

Aus der

Universitätsklinik für Radioonkologie mit Poliklinik Tübingen

**Aldehyd-Dehydrogenase-Inhibition zur Therapie-
Sensibilisierung von Glioblastom-Stammzellen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Groß, Lisa

2023

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Huber

2. Berichterstatter: Professor Dr. T. Wieder

Tag der Disputation: 22.12.2022

I. Inhaltsverzeichnis	
<i>I. Inhaltsverzeichnis</i>	3
<i>II. Abbildungsverzeichnis</i>	5
<i>III. Tabellenverzeichnis</i>	5
<i>IV. Abkürzungsverzeichnis</i>	6
1. Einleitung	9
1.1 Problemstellung und Relevanz des Themas	9
1.1.1 Glioblastoma Multiforme (GBM)	9
1.1.2 Tumorstammzellhypothese	11
1.1.3 Glioblastom Subgruppen	13
1.1.4 Aldehyd-Dehydrogenase	14
1.1.5 Medikamentöse Therapiemöglichkeiten	16
1.1.5.1 Disulfiram	16
1.1.5.2 Temozolomid	20
1.2 Zielsetzung der Arbeit	21
2. Material und Methoden	21
2.1 Zellkultur	21
2.1.1 TSZ-Isolierung	21
2.1.2 Splitting Protokoll	23
2.2 Bestrahlung	23
2.3 Polymerase Ketten Reaktion	24
2.3.1 Probenvorbereitung	24
2.3.2 RNA-Isolierung	24
2.3.3 RNA-Konzentrationsbestimmung	25
2.3.4 RT-qPCR	25
2.4 Western Blot	27
2.4.1 Proteinextraktion	27
2.4.2 SDS-Page	27
2.4.2.1 Gel-Herstellung	27
2.4.2.2 Elektrophoretische Auftrennung	28
2.4.3 Blotting	28
2.4.4 Immundetektion	29
2.5 Durchflusszytometrie	30
2.5.1 Aldeflour-Protokoll	30
2.5.2 Nicoletti-Protokoll	31
2.6 Limiting Dilution Assay (LDA)	32
2.7 Statistische Auswertung	34
2.8 Materialien	34
2.8.1 Puffer	34

2.8.2 Chemikalien.....	37
2.8.3 Labormaterial	39
2.8.4 Technische Geräte und Software.....	39
3. Ergebnisse	41
3.1 Charakterisierung der Glioblastomstammzellmarker	41
3.2 Vergleich der ALDH-Expression	43
3.2 Dosiswirkungskurve DSF	44
3.3 Durchflusszytometrie	45
3.3.1 ALDEflour-Fluoreszenz Intensität	45
3.3.2 Zellzyklus	46
3.4 Klonogenes Überleben	50
4. Diskussion	56
4.1 Disulfiram als Glioblastom Therapeutikum	56
4.2 Die radiosensibilisierende Wirkung von Disulfiram	58
4.3 Kupfer induziert Oxidativen Stress	59
4.3 Beeinflusst DSF vor allem Stammzellen vom mesenchymalen Typ?	60
4.4 Disulfiram in klinischen Studien	60
4.5 Fazit.....	61
5. Zusammenfassung.....	62
6. Literaturverzeichnis	64
7. Erklärung zum Eigenanteil	75
8. Veröffentlichung.....	76
9. Danksagung.....	77

II. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Tumorentstehung aus normalen Stammzellen	12
Abb. 2: ALDH1A3-assoziiertes Gesamtüberleben von Glioblastompatienten	15
Abb. 3: Metabolisierung von DSF und Reaktion mit Kupfer (Cu ²⁺)	17
Abb. 4: LK7 und LK17 Glioblastom-Tumorstammzellen	22
Abb. 5: PCR-Ablauf.....	26
Abb. 6: Schematischer Aufbau eines Western Blots	28
Abb. 7: Schema Durchflusszytometrie	32
Abb. 8: Verdünnungsreihe des LDA.....	33
Abb. 9: GBM-Stammzellmarker in LK7 und LK17	42
Abb. 10: ALDH1A3 Expression in LK7 und LK17	43
Abb. 11: Dosis-Wirkungskurve Disulfiram	44
Abb. 12: ADLEflour-Fluoreszenz Intensität	45
Abb. 13: Zellzyklusanalyse LK7	47
Abb. 14: Zellzyklusanalyse LK17	49
Abb. 15: Klonogene Überleben von LK7	52
Abb. 16: Klonogenes Überleben von LK17	54

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien	37
Tabelle 2: Labormaterial	39
Tabelle 3: Technische Geräte und Software	39

IV. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Celsius
μ	Mikro
ACTB	Beta-Aktin
ALDH	Aldehyd Dehydrogenase
ALDH1A3	Aldehyde Dehydrogenase 1 A3
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
BSA	Bovines Serum Albumin
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CuSO ₄	Kupfer(II)-sulfat
Da	Dalton
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulphoxid
DNA	Desoxyribunukleinsäure
DSF	Disulfiram
EGFR	Epidermal growth factor receptor
FABP2	Fatty acid-binding protein 2
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GBM	Glioblastoma Multiforme

GSZ	Glioblastomstammzellen
Gy	Gray
h	Hour
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HRP	horseradish peroxidase
k	Kilo
Km	Michaeliskonstante
L	Liter
LDA	Limiting Dilution Assay
m	Meter
M	Mol/l
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
Min	Minute
mRNA	Messenger RNA
MSI-1	Musashi 1
MV	Mega Volt
n	Anzahl
NOTCH	Transmembranprotein des Notch-Signalweges
p53	Tumor suppressor protein 53
PBS	Phosphate buffered saline solution
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PDHB	Pyruvat-Dehydrogenase Beta
PE	Plating Efficiency
pH	potential of hydrogen
PI	Propidium Iodid

PROM1	Prominin-1
rhbFGF	human recombinant basic fibroblast growth factor
RKI	Robert Koch Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RT-qPCR	Reverse transcription quantitative real time PCR
SF	Survival Fraction
SOX2	Sex determining region Y (SRY)- box 2
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TMZ	Temozolomid
TSZ	Tumorstammzellen
U/min	Umdrehungen pro Minute
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentrale Nervensystem

1.Einleitung

1.1 Problemstellung und Relevanz des Themas

1.1.1 Glioblastoma Multiforme (GBM)

Glioblastome gehören zu den diffus infiltrierenden und hochmalignen hirneigenen Tumoren des Menschen. Nach der neuen Klassifikation der World Health Organization (WHO) von 2016, zählen sie zu den Grad-IV-Tumoren und gehen mit einer sehr schlechten Prognose von ca. 14-23 Monaten medianer Überlebenszeit einher (Louis et al., 2016, Stupp et al., 2009). Die jährliche Inzidenz weltweit beträgt laut der deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN) ca. 3,2 pro 100.000 Einwohner (Wick W., 2021). Damit ist das Glioblastom die am häufigsten vorkommende primäre cerebrale Neoplasie unter Erwachsenen (Kraywinkel and Spix, 2019). Das durchschnittliche Erkrankungsalter der Patienten liegt bei ca. 62 Jahren. 2016 sind laut Robert Koch Institut (RKI) ca. 7400 Menschen an einem bösartigen Hirntumor erkrankt, hierunter waren es 3460 Frauen und 3970 Männer (Koch-Institut and e.V., 2019).

Das Glioblastoma Multiforme entsteht durch pathologische Vermehrung von neoplastisch transformierten Zellen neuronalen oder glialen Ursprungs und ist typischerweise frontotemporal lokalisiert. Das Wachstum erfolgt überwiegend entlang von Leitungsbahnen innerhalb der Substantia alba. Zusätzlich ist eine Infiltration in die Meningen und Dura mater möglich. Eine Metastasierung außerhalb des Zentralen Nervensystems (ZNS) ist jedoch selten (Jörg-Christian Tonn, 2006).

Die aktuelle Leitlinientherapie besteht derzeit aus weitestmöglicher chirurgischer Resektion des Tumors, gefolgt von einer kombinierten adjuvanten Strahlenchemotherapie. Die Gesamtstrahlendosis beträgt ca. 60 Gray (Gy), welche in 30-33 Sitzungen (30-33x2 Gy) aufgeteilt wird. Zusätzlich erhalten die Patienten eine Chemotherapie mit Temozolomid (TMZ) in 6 Zyklen (Stupp et al., 2005).

Aufgrund des diffusen Wachstums des Tumors kann eine Totalresektion mit einem R0-Status (Entfernung des Tumors im Gesunden) in der Regel nicht

erfolgen (Holland, 2000). Auch in Kombination mit der Radiochemotherapie ist eine vollständige Entfernung aller verbleibenden Tumorzellen fast unmöglich.

Zusätzlich stellt das Vorhandensein der Blut-Hirnschranke eine besondere Barriere dar. Viele Chemotherapeutika sind nicht in der Lage diese zu überwinden, weshalb Glioblastome häufig auch als „privilegiert“ angesehen werden (Sminia and Westerman, 2016).

Eine weitere große Herausforderung für die Entwicklung neuerer Therapiemöglichkeiten ist die molekulare und genetische Vielfalt des GBMs (Parker et al., 2015).

In den letzten 20 Jahren wurden in der Literatur bereits hunderte von molekularen Alterationen beschrieben, von denen einige besonders erwähnenswert sind und von therapeutischem Nutzen sein könnten. Hierzu gehören Mutationen von Tumorsuppressorgenen, wie zum Beispiel im P53- (87 % aller primären GBM), oder Retinoblastom-Gen (78 % der primären GBM) (The et al., 2008, Aldape et al., 2015). Weiter konnten Amplifikationen im EGFR- Gen in ca. 50 % der Tumoren nachgewiesen werden. Diese fördern das Tumorwachstum und gehen mit einer etwas schlechteren Prognose einher (Aldape et al., 2015).

Molekulare Marker können aber nicht nur für prognostische und prädiktive Zwecke verwendet, sondern auch therapeutisch genutzt werden. Derzeit gibt es viele verschiedene Forschungsansätze bei denen durch Inhibition spezifischer Proteine versucht wird, ein besseres Überleben der Patienten zu erzielen.

1.1.2 Tumorstammzellhypothese

Bereits in den 1970er wurde erstmalig beobachtet, dass nur ein geringer Teil der Tumorzellen zur Bildung von Tumoren befähigt ist. Im weiteren Verlauf der Forschung war es möglich bestimmte Oberflächenmarker zu identifizieren, welche zuvor mit Stammzellen assoziiert waren. Aufgrund dieser beiden Entdeckungen wurde 1997 von den kanadischen Forschern Dominique Bonnet und John Dick die Theorie der Tumorstammzellen (TSZ) aufgestellt (Bonnet and Dick, 1997, Kopper and Hajdú, 2004).

TSZ weisen typische Eigenschaften von Stammzellen auf. Hierzu gehören die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, eine hohe Proliferations-Kapazität, das Potenzial zur Differenzierung, die Fähigkeit zur Induktion von Angio- und Vaskulogenese, sowie eine hohe Expression von Arzneistofftransportern (Kreso and Dick, 2014, Shackleton, 2010). Des Weiteren wird vermutet, dass sie gegen gängige Therapieansätze, wie Strahlungs- und Chemotherapie, resistent sind und deshalb zu Rezidiven, sowie zu Metastasen führen können (Codd et al., 2018).

In mehreren *in vitro* und *in vivo* Studien wurden mittlerweile TSZ als Subgruppe unterschiedlicher Tumorentitäten nachgewiesen (Al-Hajj et al., 2003, Collins et al., 2005, Hemmati et al., 2003, O'Brien et al., 2007, Ricci-Vitiani et al., 2007). Auch beim Glioblastom ist es bereits gelungen Tumorstammzellen funktionell zu identifizieren und zu isolieren (Singh et al., 2003).

Zu den Entstehungsmechanismen von Glioblastomstammzellen (GSZ) ist momentan noch nicht viel bekannt (Gupta et al., 2009). Es wird davon ausgegangen, dass wie in Abbildung 1 zu erkennen ist, Mutationen neur(on)aler Stammzellen für die Entstehung cerebraler Neoplasien verantwortlich sind (Soltysova et al., 2005). Darüber hinaus haben Forschungsstudien ergeben, dass Mutationen in multipotenten Vorläuferzellen, die ursprünglich für die Bildung von Astrozyten und Oligodendrozyten zuständig waren, zur Bildung von Glioblastomstammzellen führen können. Somit besitzen Tumorstammzellen ein hohes tumorerzeugendes Potenzial (Codd et al., 2018).

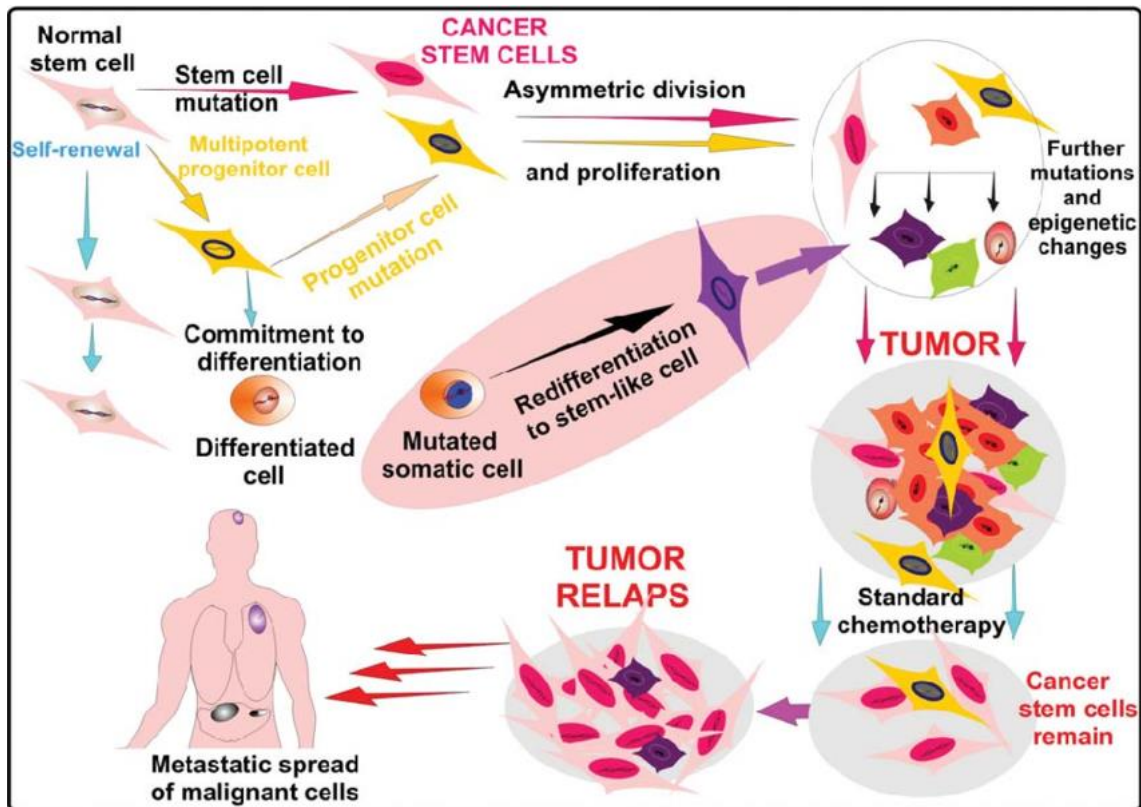


Abb. 1: Tumorentstehung aus normalen Stammzellen

Mutationen normaler Stammzellen oder Vorläuferzellen führen zu TSZ mit stammzellähnlichen Eigenschaften. Diese TSZ befinden sich häufig im inneren, hypoxischen Areal, des Tumorgewebes. Aufgrund dieser Lage und ihren Eigenschaften wie z.B. Selbsterneuerung, sind sie resistenter gegen eine Standard Chemo- und Strahlentherapie. Dies führt zur Rezidiv- und Metastasenbildung. Die Abbildung entstammt aus der Arbeit von (Soltysova et al., 2005).

Gegenwärtige Tumorthérapien zielen hauptsächlich auf den Tumor als Ganzes ab, der zum allergrößten Teil aus „differenzierten Tumorzellen“, d.h. aus nicht-TSZ besteht. Häufig sind solche Ansätze jedoch ineffizient und gerade TSZ können aufgrund ihrer hohen Radio- und Chemoresistenz nicht eliminiert werden (Li and Bhatia, 2011). Studien lassen vermuten, dass dabei der Lokalisation der TSZ innerhalb des Tumors eine Bedeutung zu kommt. TSZ befinden sich meistens in einer spezifischen, oft hypoxischen Tumor-Mikroumgebung (Soltysova et al., 2005). Dadurch wird der Zugang für Chemotherapeutika

eingeschränkt und die Wirksamkeit einer Radiotherapie geschwächt (Carnero and Lleona, 2016).

TSZ bleiben somit unbeschädigt, wohingegen differenzierte Tumorzellen zerstört und die Tumorgröße verkleinert werden kann (Meacham and Morrison, 2013).

Zur Identifikation der Glioblastomstammzellen innerhalb des Tumors ist der Nachweis spezifischer Membran- und intrazellulärer Proteine notwendig. Hierzu gehören unter anderem SOX2, NOTCH, MSI-1, PROM1, FABP2 und ALDH1A3 (Xu et al., 2017, Bradshaw et al., 2016)

1.1.3 Glioblastom Subgruppen

Bestimmte Oberflächenmarker, molekulare Mutations- und Expressionsprofile werden bereits zur molekularen (Sub-)Klassifizierung von Tumorentitäten genutzt. Bekannte Beispiele sind die 1p/19q-Kodeletion für die Charakterisierung des Oligodendroglioms und die BRAF-Mutation beim pilozystischen Astrozytom (Louis et al., 2016). Mit dessen Hilfe sind sowohl bessere Prognosen als auch die Optimierung der Behandlungsoptionen möglich.

Bereits 2006 gelang es Phillips et al. auch das Glioblastom anhand unterschiedlicher Proliferationsprofile in drei Subgruppen zu untergliedern: Proneural, proliferativ und mesenchymal (Phillips et al., 2006).

Im Jahr 2010 konnten aus dem „The Cancer Genome Atlas (TCGA)“ (Cancer Genome Atlas Research, 2008) welcher Daten aus drei unterschiedlichen Biodatenbanken zusammenfasst, insgesamt 840 differentiell exprimierte Gene identifiziert werden, mit denen das GBM in vier unterschiedliche molekulare Subklassen eingeteilt werden konnte: klassisch, mesenchymal, proneural und neuronal (Verhaak et al., 2010) Hierbei zeigten spätere Arbeiten, dass die neuronale Klasse große Anteile an Normalgewebe an den Infiltrationsrändern des Tumors widerspiegelt und deshalb keine eigenständige Subklasse des Glioblastoms darstellt (Huse et al., 2011, Zheng et al., 2012, Bhat et al., 2013, Patel et al., 2014, Behnan et al., 2019).

Besonderer Bedeutung kommt bei der mesenchymal-klassisch-proneural-Klassifizierung solchen Genen zu, die auch bei der Identifikation der Tumorstammzellen eine Rolle spielen. In weiteren molekularen Analysen war es bisher möglich Glioblastomstammzell-Subpopulationen zu identifizieren, die in den molekularen Subklassen unterschiedlich häufig auftreten. Mesenchymale Glioblastomstammzell-Marker finden sich vermehrt in mesenchymalen Tumoren, während proneurale Stammzellmarker in proneuralen Tumoren angereichert sind.

Präklinische Studien zeigen, dass mesenchymale Stammzellen einen aggressiveren Phänotyp und eine höhere Strahlenresistenz aufweisen als proneurale Stammzellen (Chandran et al., 2015, Mao et al., 2013). Retrospektive Daten lassen zudem darauf schließen, dass Glioblastom-Patienten mit dem mesenchymalen Subtyp tendenziell kürzer überleben als andere Subtypen (Bhat et al., 2013)

1.1.4 Aldehyd-Dehydrogenase

Wie bisherige Veröffentlichungen zeigen, gehen mesenchymale Tumoren häufig mit einer hohen Expression des mesenchymalen Stammzellmarkers Aldehyddehydrogenase-1A3 (ALDH1A3) einher, weshalb dieses Enzym Gegenstand aktueller Forschung ist (Mao et al., 2013, Cheng et al., 2016, Chen et al., 2016, Li et al., 2018a).

Die Aldehyd-Dehydrogenasen (ALDH) umfassen mehrere Gruppen von Enzymen, die im Stoffwechsel vieler Lebewesen Aldehyde oxidieren. Bisher sind neunzehn ALDH-Gene im Menschen beschrieben worden, die meist spezifisch für verschiedene Substrate sind (Koppaka et al., 2012).

Auffällig ist, dass die Expression der ALDH1A3 im Glioblastom häufig mit der Überlebenszeit korreliert, wie in der Kaplan-Meier-Kurve in Abbildung 2 zu erkennen ist. Das kumulative Überleben ist umso länger, je niedriger die ALDH1A3 Expression ist.

