

Molekularbiologische Untersuchung der Auswirkung einer pharmakologischen Connexin 43-Inhibition auf die Wirksamkeit von Temozolomid beim Glioblastom

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Elena Nicola Charlotte Schmidt

aus Bonn

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. med. Dipl.-Mus. Matthias Schneider
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Christian Bode

Tag der Mündlichen Prüfung: 27.08.2025

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	4
1.	Deutsche Zusammenfassung	7
1.1	Einleitung	7
1.2	Material und Methoden	8
1.3	Ergebnisse	18
1.4	Diskussion	31
1.5	Zusammenfassung	36
1.6	Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	37
2.	Veröffentlichung	44
3.	Erklärung zum Eigenanteil	45
4.	Danksagung	47

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Varianzanalyse (Analysis of Variance)
BCA	Bicinchoninsäure (Bicinchoninic Acid)
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	Komplementäre DNA (complementary DNA)
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
Ctr	Kontrolle (control)
Cx43	Connexin 43
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEGs	Differenziell exprimierte Gene
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)
dsDNA	Doppelsträngige DNA
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (Epidermal Growth Factor)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FACS	Durchflusszytometrie (Fluorescence-Activated Cell Sorting)
FC	Fold Change
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor (Fibroblast Growth Factor)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

Gen.	Generation
GFAP	Saures Gliafaserprotein (glial fibrillary acidic protein)
<i>GJA1</i>	Gen, das für Connexin 43 kodiert
GJs	Gap Junctions
GSEA	Gene-Set-Enrichment-Analyse (Gene Set Enrichment Analysis)
h	Stunden
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
KO	Knockout
log2FC	log2-Fold-Change
MFA	Meclofenamat
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
mRNA	Messenger RNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MULE	Multiple lentivirale Expression
p-adj	Adjustierter p-Wert (adjusted p-value)
PCA	Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis)
PI	Propidiumiodid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIN	RNA-Integritätsnummer
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
sgRNA	Single guide RNA

TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-20 (Tris-Buffered Saline with Tween-20)
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TMs	Zellausläufer (Tumor Microtubes)
TMZ	Temozolomid
TNTs	Membranartige Strukturen, die zwei Zellen verbinden (Tunneling Nanotubes)
TO	Tonabersat
TTF	TumortheraPIefelder (Tumor Treating Fields)
VST	Varianzstabilisierende Transformation
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)
WT	Wildtyp

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Das Glioblastom *IDH*-(Isocitrat-Dehydrogenase)-Wildtyp (ZNS WHO Grad 4) ist der häufigste primäre Hirntumor im Erwachsenenalter (Louis et al., 2021). Trotz einer multimodalen Therapie, bestehend aus chirurgischer Resektion, Strahlentherapie, Chemotherapie mit Temozolomid (TMZ) und gegebenenfalls einer zusätzlichen Behandlung mit Tumortherapiefeldern (TTF), bleibt das Glioblastom eine der aggressivsten Tumorerkrankungen, mit einem mittleren Gesamtüberleben von nur 16–20 Monaten (Stupp et al., 2017).

Die Entdeckung, dass Tumorzellen funktionelle Netzwerke bilden (Venkataramani et al., 2022), hat das Verständnis der Tumorbilogie, insbesondere von Hirntumoren, grundlegend verändert. Osswald et al. (2015) beschrieben, dass eine Säule dieser Tumornetzwerke im Glioblastom ultra-lange, dünne Zellausläufer, sogenannte „Tumor Microtubes“ (TMs), sind, die eine interzelluläre Konnektivität ermöglichen. Darüber hinaus konnten sie nachweisen, dass an den Verknüpfungspunkten dieser TMs vermehrt Gap Junctions (GJs) ausgebildet werden, die aus dem Membranprotein Connexin 43 (Cx43) bestehen. GJs ermöglichen den direkten interzellulären Austausch von Metaboliten, Ionen und pro-onkogenen Signalen und gewährleisten so die Kommunikation sowohl zwischen den Tumorzellen als auch mit ihrer Umgebung. Dadurch tragen sie zur Stabilität und Funktionalität der Tumornetzwerke bei (Aasen et al., 2019; Aasen et al., 2016). Dies begünstigt das Tumorwachstum, die Invasion in gesundes Hirngewebe und die Entwicklung von Therapieresistenzen, insbesondere gegenüber der TMZ-basierten Standardtherapie (Potthoff et al., 2019; Weil et al., 2017).

Aufgrund dieser Zusammenhänge rücken GJs zunehmend als potenzielles therapeutisches Ziel bei verschiedenen onkologischen Erkrankungen in den Fokus, so auch beim Glioblastom (Jensen et al., 2011; Potthoff et al., 2019; Sinyuk et al., 2018; Zhao et al., 2012). Die Entwicklung effektiver und klinisch praktikabler GJ-Inhibitoren blieb jedoch bislang aus. Carbenoxolon, ein Glycyrrhetinsäure-Derivat und einer der am häufigsten

experimentell untersuchten GJ-Hemmer (Murphy et al., 2016; Yulyana et al., 2013), ist mit erheblichen Nebenwirkungen assoziiert (Davies et al., 1974). Darüber hinaus wurde in Studien gezeigt, dass Carbenoxolon nach systemischer Verabreichung keine therapeutisch relevanten Konzentrationen im Gehirn erreicht (Leshchenko et al., 2006). Tonabersat (TO), ein Benzopyranderivat mit GJ-hemmenden Eigenschaften und der Fähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke zuverlässig zu überwinden (Chan et al., 1999; Kim et al., 2017), wurde bereits in klinischen Studien zur Behandlung von Migräne eingesetzt (Goadsby et al., 2009; Hauge et al., 2009). Dabei zeigte TO ein sehr günstiges Nebenwirkungsprofil und stellt somit einen vielversprechenden Kandidaten dar (Goadsby et al., 2009). Studien zur Schmerzmodulation legen nahe, dass TO durch die Hemmung der GJ-Kopplung zwischen Neuronen und Satelliten-Gliazellen im Ganglion Gasseri wirkt (Damodaram et al., 2009). Ein ähnlicher Mechanismus könnte im Rahmen der Tumorthherapie genutzt werden. TO könnte durch eine Beeinträchtigung der interzellulären Konnektivität die Vulnerabilität von Glioblastomzellen erhöhen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diese Hypothese *in vitro* zu validieren. Hierfür wurden die funktionellen, morphologischen und molekularbiologischen Effekte einer TO-Therapie in Glioblastomzellen umfassend analysiert. Es sollte geprüft werden, ob eine TO-vermittelte Schwächung der Tumornetzwerke die Sensitivität der Glioblastomzellen gegenüber TMZ-induziertem Zelltod erhöht und somit die Effizienz der Standardtherapie verbessert.

1.2 Material und Methoden

1.2.1 Zellkultur und Charakterisierung der Zellsubpopulationen

Für die Experimente wurden Zellen aus intraoperativ gewonnenem Tumorgewebe isoliert und uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Debatin/Westhoff (Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Ulm) zur Verfügung gestellt. Bei den Patient:innen war zuvor ein Glioblastom histologisch gesichert worden. Die Zellgewinnung erfolgte nach vorheriger schriftlicher Einwilligung der Patient:innen und wurde durch die Ethikkommission der Universität Ulm (Antragsnummer: 162/10) genehmigt. Das entnommene Tumorgewebe wurde mechanisch und enzymatisch dissoziiert, gereinigt und als Suspensionskultur expandiert (detaillierte Methodik siehe Schneider et al. (2016)). Die Kultivierung der

stammzellartigen Zellen erfolgte in Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA) ergänzt mit Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) (0,1 µg/ml) (Miltenyi Biotec, Deutschland), epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) (0,2 µg/ml) (Biomol, Deutschland), B27-Supplement (1 %) (Gibco), Amphotericin B (2 %) (Gibco) und Penicillin/Streptomycin (1 %) (PAN-Biotech, Deutschland) in ventilierten Zellkulturflaschen (Falcon, Corning, USA) (Potthoff et al., 2019). Die drei primären Zellpopulationen, die aus dem Patient:innenmaterial isoliert wurden, erhielten die Bezeichnungen G35, G71 und G106. Zur Differenzierung wurden die Zellen in beschichtete Zellkulturflaschen (Falcon) überführt und in DMEM-Medium (Gibco), ergänzt mit 10 % fetalem Kälberserum (Gibco) und 1 % Penicillin/Streptomycin, kultiviert, um adhärente Zellen zu erzeugen, die für maximal zwölf Passagen verwendet wurden. Alle Zellen wurden unter standardisierten Bedingungen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Die Zelllinien wurden auf eine Hypermethylierung des Promotors des O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase(*MGMT*)-Gens sowie auf den *IDH*-Status untersucht. Dazu wurde die DNA mittels QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Deutschland) isoliert und anschließend durch das Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Bonn mittels Pyrosequenzierung analysiert (detaillierte Methodik siehe Mikeska et al., 2007 und Setty et al., 2010).

Die Kultivierung der Knockout(KO)-Zelllinien erfolgte in Analogie zu den Wildtyp(WT)-Zelllinien, wobei das Medium der G35-KO-Zellkultur mit Hygromycin (25 µg/mL) (Carl Roth, Deutschland) und das der G71-KO-Zellkultur mit Puromycin (1 µg/mL) (Carl Roth) versetzt wurde, um den Selektionsdruck aufrechtzuerhalten.

1.2.2 Erzeugung klonaler Cx43-KO-Zelllinien mittels Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)

1.2.2.1 Cx43-KO-Linien aus primären G35-Glioblastomzellen

Die Generierung der Cx43-KO-Klone der G35-Zelllinie erfolgte in enger Zusammenarbeit mit PD Dr. rer. nat. Bernd Evert im neurobiologischen Labor der Arbeitsgruppe Wüllner

(Zentrum für Neurologie, Universitätsklinikum Bonn). Mithilfe des integrierten CRISPOR-Tools (<http://crispor.tefor.net>) wurden zunächst im UCSC-Genombrowser (<https://genome.ucsc.edu/>) verschiedene single guide RNA (sgRNA)-Sequenzen und potenzielle CRISPR/Cas9-Bindungsstellen ausgewählt, um den Transkriptionsstart von Cx43 im Exon 2 des *GJA1*-Gens (Gen, das für Connexin 43 kodiert) gezielt zu modifizieren. Zwei sgRNA-Sequenzen (sgRNA-TS3 und sgRNA-TS4) und ihre jeweiligen reversen komplementären Sequenzen (Tab. 1) wurden hybridisiert, in den linearisierten Cas9-Nuklease-exprimierenden CRISPR-Nuklease-Vektor (GeneArt, Thermo Fisher Scientific, USA) eingesetzt und die entsprechenden CRISPR/Cas9-sgRNA-TS3- und -TS4-Konstrukte hergestellt.

Zur Erzeugung der klonalen G35-Cx43-KO-Zelllinien wurden jeweils $1,5 \times 10^6$ primäre G35-Glioblastomzellen auf 10 cm große Gewebekulturschalen (Falcon) ausgesät, die zuvor mit Fibronektin ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) (Sigma-Aldrich, Merck, Deutschland) beschichtet worden waren. Nach 24 Stunden Inkubation unter standardisierten Bedingungen wurden die adherenten Zellen mit $12,6 \mu\text{g}$ des CRISPR-Cas9-sgRNA-TS3- oder -TS4-Vektors und jeweils $1,4 \mu\text{g}$ des Selektionsmarkers pTK-hygro (Clontech, jetzt Takara Bio, Japan) unter Verwendung von RotiFect Plus (Carl Roth) im Verhältnis von 1:5 (Plasmide:RotiFect) kotransfiziert. Anschließend erfolgte eine weitere 24-stündige Inkubation in normalem Wachstumsmedium. Nach 48 Stunden wurde das Selektions-Antibiotikum Hygromycin B ($0,025 \text{ mg}/\text{ml}$) zugegeben und die Zellen so lange weiter inkubiert bis resistente Einzelkolonien sichtbar wurden. Die nach etwa zwei Wochen sichtbaren, Hygromycin-resistenten Einzelkolonien wurden abgelöst und in Fibronektin-beschichtete 24-Well-Platten (Sarstedt, Deutschland) überführt. Sobald die Zellkolonien konfluent waren (nach etwa fünf bis sieben Tagen), wurden sie auf zwei Fibronektin-beschichtete 48-Well-Platten übertragen und aufgeteilt: Eine Platte diente der Expansion der klonalen Zellen, die andere Platte wurde zur Analyse der Cx43-Expression mittels Immunblotting verwendet (Abb. 7C). Zwei der stabilen, isolierten G35-Cx34-KO-Zellklone wurden als #6 und #11 bezeichnet und für die Experimente dieser Arbeit verwendet.

1.2.2.2 Cx43-KO-Linien aus primären G71-Glioblastomzellen

Die Cx43-KO-Zelllinien aus primären G71-Zellen wurden uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Debatin/Westhoff (Klinik für Kinder- und Jugendmedizin,

Universitätsklinikum Ulm) zur Verfügung gestellt und nach einer im Labor von Frau Prof. Dr. med. Pamela Fischer-Posovszky (Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Ulm) etablierten Methode generiert. Zur Herstellung der CRISPR/Cas9-Konstrukte wurde eine gegen das *GJA1*-Gen gerichtete sgRNA-Sequenz (Tab. 1) sowie eine nicht zielgerichtete Kontrollsequenz mit dem CRISPick-Online-Tool (<https://portals.broadinstitute.org/gppx/crispick/public>) ausgewählt und als doppelsträngige Duplexe in das pMuLE ENTR U6 stuffer sgRNA scaffold L1-R5 Plasmid (Addgene, USA) eingesetzt. Die resultierenden pMuLE ENTR U6-sgRNA-Plasmide wurden anschließend mit weiteren Plasmiden (pMuLE ENTR CMV-hCas9 R4-R3, pMuLE ENTR MCS L3-L2 und pMuSE eGFP-P2A-PuroR DEST) (Tews et al., 2019) über ein Gateway-Klonierungssystem (Albers et al., 2015) rekombiniert und zur Kotransfektion der primären G71-Zellen verwendet. Stabile einzelne Zellklone wurden nach Selektion mit Puromycin (1 µg/mL) isoliert und mittels Immunblotting auf einen erfolgreichen Cx43-KO untersucht (Abb. 7D). Zwei stabile G71-Cx43-KO-Zellklone, #2.3 und #2.7, wurden in dieser Arbeit verwendet.

