DLD1; Nierenkarzinom Zelllinien: A498 und 786-0; Leukämiezelllinien: OCI-AML 3 und KG1; Melanomzelllinie: M21/2b. (n=3) Signifikante Unterschiede verglichen mit der unbehandelten Kontrolle (sidak's multiple comparison test) und multipler Vergleich (Tukey's multiple comparison test) wurde mittels two-way ANOVA bestimmt. Signifikante Unterschiede sind mit * markiert. (GP: 0,1234(ns), 0,0332 (*), 0,0021(**), 0,0002(***), <0,0001(****)). n= Anzahl an separaten Experimenten.

7.2 Sensitivität von Gliomzellen auf ER-Stress Induktoren

Um herauszufinden wie ER-Stress in Gliomzellen manipuliert werden kann, wurden diverse Substanzen verwendet, die bekanntlich in ER-Stress Signalwegen interferieren und als ER-Stress Induktoren bezeichnet werden. Hierzu zählen unter anderem, die bereits beschriebenen Substanzen Thapsigargin, Tunicamycin sowie Brefeldin A. Brefeldin A wird in der Forschung angewandt und induziert einen retrograden Transport vom Golgi-Apparat zurück zum Endoplasmatischen Retikulum³. Die Quantifizierung von Zelltod illustriert, dass der ER-Stress Induktor Thapsigargin, als SERCA-Inhibitor², in aufsteigender Konzentration (1-1000 ng/ml) Zelltod in humanen Gliomzellen (U87) induziert (Abb.11+12). Die Ergebnisse suggerieren außerdem, dass die Konzentration von 10 ng/ml der verwendeten Substanz über einen Zeitraum von 48-72 Stunden eine effektive Dosis darstellt, um signifikant hohe Zelltodraten verglichen zur unbehandelten Kontrolle zu generieren. Die Applikation von Tunicamycin geht ebenfalls mit signifikant höherem Sterben der Gliomzellen einher (Abb.13+14).

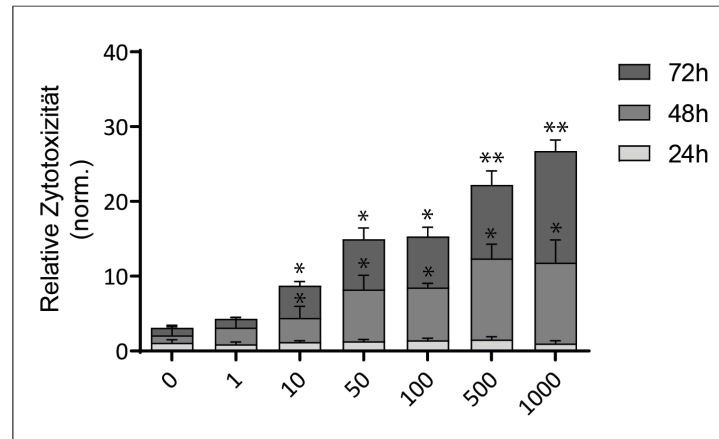


Abbildung 11 ER-Stress Induktor Thapsigargin als SERCA-Inhibitor beeinflusst die Calcium-Homeostase und führt zu erhöhten Zelltodraten in humanen Gliomzellen (U87). Quantifizierung von Zelltod nach Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen des ER-Stress Induktors Thapsigargin (1-1000ng/ml). U87 behandelt für 24h, 48h und 72h. (n=3) Signifikante Unterschiede verglichen mit der unbehandelten Kontrolle wurden mittels One-way ANOVA für normal verteilte Werte (Gaussche Verteilung) bestimmt. Nicht parametrische Verteilung der Werte wurden via nicht-parametrischem Test bestimmt. Signifikante Unterschiede sind per * markiert. (GP: 0,1234(ns), 0,0332 (*), 0,0021(**), 0,0002(***), <0,0001(***)). n= Anzahl an Experimenten

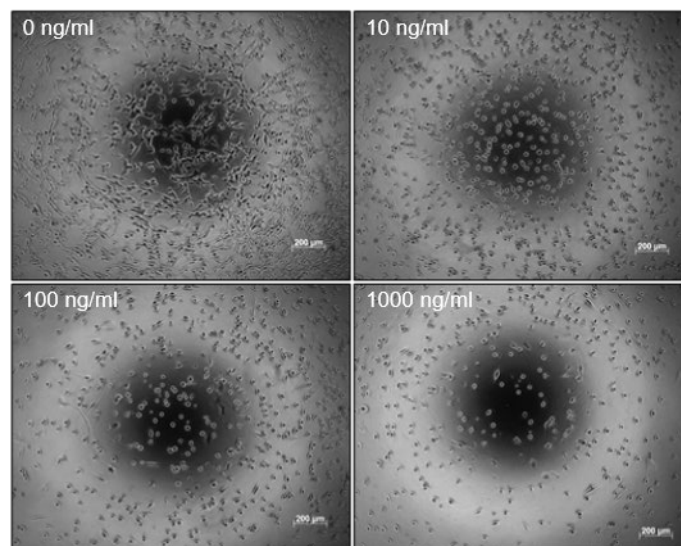


Abbildung 12. Mikroskopische Veränderungen der GBM-Zellen (U87) nach Behandlung mit Thapsigargin. Ebenso zeigt die mikroskopische Begutachtung der Gliomzellen in Folge der Applikation aufsteigender Konzentrationen (1-1000ng/ml) von Thapsigargin merklich erhöhte Zelltodraten und morphologische Veränderungen (U87). Maßstab: 200µm.

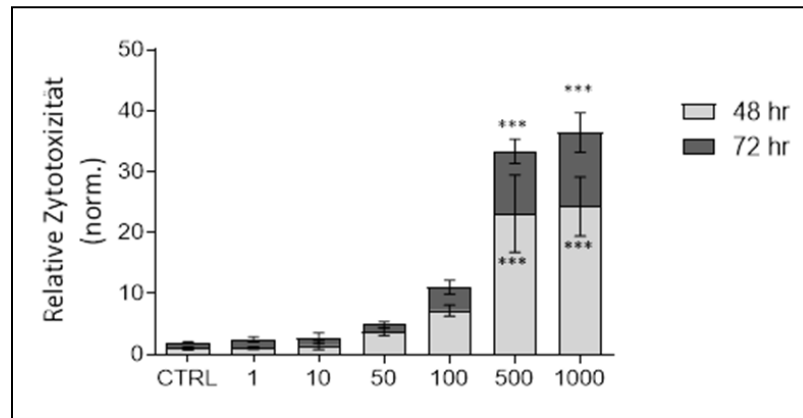


Abbildung 13 Der ER-Stress Induktor Tunicamycin, als Effektor auf die Proteinfaltung und -reifung induziert Zelltod in humanen Gliomzellen (U87). Quantifizierung von Zelltod nach Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen des ER-Stress Induktors Tunicamycin (1-1000ng/ml) normalisiert auf die unbehandelte Kontrolle. U87 behandelt für 48h und 72h. (n=3) Signifikante Unterschiede verglichen mit der unbehandelten Kontrolle wurden mittels One-way ANOVA für normal verteilte Werte (Gaussche Verteilung) bestimmt. Nicht parametrische Verteilung der Werte wurden via nicht-parametrischem Test bestimmt. Signifikante Unterschiede sind per * markiert. (GP: 0,1234(ns), 0,0332 (*), 0,0021(**), 0,0002(***), <0,0001(****)). n= Anzahl an Experimenten.

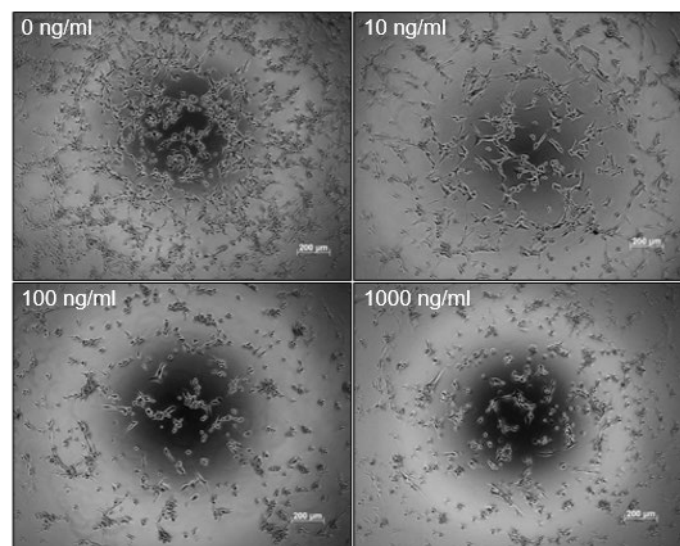


Abbildung 14 Mikroskopische Veränderungen der GBM-Zellen (U87) nach Behandlung mit Tunicamycin. Ebenso zeigt die mikroskopische Begutachtung der Gliomzellen in Folge der Applikation aufsteigender Konzentrationen (1-1000ng/ml) von Tunicamycin merklich erhöhte Zelltodraten und morphologische Veränderungen. Maßstab: 200µm.

Murine Gliomzellen (G1261wt) zeigen nach Behandlung mit Tunicamycin und Thapsigargin reproduzierbare Effekte (Abb.15). Ferner, zeigen die humanen Gliomzellen nach Behandlung mit Brefeldin A ebenfalls eine signifikant höhere Zytotoxizität im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Nach der Applikation von Brefeldin A in aufsteigender Konzentration, zeigt sich hierbei, bereits bei Verwendung von 2-4 ng/ml über 48 und 72 Stunden, ein signifikanter zytotoxischer Effekt (Abb.16).

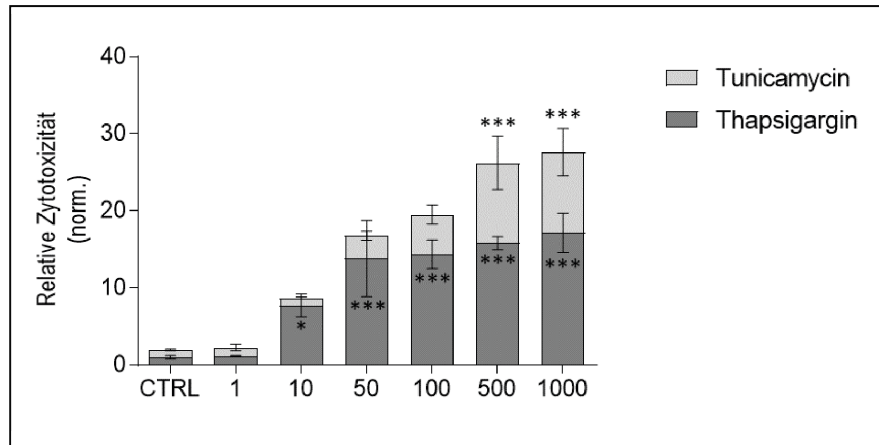


Abbildung 15 Die ER-Stress Induktoren Thapsigargin und Tunicamycin induzieren Zelltod in murinen Gliomzellen (Gl261wt). Quantifizierung von Zelltod nach Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen des ER-Stress Induktors Tunicamycin (1-1000ng/ml) normalisiert auf die unbehandelte Kontrolle. (n=3) Signifikante Unterschiede verglichen mit der unbehandelten Kontrolle wurden mittels One-way ANOVA für normal verteilte Werte (Gaussche Verteilung) bestimmt. Nicht parametrische Verteilung der Werte wurden via nicht-parametrischem Test bestimmt. Signifikante Unterschiede sind per * markiert.(GP: 0,1234(ns), 0,0332 (*), 0,0021(**), 0,0002(***), <0,0001(***)). n= Anzahl an Experimenten.

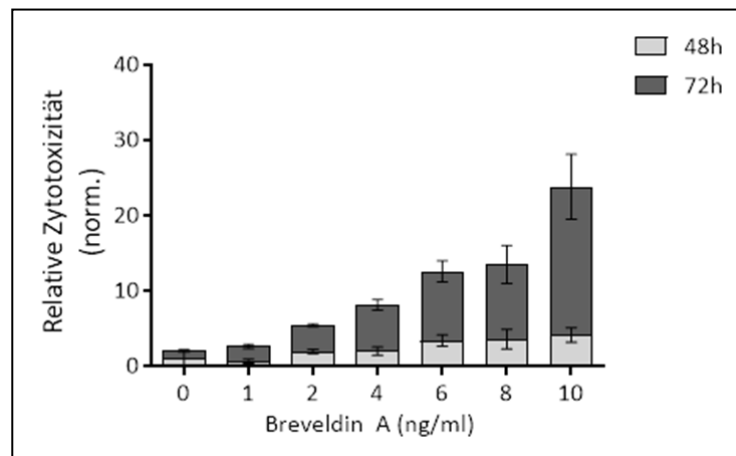


Figure 16 Der ER-Stress Induktor Breveldin A, welcher den retrograden Transport von Golgi-Apparat zum ER triggert induziert Zelltod in humanen Gliomzellen (U87). Quantifizierung von Zelltod nach Behandlung über 48 und 72 Stunden mit aufsteigenden Konzentrationen des ER-Stress Induktors Breveldin (1-10ng/ml) normalisiert zur unbehandelten Kontrolle. (n=1 zur Testung auf Potenz im Vergleich zu den anderen zwei regelmäßig verwendeten ER-Stress-Induktoren Tunicamycin und Thapsigargin)

7.3 Screening von ER-Stress-Modulatoren

Zur weiteren Suche nach potentiellen Substanzen in Bezug auf die Behandlung von Krebszellen, wurden Substanzen, die ER-Stress-Signalwege bekanntlich modulieren, durch ein ausgedehntes Screening auf deren Effekte auf Gliomzellen analysiert.

Die Ergebnisse des Screenings bringen sechs Substanzen hervor, die bereits in geringer Konzentration merkliche, zytotoxische Effekte in humanen Gliomzellen erzeugen: ISRIB, Salubrinal, Eeyarrestatin I, 3F8, N-Acetyl-L-cysteine und PF429242.

Salubrinal ist ein Inhibitor zellulärer Phosphatasekomplexe, die den eukaryotischen Translationinitiationfaktor 2 an der Untereinheit alfa dephosphorylieren. Die Applikation von 100 ng/ml Salubrinal über 72h führt zu erhöhten Zelltodraten in humanen Gliomzellen (Abb.17b). Eeyarrestatin I repräsentiert eine Nachfolgersubstanz, der bereits klinisch angewandten Substanz Bortezomib⁵, und fungiert als Inhibitor der „Endoplasmatischen Retikulum assoziierten Protein Degradation (ERAD)“⁶. Die Applikation von 1000ng/ml dieser Substanz über einen Zeitraum von 72 Stunden zeigt deutlich erhöhte zytotoxische Effekte in Gliomzellen (Abb.17d). 3F8, als monoklonaler Antikörper und GSK-3 β Inhibitor⁷, induziert ebenso gesteigerte Zelltodraten in humanen Gliomzellen (U87) nach Applikation von 1000 ng/ml über 72h Stunden (Abb.18c).

Ähnliche Effekte und Ergebnisse erzeugt die Behandlung der humanen Gliomzellen mit N-Acetyl-L-cystein (1000 ng/ml über 72h), welches als Antioxidants⁸ fungiert (Abb.19c).

Insbesondere der S1 Protease-Inhibitor PF429242, der überwiegend im Ast des ATF6 Signalwegs interferiert und den ATF6-Weg inhibiert⁹, führt zu signifikant hohen Zelltodraten, in Folge der Behandlung von humanen Gliomzellen (U87), murinen Gliomzellen (Gl261wt) und Primärkulturzellen (GBMs) (Abb.20 und 21).