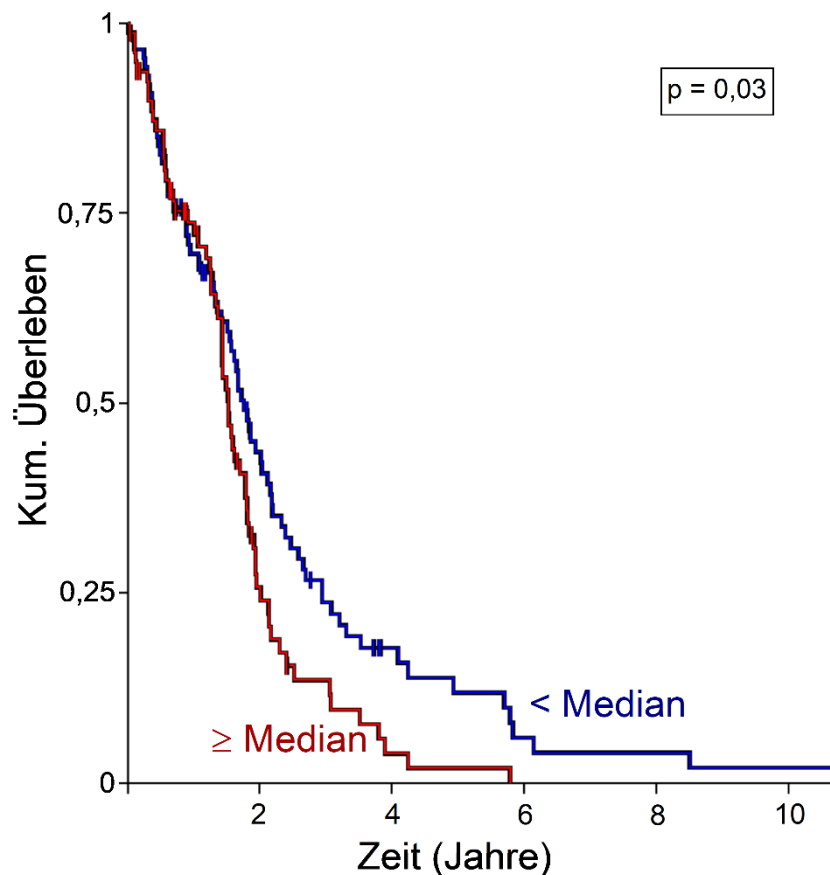


Abb. 2: ALDH1A3-assoziiertes Gesamtüberleben von Glioblastompatienten

Gesamtüberlebenskurve von Glioblastompatienten basierend auf TCGA-Daten (erstellt am 21.03.2021, GDC TCGA Glioblastoma (GBM) Datensatz mit Hilfe des Xena Functional Genomics Explorer) in Abhängigkeit der ALDH1A3 mRNA Abundanz im Glioblastomresektat. (Log-Rank Test, n= 167 Patienten).

Auch in anderen Tumorentitäten, wie beispielsweise dem Neuroblastom, verringert ein ALDH1A3-Knockout sowohl die Mitosefähigkeit als auch die Eigenschaft zur Selbsterneuerung (Flahaut et al., 2016). Bei Kopf-Hals-Tumoren hat man beobachtet, dass ein Knockdown der ALDH1A3 eine verstärkte Radiosensibilisierung bewirkt (Kurth et al., 2015).

Auf Basis dieser Datenlage gibt es seit einiger Zeit neue Therapieversuche, die ALDH1A3 spezifisch zu hemmen.

1.1.5 Medikamentöse Therapiemöglichkeiten

1.1.5.1 Disulfiram

Eine Möglichkeit die ALDH *in vivo* zu inhibieren, ist die Anwendung des Medikaments „Disulfiram“ (DSF). Disulfiram (Tetraethylthiuramdisulfid, Handelsname Antabus®) wurde erstmals 1951 von der Food and Drug Administration (FDA) geprüft und hemmt irreversibel und unspezifisch die Gruppe der Aldehyddehydrogenasen (Johansson, 1992).

Zugelassen wurde DSF ursprünglich zur unterstützenden Therapie der Abstinenz bei Alkoholabusus. Wird während einer Suchtbehandlung unerlaubt Alkohol konsumiert, kommt es zur Akkumulierung von Acetaldehyd. Dies führt zu einer vegetativen Symptomatik bestehend aus: Erythem, Vasodilatation, Hypotonie, sowie Tachykardie. Diese unangenehmen Auswirkungen sollen beim Patienten eine psychologisch aversive Wirkung hervorrufen und letztendlich zu einer Reduktion des Trinkverhaltens führen (Mutschler et al., 2008).

Allerdings wurde im April 2011 die Herstellung von DSF in Deutschland eingestellt und der Entzug der Arzneimittelzulassung bei dem Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) beantragt. Dies erfolgte laut Angaben der Firma Nycomed nicht aus klinischen oder pharmakologischen Gründen. Bei der Herstellung von DSF soll es technische Schwierigkeiten gegeben haben (e.V., 2013).

Zu den pharmakokinetischen- und dynamischen Eigenschaften von DSF gibt es mittlerweile umfassende Informationen (Wickström et al., 2007). Nach oraler Applikation wird DSF in der sauren Umgebung des Magens zu zwei Molekülen Diethylthiocarbamat reduziert. Diese wiederum bilden zusammen mit Kupfer (Cu^{2+}) hydrophobe Komplexe (Cu(II)-Diethyldithiocarbamat) aus (siehe Abbildung 3).

Als solche werden sie zu 80-90% im Gastrointestinaltrakt absorbiert (Micromedex, 2003). Anschließend erfolgt durch die erythrozytäre Glutathionreduktase im Blut eine erneute Spaltung zu Diethyldithiocarbamat-Monomeren. Aufgrund freier Sulfidbrücken kommt es zur Bindung an Thiolgruppen von Proteinen (Review (Meraz-Torres et al., 2020). Auch Albumin

scheint eine Rolle bei der Reduktion zu Diethyldithiocarbamat zu spielen (Agarwal et al., 1986).

In der Leber wird Diethyldithiocarbamat durch Thiopurine oder Thiolmethyltransferasen methyliert (Glauser et al., 1993) und durch Cytochrom-P450 Monooxygenasen oxidiert. Letztere sollen an der Inhibition der Aldehyddehydrogenasen beteiligt sein, indem kovalente Cysteinaddukte gebildet werden (Meraz-Torres et al., 2020).

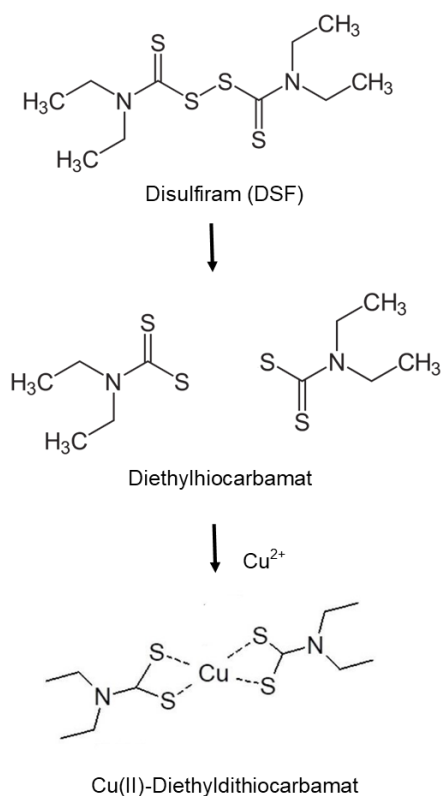


Abb. 3: Metabolisierung von DSF und Reaktion mit Kupfer (Cu^{2+})

Nach oraler Aufnahme von DSF wird es in seinen aktiven Metaboliten Diethylthiocarbamat metabolisiert. Dieser bildet zusammen mit Kupfer einen Komplex aus (Cu(II)-Diethyldithiocarbamat) und ist als solcher in der Lage in Zellen zu diffundieren.

Die maximal zugelassene Einzeldosis von Disulfiram beträgt 500 mg p.o., einmal täglich (Wickström et al., 2007). Dies führt zu einer totalen Plasmakonzentration zwischen 0,5-2 μM innerhalb von 6-10 h (Jensen et al., 1982).

Aufgrund der lipophilen und stark reaktiven Eigenschaften der Metaboliten kann davon ausgegangen werden, dass Disulfiram zum größten Teil protein-gebunden im Plasma vorliegt. Dadurch ist die freie Disulfiramkonzentration ein Vielfaches geringer als die totale Plasmakonzentration. Relevant ist zudem die Eigenschaft, dass Diethyldithiocarbamat die Blut-Hirn-Schranke passieren kann (Gunasekaran et al., 1983).

Wichtig zu erwähnen ist auch, dass bei der Anwendung von DSF von einer nebenwirkungsarmen Therapie beim Menschen ausgegangen werden kann (Mutschler et al., 2008). Speziell letztere Eigenschaft ist eine der Gründe, weshalb DSF in den letzten Jahren im Hinblick auf die irreversible ALDH-Inhibition, in der Tumorforschung stark an Bedeutung gewonnen hat.

Einige präklinische *in vitro* und *in vivo* Studien konnten antitumoröse, chemo- und/ oder strahlentherapie-sensibilisierende Eigenschaften von Disulfiram beschreiben (Review, (Lu et al., 2021). Hierzu gehören unter anderem die Inhibition der Proteasom- und NF- κ B-Aktivität, der Induktion des MAP-Kinase-Pathways und Wechselwirkungen auf reaktive Sauerstoffspezies (Viola-Rhenals et al., 2018, Koppaka et al., 2012, Liu et al., 2012). Des Weiteren induzierte DSF die Apoptose und zelluläre Seneszenz im Mammakarzinom (Robinson et al., 2013).

Auffällig ist, dass in vielen Studien Disulfiram mit Kupferionen co-inkubiert werden musste, um biologische Effekte zu erzielen. Es konnte gezeigt werden, dass Cu^{2+} den antitumorösen Effekt von Disulfiram verstärken kann (z.B. (Safi et al., 2014), (Lun et al., 2016)). In Tiermodellen erhöhte Disulfiram und Diethyldithiocarbamat den Cu^{2+} -Transport ins Gehirn, indem lipophile Kupferkomplexe gebildet wurden (Nomura et al., 2014, Allain and Krari, 1991). Durch die erhöhte Konzentration an Cu^{2+} -Ionen kommt es zur Reduktion von Hydrogenperoxid zu Hydroxyl-Radikalen (OH^*). Freie Hydroxyl-Radikale können unter anderem zu Protein- und DNA-Schäden in der Zelle führen (Liu et al., 2011). Diese Disulfiram/ Cu^{2+} -vermittelte Beeinträchtigung der Redox-Homöostase (Cen et al., 2004) könnte mitunter der Grund für die vielen unterschiedlichen beobachteten Wirkungen von Disulfiram sein.

Darüber hinaus wurde in präklinischen *in vivo*-Modellen für einige Tumorentitäten eine Steigerung der anti-tumorösen Immunantwort durch DSF gezeigt (Zhou et al., 2019, Sun et al., 2020). Diese Effekte von Disulfiram wurden unter anderem beim Melanom (Brar et al., 2004), Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (Duan et al., 2014), Hepatozellulärem-(Li et al., 2018b), Prostata-(Safi et al., 2014), Pankreas-(Kim et al., 2013) und Mammakarzinom (Chen et al., 2006), sowie dem Glioblastom (Lun et al., 2016, Westhoff et al., 2013) beschrieben.

In vitro wurde gezeigt, dass Disulfiram mit Chemotherapeutika interagieren und deren Wirkung potenzieren kann. Darunter gehören Cisplatin, Gemcitabin, Paclitaxel, Docetaxel, Cyclophosphamid und viele Weitere (Viola-Rhenals et al., 2018).

In den letzten zehn Jahren wurden bereits einige klinische Studien registriert, die den Zusammenhang zwischen Disulfiram und unterschiedlichen Krebserkrankungen untersuchen. Fünf dieser Studien befassen sich dabei mit Glioblastompatienten (siehe Review (Viola-Rhenals et al., 2018)). In den meisten dieser Veröffentlichungen wird Disulfiram als Coadjuvant angewendet (Kast et al., 2013, Kast et al., 2014). Neueste klinische Studien zum neu diagnostizierten (Huang et al., 2018) und rezidivierenden Glioblastomen (Huang et al., 2019, Jakola et al., 2018) untersuchten Disulfiram zusammen mit einer diätetischen Cu²⁺-Supplementierung, während einer Chemotherapie mit Temozolomid. Genannte Patientengruppen hatten zuvor eine Standard-Radiochemotherapie erhalten. Diese Studien zeigten, dass Disulfiram bei einer Dosis von 500 mg täglich sicher, ohne größere Nebenwirkungen, mit Temozolomid kombiniert werden konnte (Huang et al., 2016, Huang et al., 2018). Die Autoren lieferten dabei starke Gründe für die klinische Anwendung von DSF bei neu diagnostizierten Glioblastom, sowie bei Patienten mit Rezidiven, die eine Resistenz gegen das derzeit verwendete Chemotherapeutikum, Temozolomid, erworben haben (Huang et al., 2018).

1.1.5.2 Temozolomid

TMZ ist ein Zytostatikum und gehört zu den alkylierenden Substanzen. Es entfaltet seine antineoplastische Wirkung, indem es Purinbasen an Position O6 und N7 des Guanins und N3 des Adenins methyliert (Zhang et al., 2012) und dadurch die DNA-Replikation der Tumorzellen stört (FDA, 2011). Aufgrund dieser nukleären Veränderungen, kommt es durch DNA-Mismatch-Reparaturen zu DNA-Doppelstrangbrüchen innerhalb der Zelle (Drabløs et al., 2004, Kondo et al., 2010).

Nach oraler Applikation unterliegt es im Körper einer raschen Metabolisierung und wird in seine aktive Form, das Monomethyl-Triazeno-Imidazol-Carboxamid (MTIC), überführt (Friedman et al., 2000). Die maximale Wirkstoffkonzentration im Plasma, sowie im Tumor liegt bei 30-50 μM (Beier et al., 2012). Temozolomid ist im Gegensatz zu anderen Zytostatika in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Die häufigsten Nebenwirkungen von Temozolomid sind Blutbildveränderungen wie z.B. eine Thrombozytopenie und Neutropenie (FDA, 2011).

Für den Behandlungserfolg von TMZ kommt dem Methylierungsstatus der Promotorregion des O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)-Gens eine zentrale Bedeutung zu (Natsume et al., 2005, Wirsching et al., 2016). Dieser dient beim neu diagnostizierten Glioblastom als prädiktiver sowie als prognostischer molekularer Marker für das Ansprechen auf Temozolomid (Hegi et al., 2005). Gleichzeitig lässt sich mit Hilfe des Methylierungsstatus die Prognose des Patienten einschätzen. Liegt die MGMT methyliert vor, ergibt sich ein medianes Überleben von ca. 23 Monaten, nicht methyliert liegt es bei ca. 14 Monaten (Silvia Hofer, März 2019, Hegi et al., 2008).

Die MGMT ist ein Reparaturprotein im Zellkern, welches den antineoplastischen Effekt von Alkylanzien antagonisieren kann. Während dieses Prozesses geht MGMT selbst zugrunde (Weller, 2014). Kann die O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase nicht rechtzeitig von der Tumorzelle nachgebildet werden, können die Schäden, die durch TMZ entstanden sind, nicht rückgängig gemacht werden. Die Zelle wird apoptotisch (Weller et al., 2010).

Dies ist der Grund, weshalb TMZ derzeit auch bei Patienten mit einem MGMT-Wildtyp angewendet wird. Hegi et. al zeigten 2005, dass das mittlere Überleben unabhängig ihres MGMT-Status durch eine Radiochemotherapie im Vergleich zur alleinigen Radiotherapie verlängert werden kann (Hegi et al., 2005).

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, *in vitro* einen möglichen Temozolomid- und radiosensibilisierenden Effekt von Disulfiram/Cu²⁺ auf die Zellzykluskontrolle und das klonogene Überleben von Isocitratdehydrogenase (IDH)-Wildtyp, MGMT-unmethylierten primären Glioblastomstammzellen zu definieren. Zusätzlich wird die Abhängigkeit der Disulfiram/Cu²⁺ mit dem mesenchymalen Stammzellmarker ALDH1A3 untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 TSZ-Isolierung

Die in dieser Arbeit verwendeten GBM-Stammzellen entstammten aus humanem Glioblastomgewebe. Mit Zustimmung der Patienten, sowie der örtlichen Ethikkommission (Projekt Nr. 579 / 2015BO2 und BO2-2, 184/2015BO1) wurden aus Tumorproben, welche von der Abteilung für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Tübingen reseziert wurden, Primärkulturen von Glioblastomstammzellen angelegt.

Für die Gewinnung der TSZ aus den Präparaten, wurden die Proben in FCS-freiem HEPES-gepuffertem DMEM mit 1% Penicillin / Streptomycin gelöst und zu einer Suspension mechanisch vereinzelt.

Anschließend wurden die einzelnen Proben auf ihre stammzellähnlichen Eigenschaften mittels PCR und Western Blot untersucht und den zwei Subgruppen, proneural und mesenchymal, zugeordnet (Ganser et al., 2022). Zusätzlich bestimmte das Institut für Pathologie den MGMT-Status der einzelnen Tumore.

Um eventuelle Unterschiede zwischen der Expressionsstärke der ALDH1A3 und der Auswirkung von DSF auf GSZ zu verdeutlichen, wurden alle Versuche mit einer überwiegend mesenchymalen (LK7) und einer eher proneuralen (LK17) Stammzelllinie durchgeführt.

LK7 wuchs in Kultur konfluent und adhärent, wohingegen (Abb. 4; **A**) LK17 teilweise adhärente und freischwimmende Neurosphäroide ausbildete (Abb. 4; **B**). Beide Zelllinien waren MGMT-Wildtypen; d.h. das MGMT-Gen ist nicht methyliert.

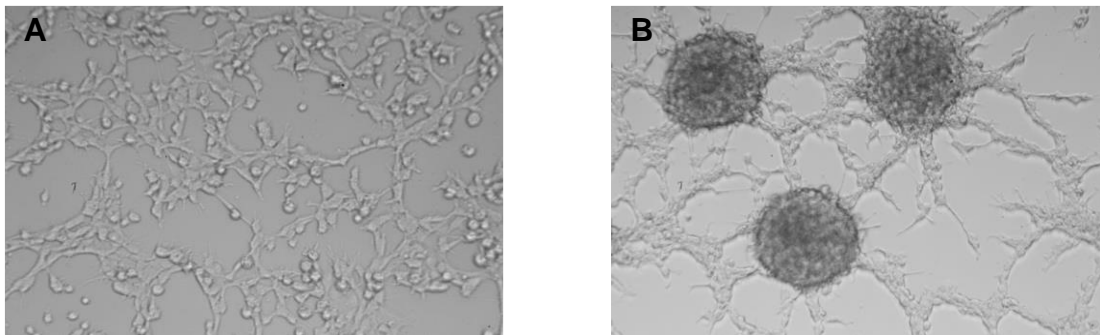


Abb. 4: LK7 und LK17 Glioblastom-Tumorstammzellen

A: adhärent wachsende Glioblastomstammzellen LK 7, in NeuroCult™ Medium, **B:** adhärent wachsende Spheres LK 17 in NeuroCult™ Medium. Kultiviert unter Standardbedingungen (37 °C und 5% CO₂).

Die GBM-Zellen wurden in NeuroCult™ NS-A-Proliferationsmedium unter Standardbedingungen (37°C und 5% CO₂) kultiviert. Zusätzlich wurden dem Medium 20 ng/ml rhEGF (humaner rekombinanter epidermaler Wachstumsfaktor), 10 ng/ml rhbFGF (humaner rekombinanter basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor) und 0,0002% Heparin hinzugefügt. Um eine konstante Menge an Wachstumsfaktoren sicherzustellen, gab man alle zwei Tage 0,5 ml frisches NSC-Medium hinzu. Die Zellen wurden bis zu darauffolgenden Versuchen oder einer maximalen Größe von ca. 150-200 µM pro Sphäroid für die Passage in Kultur gehalten.

2.1.2 Splitting Protokoll

Um die Zellen für die Versuche vorzubereiten, zu passagieren oder zu zählen wurde das alte Medium aus den Kulturflaschen entfernt und 3 ml Accutase hinzugegeben. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur, konnte die Reaktion mittels neurophysiologischen Mediums gestoppt und die Zellen in ein 15 ml Eppendorf-Gefäß überführt werden.

Anschließend wurden die Zellen bei 1000 U/min für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Resuspension mit 1 ml frischem Medium wurde die gewünschte Zellzahl mit Hilfe eines Hämozytometers (Neubauer-Zählkammer) ausgezählt und berechnet.

Zur Weiterkultivierung der Zellen wurden 10 ml NeuroCult™ NS-A-Proliferationsmedium in eine 75 cm² Kulturflasche pipettiert und die gewünschte Anzahl an Zellsuspension hinzugefügt.

2.2 Bestrahlung

Die GBM-Stammzellen wurden mit 0, 2, 4, 6 oder 8 Gy bei einer Dosisrate von 2 Gy / min unter Verwendung eines Linearbeschleunigers mit 6MV Photonen bestrahlt. Nicht bestrahlte Proben wurden ebenfalls mit in den Kontrollraum genommen, um gleiche Bedingungen zu gewährleisten. Die Bestrahlung erfolgte in allen Versuchen 1 Stunde nach der Zugabe von DSF/CuSO₄ und/ oder TMZ/CuSO₄.