Tab. 1: Guide RNAs, die für den CRISPR-Cas9-vermittelten KO von Cx43 in der G35- und G71-Zelllinie eingesetzt wurden. Modifiziert nach Schmidt et al. (2024).

Guide RNAs für G35	Sequenz (5'-3')
Cx43-sgRNA-TS3 forward	CTTGTCAAGGAGTTTGCCTAgtttt
Cx43-sgRNA-TS3 reverse	TAGGCAAACCTCCTTGACAAGcggtg
Cx43-sgRNA-TS4 forward	AAGCCTACTCAACTGCTGGAgtttt
Cx43-sgRNA-TS4 reverse	TCCAGCAGTTGAGTAGGCTTcggtg
Guide RNAs für G71	Sequenz (5'-3')
Cx43/3 antisense	TGAGCCAGGTACAAGAGTGT
Nicht zielgerichtet	GGTCACCGATCGAGAGCTAG

1.2.3 Behandlung der Zelllinien

Um Stammlösungen von 100 mM (TMZ) und 50 mM (TO) herzustellen, wurden TMZ und TO jeweils in Dimethylsulfoxid (DMSO) (alle von Sigma) gelöst. Die Stammlösungen wurden aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Für die Experimente wurden TMZ und TO in einer Endkonzentration von 50 µM verwendet; nur bei der G106-Zelllinie wurde eine Endkonzentration von 100 µM TO eingesetzt.

1.2.4 Immunfluoreszenzmikroskopie

Differenzierte, adhären wachsende Zellen (WT und KO) wurden in 6-Well-Platten (Sarstedt) auf Deckgläschen (Sigma) ausgesät, mit 16%igem Paraformaldehyd (Sigma) fixiert, mit Triton (0,1 %) (Sigma) permeabilisiert, mit Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS) (Gibco) gewaschen und anschließend mit 5%iger boviner Serumalbuminlösung (BSA) (Carl Roth) blockiert. Danach folgte die Inkubation mit gegen Cx43 und saures Gliafaserprotein (GFAP) gerichteten Primärantikörpern sowie den entsprechenden Sekundärantikörpern (alle von Sigma). 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (SouthernBiotech, USA) diente zur Anfärbung der Zellkerne. Schließlich wurden die Deckgläschen mit ProLong Gold (Gibco) auf Objektträgern fixiert. Konfokale Bilder wurden mit einem Spinning-Disc-Mikroskop (VisiScope CSU-W1, Nikon, Europa) unter Verwendung von 10x-, 20x- und 40x-Objektiven aufgenommen. Für die semiquantitative Auswertung der Cx43-Intensität wurden die digitalen Aufnahmen (20-fache Vergrößerung) mithilfe von ImageJ (Version 2.3.0/1.53f, National Institutes of Health, USA) ausgewertet.

1.2.5 Western-Blot

Zur Herstellung von Proteinlysaten für die Western-Blot-Analyse wurden differenzierte, adhären wachsende Zellen von der Zellkulturplatte mit einem Zellschaber abgelöst und nach Zentrifugation für zehn Minuten bei 300 g einmal mit DPBS gewaschen. Das Zellpellet wurde anschließend in einem Lysepuffer (1 M NaCl, 1 M Tris-HCl pH 7,5, 20 % Triton, 1 M MgCl, 1 x Protease-Inhibitor, Benzonase (0,25 U/µl); alle von Thermo Fisher Scientific, USA) resuspendiert und 30 Minuten auf Eis lysiert. Nach Zentrifugation für zehn

Minuten bei 1500 g und 4 °C wurde der Überstand abgenommen und die Proteinkonzentration mithilfe des Bicinchoninsäure(BCA)-Assays (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Für die Elektrophorese wurden jeweils 50 µg Protein mit Laemmli-Puffer gemischt, bei 94 °C für fünf Minuten denaturiert, in einem 10%igen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt (SDS-PAGE) und dann die Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid(PVDF)-Membran (Sigma) übertragen. Nach dem Transfer wurde die PVDF-Membran für 30 Minuten in 5 % BSA in einer Tris-gepufferten Salzlösung (0,075 M Tris, 0,15 % NaCl) mit 0,1 % Tween-20 (TBST-Puffer) blockiert und anschließend über Nacht mit gegen Cx43 oder β -Aktin gerichteten Erstantikörpern (beide von Agilent Dako, USA) inkubiert. Nach der Inkubation mit dem Erstantikörper wurden die Membranen dreimal in TBST-Puffer gewaschen und mit dem entsprechenden Meerrettichperoxidase(HRP)-gekoppelten Zweitantikörper (Thermo Fisher Scientific) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss an das erneute dreimalige Waschen wurden die immunreaktiven Signale mittels Chemolumineszenz sichtbar gemacht: WT- und G35-KO-Zellen mit dem ChemoCam Imaging System (Intas, Deutschland) und G71-KO-Zellen mit dem ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad Laboratories, USA).

1.2.6 Expressionsanalyse aus öffentlichen Datenbanken

RNA-Sequenzierungsdatensätze aus den Datenbanken The Cancer Genome Atlas (TCGA) (HG-U133A und Agilent-4502A) (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008), Rembrandt (GSE108474) (Madhavan et al., 2009) und Gravendeel (Gravendeel et al., 2009) wurden mithilfe des GlioVis-Datenportals (Bowman et al., 2017) analysiert. Ziel der Analyse war es, die *GJA1*-Expression in Glioblastomgewebe im Vergleich zu nicht-tumoralem Gewebe zu untersuchen und die mRNA-Expressionsniveaus verschiedener Connexine (HG-U133A-Datensatz) im Glioblastom zu vergleichen. Zudem wurde die Korrelation der *GJA1*-Expression mit den unter der Kombinationstherapie mittels Gene-Set-Enrichment-Analyse (GSEA) als hochreguliert identifizierten Genen untersucht (Agilent-4502A-Datensatz). Die Rohdaten wurden direkt über die jeweiligen Onlineportale heruntergeladen. Die Korrelationsanalyse erfolgte mithilfe der Pearson-Korrelationsmethode über GlioVis, wobei sowohl der p-Wert als auch der Korrelationskoeffizient (r) berechnet wurden.

1.2.7 Messung der metabolischen Aktivität und Zellviabilität

Die Zellviabilität wurde mithilfe des 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Assays ermittelt. Bei diesem Assay wird das Tetrazoliumsalz von lebenden, metabolisch aktiven Zellen zu einem schwer löslichen Formazan reduziert, das spektrophotometrisch gemessen werden kann. Die adhärenenten Zellen wurden in 96-Well-Platten (Sarstedt) ausgesät und in aufsteigenden Konzentrationen mit TMZ und TO behandelt. Nach 72 und 144 Stunden Inkubation wurde je 20 µl MTT-Lösung (1 mg/mL) (Sigma) hinzugegeben und die Zellen nach weiteren drei Stunden Inkubation mit 200 µl DMSO lysiert. Die Reduktion des MTT wurde mithilfe eines µQuant Mikroplattenspektrophotometers (BioTek Instruments, USA) bei einer Wellenlänge von 560 nm gemessen, mit einer Referenzmessung bei 620 nm zur Kontrolle.

1.2.8 Proliferationsanalyse mittels enzymgekoppeltem Immunadsorptionstest (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA)

Die Zellproliferation wurde mithilfe des Bromodesoxyuridin (BrdU)-ELISA-Kits (Roche, Deutschland) untersucht. Dazu wurden primäre Glioblastomzellen in 96-Well-Platten ausgesät und nach 24 Stunden entweder einzeln oder in Kombination mit TMZ und TO für 72 oder 144 Stunden behandelt. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit BrdU-Labeling-Lösung (100 µM) gemäß den Herstelleranweisungen. Nach Entfernung des Kulturmediums wurden die Zellen mit FixDenat-Lösung fixiert und für 90 Minuten mit einem anti-BrdU-Antikörper inkubiert. Die BrdU-Inkorporation wurde mittels Tetramethylbenzidin detektiert und mithilfe eines µQuant-Mikroplattenspektrophotometers kolorimetrisch bei einer Wellenlänge von 370 nm und einer Referenzmessung bei 492 nm quantifiziert.

Zur Analyse des Effekts der Kombinationstherapie mit TO und TMZ wurde das Bliss-Modell verwendet, das auf der Annahme basiert, dass die Wirkungen zweier unabhängiger Substanzen additiv sind, wenn sie keine Wechselwirkung zeigen. Eine Bliss-Synergie tritt auf, wenn die beobachteten Effekte über diesen additiven Erwartungen liegen (Demidenko und Miller, 2019).

1.2.9 Durchflusszytometrie (FACS) zur Zelltodanalyse

Die Quantifizierung der Zelltodrate wurde mittels Durchflusszytometrie an einem FACS Canto II (Becton Dickinson, USA) in der Core Facility des Universitätsklinikums Bonn durchgeführt. Adhärenz Zellen wurden 144 Stunden nach der Behandlung mit TMZ, TO oder deren Kombination zentrifugiert, in einem Puffer resuspendiert, der Propidiumiodid (PI) (Acros Organics, USA) und Triton-X (Sigma) enthielt, und anschließend für eine Stunde bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Die Messung der DNA-Fragmentierung erfolgte anhand der Durchflusszytometrie von Zellkernen, die mit PI gefärbt wurden. PI ist ein Farbstoff, der nur in Zellen mit geschädigter Membran eindringt und somit abgestorbene Zellen markiert. Die Auswertung der FCS-Dateien erfolgte mithilfe der FlowJo-Software (Version 10.4, Becton Dickinson). Die spezifische DNA-Fragmentierung wurde nach der folgenden Formel berechnet: $100 \times (\text{experimentelle DNA-Fragmentierung} - \text{spontane DNA-Fragmentierung}) / (100 - \text{spontane DNA-Fragmentierung})$. Diese diente als Indikator für den Zelltod.

Zur Analyse des Effekts der Kombinationstherapie auf den Zelltod wurde hier ebenfalls das Bliss-Modell angewendet (Demidenko und Miller, 2019).

1.2.10 Calcein Assay zum Nachweis des Stoffaustauschs über Gap Junctions

Zur Untersuchung der Zell-Zell-Kommunikation über interzelluläre GJs wurde der fluoreszierende Farbstoff Calcein AM (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Das Live-Cell-Imaging erfolgte anhand eines modifizierten Protokolls unserer Arbeitsgruppe (detaillierte Methodik siehe Schneider et al. (2021)). Dazu wurden „Acceptor-Zellen“ in Zellkulturschalen ausgesät und nach 48 Stunden Vorinkubation entweder mit TO, TMZ oder einer Kombination beider Substanzen behandelt. Zur Vorbereitung der „Donor-Zellen“ wurden diese für 20 Minuten mit Calcein gefärbt und anschließend im Verhältnis 1:4 zu den „Acceptor-Zellen“ gegeben. Über einen Zeitraum von 210 Minuten wurden Fluoreszenzbilder alle 20 Minuten mithilfe eines automatisierten Mikroskops (Lionheart FX, BioTek) aufgenommen. Die Quantifizierung der sogenannten „Receiver-Zellen“, die den Farbstoff aufgenommen hatten, erfolgte mittels einer speziell angepassten Auswertungspipeline in Cell Profiler (Version 4.2.1, Broad Institute, USA). Die Aufnahme von Calcein wurde ermittelt, indem

die Anzahl der markierten „Receiver-Zellen“ ins Verhältnis zur Anzahl der „Donor-Zellen“ gesetzt wurde.

1.2.11 Analyse der ausgebildeten Zellausläufer

Zur Messung der Länge der TMs wurden Phasenkontrastaufnahmen mit dem Lionheart FX-Mikroskop aufgenommen. Differenzierte Zellen wurden in 96-Well-Platten ausgesät und nach 24 Stunden Inkubation behandelt. Die Messung der TM-Längen sowie die Zellzählung erfolgten 48 und 96 Stunden nach Behandlung. Die aufgenommenen Bilder wurden mithilfe des Neuroanatomy SNT-Plugins in ImageJ analysiert (Longair et al., 2011), um sowohl die Längen als auch die Anzahl der TMs pro Zelle zu bestimmen. Die Auswertung der Datentabellen erfolgte anschließend mit der Programmiersprache R (Version R-4.3.0, R Foundation, Österreich).

1.2.12 RNA-Sequenzierung

Zur Untersuchung der Genexpression unter TO-, TMZ- sowie Kombinationsbehandlung wurde eine mRNA-Sequenzierung durchgeführt. Dafür wurden 6×10^5 Zellen ausgesät, 24 Stunden später behandelt und nach weiteren 48 Stunden die RNA mit dem RNeasy Kit (Qiagen) isoliert. Alle weiteren Schritte erfolgten in der NGS Core Facility des Universitätsklinikums Bonn. Die RNA wurde quantifiziert und die Integrität der RNA ($RIN \geq 7$) bestimmt. Die Bibliotheksvorbereitung erfolgte mithilfe des QuantSeq FWD 3'mRNA-Seq Kits (Lexogen, Österreich). Nach der Hybridisierung eines Oligo-dT-Primers und der anschließenden reversen Transkription wurde die komplementäre DNA (cDNA)-Bibliothek gereinigt, amplifiziert und auf dem NovaSeq 6000-System (Illumina, Inc., USA) sequenziert.

1.2.13 Auswertung der Sequenzierungsdaten

Für die Analyse und Visualisierung der RNA-Sequenzierungsdaten wurde die R/Bioconductor-Plattform verwendet (Liao et al., 2019). Die Analyse der Sequenzierungsdaten

wurde von Frau Dr. med. Anna-Laura Potthoff und Frau Barbara Pregler (beide Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie, Universitätsklinikum Bonn) unter der Supervision von Herrn Prof. Dr. med. Michael Hölzel (Institut für Experimentelle Onkologie, Universitätsklinikum Bonn) durchgeführt. Die initialen Rohdaten im FASTQ-Format wurden mithilfe des „rsub-read“-Pakets auf das menschliche Referenzgenom Hg38 ausgerichtet. Die Zuordnung der Gene erfolgte mithilfe der „featureCounts“-Funktion, wobei die Zuordnung der Reads zu genomischen Merkmalen basierend auf ENTREZ Gene IDs (NCBI Gene, USA) durchgeführt wurde (Maglott et al., 2011).