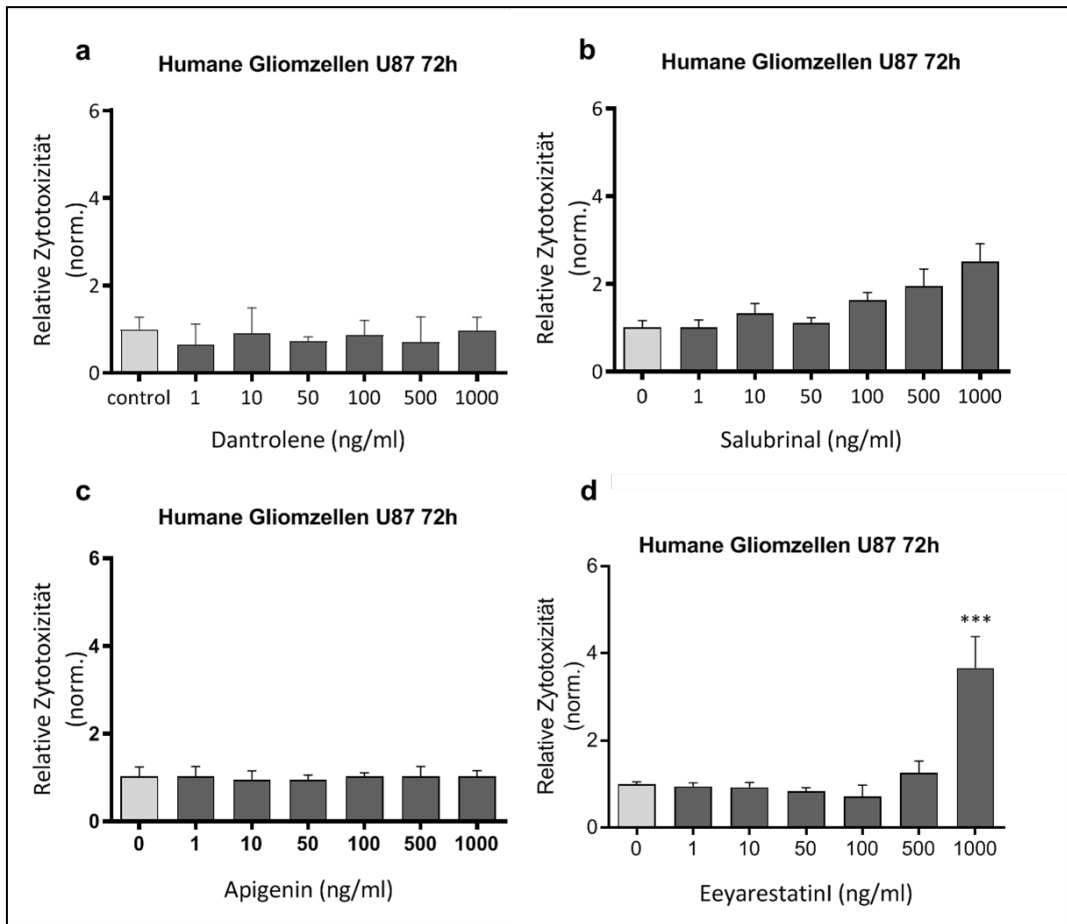


Abbildung 17 Screening von ER-Stress Modulatoren durch Behandlung von humanen Gliomzellen (U87). Quantifizierung von Zelltod nach Behandlung über 72 Stunden mit ER-Stress Modulatoren in aufsteigenden Konzentrationen (1-1000ng/ml) normalisiert zur behandelten Kontrolle. (a) Zytotoxizität nach Applikation von Dantrolene (n=2) (b) Zytotoxizität nach Applikation von Salubrinal (n=2) (c) Zytotoxizität nach Applikation von Apigenin (n=2) (d) Zytotoxizität nach Applikation von Eeyarestatin I (n=3-4). Signifikante Unterschiede verglichen mit der unbehandelten Kontrolle wurden mittels One-way ANOVA für normal verteilte Werte (Gaussche Verteilung) bestimmt. Nicht parametrische Verteilung der Werte wurden via nicht-parametrischem Test bestimmt. Signifikante Unterschiede sind per * markiert. (GP: 0,1234(ns), 0,0332 (*), 0,0021(**), 0,0002(***), <0,0001(****)). n= Anzahl an Experimenten.

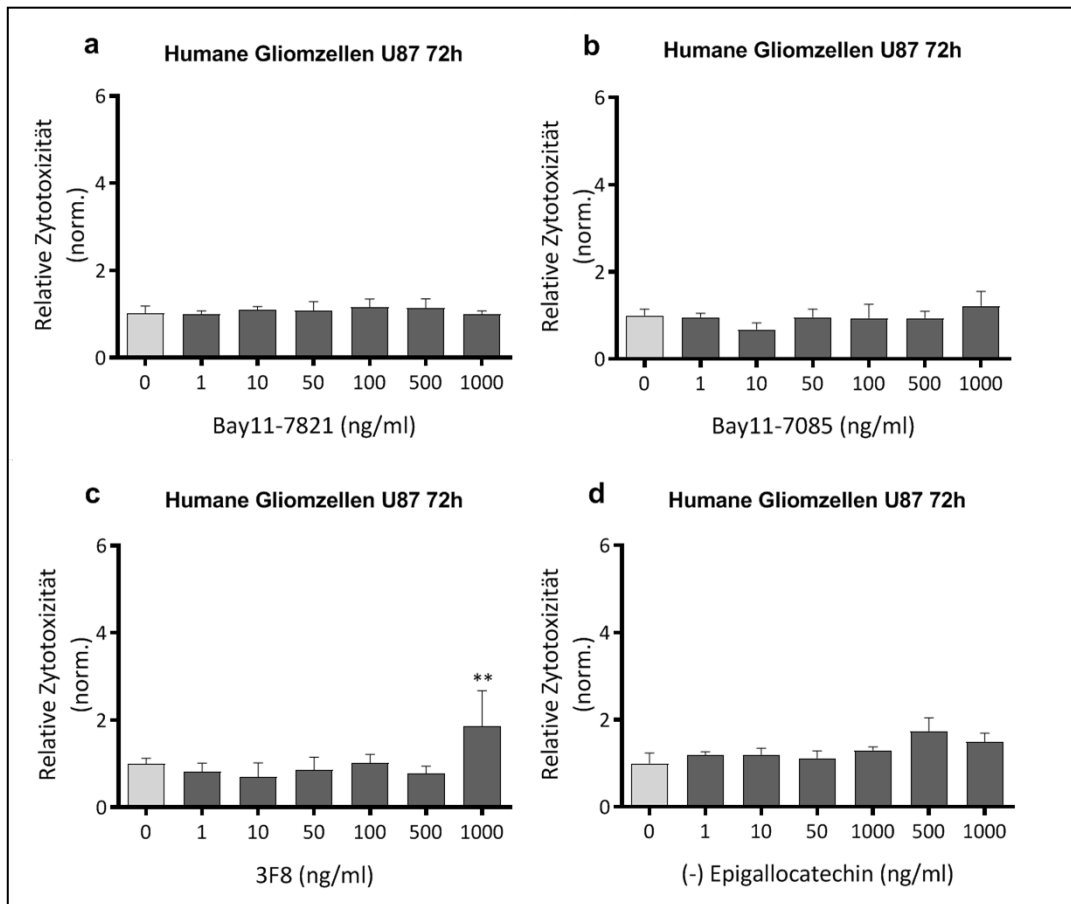


Abbildung 18 Screening von ER-Stress Modulatoren durch Behandlung von humanen Gliomzellen (U87). Quantifizierung von Zelltod nach Behandlung über 72 Stunden mit ER-Stress Modulatoren in aufsteigenden Konzentrationen (1-1000ng/ml) normalisiert auf die unbehandelte Kontrolle (a) Zytotoxizität nach Applikation von Bay11-7821 (b) Zytotoxizität nach Applikation von Bay11-7085 (c) Zytotoxizität nach Applikation von 3F8 (d) Zytotoxizität nach Applikation von Epigallocatechin. (n=1 im Rahmen eines Screenings auf den potentesten ER-Stress Modulator). n= Anzahl an Experimenten.

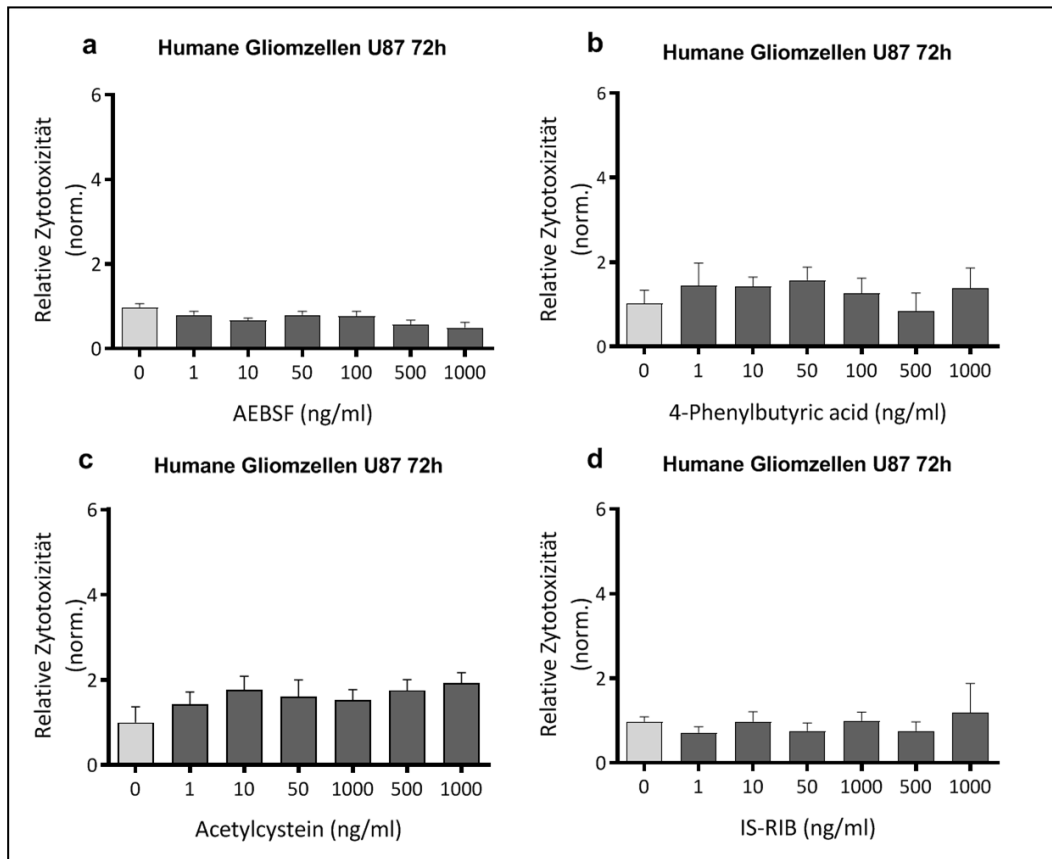


Abbildung 19 Screening von ER-Stress Modulatoren durch Behandlung von humanen Gliomzellen (U87). Quantifizierung von Zelltod nach Behandlung über 72 Stunden mit ER-Stress Modulatoren in aufsteigenden Konzentrationen (1-1000ng/ml) normalisiert auf die unbehandelte Kontrolle (a) Zytotoxizität nach Applikation von AEBSF (b) Zytotoxizität nach Applikation von 4-Phenylbutyrat (c) Zytotoxizität nach Applikation von N-Acetyl-L-cystein (d) Zytotoxizität nach Applikation von IS-RIB. (n=1 im Rahmen eines Screenings auf den potentesten ER-Stress Modulator). n= Anzahl an Experimenten.

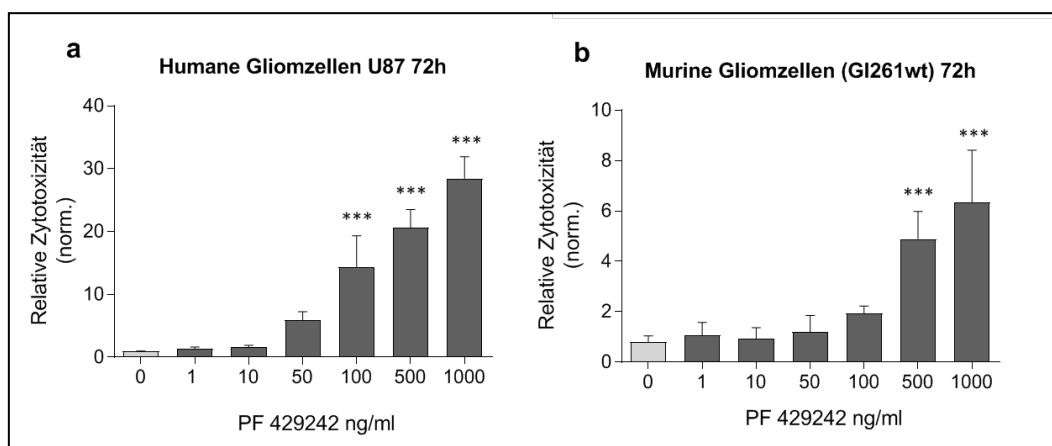


Abbildung 20 PF429242 als Site 1 Serinprotease-Inhibitor und UPR Inhibitor induziert Zelltod in humanen und murinen Gliomzellen (U87). Quantifizierung von Zelltod nach Behandlung mit PF429242 über 72 Stunden in aufsteigenden Konzentrationen (1-1000ng/ml) normalisiert auf die unbehandelte Kontrolle a) U87 (human) für 72h (b) GI261wt (mouse) für 72h. (n=3). Signifikante Unterschiede verglichen mit der unbehandelten Kontrolle wurden mittels One-way ANOVA für normal verteilte Werte (Gaussche Verteilung) bestimmt. Nicht parametrische Verteilung der Werte wurden via nicht-parametrischem Test bestimmt. Signifikante Unterschiede sind per * markiert. (GP: 0,1234(ns), 0,0332 (*), 0,0021(**), 0,0002(***), <0,0001(****)). n= Anzahl an Experimenten.

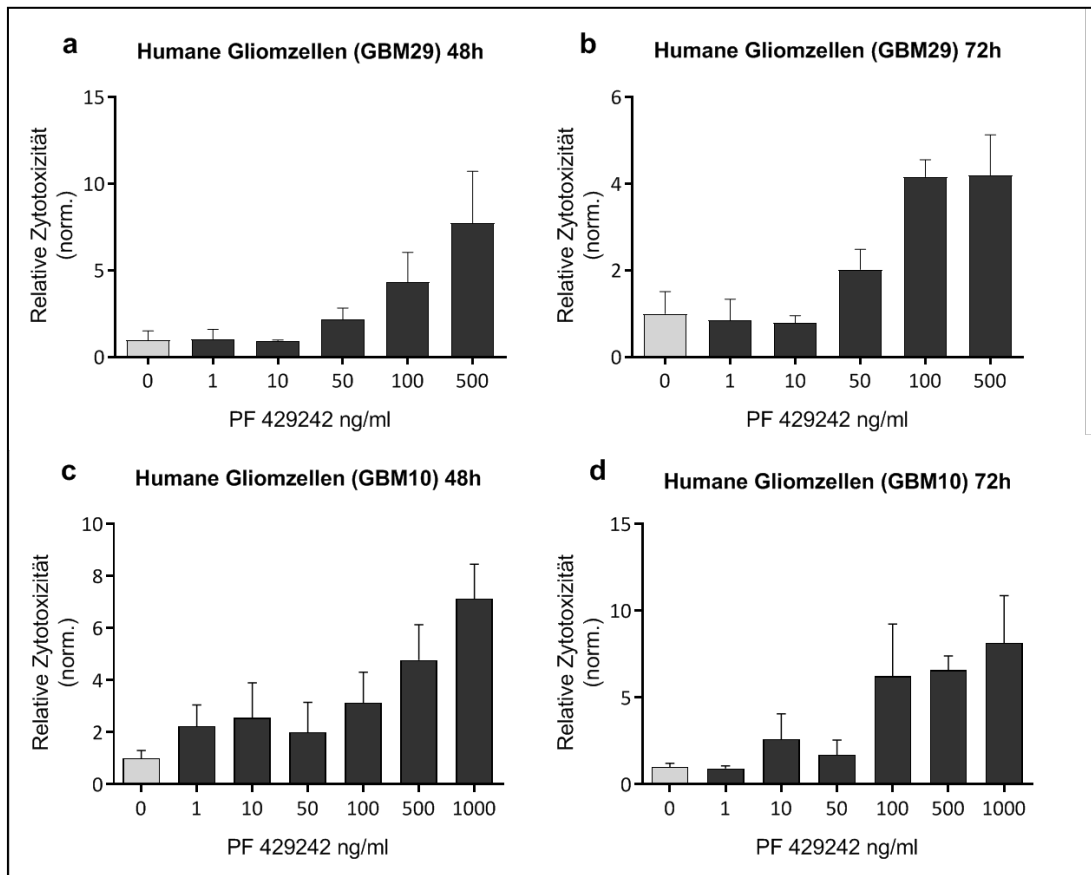


Abbildung 21 Screening von PF429242 als „Site 1 Serinprotease-Inhibitor“ auf Primärkulturzellen aus Patientenmaterial (GBM) ist assoziiert mit hohen Zelltodraten der Gliomzellen. Quantifizierung von Zelltod nach Behandlung über 72 Stunden mit aufsteigenden Konzentrationen PF429242 (1-1000 ng/ml) normalisiert auf die unbehandelte Kontrolle. (a+b) GBM29(human) für 48h and 72h (c+d) GBM10(human) für 48h and 72h. (n=2)

7.4 Sensitivität von Gliomzellen auf eine Kombinationstherapie aus ER-Stress Induktoren

Im nächsten Experiment wurden Konzentrationen unterschiedlicher ER-Stress Induktoren kombiniert und auf additive oder synergistische Effekte, in Hinblick auf eine kombinierte, gegen Krebszellen gerichtete Pharmakotherapie, untersucht. Hierbei wurde für Thapsigargin eine Konzentration von 1 ng/ml verwendet, die bei alleiniger Applikation keine messbaren zytotoxischen Effekte aufweist. Thapsigargin wurde dann mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von Brefeldin A (1-10 ng/ml) kombiniert. Im Diagramm aufgeführt ist die gemessene Zytotoxizität der Gliomzellen nach Kombinationstherapie, verglichen mit der jeweiligen Einzeltherapie und der unbehandelten Kontrolle. Die Messung zeigt hierbei eine deutlich höhere Zytotoxizität in den humanen Gliomzellen nach Behandlung mit der Kombination aus den ER-Stress-Induktoren Brefeldin A und Thapsigargin im Vergleich zu den Einzelapplikationen und der unbehandelten Kontrolle (Abb. 22a+b). Hierbei liegt das besondere Augenmerk darauf, dass 1 ng/ml Thapsigargin und 10 ng/ml Brefeldin A in Kombination mehr Effekt haben, als die reine Addition derer beiden Einzelwerte erwarten ließe und diese somit synergistisch wirken. Mikroskopisch waren alle Zellen tot, was einen zu toxischen Effekt der Kombination aus beiden Substanzen inmpliziert.