2.3 Polymerase Ketten Reaktion

2.3.1 Probenvorbereitung

Um die Proben vorzubereiten, wurden die Zellen in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt und 5 min bei Raumtemperatur bei 1200 U / min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das verbleibende Zellpellet, konnte zur RNA-Isolierung verwendet werden.

2.3.2 RNA-Isolierung

Unter Verwendung des NucleoSpin® RNA-Kits wurde die RNA gemäß des Herstellerprotokolls isoliert (Macherey-Nagel, 2015).

Durch die Zugabe von 350 µl RA1 Puffer und 3,5 µl β-Mercaptoethanol auf die Zellen, wurden diese lysiert. Im Anschluss konnte das Lysat mit Hilfe des NucleoSpin®-Filters durch 1-minütige Zentrifugation (11.000 U/min bei Raumtemperatur) in einem 2 ml Sammelröhrchen gefiltert werden.

Der Filter konnte nun verworfen werden. Nach Zugabe von 350 µl Ethanol (70%) zu dem Lysat, wurde dieses mehrfach gemischt. Das Lysat wurde in eine NucleoSpin®RNA-Säule überführt und erneut 30 s bei 11.000 U/min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Anschließend wurden 350 µl Membranentsalzungspuffer (MDB) auf die Säule pipettiert und das Gemisch für 1 min bei 11.000 U/min zentrifugiert.

Im nächsten Schritt wurden 90 µl Reaktionspuffer und 10 µl rekonstituierte rDNase miteinander gemischt. 95 µl des hergestellten Reagenzes wurden auf die Membran der Säule gegeben und für weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurden 200 µl RAW2 Puffer der Membran hinzugefügt, um die rDNase-Aktivität zu inhibieren. Woraufhin erneut ein Waschschrift mit 600 µl RA3 Puffer und anschließender Zentrifugation bei 11.000 U/min für jeweils 30 s folgte. Nachfolgend wurde die Säule in ein neues 2 ml-Sammelröhrchen gegeben. Mit Hilfe von 250 µl RA3 Puffer wurde ein zweiter Waschschrift durchgeführt und im Anschluss für weitere 2 min bei 11.000 U/min zentrifugiert.

Die Säule wurde abschließend in ein 1,5 ml Nuklease-freies Sammelröhrchen überführt. Unter Zugabe von 60 μ l RNase-freiem H₂O und 1-minütiger Zentrifugation bei 11.000 U/min konnte reine RNA eluiert werden.

2.3.3 RNA-Konzentrationsbestimmung

Nachfolgend konnte mit Hilfe des NanoPhotometers die RNA-Konzentration und deren Reinheit ermittelt werden. Die Kalibrierung wurde mit RNase-freiem Wasser durchgeführt. Die typische Absorptionswellenlänge für RNA lag bei 260 nm. Anhand dessen konnte die RNA-Konzentration der Probe gemessen werden. Die Reinheit der Probe wurde anschließend durch das Verhältnis der Absorptionswellenlänge von RNA und Protein (A₂₈₀ nm) berechnet. Das Verhältnis A₂₆₀ / A₂₈₀ sollte für eine hohe Reinheit größer 1,8 liegen. Im Anschluss wurde zusätzlich die Absorption bei einer Wellenlänge von 230 nm bestimmt. Das Verhältnis von A₂₆₀ / A₂₃₀ lässt Rückschlüsse auf die Kontamination der Probe zu. Hierfür wurde ein Wert höher als 2,0 angenommen.

2.3.4 RT-qPCR

Die quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion (RT-qPCR) mit reverser Transkription wurde unter Verwendung des 1Step RT qPCR Green ROX L-Kits nach Herstellerangaben (QIAGEN, 2012) durchgeführt.

Zuerst wurde ein Mastermix für jeden zu untersuchenden Primer pipettiert (10 μ l RT qPCR-Mix (2 \times), 1 μ l RT3-Mix, 2 μ l Primer). Pro Well einer 96-Multiwell-Platte wurden 13 μ l spezifischer Primer-Master-Mix und 40 ng RNA in einem Gesamtvolumen von 7 μ l RNase-freiem Wasser hinzugegeben. Zusätzlich wurde für jeden Primer eine Kontrolle unter Verwendung eines spezifischen Primer-Master-Mix und 7 μ l Nuclease-freiem Wasser hergestellt.

Die Platte konnte anschließend mit einer Folie versiegelt und 1 min bei 2.500 U / min zentrifugiert werden. Für die Messung der Genexpression wurde der LightCycler® 480-Instruments verwendet.

Das Programm durchlief wie in Abb. 5 zu erkennen, ein standardisiertes Programm. Es begann mit reverser Transkription für 10 min, bei 50 °C, anschließend folgte eine initiale Denaturierung für 2 min bei 95°. Daraufhin durchlief das Programm 40 Zyklen, bestehend aus 5 s Denaturierung bei 95 °C und nachfolgender Elongation für 30 s, bei 60 °C. Nach abschließender Denaturierung und Abkühlung über 10 s erfolgte ein erneutes Erhitzen bis 95°C.

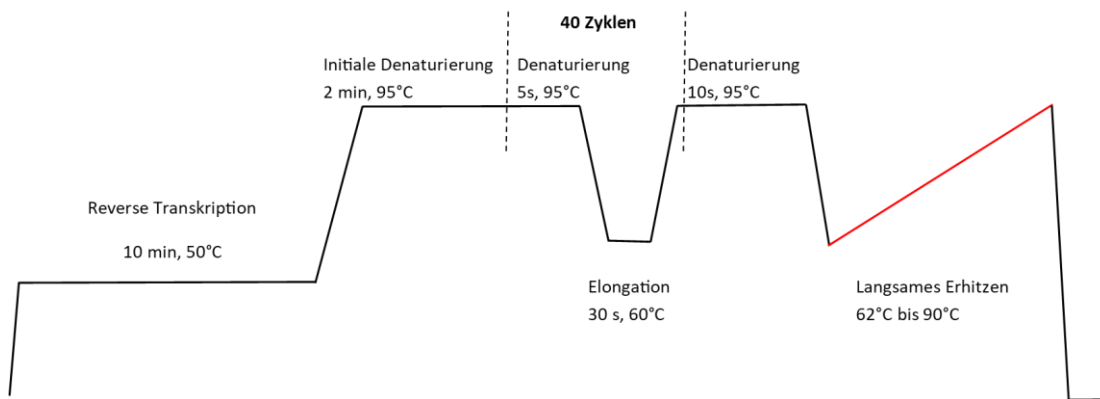


Abb. 5: PCR-Ablauf

Ablauf eines standardisierten 5 Schritte PCR-Programms, bestehend aus einer initialen Reversen Transkription, anfänglicher Denaturierung, gefolgt von 40 Zyklen abwechselnder Denaturierung und Elongation. Für die abschließende Quantifizierung und Messung der Fluoreszenz, werden die Proben erneut denaturiert und anschließend langsam erwärmt.

Im Anschluss an die PCR konnte die relative Häufigkeit jeder mRNA auf das geometrische Mittel der drei Housekeeper-mRNAs (GAPDH, ACTB, PDHB) normalisiert werden.

2.4 Western Blot

Zur Proteinbestimmung der ALDH1A3 wurden Isolate der Zelllinien LK7 und LK17 in jeweils drei unterschiedlichen Passagen verwendet.

2.4.1 Proteinextraktion

Für die Proteinisolation wurden Zellpellets der jeweiligen Zelllinie benötigt. Um die Zellen zu lysieren und die Proteine zu extrahieren, wurden sie in Abhängigkeit der Größe des Pellets mit 400-1200 µl RIPA-Puffer suspendiert.

Während einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Proben mehrmals gemischt, um eine Aggregation zu vermeiden. Anschließend wurden die Proben bei 14.000 U/min, 4°C für 15 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf Gefäß überführt. Unter Zuhilfenahme des Pierce™ BCA-Protein-Assay-Kits, basierend auf einer BSA (Rinderserumalbumin)-Verdünnungsreihe, konnte gemäß des Herstellerprotokolls die Proteinkonzentration der jeweiligen Probe mit Hilfe des ELISA-Readers bestimmt werden (ThermoFisher, 2020).

Um eine Vergleichbarkeit der jeweiligen Proben zu gewährleisten, konnte durch eine erneute Hinzugabe von RIPA-Puffer eine gewünschte Endkonzentration eingestellt werden. Nach 10-minütiger Inkubation bei 70°C, konnten die Proteinproben entweder bei -20°C gelagert oder direkt für die elektrophoretische Auftrennung weiter benutzt werden.

2.4.2 SDS-Page

2.4.2.1 Gel-Herstellung

Zunächst mussten die Gele für die Gelelektrophorese gegossen werden. Begonnen wurde mit dem Trenn-Gel der Stärke 10 %, welches zwischen zwei Glasplatten aufgetragen wurde. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel (6%) hinzugegeben und die Kämme eingeführt. Sobald auch das Sammelgel polymerisiert war, konnte dies verwendet werden. Falls das Gel erst am Folgetag benötigt wurde, konnte es feucht eingepackt über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gelagert werden (Laemmli, 1970).

2.4.2.2 Elektrophoretische Auftrennung

Für die elektrophoretische Auftrennung wurde die Gelelektrophoresekammer mit 10% SDS-Laufpuffer befüllt. Anschließend wurde 5µl eines Markers und 15µl der Proben auf das polymerisierte Gel aufgetragen. Nach 45 min Betrieb bei 60 V wurde die Spannung an der Stromversorgung für 2 h auf 160 V eingestellt (Laemmli, 1970).

2.4.3 Blotting

Um die Proteine vom SDS-Gel auf die Polyvinylidenfluoridmembran zu übertragen, wurde die Blotting-Apparatur wie in Abb. 6 zusammengefügt. Danach wurde die Apparatur in eine Elektrophoresekammer mit Transferpuffer für 90 min bei 80 V gegeben (Renart et al., 1979).

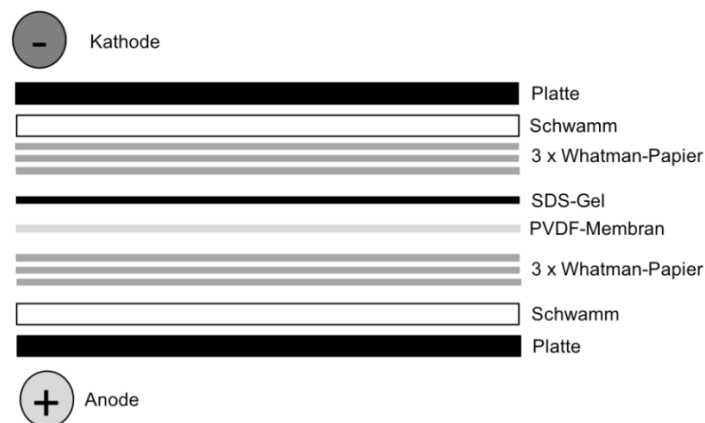


Abb. 6: Schematischer Aufbau eines Western Blots

Schematischer Aufbau eines Western Blots für den Transfer der Proteine vom SDS-Gel auf die PVDF-Membran. Das „Sandwich“ bestand aus 2 Platten, 2 Schwämmen, 6 Whatman-Papieren, dem SDS-Gel und einer PVDF-Membran. Die Proteine wurden in Richtung der Anode auf die Membran geblottet.

2.4.4 Immundetektion

Für den Nachweis einer erfolgreichen Proteinübertragung, konnte eine Gesamtproteinfärbung durchgeführt werden. Hierfür wurde die Membran in Tris-gepufferter Salzlösung mit Tween20 (TBS-T, chemische Zusammensetzung siehe Anhang) 5min lang gewaschen und anschließend 5min in „PonceauS“ gegeben (ThermoScientific, 2021). Dies ist ein roter Azofarbstoff, welcher Proteine auf Membranen reversibel anfärbt. Nach mehrmaligem Waschen in TBS-T war der Farbstoff vollkommen verschwunden. Es handelt sich bei diesem Verfahren um eine visuelle Kontrolle des Blots.

Um bei der anschließenden Färbung unspezifische Proteinbindungen zu vermeiden, musste nun die Membran 1h in Blocklösung (5 % Milchpulver in TBS-T) eingelegt werden. Daraufhin erfolgte die Inkubation des Primärantikörpers über Nacht bei 4°C auf einem Rotor. Es handelte sich bei diesem Antikörper um einen Anti-ALDH1A3 Antikörper mit einer Verdünnung von 1:1000 in 5% Milchpulver. Nach dieser Zeit folgten drei weitere Waschschritten mit TBS-T für jeweils 5 Minuten und anschließender Inkubation mit dem sekundären Antikörper.

Hierbei handelte es sich um einen ECLTM Anti-Rabbit-IgG horseradish peroxidase (HRP) gebundenen Antikörper mit einer Verdünnung von 1:10.000. Nach 1-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgten vier erneute Waschschriffe in TBS-T für 10 min.

Die Visualisierung der Proteine erfolgte unter Verwendung eines chemolumineszierenden Substrats, das während der HRP-katalysierten Zersetzung Licht emittiert. Nach Herstellerprotokoll wurde die Membran 1min mit Substrat inkubiert und die Chemolumineszenz mit Hilfe eines ChemiDoc-Bildgebungssystems gemessen. Die Quantifizierung der Proteinkonzentration wurde durch Graustufenanalyse anhand der ImageLab-Software vorgenommen.

Um eine Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten, fand eine erneute Immundetektion mittels des Primärantikörpers GAPDH (1:2000) und des Sekundärantikörpers ECLTM-Anti-Mouse-IgG-horseradish peroxidase

gebundener Antikörper statt. Die Durchführung erfolgte analog zur bevor beschriebenen Antikörperinkubation.

2.5 Durchflusszytometrie

2.5.1 Aldeflour-Protokoll

Die Aktivität der ALDH1 in unterschiedlichen Stammzelllinien wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell sorting (FACS)) unter Verwendung des ALDEFLOUR-Herstellerprotokolls bestimmt. Hierfür wurden die verwendeten Zellen von der Zellkulturflasche wie in Abschnitt 2.1.2 beschrieben, gelöst, vereinzelt und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

Insgesamt wurden 900.000 Zellen benötigt und in ein Eppendorf Gefäß übertragen. Dieses wurde bei 1000 U/min, 5 min zentrifugiert und das überschüssige Medium abgesaugt.

Anschließend wurden 1,5 ml Aldeflour Assay Buffer und 7,5 µl Aldeflour Reagenz in einem Eppendorf Gefäß gemischt. Um eine Kontrollfärbung herzustellen, wurden 5 µl DEAβ-Reagenz (ALDH-1 Kontroll-Inhibitor) in ein zweites Gefäß gegeben. Für die Untersuchung der Auswirkung von DSF auf die Aktivität der ALDH-1, wurden 5 µl DSF/CuSO₄ in einer Konzentration von 100 nM in ein drittes Eppendorf Gefäß pipettiert. Aus Eppendorf Gefäß Nr. 1 wurden anschließend jeweils 500 µl in Eppendorf-Gefäß 2 und 3 übertragen.

Alle drei Eppendorf-Gefäße inkubierten anschließend für 45 min im Dunkeln bei 37 °C und 5 % CO₂. Nach ablaufen der Zeit wurden die Tubes bei 1000 U/min, 5 min zentrifugiert, überschüssiges Medium entfernt, jeweils mit 250 µl Aldeflour Assay Buffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt.

Die Messung der Aktivität der ALDH1 konnte mittels Durchflusszytometrie (Becton-Dickinson, Heidelberg) bei einer Wellenlänge von 488 nm im Kanal FL-1 (log. Skala, 515-545 nm Emissionswellenlänge) und FL-3 (linear Skala, >670 nm Emissionswellenlänge) gestartet werden. Im Anschluss wurden alle Daten mittels FCS Express 3 Software nach Herstellerprotokoll analysiert (STEMCELL, 2016).

2.5.2 Nicoletti-Protokoll

Um die Auswirkungen von Disulfiram, Temozolomid und Bestrahlung auf den Zellzyklus zu untersuchen, wurden Durchflusszytometrie-Messungen mit Hilfe des Nicoletti-Protokolls durchgeführt.

Für die Messungen wurde der Farbstoff Propidium Iodid (PI) verwendet. Er ist ein Nukleinsäureinterkalator und kann die Zellmembran von apoptotischen Zellen, jedoch nicht von lebenden Zellen durchdringen. Diese Eigenschaft wird sich bei der Durchflusszytometrie zu Nutze gemacht, um die Zellviabilität zu bestimmen. Zusätzlich konnte mit Hilfe von PI der DNA-Gehalt im Zellkern bestimmt werden. Dies lässt Rückschlüsse auf den Zellzyklus zu.

Bevor die Durchflusszytometrie gestartet werden konnte, mussten die TSZ (50.000 Zellen/Well) mit der jeweiligen Bedingung behandelt werden:

- Kontrollgruppe: 100 nM CuSO₄ + 5 µl DMSO
- 100 nM DSF/ 100 nM CuSO₄
- 100 nM DSF/ 100 nM CuSO₄ + 30 µM TMZ
- 30 µM TMZ/ 100 nM CuSO₄

Eine Stunde nach Zugabe des Substrats wurden die Zellen mit 0, 4, oder 8 Gy bestrahlt und für weitere 48 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen abgelöst und mit PI für 30 min bei Raumtemperatur, in Dunkelheit angefärbt.

Die DNA-Menge konnte mit Hilfe der Durchflusszytometrie (488 nm Anregungswellenlänge) im Fluoreszenzkanal FL1 (logarithmische Skala, 515-545 nm Emissionswellenlänge) und FL-3 (lineare Skala, > 470 nm Emissionswellenlänge) gemessen werden. Die erhobenen Daten ergaben wie in Abb. 7 dargestellt ein Diagramm, anhand dessen mit Hilfe der Fläche unterhalb der Kurve der prozentuale Anteil an Zellen einer bestimmten Phase zugeordnet werden konnte. Die Daten wurden mit der FCS Express 3-Software analysiert (Nicoletti et al., 1991).

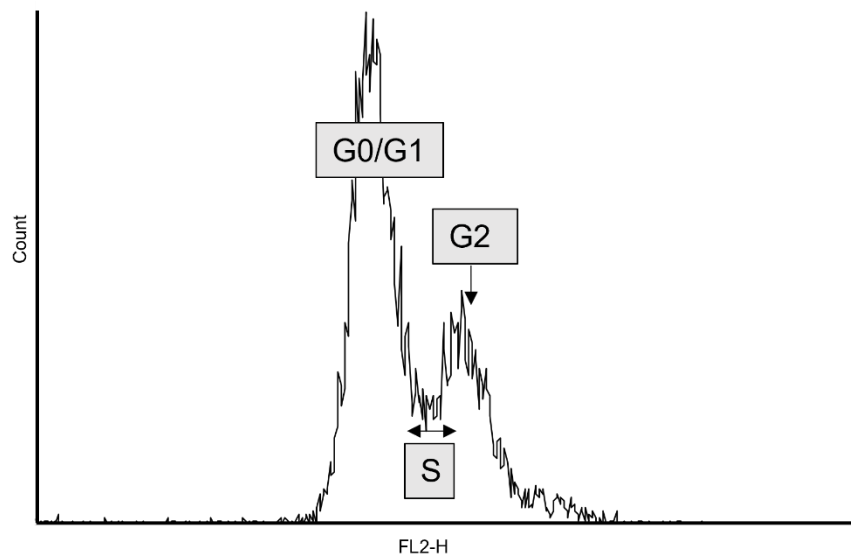


Abb. 7: Schema Durchflusszytometrie

Schematische Darstellung der Zellzyklusanalyse durch Propidium-Iodid Färbung und anschließender Durchflusszytometrie. Die Fläche innerhalb des ersten Peaks stellt den prozentualen Anteil an Zellen in der G_0/G_1 Phase dar. Die Fläche zwischen dem ersten und zweiten Peak stellt den Anteil an Zellen in der S-Phase und die Fläche innerhalb des zweiten Peaks den Anteil an Zellen in der G_2 -Phase dar.

2.6 Limiting Dilution Assay (LDA)

Um das klonogene Überleben der TSZ nach Bestrahlung mit 0, 2, 4, 6 Gy und gleichzeitiger Inhibierung der ALDH-1 durch Behandlung mit 100 nM DSF, 30 μ M TMZ und in Kombination DSF (100 nM) mit TMZ 30 μ M zu testen, wurden Limiting Dilution Assays durchgeführt (Taswell, 1987). Dazu mussten die Zellen zunächst, wie in Abschnitt 2.1 beschrieben, von der Zellkulturflasche gelöst, vereinzelt und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt werden.

Im Anschluss wurden pro Reihe in eine 96-Wellplatten 2048 Zellen ausgesät und nach folgendem Schema (siehe Abbildung 8) verdünnt:

	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
A	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1
B	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1
C	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1
D	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1
E	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1
F	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1
G	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1
H	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1

Abb. 8: Verdünnungsreihe des LDA

Schemahafte Verdünnungsreihe des Limiting Dilution Assays auf einer 96-Well-Platte. Initial werden 2048 Zellen ausgesät und bei jeder Verdünnung um die Hälfte reduziert, sodass nach 12 Verdünnungen eine Zelle pro Reihe übrigbleibt.