Zur Qualitätssicherung wurden eine Varianzstabilisierende Transformation (VST) und eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) durchgeführt. Die Analyse der differentiellen Genexpression für die verschiedenen Bedingungen (TMZ und TMZ + TO) wurde mit dem „DESeq2“-Paket durchgeführt (Anders und Huber, 2010). Die Ergebnisse wurden anhand eines adjustierten p-Werts ($p\text{-adj} < 0,05$) und zweier Schwellenwerte für den log₂-Fold-Change ($\log_2\text{FC} > 0,5$ und $\log_2\text{FC} > 2$) gefiltert und in einem Volcano-Plot mit der „EnhancedVolcano“-Funktion dargestellt. Gene von besonderer Relevanz wurden zusätzlich mithilfe des „Limma“-Pakets in Boxplots visualisiert. Anschließend wurden paarweise t-Tests durchgeführt, um signifikante Unterschiede in den mRNA-Expressionsniveaus zwischen den Gruppen zu überprüfen. Zusätzlich wurde eine GSEA durchgeführt, um über- oder unterrepräsentierte Gen-Sets zu identifizieren und funktionelle Erkenntnisse über die zugrunde liegenden Prozesse nach der Behandlung mit TMZ im Vergleich zu TMZ + TO zu gewinnen. Die GSEA wurde mit dem „ClusterProfiler“-Paket durchgeführt, die Enrichment-Plots wurden mit der Funktion „gseaplot2“ des „enrichplot“-Pakets erstellt.

1.2.14 Statistik und Abbildungen

Die statistische Analyse wurde unter Verwendung von GraphPad PRISM (Version 9.5.1, GraphPad Software, USA) und der Programmiersprache R durchgeführt. Die finalen Abbildungen wurden mit Adobe Illustrator (Version 27.7, Adobe Inc., USA) erstellt. Für Experimente mit mehr als einer Behandlungsbedingung und normalverteilten Daten wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) verwendet. Bei Daten ohne Normalverteilung, bestimmt durch den D'Agostino-Pearson-Normalitätstest, wurde der Mann-Whitney-

U-Test angewendet. Ergebnisse wurden als statistisch signifikant betrachtet, wenn der p-Wert $< 0,05$ lag. Die Symbole *, **, *** und **** stehen für p-Werte von $< 0,05$, $< 0,01$, $< 0,001$ beziehungsweise $< 0,0001$. Alle Experimente wurden als technische und biologische Triplikate durchgeführt.

1.3 Ergebnisse

1.3.1 Charakterisierung der Glioblastom-Zelllinien und Überprüfung der Connexin-43-Expression

In den drei primären Zelllinien G35, G71 und G106 wurde mittels Pyrosequenzierung bestätigt, dass es sich um Glioblastome mit *IDH*-Wildtyp handelt. Nach der aktuellen WHO-Klassifikation ist dies ein diagnostisches Kriterium für Glioblastome (Louis et al., 2021). Zudem wurde eine Hypermethylierung des *MGMT*-Promotors nachgewiesen, was auf eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber TMZ hinweist. Eine Hypermethylierung des *MGMT*-Promotors führt zu einer deutlichen Reduktion der Expression des *MGMT*-Gens, wodurch die Produktion des MGMT-Proteins stark eingeschränkt wird. Das MGMT-Protein ist normalerweise für die Reparatur von TMZ-induzierten DNA-Schäden mitverantwortlich. Durch die reduzierte Proteinmenge können diese Schäden jedoch nicht effizient behoben werden, was die Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber TMZ erhöht und die Wirksamkeit der Chemotherapie steigert (Esteller et al., 2000).

Die Expression von Cx43 wurde in allen drei Zelllinien sowohl durch Immunblotting als auch Immunfluoreszenz bestätigt (Abb. 1). Dabei wurde darauf geachtet, dass die Zellkonfluenz der unterschiedlichen Zellpopulationen sehr ähnlich war, um eine zuverlässige Interpretation der Ergebnisse zu gewährleisten (Abbildung S1B der Publikation). Die Immunfluoreszenz zeigte eine verstärkte Cx43-Expression insbesondere an Zell-Zell-Kontakten entlang der ultra-langen Zellfortsätze, was auf eine erhöhte Präsenz von GJs in diesen Bereichen hindeutet (Abb. 1C). Diese Beobachtung stimmt mit den Beschreibungen von Osswald et al. (2015) überein.

Öffentliche Datenbanken wie TCGA, Rembrandt und Gravendeel (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008; Gravendeel et al., 2009; Madhavan et al., 2009) zeigen, dass

Cx43 in den meisten Glioblastomen exprimiert wird und das am häufigsten vorkommende Connexin in diesen Tumoren ist (Abbildung 1D der Publikation). Auf mRNA-Ebene konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede in der *GJA1*-Expression zwischen Tumorgewebe und normalem Hirngewebe festgestellt werden (Abbildung 1E der Publikation und Abbildung S2 der Publikation).

Die nachgewiesene Hypermethylierung des *MGMT*-Promotors sowie die bestätigte Cx43-Expression machen die ausgewählten Zelllinien zu geeigneten Modellen, um eine TO-vermittelte Steigerung des zytotoxischen Effekts von TMZ zu untersuchen.

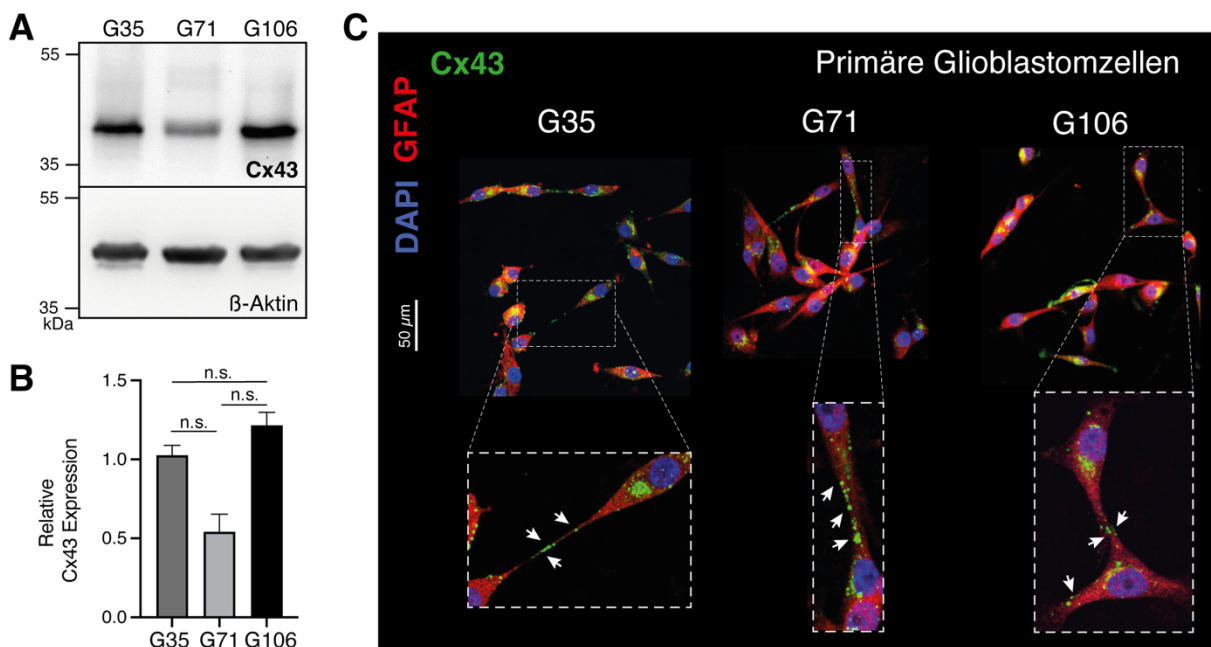


Abb. 1: Nachweis der Cx43-Expression in den primären Glioblastomzelllinien G35, G71 und G106. (A) Western-Blot Analyse mit (B) densitometrischer Quantifizierung der Cx43-Expression relativ zu den jeweiligen β-Aktin-Expressionsniveaus. (C) Repräsentative Immunfluoreszenzbilder; Pfeile markieren die charakteristische Cx43-Expression entlang der TJs. Modifiziert nach Schmidt et al. (2024).

1.3.2 Toxizitätsbestimmung und Konzentrationsoptimierung von TMZ und TO

Im weiteren Verlauf wurden die optimale Konzentration von TMZ und TO sowie die Behandlungsdauer von 144 Stunden mithilfe einer MTT-Messung bestimmt (Abb. 2). Für die Zelllinien G35 und G106 ergab sich eine effektive Hemmkonzentration von etwas über 50

μM für beide Substanzen, während die TMZ-Konzentration bei der Zelllinie G71 fast $100 \mu\text{M}$ betrug – ein Wert, der physiologisch nicht erreicht werden kann (Portnow et al., 2009). Basierend auf dieser Studie sowie auf früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe wurde für alle drei Zelllinien eine TMZ-Konzentration von $50 \mu\text{M}$ gewählt (Potthoff et al., 2019; Schneider et al., 2021). Für die G106-Zelllinie wurde eine Endkonzentration von $100 \mu\text{M}$ für TO festgelegt, da eine Sensitivierung gegenüber TMZ-induziertem Zelltod in der FACS-Analyse erst bei höheren TO-Konzentrationen beobachtet werden konnte.

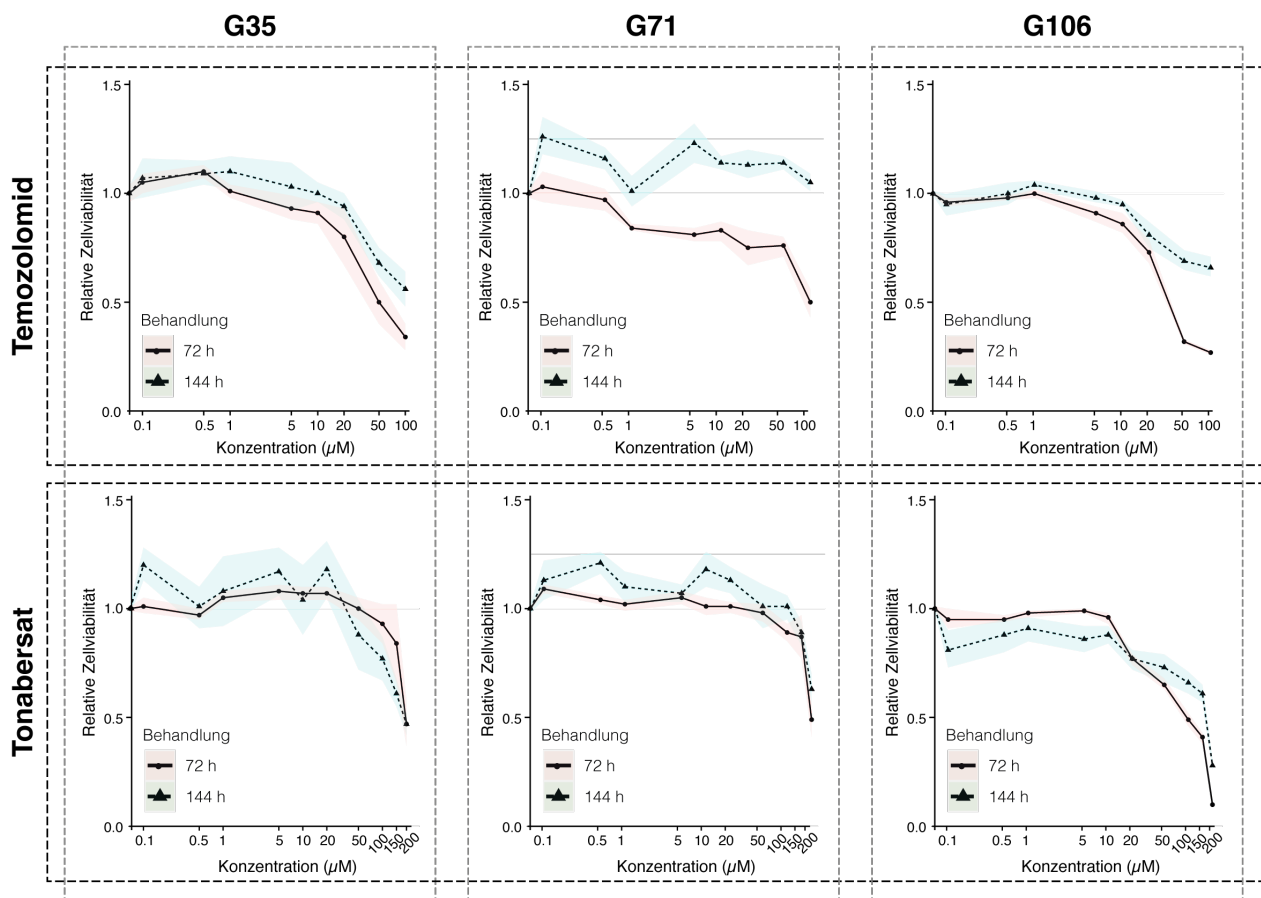


Abb. 2: Bestimmung der effektiven Hemmkonzentration von TMZ und TO mittels Zellviabilitäts-Assay in den primären Glioblastomzelllinien G35, G71 und G106. MTT-Tests nach Behandlung mit TMZ (oben) und TO (unten), gemessen nach 72 und 144 Stunden. Für TMZ wurden Konzentrationen von 0,1 bis $100 \mu\text{M}$, für TO bis zu $200 \mu\text{M}$ getestet. Modifiziert nach Schmidt et al. (2024).

1.3.3 Einfluss von Tonabersat auf die funktionelle und morphologische Konnektivität von Glioblastomzellen

Osswald et al. (2015) konnten zeigen, dass Cx43-basierte GJs in Glioblastomzellen eine zentrale Rolle bei der Ausbildung funktioneller Netzwerke spielen. Um zu überprüfen, ob TO diese interzellulären Verbindungen stören kann, wurde der Effekt von TO auf den Stofftransport zwischen den Zellen analysiert. Dazu wurde der Transfer von Calcein, einem fluoreszierenden Farbstoff, der ausschließlich über GJs von einer Zelle zur nächsten weitergegeben wird, über mehrere Zellgenerationen hinweg gemessen (Abb. 3A). Ein Live-Cell-Imaging über vier Stunden zeigte, dass die gefärbten „Donor-Zellen“ Calcein nicht nur an benachbarte „Acceptor-Zellen“ weitergeben können, sondern dass diese „Acceptor-Zellen“, nun als „Receiver-Zellen“ bezeichnet, selbst zu neuen „Donor-Zellen“ werden und das Molekül auf weitere Zellgenerationen übertragen (Abb. 3B). Unter TO-Behandlung konnte bei allen drei untersuchten Zelllinien eine signifikante Reduktion des Calcein-Transfers beobachtet werden, was auf eine effektive Blockade der GJs durch TO schließen lässt (Abb. 3C–E). Diese Ergebnisse legen nahe, dass TO den interzellulären Austausch über GJs in Glioblastomzellen signifikant unterdrückt und so möglicherweise zur Destabilisierung der Tumornetzwerke beiträgt, da ein Austausch von Metaboliten, Ionen oder anderen Signalen nur noch in einem deutlich verminderten Ausmaß möglich ist.