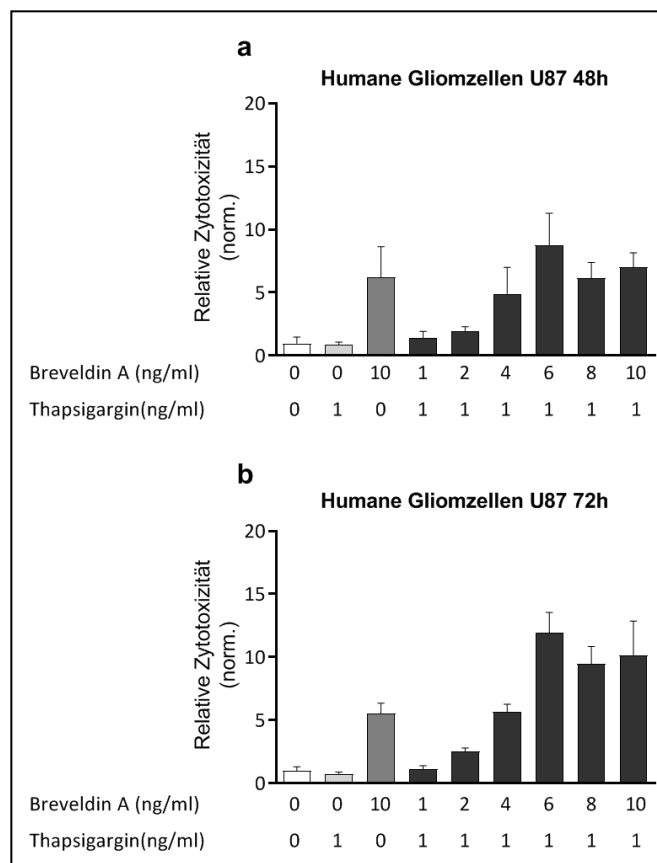


Abbildung 22 Die Kombination aus ER-Stress-Induktoren verstärkt den zytotoxischen Effekt auf humanen Gliomzellen (U87). Quantifizierung von Zelltod nach Behandlung mit den ER-Stress Induktoren Brefeldin A and Thapsigargin im Vergleich zur Einzeltherapie (a) für 48h und (b) für 72h. (n=1, da in Kombination zu toxisch, keine Zellen überlebend)

7.5 Sensitivität von Gliomzellen auf eine Kombinationstherapie aus ER-Stress Induktor und Modulator

Um herauszufinden ob additive und synergistische Effekte auch bei der Kombination von ER-Stress Induktoren und Modulatoren vorhanden sind, wurden weitere Experimente vorgenommen. Hierfür wurden Schwellenwerte der jeweiligen Kombinationspartner evaluiert, bei deren Einzelapplikation kaum zytotoxische Effekte zu verzeichnen sind und diese dann kombiniert. Folglich wurde Thapsigargin mit den Konzentrationen 1 und 10 ng/ml jeweils mit 500 und 1000 ng/ml verschiedener Modulatoren kombiniert und diese Kombination gegenüber den jeweiligen Einzeltherapien im Diagramm aufgeführt.

Als erstes aufgeführt ist die Kombination von N-Acetyl-L-cystein als ER-Stress Modulator (M) und Thapsigargin als Induktor (I). Die Kombination zeigt additive zytotoxische Effekte in Gliomzellen (Abb.23a).

Als zweites aufgeführt ist die Kombination von IS-RIB (M) und Thapsigargin (I), welche eine signifikant erhöhte Zelltodrate in Gliomzellen verglichen zur Einzeltherapie und zur unbehandelten Kontrolle aufweist (Abb.23b).

Die Abbildung 24 zeigt die identische experimentelle Prozedur und die gleichen potenzierenden Effekte nach Verabreichung der Kombination aus 3F8 (M) und Thapsigargin (I) (Abb.24a) sowie der Kombination aus Apigenin (M) und Thapsigargin (I) (Abb.24b).

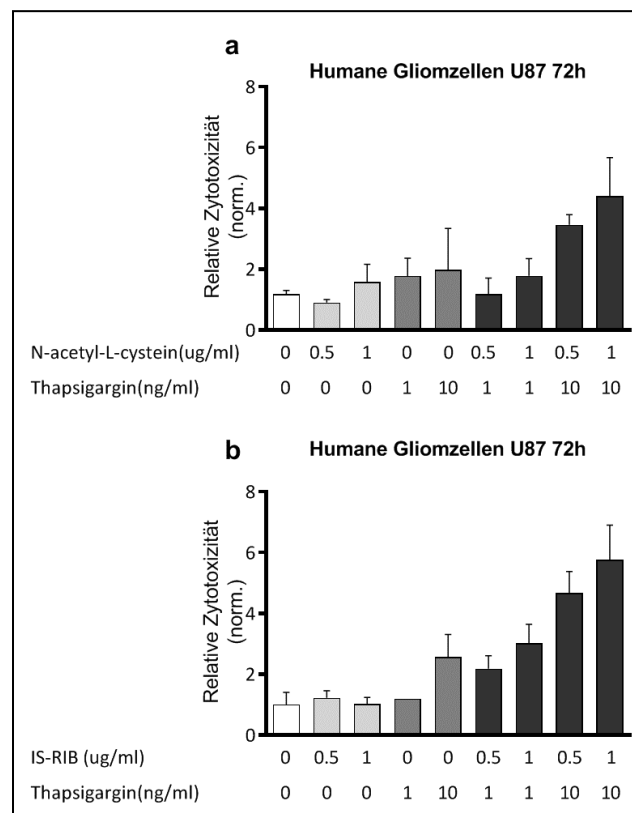


Abbildung 23 Die Kombinationstherapie aus ER-Stress Induktor und Modulator verstärkt den antitumorigenen Effekt auf humane Gliomzellen (U87). Quantifizierung von Zelltod nach Behandlung mit den ER-Stress Induktor(I) und Modulator(M) im Vergleich zur Einzeltherapie für 72h normalisiert auf die unbehandelte Kontrolle (a) N-Acetyl-L-cystein+Thapsigargin (b) IS-RIB+Thapsigargin. (n=1, Testung auf additive/synergistische antitumorigene Kombination) n= Anzahl an Experimenten.

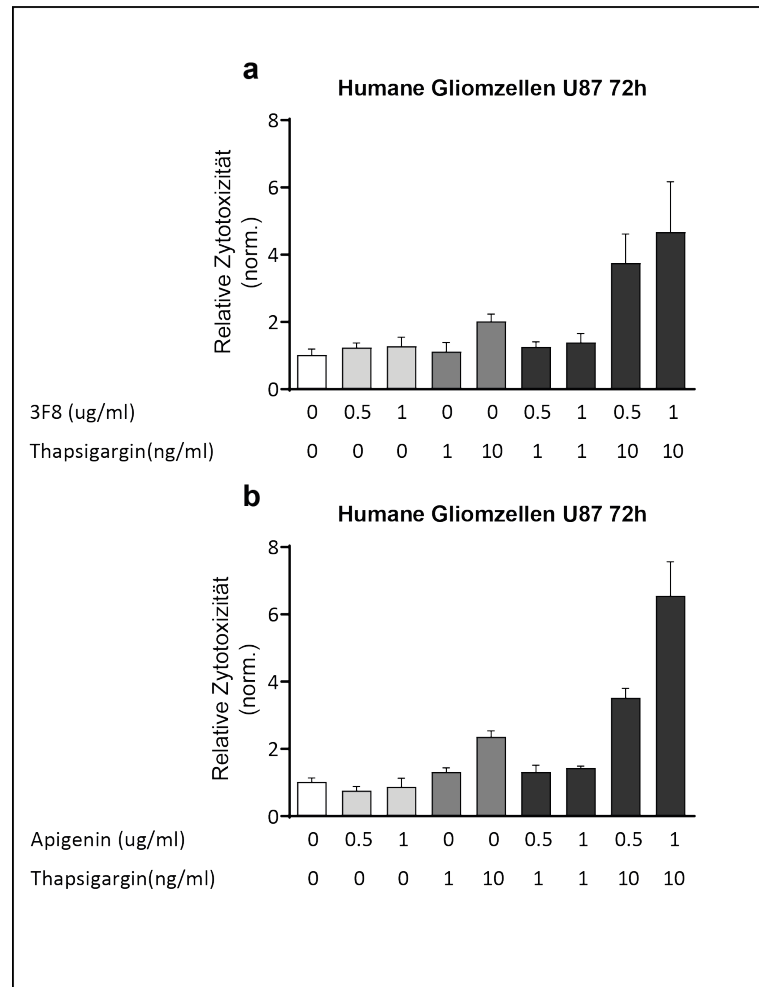


Abbildung 24 Die Kombinationstherapie aus ER-Stress Induktor und Modulator verstärkt den antitumorigenen Effekt auf humane Gliomzellen (U87). Quantifizierung von Zelltod nach Behandlung mit den ER-Stress Induktor(I) und Modulator(M) im Vergleich zur Einzeltherapie für 72h normalisiert auf die unbehandelte Kontrolle. (a) 3F8+Thapsigargin (n=2) und (b) Apigenin+Thapsigargin (n=2) n= Anzahl an Experimenten.

Im Vergleich dazu zeigen die Kombinationen von Bay11-7085 und Bay11-7821 jeweils mit Thapsigargin (Abb.25) sowie Epigallocatechin mit Thapsigargin nur in höheren Konzentrationen zytotoxische Effekte der Gliomzellen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb.26).

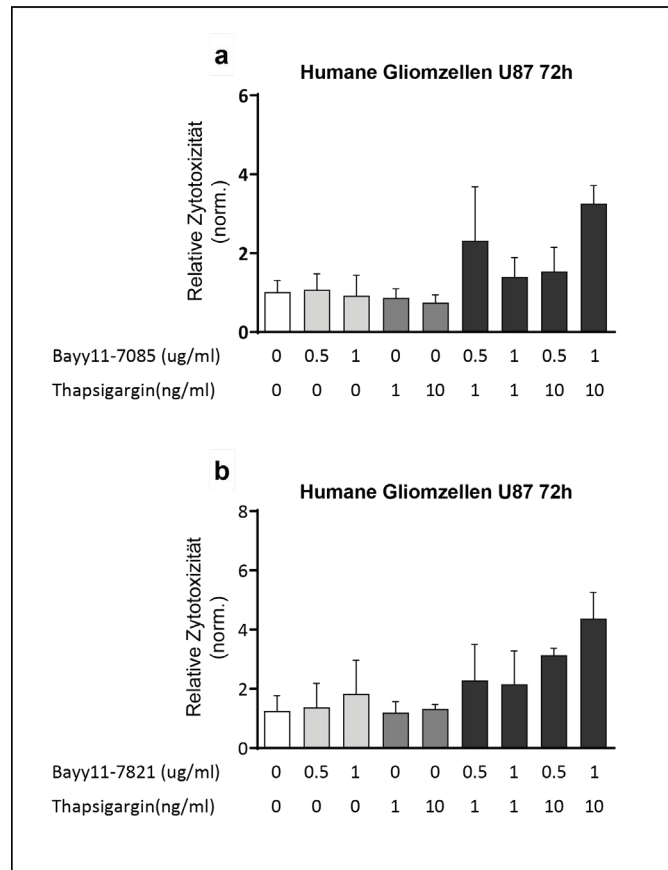


Abbildung 25 Die Kombinationstherapie aus ER-Stress Induktor und Modulator verstärkt den antitumorigenen Effekt auf humane Gliomzellen (U87). Quantifizierung von Zelltod nach Behandlung mit dem ER-Stress Induktor(I) Thapsigargin und den Modulatoren(M) Bay11-7085 und Bay11-7821 im Vergleich zur Einzeltherapie für 72h. (a) Bay11-7085+Thapsigargin (b) Bay11-7821+Thapsigargin (n=1, Testung auf additive/synergistische antitumorogene Kombination)

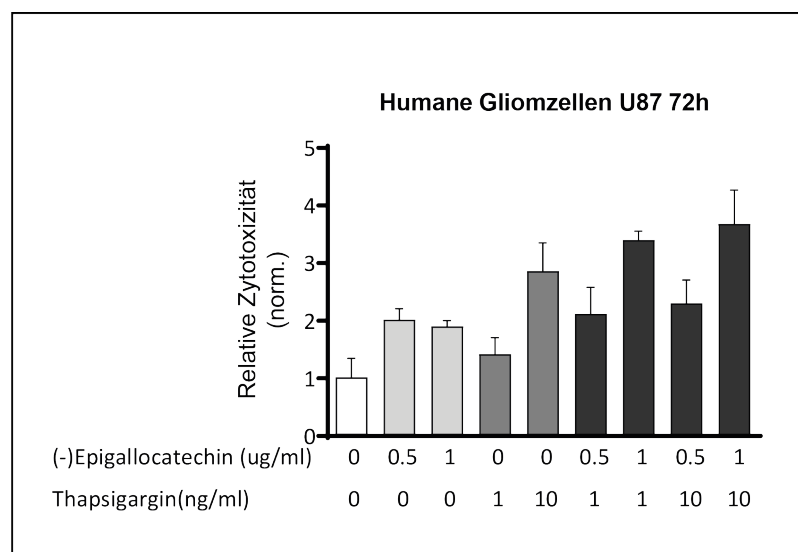


Abbildung 26 Die Kombinationstherapie aus ER-Stress Induktor und Modulator verstärkt den antitumorigenen Effekt auf humane Gliomzellen (U87). Quantifizierung von Zelltod nach Behandlung mit dem ER-Stress Induktor(I) Thapsigargin und den Modulator(M) (-)Epigallocatechin im Vergleich zur Einzeltherapie für 72h normalisiert auf die unbehandelte Kontrolle. (-)Epigallocatechin+Thapsigargin. (n=1, Testung auf additive/synergistische antitumorogene Kombination)

Die Kombination von Salubrinal und Thapsigargin (Abb.27a) sowie speziell die Kombination von Eeyarestatin I und Thapsigargin (Abb.27b) zeigen hingegen einen hohen zytotoxischen Effekt und die höchste Zelltodrate im Vergleich zur Einzelbehandlung und der unbehandelten Kontrolle.

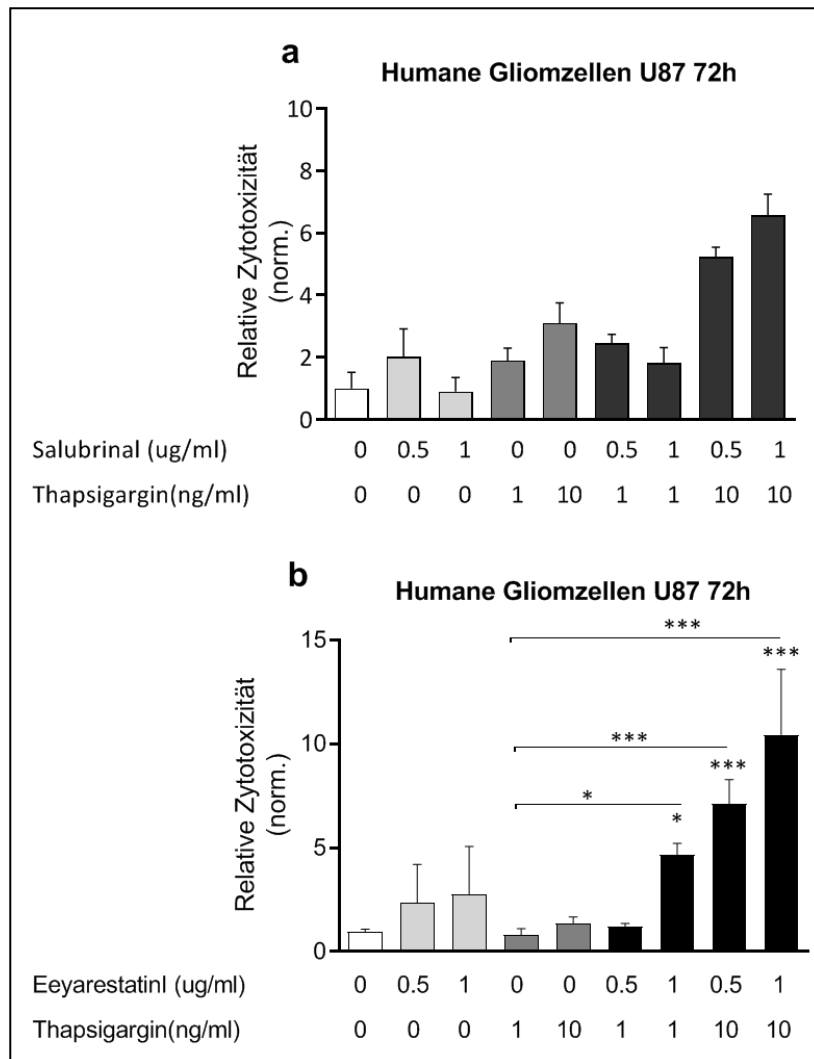


Abbildung 27 Die Kombinationstherapie aus ER-Stress Induktor und Modulator verstärkt den antitumorigenen Effekt auf humane Gliomzellen (U87). Quantifizierung von Zelltod nach Behandlung mit dem ER-Stress Induktor(I) Thapsigargin und den Modulatoren(M) Salubrinal und EeyarestatinI im Vergleich zur Einzeltherapie für 72h normalisiert auf die unbehandelte Kontrolle (a) Salubrinal+Thapsigargin (n=1, Testung auf additive/synergistische antitumorigene Effekte) (b) EeyarestatinI+Thapsigargin. (n=3) Signifikante Unterschiede verglichen mit der unbehandelten Kontrolle wurden mittels One-way ANOVA für normal verteilte Werte (Gaussche Verteilung) bestimmt. Nicht parametrische Verteilung der Werte wurden via nicht-parametrischem Test bestimmt. Signifikante Unterschiede zur sind per * markiert. (GP: 0,1234(ns), 0,0332 (*), 0,0021(**), 0,0002(***), <0,0001(***)). n= Anzahl an Experimenten.