24 h nach der Aussaat, konnten die Zellen nach unterschiedlichen Vorgaben behandelt werden:

- Kontrollgruppe: 100 nM CuSO₄ + 5 µl DMSO
- 100 nM DSF/ 100 nM CuSO₄
- 100 nM DSF/ 100 nM CuSO₄ + 30 µM TMZ
- 30 µM TMZ/ 100 nM CuSO₄

Eine Stunde nach Zugabe der unterschiedlichen Medikamente wurden die 96-Well-Platten mit einer Einzeldosis bei Raumtemperatur von 0, 2, 4, 6 oder 8 Gy bestrahlt. Daran anschließend wurden die Zellen für weitere 14-28 Tage in An oder- Abwesenheit des Inhibitors inkubiert, die abschließende Zellzahl/ Anzahl an Spheres ausgezählt und mittels einer Kamera fotografiert.

Nun konnte die Plating Efficiency (PE) bestimmt werden. Diese berechnete sich aus der Anzahl der gezählten Zellen, dividiert durch die Zahl der ausgesäten Zellen. Die Survival Fraction (SF) ist der Quotienten aus der zuvor berechneten PE der bestrahlten Zellen mit der PE der nicht bestrahlten Kontrollgruppe und wurde mit Hilfe einer linear quadratischen Gleichung gefittet.

2.7 Statistische Auswertung

Für alle Daten wurden der Mittelwert +/- Standardfehler berechnet. Um Differenzen zwischen zwei Gruppen zu identifizieren, wurden der Welch-korrigierte zweiseitige t-Test angewendet. Berechnungen zwischen Gruppen mit mehr als 2 Proben wurden mittels nichtparametrischen Kruskal-Wallis ANOVA und Dunn's multiplen Mittelwertvergleich durchgeführt. Signifikanzen wurden mit * gekennzeichnet; (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$. Die Datenauswertung erfolgte mit GraphPad Prism (Version 8.4.0).

2.8 Materialien

2.8.1 Puffer

RIPA-Puffer (pH 7.6)

TRIS Base (1 M)	1,25 ml
NaCl (5 M)	1,50 ml
SDS 10%	0,5 ml
NaDOC	5 ml
Triton X 100	0,5 ml
dH ₂ O	ad 50 ml

Nach Einstellung des pH-Wertes Zugabe von:

1xTablette Protease-Inhibitor und Phosphatase Inhibitor Cocktail-2

Trenn- Puffer (pH 8.8)

TRIS Base	18,17 g
SDS 10%	4,00 ml
dH ₂ O	ad 100 ml
Einstellung des pHs mittels 32% HCl	

Sammel- Puffer (pH 6.8)

TRIS Base	6,06 g
SDS 10%	4 ml
dH ₂ O	ad 100 ml
Einstellung des pHs mittels 32% HCl	

10% Trenn-SDS-Gel:

Trenn-Puffer	3750 µl
dH ₂ O	6250 µl
Acrylamid-Methylenbisacrylamid (29:1)	5000 µl
Ammoniumpersulfat (APS) 30%	75 µl
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	7,5 µl
SDS 20%	75 µl

6% Sammel Gel

Sammel-Puffer	875 µl
dH ₂ O	1875 µl
Acrylamid-Methylenbisacrylamid (29:1)	750 µl
Ammoniumpersulfat (APS) 30%	35 µl
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	3,5 µl

4x sample buffer

SDS 20%	10 ml
TRIS Base (1 M)	10 ml
Glycerin	10 ml
dH ₂ O	17,5 ml
Bromphenolblau 0,1 %	2,5 ml

Lauf Puffer (1x)

Rotiphorese SDS Page (10x)	Roth (Art. Nr. 3060.1)
dH ₂ O	

Transfer Puffer (pH 8.3)

TRIS Base	3,03 g
Glycerin	14,04 g
Methanol	200 ml
dH ₂ O	ad 1000 ml
Einstellung des pHs mittels 5 M NaOH	

Tris-buffered saline/ TWEEN (pH8.0)

Tris-HCl (10 mM)	1,75 g
NaCl (150 mM)	8,76 g
TWEEN 20	1,00 ml
dH ₂ O	ad 1000 ml
Einstellung des pHs 8,0 mit 5 M NaOH	

Nicoletti-Lösung

Natriumcitrat 0,1 %	5ml
Triton X-100 (10 %)	50 µl
Propidium Iodid (1µg/ml)	100 µl

2.8.2 Chemikalien

Tabelle 1: Chemikalien

Chemikalie	Firma
1Step RT qPCR Green ROX L Kit	highQu, Kraichtal, Deutschland
70 % Ethanol	SIGMA-Aldrich, München, Deutschland
Anti-ALDH1A3 Antikörper	Thermo ScientificTMZ, Dreieich, Deutschland
Anti-GAPDH Antikörper	Thermo ScientificTMZ, Dreieich, Deutschland
Anti-Rabbit-IgG Meerrettichperoxidase gebundener AK (HRP)	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	New England BioLabs® GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
CuSO ₄	SIGMA-Aldrich, München, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	BioLegend®, Koblenz, Deutschland
Disulfiram	SIGMA-Aldrich, München, Deutschland
ECLTM-Anti-Mouse-IgG Meerrettichperoxidase (HRP) gebundener AK	GE Healthcare, Buckinghamshire, England
Fetal calf serum (FCS 100%)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Heparin	STEMCELL Technologies, Deutschland
Isopropanol	SAV LP GmbH, Flintsbach, Deutschland
NeuroCult™ NS-A Basal Medium	STEMCELL Technologies, Deutschland
NeuroCult™ Proliferation Supplement	STEMCELL Technologies, Deutschland

Nuclease-free water	highQu, Kraichtal, Deutschland
NucleoSpin® RNA Kit	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. Kg, Düren, Deutschland
Phosphatase Inhibitor cocktail-2	SIGMA-Aldrich, München, Deutschland
Phosphate buffered saline solution tabs (PBS)	Schüle & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
Ponceau S	Thermo ScientificTMZ, Dreieich, Deutschland
Protease-Inhibitor (complete tablets Mini EDTA-free)	Roche, Mannheim, Deutschland
rhbFGF	STEMCELL Technologies, Deutschland
rhEGF	STEMCELL Technologies, Deutschland
RNAse-free water	highQu, Kraichtal, Deutschland
RT qPCR Mix (2x)	highQu, Kraichtal, Deutschland
RT3 Mix	highQu, Kraichtal, Deutschland
β-Mercaptoethanol	SIGMA-Aldrich, München, Deutschland
Temozolomid	SIGMA-Aldrich, München, Deutschland
Trypanblau	SIGMA-Aldrich, München, Deutschland

2.8.3 Labormaterial

Tabelle 2: Labormaterial

Material	Firma
C-Chip (Neubauer Zählkammer)	Webcraft GmbH, Gottmadingen, Deutschland
Eppendorf Pipette Research	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Safe-Lock Tube	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf, Tips	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Falcon® Tube 15 ml	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Falcon® Tube 50 ml	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
IBS Integra Biosciences Pipetboy acu	Integra Biosciences, Hudson, USA
Polyvinylidenfluoridmembran	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Safe-Lock Tubes 0,5 ml PCR Clean	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
TC-Zellkulturflasche T25Stand, Vent. Cap	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
TC-Zellkulturflasche T75 Stand., Vent. Cap	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland

2.8.4 Technische Geräte und Software

Tabelle 3: Technische Geräte und Software

Gerät	Firma
Bestrahlungsgerät LINAC SL25	Elekta, Stockholm, Schweden
Blotting Apparatur	BioRad Laboratories, Feldkirchen, Deutschland
ChemiDoc Bildgebungssystem	BioRad Laboratories, Feldkirchen, Deutschland
Durchflusszytometer, FACS-Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

ELISA-Reader	Labtec Instruments GmbH, Salzburg, Österreich
Fluoreszenz Mikroskop, Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Gelektrophorese Apparatur	Biometra, Jena, Deutschland
Graph Pad Prism	GraphPad Software, San Diego, USA
ImageLab Software	BioRad Laboratories, Feldkirchen, Deutschland
Inkubator HERA cell 240	Thermo ScientificTMZ, Dreieich, Deutschland
Lichtmikroskop (Zellkultur), Wilovert S	Hund Wetzlar, Wetzlar, Deutschland
LightCycler 480 R System	Roche, Mannheim, Deutschland
Spannungsgerät	BioRad Laboratories, Feldkirchen, Deutschland
Sterilbank	BDK, Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

3. Ergebnisse

Alle die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse wurden bereits in der Originalarbeit mit dem Titel „Repurposing disulfiram for targeting of glioblastoma stem cells: an in vitro study“, Zirjacks et. al (Zirjacks et al., 2021) veröffentlicht.

3.1 Charakterisierung der Glioblastomstammzellmarker

Trotz identischer Kulturbedingungen zeigten primäre Glioblastomstammzellkulturen unterschiedliche Wachstumsphänotypen. Sie konnten konfluent und adhärent wachsen oder freischwimmende Neurosphäroide ausbilden (Klumpp et al., 2018).

Um die verwendeten Glioblastomzelllinien LK7 und LK17 auf ihre stammzellähnlichen Eigenschaften zu untersuchen und sie dadurch klassifizieren zu können, wurden RT-qPCR Analysen durchgeführt und unterschiedliche Stammzellmarker betrachtet (siehe Abb. 9). Zusätzlich wurden die Zellen mit 100 nM Disulfiram/ Cu^{2+} 24 h vorinkubiert und erneut auf ihre Stammzeleigenschaften überprüft. Auf mRNA-Ebene unterschieden sich LK7 und LK17 Zellen in der Expressionsstärke unterschiedlicher Stammzellmarker.

LK 17 exprimiert im Vergleich zu LK7 deutlich mehr Musashi-1 (MSI) und Promin-1 (PROM1, CD133), wohingegen die ALDH1A3 Expression signifikant in LK7 erhöht war. Auch die mit dem proneuralen Phänotyp assoziierten Stammzellmarker NOTCH1 und SOX2, zeigten eine erhöhte Expression in LK17 im Vergleich zu LK7 (siehe Abb. 9).

Durch die Vorinkubation mit DSF veränderte sich die Expressionstärke der Stammzellmarker ALDH1A3, SOX2, PROM1, FABP7 in LK7 nicht wesentlich. Allerdings wurde eine Zunahme der NOTCH1-mRNA Menge durch die Vorinkubation mit DSF in LK7 beobachtet. In LK17 schien DSF/ Cu^{2+} die mRNA-Menge aller Stammzellmarker bis auf ALDH1A3 zu reduzieren.

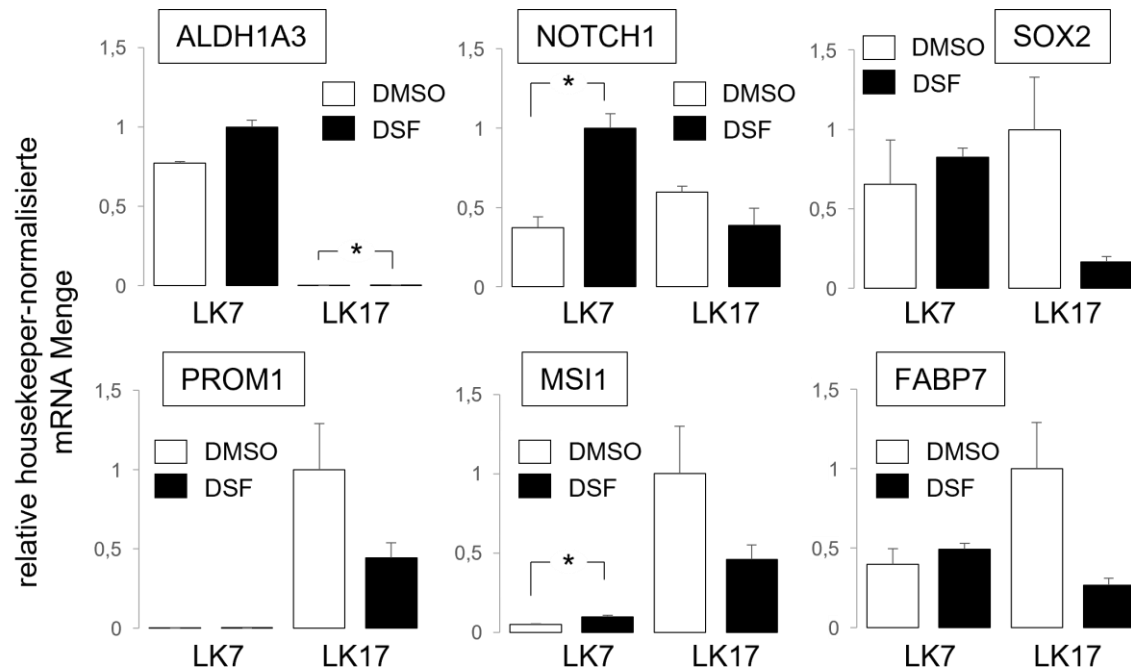


Abb. 9: GBM-Stammzellmarker in LK7 und LK17

Disulfiram/ Cu^{2+} verändert die Stammzeleigenschaften von LK 7 und LK 17 Glioblastomzelllinien. Abgebildet sind die mittleren ($\pm\text{SE}$, $n = 3$) auf die Housekeeper-normalisierten mRNA Mengen in LK7- (links) und LK17-Zellen (rechts), welche für Stammzellmarker kodieren (wie angegeben) und entweder in DMSO- (weiß) oder DSF-haltigem NSC-Medium (schwarz) gezüchtet wurden. * zeigt $p \leq 0,05$ an; berechnet durch Welch-korrigierter zweiseitiger t-Test. Ergebnisse bereits veröffentlicht in (Zirjacks et al., 2021).

3.2 Vergleich der ALDH-Expression

Um die Expression des mesenchymalen Stammzellmarkers ALDH1A3 in den Glioblastomstammzelllinien LK 7 und LK 17 weiter zu untersuchen, wurden zusätzlich zur mRNA-Analyse (Abb. 10 A), die Proteinhäufigkeit mittels Immunoblots (Abb. 10 B, C) analysiert. Die Daten deuteten auf eine hohe ALDH1A3-Expression in LK7, aber nicht LK17-Zellen, hin.

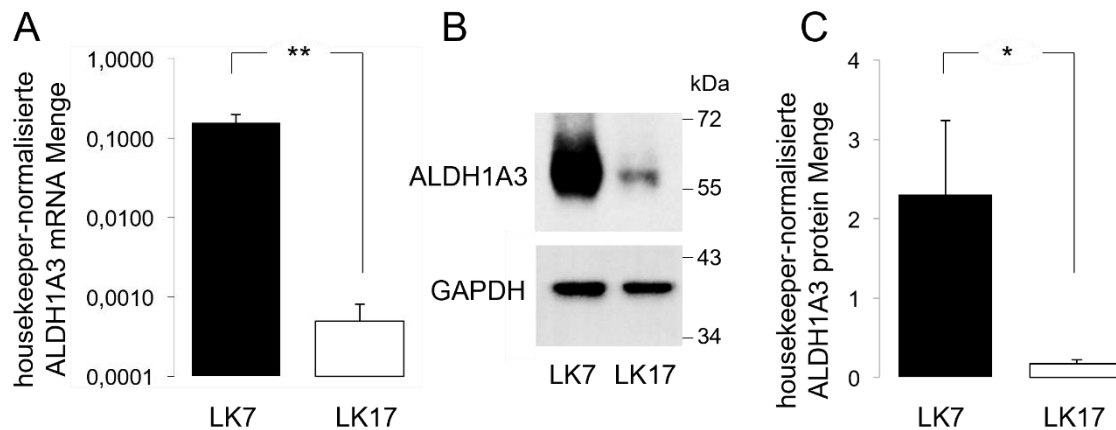


Abb. 10: ALDH1A3 Expression in LK7 und LK17

Primäre GSZ-Kulturen LK7 und LK17 unterscheiden sich in ihrer ALDH1A3 mRNA- und Proteinexpression. **A**. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SE, $n=7-9$), der auf die Housekeeper-normalisierten mRNA-Menge von LK7 (schwarz) und LK17 (weiß), quantifiziert mittels real-time RT-PCR. Die Ordinate ist logarithmisch dargestellt. **B**. Repräsentativer Nachweis der ALDH1A3- (oben) und GAPDH-Kontroll-Immunfärbung (unten) von LK7 (links) und LK17 (rechts), identifiziert mittels Western Blot. **C**. Mittelwerte (\pm SE, $n=9-10$) der Housekeeper-normalisierten ALDH1A3 Proteinmenge von LK7 (schwarz) und LK17 (weiß) ermittelt wie in **(B)** mittels Immunoblot. Die Signifikanzen ($P < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**)) wurden anhand des Welch-korrigiertem zweiseitigen t-Test berechnet. Veröffentlicht in (Zirjacks et al., 2021).

3.2 Dosiswirkungskurve DSF

Um die Auswirkungen von DSF auf die Glioblastomstammzelllinien LK7 und LK17 in unterschiedlichen Konzentrationen zu untersuchen, wurden Limiting Dilution Assays über 14 Tage mit unterschiedlichen DSF/Cu²⁺-Konzentrationen durchgeführt. Je höher die Konzentration an DSF/Cu²⁺ desto geringer war die Survival Fraction in beiden Zelllinien (Abb. 11). Die Daten ließen die Vermutung zu, dass die mittlere effektive Dosis (IC₅₀) im Bereich unter 100 nM liegt. Wie in der Einleitung beschrieben, konnte davon ausgegangen werden, dass bei oraler Applikation von DSF eine annähernde Dosis von 100 nM im Gehirn erreicht werden kann. Aus diesem Grund wurden alle weiteren Versuche mit einer Disulfiramdosis von 100 nM und 100 nM CuSO₄ durchgeführt.

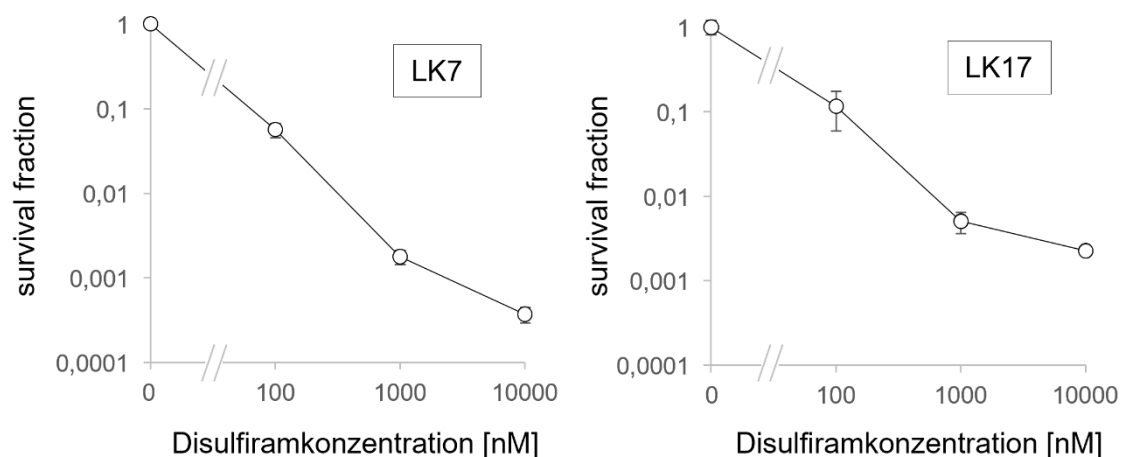


Abb. 11: Dosis-Wirkungskurve Disulfiram

Disulfiram/ Cu²⁺ verringert die Überlebensfraktionen von LK7 und LK17 Glioblastomstammzellen. Dargestellt ist der Zusammenhang der mittleren Überlebensfraktion (Survival Fraction; \pm SE, n= 4-12) und der Disulfiramkonzentration (DSF) von LK 7 (links) und LK 17 (rechts) GSZ nach Zugabe von Disulfiram (0-10.000 nM) und CuSO₄ (100 nM) in NSC Medium. Ermittelt wurden die Survival Fractions mit Hilfe des Limiting Dilution Assays. Die absolute Anwachsrate bei 0 nM betrug 0,83 in LK7 und 0,11 in LK17 GSZ. Ergebnisse bereits veröffentlicht in (Zirjacks et al., 2021).

3.3 Durchflusszytometrie

3.3.1 ALDEflour-Fluoreszenz Intensität

Im kommenden Abschnitt erfolgte eine vergleichende Darstellung der Auswertung und Quantifizierung der ALDEflour FACS-Messungen aus beiden Glioblastomstammzelllinien. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnte die Aktivität der ALDH-Isoformen in beiden Zelllinien bestimmt werden. Wie erwartend waren die DEAB-sensitiven enzymatischen Aktivitäten der ALDH in LK7 höher als in LK17-Zellen, die in Gegenwart von CuSO_4 (100 nM) unter allen experimentellen Bedingungen mittels Durchflusszytometrie gemessen wurden (Abb. 12 A, B schwarz und blau). Bemerkenswerterweise erfolgte durch Disulfiram nur eine unvollständige Blockade der ALDH-Aktivität (Abb. 12 A, B, rot).