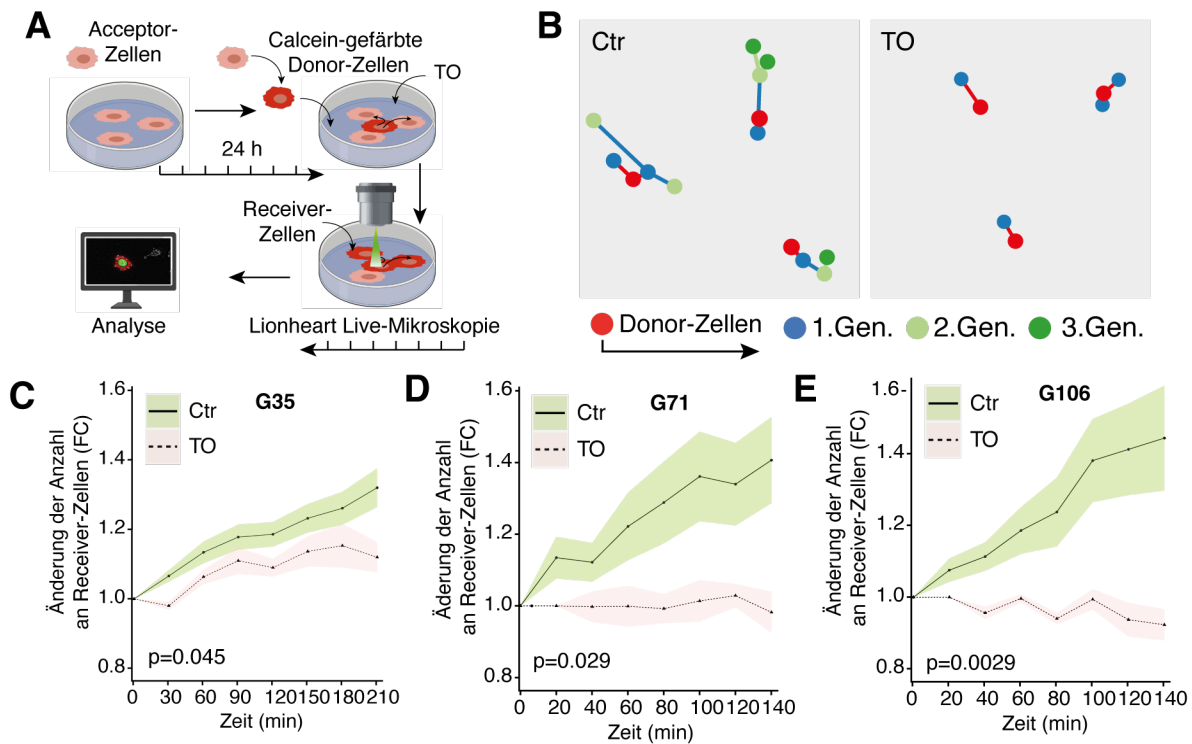


Abb. 3: Einfluss von TO auf das funktionelle Netzwerk primärer Glioblastomzelllinien (G35, G71, G106). (A) Schematische Darstellung des Calcein-Experiments. (B) Visualisierung der Calcein-Ausbreitung von einer „Donor-Zelle“ auf mehrere Generationen von „Receiver-Zellen“. (C–E) Quantifizierung: Änderung der Anzahl an „Receiver-Zellen“. Modifiziert nach Schmidt et al. (2024).

Die Blockade von GJs kann nicht nur die funktionelle Kopplung der Tumorzellen beeinträchtigen, sondern auch zu morphologischen Veränderungen führen, wie frühere Arbeiten bereits für den GJ-Inhibitor Meclofenamat (MFA) gezeigt haben (Schneider et al., 2021). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Behandlung mit TO ebenfalls die Bildung von TMs und damit die räumliche Netzwerkstruktur der Glioblastomzellen beeinflusst. Zu diesem Zweck wurden die Zellen 24 Stunden nach der Aussaat mit TO behandelt und anschließend mittels Live-Cell-Imaging analysiert, um die Anzahl sowie die durchschnittliche Länge der TMs zu bestimmen (Abb. 4A). Nach 48 und 96 Stunden Behandlung mit TO zeigte sich eine signifikante Reduktion der mittleren TM-Länge in allen drei Zelllinien (Abb. 4C–E und Abbildung S3A–C der Publikation). Bemerkenswerterweise blieb die durchschnittliche Anzahl der TMs pro Zelle in allen Zelllinien unverändert (Abb. 4F–H und Abbildung S3D–F der Publikation). Im Gegensatz dazu zeigten Studien mit

MFA eine reduzierte TM-Länge sowie eine geringere TM-Anzahl pro Zelle (Schneider et al., 2021).

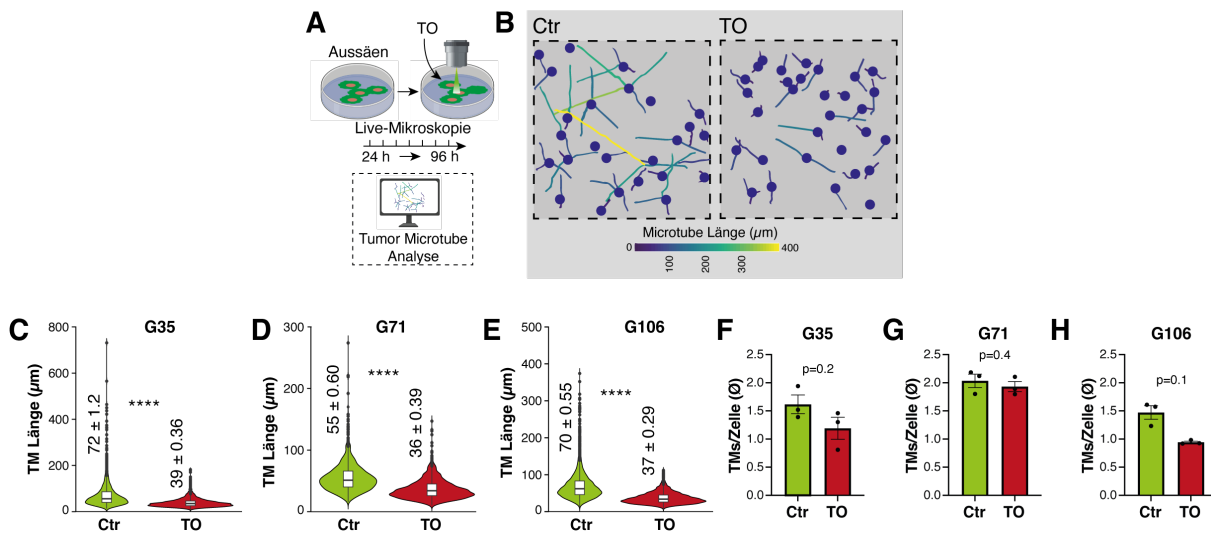


Abb. 4: Einfluss von TO auf das morphologische Netzwerk primärer Glioblastomzelllinien (G35, G71, G106). (A) Schematische Darstellung des Versuchsablaufs. (B) Exemplarische, farbkodierte Darstellung der TM-Längen von G35-Zellen nach TO-Behandlung. (C–E) Violin-Plots zeigen Mittelwerte, Interquartilsabstände und Verteilungen der TM-Längen 96 Stunden nach Behandlung. (F–H) Balkendiagramme der durchschnittlichen TM-Anzahl pro Zelle 96 Stunden nach Behandlung. Modifiziert nach Schmidt et al. (2024).

1.3.4 Zytotoxische Effekte

Um zu prüfen, ob TO durch Entkopplung der funktionellen Tumornetzwerke die Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber einer Chemotherapie mit TMZ erhöht, wurden Durchflusszytometrien durchgeführt. Dabei wurde die DNA-Fragmentierung in PI-gefärbten Zellkernen analysiert. Die Zellen wurden entweder mit TO, TMZ oder einer Kombination beider Substanzen für 144 Stunden behandelt (Abb. 5A). Eine alleinige Behandlung mit TO führte in der Durchflusszytometrie zu keinem Anstieg des Zelltodes. Wie erwartet, zeigte TMZ hingegen eine signifikante Erhöhung der Zelltodrate im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Bemerkenswerterweise wies TO einen sensitivierenden Effekt auf den TMZ-induzierten Zelltod auf: In den G71- und G106-Zelllinien war der zytotoxische Effekt

der Kombinationstherapie etwa viermal höher als unter TMZ-Monotherapie, während er in der G35-Zellpopulation etwa doppelt so hoch war (Abb. 5C).

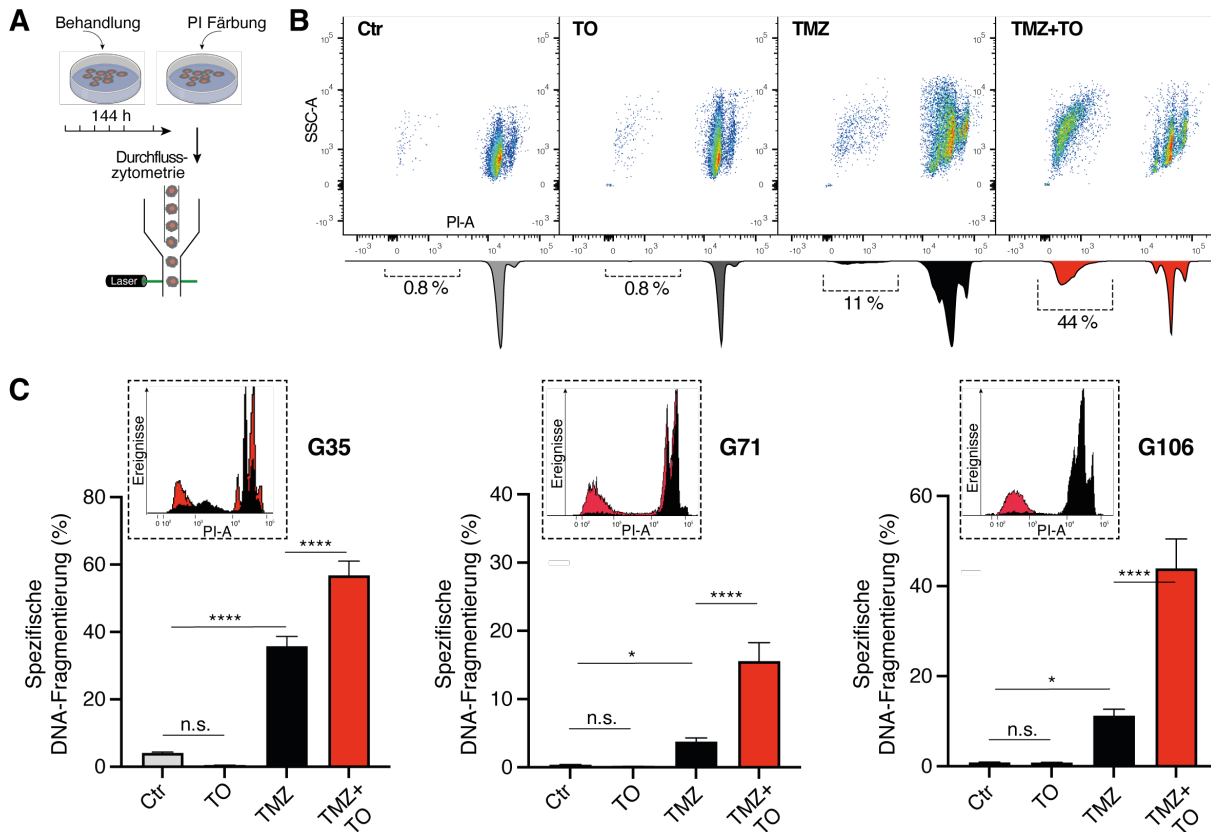


Abb. 5: Spezifische DNA-Fragmentierung in PI-gefärbten Zellkernen von primären Glioblastomzelllinien (G35, G71 und G106). (A) Schematische Darstellung des Versuchsablaufs. Die spezifische DNA-Fragmentierungsrate in PI-gefärbten Zellkernen wurde als indirektes Maß für den Zelltod herangezogen und durch den SubG1-Peak dargestellt. (B) Repräsentative Scatter-Plots der Durchflusszytometrie mit hervorgehobenem SubG1-Peak. Die durchschnittliche spezifische DNA-Fragmentierungsrate ist unterhalb der Diagramme angegeben. (C) Quantifizierung: Balkendiagramme zeigen den Prozentsatz der spezifischen DNA-Fragmentierung. Repräsentative Histogramme 144 Stunden nach Behandlung mit TMZ allein (schwarz) oder in Kombination mit TO (rot) sind in der oberen linken Ecke jedes Balkendiagramms dargestellt. Modifiziert nach Schmidt et al. (2024).

Die Kombinationstherapie zeigte hier eine Bliss-Synergie, mit bis zu 3,9-fach höheren Effekten im Vergleich zu den nach der Bliss-Unabhängigkeits-Hypothese erwarteten

additiven Werten (G35: 1,6-fach; G71: 3,9-fach; G106: 3,2-fach). Diese Ergebnisse deuten auf eine synergistische Wirkung von TO auf den TMZ-induzierten Zelltod hin.

1.3.5 Effekte von Tonabersat auf die Zellteilung

Zur Untersuchung der Zellproliferation wurde ein BrdU-Assay durchgeführt, der auf dem Einbau von BrdU, einem Thymidin-Analogon, in die neu synthetisierte DNA während der S-Phase des Zellzyklus basiert. Die TMZ-Behandlung zeigte wie erwartet in allen drei Zelllinien eine Reduktion der BrdU-Inkorporation um etwa die Hälfte, was auf eine deutlich verringerte Zellteilungsrate hinweist. Interessanterweise führte die Behandlung mit TO allein, trotz des fehlenden zytotoxischen Effekts, ebenfalls zu einer signifikanten Verminderung der Zellproliferation, insbesondere in der G35- und G71-Zelllinie. Die Kombinationstherapie aus TMZ und TO führte zu einer weiteren Abnahme des Anteils sich aktiv teilender Zellen, erneut am deutlichsten bei G35 und G71 (Abb. 6).