Im weiteren wurde die Kombination aus Eeyarestatin I und ER-Stress Induktor Thapsigargin auf für eine murine GBM Zelllinie getestet. Die Resultate zeigen vielversprechende synergistische Effekte der beschriebenen Konstellation (Abb.28).

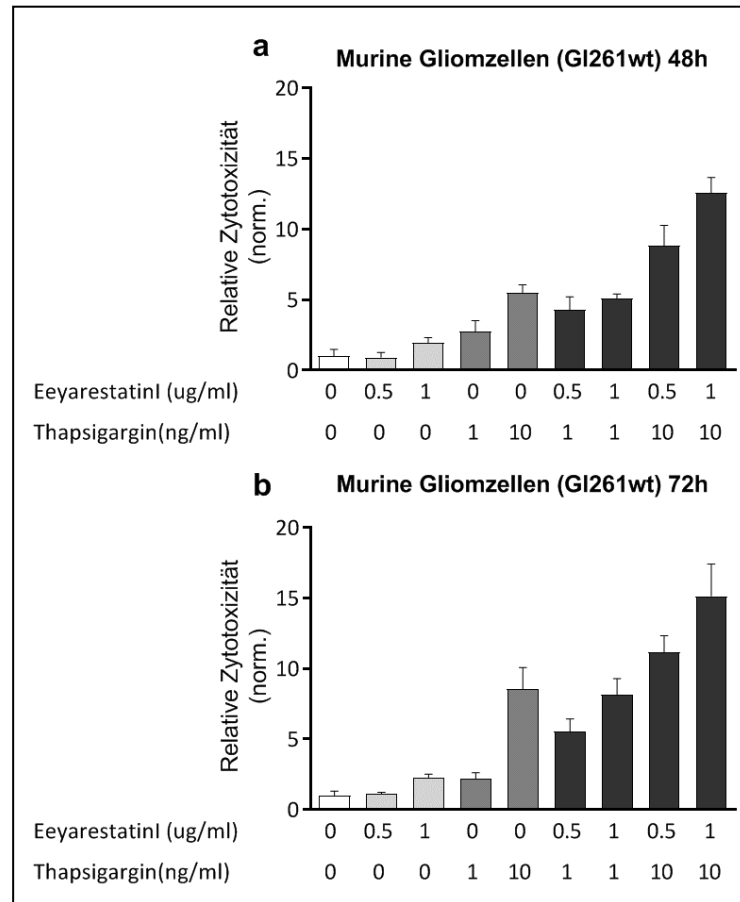


Abbildung 28 Die Kombinationstherapie aus ER-Stress Induktor Thapsigargin und Modulator Eeyarestatin I, als Inhibitor der Proteindegradation verstärkt den antitumorigenen Effekt auf murinen Gliomzellen (GI261wt). Quantifizierung von Zelltod nach Behandlung mit dem ER-Stress Induktor(I) Thapsigargin und den Modulatoren(M) EeyarestatinI im Vergleich zur Einzeltherapie (a) für 48h (b) für 72h. n=2. n= Anzahl an separaten Experimenten.

7.6 Sensitivität von Gliomzellen auf eine Kombinationstherapie aus einem ER-Stress Induktor und dem TRPV1-Rezeptor-Agonisten CBD

Im Hinblick auf die klinische Anwendung wurde die Kombination aus einem ER-Stress Induktor und einer an Patienten zu verabreichenden Substanz untersucht. Auf Grund der Vorarbeiten meiner Arbeitsgruppe hat sich hierfür das Cannabidiol CBD angeboten, welches ebenfalls ER-Stress über den sogenannten TRPV1 Rezeptor in Gliomzellen auslöst. Folglich wurde als nächster Schritt der ER-Stress Induktor Thapsigargin in den geringsten, kaum wirksamen Schwellenwertkonzentrationen (1 and 10ng/ml) mit einer spärlich effektiven Dosis des Cannabidiols CBD kombiniert. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 29 zusammengefasst und veranschaulichen eine höhere Zytotoxizität im Rahmen der Kombinationstherapie im Vergleich zu keiner Zytotoxizität nach jeweiliger Einzelbehandlung und in der unbehandelten Kontrolle. Demzufolge, zeigt die Kombinationstherapie dabei ein höheres Zytotoxizitätslevel als die reine Addition der jeweiligen Einzelbehandlungen erwarten lassen würde und wirkt somit synergistisch.

Jedoch zeigt die Kombination des ER-Stress Induktor Brefeldin A in aufsteigender Konzentrationsreihe mit 5uMol konzentriertem CBD keine deutlichen additiven Effekte (Abb.30).

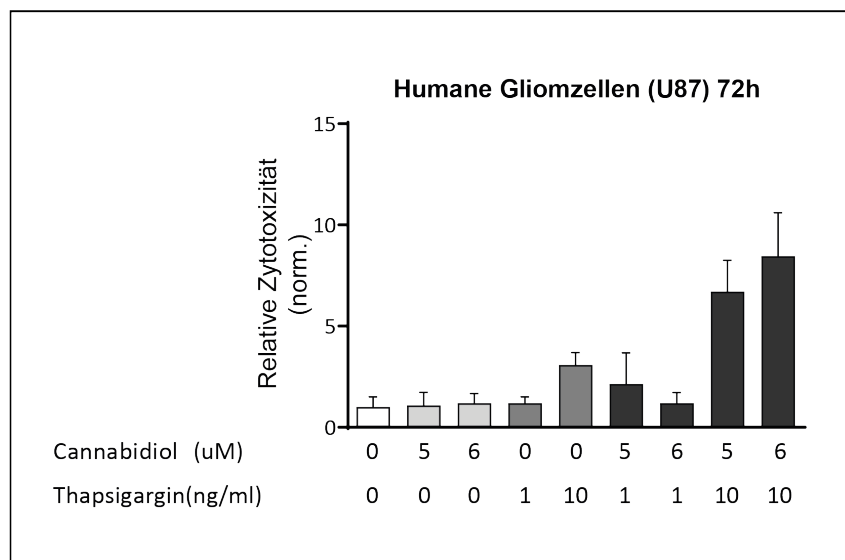


Abbildung 29 Die Kombinationstherapie aus ER-Stress Induktor und dem Cannabidiol CBD verstärkt den antitumorigenen Effekt auf humanen Gliomzellen (U87). Quantifizierung von Zelltod nach Behandlung mit dem ER-Stress Induktor(I) Thapsigargin und the Cannabidiol CBD im Vergleich zur Einzeltherapie für 72h. (n=1, Testung auf additive/synergistische antitumorigene Kombination).

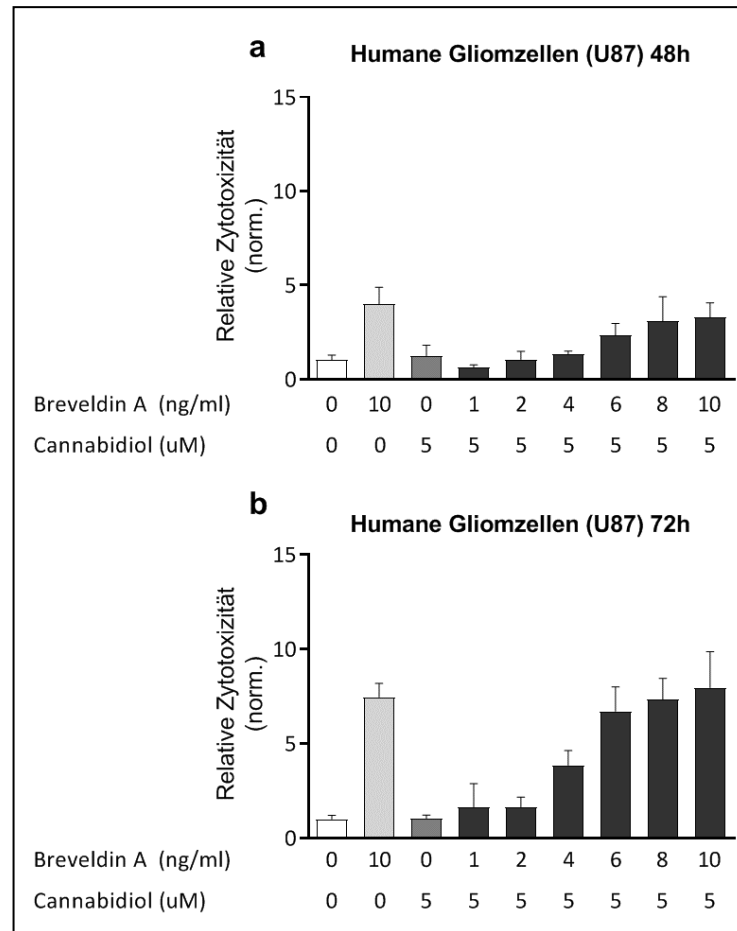


Abbildung 30 Die Kombinationstherapie aus ER-Stress Induktor BreveldinA und dem Cannabidiol CBD verstärkt nicht den antitumorigenen Effekt auf humane Gliomzellen (U87). Quantifizierung von Zelltod nach Behandlung mit dem ER-Stress Induktor(I) Thapsigargin und the Cannabidiol CBD im Vergleich zur Einzeltherapie normalisiert auf die unbehandelte Kontrolle. (a) für 48h (b) 72h. (n=1, Testung auf additive/synergistische antitumorigene Kombination)

7.7 Sensitivität von Gliomzellen auf eine Kombinationstherapie aus einem ER-Stress Modulator und dem TRPV1-Rezeptor-Agonisten CBD

Nach der Kombination von ER-Stress Induktoren und dem Cannabidiol wurde die Kombination eines Modulators mit dem Cannabidiol CBD vorgenommen. Hierfür wurde der ER-Stress Modulator in einer Dosis von 1000ng/ml mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe des Cannabinoids CBD kombiniert. Im Diagramm aufgeführt ist die Kombination der Modulatoren Salubrial (Abb. 31a), IS-RIB (Abb. 31b) und EeyarestatinI (Abb. 31c) jeweils kombiniert mit CBD. Die Kombinationstherapie zeigt in jedem der beschriebenen Konstellationen deutlich höhere Zytotoxizitätslevel im Vergleich zur Einzeltherapie und unbehandelten Kontrolle.

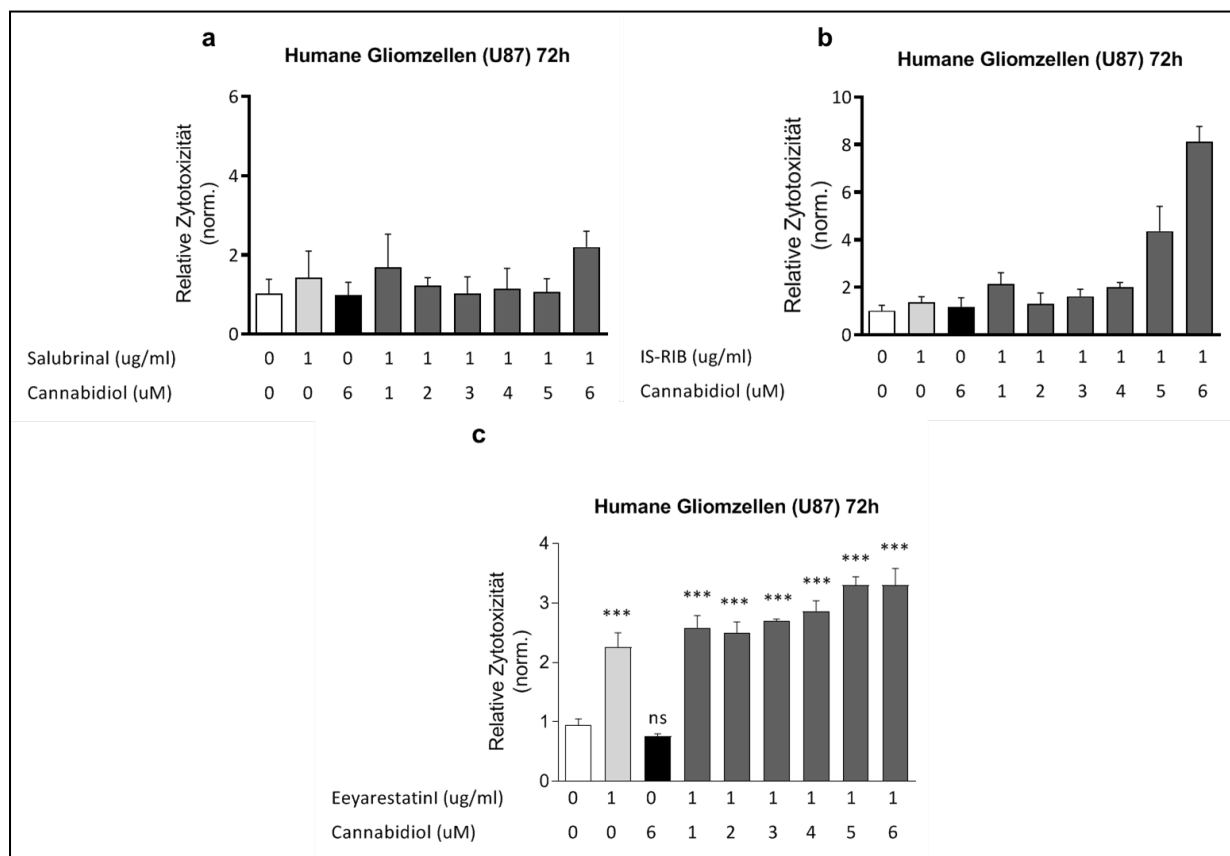


Abbildung 31 Kombinationstherapie aus ER-Stress Modulatoren und CBD gegen humane Gliomzellen (U87). Quantifizierung von Zelltod nach Behandlung mit dem ER-Stress Modulatoren kombiniert mit dem Cannabidiol CBD im Vergleich zur Einzeltherapie a) Salubrial+CBD für 72h (b) IS-RIB+CBD für 72h (c) EeyarestatinI+CBD für 72h. Signifikante Unterschiede verglichen mit der unbehandelten Kontrolle wurden mittels One-way ANOVA für normal verteilte Werte (Gaussche Verteilung) bestimmt. Nicht parametrische Verteilung der Werte wurden via nicht-parametrischem Test bestimmt. Signifikante Unterschiede sind per * markiert. (GP: 0,1234(ns), 0,0332 (*), 0,0021(**), 0,0002(***), <0,0001(***)).

7.8 Sensitivität von Gliomzellen aus Patientenmaterial auf eine Kombinationstherapie aus dem ER-Stress Modulator Eeyarestatin I und dem TRPV1-Rezeptor-Agonisten CBD

In den folgenden Experimenten wurde der Fokus auf die vielversprechendste Kombinationstherapie gelegt. Hierfür wurden die Gliomzellen mit der Kombination aus Eeyarestatin I und CBD und der jeweiligen Einzelbehandlungen gegenübergestellt. Eeyarestatin I wurde in aufsteigender Konzentrationsreihe jeweils mit CBD (5 μ Mol) kombiniert und dabei wurden CBD Konzentrationen verwendet, die bei alleiniger Applikation kaum bis keine zytotoxischen Effekte zeigen.

Die behandelten Zelllinien GBM29, GBM29a, GBM10 und GBM20 repräsentieren Primärkulturzellen die aus Patienten mit diagnostiziertem Glioblastom isoliert wurden. Die behandelte Zelllinie NCH588j repräsentiert hingegen eine Primärkulturzelllinie die aus einem Patienten mit Tumorezidiv isoliert wurde und dementsprechend handelt es sich um Zellen aus einem rekurrentem Glioblastom.

Die Resultate reproduzieren die vorherigen Daten und zeigen ein signifikant höheres Ansprechen der Primärkulturzellen auf die Kombinationstherapie im Vergleich zu den jeweiligen Einzeltherapien und zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 32).