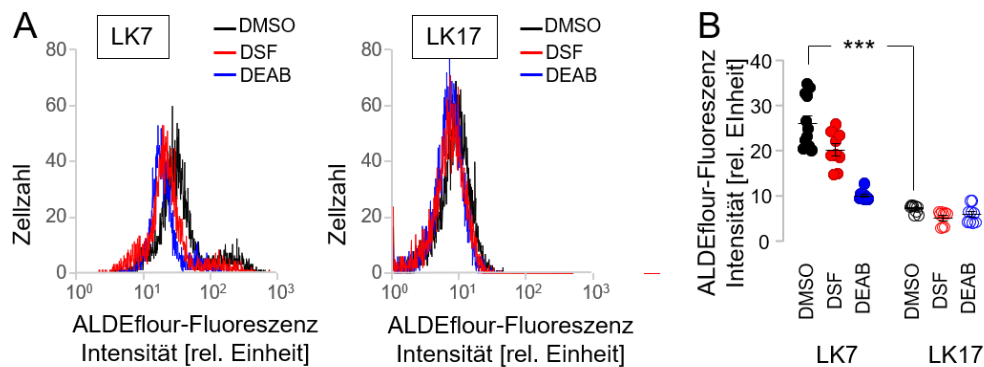


Abb. 12: ADLEflour-Fluoreszenz Intensität

Primäre Glioblastomstammzellkulturen LK7 und LK17 unterscheiden sich in ihrer ALDH Aktivität. **A.** Repräsentative Histogramme zeigen die ALDEflour-spezifische Fluoreszenz Intensität von LK7 (links) und LK17 (rechts) GSZ gemessen mittels Durchflusszytometrie eine Stunde nach Inkubation mit DMSO (schwarz) als Kontrolle, Disulfiram (DSF, 100 nM, rot) oder Ethylaminobenzaldehyd (DEAB, 3 μM , blau). **B.** Dargestellt sind die Einzelwerte, sowie die geometrischen Mittelwerte (\pm SE, $n = 9-12$) ermittelt wie in **(A)** mit Hilfe der Durchflusszytometrie in LK7 (links) und LK17 (rechts) nach einstündiger Inkubation mit DMSO (Kontrolle, schwarz), DSF (rot), und DEAB (blau). Die statistische Auswertung erfolgte durch nichtparametrischen Kruskal-Wallis und Dunn's multiplen Mittelwertvergleich ($P < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)). Veröffentlicht in (Zirjacks et al., 2021).

3.3.2 Zellzyklus

Um die Auswirkungen von Disulfiram allein oder in Kombination mit Bestrahlung und/oder Temozolomid-Chemotherapie auf den Zellzyklus und das apoptotische Verhalten in LK7 und LK17-Zellen zu untersuchen, wurden Versuche mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen mit 0-8 Gy bestrahlt und anschließend 48 h lang mit DMSO (0,1% Kontrollgruppe), Disulfiram (je 100 nM), Temozolomid (30 µM) oder mit DSF+TMZ weiter inkubiert. Zusätzlich enthielt das Medium aller Versuchsarme CuSO_4 (100 nM).

Anschließend wurde mit Hilfe des DNA-selektiven Farbstoffs Propidium Iodid (PI) der prozentuale Anteil der Zellen in einer bestimmten Zellzyklusphase bestimmt (Abb. 13, A).

In mit 8 Gy- aber nicht in mit 0 oder 4 Gy-bestrahlten LK7-Zellen erhöhte Disulfiram und Temozolomid, sowie deren Kombination die subG1-Fraktion (d.h. Zellen mit teilweise abgebauter DNA, Abb. 13, B, links). Dies deutete auf einen durch Disulfiram- und Temozolomid-induzierten Zelltod von durch Strahlung vorgeschädigten Zellen hin. Aufgrund der unveränderten HyperG-Fraktion in allen Behandlungsarmen (Abb. 13, B rechts), konnte nicht von einem Anstieg des zellulären DNA-Gehalts durch Replikationsfehler in der Mitose (Polyploidie) oder Zytokinese (Polynuklearität) ausgegangen werden.

Die Bestrahlung mit 8 Gy induzierte einen G2/M-Arrest in LK7-Zellen. Dies war durch die Abnahme des prozentualen Anteils an Zellen in der G1- und S-Phase, bei gleichzeitiger Zunahme der G2-Population zu erkennen (schwarze Kreise in Abb.13, C). Unabhängig von der Bestrahlung zeigte Disulfiram eine Tendenz, die G1-Population zu verringern und die G2-Population zu erhöhen (Abb. 13, C, links und rechts). Darüber hinaus bewirkte Disulfiram fast eine Verdopplung der S-Population, insbesondere in bestrahlten Zellen (Abb. 13, C, Mitte). Temozolomid hingegen, das als Monobehandlung keinen Einfluss auf den Zellzyklus ausübt, schien die Disulfiram-Effekte bei kombinierter Behandlung zu verringern (Abb. 13, C).

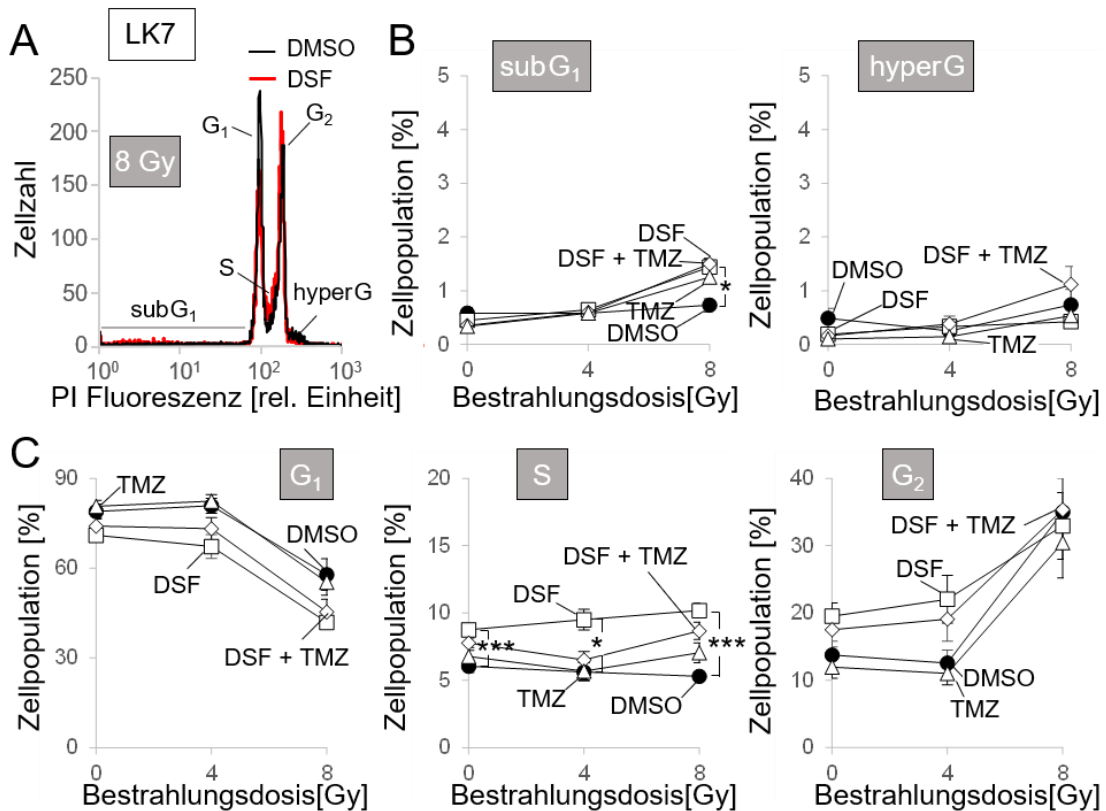


Abb. 13: Zellzyklusanalyse LK7

Disulfiram erhöht den Anteil der LK7 Zellen in der S-Phase. **A**. Repräsentative Durchflusszytometrie-Histogramme zeigen die Aufteilung der DNA-spezifischen Propidium Iodid (PI)-Fluoreszenz der Kontrollfärbung (DMSO, schwarz) und der Behandlung mit Disulfiram (DSF, 100 nM, rot) 48 h nach Bestrahlung mit 8 Gy in LK7 Zellen. **B,C**. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SE, $n = 9$) des prozentualen Anteils an apoptotischen Zellen (subG₁, **(B)**, links), polyploiden/ polynukleären Zellen (hyperG, **(B)**, rechts), Zellen in G1- (**(C)**, links), S- (**(C)**, Mitte) und G2-Phase (**(C)**, rechts), aufgeteilt nach Bestrahlungsdosis und zusätzlicher Behandlung mit DMSO (Kontrollgruppe, schwarze Kreise), Disulfiram (DSF, 100 nM, weiße Quadrate), Temozolomid (TMZ, 30 μ M, weiße Dreiecke) und DSF + TMZ (weiße, Raute). Die statistische Auswertung erfolgte mittels nichtparametrischen Kruskal-Wallis ANOVA und Dunn's multiplen Mittelwertvergleich ($P < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), (***)). Veröffentlicht in (Zirjacks et al., 2021)

Ähnliche Effekte von Disulfiram wie auf die LK7-Zelllinie, ließen sich auch bei LK17-Zellen beobachten (Abb. 14 A-C). In LK17 verringerte Disulfiram die G1- und erhöhte die G2-Population unabhängig von der Bestrahlung (Abb. 14, B und C, links und rechts). Im Gegensatz zu LK7 kam es durch die Disulfiram-Behandlung zu keiner Erhöhung der S-Population (Abb. 14, C, links). Ebenso bewirkte Temozolomid als Einzeltherapie eine Abnahme der G1 (8 Gy) und Zunahme der G2 (4 Gy und 8 Gy) -Population, jedoch nur in bestrahlten Zellen (Abb. 14 B C, links und rechts). Auch diesmal waren die Auswirkungen von Disulfiram und Temozolomid auf den Zellzyklus nicht additiv. Stattdessen schien Temozolomid den Disulfiram-Effekt bei kombinierter Anwendung abzuschwächen, wie aus den 0 Gy- und 4 Gy-Daten in Abb. 14 B und C, links, hervorging. Sowohl in der Kontrollgruppe als auch durch Bestrahlung erhöhte Disulfiram oder Temozolomid die SubG1- oder HyperG-Population nicht (Daten nicht abgebildet).

In Zusammenschau der Daten deuteten diese auf eine eventuelle Interferenz von Disulfiram mit dem Zellzyklus der LK7 und LK17-Zelllinie hin. Temozolomid schien jedoch vor allem auf den Zellzyklus von LK17-Zellen Einfluss zu nehmen. Diese Effekte führten jedoch nicht zu einer vermehrten Apoptose (SubG1-Population) oder einer Beeinträchtigung der Mitose/Zytokinese (HyperG-Population) während der 48-h-Beobachtungsperiode.

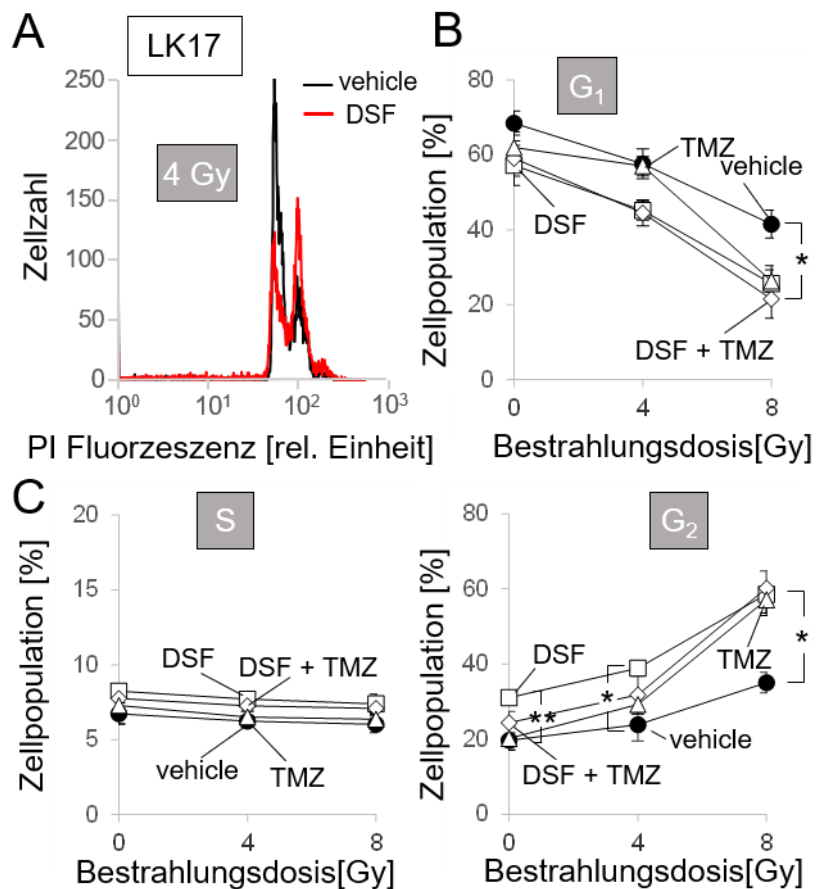


Abb. 14: Zellzyklusanalyse LK17

Disulfiram verringert den Anteil an LK17 Zellen in G₁ und erhöht ihn in der G₂-Phase **A**. Repräsentative Durchflusszytometrie-Histogramme zeigen die Aufteilung der DNA-spezifischen Propidium Iodid (PI)-Fluoreszenz der Kontrollfärbung (DMSO, schwarz) und der Behandlung mit Disulfiram (DSF, 100 nM, rot) 48 h nach Bestrahlung mit 4 Gy in LK17 Zellen. **B,C**. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SE, n = 6-9) des prozentualen Anteils an Zellen in G₁- (**B**), S- ((**C**), links) und G₂-Phase ((**C**), rechts), aufgeteilt nach Bestrahlungsdosis und zusätzlicher Behandlung mit DMSO (Kontrollgruppe, schwarze Kreise), Disulfiram (DSF, 100 nM, weiße Quadrate), Temozolomid (TMZ, 30 μ M, weiße Dreiecke) und DSF + TMZ (weiße, Raute). Die statistische Auswertung erfolgte mittels nichtparametrischen Kruskal-Wallis ANOVA und Dunn's multiplen Mittelwertvergleich ($P < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**)). Veröffentlicht in (Zirjacks et al., 2021)

3.4 Klonogenes Überleben

Um die Auswirkungen von Disulfiram und Temozolomid auf das klonogene Überleben von LK7 und LK17 Zellen zu testen, wurden Limiting Dilution Assays durchgeführt.

Hierzu wurden die Zellen zuerst isoliert, sequenziell 1:2 in 96-Well-Platten verdünnt, über Nacht ausgesät, 1 h vorinkubiert, bestrahlt (0-8 Gy) und über weitere 28 Tage in 0,1 % DMSO als Kontrollgruppe, Disulfiram (100 nM), Temozolomid (30 μ M) oder DSF+TMZ weiter inkubiert. Auch hier wurden dem Medium in allen Experimentierarmen CuSO_4 (100 nM) zugesetzt.

Die abgebildeten Diagramme (Abb. 15 A-E und Abb. 16 A-E) sollten mögliche additive Effekte von Strahlung und Disulfiram und/oder Temozolomid veranschaulichen. Zusätzlich konnten mögliche radiosensibilisierende Wirkungen der Medikamente dargestellt werden.

Wie in Abb. 15 B gezeigt, reduzierte Disulfiram die Anwachsrate von LK7-Zellen signifikant. Temozolomid hingegen verringerte diese nur geringfügig. Bei gleichzeitiger Anwendung beider Medikamente wurde die Wirkung von Disulfiram auf die Anwachsrate abgeschwächt. Die Normalisierung der Survival Fraction auf die 0 Gy-Kontrolle des jeweiligen Experimentierarms (Abb. 15 D) zeigte, dass weder Disulfiram oder Temozolomid, noch deren Kombination in LK7-Zellen eine radioresistenzmodifizierende Funktion ausübte. Dies wurde in Abb. 15 durch die Auftragung der einzelnen Werte nach Bestrahlung mit 4 Gy (SF4Gy) noch einmal verdeutlicht.

Auch in 0-8 Gy bestrahlten LK17-Zellen wurde die Anwachsrate und die Survival Fraction bestimmt (Abb. 16). Identisch zu LK7-Zellen reduzierte Disulfiram die Anwachsrate in LK17-Zellen signifikant. Durch die gleichzeitige Verabreichung mit Temozolomid wurde dieser Effekt von DSF geringfügig verringert, während Temozolomid allein keine Auswirkung auf die Anwachsrate hatte (Abb. 16 B). Auch in Analogie zu LK7-Zellen konnten kein radiosensibilisierender Effekt weder durch Disulfiram noch Temozolomid noch deren Kombination in LK17-Zellen beobachtet werden (Abb. 16 D, E).

Zusammengenommen deuteten diese Datensätze auf eine hohe Inhibition des klonogenen Überlebens durch Disulfiram in Glioblastom-Stammzellen unabhängig der ALDH1A3-Expression hin. Darüber hinaus hatte Temozolomid keine Auswirkungen auf das klonogene Überleben, milderte aber den Disulfiram-Effekt in LK7-Zellen ab. Ein radiosensibilisierender Effekt durch Disulfiram und/oder Temozolomid wurde in keiner der beiden Zelllinien beobachtet.

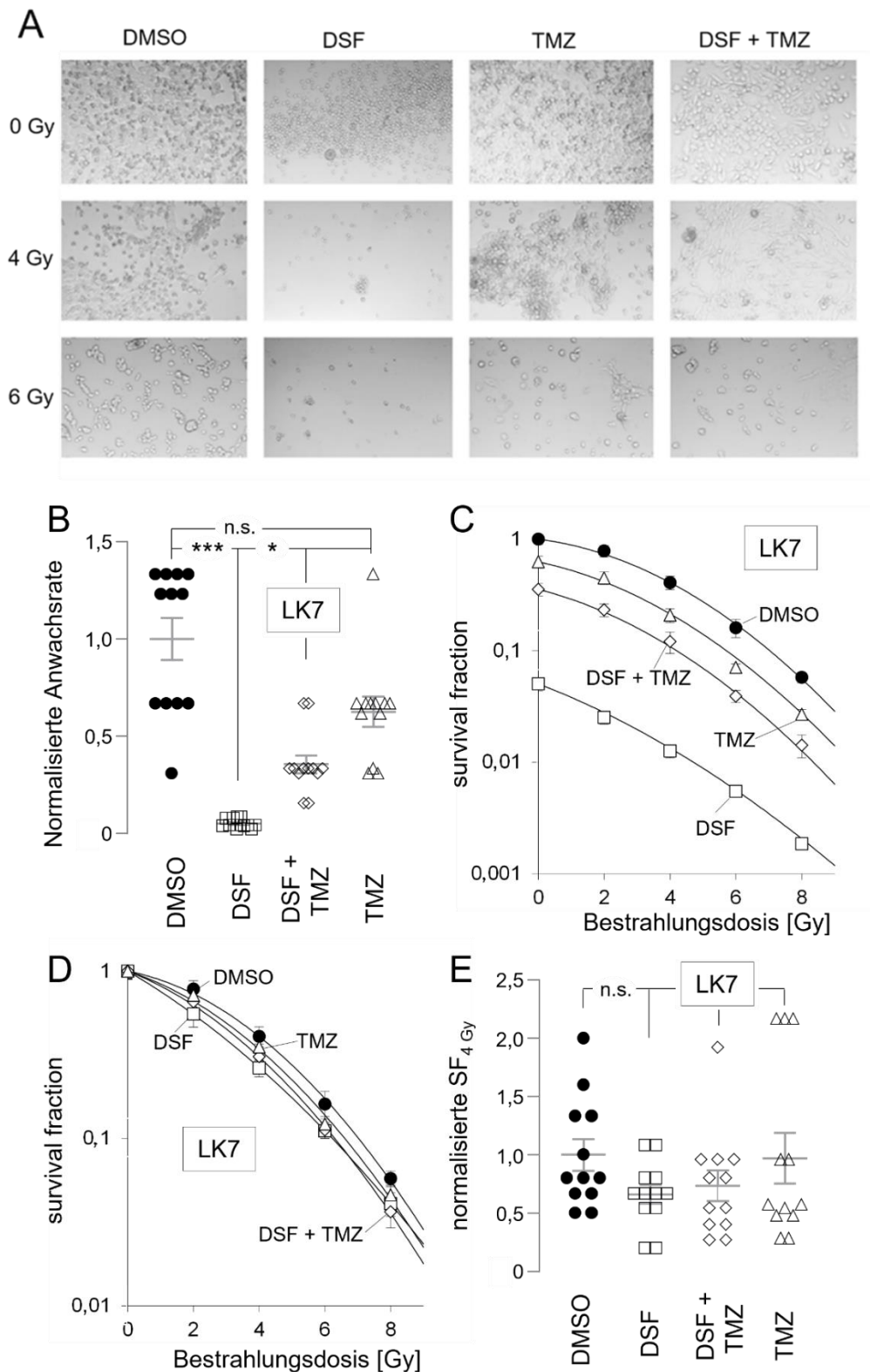


Abb. 15: Klonogene Überleben von LK7

Disulfiram beeinflusst die Survival Fraction von LK7 Zellen. Weder Disulfiram noch Temozolomid induzieren eine Radiosensibilisierung von LK7 Zellen.