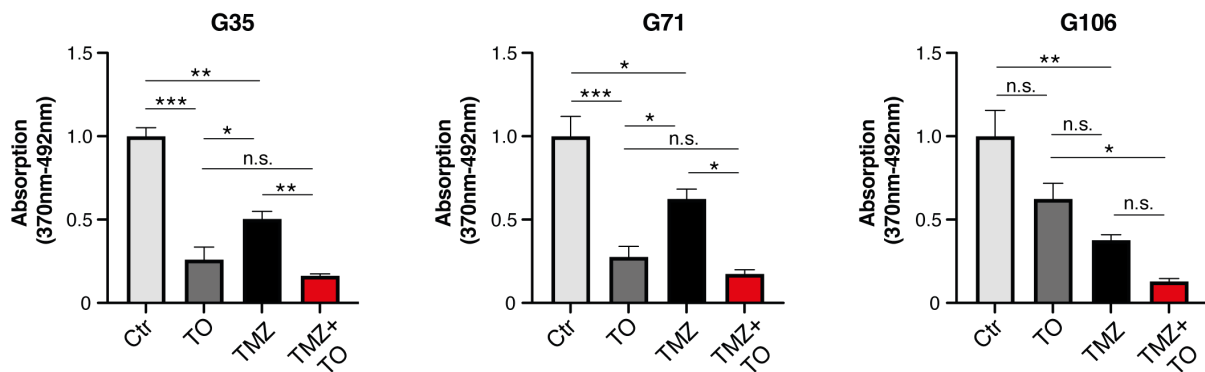


Abb. 6: Quantifizierung der BrdU-Inkorporation als Zellproliferationsmaß 144 Stunden nach Behandlung mit TMZ, TO oder der Kombination aus beidem. Modifiziert nach Schmidt et al. (2024).

Die Bewertung des Effekts der Kombinationstherapie mit dem Bliss-Modell zeigte, dass es sich dabei überwiegend um additive Effekte handelt.

Ergänzend zeigte der MTT-Viabilitäts-Assay eine zeit- und konzentrationsabhängige Abnahme der Zellviabilität unter der Behandlung mit beiden Medikamenten (Abb. 2). Diese Abnahme könnte durch die verminderte Zellproliferation erklärt werden, da TO allein in der Durchflusszytometrie keinen signifikanten Einfluss auf den Zelltod zeigte (Abb. 5C).

1.3.6 Ausschalten des *GJA1*-Gens: Auswirkungen auf die Tumornetzwerke und den TMZ-induzierten Zelltod

Um den Wirkmechanismus von TO eingehender zu untersuchen, wurden aus den G35- und G71-Zelllinien Cx43-KO-Zelllinien generiert, bei denen durch CRISPR/Cas9-vermittelte Geneditierung die Transkription des *GJA1*-Gens, das für Cx43 kodiert, gezielt deaktiviert wurde (Abb. 7A, B).

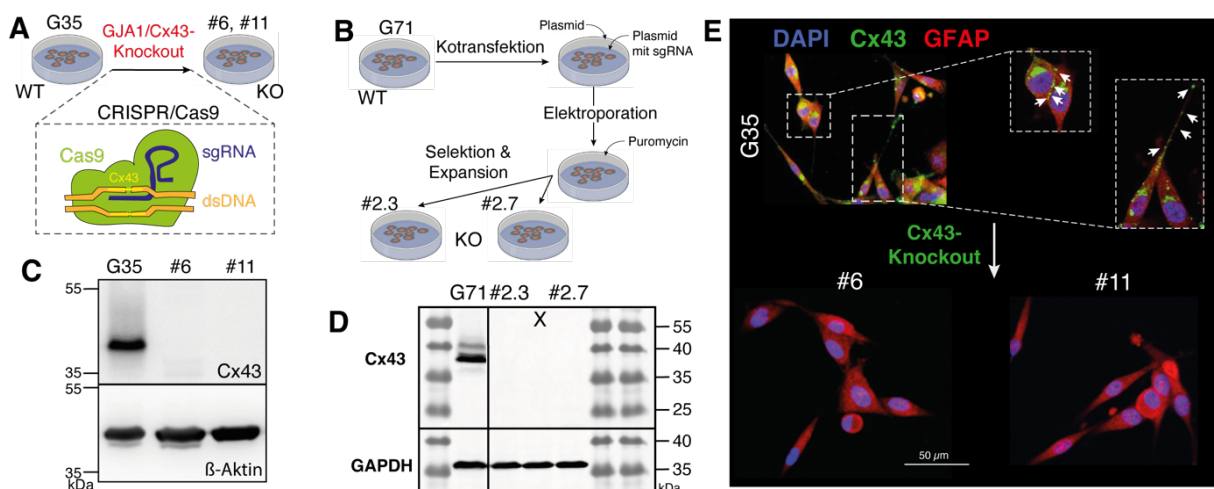


Abb. 7: CRISPR/Cas9-vermittelter KO von *GJA1*/Cx43 in den primären Glioblastomzelllinien G35 und G71. (A, B) Schematische Darstellung des Versuchsablaufs. (C, D) Western-Blot-Analyse zur Verifizierung der signifikanten Reduktion der Cx43-Proteinexpression in den G35-KO-Klonen #6 und #11 sowie den G71-KO-Klonen #2.3 und #2.7. (E) Repräsentative Immunfluoreszenzbilder zeigen eine deutlich reduzierte Cx43-Expression in den G35-KO-Klonen #6 und #11 im Vergleich zur hohen Cx43-Expression in der entsprechenden WT-Linie G35. Modifiziert nach Schmidt et al. (2024).

Mithilfe dieser KO-Linien sollte geklärt werden, ob die beobachteten Effekte von TO auf die funktionelle Entkopplung, den Zelltod und die Zellproliferation auf einer Hemmung von Cx43 beruhen. Zwei stabile Cx43-KO-Klone der G35-Zelllinie (#6 und #11) sowie der G71-Zelllinie (#2.3 und #2.7) zeigten im Western-Blot nahezu keine Cx43-immunreaktiven Banden (Abb. 7C, D). Auch die Immunfluoreszenzfärbung der G35-Cx43-KO-Zelllinien bestätigte eine stark reduzierte Cx43-Signalintensität entlang der Zellausläufer (Abb. 7E).

Die Analyse im Live-Cell-Imaging zeigte insgesamt deutlich verkürzte Zellausläufer der KO-Klone im Vergleich zu den WT-Zelllinien, wobei die durchschnittliche Anzahl der TMs pro Zelle weitgehend unverändert blieb (Abb. 8D–G und Abbildung S5 der Publikation). Eine Ausnahme bildete der G35-Klon #11, bei dem die TM-Anzahl pro Zelle im Vergleich zu den entsprechenden WT-Zellen signifikant reduziert war (Abb. 8F). Im Calcein-Transfer-Assay konnte bei den KO-Zellen kaum ein Austausch des fluoreszierenden Farbstoffs beobachtet werden, was auf eine nahezu fehlende Kommunikation über Cx43-basierte GJs schließen lässt (Abb. 8A, B).

Die Zelltodrate wurde mittels Durchflusszytometrie in den Cx43-KO-Klonen ermittelt und mit den entsprechenden WT-Zellen verglichen. Dabei zeigte sich unter TMZ-Behandlung ein signifikanter Unterschied zwischen KO- und WT-Zellen: Die KO-Klone der G35- und G71-Zellen wiesen DNA-Fragmentierungsraten auf, die vergleichbar waren mit den Werten der WT-Zellen unter der Kombinationsbehandlung aus TMZ und TO. Eine zusätzliche Behandlung der KO-Zellen mit dem GJ-Hemmer TO führte jedoch nicht zu einer weiteren Erhöhung der Zelltodrate (Abb. 8I–L). Diese Ergebnisse stützen die Annahme, dass der synergistische Effekt der Kombinationsbehandlung primär auf einer Hemmung Cx43-basierter GJs beruht.

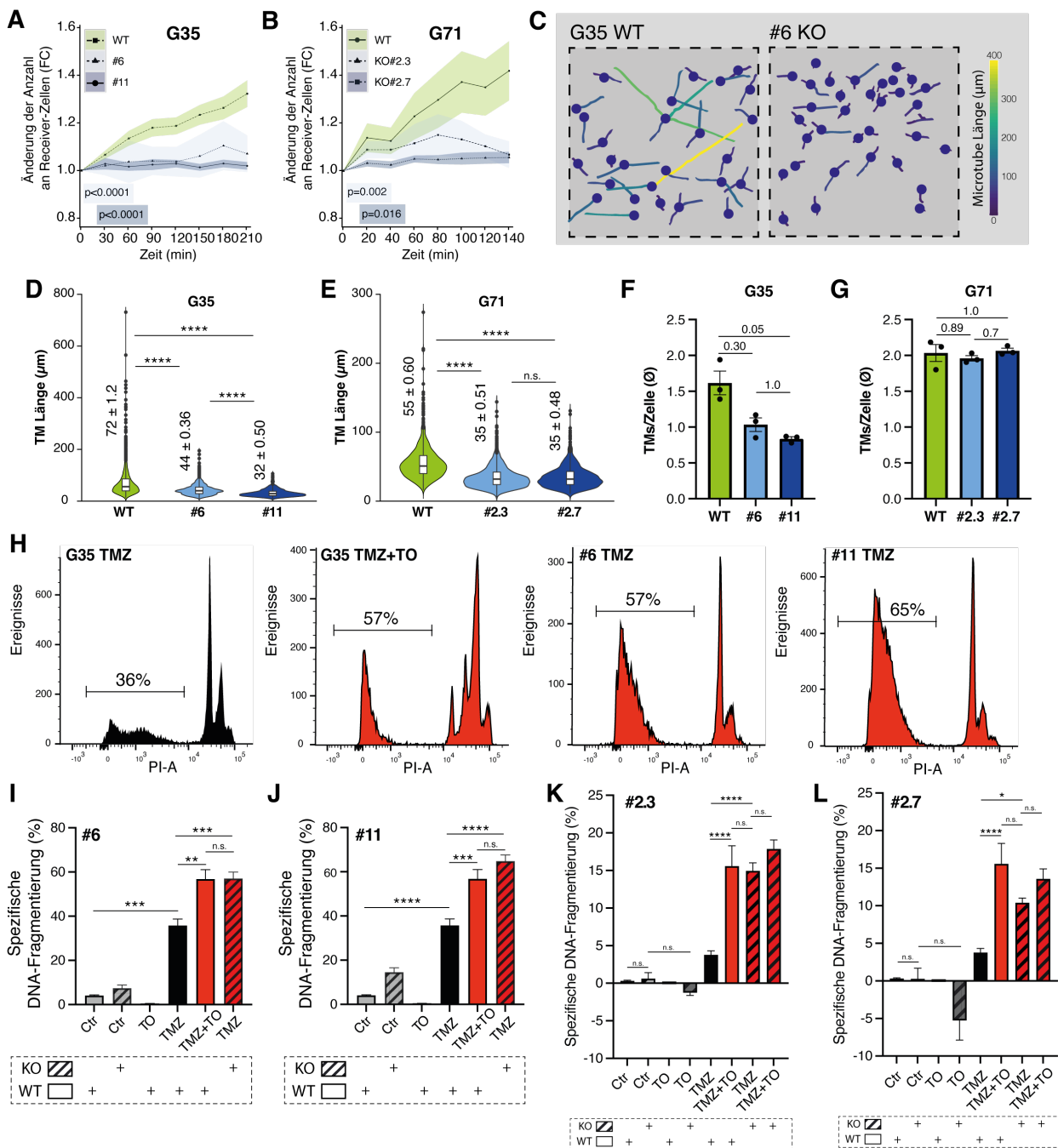


Abb. 8: Auswirkungen des *GJA1/Cx43*-KOs auf die Tumornetzwerke und den TMZ-induzierten Zelltod in primären Glioblastomzelllinien (G35, G71). (A, B) Ergebnisse des Calcein-Experiments: Quantifizierung der „Receiver-Zellen“ in den G35-Cx43-KO-Klonen (#6, #11) und G71-Cx43-KO-Klonen (#2.3, #2.7) im Vergleich zu den jeweiligen WT-Linien (grün schraffiert). (C) Exemplarische, farbkodierte Darstellung der TM-Länge des G35-Cx43-KO-Klons #6 und der entsprechenden WT-Linie. (D, E) Violin-Plots zeigen Mittelwerte, Interquartilsabstände und Verteilungen der TM-Längen 96 Stunden nach Aussaat für Cx43-KO- und entsprechende WT-Linien. (F, G) Balkendiagramme der durchschnittlichen TM-Anzahl pro Zelle 96 Stunden nach Aussaat in Cx43-KO- und WT-Linien. (H) Histogramme der FACS-Analyse für G35-WT-Zellen und G35-KO-Klone (#6, #11) nach

einer 144-stündigen Behandlung mit TMZ allein oder in Kombination mit TO. Der SubG1-Peak ist markiert und die durchschnittliche spezifische DNA-Fragmentierungsrate angegeben. (I–L) Balkendiagramme zeigen den Prozentsatz der DNA-Fragmentierung für G35- und G71-WT-Zellen sowie Cx43-KO-Klone (#6, #11 für G35; #2.3, #2.7 für G71). Modifiziert nach Schmidt et al. (2024).