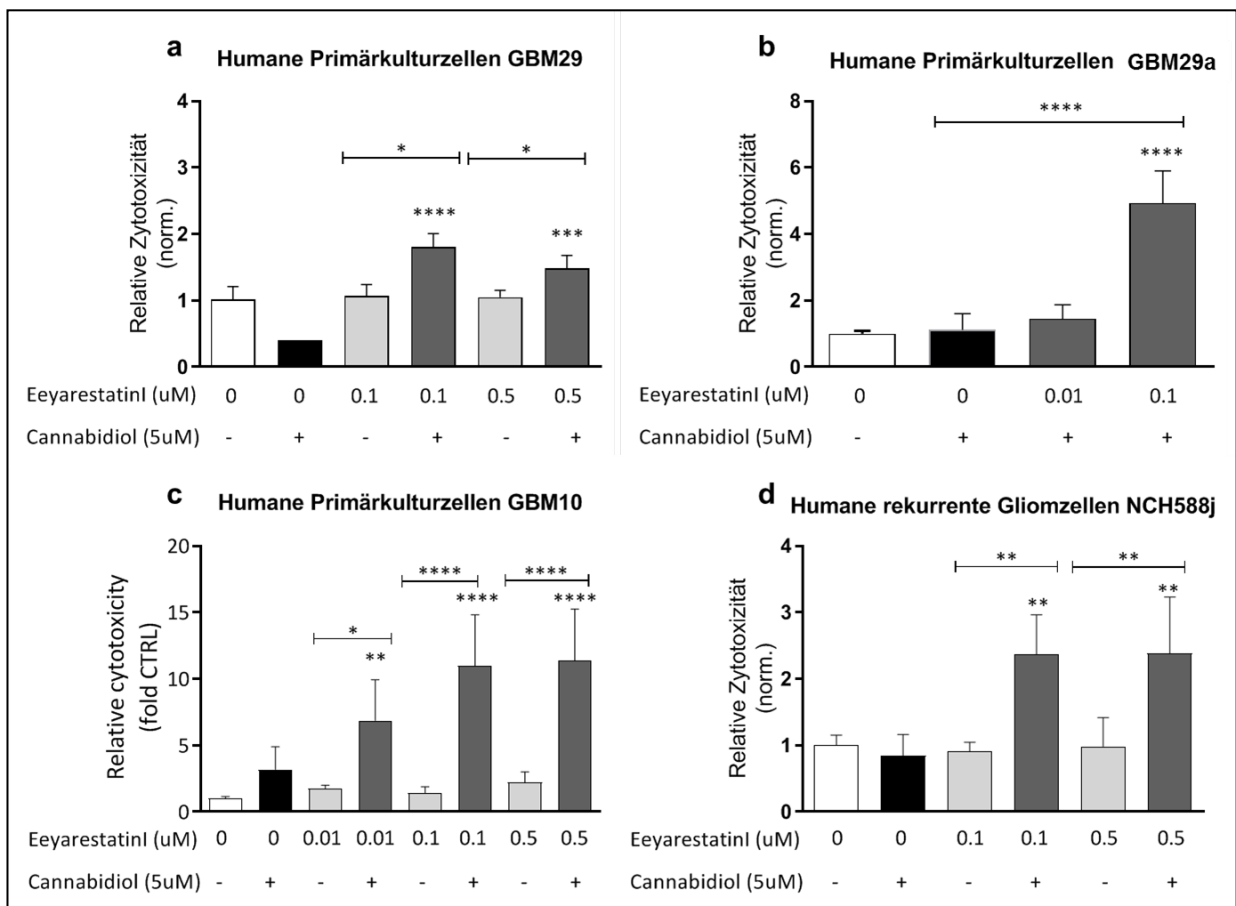


Abbildung 32 Die Kombinationstherapie mit Eeyarestatin I, als Inhibitor der Proteindegradation und dem Cannabinoid CBD verstärkt den antitumorigenen Effekt gegen Gliomzellen. Quantifizierung von Zelltod nach Behandlung mit Eeyarestatin I und dem Cannabidiol CBD im Vergleich zur Einzeltherapie nach 24h. (a) GBM 29 für 24h (n=2) (b) GBM 29a für 18h (n=2) (c) GBM 10 für 24h (n=2) (d) Rezidivtumorzellen NCH588j für 24h (n=2) Signifikante Unterschiede verglichen mit der unbehandelten Kontrolle wurden mittels One-way ANOVA Tukey-Test für normal verteilte Werte (Gaussche Verteilung) bestimmt. Nicht-parametrische Verteilung der Werte wurden via nicht-parametrischem Test bestimmt. Signifikante Unterschiede sind per * markiert. (GP: 0,1234(ns), 0,0332 (*), 0,0021(**), 0,0002(***)). n= Anzahl an Experimenten.

7.9 Sensitivität von genetisch veränderten Gliomzellen auf eine Kombinationstherapie aus dem ER-Stress Modulator Eeyarestatin I und dem TRPV1-Rezeptor-Agonisten CBD

Im Folgenden wurden für das GBM typisch veränderte Gliomzelllinien generiert und auf das Ansprechen auf die potenteste Kombinationstherapie aus Eeyarestatin I und CBD getestet. Abbildung 33 repräsentiert die Mutante mit einem „knockout“ für *cdkn2alpha* und einer Überexpression für EGFRvIII und zeigt eine zytotoxische Reaktion als Antwort auf die Einzeltherapie mit Eeyarestatin I, allerdings mit noch deutlicherer zytotoxischer Antwort bei Behandlung mit der Kombinationstherapie aus Eeyarestatin I und CBD. Genetisch veränderte Zellen mit p53 knockout zeigen ebenfalls ein signifikant höheres Ansprechen auf die Kombinationstherapie (Abb. 33b). Insbesondere Gliomzellen mit einer typischen Mutation in p53 (p53 Mutante R175H) als strukturelle Mutante, welche viral mit PDGFB transduziert wurden, zeigten die deutlichsten letalen Effekte (Abb. 33d). Allerdings zeigen sich die Zellen mit einem kompletten „knock out“ für p53, die zusätzlich viral mit PDGFB transduziert wurden, und somit PDGFB überexprimieren, die höchste Resistenz gegenüber der Behandlung (Abb. 33c).

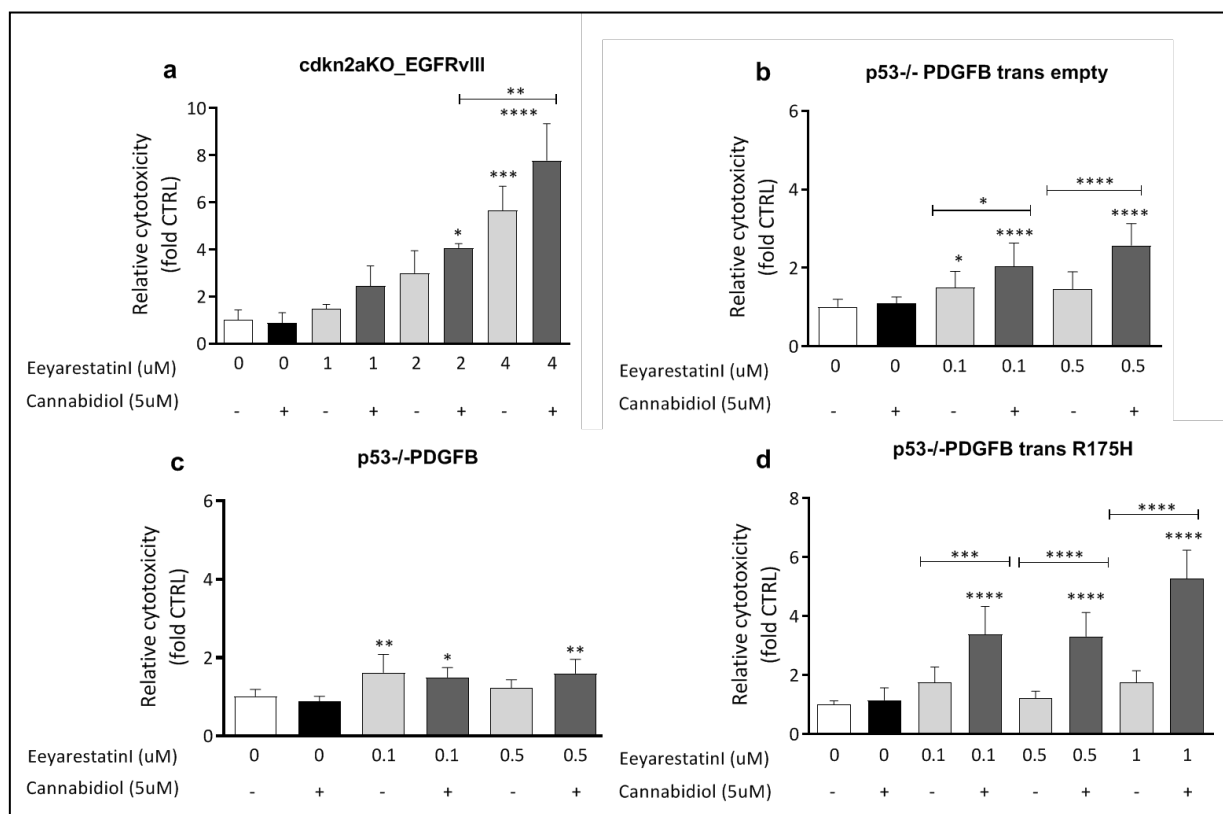


Abbildung 33 Die Kombinationstherapie mit Eeyarestatin I, als Inhibitor der Proteindegradation, und dem Cannabinoid CBD verstärkt den antitumorigenen Effekt gegen spezifisch genetisch veränderte Gliomzellen. Quantifizierung von Zelltod nach Behandlung mit Eeyarestatin I und dem Cannabinoid CBD im Vergleich zur Einzeltherapie nach 24h. Dargestellt sind die Resultate von spezifisch genetisch veränderten Gliomzellen mit (a) KO für *cdkn2α* und Transfektion mit EGFRvIII (n=2). (b) KO für p53 und viraler Transduktion mit leerem PDGFB Vektor (n=3) (c) KO für p53 und Transfektion mit PDGFB Vektor (n=3). (d) KO für p53 und viral transduziert mit PDGFB und Transfektion mit der p53 Mutante R175H (n=3). Signifikante Unterschiede verglichen mit der unbehandelten Kontrolle wurden mittels One-way ANOVA für normal verteilte Werte (Gaussche Verteilung) bestimmt. Nicht-parametrische Verteilung der Werte wurden via nicht-parametrischem Test bestimmt. Signifikante Unterschiede sind per * markiert. (GP: 0,1234(ns), 0,0332 (*)) n= Anzahl an Experimenten.

7.10 Genetische Untersuchungen der Gliomzellen zur Rekapitulation der Spezifität der Pharmakotherapie auf ER-Stress

Um zu verifizieren, dass die eruierte Pharmakotherapie zu einer Hochregulation der proapoptischen Komponenten ATF3 und ATF4 führt, wurden Reporter Gene Assays, mit transient transfizierten Gliomzellen, durchgeführt. Die Gliomzelllinie U87 wurde hierfür mit Plasmiden die ATF3 und ATF4 als Promotoren enthalten transfiziert und danach mit der beschriebenen Pharmakotherapie behandelt. Anschließend wurde die Genaktivität gemessen. Die messbare Lumineszenz entspricht hierbei der Promotoraktivität in den Zellen und wurde in Relation zur Positiv- und Negativkontrolle ausgewertet und im Diagramm zusammengefasst (Abb. 34). Das Resultat der Messungen zeigt, dass Thapsigargin im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu einer signifikanten Hochregulation der Komponente ATF3 und ATF4 führt. Eeyarestatin I zeigt ebenfalls eine Hochregulation der Komponenten ATF3 und ATF4. Das Cannabinoid CBD zeigt überwiegend eine Hochregulation der Komponente ATF3. Und die Kombinationstherapie aus EeyarestatinI und CBD zeigt eine Hochregulation der Komponenten ATF3 und ATF4 (Abb.34).

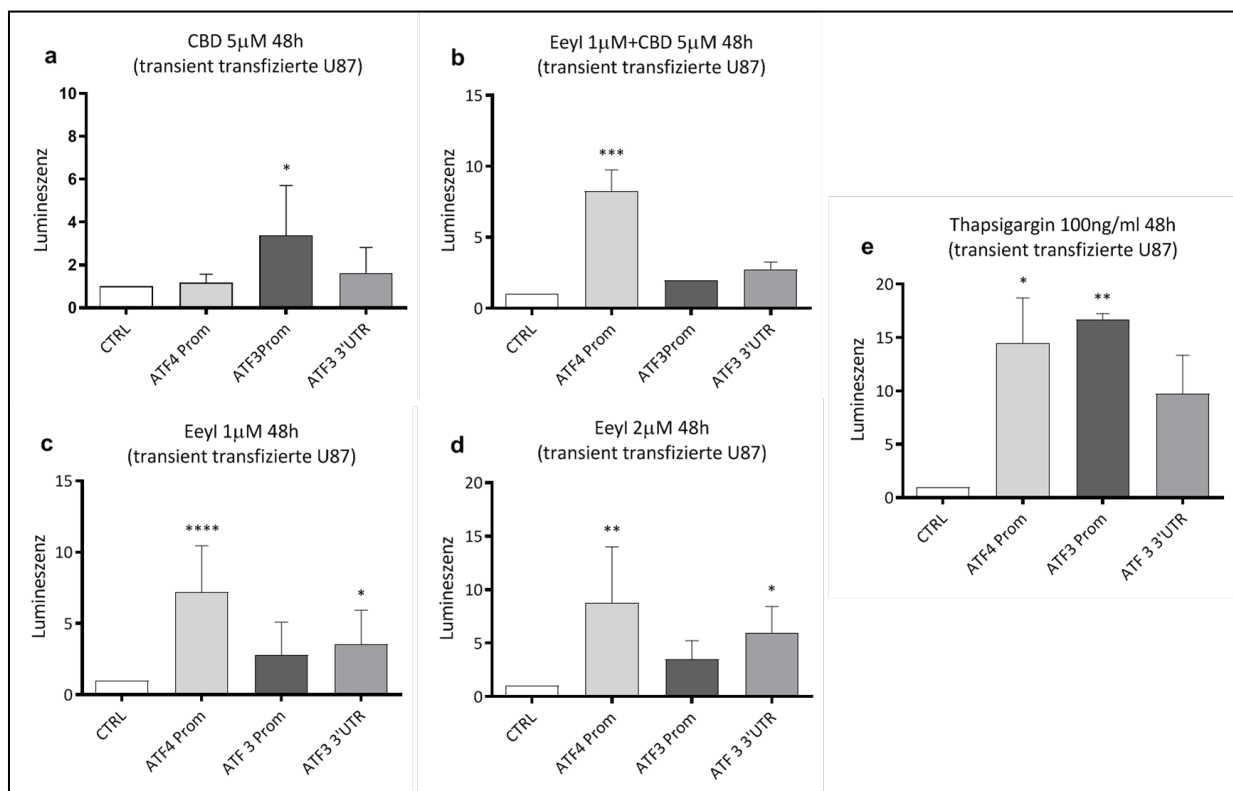


Abbildung 34 Genetische Manipulationen von humanen Gliomzellen (U87) rekapitulieren das regulatorische Potenzial der pro-apoptischen (ATF3+4) Komponenten infolge einer Pharmakotherapie mit Eeyarestatin I und CBD. Qualitatives Genexpressionsmuster nach Behandlung mit geringen Konzentrationen von (a) Cannabinoid CBD (b) Kombination aus EeyI+CBD (c) Eeyarestatin I 1uM (d) Eeyarestatin I 2uM (e) Thapsigargin (positive Kontrolle) (n=2). Signifikante Unterschiede verglichen mit der unbehandelten Kontrolle wurden mittels One-way ANOVA für normal verteilte Werte (Gaussche Verteilung) bestimmt. Nicht parametrische Verteilung der Werte wurden via nicht-parametrischem Test bestimmt. Signifikante Unterschiede sind per * markiert. (GP: 0,1234(ns), 0,0332 (*), 0,0021(**), 0,0002(***), <0,0001(***)). n= Anzahl an Experimenten.

7.11 Immunzytochemische Untersuchungen von Gliomzellen zur Rekapitulation der Spezifität der Pharmakotherapie auf ER-Stress

Zur Phänotypisierung der proapoptischen Komponente ATF3 wurden Immunzytochemische Färbungen an Gliomzellen durchgeführt, die mit Thapsigargin, Eeyarestatin I, CBD sowie der Kombination aus Eeyarestatin I und CBD behandelt wurden. Eine repräsentative Auswahl zeigt, dass die Behandlung mit Thapsigargin, Eeyarestatin I und Eeyarestatin I kombiniert mit CBD, zu einer nukleären Lokalisation von ATF3 führt. Dies suggeriert eine verstärkte Transkription von ATF3 und impliziert ER-Stress. Die Gliomzellen nach Behandlung mit CBD, in geringen Konzentrationen, und die unbehandelten Zellen zeigen diesen Effekt nicht (Abb.35).