Temozolomid verringert den Effekt von Disulfiram auf das klonogene Überleben von LK7 Zellen. **A.** Repräsentative Bilder gewachsener LK7 GSZ nach 28 Tagen Inkubation bei einer anfangs ausgebrachten Zell-Zahl von 1024 Zellen. Zellen wurden mit DMSO (Kontrolle, linke Spalte), Disulfiram (DSF, 100 nM, zweite Spalte), Temozolomid (TMZ, 30 μ M, dritte Spalte) und DSF + TMZ (rechte Spalte) in Kombination mit Bestrahlung (0-6 Gy) behandelt. **B-E.** Diagramme zeigen die normalisierte Anwachsrate (**B**), auf die 0 Gy-Kontrollgruppe normalisierte Survival Fraction (SF, (**C**)), auf die jeweils im Behandlungsarm bezogene 0 Gy-Kontrollgruppe normalisierte Survival Fraction (**D**) und die Survival Fraction nach 4 Gy Bestrahlung (SF_{4Gy} , (**E**)) von LK7 Zellen, in Abhängigkeit von Bestrahlung (**C-E**), sowie einer Behandlung mit (**B-E**) mit DMSO (Kontrolle, schwarze Kreise), Disulfiram (DSF, 100 nM, weiße Quadrate), Temozolomid (TMZ, 30 μ M, weiße Dreiecke) und DSF + TMZ (weiße, Raute). Dargestellt wurden die Mittelwerte (\pm SE, n = 12), sowie Einzelwerte in (**B,E**). Die durchschnittliche absolute Anwachsrate der 0 Gy DMSO-Kontrolle (\pm SE, n = 12) betrug $0,77 \pm 0,29$. Die statistische Auswertung erfolgte mittels nichtparametrischen Kruskal-Wallis ANOVA und Dunn's multiplen Mittelwertvergleich. (ns= nicht signifikant) $P < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)). Aufgrund einer besseren Übersicht werden in (**C**) keine Signifikanzen angezeigt. Veröffentlicht in (Zirjacks et al., 2021).

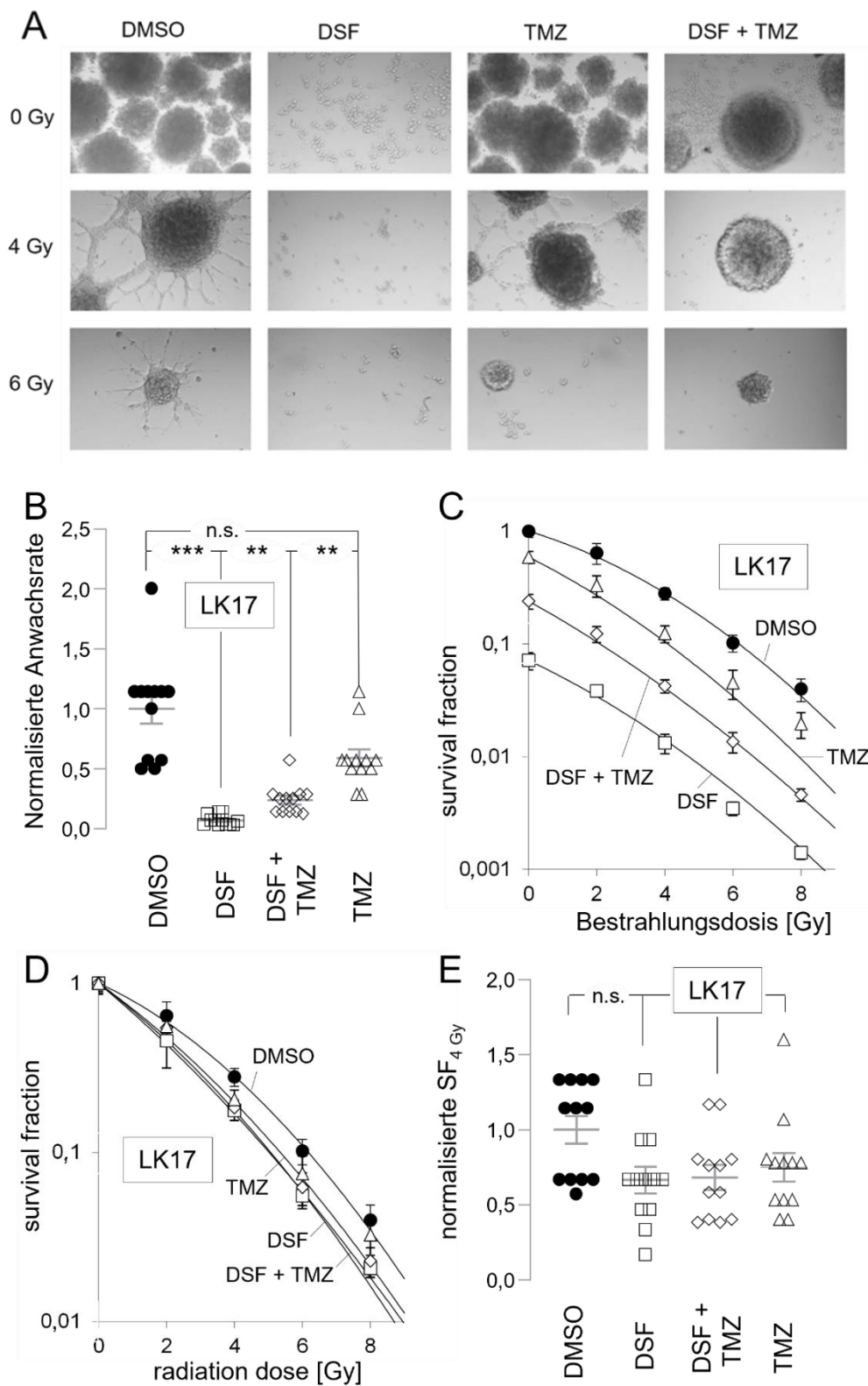


Abb. 16: Klonogenes Überleben von LK17

Disulfiram beeinflusst die Survival Fraction von LK17 GSZ. Weder Disulfiram noch Temozolomid bewirken eine Radiosensibilisierung von LK17 Zellen. **A.**

Repräsentative Bilder gewachsener LK 17 GSZ nach 28 Tagen Inkubation bei einer anfangs ausgebrachten Zellzahl von 1024 Zellen. Zellen wurden mit DMSO (Kontrolle, linke Spalte), Disulfiram (DSF, 100 nM, zweite Spalte), Temozolomid (TMZ, 30 μ M, dritte Spalte) und DSF + TMZ (rechte Spalte) in Kombination mit Bestrahlung (0-6 Gy) behandelt. **B-E**. Diagramme zeigen die normalisierte Anwachsrate (**B**), auf die 0 Gy-Kontrollgruppe normalisierte Survival Fraction (SF, (**C**)), auf die jeweils im Behandlungsarm bezogene 0 Gy-Kontrollgruppe normalisierte Survival Fraction (**D**) und die Survival Fraction nach 4 Gy Bestrahlung (SF_{4Gy} , (**E**)) von LK17 Zellen, in Abhängigkeit von Bestrahlung (**C-E**), sowie einer Behandlung mit (**B-E**) mit DMSO (Kontrolle, schwarze Kreise), Disulfiram (DSF, 100 nM, weiße Quadrate), Temozolomid (TMZ, 30 μ M, weiße Dreiecke) und DSF + TMZ (weiße, Raute). Dargestellt wurden die Mittelwerte (\pm SE, n = 12), sowie Einzelwerte in (**B,E**). Die durchschnittliche absolute Anwachsrate der 0 Gy DMSO-Kontrolle (\pm SE, n = 12) betrug $0,75 \pm 0,09$. Die statistische Auswertung erfolgte mittels nichtparametrischen Kruskal-Wallis ANOVA und Dunn's multiplen Mittelwertvergleich ($P \geq 0,05$ (ns= nicht signifikant) $P < 0,05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***)). Veröffentlicht in (Zirjacks et al., 2021).

4. Diskussion

Ziel dieser Dissertation war es ein *in vitro* Modell zur Inhibierung der Aldehyd-Dehydrogenasen in mesenchymalen und proneuralen Glioblastomstammzellen (GSZ) zu etablieren und mögliche Auswirkungen von Disulfiram auf die GSZ zu definieren. Eine weitere Intention war die Beobachtung und Deutung der Wechselwirkung zwischen DSF und TMZ. Abschließend wurde der Einfluss von DSF auf bestrahlte GSZ untersucht.

4.1 Disulfiram als Glioblastom Therapeutikum

Da Tumorstammzellen vermutlich eine Schlüsselrolle bei der Behandlungsresistenz und der Entstehung von Rezidiven des Glioblastoms einnehmen, ist die Entwicklung von gezielten Therapieansätzen gegen genau diese GSZ ein sehr wichtiger Forschungsansatz (Al-Hajj et al., 2003, Bao et al., 2006, Meacham and Morrison, 2013). Frühere Studien an mesenchymalen Glioblastom-Stammzellen zeigten eine starke Hochregulation der ALDH1A3 (Mao et al., 2013, Cheng et al., 2016, Chen et al., 2016, Li et al., 2018a), welche durch das Medikament Disulfiram inhibiert werden kann (Johansson, 1992).

Einige präklinische *in vitro* und *in vivo* Studien konnten bereits unterschiedliche antitumoröse Eigenschaften von Disulfiram in mehreren Tumorentitäten, u.a. dem Glioblastom, beschreiben (Review, (Lu et al., 2021). Insbesondere Temozolomid-refraktäre Glioblastom(stamm)zellen schienen besonders empfindlich gegenüber Disulfiram zu sein (Triscott et al., 2012). Darüber hinaus wurde von einer Chemotherapie-sensibilisierenden Wirkung von Disulfiram berichtet. Disulfiram/Cu²⁺ sensibilisierte Temozolomid-resistente Glioblastomzellen für Temozolomid *in vitro* (Triscott et al., 2012, Lun et al., 2016), sowie in einem Glioblastom-Mausmodell (Lun et al., 2016). Letztere Studie wurde mit einer täglichen Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht Disulfiram und 2 mg/kg Körpergewicht Cu²⁺ durchgeführt und ist im Vergleich zur täglich maximal zugelassenen Dosis von 500 mg beim Menschen (Wickström et al., 2007), deutlich zu hoch.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, gehört Temozolomid zur Gruppe der Alkylanzien und entfaltet seine Wirkung indem es Purinbasen an Position O6 und N7 methyliert (Zhang et al., 2012). Aufgrund dieser nukleären Veränderungen, kommt es zur Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen innerhalb der Zelle (Drabløs et al., 2004, Kondo et al., 2010). Das Fehlen von DNA-Reparaturmechanismen, sowie eine aktive MGMT führen zur Resistenzbildung gegenüber Temozolomid (Stupp et al., 2009).

Ein möglicher Mechanismus, wie Disulfiram Tumorzellen für eine Temozolomid-Chemotherapie sensibilisieren kann, wurde bereits in Hypophysenadenom-Stammzellen (Zhao et al., 2015) und Glioblastomzelllinien (Paranjpe et al., 2014) erläutert. Disulfiram bindet kovalent an das MGMT-Promotorprotein, was zu einem proteasomalen Abbau des Proteins führt. In Glioblastom-Sphäroidkulturen verstärkt Disulfiram zusätzlich die Wirkung von Temozolomid, indem es Einfluss auf die DNA-Reparaturmechanismen nimmt (Lun et al., 2016).

Wie bereits in der Literatur beschrieben, kommt es durch Temozolomid induzierte DNA-Doppelstrangbrüche zu einem G2/M-Arrest des Zellzyklus (Zhang et al., 2012). Die in dieser Arbeit vorliegenden Experimenten (siehe Abb. 13 und 14) konnten einen Temozolomid-vermittelten G2/M-Arrest in unbestrahlten LK7- und LK17-Zellen nicht nachweisen. Dies bestätigt die relative Temozolomid-Resistenz der MGMT-Promotor-unmethylierten Glioblastomzelllinien LK7 und LK17. Gleiches zeigte sich auch in den Experimenten zum klonogenen Überleben (siehe Abb. 15 und 16 C). Auch diese deuten auf eine Temozolomid-Resistenz in beiden Glioblastomstammzelllinien hin.

Während die Daten eine antitumoröse Wirkung von Disulfiram/Cu²⁺ in Temozolomid-resistenten Glioblastom-Stammzellkulturen bestätigten, konnte in der vorliegenden Promotionsarbeit keine Temozolomid-sensibilisierende Wirkung von Disulfiram/Cu²⁺ gezeigt werden (siehe Abb. 15 und 16 C). Das Gegenteil war der Fall. In beiden Glioblastomstammzelllinien schwächte Temozolomid die hemmende Wirkung von Disulfiram auf das klonogene Überleben deutlich ab. Es wäre möglich, dass Temozolomid mit Disulfiram interferiert und dadurch die antitumoröse Wirkung von Disulfiram reduziert wird.

Eine solche antagonisierende Wirkung beider Medikamente konnte ebenfalls in den Durchflusszytometrie-Experimenten zum Zellzyklus nachgewiesen werden (siehe Abb. 13 und 14).

4.2 Die radiosensibilisierende Wirkung von Disulfiram

Auch eine radiosensibilisierende Wirkung von Disulfiram/ Cu^{2+} auf die Glioblastomstammzelllinien konnte in der vorliegenden Promotionsarbeit nicht identifiziert werden. Dies ist gegensätzlich zu früheren Studien, in denen eine Disulfiram/ Cu^{2+} -vermittelte Radiosensibilisierung in primären Glioblastom-Stammzell-Sphäroidkulturen (Lun et al., 2016) und humanen Glioblastom-Zelllinien (Koh et al., 2019) gezeigt wurde. Zu bemerken ist allerdings, dass in letztgenannter Studie nur eine (U138MG) und tendenziell auch eine zweite (T98G) von fünf Glioblastomzelllinien durch Disulfiram (75-100 nM) radiosensibilisiert werden konnte, wenn sie in Cu^{2+} -haltigem Medium inkubiert wurden und das klonogene Überleben als Endpunkt betrachtet wurde (Koh et al., 2019). Das klonogene Überleben bestimmt die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs des behandelten Tumors und gilt daher als Goldstandard für die Interpretation von Arzneimittelwirkungen auf die Strahlenempfindlichkeit in der Strahlenbiologie (Dokic et al., 2015). In den Glioblastom-Stammzell-Sphäroiden verringerte die 5-Gy-Bestrahlung in Kombination mit Disulfiram (100 nM) und Cu^{2+} (200 nM) das Überleben (definiert durch die Stoffwechselaktivität) in nur einer von zwei getesteten Sphäroidkulturen (Lun et al., 2016). Darüber hinaus verzögerte Disulfiram/ Cu^{2+} in der gleichen Studie die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen von 2 Gy-bestrahlten Zellen ohne Erhöhung der Anzahl von residualen Doppelstrangbrüchen (24 h-Wert, Anzahl an γH2AX Foci in den Zellkernen) (Lun et al., 2016).

Allerdings können aus dem Zerfall strahleninduzierter γH2AX -Foci (Marková et al., 2007) und dem als „metabolisch“ definierten Überleben bestrahlter Krebszellen, nur begrenzt Schlussfolgerungen auf das klonogene Überleben gezogen werden.

Aufgrund der Tatsache, dass ein radiosensibilisierender Effekt nur in wenigen Glioblastomzelllinien (Koh et al., 2019) beobachtet werden konnte und unter Berücksichtigung der Ergebnisse in dieser Arbeit, kann davon ausgegangen werden, dass Disulfiram Glioblastom-Zellen radiosensibilisieren kann, dies aber eher eine Ausnahme, statt Regel ist. Anders verhält es sich bei bestrahlten atypischen Teratoid/Rhabdoid-Tumoren (AT/RT) und Primärkulturen, bei dem Disulfiram/ Cu^{2+} die Survival Fraction in Koloniebildungsassays aller getesteten Zellreihen konsequent verringert (Lee et al., 2017).

4.3 Kupfer induziert Oxidativen Stress

Die Radiosensibilisierende Wirkung von Disulfiram könnte mitunter an einer, durch das Medikament verstärkten, Kupferaufnahme in die Zelle liegen. Wie bereits im Abschnitt 1.1.5.1 erwähnt, kommt es durch eine erhöhte intrazelluläre Kupferkonzentration zur Reduktion von Hydrogenperoxid zu Hydroxyl-Radikalen (OH^*) (Liu et al., 2011). Auch ionisierende Strahlung bewirkt eine sofortige Radikalbildung (z. B. Bildung von OH^* durch Ionisation von H_2O) innerhalb der Zelle, sowie eine verzögerte langanhaltende mitochondriell erzeugte Superoxidanionenbildung (O_2^{*-}), die zu strahlenvermittelten genotoxischen Schäden beiträgt (Klumpp et al., 2018). Es wäre möglich, dass durch die verstärkte Disulfiram-vermittelte Kupferaufnahme und anschließender Hydroxyl-Radikalen-Bildung, der durch die Bestrahlung ausgelöste oxidative Stress verstärkt wird und dabei mehr DNA-Doppelstrangbrüche entstehen könnten. Sollte dies der Fall sein, hängt die radio- (und auch Temozolomid-) sensibilisierende Wirkung von Disulfiram, einerseits von der interstitiellen Cu^{2+} -Konzentration und intrazellulären Kupfer-Transportmechanismen, andererseits von der Fähigkeit der Tumorzelle oxidativen Stress zu reduzieren, ab (Nevitt et al., 2012). Die Fähigkeit Cu^{2+} zu speichern, bzw. es wieder über Kanäle abzutransportieren, unterscheidet sich höchstwahrscheinlich zwischen den Zelltypen und könnte eine Erklärung der unterschiedlichen radiosensibilisierenden Wirkung von Disulfiram zwischen AT/RT (Lee et al., 2017) - und Glioblastom(stamm)zellen (aktuelle Daten, (Lun et al., 2016, Koh et al., 2019) sein.

4.3 Beeinflusst DSF vor allem Stammzellen vom mesenchymalen Typ?

In einem *in vivo* Mausmodell hemmte Disulfiram die Bildung von Glioblastom-mikrometastasen (Westhoff et al., 2013) unabhängig der ALDH-Expression. Mit Hilfe eines Viability-Assays wurde gezeigt, dass Disulfiram als Wachstumsinhibitor (mittlere IC₅₀s von 12-56 nM) unterschiedlicher primärer humaner Glioblastom-Stammzellen fungiert (Hothi et al., 2012). Gleichzeitig wurde dargestellt, dass die Menge an Kupfer-Chelatkomplexen abnahm und die Zugabe von Cu²⁺ den Disulfiram-Effekt erhöhte. Darüber hinaus ist die Disulfiram-vermittelte Hemmung von ALDH-positiven Glioblastom-Stammzellen von Cu²⁺ abhängig (Liu et al., 2012). Die in dieser Arbeit dargestellten Daten legen nahe, dass Disulfiram das klonogene Überleben von Glioblastom-Stammzellen ALDH(1A3)-unabhängig reduziert.

Zusammengenommen deutet dies darauf hin, dass Disulfiram gleichermaßen auf mesenchymale und nicht-mesenchymale Glioblastom-Stammzellen wirkt. Die ALDH-Hemmung spielt dabei keine Rolle.

4.4 Disulfiram in klinischen Studien

Neueste klinische Studien zum neu diagnostizierten (Huang et al., 2018) und rezidivierenden Glioblastomen (Huang et al., 2019, Jakola et al., 2018) untersuchten Disulfiram zusammen mit einer diätetischen Cu²⁺-Supplementierung, während einer Chemotherapie mit Temozolomid. Die bisherigen Daten deuten auf eine gute Verträglichkeit einer Disulfiram/Cu²⁺-Behandlung in Kombination mit einer Chemotherapie hin. Eine Temozolomid-sensibilisierende oder antitumoröse Wirkung von Disulfiram beim Glioblastom konnte bisher jedoch noch nicht gezeigt werden (Huang et al., 2019, Huang et al., 2018).

Auch eine klinische Studie zu rezidivierenden nicht metastasierten Prostatakarzinomen nach Lokalthherapie zeigte keinen klinischen Nutzen einer zusätzlichen Disulfiram-Therapie (täglich 250-500 mg DSF) (Schweizer et al., 2013).

Es scheint eine Diskrepanz zwischen der ausgeprägten antitumorösen Wirkung von Disulfiram in präklinischen *in vitro* Studien und den tatsächlich beobachteten Ergebnissen der klinischen Studien auf Tumoren zu geben.

Ein möglicher Grund wäre, dass im klinischen Umfeld keine therapeutischen Disulfiram/ Cu^{2+} -Konzentrationen in den Tumoren erreicht werden können. Es könnte versucht werden, durch unterschiedliche Formulierungen von Disulfiram zum Beispiel durch polymere Nanostrukturen, Mizellen, Mikropartikeln, Nanokristallen oder lipidbasierte Wirkstoffabgabesysteme eine bessere Gewebedurchlässigkeit zu erzielen und letztendlich dadurch die Bioverfügbarkeit und Konzentrationen innerhalb des Tumors zu erhöhen (Farooq et al., 2019). Eine weitere Möglichkeit wäre mit Hilfe von Disulfiram-tragenden Nanopartikeln Oberflächenrezeptoren zu erreichen und damit die zelluläre Wirkstoffaufnahme zu verbessern (He et al., 2018). Alternativ könnte durch unterschiedliche Darreichungsformen, z.B. als nasal applizierte Nanoemulsion (Qu et al., 2021) oder stereotaktische Injektion (McConville et al., 2015), eine erhöhte Wirkstoffkonzentration innerhalb des Tumors erzeugt werden.