1.3.7 Molekulare Folgen einer Behandlung mit Tonabersat

Um die Auswirkungen der Kombinationstherapie aus TO und TMZ auf molekularer Ebene zu untersuchen, wurde eine 3'-mRNA-Sequenzierung der G35-Zelllinie durchgeführt. Die RNA wurde hierfür aus behandelten primären G35-Zellen extrahiert und in der NGS Core Facility des Universitätsklinikums Bonn sequenziert. Unter alleiniger TMZ-Behandlung waren 454 Gene differentiell exprimiert, während unter der Kombinationstherapie (TMZ + TO) 688 differentiell exprimierte Gene (DEGs) identifiziert werden konnten. Davon waren 339 DEGs bereits in der TMZ-Monotherapie nachweisbar (Abbildung 7B der Publikation). Eine GSEA dieser gemeinsam regulierten Gene zeigte eine deutliche Hochregulierung von Genen, die mit Apoptose (*DDIT3*, *BBC3*, *MDM2*, *SESN2*, *BMP2*, *TRIB3*), zellulärer Stressantwort (*ATF3*, *GDF15*) und Zellzyklusarrest (*GADD45*, *CDKN1A*, *BTG2*) assoziiert sind (Abbildung 7C der Publikation). Unter der TMZ-Monotherapie wurden 25 Gene als „signifikant reguliert“ detektiert, definiert durch einen adjustierten p-Wert $< 0,05$ ($p\text{-adj} < 0,05$) und eine absolute $\log_2$ -Fold-Change von mindestens 2 ($\log_2FC > 2$) (Abb. 9A). Die Kombinationstherapie zeigte ein vergleichbares Profil, wobei hier 29 „signifikant regulierte“ Gene identifiziert wurden ($\log_2FC > 2$, $p\text{-adj} < 0,05$) (Abb. 9B). Von diesen 29 Genen waren 22 bereits unter der TMZ-Monotherapie nachweisbar, zeigten jedoch unter der Kombinationstherapie eine deutlich stärkere Hochregulierung (Abb. 9C). In beiden Behandlungsgruppen wurden auch herunterregulierte Gene identifiziert. Deren Anzahl war jedoch deutlich geringer als die der hochregulierten Gene. Besonders hervorzuheben ist hier *PIF1*, ein Gen, dessen Herunterregulierung nachweislich Apoptose induzieren und den Zellzyklus anhalten kann (Chen et al., 2020). Dieses Gen zeigte in beiden Behandlungsgruppen die stärkste Herunterregulierung (Abb. 9D). Die Ergebnisse legen nahe, dass die Kombinationstherapie aus TMZ und TO zu einer verstärkten Aktivierung proapoptotischer Gene führt, die DNA-Schäden und Zelltod induzieren, und somit stärker als die TMZ-Monotherapie wirkt.

Um die Korrelation zwischen der *GJA1*/Cx43-Expression und den unter der Kombinationsbehandlung hochregulierten Genen zu untersuchen, wurde eine Analyse des Agilent-4502A-Datensets der TCGA-Datenbank (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008) durchgeführt. Diese Analyse zeigte, dass einige Gene positiv mit der *GJA1*/Cx43-Expression korrelierten (*GADD45A*, *CDKN1A*, *BTG2*, *GDF15*), während *BMP2* eine negative Korrelation aufwies (Abbildung S6 der Publikation). Die Korrelation zwischen der *GJA1*-Expression und den unter der Kombinationstherapie hochregulierten Genen deutet darauf hin, dass Cx43 an der Regulation zentraler zellulärer Prozesse wie Stressantwort, Zellzyklusarrest und Apoptose beteiligt ist.

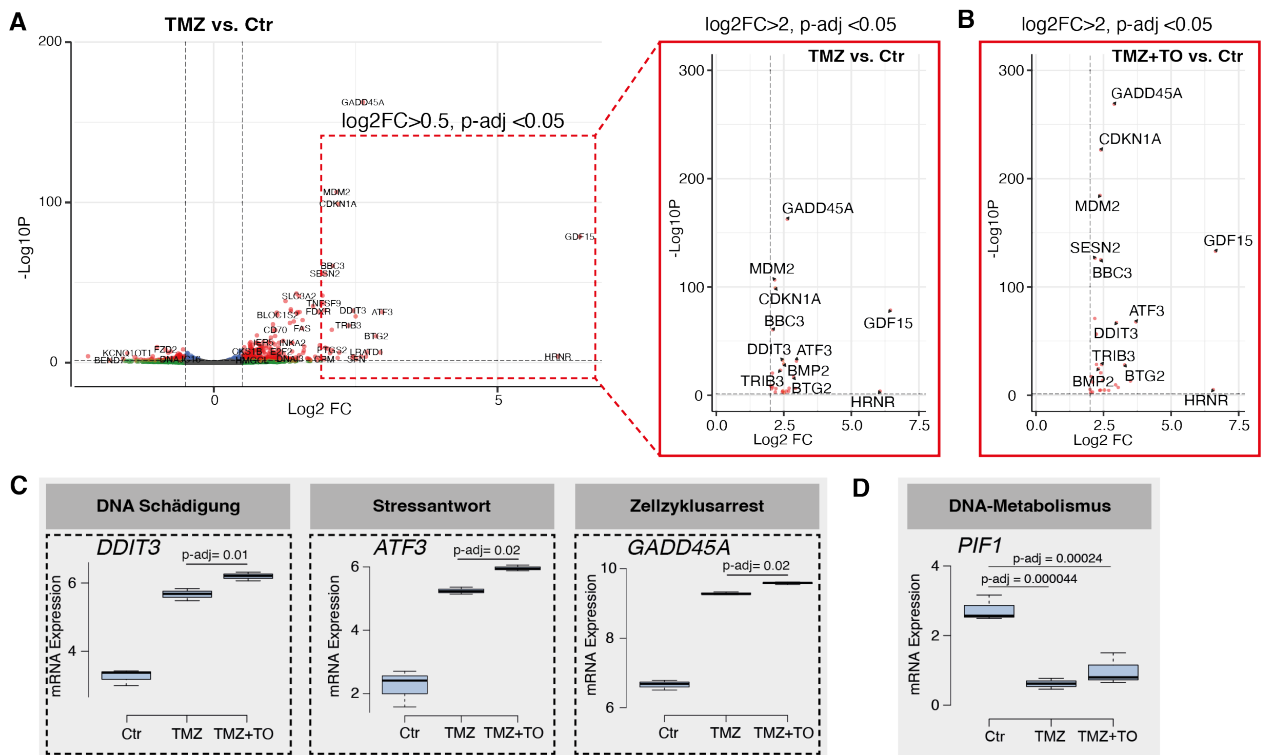


Abb. 9: Auswirkungen einer Kombinationsbehandlung mit TMZ und TO auf die Genexpression. (A) Volcano-Plot der DEGs nach TMZ-Monotherapie im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (linkes Diagramm im Kasten mit gestrichelter roter Linie: $\log_2 FC > 0,5$, $p\text{-adj} < 0,05$; rechtes Diagramm im Kasten mit durchgezogener roter Linie: $\log_2 FC > 2$, $p\text{-adj} < 0,05$). (B) Volcano-Plot der DEGs nach Kombinationsbehandlung mit TMZ und TO im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($\log_2 FC > 2$, $p\text{-adj} < 0,05$). (C) Boxplots zeigen die relative Expression von *DDIT3*, *ATF3* und *GADD45A* als repräsentative Marker für DNA-Schädigung, zelluläre Stressantwort und Zellzyklusarrest. (D) Boxplot zur relativen Expression von *PIF1*. Modifiziert nach Schmidt et al. (2024).

1.4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde *in vitro* an drei primären Glioblastom-Zelllinien nachgewiesen, dass die pharmakologische Inhibition von Cx43-basierten GJs durch TO die interzelluläre Konnektivität sowohl funktionell als auch morphologisch beeinträchtigt. Diese Störung der interzellulären Kommunikation führte zu einer signifikant erhöhten Sensitivität der Glioblastomzellen gegenüber einem TMZ-vermittelten Zelltod. Die Behandlung eines durch CRISPR/Cas9 generierten *GJA1*-KO-Zellmodells mit TMZ allein lieferte vergleichbare Ergebnisse. Dies deutet darauf hin, dass die sensitivierende Wirkung von TO primär auf einer Blockade von Cx43-basierten GJs beruht. Auf molekularer Ebene war die Kombinationsbehandlung aus TMZ und TO mit einer Hochregulation von Genen assoziiert, die an zellulären Stressreaktionen, Zellzyklusarrest und Apoptose beteiligt sind. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Studien, die einen Zusammenhang zwischen GJ-vermittelter interzellulärer Kommunikation und der Resistenz gegenüber zytotoxischen Therapien beschrieben haben (Osswald et al., 2015; Weil et al., 2017).

Während Cx43 in einigen Studien als Tumorsuppressor beschrieben wurde (Hatakeyama et al., 2013; Huang et al., 2002), überwiegen beim Glioblastom Hinweise auf eine tumorfördernde Wirkung (Murphy et al., 2016; Sin et al., 2012). Diese umfassen Tumordinvasion, Migration und Therapieresistenz, was folglich mit einer verkürzten Überlebenszeit einhergeht (McCutcheon und Spray, 2022; Munoz et al., 2014; Pridham et al., 2022). Osswald et al. (2015) identifizierten Cx43 als zentralen Faktor in den durch TMs organisierten Tumornetzwerken, die wesentlich zur Entstehung von Chemoresistenz beitragen. Besonders an den Verknüpfungspunkten der TMs werden vermehrt Cx43-basierte GJs ausgebildet, welche die interzelluläre Kommunikation der Tumorzellen effektiv unterstützen.

Effekte, die auf einer gezielten Hemmung interzellulärer, Cx43-basierter GJs beruhen, wurden bereits im Kontext anderer onkologischer Erkrankungen beschrieben. Ein bemerkenswertes Beispiel für die Bedeutung von GJs im Tumorprogress zeigt sich bei Hirnmetastasen von Bronchial- und Mammakarzinomen. Hier ermöglichen es GJs den Tumorzellen, über den Second Messenger cGAMP den STAT1- und NF- κ B-Signalweg in benachbarten, nicht-malignen Astrozyten zu aktivieren. Dies führt zu einer verstärkten Sekretion entzündungsfördernder Zytokine und Wachstumsfaktoren, die das

Tumorstadium, die Invasion in gesundes Gewebe und die Chemoresistenz begünstigen (Chen et al., 2017). Dieser Mechanismus konnte in der genannten Arbeit gezielt durch die Hemmung von GJs, beispielsweise mit dem GJ-Modulator TO, unterbrochen werden.

Tishchenko et al. (2020) konnten zeigen, dass ein CRISPR/Cas9-vermittelter KO von Cx43 in Brustkrebszellen zu einer Reduktion sogenannter „Tunneling Nanotubes“ (TNTs) führte, die in der interzellulären Kommunikation und Tumorausbreitung eine zentrale Rolle spielen. TNTs sind lange Membranprotrusionen, die Zellen miteinander verbinden und den Austausch von Molekülen, Proteinen und Organellen ermöglichen. In Tumoren fördern sie die Metastasierung sowie das Überleben der Tumorzellen unter Stressbedingungen. In hirneigenen Tumoren bewirkte ein short-hairpin-RNA-vermittelter Knockdown von GAP43 eine verminderte Cx43-Expression, eine gestörte TM-Bildung sowie eine reduzierte Tumorumvernetzung und Proliferation. Dies resultierte in einer reduzierten Tumoruminvasion und -expansion sowie einer verminderten Radioresistenz der Tumorzellen (Osswald et al., 2015).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass TO eine ähnliche Wirkung im Glioblastom entfaltet: Es reduziert den interzellulären Calcein-Transfer über GJs und verkürzt TMs. Dabei dient der interzelluläre, zytosolische Calcein-Austausch als Surrogatparameter für die funktionelle Konnektivität innerhalb der Tumornetzwerke. Ergänzend führte ein Cx43-KO ebenfalls zu einer Verkürzung der TMs und zu einer funktionellen Blockade der GJs. Das unterstreicht die zentrale Rolle von Cx43 in der strukturellen und funktionellen Organisation von Tumornetzwerken und verdeutlicht das Potenzial von Cx43-basierten GJs als therapeutisches Ziel.

Die funktionelle Entkopplung von Tumorzellen kann zu einer erhöhten Chemosensitivität führen (Weil et al., 2017). Im Zusammenhang mit KRAS-mutierten Bronchialkarzinomen wurde gezeigt, dass ein CRISPR/Cas9-vermittelter KO von Cx43 die Vulnerabilität der Tumorzellen gegenüber dem Chemotherapeutikum Cisplatin deutlich erhöht (Martin und Mu, 2022). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass ein CRISPR/Cas9-vermittelter KO von Cx43 in *MGMT*-hypermethylierten Glioblastomzellen deren Vulnerabilität gegenüber dem Alkylanz TMZ signifikant erhöht. Dies deutet darauf hin, dass die erhöhte Wirksamkeit von TMZ durch TO hauptsächlich auf einer Hemmung

Cx43-basierter GJs beruht. Die gezielte Unterbrechung der Tumorzellvernetzungen in Glioblastomen kann potenziell dazu beitragen, eine ausgeprägte Chemoresistenz zu überwinden.

Neben TO könnten auch andere GJ-Modulatoren wie MFA in der Glioblastomtherapie Anwendung finden. MFA, ein nichtsteroidales Antirheumatikum, zeigt GJ-hemmende Eigenschaften und beeinflusst funktionelle Tumornetzwerke sowohl in Zellkulturen als auch in organotypischen Hirnschnittkulturen (Schneider et al., 2021). Untersuchungen an Xenograft- und immunkompetenten Modellen zeigten zudem, dass sowohl MFA als auch TO das Wachstum und die Progression von Hirnmetastasen signifikant hemmen konnten (Chen et al., 2017). Allerdings bleibt bisher unklar, ob MFA die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann. Für TO hingegen konnte bereits in mehreren präklinischen und klinischen Studien zur Migränetherapie eindeutig gezeigt werden, dass es die Blut-Hirn-Schranke zuverlässig passiert (Cao und Zheng, 2014; Goadsby et al., 2009; Hauge et al., 2009). In diesen Studien wurde TO oral etwa 1000 Patient:innen verabreicht (NCT00311662, NCT00534560, NCT00332007). Neben der erfolgreichen Passage der Blut-Hirn-Schranke bestätigten die Untersuchungen auch ein günstiges Nebenwirkungsprofil des Medikaments (Cao und Zheng, 2014). Diese Eigenschaften machen TO zu einem vielversprechenden Kandidaten für die Behandlung von Glioblastompatient:innen. Präklinische Studien am F98-Rattenmodell zeigten zudem, dass die zusätzliche Gabe von TO zur Standardtherapie (TMZ und Bestrahlung) eine signifikante Reduktion der Tumormasse und eine Verlängerung der Überlebenszeit bewirkte (De Meulenaere et al., 2019; Zoteva et al., 2024). Eine funktionelle Analyse des Wirkmechanismus von TO wurde in diesen Studien jedoch nicht durchgeführt.