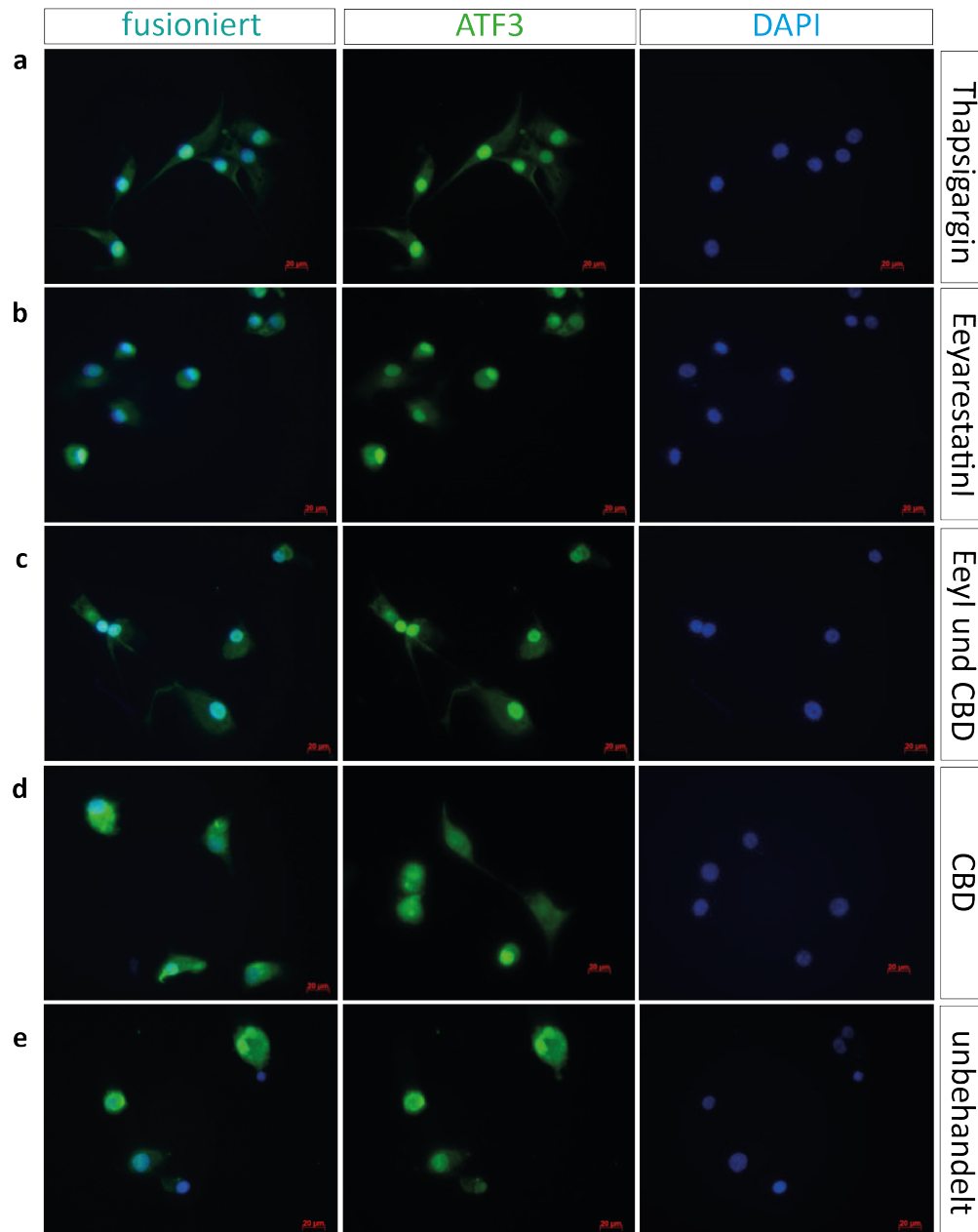


Abbildung 35 Immunzytochemische Färbungen des Transkriptionsfaktors ATF3 zeigen eine nukleäre Lokalisation nach Behandlung der Zellen mit Thapsigargin, EeyarestatinI und der Kombination von EeyarestatinI und CBD. Repräsentative Auswahl. (a) Thapsigargin (100ng/ml) (b) EeyarestatinI 1 μ M (c) EeyarestatinI 1 μ M und CBD (5 μ M) (d) CBD 5 μ M (e) unbehandelte Kontrolle. Maßstab: 20 μ m.

8. Diskussion

Das Glioblastom ist der häufigste primäre Hirntumor, mit dem gleichzeitig höchsten Malignitätsgrad. Die Standardbehandlung des Glioblastoms beinhaltet die maximale Resektion, sofern nach Lokalisation möglich. Typischerweise folgt der Operation eine kombinierte Radiochemotherapie mit Temozolomid (TMZ), als Standardtherapeutikum. Die hohe Aggressivität gepaart mit ausgeprägtem infiltrativem Verhalten der Tumorzellen führt jedoch konsequent zum Versagen der bisherigen therapeutischen Strategien. Trotz des zusätzlichen Einsatzes von weiteren Second-line Behandlungen, unter anderem mit Ansätzen in der Angiogenese, bleibt das mittlere Überleben bei nur 15 bis 18 Monaten². In diesen Monaten führen neurologische Dysfunktionen, die durch den Tumor hervorgerufen werden, zu schweren Beeinträchtigungen der Lebensqualität der Patienten³.

In der Therapie des Glioblastoms stehen im Vergleich zu anderen Tumorerkrankungen kaum pharmakologische Alternativen zum Chemotherapeutikum Temozolomid zur Verfügung. Die zugrundeliegende Problematik hierbei ist vor allem der ausgeprägten Resistenzbildung der Glioblastomzellen und der Anforderung an Chemotherapeutika, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren, zuzuschreiben. Mit besserem Verständnis des menschlichen Genoms, mithilfe neuer Sequenzierungs-Methoden, konnte ein detaillierteres genetisches Profil vieler Tumorerkrankungen, darunter auch des Glioblastoms, erstellt werden. In der Zukunft besteht somit die Herausforderung eine Chemotherapie zu entwickeln, die einerseits die verschiedenen Subpopulationen des Glioblastoms spezifisch behandelt, allerdings nicht zu spezifisch ist, um die Entwicklung von Resistenzmechanismen zu vermeiden.

Endoplasmatischer Retikulum Stress könnte ein geeignetes Target für eine innovative Chemotherapie darstellen. Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass TMZ als Standard-Chemotherapeutikum in der Behandlung des Glioblastoms zu Störungen der ER-Stress Homeostase in GBMs führt und durch Silencing von GRP78 mRNA schließlich Zelltod der Tumorzellen induziert²⁹. Ferner beschreiben einige Arbeiten, dass die Behandlung von U87 Tumorzellen mit TMZ zur Aktivierung des PERK-Signalweges der UPR führt¹³². In Tumorzellen finden sich erhöhte basale ER-Stress Level im Vergleich zu gesunden Zellen, wodurch eine krankheitsspezifische Therapie entwickelt werden kann. Eine pharmakologische Kombinationstherapie würde hierbei einen möglichen Schutz gegen die Ausbildung von Resistenzmechanismen darstellen. Die bisherigen in Anwendung befindlichen Chemotherapeutika führen zwar zu ER-Stress Imbalance, könnten allerdings bestimmte genetische Subgruppen der Tumoren noch resistenter machen. Einige Daten ergeben bereits Hinweise darauf, dass eine Kombinationstherapie aus TMZ und ER-Stress-Induktoren (wie z.B.: Salinomycin) zum besseren Therapieansprechen der Tumoren führen könnte. Hierbei zu Grunde liegend ist eine Sensibilisierung der Tumorzellen für TMZ durch eine Downregulation der MGMT, N-methylpurine DNA Glykosylase (MPG) und RAD51. Diese Komponenten sind alle in der DNA Reparatur involviert¹³³.

Bezüglich der Modulation von ER-Stress wurden bereits vereinzelt Substanzen und Moleküle im Glioblastom-Modell studiert und konnten einen Einfluss auf die ER Proteastase zeigen. Jedoch wurden die meisten Substanzen nicht in Kombinationstherapien getestet und nur sehr wenige davon brachten es in klinische Versuche. Im folgenden Abschnitt diskutieren wir einige dieser Substanzen und mögliche therapeutische Ansätze.

Es konnte in diversen Vorarbeiten gezeigt werden, dass ER-Stress Modulatoren zu verschiedenen Effekten in Zielzellen führen. Werden diese auf Tumorzellen appliziert, führt dies in der Regel jedoch zum Zelltod. Dies bringt einerseits mehr Spezifität, andererseits muss in diesem Rahmen genau geprüft werden welche Effekte ein bestimmter ER-Stress Modulator auf gesunde Zellen hat. Außerdem ist die Anwendung möglichst geringer Konzentrationen der eingesetzten Substanzen von enormer Bedeutung. Das ER-Stresslevel in Tumorzellen, mit bereits erhöhten basalen ER-Stress-Levels, sollte erhöht werden, während ein Anstieg des ER-Stress-Levels für gesunde Zellen noch tolerabel ist. Ein weiteres Therapieziel einer Kombinationstherapie sollte sein, die UPR so zu modulieren, dass die Krebszelle sich aus der UPR keinen Überlebensvorteil schaffen kann.

Es existieren aktuell folglich zwei pharmakologische Strategien zur Beeinflussung der ER-Stress und der konsekutiven UPR. Die erste Variante zielt auf die unspezifische Erhöhung des ER-Stress-Levels ab. Hierbei wird das bereits basal erhöhte ER-Stress-Level von Tumorzellen berücksichtigt. Wird das ER-

Stress-Level auf Tumorzellen deutlich erhöht so kann dieser durch die Tumorzellen nicht mehr bewältigt werden und sie sterben ab oder büßen zumindest ihren Überlebensvorteil ein. Die zweite Variante entwickelte sich über die letzten 5 Jahre und hat als Strategie eine spezifische Interferenz in die UPR durch Inhibitoren und Effektoren, die direkt in die drei Arme der UPR eingreifen^{83,91,93,134}. Auf diese Weise kann der Krebszelle die Möglichkeit die UPR zu ihren Gunsten zu nutzen, versperrt werden. Es ist bekannt, dass der ATF6 Arm der UPR zu einer Resistenz gegen Radiotherapie der GBMs führt¹³⁵. Vorläufige Daten zeigen außerdem in Transkriptom-Analysen, dass eine Subgruppe der GBMs (ca. 15-20%) mehr IRE1 Aktivität aufweisen und in diesen Patienten die Prognose deutlich schlechter wird¹³⁶. Zum aktuellen Stand ergibt sich eine eindeutige Evidenz dafür, dass die Kontrolle der ER-Proteostase durch die UPR von immenser Relevanz für eine Krebszelle ist. Dies konnte bisher ausgiebig für periphere Krebszellen gezeigt werden, jedoch erst kürzlich und noch sehr spärlich für Hirntumorzellen. Während die bisherigen Daten nur aus Zellkultur und Mausmodellen stammen, um die UPR in GBMs zu analysieren, fehlen Daten von humanen Gliomzellen aus frischen Tumoren direkt vom Patienten, die die ausgeprägte Heterogenität der Tumoren am besten widerspiegeln. In dieser Arbeit wurden auch humane Primärkulturzelllinien, die aus frischem Patientenmaterial aus Glioblastomgewebe von Patienten gewonnen wurden, verwendet.

Die mögliche Relevanz von ER-Stress für das Glioblastom ergibt sich zusätzlich durch eine hohe Expression an TRPV1 Rezeptoren, die auf gesundem Hirngewebe nur sehr gering exprimiert sind. Die Stimulation des TRPV1 Rezeptors induziert nachweislich ER-Stress in Glioblastomzellen *in vitro* und *in vivo*²⁸. Mögliche Liganden dieser TRPV1-Rezeptoren stellen die Gruppe der Cannabinoide dar. Einige Cannabinoide sind bereits in klinischer Anwendung, jedoch ergibt sich häufig die Problematik der zu hohen notwendigen Konzentrationen für eine bedenkenlose Applikation an Patienten. Durch eine Kombinationstherapie von Cannabinoiden und ER-Stress Modulatoren könnte eine mögliche innovative Therapie zur Krebsbehandlung entwickelt werden, die durch synergistische Effekte der Substanzen eine wirkungsvolle Applikation an Patienten ermöglicht und durch verschiedene Angriffspunkte mehr Subgruppen an Tumorzellen angreift und die Resistenzbildung vermindert.

Diverse ER-Stress Modulatoren stehen derzeit auf dem Markt zur Verfügung, jedoch ist ihr Einfluss auf Glioblastomzellen weitgehend unbekannt. ER-Stress Modulatoren können sowohl zu einer Hoch- als auch zu einer Herunterregulation der ER-Stress Antwort führen. Somit können sie zum einen als ER-Stress Stimulatoren eine erhöhte Viabilität von Zellen oder eine erhöhte Zelltodrate induzieren. Im Bereich der Alzheimer und Parkinsonforschung werden daher ER-Stress Modulatoren zur Erhöhung der Viabilität von Zellen eingesetzt. Im Bereich der Krebsforschung werden Modulatoren aufgrund ihres zytotoxischen Effektes auf Tumorzellen verwendet. Bei aktuell fehlendem Wissen über den Effekt von bereits bekannten ER-Stress Modulatoren auf Glioblastomzellen erfolgte in der vorliegenden Arbeit zunächst ein ausführliches Screening zur Evaluation eines geeigneten Kandidaten für eine spätere pharmakologische Chemotherapie.

Es erfolgte die Applikation verschiedenster ER-Stress-Modulatoren auf Glioblastomzellen. Anschließend wurde sich auf den dabei hervorgegangenen, besten Kandidaten fokussiert. Dieser Kandidat wurde nachfolgend in verschiedenen Kombinationen mit anderen pharmakologischen Substanzen auf verschiedenen Glioblastomzellen getestet. Das Endziel des Projektes war es ein Kombinationspartner für das, bereits bekannte und von meiner Arbeitsgruppe gleichzeitig evaluierte, Cannabinoid CBD zu entwickeln. CBD ist bereits in klinischer Anwendung und an Patienten applizierbar sowie fähig die Blut-Hirn-Schranke zu passieren. Nach einem ausführlichen Screening von ER-Stress Modulatoren zeigte sich der ER-Stress Modulator Eeyarestatin I als vielversprechend. Eeyarestatin I interagiert im Upiquitin Proteasom-System der Zelle. Die Applikation von Eeyarestatin I zeigte eine deutliche Beeinträchtigung aller Krebszelllinien unter Therapie. In Kombination mit dem Cannabinoid CBD, zeigte Eeyarestatin I synergistische antitumorogene Effekte, insbesondere auf bestimmte genetisch veränderte Gliomzellen. Das aufgezeigte unterschiedliche Ansprechen von genetisch veränderten Gliomzellen, die für das Glioblastom typische Mutationen aufweisen, impliziert die Heterogenität der Tumorzellen und gleichzeitig die Möglichkeiten zur Gestaltung individueller, personalisierter Krebstherapien in der Behandlung des Glioblastoms. Dies ist konform mit den bisher beschriebenen Beobachtungen, dass man Krebszellen in Gliomen anhängig von deren ER-Stress Aktivität in Subgruppen klassifizieren muss, um durch eine adäquate Kombinationstherapie alle Formen der Subgruppen auszuschalten¹³⁸. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl UPR-Inhibitoren wie PF429242 als auch unspezifische ER-Stress Induktoren zum Zelltod in Gliomzellen führen. Dies gibt uns Hinweise darauf, dass Kombinationstherapien in Zukunft in Betracht zu ziehen sind, um die Chemotherapie zielgerichteter auf

die Subpopulation des Glioblastoms zu designen. Außerdem ergibt auch die unterschiedliche Relevanz von ER-Stress in Tumor- und den tumorassoziierten Stromazellen Anhalt für eine notwendige Kombinationstherapie. Regelmäßig kann die Relevanz der UPR in Stromazellen von Tumoren aufgezeigt werden. Glioblastome zeichnen sich durch ihren Reichtum an nicht-neoplastischen Stromazellen aus. Die Tumorprogression hängt hierbei von einer ausgeprägten Kommunikation zwischen Tumorzellen und umgebenden Zellen ab. Darunter befinden sich Tumor-assoziierte Endothelzellen, myeloische dendritische Zellen, plasmazytoide dendritische Zellen, T-Zellen sowie Tumor-assoziierte Makrophagen und Mikrogliazellen^{137,63}. Die zuletzt genannten Tumor-assoziierten Makrophagen und Mikrogliazellen sind Immunzellen die das Tumorgewebe infiltrieren und 30% der Tumormasse ausmachen⁸⁷. Somit können mit dem Target UPR auch weitere Zellen des Tumorgewebes beeinflusst werden. Die Kombination aus ER-Stress-Modulatoren oder Induktoren mit Substanzen wie den Cannabinoiden, die auf Gliomen exprimierten TRPV-1 Rezeptoren wirken, um unter anderem ER-Stress auszulösen, stellen einen möglichen Therapieansatz der Zukunft dar. Auf Basis der Subgruppen und verschiedener Targets könnte so eine Kombinationstherapie aus Substanzen entstehen, die erheblich die Resistenz der Glioblastome und die Rezidivrate, durch eine bessere Eradikation von Tumorzell-Subgruppen, reduzieren könnte.