4.5 Fazit

Die vorliegende Arbeit zeigte eine ausgeprägte tumorizide Wirkung von Disulfiram/ Cu^{2+} in Primärkulturen von mesenchymalen (ALDH1A3^+) und nicht-mesenchymalen (ALDH1A3^-) Glioblastom-Stammzellen. Im Gegensatz zu früheren Studien wurde weder eine Radio- noch eine Temozolomid-sensibilisierende Wirkung von Disulfiram beobachtet. Temozolomid hingegen schwächte die antitumoröse Wirkung von Disulfiram weitgehend ab. Die gezeigten Daten legen nahe, dass in der klinischen Situation Disulfiram nicht mit adjuvanter Radio- und Temozolomidchemotherapie kombiniert werden sollte.

Disulfiram/ Cu^{2+} könnte zukünftig allerdings als Zweitlinien-Chemotherapie beim Glioblastom angewendet werden. Allerdings benötigt es hierfür Verabreichungssysteme, die gewährleisten, dass Disulfiram in ausreichender Dosierung im Tumor akkumuliert, und dabei eine maximal tolerierbare Dosis nicht überschritten wird.

5. Zusammenfassung

Einführung: Glioblastoma multiforme ist der häufigste und bösartigste primäre Hirntumor bei Erwachsenen. Die Prognose der Glioblastom-Patienten ist sehr schlecht und neue Therapieoptionen sind dringend erforderlich. Frühere Studien an mesenchymalen Glioblastom-Stammzellen zeigten eine starke Hochregulation der Aldehyd Dehydrogenase 1A3 (ALDH1A3), welche durch das Medikament Disulfiram (DSF) inhibiert werden kann. An anderen Tumorentitäten wurde bereits gezeigt, dass DSF in Kombination mit Kupfer-Ionen (Cu^{2+}) eine tumorizide, sowie chemo- und strahlentherapiesensibilisierende Wirkung aufweist. Der Pathomechanismus von DSF / Cu^{2+} in Glioblastomzellen wurde jedoch bisher nicht vollständig aufgeklärt. Um DSF zukünftig sicher mit anderen Medikamenten, wie z.B. dem Chemotherapeutikum Temozolomid (TMZ), anwenden zu können, bedarf es noch weiteren Untersuchungen. Die vorliegende Studie zielte darauf ab, die Wirkungen und Funktionsmechanismen von DSF / Cu^{2+} auf bestrahlte mesenchymale und proneurale humane Glioblastom-Stammzellen zu definieren. Zusätzlich wurden Kombinationseffekte von DSF und TMZ dargestellt.

Methoden: Zu diesem Zweck wurden vom Patienten stammende mesenchymale und proneurale Glioblastom-Stammzellkulturen mit dem ALDH1A3-Inhibitor DSF in An- und Abwesenheit von TMZ vorbehandelt und mit einer Einzeldosis von 0-8 Gy 6 MV-Photonen bestrahlt. Anschließend konnte die ALDH-Aktivität, der Einfluss auf den Zellzyklus und das klonogene Überleben mit Hilfe von ALDEFLOUR und Nicoletti-Durchflusszytometrie, sowie Limiting Dilution Assays bestimmt werden.

Ergebnisse: Disulfiram interferierte mit dem Zellzyklus beider Glioblastomstammzelllinien unabhängig der ALDH1A3-Expression. Infolgedessen verringerte die Behandlung mit DSF das klonogene Überleben beider Tumorstammzelllinien signifikant. Diese Auswirkung schien additiv zum Bestrahlungseffekt in beiden Zelllinien zu sein. Ein radiosensibilisierender Effekt konnte nicht nachgewiesen werden. Bemerkenswert ist, dass die gleichzeitige Behandlung mit Temozolomid die DSF-hemmende Wirkung auf das klonogene Überleben abschwächte.

Fazit: Die vorliegende Arbeit zeigte eine ausgeprägte tumorizide Wirkung von Disulfiram/ Cu^{2+} in Primärkulturen von mesenchymalen (ALDH1A3⁺) und nicht-mesenchymalen (ALDH1A3⁻) Glioblastom-Stammzellen. Die gezeigten Daten legen nahe, dass in der klinischen Situation Disulfiram nicht mit adjuvanter Radio- und Temozolomidchemotherapie kombiniert werden sollte. Es könnte zukünftig jedoch als Zweitlinien-Chemotherapie beim Glioblastom angewendet werden. Allerdings benötigt es hierfür Verabreichungssysteme, die gewährleisten, dass Disulfiram in ausreichender Dosierung im Tumor akkumuliert, und dabei eine maximal tolerierbare Dosis nicht überschritten wird.

6. Literaturverzeichnis

- AGARWAL, R. P., PHILLIPS, M., MCPHERSON, R. A. & HENSLEY, P. 1986. Serum albumin and the metabolism of disulfiram. *Biochem Pharmacol*, 35, 3341-7.
- AL-HAJJ, M., WICHA, M. S., BENITO-HERNANDEZ, A., MORRISON, S. J. & CLARKE, M. F. 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 3983-8.
- ALDAPE, K., ZADEH, G., MANSOURI, S., REIFENBERGER, G. & VON DEIMLING, A. 2015. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol*, 129, 829-48.
- ALLAIN, P. & KRARI, N. 1991. Diethyldithiocarbamate, copper and neurological disorders. *Life Sci*, 48, 291-9.
- BAO, S., WU, Q., MCLENDON, R. E., HAO, Y., SHI, Q., HJELMELAND, A. B., DEWHIRST, M. W., BIGNER, D. D. & RICH, J. N. 2006. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, 444, 756-760.
- BEIER, D., SCHRIEFER, B., BRAWANSKI, K., HAU, P., WEIS, J., SCHULZ, J. B. & BEIER, C. P. 2012. Efficacy of clinically relevant temozolomide dosing schemes in glioblastoma cancer stem cell lines. *Journal of Neuro-Oncology*, 109, 45-52.
- BHAT, K. P. L., BALASUBRAMANIYAN, V., VAILLANT, B., EZHILARASAN, R., HUMMELINK, K., HOLLINGSWORTH, F., WANI, K., HEATHCOCK, L., JAMES, J. D., GOODMAN, L. D., CONROY, S., LONG, L., LELIC, N., WANG, S., GUMIN, J., RAJ, D., KODAMA, Y., RAGHUNATHAN, A., OLAR, A., JOSHI, K., PELLOSKI, C. E., HEIMBERGER, A., KIM, S. H., CAHILL, D. P., RAO, G., DEN DUNNEN, W. F. A., BODDEKE, H., PHILLIPS, H. S., NAKANO, I., LANG, F. F., COLMAN, H., SULMAN, E. P. & ALDAPE, K. 2013. Mesenchymal differentiation mediated by NF- κ B promotes radiation resistance in glioblastoma. *Cancer Cell*, 24, 331-46.
- BONNET, D. & DICK, J. E. 1997. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*, 3, 730-7.
- BRADSHAW, A., WICKREMSEKERA, A., TAN, S. T., PENG, L., DAVIS, P. F. & ITINTEANG, T. 2016. Cancer Stem Cell Hierarchy in Glioblastoma Multiforme. *Front Surg*, 3, 21.
- BRAR, S. S., GRIGG, C., WILSON, K. S., HOLDER, W. D., JR., DREAU, D., AUSTIN, C., FOSTER, M., GHIO, A. J., WHORTON, A. R., STOWELL, G. W., WHITTALL, L. B., WHITTLE, R. R., WHITE, D. P. & KENNEDY, T. P. 2004. Disulfiram inhibits activating transcription factor/cyclic AMP-responsive element binding protein and human melanoma growth in a metal-dependent manner in vitro, in mice and in a patient with metastatic disease. *Mol Cancer Ther*, 3, 1049-60.

- CANCER GENOME ATLAS RESEARCH, N. 2008. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*, 455, 1061-8.
- CARNERO, A. & LLEONART, M. 2016. The hypoxic microenvironment: A determinant of cancer stem cell evolution. *Bioessays*, 38 Suppl 1, S65-74.
- CEN, D., BRAYTON, D., SHAHANDEH, B., MEYSKENS, F. L., JR. & FARMER, P. J. 2004. Disulfiram facilitates intracellular Cu uptake and induces apoptosis in human melanoma cells. *J Med Chem*, 47, 6914-20.
- CHANDRAN, U. R., LUTHRA, S., SANTANA-SANTOS, L., MAO, P., KIM, S. H., MINATA, M., LI, J., BENOS, P. V., DEWANG, M., HU, B., CHENG, S. Y., NAKANO, I. & SOBOL, R. W. 2015. Gene expression profiling distinguishes proneural glioma stem cells from mesenchymal glioma stem cells. *Genom Data*, 5, 333-336.
- CHEN, D., CUI, Q. C., YANG, H. & DOU, Q. P. 2006. Disulfiram, a clinically used anti-alcoholism drug and copper-binding agent, induces apoptotic cell death in breast cancer cultures and xenografts via inhibition of the proteasome activity. *Cancer Res*, 66, 10425-33.
- CHEN, M. H., WENG, J. J., CHENG, C. T., WU, R. C., HUANG, S. C., WU, C. E., CHUNG, Y. H., LIU, C. Y., CHANG, M. H., CHEN, M. H., CHIANG, K. C., YEY, T. S., SU, Y. & YEY, C. N. 2016. ALDH1A3, the Major Aldehyde Dehydrogenase Isoform in Human Cholangiocarcinoma Cells, Affects Prognosis and Gemcitabine Resistance in Cholangiocarcinoma Patients. *Clin Cancer Res*, 22, 4225-35.
- CHENG, P., WANG, J., WAGHMARE, I., SARTINI, S., COVIELLO, V., ZHANG, Z., KIM, S. H., MOHYELDIN, A., PAVLYUKOV, M. S., MINATA, M., VALENTIM, C. L., CHHIPA, R. R., BHAT, K. P., DASGUPTA, B., LA MOTTA, C., KANGO-SINGH, M. & NAKANO, I. 2016. FOXD1-ALDH1A3 Signaling Is a Determinant for the Self-Renewal and Tumorigenicity of Mesenchymal Glioma Stem Cells. *Cancer Res*, 76, 7219-7230.
- CODD, A. S., KANASEKI, T., TORIGO, T. & TABI, Z. 2018. Cancer stem cells as targets for immunotherapy. *Immunology*, 153, 304-314.
- COLLINS, A. T., BERRY, P. A., HYDE, C., STOWER, M. J. & MAITLAND, N. J. 2005. Prospective Identification of Tumorigenic Prostate Cancer Stem Cells. *Cancer Research*, 65, 10946-10951.
- DOKIC, I., NIKLAS, M., ZIMMERMANN, F., MAIRANI, A., SEIDEL, P., KRUNIC, D., JÄKEL, O., DEBUS, J., GREILICH, S. & ABDOLLAHI, A. 2015. Correlation of Particle Traversals with Clonogenic Survival Using Cell-Fluorescent Ion Track Hybrid Detector. *Front Oncol*, 5, 275.
- DRABLØS, F., FEYZI, E., AAS, P. A., VAAGBØ, C. B., KAVLI, B., BRATLIE, M. S., PEÑA-DIAZ, J., OTTERLEI, M., SLUPPHAUG, G. & KROKAN, H. E. 2004. Alkylation damage in DNA and RNA--repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair (Amst)*, 3, 1389-407.

- DUAN, L., SHEN, H., ZHAO, G., YANG, R., CAI, X., ZHANG, L., JIN, C. & HUANG, Y. 2014. Inhibitory effect of Disulfiram/copper complex on non-small cell lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 446, 1010-6.
- E.V., V. F. G. P. 2013. *Antabus - Häufig gestellte Fragen (FAQ)* [Online]. cra-kongress.de: Verein für gemeindeorientierte Psychotherapie e.V.
c/o Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie Bethel. Available: <https://www.cra-kongress.de/disulfiran-anbaus-fragen-zu-antabus> [Accessed 16.05.2022].
- FAROOQ, M. A., AQUIB, M., KHAN, D. H., HUSSAIN, Z., AHSAN, A., BAIG, M., WANDE, D. P., AHMAD, M. M., AHSAN, H. M., JIAJIE, J. & WANG, B. 2019. Recent advances in the delivery of disulfiram: a critical analysis of promising approaches to improve its pharmacokinetic profile and anticancer efficacy. *Daru*, 27, 853-862.
- FDA. 2011. *FDA Datenblatt Temodar* [Online]. Available: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/021029s021_022277s005lbl.pdf [Accessed 16.05.2022].
- FLAHAUT, M., JAUQUIER, N., CHEVALIER, N., NARDOU, K., BALMAS BOURLOUD, K., JOSEPH, J. M., BARRAS, D., WIDMANN, C., GROSS, N., RENELLA, R. & MUHLETHALER-MOTTET, A. 2016. Aldehyde dehydrogenase activity plays a Key role in the aggressive phenotype of neuroblastoma. *BMC Cancer*, 16, 781.
- FRIEDMAN, H. S., KERBY, T. & CALVERT, H. 2000. Temozolomide and Treatment of Malignant Glioma. *Clinical Cancer Research*, 6, 2585-2597.
- GANSER, K., ECKERT, F., RIEDEL, A., STRANSKY, N., PAULSEN, F., NOELL, S., KRUEGER, M., SCHITTENHELM, J., BECK-WÖDL, S., ZIPS, D., RUTH, P., HUBER, S. M. & KLUMPP, L. 2022. Patient-individual phenotypes of glioblastoma stem cells are conserved in culture and associate with radioresistance, brain infiltration and patient prognosis. *International Journal of Cancer*, 150, 1722-1733.
- GLAUSER, T. A., NELSON, A. N., ZEMBOWER, D. E., LIPSKY, J. J. & WEINSHILBOUM, R. M. 1993. Diethyldithiocarbamate S-methylation: evidence for catalysis by human liver thiol methyltransferase and thiopurine methyltransferase. *J Pharmacol Exp Ther*, 266, 23-32.
- GUNASEKARAN, S., WEINSTEIN, P., ANDERSON, G., PARKER, D., MISIOROWSKI, R. L. & CHVAPIL, M. 1983. Distribution of disulfiram in brain after carotid ligation in gerbils. *Neuropharmacology*, 22, 1159-63.
- GUPTA, P. B., CHAFFER, C. L. & WEINBERG, R. A. 2009. Cancer stem cells: mirage or reality? *Nature Medicine*, 15, 1010-1012.
- HE, H., MARKOUTSA, E., LI, J. & XU, P. 2018. Repurposing disulfiram for cancer therapy via targeted nanotechnology through enhanced tumor mass penetration and disassembly. *Acta Biomater*, 68, 113-124.
- HEGI, M. E., DISERENS, A.-C., GORLIA, T., HAMOU, M.-F., DE TRIBOLET, N., WELLER, M., KROS, J. M., HAINFELLNER, J. A., MASON, W., MARIANI, L., BROMBERG, J. E. C., HAU, P., MIRIMANOFF, R. O., CAIRNCROSS,

- J. G., JANZER, R. C. & STUPP, R. 2005. MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 352, 997-1003.
- HEGI, M. E., LIU, L., HERMAN, J. G., STUPP, R., WICK, W., WELLER, M., MEHTA, M. P. & GILBERT, M. R. 2008. Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J Clin Oncol*, 26, 4189-99.
- HEMMATI, H. D., NAKANO, I., LAZAREFF, J. A., MASTERMAN-SMITH, M., GESCHWIND, D. H., BRONNER-FRASER, M. & KORNBLUM, H. I. 2003. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 15178-15183.
- HOLLAND, E. C. 2000. Glioblastoma multiforme: The terminator. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 6242-6244.
- HOTHI, P., MARTINS, T. J., CHEN, L., DELEYROLLE, L., YOON, J. G., REYNOLDS, B. & FOLTZ, G. 2012. High-throughput chemical screens identify disulfiram as an inhibitor of human glioblastoma stem cells. *Oncotarget*, 3, 1124-36.
- HUANG, J., CAMPIAN, J. L., GUJAR, A. D., TRAN, D. D., LOCKHART, A. C., DEWEES, T. A., TSIEN, C. I. & KIM, A. H. 2016. A phase I study to repurpose disulfiram in combination with temozolomide to treat newly diagnosed glioblastoma after chemoradiotherapy. *J Neurooncol*, 128, 259-66.
- HUANG, J., CAMPIAN, J. L., GUJAR, A. D., TSIEN, C., ANSSTAS, G., TRAN, D. D., DEWEES, T. A., LOCKHART, A. C. & KIM, A. H. 2018. Final results of a phase I dose-escalation, dose-expansion study of adding disulfiram with or without copper to adjuvant temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *J Neurooncol*, 138, 105-111.
- HUANG, J., CHAUDHARY, R., COHEN, A. L., FINK, K., GOLDLUST, S., BOOCKVAR, J., CHINNAIYAN, P., WAN, L., MARCUS, S. & CAMPIAN, J. L. 2019. A multicenter phase II study of temozolomide plus disulfiram and copper for recurrent temozolomide-resistant glioblastoma. *J Neurooncol*, 142, 537-544.
- JAKOLA, A. S., WERLENIUS, K., MUDAISI, M., HYLIN, S., KINHULT, S., BARTEK, J., JR., SALVESEN, Ø., CARLSEN, S. M., STRANDÉUS, M., LINDSKOG, M., LÖFGREN, D., RYDENHAG, B., CARSTAM, L., GULATI, S., SOLHEIM, O., BARTEK, J. & SOLHEIM, T. 2018. Disulfiram repurposing combined with nutritional copper supplement as add-on to chemotherapy in recurrent glioblastoma (DIRECT): Study protocol for a randomized controlled trial. *F1000Res*, 7, 1797.
- JENSEN, J. C., FAIMAN, M. D. & HURWITZ, A. 1982. Elimination characteristics of disulfiram over time in five alcoholic volunteers: a preliminary study. *Am J Psychiatry*, 139, 1596-8.

- JOHANSSON, B. 1992. A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of disulfiram and its metabolites. *Acta Psychiatr Scand Suppl*, 369, 15-26.
- JÖRG-CHRISTIAN TONN, M. W., J. T. RUTKA, S.A. GROSSMAN 2006. *Neuro-Oncology of CNS Tumors*, Springer, Berlin, Heidelberg.
- KAST, R. E., BOOCKVAR, J. A., BRÜNING, A., CAPPELLO, F., CHANG, W. W., CVEK, B., DOU, Q. P., DUENAS-GONZALEZ, A., EFFERTH, T., FOCOSI, D., GHAFFARI, S. H., KARPEL-MASSLER, G., KETOLA, K., KHOSHNEVISAN, A., KEIZMAN, D., MAGNÉ, N., MAROSI, C., MCDONALD, K., MUÑOZ, M., PARANJPE, A., POURGHOLAMI, M. H., SARDI, I., SELLA, A., SRIVENUGOPAL, K. S., TUCCORI, M., WANG, W., WIRTZ, C. R. & HALATSCH, M. E. 2013. A conceptually new treatment approach for relapsed glioblastoma: coordinated undermining of survival paths with nine repurposed drugs (CUSP9) by the International Initiative for Accelerated Improvement of Glioblastoma Care. *Oncotarget*, 4, 502-30.
- KAST, R. E., KARPEL-MASSLER, G. & HALATSCH, M. E. 2014. CUSP9* treatment protocol for recurrent glioblastoma: aprepitant, artesunate, auranofin, captopril, celecoxib, disulfiram, itraconazole, ritonavir, sertraline augmenting continuous low dose temozolomide. *Oncotarget*, 5, 8052-82.
- KIM, S. K., KIM, H., LEE, D. H., KIM, T. S., KIM, T., CHUNG, C., KOH, G. Y., KIM, H. & LIM, D. S. 2013. Reversing the intractable nature of pancreatic cancer by selectively targeting ALDH-high, therapy-resistant cancer cells. *PLoS One*, 8, e78130.
- KLUMPP, L., SEZGIN, E. C., SKARDELLEY, M., ECKERT, F. & HUBER, S. M. 2018. KCa3.1 Channels and Glioblastoma: In Vitro Studies. *Curr Neuropharmacol*, 16, 627-635.
- KOCH-INSTITUT, R. & E.V., G. D. E. K. I. D. 2019. Krebs in Deutschland 2015/2016. Robert Koch-Institut.
- KOH, H. K., SEO, S. Y., KIM, J. H., KIM, H. J., CHIE, E. K., KIM, S. K. & KIM, I. H. 2019. Disulfiram, a Re-positioned Aldehyde Dehydrogenase Inhibitor, Enhances Radiosensitivity of Human Glioblastoma Cells In Vitro. *Cancer Res Treat*, 51, 696-705.
- KONDO, N., TAKAHASHI, A., ONO, K. & OHNISHI, T. 2010. DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways. *J Nucleic Acids*, 2010, 543531.
- KOPPAKA, V., THOMPSON, D. C., CHEN, Y., ELLERMANN, M., NICOLAOU, K. C., JUVONEN, R. O., PETERSEN, D., DEITRICH, R. A., HURLEY, T. D. & VASILIOU, V. 2012. Aldehyde dehydrogenase inhibitors: a comprehensive review of the pharmacology, mechanism of action, substrate specificity, and clinical application. *Pharmacol Rev*, 64, 520-39.
- KOPPER, L. & HAJDÚ, M. 2004. Tumor stem cells. *Pathol Oncol Res*, 10, 69-73.

- KRAYWINKEL, K. & SPIX, C. 2019. Epidemiologie primärer Hirntumoren bei Kindern und Erwachsenen in Deutschland. *Der Onkologe*, 25, 5-9.
- KRESO, A. & DICK, J. E. 2014. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell*, 14, 275-91.
- KURTH, I., HEIN, L., MABERT, K., PEITZSCH, C., KOI, L., COJOC, M., KUNZ-SCHUGHART, L., BAUMANN, M. & DUBROVSKA, A. 2015. Cancer stem cell related markers of radioresistance in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, 6, 34494-509.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LEE, Y. E., CHOI, S. A., KWACK, P. A., KIM, H. J., KIM, I. H., WANG, K. C., PHI, J. H., LEE, J. Y., CHONG, S., PARK, S. H., PARK, K. D., HWANG, D. W., JOO, K. M. & KIM, S. K. 2017. Repositioning disulfiram as a radiosensitizer against atypical teratoid/rhabdoid tumor. *Neuro Oncol*, 19, 1079-1087.
- LI, G., LI, Y., LIU, X., WANG, Z., ZHANG, C., WU, F., JIANG, H., ZHANG, W., BAO, Z., WANG, Y., CAI, J., ZHAO, L., KAHLERT, U. D., JIANG, T. & ZHANG, W. 2018a. ALDH1A3 induces mesenchymal differentiation and serves as a predictor for survival in glioblastoma. *Cell Death Dis*, 9, 1190.
- LI, L. & BHATIA, R. 2011. Stem cell quiescence. *Clin Cancer Res*, 17, 4936-41.
- LI, Y., WANG, L. H., ZHANG, H. T., WANG, Y. T., LIU, S., ZHOU, W. L., YUAN, X. Z., LI, T. Y., WU, C. F. & YANG, J. Y. 2018b. Disulfiram combined with copper inhibits metastasis and epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma through the NF- κ B and TGF- β pathways. *J Cell Mol Med*, 22, 439-451.
- LIU, L., JIANG, D., MCDONALD, A., HAO, Y., MILLHAUSER, G. L. & ZHOU, F. 2011. Copper redox cycling in the prion protein depends critically on binding mode. *J Am Chem Soc*, 133, 12229-37.
- LIU, P., BROWN, S., GOKTUG, T., CHANNATHODIYIL, P., KANNAPPAN, V., HUGNOT, J. P., GUICHET, P. O., BIAN, X., ARMESILLA, A. L., DARLING, J. L. & WANG, W. 2012. Cytotoxic effect of disulfiram/copper on human glioblastoma cell lines and ALDH-positive cancer-stem-like cells. *Br J Cancer*, 107, 1488-97.
- LOUIS, D. N., PERRY, A., REIFENBERGER, G., VON DEIMLING, A., FIGARELLA-BRANGER, D., CAVENEE, W. K., OHGAKI, H., WIESTLER, O. D., KLEIHUES, P. & ELLISON, D. W. 2016. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*, 131, 803-820.
- LU, C., LI, X., REN, Y. & ZHANG, X. 2021. Disulfiram: a novel repurposed drug for cancer therapy. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 87, 159-172.
- LUN, X., WELLS, J. C., GRINSHTEIN, N., KING, J. C., HAO, X., DANG, N. H., WANG, X., AMAN, A., UEHLING, D., DATTI, A., WRANA, J. L., EASAW, J. C., LUCHMAN, A., WEISS, S., CAIRNCROSS, J. G., KAPLAN, D. R.,

- ROBBINS, S. M. & SENGER, D. L. 2016. Disulfiram when Combined with Copper Enhances the Therapeutic Effects of Temozolomide for the Treatment of Glioblastoma. *Clin Cancer Res*, 22, 3860-75.
- MACHEREY-NAGEL. 2015. *RNA isolation* [Online]. Available: <https://www.mn-net.com/media/pdf/b0/51/ee/Instruction-NucleoSpin-RNA.pdf> [Accessed 16.05.2022].
- MAO, P., JOSHI, K., LI, J., KIM, S. H., LI, P., SANTANA-SANTOS, L., LUTHRA, S., CHANDRAN, U. R., BENOS, P. V., SMITH, L., WANG, M., HU, B., CHENG, S. Y., SOBOL, R. W. & NAKANO, I. 2013. Mesenchymal glioma stem cells are maintained by activated glycolytic metabolism involving aldehyde dehydrogenase 1A3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 8644-9.
- MARKOVÁ, E., SCHULTZ, N. & BELYAEV, I. Y. 2007. Kinetics and dose-response of residual 53BP1/gamma-H2AX foci: co-localization, relationship with DSB repair and clonogenic survival. *Int J Radiat Biol*, 83, 319-29.
- MCCONVILLE, C., TAWARI, P. & WANG, W. 2015. Hot melt extruded and injection moulded disulfiram-loaded PLGA millirods for the treatment of glioblastoma multiforme via stereotactic injection. *Int J Pharm*, 494, 73-82.
- MEACHAM, C. E. & MORRISON, S. J. 2013. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature*, 501, 328-37.
- MERAZ-TORRES, F., PLÖGER, S., GARBE, C., NIESSNER, H. & SINNBERG, T. 2020. Disulfiram as a Therapeutic Agent for Metastatic Malignant Melanoma-Old Myth or New Logos? *Cancers (Basel)*, 12.
- MICROMEDEX 2003. *USP DI 2003: Drug Information for Healthcare Professionals*, Thomson Micromedex.
- MUTSCHLER, J., DIEHL, A. & KIEFER, F. 2008. Klinische Pharmakologie von Disulfiram - eine aktuelle Übersicht. *Fortschr Neurol Psychiatr*, 76, 225-231.
- NATSUME, A., ISHII, D., WAKABAYASHI, T., TSUNO, T., HATANO, H., MIZUNO, M. & YOSHIDA, J. 2005. IFN-beta down-regulates the expression of DNA repair gene MGMT and sensitizes resistant glioma cells to temozolomide. *Cancer Res*, 65, 7573-9.
- NEVITT, T., OHRVIK, H. & THIELE, D. J. 2012. Charting the travels of copper in eukaryotes from yeast to mammals. *Biochim Biophys Acta*, 1823, 1580-93.
- NICOLETTI, I., MIGLIORATI, G., PAGLIACCI, M. C., GRIGNANI, F. & RICCARDI, C. 1991. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 139, 271-279.
- NOMURA, S., NOZAKI, S., HAMAZAKI, T., TAKEDA, T., NINOMIYA, E., KUDO, S., HAYASHINAKA, E., WADA, Y., HIROKI, T., FUJISAWA, C., KODAMA, H., SHINTAKU, H. & WATANABE, Y. 2014. PET imaging analysis with

- ⁶⁴Cu in disulfiram treatment for aberrant copper biodistribution in Menkes disease mouse model. *J Nucl Med*, 55, 845-51.
- O'BRIEN, C. A., POLLETT, A., GALLINGER, S. & DICK, J. E. 2007. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*, 445, 106-10.
- PARANJPE, A., ZHANG, R., ALI-OSMAN, F., BOBUSTUC, G. C. & SRIVENUGOPAL, K. S. 2014. Disulfiram is a direct and potent inhibitor of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in brain tumor cells and mouse brain and markedly increases the alkylating DNA damage. *Carcinogenesis*, 35, 692-702.
- PARKER, N. R., KHONG, P., PARKINSON, J. F., HOWELL, V. M. & WHEELER, H. R. 2015. Molecular heterogeneity in glioblastoma: potential clinical implications. *Front Oncol*, 5, 55.
- PHILLIPS, H. S., KHARBANDA, S., CHEN, R., FORREST, W. F., SORIANO, R. H., WU, T. D., MISRA, A., NIGRO, J. M., COLMAN, H., SOROCEANU, L., WILLIAMS, P. M., MODRUSAN, Z., FEUERSTEIN, B. G. & ALDAPE, K. 2006. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell*, 9, 157-73.
- QIAGEN. 2012. *QIAGEN OneStep RT-PCR Kit Handbook* [Online]. Available: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=57743726-84e1-423a-9d8f-a3fa89bbe7eb&lang=en> [Accessed 18.09.2022].
- QU, Y., LI, A., MA, L., IQBAL, S., SUN, X., MA, W., LI, C., ZHENG, D., XU, Z., ZHAO, Z. & MA, D. 2021. Nose-to-brain delivery of disulfiram nanoemulsion in situ gel formulation for glioblastoma targeting therapy. *Int J Pharm*, 597, 120250.
- RENART, J., REISER, J. & STARK, G. R. 1979. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 3116-20.
- RICCI-VITIANI, L., LOMBARDI, D. G., PILOZZI, E., BIFFONI, M., TODARO, M., PESCHLE, C. & DE MARIA, R. 2007. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, 445, 111-5.
- ROBINSON, T. J., PAI, M., LIU, J. C., VIZEACOUMAR, F., SUN, T., EGAN, S. E., DATTI, A., HUANG, J. & ZACKSENHAUS, E. 2013. High-throughput screen identifies disulfiram as a potential therapeutic for triple-negative breast cancer cells: interaction with IQ motif-containing factors. *Cell Cycle*, 12, 3013-24.
- SAFI, R., NELSON, E. R., CHITNENI, S. K., FRANZ, K. J., GEORGE, D. J., ZALUTSKY, M. R. & MCDONNELL, D. P. 2014. Copper signaling axis as a target for prostate cancer therapeutics. *Cancer Res*, 74, 5819-31.
- SCHWEIZER, M. T., LIN, J., BLACKFORD, A., BARDIA, A., KING, S., ARMSTRONG, A. J., RUDEK, M. A., YEGNASUBRAMANIAN, S. &

- CARDUCCI, M. A. 2013. Pharmacodynamic study of disulfiram in men with non-metastatic recurrent prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 16, 357-61.
- SHACKLETON, M. 2010. Normal stem cells and cancer stem cells: similar and different. *Semin Cancer Biol*, 20, 85-92.
- SILVIA HOFER, L. B., JUDITH DIERLAMM, ANCA-LIGIA GROSU, PETER HAU, JÖRG HENSE, TOBIAS PFLUGSHAUPT, MATTHIAS PREUSSER, MARTIN PROESCHOLDT, TOBIAS PUKROP, ELISABETH JANE RUSHING, MARIANNE SINN, BERNHARD WÖRMANN März 2019. Gliome im Erwachsenenalter. *Onkologie*.
- SINGH, S. K., CLARKE, I. D., TERASAKI, M., BONN, V. E., HAWKINS, C., SQUIRE, J. & DIRKS, P. B. 2003. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*, 63, 5821-8.
- SMINIA, P. & WESTERMAN, B. A. 2016. Blood-brain barrier crossing and breakthroughs in glioblastoma therapy. *Br J Clin Pharmacol*, 81, 1018-20.
- SOLTYSOVA, A., ALTANEROVA, V. & ALTANER, C. 2005. Cancer stem cells. *Neoplasma*, 52, 435-40.
- STEMCELL. 2016. *ALDEFLUOR™ Kit* [Online]. Available: https://cdn.stemcell.com/media/files/pis/29888-PIS_1_1_2.pdf?_ga=2.207143571.1023362432.1663603106-1770530491.1663603106 [Accessed 19.09.2022].
- STUPP, R., HEGI, M. E., MASON, W. P., VAN DEN BENT, M. J., TAPHOORN, M. J., JANZER, R. C., LUDWIN, S. K., ALLGEIER, A., FISHER, B., BELANGER, K., HAU, P., BRANDES, A. A., GIJTENBEEK, J., MAROSI, C., VECHT, C. J., MOKHTARI, K., WESSELING, P., VILLA, S., EISENHAUER, E., GORLIA, T., WELLER, M., LACOMBE, D., CAIRNCROSS, J. G. & MIRIMANOFF, R. O. 2009. 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, 459-66.
- STUPP, R., MASON, W. P., VAN DEN BENT, M. J., WELLER, M., FISHER, B., TAPHOORN, M. J. B., BELANGER, K., BRANDES, A. A., MAROSI, C., BOGDAHN, U., CURSCHMANN, J., JANZER, R. C., LUDWIN, S. K., GORLIA, T., ALLGEIER, A., LACOMBE, D., CAIRNCROSS, J. G., EISENHAUER, E. & MIRIMANOFF, R. O. 2005. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 352, 987-996.
- SUN, T., YANG, W., TOPRANI, S. M., GUO, W., HE, L., DELEO, A. B., FERRONE, S., ZHANG, G., WANG, E., LIN, Z., HU, P. & WANG, X. 2020. Induction of immunogenic cell death in radiation-resistant breast cancer stem cells by repurposing anti-alcoholism drug disulfiram. *Cell Commun Signal*, 18, 36.
- TASWELL, C. 1987. Chapter 6 - Limiting Dilution Assays for the Separation, Characterization, and Quantitation of Biologically Active Particles and

- Their Clonal Progeny. *In*: PRETLOW, T. G. & PRETLOW, T. P. (eds.) *Cell Separation*. Academic Press.
- THE, CANCER, GENOME, ATLAS, RESEARCH, NETWORK & (TCGA) 2008. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 2008/09/06 ed.
- THERMOFISHER. 2020. *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* [Online]. Available: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf [Accessed 18.09.2022].
- THERMOSCIENTIFIC. 2021. *Ponceau S Staining Solution* [Online]. Available: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2FMAN0025939_Ponceau_S_Staining_Soln_UG.pdf [Accessed 27.09.2022].
- TRISCOTT, J., LEE, C., HU, K., FOTOVATI, A., BERNS, R., PAMBID, M., LUK, M., KAST, R. E., KONG, E., TOYOTA, E., YIP, S., TOYOTA, B. & DUNN, S. E. 2012. Disulfiram, a drug widely used to control alcoholism, suppresses the self-renewal of glioblastoma and over-rides resistance to temozolomide. *Oncotarget*, 3, 1112-23.
- VERHAAK, R. G., HOADLEY, K. A., PURDOM, E., WANG, V., QI, Y., WILKERSON, M. D., MILLER, C. R., DING, L., GOLUB, T., MESIROV, J. P., ALEXE, G., LAWRENCE, M., O'KELLY, M., TAMAYO, P., WEIR, B. A., GABRIEL, S., WINCKLER, W., GUPTA, S., JAKKULA, L., FEILER, H. S., HODGSON, J. G., JAMES, C. D., SARKARIA, J. N., BRENNAN, C., KAHN, A., SPELLMAN, P. T., WILSON, R. K., SPEED, T. P., GRAY, J. W., MEYERSON, M., GETZ, G., PEROU, C. M. & HAYES, D. N. 2010. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*, 17, 98-110.
- VIOLA-RHENALS, M., PATEL, K. R., JAIMES-SANTAMARIA, L., WU, G., LIU, J. & DOU, Q. P. 2018. Recent Advances in Antabuse (Disulfiram): The Importance of its Metal-binding Ability to its Anticancer Activity. *Current medicinal chemistry*, 25, 506-524.
- WELLER, M. 2014. Dosisintensivierung ohne Zusatzeffekt. *Info Onkologie*, 17, 14-15.
- WELLER, M., STUPP, R., REIFENBERGER, G., BRANDES, A. A., VAN DEN BENT, M. J., WICK, W. & HEGI, M. E. 2010. MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nature Reviews Neurology*, 6, 39-51.
- WESTHOFF, M. A., ZHOU, S., NONNENMACHER, L., KARPEL-MASSLER, G., JENNEWEIN, C., SCHNEIDER, M., HALATSCH, M. E., CARRAGHER, N. O., BAUMANN, B., KRAUSE, A., SIMMET, T., BACHEM, M. G., WIRTZ, C. R. & DEBATIN, K. M. 2013. Inhibition of NF-κB signaling ablates the invasive phenotype of glioblastoma. *Mol Cancer Res*, 11, 1611-23.

- WICK W., E. A. 2021. Gliome, S3k-Leitlinie. *Leitlinie für Diagnostik und Therapie in der Neurologie*. Deutsche Gesellschaft für Neurologie.
- WICKSTRÖM, M., DANIELSSON, K., RICKARDSON, L., GULLBO, J., NYGREN, P., ISAKSSON, A., LARSSON, R. & LÖVBORG, H. 2007. Pharmacological profiling of disulfiram using human tumor cell lines and human tumor cells from patients. *Biochem Pharmacol*, 73, 25-33.
- WIRSCHING, H. G., GALANIS, E. & WELLER, M. 2016. Glioblastoma. *Handb Clin Neurol*, 134, 381-97.
- XU, H. S., QIN, X. L., ZONG, H. L., HE, X. G. & CAO, L. 2017. Cancer stem cell markers in glioblastoma - an update. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 21, 3207-3211.
- ZHANG, J., STEVENS, M. F. & BRADSHAW, T. D. 2012. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Curr Mol Pharmacol*, 5, 102-14.
- ZHAO, Y., XIAO, Z., CHEN, W., YANG, J., LI, T. & FAN, B. 2015. Disulfiram sensitizes pituitary adenoma cells to temozolomide by regulating O6-methylguanine-DNA methyltransferase expression. *Mol Med Rep*, 12, 2313-22.
- ZHOU, B., GUO, L., ZHANG, B., LIU, S., ZHANG, K., YAN, J., ZHANG, W., YU, M., CHEN, Z., XU, Y., XIAO, Y., ZHOU, J., FAN, J., LI, H. & YE, Q. 2019. Disulfiram combined with copper induces immunosuppression via PD-L1 stabilization in hepatocellular carcinoma. *Am J Cancer Res*, 9, 2442-2455.
- ZIRJACKS, L., STRANSKY, N., KLUMPP, L., PRAUSE, L., ECKERT, F., ZIPS, D., SCHLEICHER, S., HANDGRETINGER, R., HUBER, S. M. & GANSER, K. 2021. Repurposing Disulfiram for Targeting of Glioblastoma Stem Cells: An In Vitro Study. *Biomolecules*, 11, 1561.

7. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Radioonkologie Tübingen in der Abteilung für experimentelle Radioonkologie unter Betreuung von Prof. Dr. rer. nat. Stephan Huber durchgeführt. Die Konzeption der Arbeit erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med. Rupert Handgretinger und Dr. rer. nat. Sabine Schleicher. Sämtliche in dieser Arbeit abgebildeten Ergebnisse wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder (Katrin Ganser, Nicolai Stransky, Lukas Prause und Heidrun Faltin) von mir eigenständig durchgeführt. Die Durchführung der PCR-Analysen (Abb. 10, Abb. 11A) erfolgten in Kooperation mit Lukas Prause und Katrin Ganser. Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Prof. Dr. rer. nat. Stephan Huber durch mich. Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Bezugnehmend auf die Veröffentlichung: „Zirjacks, L., et al., Repurposing Disulfiram for Targeting of Glioblastoma Stem Cells: An In Vitro Study. *Biomolecules*, 2021. 11(11): p. 1561“, erfolgte die Konzeption in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med. Rupert Handgretinger und Dr. rer. nat. Sabine Schleicher. Abgebildete Ergebnisse in Fig. 1 wurden durch Lukas Klumpp durchgeführt. Methoden in Fig. 2.B., Fig. 3 A,B erfolgten in Kooperation mit Lukas Prause (Fig. 2B) und Katrin Ganser (Fig. 3A,B). Alle restlichen Versuche wurden eigenständig von mir durchgeführt. An der Erstellung des Manuskripts waren Prof. Dr. rer. nat. Stephan Huber, Prof. Dr. med. Daniel Zips, PD Dr. med. Franziska Eckert, Katrin Ganser, Nicolai Stransky und ich beteiligt.

Tübingen, den 16.05.2022

Lisa Groß

8. Veröffentlichung

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

Zirjacks, L.; Stransky, N.; Klumpp, L.; Prause, L.; Eckert, F.; Zips, D.; Schleicher, S.; Handgretinger, R.; Huber, S.M.; Ganser, K. Repurposing Disulfiram for Targeting of Glioblastoma Stem Cells: An In Vitro Study. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1561. <https://doi.org/10.3390/biom11111561>

(Zirjacks et al., 2021)

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen beteiligten Personen einen großen Dank aussprechen, die mich im Rahmen dieser Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Stephan Huber und Frau Prof. Dr. Franziska Eckert für die ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung und Umsetzung der gesamten Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe der experimentellen Radioonkologie bedanken. Allen Voran meiner Betreuerin und guten Freundin Katrin Ganser, die mich auf meinem Weg mit Anregungen, produktiven Gesprächen und lieben Worten begleitet hat, sowie Nico Stransky, Lukas Klumpp und Heidi Feltin, die mich durch ihre fachliche und persönliche Unterstützung über den gesamten Zeitraum unterstützt haben.

Außerdem möchte ich mich bei Dominic Groß und meinen Eltern für ihre Geduld und ermutigenden Zusprüche während der Arbeit an dieser Dissertation bedanken.