Auf molekularer Ebene konnte im Zuge dieser Arbeit mittels GSEA nachgewiesen werden, dass die Behandlung von Glioblastomzellen mit TMZ zu einer Aktivierung von proapoptischen Signalwegen führt. Eine Hochregulierung von Genen mit Beteiligung an Apoptose (*DDIT3*, *BBC3*, *MDM2*, *SESN2*, *BMP2*, *TRIB3*), zellulärer Stressantwort (*ATF3*, *GDF15*) und Zellzyklusarrest (*GADD45*, *CDKN1A*, *BTG2*) wurde festgestellt. Dieser Effekt wurde durch eine Kombinationsbehandlung aus TMZ und TO signifikant verstärkt. Für viele dieser Gene konnte gezeigt werden, dass sie p53-Zielgene sind, die je nach Kontext Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur oder Apoptose einleiten können (Fischer, 2017). Andere der

hochregulierten Gene, wie *ATF3* und *TRIB3*, besitzen eine doppelte Funktion: Sie können sowohl Zellproliferation als auch Apoptose fördern, zwei wichtige Elemente der Tumorpapathogenese (Ku und Cheng, 2020; Ohoka et al., 2005; Yin et al., 2008; Zhang et al., 2017). Hervorzuheben ist auch die erhöhte Expression von *MDM2*, das eine negative Feedback-Schleife mit p53 bildet: MDM2 hemmt die Aktivität von p53, wird aber gleichzeitig durch p53 transkriptionell reguliert, was bei DNA-Schäden zu einer verstärkten p53-Aktivierung führt (Harris und Levine, 2005; Vousden und Lu, 2002). Die FACS-Analysen unterstützen diese Erkenntnisse, indem sie zeigen, dass die Kombinationstherapie im Vergleich zur TMZ-Monotherapie signifikant mehr Zelltod induziert. Die GSEA legt nahe, dass der durch die Durchflusszytometrie gemessene Zelltod hauptsächlich über eine p53-Aktivierung vermittelt wird und größtenteils auf Apoptose zurückzuführen ist.

Eine Analyse des Agilent-4502A-Datensets der TCGA-Datenbank zeigte, dass die *GJA1*-Expression im Tumorgewebe von Glioblastompatient:innen mit den in den Sequenzierungsdaten hochregulierten Genen *GADD45A*, *CDKN1A*, *BTG2*, *GDF15* und *BMP2* korreliert. Dies deutet darauf hin, dass es eine Verbindung zwischen der Höhe der *GJA1*-Expression und der Resistenz gegenüber Zytostatika gibt. Das steht im Einklang mit früheren Studien, die eine Assoziation zwischen hohen Cx43-Werten und einem schlechteren Gesamtüberleben bei Glioblastompatient:innen zeigten (Pridham et al., 2022). Daraus ergibt sich die vielversprechende Perspektive, dass Therapien, die Cx43-Spiegel gezielt senken, Apoptoseprozesse fördern und gleichzeitig zelluläre Mechanismen schwächen, mit denen Glioblastome zytotoxische Schäden abwehren. Solche Ansätze könnten eine zentrale Strategie zur Überwindung der Therapieresistenz in Glioblastomen darstellen.

Dabei gilt es zu beachten, dass die Regulation essenzieller Prozesse wie Zellzyklusarrest, Stressantwort und Apoptose von einem fein abgestimmten Gleichgewicht zwischen fördernden und supprimierenden Signalen abhängt. Dieses Gleichgewicht entscheidet letztlich darüber, ob eine Zelle proliferiert oder den programmierten Zelltod einleitet. Die aufgezeigten Korrelationen unterstreichen die zentrale Rolle von Cx43 in diesen Prozessen, wobei zahlreiche weitere Faktoren, die über die hier untersuchten Gene hinausgehen, dieses Gleichgewicht beeinflussen. Ein entscheidender Punkt ist, dass die Höhe der mRNA-Expression von *GJA1* aufgrund epigenetischer und posttranskriptioneller

Mechanismen nicht zwangsläufig mit der Höhe der Cx43-Expression übereinstimmt. Bislang gibt es nur wenige Studien, die den Zusammenhang zwischen mRNA- und Proteinlevel von Cx43 untersuchen (Zhang et al., 2023). Zudem könnte sich das biologische Verhalten von Tumoren mit niedriger *GJA1*-Expression und solcher, deren *GJA1*-Expression therapeutisch reduziert wurde, unterscheiden. Dennoch betonen die TCGA-Daten die therapeutische Relevanz von Cx43-basierten GJs, insbesondere hinsichtlich ihrer gezielten Modulation zellulärer Signalwege, die Proliferation und Zelltod regulieren.

Trotz intensiver Forschung bleibt der exakte Mechanismus, durch den TO die Zytotoxizität von TMZ verstärkt, unklar. Die durchgeführten Experimente legen nahe, dass TO eine Hemmung von Cx43-basierten GJs und dadurch eine funktionelle Entkopplung der Tumorzellen bewirkt. Dies könnte dazu führen, dass in den einzelnen Glioblastomzellen höhere TMZ-Konzentrationen erreicht werden und sich dadurch die Wirksamkeit des Chemotherapeutikums deutlich verbessert. Einen weiteren möglichen Erklärungsansatz liefert ein Mausmodell von zerebral metastasiertem Bronchial- und Mammakarzinom: Die Hemmung von GJs durch TO könnte die interzelluläre Kommunikation zwischen Tumorzellen und nicht-malignen Astrozyten unterbrechen. Dadurch würde der Transfer von Überlebenssignalen wie cGAMP verhindert, die über den STING-Signalweg zur Chemoresistenz beitragen (Chen et al., 2017). Ebenso ist denkbar, dass GJ-Hemmer wie TO eine Störung der intrazellulären Homöostase hervorrufen, indem sie ein Ungleichgewicht von GJ-permeablen Ionen wie Ca^{2+} verursachen. Dies könnte die Fähigkeit der Tumorzellen einschränken, auf Stresssituationen zu reagieren und ihre Anpassungsfähigkeit innerhalb der Tumornetzwerke aufrechtzuerhalten (Weil et al., 2017). Die Blockade Cx43-basierter GJs könnte außerdem laut Menachem et al. (2016) den Transfer überlebensfördernder nichtkodierender RNAs verringern und Tumorzellen dadurch anfälliger gegenüber zytotoxischen Therapien machen. Weitere Studien sind notwendig, um einerseits den exakten Mechanismus der TO-Wirkung vollständig aufzuklären und andererseits die klinische Relevanz von GJ-Hemmern in Kombinationstherapien weiter zu evaluieren. Ebenso sollten die langfristigen Effekte der Tumornetzwerk-Inhibition untersucht werden, insbesondere im Hinblick auf mikroinvasive Tumorzellen mit intakter Blut-Hirn-Schranke.

Obwohl der exakte Wirkmechanismus unklar bleibt, zeigen die Ergebnisse, dass TO ein vielversprechender Kandidat für die Entwicklung innovativer Glioblastomtherapien ist.

Durch seine Fähigkeit, die Wirksamkeit von TMZ zu steigern und die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, könnte TO eine Schlüsselrolle in der gezielten Therapie von Tumornetzwerken einnehmen.

1.5 Zusammenfassung

Patienten mit Glioblastom, dem häufigsten primären Hirntumor im Erwachsenenalter, haben trotz multimodaler Therapieansätze nach wie vor äußerst geringe Überlebenschancen und eine stark eingeschränkte Lebensqualität. Glioblastomzellen sind über Gap Junctions, die insbesondere Connexin 43 enthalten, miteinander gekoppelt. Diese Verbindungen ermöglichen es den Tumorzellen, über lange Zellfortsätze kommunizierende Netzwerke zu etablieren, die wesentlich zur Ausbildung einer Therapieresistenz beitragen. Gezielte Therapien, die diese Netzwerke stören, könnten durch funktionelle Entkopplung den zytotoxischen Effekt der auf Temozolomid basierenden Standardtherapie verstärken. Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass die pharmakologische Hemmung der Tumornetzwerke durch Tonabersat, einen die Blut-Hirn-Schranke passierenden Gap-Junction-Inhibitor, die Glioblastomzellen für den durch Temozolomid induzierten Zelltod sensitiviert. Tonabersat bewirkt dabei nicht nur eine funktionelle, sondern auch eine morphologische Unterbrechung der malignen Zell-zu-Zell-Konnektivität. Diese Veränderungen tragen entscheidend zur Schwächung der Glioblastomnetzwerke bei und verstärken die chemotherapieinduzierten zytotoxischen Effekte. Mittels CRISPR/Cas9-vermittelter Ausschaltung von Connexin 43 konnten grundlegende Erklärungsansätze für den Wirkmechanismus von Tonabersat auf die Glioblastomzellen identifiziert werden. Auf molekularer Ebene zeigte sich, dass die durch die Kombinationstherapie aus Temozolomid und Tonabersat hervorgerufenen synergistischen zytotoxischen Effekte mit einer signifikanten Hochregulierung von Zelltod-Signalwegen verbunden waren. Angesichts der Ergebnisse experimenteller und molekularer Untersuchungen sowie des gut verträglichen Nebenwirkungsprofils, besitzt Tonabersat das Potenzial, klinisch relevant zu werden. Die Ergebnisse belegen, dass Tonabersat als Blut-Hirn-Schranken-gängiger Gap-Junction-Inhibitor eine gezielte Unterbrechung der Glioblastomnetzwerke ermöglicht und somit die Übertragung des Konzepts vom Labor in die klinische Anwendung in greifbare Nähe rückt.

1.6 Literaturverzeichnis

- Aasen T, Leithe E, Graham SV, Kameritsch P, Mayán MD, Mesnil M, Pogoda K, Taber-nero A. Connexins in cancer: bridging the gap to the clinic. *Oncogene*. 2019; 38: 4429–4451
- Aasen T, Mesnil M, Naus CC, Lampe PD, Laird DW. Gap junctions and cancer: communicating for 50 years. *Nat. Rev. Cancer*. 2016; 16: 775–788
- Albers J, Danzer C, Rechsteiner M, Lehmann H, Brandt LP, Hejhal T, Catalano A, Busen-hart P, Gonçalves AF, Brandt S, Bode PK, Bode-Lesniewska B, Wild PJ, Frew IJ. A ver-satile modular vector system for rapid combinatorial mammalian genetics. *J. Clin. Invest.* 2015; 125: 1603–1619
- Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* 2010; 11: R106
- Bowman RL, Wang Q, Carro A, Verhaak RGW, Squatrito M. GlioVis data portal for visu-alization and analysis of brain tumor expression datasets. *Neuro-Oncol.* 2017; 19: 139–141
- Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization de-fines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 2008; 455: 1061–1068
- Cao Y, Zheng OJ. Tonabersat for migraine prophylaxis: a systematic review. *Pain Physi-cian*. 2014; 17: 1–8
- Chan WN, Evans JM, Hadley MS, Herdon HJ, Jerman JC, Parsons AA, Read SJ, Stean TO, Thompson M, Upton N. Identification of (-)-cis-6-acetyl-4S-(3-chloro-4-fluoro-ben-zoylamino)- 3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-benzo[b]pyran-3S-ol as a potential antimigraine agent. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1999; 9: 285–290
- Chen B, Hua Z, Gong B, Tan X, Zhang S, Li Q, Chen Y, Zhang J, Li Z. Downregulation of PIF1, a potential new target of MYCN, induces apoptosis and inhibits cell migration in neuroblastoma cells. *Life Sci.* 2020; 256: 117820

Chen Q, Boire A, Jin X, Valiente M, Emrah Er E, Lopez-Soto A, Jacob LS, Patwa R, Shah H, Xu K, Cross JR, Massagué J. Corrigendum: Carcinoma-astrocyte gap junctions promote brain metastasis by cGAMP transfer. *Nature*. 2017; 544: 124

Damodaram S, Thalakoti S, Freeman SE, Garrett FG, Durham PL. Tonabersat inhibits trigeminal ganglion neuronal-satellite glial cell signaling. *Headache*. 2009; 49: 5–20

Davies GJ, Rhodes J, Calcraft BJ. Complications of carbenoxolone therapy. *Br. Med. J.* 1974; 3: 400–402

De Meulenaere V, Bonte E, Verhoeven J, Kalala Okito J-P, Pieters L, Vral A, De Wever O, Leybaert L, Goethals I, Vanhove C, Descamps B, Deblaere K. Adjuvant therapeutic potential of tonabersat in the standard treatment of glioblastoma: A preclinical F98 glioblastoma rat model study. *PloS One*. 2019; 14: e0224130

Demidenko E, Miller TW. Statistical determination of synergy based on Bliss definition of drugs independence. *PloS One*. 2019; 14: e0224137

Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N. Engl. J. Med.* 2000; 343: 1350–1354

Fischer M. Census and evaluation of p53 target genes. *Oncogene*. 2017; 36: 3943–3956

Goadsby PJ, Ferrari MD, Csanyi A, Olesen J, Mills JG, Tonabersat TON-01-05 Study Group. Randomized, double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept study of the cortical spreading depression inhibiting agent tonabersat in migraine prophylaxis. *Cephalalgia Int. J. Headache*. 2009; 29: 742–750

Gravendeel LAM, Kouwenhoven MCM, Gevaert O, de Rooi JJ, Stubbs AP, Duijm JE, Daemen A, Bleeker FE, Bralten LBC, Kloosterhof NK, De Moor B, Eilers PHC, van der Spek PJ, Kros JM, Sillevius Smitt PAE, van den Bent MJ, French PJ. Intrinsic gene expression profiles of gliomas are a better predictor of survival than histology. *Cancer Res*. 2009; 69: 9065–9072

Harris SL, Levine AJ. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*. 2005; 24: 2899–2908

Hatakeyama T, Dai P, Harada Y, Hino H, Tsukahara F, Maru Y, Otsuji E, Takamatsu T. Connexin43 functions as a novel interacting partner of heat shock cognate protein 70. *Sci. Rep.* 2013; 3: 2719

Hauge AW, Asghar MS, Schytz HW, Christensen K, Olesen J. Effects of tonabersat on migraine with aura: a randomised, double-blind, placebo-controlled crossover study. *Lancet Neurol.* 2009; 8: 718–723

Huang R, Lin Y, Wang CC, Gano J, Lin B, Shi Q, Boynton A, Burke J, Huang R-P. Connexin 43 suppresses human glioblastoma cell growth by down-regulation of monocyte chemotactic protein 1, as discovered using protein array technology. *Cancer Res.* 2002; 62: 2806–2812

Jensen K, Patel A, Klubo-Gwiedzinska J, Bauer A, Vasko V. Inhibition of gap junction transfer sensitizes thyroid cancer cells to anoikis. *Endocr. Relat. Cancer.* 2011; 18: 613–626

Kim Y, Griffin JM, Nor MNM, Zhang J, Freestone PS, Danesh-Meyer HV, Rupenthal ID, Acosta M, Nicholson LFB, O'Carroll SJ, Green CR. Tonabersat Prevents Inflammatory Damage in the Central Nervous System by Blocking Connexin43 Hemichannels. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 2017; 14: 1148–1165

Ku H-C, Cheng C-F. Master Regulator Activating Transcription Factor 3 (ATF3) in Metabolic Homeostasis and Cancer. *Front. Endocrinol.* 2020; 11: 556

Leshchenko Y, Likhodii S, Yue W, Burnham WM, Perez Velazquez JL. Carbenoxolone does not cross the blood brain barrier: an HPLC study. *BMC Neurosci.* 2006; 7: 3

Liao Y, Smyth GK, Shi W. The R package Rsubread is easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47: e47

Longair MH, Baker DA, Armstrong JD. Simple Neurite Tracer: open source software for reconstruction, visualization and analysis of neuronal processes. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 2011; 27: 2453–2454

Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, Hawkins C, Ng HK, Pfister SM, Reifenberger G, Soffietti R, von Deimling A, Ellison DW. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncol.* 2021; 23: 1231–1251

Madhavan S, Zenklusen J-C, Kotliarov Y, Sahni H, Fine HA, Buetow K. Rembrandt: helping personalized medicine become a reality through integrative translational research. *Mol. Cancer Res. MCR.* 2009; 7: 157–167

Maglott D, Ostell J, Pruitt KD, Tatusova T. Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39: D52-57

Martin S, Mu D. CRISPR-Induced Loss of Connexin 43 Expression Sensitizes KRAS Mutant Cells to Cisplatin. *MicroPublication Biol.* 2022; 2022

McCutcheon S, Spray DC. Glioblastoma-Astrocyte Connexin 43 Gap Junctions Promote Tumor Invasion. *Mol. Cancer Res. MCR.* 2022; 20: 319–331

Menachem A, Makovski V, Bodner O, Pasmanik-Chor M, Stein R, Shomron N, Kloog Y. Intercellular transfer of small RNAs from astrocytes to lung tumor cells induces resistance to chemotherapy. *Oncotarget.* 2016; 7: 12489–12504

Mikeska T, Bock C, El-Maarri O, Hübner A, Ehrentraut D, Schramm J, Felsberg J, Kahl P, Büttner R, Pietsch T, Waha A. Optimization of quantitative MGMT promoter methylation analysis using pyrosequencing and combined bisulfite restriction analysis. *J. Mol. Diagn. JMD.* 2007; 9: 368–381

Munoz JL, Rodriguez-Cruz V, Greco SJ, Ramkissoon SH, Ligon KL, Rameshwar P. Temozolomide resistance in glioblastoma cells occurs partly through epidermal growth factor receptor-mediated induction of connexin 43. *Cell Death Dis.* 2014; 5: e1145

Murphy SF, Varghese RT, Lamouille S, Guo S, Pridham KJ, Kanabur P, Osimani AM, Sharma S, Jourdan J, Rodgers CM, Simonds GR, Gourdie RG, Sheng Z. Connexin 43 Inhibition Sensitizes Chemoresistant Glioblastoma Cells to Temozolomide. *Cancer Res.* 2016; 76: 139–149

Ohoka N, Yoshii S, Hattori T, Onozaki K, Hayashi H. TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *EMBO J.* 2005; 24: 1243–1255

Osswald M, Jung E, Sahm F, Solecki G, Venkataramani V, Blaes J, et al. Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network. *Nature.* 2015; 528: 93–98

Portnow J, Badie B, Chen M, Liu A, Blanchard S, Synold TW. The neuropharmacokinetics of temozolomide in patients with resectable brain tumors: potential implications for the current approach to chemoradiation. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2009; 15: 7092–7098

Potthoff A-L, Heiland DH, Evert BO, Almeida FR, Behringer SP, Dolf A, Güresir Á, Güresir E, Joseph K, Pietsch T, Schuss P, Herrlinger U, Westhoff M-A, Vatter H, Waha A, Schneider M. Inhibition of Gap Junctions Sensitizes Primary Glioblastoma Cells for Temozolomide. *Cancers.* 2019; 11: 858

Pridham KJ, Shah F, Hutchings KR, Sheng KL, Guo S, Liu M, Kanabur P, Lamouille S, Lewis G, Morales M, Jourdan J, Grek CL, Ghatnekar GG, Varghese R, Kelly DF, Gourdie RG, Sheng Z. Connexin 43 confers chemoresistance through activating PI3K. *Oncogenesis.* 2022; 11: 2

Schmidt ENC, Evert BO, Pregler BEF, Melhem A, Hsieh M-C, Raspe M, Strobel H, Roos J, Pietsch T, Schuss P, Fischer-Posovszky P, Westhoff M-A, Hölzel M, Herrlinger U, Vatter H, Waha A, Schneider M, Potthoff A-L. Tonabersat enhances temozolomide-mediated cytotoxicity in glioblastoma by disrupting intercellular connectivity through connexin 43 inhibition. *Mol Oncol* 2024; 19(3): 878-898.

Schneider M, Ströbele S, Nonnenmacher L, Siegelin MD, Tepper M, Stroh S, Hasslacher S, Enzenmüller S, Strauss G, Baumann B, Karpel-Massler G, Westhoff M-A, Debatin K-

M, Halatsch M-E. A paired comparison between glioblastoma 'stem cells' and differentiated cells. *Int. J. Cancer*. 2016; 138: 1709–1718

Schneider M, Vollmer L, Potthoff A-L, Ravi VM, Evert BO, Rahman MA, et al. Meclofenamate causes loss of cellular tethering and decoupling of functional networks in glioblastoma. *Neuro-Oncol*. 2021; 23: 1885–1897

Setty P, Hammes J, Rothämel T, Vladimirova V, Kramm CM, Pietsch T, Waha A. A pyrosequencing-based assay for the rapid detection of IDH1 mutations in clinical samples. *J. Mol. Diagn. JMD*. 2010; 12: 750–756

Sin W-C, Crespín S, Mesnil M. Opposing roles of connexin43 in glioma progression. *Biochim. Biophys. Acta*. 2012; 1818: 2058–2067

Sinyuk M, Mulkearns-Hubert EE, Reizes O, Lathia J. Cancer Connectors: Connexins, Gap Junctions, and Communication. *Front. Oncol*. 2018; 8: 646

Stupp R, Taillibert S, Kanner A, Read W, Steinberg DM, Lhermitte B, et al. Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2017; 318: 2306

Tews D, Pula T, Funcke JB, Jastroch M, Keuper M, Debatin KM, Wabitsch M, Fischer-Posovszky P. Elevated UCP1 levels are sufficient to improve glucose uptake in human white adipocytes. *Redox Biol*. 2019; 26: 101286

Tishchenko A, Azorín DD, Vidal-Brime L, Muñoz MJ, Arenas PJ, Pearce C, Girao H, Ramón Y Cajal S, Aasen T. Cx43 and Associated Cell Signaling Pathways Regulate Tunneling Nanotubes in Breast Cancer Cells. *Cancers*. 2020; 12: 2798

Venkataramani V, Schneider M, Giordano FA, Kuner T, Wick W, Herrlinger U, Winkler F. Disconnecting multicellular networks in brain tumours. *Nat. Rev. Cancer*. 2022; 22: 481–491

Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat. Rev. Cancer*. 2002; 2: 594–604

Weil S, Osswald M, Solecki G, Grosch J, Jung E, Lemke D, Ratliff M, Hänggi D, Wick W, Winkler F. Tumor microtubes convey resistance to surgical lesions and chemotherapy in gliomas. *Neuro-Oncol.* 2017; 19: 1316–1326

Yin X, Dewille JW, Hai T. A potential dichotomous role of ATF3, an adaptive-response gene, in cancer development. *Oncogene.* 2008; 27: 2118–2127

Yulyana Y, Endaya BB, Ng WH, Guo CM, Hui KM, Lam PYP, Ho IAW. Carbenoxolone enhances TRAIL-induced apoptosis through the upregulation of death receptor 5 and inhibition of gap junction intercellular communication in human glioma. *Stem Cells Dev.* 2013; 22: 1870–1882

Zhang A, Hitomi M, Bar-Shain N, Dalimov Z, Ellis L, Velpula KK, Fraizer GC, Gourdie RG, Lathia JD. Correction: Connexin 43 expression is associated with increased malignancy in prostate cancer cell lines and functions to promote migration. *Oncotarget.* 2023; 14: 417–418

Zhang C, Hong F-F, Wang C-C, Li L, Chen J-L, Liu F, Quan R-F, Wang J-F. TRIB3 inhibits proliferation and promotes osteogenesis in hBMSCs by regulating the ERK1/2 signaling pathway. *Sci. Rep.* 2017; 7: 10342

Zhao K, Wang W, Guan C, Cai J, Wang P. Inhibition of gap junction channel attenuates the migration of breast cancer cells. *Mol. Biol. Rep.* 2012; 39: 2607–2613

Zoteva V, De Meulenaere V, Vanhove C, Leybaert L, Raedt R, Pieters L, Vral A, Boterberg T, Deblaere K. Integrating and optimizing tonabersat in standard glioblastoma therapy: A preclinical study. *PloS One.* 2024; 19: e0300552

2. Veröffentlichung

Dieser Publikationsdissertation liegt die folgende, unabhängig begutachtete Veröffentlichung zugrunde:

Schmidt ENC, Evert BO, Pregler BEF, Melhem A, Hsieh M-C, Raspe M, Strobel H, Roos J, Pietsch T, Schuss P, Fischer-Posovszky P, Westhoff M-A, Hölzel M, Herrlinger U, Vater H, Waha A, Schneider M, Potthoff A-L. Tonabersat enhances temozolomide-mediated cytotoxicity in glioblastoma by disrupting intercellular connectivity through connexin 43 inhibition. *Mol Oncol* 2024; 19(3): 878-898.

<https://doi.org/10.1002/1878-0261.13786>

3. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie am Universitätsklinikum Bonn unter Betreuung von Herrn PD Dr. med. Dipl.-Mus. Matthias Schneider durchgeführt.

Die Konzeption der Arbeit erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. med. Anna-Laura Potthoff und Herrn PD Dr. rer. nat. Bernd Evert.

Die Versuche und Analysen wurden nach Einarbeitung durch Frau Dr. med. Anna-Laura Potthoff und mit technischer Unterstützung durch Herrn Markus Raspe von mir eigenständig durchgeführt. In Anteilen ausgenommen hiervon sind:

Isolation primärer Zellen: Die Isolation der Zellen aus intraoperativ gewonnenem Tumorgewebe erfolgte durch die Arbeitsgruppe Debatin/Westhoff (Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Ulm), die uns diese zur Verfügung stellte.

MGMT/IDH-Analysen: Die Bestimmung des MGMT-Promotor-Methylierungsstatus und des IDH-Status erfolgte im Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Bonn.

Generierung von Cx43-KO-Zelllinien: Die Generierung der Cx43-KO-Klone der G35-Zelllinie erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. rer. nat. Bernd Evert im neurobiologischen Labor der Arbeitsgruppe Wüllner (Zentrum für Neurologie, Universitätsklinikum Bonn). Die Cx43-KO-Zelllinien aus primären G71-Zellen wurden von der Arbeitsgruppe Debatin/Westhoff (Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Ulm) zur Verfügung gestellt.

mRNA-Sequenzierung: Die mRNA-Sequenzierung wurde in der NGS Core Facility des Universitätsklinikums Bonn durchgeführt.

RNA-Seq-Datenanalyse: Die Analyse und Visualisierung der RNA-Sequenzierungsdaten wurde von Frau Dr. med. Anna-Laura Potthoff und Frau Barbara Pregler (Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie, Universitätsklinikum Bonn) unter Supervision von Herrn Prof. Dr. med. Michael Hölzel (Institut für Experimentelle Onkologie, Universitätsklinikum Bonn) durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte durch mich in Zusammenarbeit mit Frau Dr. med. Anna-Laura Potthoff und nach Beratung durch das Institut für Medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie (IMBIE).

Bei der Erstellung dieser Arbeit verwendete ich ChatGPT, um die Lesbarkeit und Sprache einiger Textpassagen zu optimieren. Im Anschluss wurden entsprechende Änderungen überprüft und bearbeitet. Ich übernehme die volle Verantwortung für den Inhalt der veröffentlichten Dissertationsschrift.

Ich versichere, die Dissertationsschrift selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

4. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben!

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. med. Dipl.-Mus. Matthias Schneider, für die Vergabe dieses Promotionsprojekts und die Möglichkeit, an einer so spannenden wissenschaftlichen Arbeit mitzuwirken. Ohne deine Fachkompetenz, deine Expertise und dein Vertrauen in mich wäre die Umsetzung in dieser Form für mich nicht möglich gewesen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. med. Anna-Laura Potthoff für die vertrauensvolle Betreuung, die fachliche Unterstützung und die inspirierenden Diskussionen – unabhängig von Wochentag oder Tageszeit – während meiner Promotionszeit. Liebe Laura, deine Zeit, deine Ideen, deine konstruktiven Anregungen und auch dein Nachdruck haben maßgeblich zum Erfolg dieser Dissertation beigetragen. Deine Geduld, dein Glaube an mich und deine unermüdliche Bereitschaft, alles für dieses Projekt zu geben, waren für mich eine ständige Motivation und Unterstützung.

Ein herzliches Dankeschön geht außerdem an Herrn PD Dr. rer. nat. Bernd Evert für die wertvolle Zusammenarbeit, die hilfreichen Ratschläge und die wissenschaftliche Begleitung. Auch deine aufbauenden Worte und deine mentale Unterstützung haben mich während des gesamten Projekts stets ermutigt.

Mein Dank gilt auch meinen Kolleginnen und Kollegen aus der „Brain Tumor Translational Research Group“ sowie Herrn Prof. Dr. med. Thorsten Pietsch und seinem Team aus der Neuropathologie. Eure Unterstützung, der wissenschaftliche Austausch und die hervorragenden Laborbedingungen haben diese Arbeit wesentlich erleichtert.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern, Frau Dr.-Ing. Karen Schmidt und Herrn Friedhelm Einhaus, sowie meinem Partner, Herrn Stefan Senkel, von Herzen danken. Ihr habt mir den Rücken gestärkt und an mich geglaubt. Eure Unterstützung, Geduld und Liebe haben mir in dieser Zeit unglaublich viel bedeutet. Danke, dass ihr immer für mich da seid!