Während die Relevanz einer ER-Stress-fokussierten Therapie ausgiebig für periphere, nicht-zentralnervöse Krebserkrankungen beschrieben ist, konnte in meiner Arbeit das Potenzial von ER-Stress fokussierten Therapien für das Glioblastom, insbesondere auch an Primärkulturzellen, aufgezeigt werden. Ferner zeigt die vorliegende Arbeit, dass ein spezifisches Eingreifen in den ER-Stress mit Substanzen wie dem „Integrated Stress Response Inhibitor (ISRIB), der die Effekte der Phosphorylierung des eIF2 α umkehrt und folglich zur Aufrechterhaltung der Translationskapazität der Zelle führt und gleichzeitig die Produktion von ATF4 blockiert^{96,125,126}, ausgeprägte antitumorogene Effekte in Gliomzellen induziert. Der Einsatz von Salubrinal, welches die Protein-Phosphatase 1 (PP1) im Komplex mit CreP oder dem „Growth Arrest and DNA Damage 34 Protein“ blockiert, was über die Dephosphorylierung von eIF2 α zur verzögerten mRNA Translation führt⁹⁵, ergab ebenfalls signifikant erhöhte Zelltodraten in Gliomzellen. Salubrinal ist zudem bereits in anderen Erkrankungen in klinischer Anwendung. Des Weiteren kam es zu erstaunlich hohen Zelltodraten von Gliomzellen nach Applikation von PF429242 als Site 1-Protease-Inhibitor, der die Prozessierung von ATF6 stört und die UPR blockiert^{121, 113}, was eine relevante Rolle der ATF6-Achse der UPR in Gliomzellen impliziert. Eeyarestatin I, als spezifischer Inhibitor der „ER-associated Proteindegradation (ERAD)“, durch Inhibition der p97 ATPase, führt unter anderem zur Retrotranslokation fehlgefalteter Proteine vom ER zum Proteasom mit konsekutiver Anhäufung fehlgefalteter Proteine¹¹². Das Ubiquitin-Proteasomen-System stellte sich kürzlich als wichtiges Target in der Entwicklung der Krebstherapie heraus¹³⁹. An der Harvard-Universität konnte die Substanz Eeyarestatin I als Nachfolgersubstanz von Bortezomib entwickelt werden. Der Proteasomeninhibitor Bortezomib ist eine Vorgängersubstanz von Eeyarestatin I und wird bereits klinisch in der Behandlung des Multiplen Myeloms und Mantelzellymphoms angewandt. Ähnlich wie Bortezomib fungiert Eeyarestatin I ebenfalls als Proteasomen-Inhibitor und blockiert somit die Degradation von Proteinen. Die Zytotoxizität beider Substanzen wird über das anti-BCL-2 Protein NOXA induziert¹³⁹. Die Transkriptionsfaktoren ATF3 und ATF4 fungieren hierbei als Schlüsselmediator zur Aktivierung von NOXA nach Applikation von Eeyarestatin I und Bortezomib. Eeyarestatin I blockiert die UPR und hat antitumorogene und biologische Eigenschaften die Bortezomid gleich kommen¹⁰⁹. Eeyarestatin I konnte sich in dieser Arbeit als potenzielle pharmakologische Therapiemöglichkeit im Rahmen einer Glioblastombehandlung herauskristallisieren. Außerdem unterstreichen die aufgezeigten antitumorogenen Effekte von Eeyarestatin I die Relevanz des Ubiquitin-Proteasom-Systems als neues Target für die Entwicklung von Krebstherapien. Zudem konnte in den Analysen der Harvard-Universität gezeigt werden, dass Eeyarestatin I als Nachfolgersubstanz weniger zytotoxische Effekte auf mononukleäre Zellen des peripheren Blutes von gesunden Patienten zeigt als Bortezomib¹¹². Relevante antitumorogene Effekte von Eeyarestatin I konnten bisher nur für wenige periphere Krebserkrankungen aufgezeigt werden¹³⁹, während die Wirkung auf Tumore des zentralen Nervensystems bisher komplett unerforscht ist. Jedoch sind ERAD Inhibitoren als eine nutzvollere neue Medikamentenklasse in der Krebstherapie schon längere Zeit bekannt¹¹². Es liegt Evidenz vor, dass die Präsenz eines Einzel-Nukleotid-Polymorphismus (rs12435998) einer ERAD E3 Ubiquitin-Ligase-Adaptor-Untereinheit zu besserem Ansprechen der Patienten auf Radiochemotherapie und konsekutiv verlängertem Überleben führt¹⁴⁰.

9. Zusammenfassung

Endoplasmatischer Retikulum-Stress zeigt sich für Glioblastomzellen als mindestens genauso relevantes Target in der Krebstherapie wie in peripheren, nicht-zentralnervösen Krebszellen. Die Induktion von ER-Stress führt in Gliomen zu relevant erhöhten Zelltodraten. Auch die reine Modulation, unter anderem durch UPR-Modulatoren, wie PF429242 und ISRIB, führt zu erheblich erhöhten Zelltodraten in verschiedenen Gliomzellen. Bei der Behandlung von Krebszellen mit ER-Stress Induktoren variiert die Zelltoxizität zwischen den verschiedenen Krebszelltypen. Hierbei scheinen Glioblastomzellen zum Teil sensitiver auf eine ER-Stress Induktion zu reagieren als andere Krebszellen. Am deutlichsten ist dieser Effekt zu erkennen bei der Behandlung von Krebszellen mit Tunicamycin welches direkt die Proteinfaltung und Reifung der Zelle beeinflusst. Ein ausgedehntes Screening an ER-Stress-Modulatoren erbrachte diverse Substanzen, die in geringer Dosierung einen zytotoxischen Effekt in Krebszellen hervorrufen. Sowohl UPR Inhibitoren wie PF429242, als auch andere ER-Stress Modulatoren und Induktoren konnten deutliche antitumorigene Effekte auf Gliomzellen erzeugen. Hierbei konnten als Einzeltherapie für die Substanzen Salubrinal, Eeyarestatin I, 3F8, Acetylcystein, Epigallocatechin galate, ISRIB, Apigenin und PF429242 ein zytotoxischer Effekt auf Krebszellen gezeigt werden. Im Rahmen einer Kombinationstherapie, von ER-Stress-Induktoren als auch von ER-Stress Induktoren mit Modulatoren und anderen geeigneten Substanzen wie den TRPV1-Rezeptor-Agonisten, konnten additive bis synergistische antitumorigene Effekte für Gliomzellen aufgezeigt werden. Hierbei zeigte sich die vielversprechendste Therapie unter Verwendung des ER-Stress Modulators Eeyarestatin I in Kombination mit bekannten ER-Stress Induktoren. In Hinblick auf eine kombinatorische Pharmakotherapie erbrachte die Hinzunahme einer bereits in klinischer Anwendung befindlichen Substanz namens CBD, aus dem Formenkreis der Cannabinoide, vielversprechende Ergebnisse. Die vielversprechendsten Kombinationstherapien ergaben sich aus CBD jeweils mit Thapsigargin, IS-RIB und Eeyarestatin I. Thapsigargin wird regelmäßig in der Forschung eingesetzt, ist jedoch nicht dem Menschen applizierbar. Auf der Suche nach effektiven ER-Stress Modulatoren, die dem Menschen applizierbar sind und die Blut-Hirnschranke passieren können, wurden für Eeyarestatin I, als Nachfolgesubstanz des bereits in klinischer Anwendung befindlichen Bortezomib, antitumorigene Effekte auf verschiedene Primärkulturzelllinien und genetisch veränderte Gliomzellen aufgezeigt. Durch genetische Manipulation der Gliomzellen konnte das regulatorische Potenzial der Kombinationstherapie und die pharmakologische Spezifität auf die pro-apoptotische Komponenten des ER-Stress-Signalweges rekapituliert werden. Ferner konnte auch immunzytochemisch eine verstärkte nukleare Lokalisation des pro-apoptotischen Faktors ATF3 nach der Behandlung mit Eeyarestatin I und der Kombinationstherapie mit Eeyarestatin I und CBD aufgezeigt werden, was eine verstärkte Transkription von ATF3 und somit unsere Pharmakotherapie als ER-Stress spezifisch impliziert.

Zusammenfassend konnte in meiner Arbeit die Relevanz einer ER-Stress-fokussierten Kombinationstherapie für eine aggressivere und zielgerichtete Behandlung des Glioblastoms aufgezeigt werden. Hierbei zeigte sich sowohl die Induktion von ER-Stress, als auch die Modulation der UPR als geeignete Strategie um Gliomzellen und speziell ihre zellulären Subgruppen zu eradizieren. Insbesondere die Kombination mit ER-Stress-Inhibitoren wie PF429242 könnten zusätzlich tumorassoziierte Stromazellen und die Neoangiogenese von Tumoren beeinträchtigen, die von der UPR profitieren. Eeyarestatin I kristallisierte sich als geeigneter ER-Stress-Modulator zur effektiven Behandlung von allen getesteten Gliomzellen heraus. Hinzukommen als mögliche Kombinationspartner davon unabhängige Substanzen wie die Cannabinoide, die durch ihre spezifische Wirkung auf Tumorzellen, auf Grund der Bindung an vorwiegend in Gliomen exprimierten TRPV-1 Rezeptoren, von besonderer Relevanz sind.

Zusammenfassend, zeigt die vorliegende Arbeit die Relevanz von ER-Stress und der UPR in Gliomzellen, erstmalig auch in Glioblastomzellen aus Patientenmaterial inklusive von Patienten mit Rezidivtumor. Außerdem unterstreicht das unterschiedliche Ansprechen der häufigsten genetischen Varianten von Gliomzellen, die Relevanz einer zukünftigen individualisierten Krebs-Therapie und den Benefit durch Kombinationstherapien. Die vorliegende Arbeit könnte ein möglicher Ansatz eines zukünftigen Therapieregimes in der Behandlung des Glioblastoms darstellen.

10. Referenzen

1. Chen, J., McKay, R. M. & Parada, L. F. Malignant glioma: Lessons from genomics, mouse models, and stem cells. *Cell* **149**, 36–47 (2012).
2. Louis, D. N. *et al.* The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica* **131**, 803–820 (2016).
3. Crocetti, E. *et al.* Epidemiology of glial and non-glial brain tumours in Europe. *Eur. J. Cancer* **48**, 1532–1542 (2012).
4. Cotran, R. *et al.* *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. Philadelphia, PA: Saunders, Ipswich, MA (2015).
5. AWMF Leitlinie 2015. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. 1–21 (2012).
6. Aldape, K., Zadeh, G., Mansouri, S., Reifenberger, G. & von Deimling, A. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathologica* (2015). doi:10.1007/s00401-015-1432-1
7. Carlsson, S. K., Brothers, S. P. & Wahlestedt, C. Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme. *EMBO Mol. Med.* (2014). doi:10.15252/emmm.201302627
8. Stupp, R. *et al.* Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 987–96 (2005). doi:10.1056/NEJMoa043330
9. Martínez-García, M. *et al.* SEOM clinical guidelines for diagnosis and treatment of glioblastoma (2017). *Clin. Transl. Oncol.* (2018). doi:10.1007/s12094-017-1763-6
10. Hart, M. G., Garside, R., Rogers, G., Stein, K. & Grant, R. Temozolomide for high grade glioma. *Cochrane Database Syst. Rev.* **4**, CD007415 (2013).
11. Newlands, E. S. *et al.* Phase I trial of temozolomide (CCRG 81045: M&U 39831: NSC 362856). *Br. J. Cancer* **65**, 287–291 (1992).
12. Tsang, L. L. H., Farmer, P. B., Gescher, A. & Slack, J. A. Characterisation of urinary metabolites of temozolomide in humans and mice and evaluation of their cytotoxicity. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **26**, 429–436 (1990).
13. Stupp, R. *et al.* Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* **10**, 459–466 (2009).
14. Hegi, M. E. *et al.* MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **352**, 997–1003 (2005).
15. Denny, B. J., Wheelhouse, R. T., Stevens, M. F., Tsang, L. L. & Slack, J. a. NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA. *Biochemistry* **33**, 9045–9051 (1994).
16. Tisdale, M. J. Antitumour imidazotetrazines-XV. Role of guanine O6alkylation in the mechanism of cytotoxicity of imidazotetrazinones. *Biochem. Pharmacol.* **36**, 457–462 (1987).
17. Johnson, D. R. & O'Neill, B. P. Glioblastoma survival in the United States before and during the temozolomide era. *J. Neurooncol.* **107**, 359–364 (2012).
18. Phillips, H. S. *et al.* Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* (2006). doi:10.1016/j.ccr.2006.02.019
19. Brennan, C. *et al.* The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. *Cell* **155**, 462–477 (2013).
20. Verhaak, R. G. W. *et al.* Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* **17**, 98–110 (2010).
21. Wang, J., Su, H. K., Zhao, H. F., Chen, Z. P. & To, S. S. T. Progress in the application of molecular biomarkers in gliomas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2015). doi:10.1016/j.bbrc.2015.07.148

22. Cameron W, Brennan, Roel G.W. Verhaak, Aaron McKenna, Benito Campos, Houtan Noushmehr, Sofie R. Salama, Siyuan Zheng, Debyani Chakravarty, J. Zachary Sanborn, Samuel H. Berman, Rameen Beroukhim, Brady Bernard, Chang-Jiun Wu, Giannicola Genovese, Ilya Shmu, L. C. NIH Public Access - The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. *Cell* **155**, 462–477 (2014).
23. Filbin, M. G. & Suvà, M. L. Gliomas Genomics and Epigenomics: Arriving at the Start and Knowing It for the First Time. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **11**, 497–521 (2016).
24. Ohgaki, H. *et al.* Genetic pathways to glioblastoma: A population-based study. *Cancer Res.* (2004). doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1337
25. Huse, J. T. & Holland, E. C. Targeting brain cancer: Advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nature Reviews Cancer* (2010). doi:10.1038/nrc2818
26. Brennan, C. W. *et al.* The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* **155**, (2013).
27. Glass, R. *et al.* Glioblastoma-induced attraction of endogenous neural precursor cells is associated with improved survival. *J. Neurosci.* **25**, 2637–2646 (2005).
28. Stock, K. *et al.* Neural precursor cells induce cell death of high-grade astrocytomas through stimulation of TRPV1. *Nat. Med.* **18**, 1232–1238 (2012).
29. Hetz, C. The unfolded protein response: Controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **13**, 89–102 (2012).
30. Ron, D. & Walter, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**, 519–529 (2007).
31. Obacz, J. *et al.* Endoplasmic reticulum proteostasis in glioblastoma—From molecular mechanisms to therapeutic perspectives. *Sci. Signal.* **10**, eaal2323 (2017).
32. Schroder, M. & Kaufman, R. J. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* **74**, 739–789 (2005).
33. Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P. & Ron, D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* **2**, 326–332 (2000).
34. Korennykh, A. V *et al.* The unfolded protein response signals through high-order assembly of Ire1. *Nature* **457**, 687–693 (2009).
35. Jiang, D., Niwa, M. & Koong, A. C. Targeting the IRE1 α -XBP1 branch of the unfolded protein response in human diseases. *Seminars in Cancer Biology* **33**, 48–56 (2015).
36. Maurel, M., Chevet, E., Tavernier, J. & Gerlo, S. Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation. *Trends in Biochemical Sciences* **39**, 245–254 (2014).
37. Dejeans, N. *et al.* Addicted to secrete - novel concepts and targets in cancer therapy. *Trends in Molecular Medicine* **20**, 242–250 (2014).
38. Walter, P. & Ron, D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* **334**, 1081–1086 (2011).
39. Tabas, I. & Ron, D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nature Cell Biology* **13**, 184–190 (2011).
40. Heiden, M. G. Vander, Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **324**, 1029–1033 (2009).
41. Hanahan & Weinberg. Cell - Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell, Volume 144, Issue 5, 646-674, 4 March 2011* **144**, 646–674 (2011).
42. Gaillard, H., García-Muse, T. & Aguilera, A. Replication stress and cancer. *Nature Reviews Cancer* **15**, 276–280 (2015).
43. Leprivier, G., Rotblat, B., Khan, D., Jan, E. & Sorensen, P. H. Stress-mediated translational control in cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1849**, 845–860 (2015).
44. Pyrko P, Schönthal AH, Hofman FM, Chen TC, L. A. S. The unfolded protein response regulator GRP78/BiP as a novel target for increasing chemosensitivity in malignant gliomas. *Cancer Res.* **67**,

- (2007).
45. Hart, L. S. *et al.* ER stress-mediated autophagy promotes Myc-dependent transformation and tumor growth. *J. Clin. Invest.* **122**, 4621–4634 (2012).
 46. Bagratuni, T. *et al.* XBP1s levels are implicated in the biology and outcome of myeloma mediating different clinical outcomes to thalidomide-based treatments. *Blood* **116**, 250–253 (2010).
 47. Fernandez, P. M. *et al.* Overexpression of the glucose-regulated stress gene GRP78 in malignant but not benign human breast lesions. *Breast Cancer Res. Treat.* **59**, 15–26 (2000).
 48. Uramoto, H. *et al.* Expression of endoplasmic reticulum molecular chaperone Grp78 in human lung cancer and its clinical significance. *Lung Cancer* **49**, 55–62 (2005).
 49. Shuda, M. *et al.* Activation of the ATF6, XBP1 and grp78 genes in human hepatocellular carcinoma: A possible involvement of the ER stress pathway in hepatocarcinogenesis. *J. Hepatol.* **38**, 605–614 (2003).
 50. Xing, X., Lai, M., Wang, Y., Xu, E. & Huang, Q. Overexpression of glucose-regulated protein 78 in colon cancer. *Clin. Chim. Acta* **364**, 308–315 (2006).
 51. Niu, Z. *et al.* Elevated GRP78 expression is associated with poor prognosis in patients with pancreatic cancer. *Sci. Rep.* **5**, (2015).
 52. Ana Mozos, Gaël Roué, Armando López-Guillermo, Pedro Jares, Elias Campo, Dolors Colomer & Martinez, A. The Expression of the Endoplasmic Reticulum Stress Sensor BiP/GRP78 Predicts Response to Chemotherapy and Determines the Efficacy of Proteasome Inhibitors in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Am J Pathol* **179**, 2601–2610 (2011).
 53. Matsuo, K. *et al.* The endoplasmic reticulum stress marker, glucose-regulated protein-78 (GRP78) in visceral adipocytes predicts endometrial cancer progression and patient survival. *Gynecol. Oncol.* **128**, 552–559 (2013).
 54. Dufey, E., Urra, H. & Hetz, C. ER proteostasis addiction in cancer biology: Novel concepts. *Seminars in Cancer Biology* **33**, 40–47 (2015).
 55. Urra, H., Dufey, E., Avril, T., Chevet, E. & Hetz, C. Endoplasmic Reticulum Stress and the Hallmarks of Cancer. *Trends in Cancer* **2**, 252–262 (2016).
 56. Hetz, C. & Mollereau, B. Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience* (2014). doi:10.1038/nrn3689
 57. Agostinis, P. & Samali, A. *Endoplasmic reticulum stress in health and disease. Endoplasmic Reticulum Stress in Health and Disease* (2012). doi:10.1007/978-94-007-4351-9
 58. S. F. Hussain, D. Yang, D. Suki, K. Aldape, E. Grimm, A. B. Heimberger. The role of human glioma-infiltrating microglia/macrophages in mediating antitumor immune responses. *Neuro. Oncol.* **8**, 261–279 (2006).
 59. Charalambous, C., Chen, T. C. & Hofman, F. M. Characteristics of tumor-associated endothelial cells derived from glioblastoma multiforme. *Neurosurg. Focus* **20**, E22 (2006).
 60. Badie, B. & Schartner, J. M. Flow cytometric characterization of tumor-associated macrophages in experimental gliomas. *Neurosurgery* **46**, 957–962 (2000).
 61. Komohara, Y., Ohnishi, K., Kuratsu, J. & Takeya, M. Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. *J. Pathol.* **216**, 15–24 (2008).
 62. Bingle, L., Brown, N. J. & Lewis, C. E. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: Implications for new anticancer therapies. *Journal of Pathology* **196**, 254–265 (2002).
 63. Martinon, F., Chen, X., Lee, A. H. & Glimcher, L. H. TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages. *Nat. Immunol.* **11**, 411–418 (2010).
 64. Chen, L. *et al.* HIV protease inhibitor lopinavir-induced TNF- α and IL-6 expression is coupled to the unfolded protein response and ERK signaling pathways in macrophages. *Biochem. Pharmacol.* **78**, 70–77 (2009).

65. Goodall, J. C. *et al.* Endoplasmic reticulum stress-induced transcription factor, CHOP, is crucial for dendritic cell IL-23 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 17698–17703 (2010).
66. Mahadevan, N. R. *et al.* Transmission of endoplasmic reticulum stress and pro-inflammation from tumor cells to myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 6561–6566 (2011).
67. Mahadevan, N. R. *et al.* Cell-Extrinsic Effects of Tumor ER Stress Imprint Myeloid Dendritic Cells and Impair CD8+ T Cell Priming. *PLoS One* **7**, (2012).
68. Morales, C. *et al.* Immune chaperone gp96 drives the contributions of macrophages to inflammatory colon tumorigenesis. *Cancer Res.* **74**, 446–459 (2014).
69. Wheeler, M. C. *et al.* KDEL-retained antigen in B lymphocytes induces a proinflammatory response: a possible role for endoplasmic reticulum stress in adaptive T cell immunity. *J. Immunol.* **181**, 256–264 (2008).
70. Granados, D. P. *et al.* ER stress affects processing of MHC class I-associated peptides. *BMC Immunol.* **10**, (2009).
71. Iwakoshi, N. N., Pypaert, M. & Glimcher, L. H. The transcription factor XBP-1 is essential for the development and survival of dendritic cells. *J. Exp. Med.* **204**, 2267–2275 (2007).
72. Karali, E. *et al.* VEGF Signals through ATF6 and PERK to Promote Endothelial Cell Survival and Angiogenesis in the Absence of ER Stress. *Mol. Cell* **54**, 559–572 (2014).
73. Auf, G. *et al.* Inositol-requiring enzyme 1 is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 15553–15558 (2010).
74. Pluquet, O. *et al.* Posttranscriptional regulation of per1 underlies the oncogenic function of IRE α . *Cancer Res.* **73**, 4732–4743 (2013).
75. Feng, Y. *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition activates PERK-eIF2 α and sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress. *Cancer Discov.* **4**, 702–715 (2014).
76. Hilda Mujcic, Anika Nagelkerke, Kasper M.A. Rouschop, Stephen Chung, Naz Chaudary, Paul N. Span, Blaise Clarke, Michael Milosevic, Jenna Sykes, Richard P. Hill, M. K. & Wouters, B. G. Hypoxic Activation of the PERK/eIF2 α Arm of the Unfolded Protein Response Promotes Metastasis through Induction of LAMP3. *Hum. Cancer Biol.* **19**, (2013).
77. Zhu, H. *et al.* Activating transcription factor 4 promotes esophageal squamous cell carcinoma invasion and metastasis in mice and is associated with poor prognosis in human patients. *PLoS One* **9**, (2014).
78. Heijmans, J. *et al.* ER Stress Causes Rapid Loss of Intestinal Epithelial Stemness through Activation of the Unfolded Protein Response. *Cell Rep.* **3**, 1128–1139 (2013).
79. Dejeans, N., Barroso, K., Fernandez-Zapico, M. E., Samali, A. & Chevet, E. Novel roles of the unfolded protein response in the control of tumor development and aggressiveness. *Seminars in Cancer Biology* **33**, 67–73 (2015).
80. Bobrovnikova-Marjon, E. *et al.* PERK promotes cancer cell proliferation and tumor growth by limiting oxidative DNA damage. *Oncogene* **29**, 3881–3895 (2010).
81. Tameire, F., Verginadis, I. I. & Koumenis, C. Cell intrinsic and extrinsic activators of the unfolded protein response in cancer: Mechanisms and targets for therapy. *Seminars in Cancer Biology* **33**, 3–15 (2015).
82. Yugang Wang, Goleeta N. Alam, Yu Ning, Fernanda Visioli, Zhihong Dong, J. E. N. & Polverini, P. J. The Unfolded Protein Response Induces the Angiogenic Switch in Human Tumor Cells through the PERK/ATF4 Pathway. *Tumor Stem Cell Biol.* **72**, (2012).
83. Atkins, C. *et al.* Characterization of a novel PERK kinase inhibitor with antitumor and antiangiogenic activity. *Cancer Res.* **73**, 1993–2002 (2013).
84. Avivar-Valderas, A. *et al.* PERK Integrates Autophagy and Oxidative Stress Responses To Promote Survival during Extracellular Matrix Detachment. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 3616–3629 (2011).

85. Jiang, H. *et al.* Phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2 is required for activation of NF-kappaB in response to diverse cellular stresses. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 5651–5663 (2003).
86. Greenman, C. *et al.* Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* **446**, 153–158 (2007).
87. Simpson, K. J. *et al.* Identification of genes that regulate epithelial cell migration using an siRNA screening approach. *Nat. Cell Biol.* **10**, 1027–1038 (2008).
88. Romero-Ramirez, L. *et al.* XBP1 is essential for survival under hypoxic conditions and is required for tumor growth. *Cancer Res.* **64**, 5943–5947 (2004).
89. Hu, P., Han, Z., Couvillon, A. D., Kaufman, R. J. & Exton, J. H. Autocrine Tumor Necrosis Factor Alpha Links Endoplasmic Reticulum Stress to the Membrane Death Receptor Pathway through IRE1 α -Mediated NF- κ B Activation and Down-Regulation of TRAF2 Expression. *Society* **26**, 3071–3084 (2006).
90. Arai, M. *et al.* Transformation-associated gene regulation by ATF6alpha during hepatocarcinogenesis. *FEBS Lett.* **580**, 184–190 (2006).
91. Higa, A. *et al.* Endoplasmic Reticulum Stress-Activated Transcription Factor ATF6 Requires the Disulfide Isomerase PDIA5 To Modulate Chemoresistance. *Mol. Cell. Biol.* **34**, 1839–1849 (2014).
92. Schewe, D. M. & Aguirre-Ghiso, J. A. ATF6alpha-Rheb-mTOR signaling promotes survival of dormant tumor cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 10519–10524 (2008).
93. Das, I. *et al.* Preventing proteostasis diseases by selective inhibition of a phosphatase regulatory subunit. *Science (80-.)*. **348**, 239–242 (2015).
94. Tsaytler, P., Harding, H. P., Ron, D. & Bertolotti, A. Selective inhibition of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 restores proteostasis. *Science* **332**, 91–94 (2011).
95. Long, K., Boyce, M. & Bryant, K. F. A Selective Inhibitor of eIF2a Dephosphorylation Protects Cells from ER Stress. *Science (80-.)*. **307**, 935–939 (2005).
96. Sidrauski, C. *et al.* Pharmacological brake-release of mRNA translation enhances cognitive memory. *Elife* **2013**, (2013).
97. Wang, L. *et al.* Divergent allosteric control of the IRE1 α endoribonuclease using kinase inhibitors. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 982–989 (2012).
98. Papandreou, I. *et al.* Identification of an Ire1alpha endonuclease specific inhibitor with cytotoxic activity against human multiple myeloma. *Blood* **117**, 1311–1314 (2011).
99. Ghosh, R. *et al.* Allosteric Inhibition of the IRE1a RNase Preserves Cell Viability and Function during Endoplasmic Reticulum Stress. *Cell* 1–15 (2014). doi:10.1016/j.cell.2014.07.002
100. Lhomond, S. *et al.* Adaptation of the secretory pathway in cancer through IRE1 signaling. *Methods Mol. Biol.* **1292**, 177–194 (2015).
101. Sanches, M. *et al.* Structure and mechanism of action of the hydroxy-aryl-aldehyde class of IRE1 endoribonuclease inhibitors. *Nat. Commun.* **5**, (2014).
102. Mimura, N. *et al.* Blockade of XBP1 splicing by inhibition of IRE1 α is a promising therapeutic option in multiple myeloma. *Blood* **119**, 5772–5781 (2012).
103. Volkmann, K. *et al.* Potent and selective inhibitors of the inositol-requiring enzyme 1 endoribonuclease. *J. Biol. Chem.* **286**, 12743–12755 (2011).
104. Cross, B. C. S. *et al.* The molecular basis for selective inhibition of unconventional mRNA splicing by an IRE1-binding small molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, E869--78 (2012).
105. Gallagher, C. M. & Walter, P. Ceapins inhibit ATF6 α signaling by selectively preventing transport of ATF6 α to the Golgi apparatus during ER stress. *Elife* **5**, (2016).
106. Gallagher, C. M. *et al.* Ceapins are a new class of unfolded protein response inhibitors, selectively targeting the ATF6 α branch. *Elife* **5**, (2016).

107. Hetz, C., Chevet, E. & Harding, H. P. Targeting the unfolded protein response in disease. *Nature Reviews Drug Discovery* **12**, 703–719 (2013).
108. Sidrauski, C. *et al.* Pharmacological dimerization and activation of the exchange factor eIF2B antagonizes the integrated stress response. *Elife* **2015**, (2015).
109. Kraskiewicz, H. & FitzGerald, U. InterfERring with endoplasmic reticulum stress. *Trends Pharmacol Sci* **33**, 53–63 (2012).
110. Nakka, V. P., Gusain, A. & Raghuram, R. Endoplasmic reticulum stress plays critical role in brain damage after cerebral ischemia/reperfusion in rats. *Neurotox. Res.* **17**, 189–202 (2010).
111. Sokka, A.-L. *et al.* Endoplasmic Reticulum Stress Inhibition Protects against Excitotoxic Neuronal Injury in the Rat Brain. *J. Neurosci.* **27**, 901–908 (2007).
112. Qiuyan Wang, Helena Mora-Jensen, Marc A. Weniger, Patricia Perez-Galan, Chris Wolford, Tsonwin Hai, David Ron, Weiping Chen, William Trenkle, Adrian Wiestner, Y. Y. ERAD inhibitors integrate ER stress with an epigenetic mechanism to activate BH3-only protein NOXA in cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **7**, 2200–2205 (2009).
113. Choi, E. J. & Kim, G.-H. Apigenin Induces Apoptosis through a Mitochondria/Caspase-Pathway in Human Breast Cancer MDA-MB-453 Cells. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **44**, 260–265 (2009).
114. Jin, B.-H. *et al.* Apigenin protects endothelium-dependent relaxation of rat aorta against oxidative stress. *Eur. J. Pharmacol.* **616**, 200–205 (2009).
115. Kuo, M. L. & Yang, N. C. Reversion of v-H-ras-transformed NIH 3T3 cells by apigenin through inhibiting mitogen activated protein kinase and its downstream oncogenes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **212**, 767–775 (1995).
116. Lin, J. K., Chen, Y. C., Huang, Y. T. & Lin-Shiau, S. Y. Suppression of protein kinase C and nuclear oncogene expression as possible molecular mechanisms of cancer chemoprevention by apigenin and curcumin. *J. Cell. Biochem.* **67**, 39–48 (1997).
117. Frisard, M. I. *et al.* Low levels of lipopolysaccharide modulate mitochondrial oxygen consumption in skeletal muscle. *Metabolism.* **64**, 416–427 (2015).
118. Hotchkiss, R. S. & Karl, I. E. Dantrolene ameliorates the metabolic hallmarks of sepsis in rats and improves survival in a mouse model of endotoxemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 3039–3043 (1994).
119. O'Mara, S. M., Rowan, M. J. & Anwyl, R. Dantrolene inhibits long-term depression and depotentiation of synaptic transmission in the rat dentate gyrus. *Neuroscience* **68**, 621–624 (1995).
120. Zhao, F., Li, P., Chen, S. R. W., Louis, C. F. & Fruen, B. R. Dantrolene inhibition of ryanodine receptor Ca²⁺ release channels. Molecular mechanism and isoform selectivity. *J. Biol. Chem.* **276**, 13810–13816 (2001).
121. Ye, J. *et al.* ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol. Cell* **6**, 1355–1364 (2000).
122. Hawkins, J. L. *et al.* Pharmacologic inhibition of site 1 protease activity inhibits sterol regulatory element-binding protein processing and reduces lipogenic enzyme gene expression and lipid synthesis in cultured cells and experimental animals. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **326**, 801–808 (2008).
123. Okada, T. *et al.* A serine protease inhibitor prevents endoplasmic reticulum stress-induced cleavage but not transport of the membrane-bound transcription factor ATF6. *J. Biol. Chem.* **278**, 31024–31032 (2003).
124. Zhong, H. *et al.* Characterization and development of novel small-molecules inhibiting GSK3 and activating Wnt signaling. *Mol. Biosyst.* **5**, 1356 (2009).
125. Sekine, Y. *et al.* Mutations in a translation initiation factor identify the target of a memory-enhancing compound. *Science (80-)*. **348**, 1027–1030 (2015).
126. Hinnebusch, A. G. Blocking stress response for better memory? *Science (80-)*. **348**, 967–968 (2015).

127. Jeon, S. Y., Bae, K. H., Seong, Y. H. & Song, K. S. Green tea catechins as a BACE1 (β -secretase) inhibitor. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **13**, 3905–3908 (2003).
128. Ahmad, N., Gupta, S. & Mukhtar, H. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate differentially modulates nuclear factor κ B in cancer cells versus normal cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **376**, 338–346 (2000).
129. Shankar, S., Ganapathy, S., Hingorani, S. R. & Srivastava, R. K. EGCG inhibits growth, invasion, angiogenesis and metastasis of pancreatic cancer. *Front. Biosci.* **13**, 440–452 (2008).
130. Lee, W. J., Shim, J. & Zhu, B. T. Mechanisms for the inhibition of DNA methyltransferases by tea catechins and bioflavonoids. *Mol. Pharmacol.* **68**, 1018–1030 (2005).
131. Chendong, Y. *et al.* Glioblastoma cells require glutamate dehydrogenase to survive impairments of glucose metabolism or Akt signaling. *Cancer Res.* **69**, 7986–7993 (2009).
132. Sun, S. *et al.* Inhibition of prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide (P4HB) attenuates temozolomide resistance in malignant glioma via the endoplasmic reticulum stress response (ERSR) pathways. *Neuro. Oncol.* **15**, 562–577 (2013).
133. Xipell, E. *et al.* Endoplasmic reticulum stress-inducing drugs sensitize glioma cells to temozolomide through downregulation of MGMT, MPG, and Rad51. *Neuro. Oncol.* **18**, 1109–1119 (2016).
134. Gutiérrez, T. & Simmen, T. Endoplasmic Reticulum Chaperones and Oxidoreductases: Critical Regulators of Tumor Cell Survival and Immunorecognition. *Front. Oncol.* **4**, (2014).
135. Dadey, D. Y. A. *et al.* The ATF6 pathway of the ER stress response contributes to enhanced viability in glioblastoma. *Oncotarget* **7**, 2080–2092 (2016).
136. Mollereau, B. *et al.* Adaptive preconditioning in neurological diseases – therapeutic insights from proteostatic perturbations. *Brain Research* **1648**, 603–616 (2016).
137. Chen, X. *et al.* XBP1 promotes triple-negative breast cancer by controlling the HIF1 α pathway. *Nature* **508**, 103–107 (2014).
138. Huber, A. L. *et al.* P58IPK-Mediated Attenuation of the Proapoptotic PERK-CHOP Pathway Allows Malignant Progression upon Low Glucose. *Mol. Cell* **49**, 1049–1059 (2013).
139. Wang, Q. *et al.* ERAD inhibitors integrate ER stress with an epigenetic mechanism to activate BH3-only protein NOXA in cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 2200–2205 (2009).
140. Mellai, M. *et al.* <i>SEL1L</i> SNP rs12435998, a predictor of glioblastoma survival and response to radio-chemotherapy. *Oncotarget* **6**, 12452–12467 (2015).
130. Tom A. Rapoport, Harvard Medical School, Boston, MA, and approved December 9, 2008 (received for review August 4, 2008)



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Promotionsbüro
Medizinische Fakultät



Eidesstattliche Versicherung

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Alisha Haug
Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand