

# **Auswirkungen einer pharmakologischen Inhibition von Gap Junctions durch INI-0602 auf die Therapie des Glioblastoms**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

**Anna-Laura Potthoff**

aus Bonn

2021

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter\*in: Prof. Dr. med. Hartmut Vatter
2. Gutachter\*in: Prof. Dr. med. Sebastian Strieth

Tag der Mündlichen Prüfung: 04. August 2021

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie  
Direktor: Prof. Dr. med. Hartmut Vatter

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	4
<b>1. Deutsche Zusammenfassung</b>	5
1.1 Einleitung	5
1.2 Material und Methoden	6
1.3 Ergebnisse	11
1.4 Diskussion	19
1.5 Zusammenfassung	22
1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	22
<b>2. Veröffentlichung</b>	29
Abstract	29
Introduction	30
Results	30
Discussion	36
Materials and Methods	38
References	42
Supplementary Materials	45
<b>3. Danksagung</b>	49

## Abkürzungsverzeichnis

a.u.	Willkürliche Einheit (arbitrary unit)
BrdU	Bromdesoxyuridin
Ctr	Kontrolle
Cx43	Connexin 43
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC-50	Mittlere effektive Konzentration (half maximal effective concentration)
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
FACS	Durchflusszytometrie (Fluorescence-activated Cell Sorting)
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor (fibroblast growth factor)
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
INI	INI-0602, Gap Junction-Inhibitor
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolimbromid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PI	Propidiumiodid
Std	Stunden
TMs	Zellausläufer (tumor microtubes)
TMZ	Temozolomid, alkylierendes Chemotherapeutikum
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation)

# 1. Deutsche Zusammenfassung

## 1.1 Einleitung

Das Glioblastom (WHO Grad IV Astrozytom) ist der häufigste primäre Hirntumor des Erwachsenen. Trotz Ausschöpfung der Standardtherapie - bestehend aus chirurgischer Resektion mit anschließender Strahlentherapie und adjuvanter Chemotherapie - sind die Patienten mit einer mittleren Überlebenszeit von unter zwei Jahren konfrontiert (Hegi et al., 2005; Stupp et al., 2009; Tan et al., 2020). Dabei macht die nahezu unbegrenzte Proliferationskapazität der Glioblastomzellen, ihre ausgeprägte Resistenz gegenüber Chemotherapeutika sowie ihre Invasion in das umliegende Hirngewebe das Glioblastom zu einem der bösartigsten Tumoren des Menschen (Broekman et al., 2018; Giese et al., 2003).

Osswald et al. beschrieben im Jahr 2015, dass Glioblastomzellen lange und dünne Membranprotrusionen - sogenannte „tumor microtubes“ (TMs) – ausbilden, die sich nicht nur innerhalb des Tumors ausdehnen, sondern sich auch bis in das umliegende gesunde Hirngewebe erstrecken (Osswald et al., 2015). Dadurch können sich einzelne Tumorzellen zu einem multizellulären Netzwerk zusammenschließen, das eine Kommunikation auch über große Distanzen hinweg ermöglicht. Die interzellulären Kontaktpunkte dieser TMs wiederum werden durch sogenannte „Gap Junctions“ verstärkt, die aus dem Transmembranprotein Connexin 43 (Cx43) bestehen. Die Rolle der Gap Junctions in der Tumorphagenese wird seit Jahren intensiv erforscht und reicht von der Funktion als interzelluläre Kanäle für den Austausch von Ionen, sekundären Botenstoffen und microRNA (Laird, 2006; Lim et al., 2011) über die Aufrechterhaltung der Homöostase bis hin zur Regulation von Zelldifferenzierung, Proliferation und Zelltod (Kar et al., 2012; Sinyuk et al., 2018).

### Hypothese und Zielsetzung der Arbeit

Die Vernetzung der Tumorzellen über Gap Junctions und das hierdurch entstehende zelluläre Synzytium im Glioblastom stellt einen wesentlichen Mechanismus der

Therapieresistenz dar und erhöht darüber hinaus die Invasions- und Proliferationsfähigkeit der Glioblastomzellen (Weil et al., 2017). In dieser Hinsicht könnte eine gegen Gap Junctions gerichtete Therapie durch Isolierung der Glioblastomzellen zu einem Zusammenbruch des funktionellen Netzwerks führen. Wichtige Überlebenssignale könnten auf diese Weise die isolierte Tumorzelle nicht mehr erreichen und die Zelle somit in ihrer ausgeprägten Proliferationskapazität und der Resistenz gegenüber dem Standardchemotherapeutikum Temozolomid einschränken. Eine Übertragung dieser vielversprechenden Erkenntnisse vom präklinischen Modell in die praktische Anwendung war jedoch bislang gescheitert, da die bisher untersuchten Gap Junction-Inhibitoren die Blut-Hirn-Schranke nicht suffizient überwinden konnten (Bhowmik et al., 2015). Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war nun unter Verwendung von INI-0602, eines neuartigen und erstmals für die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke optimierten Gap Junction-Inhibitors, das Potential einer gegen Gap Junctions gerichteten Therapie als neuen Ansatz für die Behandlung des Glioblastoms zu evaluieren.

## **1.2 Material und Methoden**

### **1.2.1 Zellkultur und Charakterisierung der Zellpopulationen**

Für die Experimente wurden drei primäre Glioblastom-Zellpopulationen – bezeichnet als G35, G38 und G40 – verwendet, die freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Debatin/Westhoff (Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Ulm) zur Verfügung gestellt wurden. Die Zellpopulationen wurden durch mechanische und enzymatische Dissoziation aus operativ gewonnenem Tumormaterial histologisch gesicherter WHO Grad IV Astrozytome isoliert, aufgereinigt und schließlich als Suspensionszellkultur expandiert (für Methode siehe Schneider et al., 2016). Die Aufbereitung des humanen Materials wurde von der lokalen Ethikkommission der Universität Ulm genehmigt (Antragsnummer: 162/10). Die Suspensionszellen wurden in DMEM/F-12 (HAM)-Medium mit FGF (0,1 µg/ml), EGF (0,2 µg/ml), B27 (1 %), Amphotericin B (2 %) und Penicillin/Streptomycin (1 %) kultiviert. Für die Experimente wurden die Suspensionszellen in unbeschichtete Zellkulturflaschen mit DMEM-Medium,

fetalem Rinderserum (10 %) und Penicillin/Streptomycin (1 %) überführt und zu adhären Zellen differenziert (De Witt Hamer et al., 2008). Nach höchstens 10 Passagen wurden neue adhären Zellen aus der Suspensionszellkultur generiert. Sowohl die Suspensionszellen als auch die adhären Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Alle Zellpopulationen wurden hinsichtlich ihrer Methylierung im *MGMT*-Promotor und vorliegender *IDH1*- und *IDH2*-Mutationen durch Prof. Dr. Andreas Waha (Institut für Neuropathologie, Universitätsklinikum Bonn) mittels Pyrosequenzierung molekular charakterisiert (detaillierte Methode siehe Mikeska et al., 2007; Setty et al., 2010).

### 1.2.2 Lentivirale Transduktion

Für den Nachweis der Zellen in der Fluoreszenzmikroskopie wurden die Suspensionszellen mit lentiviralen Partikeln rLV.EF1.Zsgreen1-9 transduziert. Dafür wurden die Zellen (50000 Zellen/ml) für 48 Stunden in mit Polybrene (1 µl/ml) und mit Viruspartikeln (1 µl/ml) angereichertem Suspensionszellmedium kultiviert. Die Effizienz der Transduktion wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie kontrolliert und das Medium durch normales Suspensionszellmedium ersetzt.

### 1.2.3 Behandlung der Zellen

Die Behandlung der Zellen erfolgte mit Temozolomid (TMZ), dem Standard-Chemotherapeutikum in der Therapie des Glioblastoms, in einer Konzentration von 50 µM und/oder mit INI-0602 als Gap Junction-Inhibitor in einer Konzentration von 100 µM, sofern nicht anders angegeben. Beide Substanzen wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Die DMSO-Endkonzentrationen bei den Experimenten lagen dabei 0,1 % um zytotoxische Effekte durch das Lösungsmittel zu vermeiden.

#### 1.2.4 Fluoreszenzmikroskopie

Die adhärennten Zellen wurden auf mit Laminin beschichteten Deckgläschen ausgesät. Anschließend wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und mit Methanol permeabilisiert. Danach folgte eine Inkubation mit einem Primärantikörper-Mix aus Cx43 und  $\beta$ -tubulin und den entsprechenden Sekundärantikörpern. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit DAPI Fluoromount-G® Montagemedium gefärbt (für eine detaillierte Beschreibung der Methode siehe Publikation) gefärbt. Die Immunfluoreszenzbilder wurden mit einem AX70 Mikroskop von Zeiss aufgenommen und mit der Zeiss Zen Blue Software ausgewertet.

#### 1.2.5 Messung der metabolischen Aktivität und Zellviabilität

Die metabolische Aktivität der behandelten Glioblastomzellen wurde mittels des sogenannten MTT-Tests untersucht. Die Methode basiert auf der spektrophotometrischen Quantifizierung eines reduzierten Tetrazoliumsalzes MTT zu einem unlöslichen Formazan durch lebende Zellen. Hierfür wurden die Zellen zunächst ausgesät und mit aufsteigenden Konzentrationen von TMZ und INI-0602 für einen Zeitraum von 72 und 144 Stunden behandelt. Anschließend wurde ein Zehntel der MTT-Stammlösung (1 mg/ml) zu den Zellen hinzugegeben und die Zellen für weitere 3 Stunden inkubiert. Danach wurde die Absorption bei 550 nm mit dem Spektrometer  $\mu$ Quant bestimmt.

#### 1.2.6 Messung der Zellkonfluenz

Die Veränderungen der Zellkonfluenz durch die Behandlung mit TMZ und/oder INI-0602 wurden durch stündliche Aufnahmen von Fluoreszenzbildern über einen Zeitraum von 144 Stunden mit dem IncuCyte S3 Live-Cell Analysis System dokumentiert und unter Verwendung der geräteeigenen Software ausgewertet.



### 1.2.7 Analyse der Proliferation mittels ELISA

Die Analyse der Zellproliferation erfolgte über die Quantifizierung des Einbaus des Thymidinanalogons Bromdesoxyuridin (BrdU) in neu synthetisierte DNA mit dem BrdU ELISA Kit (Merck). Dafür wurden die Zellen ausgesät, behandelt und nach 144 Stunden Inkubation für 2 Stunden in der BrdU-Lösung inkubiert. Die Zellen wurden dann fixiert, die DNA denaturiert und anschließend für weitere 90 Minuten in einer Antikörper-Peroxidase-Lösung (anti-BrdU-POD-Lösung) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit PBS gewaschen und es wurde Tetramethylbenzidin als Substrat-Lösung hinzugegeben. Die Inkorporation von BrdU wurde bei 370 und 492 nm mit dem Spektrometer  $\mu$ Quant gemessen.

### 1.2.8 Durchflusszytometrie zur Zelltod-Analyse

Zur Analyse des Zelltods nach Behandlung wurde die DNA-Fragmentierung von Propidiumiodid-gefärbten Zellkernen mittels durchflusszytometrischer Analyse an einem FACS Canto (Becton Dickinson) bestimmt. Hierfür wurden adhärente Zellen nach 144 Stunden Behandlung mit Trypsin (0,1 %) enzymatisch abgelöst, für 5 Minuten bei 1300 Umdrehungen/min zentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurde das Pellet in FACS-Puffer bestehend aus Trinatriumcitrat-Dihydrat (0,05 %), Triton-X (0,05 %) und Propidiumiodid (0,05 mg/ml) resuspendiert und die Zellen für 1 Stunde bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die FCS-Dateien wurden mit der Software FlowJo (Version 9) analysiert. Die spezifischen DNA-Fragmentierungsraten wurde wie folgt berechnet:  $100 \times (\text{experimentelle DNA-Fragmentierung (\%)} - \text{spontane DNA-Fragmentierung (\%)}) / (100 \% - \text{spontane DNA-Fragmentierung (\%)})$ .

### 1.2.9 Bliss-Modell

Das Bliss-Unabhängigkeitsmodell wurde zur Untersuchung der Kombinationswirkung von TMZ und INI-0602 verwendet. Der Bliss-Wert wurde definiert als Quotient aus dem rechnerisch vorhergesagten und dem experimentell beobachteten Ansprechen der

Kombinationsbehandlung. Das vorhergesagte Ansprechen der Kombinationsbehandlung wurde berechnet als:  $E = (a+b) - (a*b)$ , wobei a und b dem Prozentsatz der toten Zellen unter Behandlung entspricht, bei jeweils gegebenen Konzentrationen von Medikament A und Medikament B. Der Effekt der Kombinationsbehandlung ist als synergistisch zu bewerten, wenn der beobachtete Kombinationseffekt höher ist als der vorhergesagte Wert (Bliss-Wert  $> 1,1$ ), während die Interaktion als antagonistisch bewertet wird, wenn der beobachtete Effekt geringer ist (Bliss-Wert  $< 0,9$ ).

#### 1.2.10 Reportergeren-Array

Der Cignal™ Finder 45-Pathway Reporter Array (Qiagen) wurde zur Beurteilung möglicher beteiligter, onkologisch relevanter Signalwege eingesetzt. Die Reporter Array Well Platten enthalten Reporterkonstrukte, die von aktivierten Transkriptionsfaktoren induziert werden können. Für die reverse Transfektion der Reporterkonstrukte in die G35-Zellpopulation wurde Lipofectamine 2000 verwendet. Die Behandlung der Zellen mit TMZ/INI-0602 erfolgte für 72 Stunden. Danach wurden die Zellen lysiert und die Luziferase-Aktivitäten mit dem Dual-Luciferase® Reporter Assay in einem Mikroplatten-Luminometer gemessen. Dieses Experiment wurde in Kooperation mit PD Dr. Bernd Evert durchgeführt. Für eine detaillierte Beschreibung der Methode siehe Publikation.

#### 1.2.11 Proteom-Profiler

Der Human Phospho-Kinase Array (R&D) diente zur Bestimmung der relativen Phosphorylierungslevel von 43 verschiedenen Kinasen. Nach 72 Stunden Behandlung mit TMZ/INI-0602 wurden Proteinlysate hergestellt, die mit den bereits mit Antikörper gekoppelten Nitrozellulose-Membranen über Nacht inkubiert wurden. Nach Waschen wurden die Membranen mit einem Zweit-Antikörper-Detektionsgemisch inkubiert, erneut gewaschen und schließlich mit einem Streptavidin-HRP-Gemisch inkubiert. Anschließend wurden die Chemilumineszenz-Signale mit dem ChemoCam Imager

gemessen. Die densitometrische Quantifizierung wurde mit ImageJ durchgeführt. Für eine detaillierte Beschreibung der Methode siehe Publikation.

### 1.2.12 Westernblot-Analyse

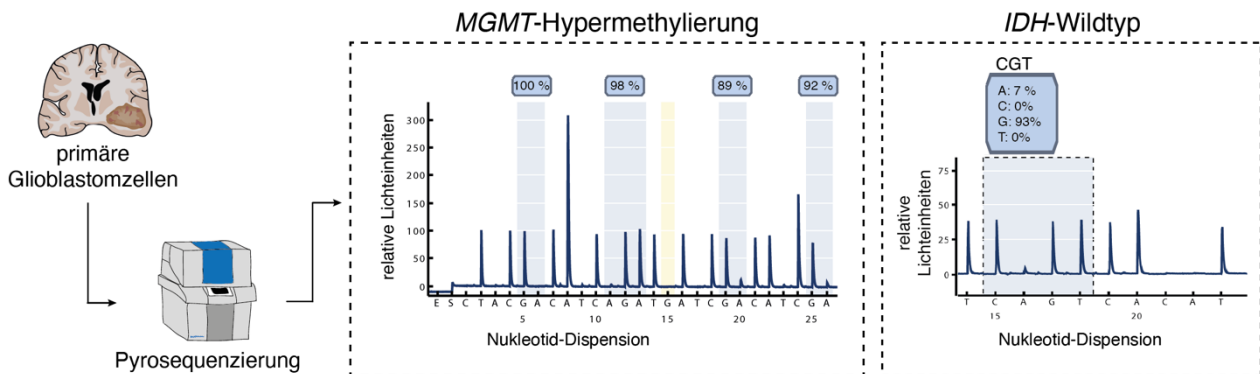
Die Westernblot-Analysen wurde nach Bereitstellung der Proteinlysate freundlicherweise von PD Dr. Bernd Evert durchgeführt. Hierfür wurden 50 µg Protein jeder Probe elektrophoretisch in SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt und auf Nitrozellulose-Membranen transferiert. Die Nitrozellulose-Membranen wurden anschließend mit den angegebenen Primär-Antikörpern über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Waschen der Membranen wurde der entsprechende Zweit-Antikörper zugegeben und die Membranen für eine weitere Stunde inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde das Chemolumineszenz-Substrat auf die Membranen gegeben und die Signale mit einem Chemolumineszenz-Imager sichtbar gemacht. Die Auswertung der Signalintensitäten erfolgte mit der ImageJ Software. Folgende Antikörper wurden eingesetzt: anti-Cx43 (1:1000), anti-JNK (1:1000), anti-Phospho-JNK (1:1000), anti-β-Actin (1:5000).

## 1.3 Ergebnisse

### 1.3.1 Molekulare Charakterisierung der drei Glioblastom-Zellpopulationen

Die molekulare Charakterisierung aller drei primärer Glioblastom-Zellpopulationen G35, G38 und G40 zeigte in der Pyrosequenzierung eine signifikante Hypermethylierung an acht individuellen CpG-Positionen des *MGMT*(O6-Methylguanine-DNA-Methyltransferase)-Gens (Abb. 1 und Abbildung S1 der Publikation). Die Methylierung des *MGMT*-Promotors führt letztlich zu einer reduzierten *MGMT*-Proteinexpression. Dies resultiert in einer verminderten Reparatur der durch TMZ verursachten DNA-Schädigungen (Esteller et al., 2000). Für die in dieser Arbeit verwendeten hypermethylierten Glioblastom-Zellpopulationen stellt TMZ daher das Chemotherapeutikum der Wahl dar (Gilbert et al., 2013). Weiterhin konnte in der Mutationsanalyse des Isocitrat-Dehydrogenase(*IDH*)-Gens bei keiner der drei

Zellpopulationen eine Mutation der Hotspot-Positionen R132 (*IDH1*) oder R172 (*IDH2*) identifiziert werden, sodass es sich bei allen drei Zellpopulationen um *IDH*-Wildtyp Glioblastome handelt.

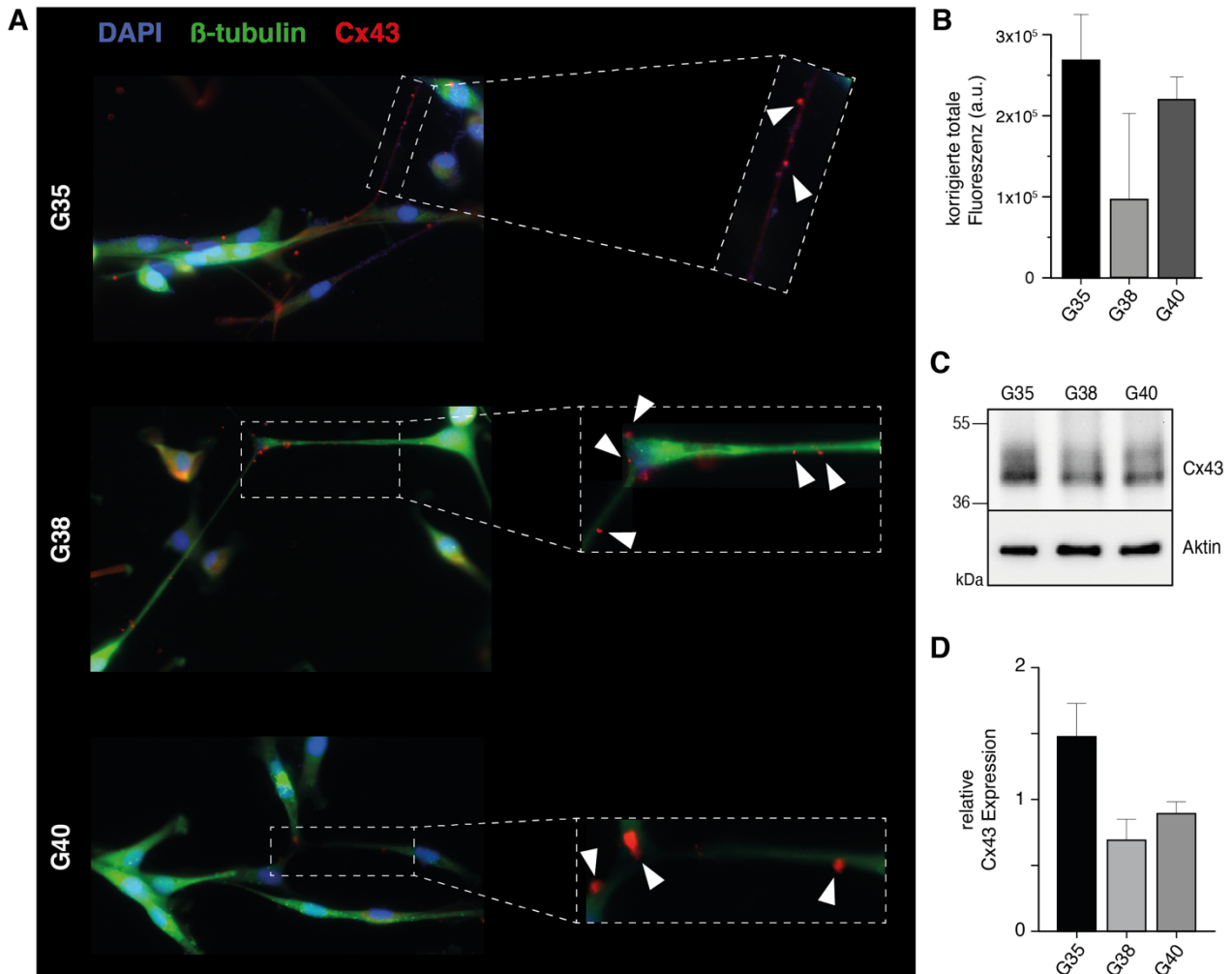


**Abb. 1:** Charakterisierung primärer humaner Glioblastom-Zellpopulationen. Im linken Kasten ist repräsentativ für die G40-Zellpopulation die starke Methylierung an 4 individuellen CpG-Positionen des *MGMT*-Promotors dargestellt. Da es sich hier um eine reverse Sequenzierung handelt, zeigt ein G (Guanin)-Signal den methylierten Zustand des Cytosins des jeweiligen CpG-Dinukleotids an, während ein A (Adenin)-Signal den unmethylierten Zustand darstellt. Im rechten Kasten sind die entsprechenden Ergebnisse der *IDH1*-Mutationsanalyse repräsentativ für die G35-Zellpopulation dargestellt.

### 1.3.2 Nachweis der Expression von Cx43

Da eine wichtige Voraussetzung für eine gegen Gap Junctions gerichtete Therapie die Expression des Zielproteins Cx43 ist, wurde diese zunächst mittels Immunfluoreszenz für die verwendeten Zellpopulationen nachgewiesen. Dabei konnte bei allen drei Glioblastom-Zellpopulationen eine Expression von Cx43 entlang der interkonnektierenden TMs bestätigt werden (Abb. 2A). Bei der semiquantitativen Auswertung der Cx43-Expression anhand der Immunfluoreszenz-Intensitäten wies die G35-Zellpopulation die höchste und die G38-Zellpopulation die geringste Expression von Cx43 auf (Abb. 2B). In Westernblot-Analysen zeigten sowohl die Suspensionszellen (Abbildung S2 der Publikation) als auch die daraus adhären hervorgegangenen differenzierten Zellen (Abb. 2C) aller drei Zellpopulationen eine Expression von Cx43.

Darüber hinaus konnten in den Westernbot-Analysen die in der Immunfluoreszenz beobachteten Unterschiede in der Cx43-Expression bestätigt werden (Abb. 2D).

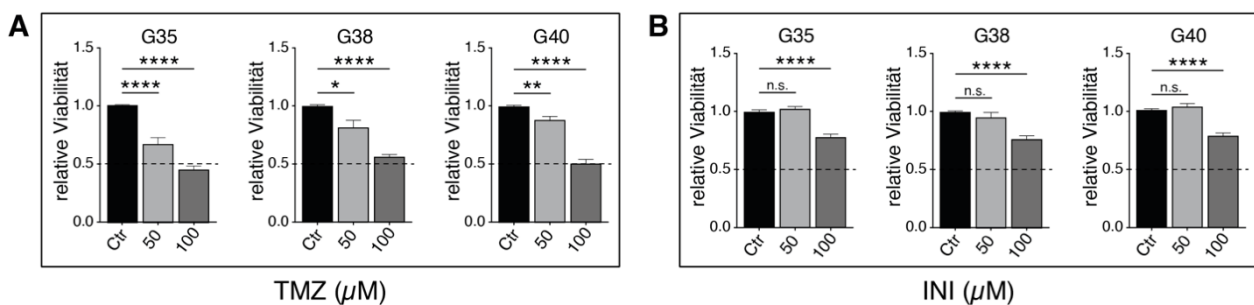


**Abb. 2:** Expressionsnachweis von Cx43 in den Glioblastom-Zellpopulationen G35, G38 und G40. (A) Repräsentative Immunfluoreszenzbilder. Die weißen Pfeilspitzen zeigen auf die Cx43-Expression entlang der TMs. Verwendetes Objektiv: 40x. (B) Quantifizierung der Cx43-Fluoreszenz. (C) Repräsentative Westernblot-Analyse für Cx43 und (D) entsprechende densitometrische Quantifizierung. Modifiziert nach Potthoff et al., 2019.

### 1.3.3 Toxizitätsbestimmung der verwendeten Substanzen

Im nächsten Schritt wurden mithilfe von MTT-Tests effektive Konzentrationen von TMZ und INI-0602 und geeignete Zeitpunkte zur Messung signifikanter Auswirkungen auf die

Zellviabilität ermittelt. Die Behandlung der Zellen mit TMZ zeigte bei einer TMZ-Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  nach 144 Stunden etwa einen halb maximalen Effekt (EC-50) auf die Zellviabilität (Abb. 3A und Abbildung S3A der Publikation). Da jedoch eine Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  weit über den TMZ-Spiegeln liegt, die im Gehirn von mit TMZ behandelten Patienten gemessen werden kann (Portnow et al., 2009), wurde für die weiteren Experimente eine physiologisch relevantere Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  gewählt. Diese Konzentration ging, wie im MTT-Test gezeigt, auch mit einer signifikant verminderten Zellviabilität einher. Die Behandlungen mit INI-0602 zeigten selbst bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  keinen Effekt der einem EC-50-Wert entsprach. In Anlehnung an eine im murinen Modell verwendete Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  (Takeuchi et al., 2011), wurde im Folgenden diese als physiologisch realisierbare Konzentration gewählt (Abb. 3B und Abbildung S3B der Publikation).



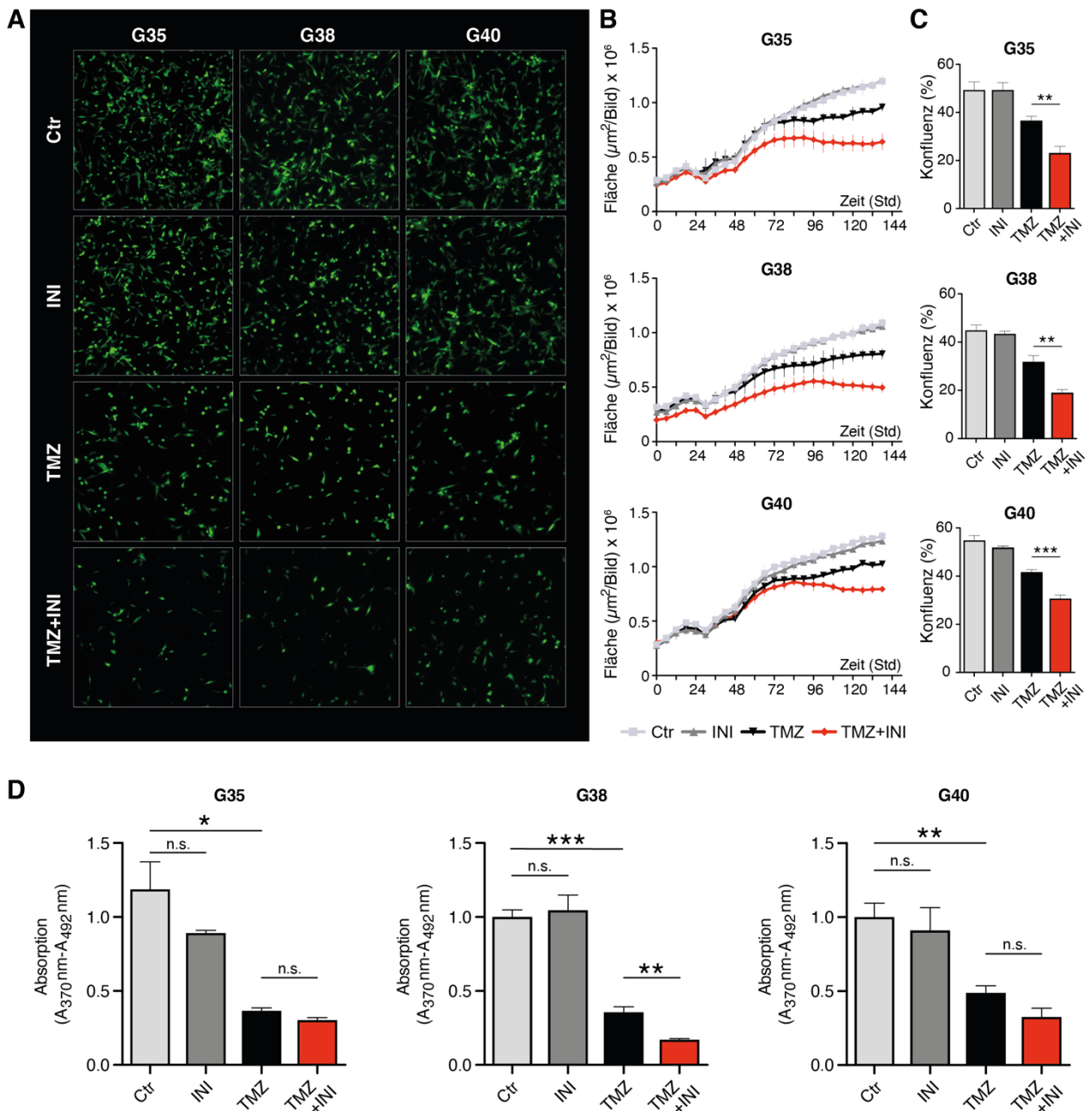
**Abb. 3:** Toxizitätsbestimmung für die Behandlung der Glioblastom-Zellpopulationen G35, G38 und G40 mit TMZ und INI-0602. MTT-Tests nach 144 Stunden Behandlung mit je 50 und 100  $\mu\text{M}$  von (A) TMZ und (B) INI-0602. Unbehandelte Kontrollen wurden gleich 1 gesetzt. Die gestrichelte Linie zeigt die EC-50-Werte an, bei denen ein halbmaximaler zytotoxischer Effekt beobachtet wurde. Modifiziert nach Potthoff et al., 2019.

#### 1.3.4 Effekte auf Zellkonfluenz und Zellproliferation

Unter der Behandlung mit TMZ verringerte sich wie erwartet die Konfluenz der Zellen signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 4A, B). Die alleinige Behandlung mit INI-0602 zeigte keinen signifikanten Effekt. Für die Kombination aus INI-0602 und TMZ hingegen ergab sich für alle drei Glioblastom-Zellpopulationen eine deutlich verringerte Konfluenz der Zellen im Vergleich zur alleinigen TMZ-Behandlung.

Die Quantifizierung der Konfluenz nach 144 Stunden Behandlung zeigte bei der G35-Zellpopulation den stärksten Effekt. Die Zellkonfluenz verringerte sich dabei von 67 % bei alleiniger TMZ-Behandlung auf 37 % in der Kombinationsbehandlung mit INI-0602 (Abb. 4C).

Da die Behandlung der Zellen deren Form verändern kann und die Zellkonfluenz allein somit die Zellproliferation nicht ausreichend abbilden kann, wurde zusätzlich der Einbau des Thymidinanalogons BrdU in neu synthetisierte DNA als Maß für die Zellproliferation bestimmt. Für TMZ zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle eine Verminderung der BrdU-Inkorporation, wohingegen die alleinige Behandlung mit INI-0602 keinen inhibitorischen Effekt auf die Zellproliferation hatte (Abb. 4D). Lediglich die Zellpopulation G38 zeigte eine signifikante Reduktion der Proliferation in der Kombinationstherapie im Vergleich zur alleinigen TMZ-Behandlung.



**Abb. 4:** Bestimmung der Zellkonfluenz und Zellproliferation. (A) Repräsentative Fluoreszenzbilder nach 144 Stunden Behandlung. (B) Quantifizierung der Zellkonfluenz in einem Intervall von 12 Stunden über einen Zeitraum von 144 Stunden. (C) Zellkonfluenz in Prozent nach 144 Stunden Behandlung. (D) Quantifizierung der BrdU-Inkorporation als Maß für die Zellproliferation nach 144 Stunden. Modifiziert nach Potthoff et al., 2019.

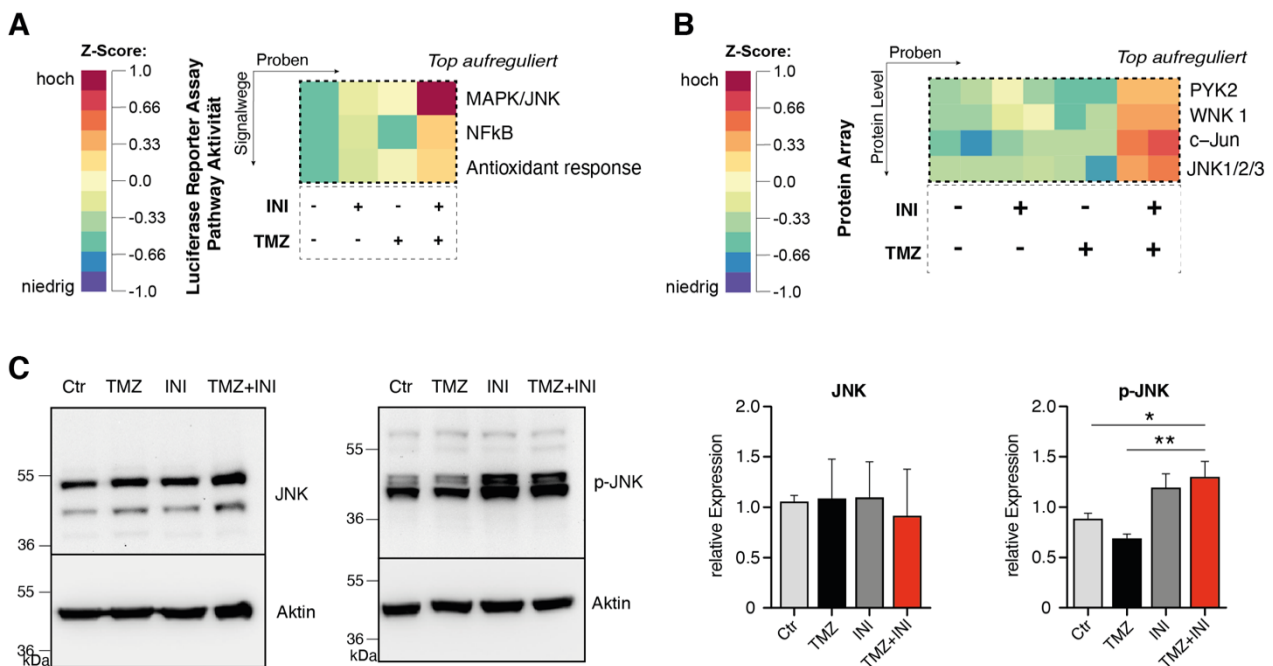


### 1.3.5 Effekte auf den Zelltod

Um eine Aussage darüber treffen zu können, welchen Effekt die Inhibition der Gap Junctions auf den Zelltod hat, wurden die Zellen mit Propidiumiodid (PI) gefärbt und die DNA-Fragmentierung - als Maß für den Zelltod - in der Durchflusszytometrie gemessen (Abb. 5A). Die alleinige Behandlung mit INI-0602 zeigte keinen signifikanten Effekt auf die Zelltodrate (Abb. 5B). Die Kombination aus INI-0602 und TMZ zeigte jedoch in allen drei Zellpopulationen eine Sensitivierung für einen durch TMZ-vermittelten Zelltod (Abb. 5C). Dabei zeigte die G35-Zellpopulation in der Kombinationsbehandlung sowohl die höchste absolute DNA-Fragmentierungsrate als auch den stärksten Zuwachs im Vergleich zu der alleinigen Behandlung mit TMZ. Zur Untersuchung der Kombinationswirkung von TMZ und INI-0602 wurde das Bliss-Modell auf die Höhe der DNA-Fragmentierungsraten angewendet. Die Analyse zeigte, dass die experimentell ermittelte DNA-Fragmentierungsrate für die Kombinationstherapie für alle drei Zellpopulationen deutlich über den rechnerisch vorhergesagten Werten einer rein additiven Wirkung lag (Bliss-Wert für G35: 2, G38: 1,9, G40: 1,6), sodass von einem synergistischen zytotoxischen Effekt ausgegangen werden kann.



aufreguliert werden (Abb. 6A und Abbildung S5A der Publikation). Auf Proteinebene konnte unter Verwendung eines Proteom-Profilers c-Jun und JNK1/2/3 als die in der Kombinationsbehandlung am stärksten aufregulierten Transkriptionsfaktoren und Proteinkinasen bestätigt werden (Abb. 6B und Abbildung S5B der Publikation). In der Westernblot-Analyse konnte unter Kombinationsbehandlung ein signifikant erhöhter Anteil der phosphorylierten, aktivierten Form von JNK (p-JNK) gezeigt werden (Abb. 6C).



**Abb. 6:** Effekte der Kombinationsbehandlung aus TMZ und INI-0602 auf molekularer Ebene. (A) Heatmap der unter Kombinationsbehandlung am stärksten aufregulierten Signalwege im Signal™ Finder 45-Pathway Reporter Array für die G35-Zellpopulation nach 72 Stunden Behandlung. (B) Heatmap für die am stärksten aufregulierten phosphorylierten Proteine im Human Phospho-Kinase Array für die G35-Zellpopulation. (C) Repräsentative Westernblot-Analysen für JNK und p-JNK und entsprechende Quantifizierung der relativen Proteinexpressionen. Modifiziert nach Potthoff et al., 2019.

## 1.4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnten wir für drei primäre Glioblastom-Zellpopulationen zeigen, dass die Inhibition interzellulärer Gap Junctions durch den pharmakologischen

Gap Junction-Inhibitor INI-0602 in einer Sensitivierung für einen durch TMZ-vermittelten Zelltod kumuliert. Die Kombinationsbehandlung aus TMZ mit INI-0602 war auf molekularer Ebene mit einer Aktivierung des NF- $\kappa$ B- und JNK-Signalweges assoziiert.

Bisher wurde in der Glioblastomforschung für die Inhibition der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions fast ausschließlich Carbenoxolon verwendet (Mettang et al., 2018; Murphy et al., 2016; Yulyana et al., 2013). Tierexperimente haben allerdings gezeigt, dass nur ein sehr geringer Anteil des oral verabreichten Carbenoxolons im Gehirnparenchym nachgewiesen werden kann (Leshchenko et al., 2006). Daher scheint es unwahrscheinlich im Gehirn eine Konzentration von 50-100  $\mu$ M - die für die Inhibition der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions benötigt werden - erreichen zu können. Im Hinblick auf eine mögliche klinische Translation einer gegen Gap Junctions gerichteten Therapie ist daher eine Substanz nötig, die fähig ist die Blut-Hirn-Schranke suffizient zu überwinden. Hinzu kommt, dass eine effektive Therapie auch mikroinvasive Tumorzellen erreichen muss, die im gesunden Hirngewebe mit noch intakter Blut-Hirn-Schranke liegen und einer chirurgischen Resektion meist unzugänglich sind. Mit INI-0602, welches bislang im Rahmen der Forschung an murinen Modellen zu Amyotropher Lateralsklerose, Morbus Alzheimer, spinalem Trauma und Adipositas eingesetzt worden war (Takeuchi et al., 2011; Sasaki et al., 2018; Umebayashi et al., 2014), konnte nun in der vorliegenden Arbeit ein erstmals für die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke optimierter Gap Junction-Inhibitor auf das onkologische Feld des Glioblastoms übertragen werden.

Hierbei konnten wir zeigen, dass INI-0602 primäre Glioblastomzellen für einen durch TMZ-vermittelten Zelltod sensibilisiert. Dieses Ergebnis ist vereinbar mit weiteren Arbeiten, die einen Zusammenhang zwischen interzellulärer Kommunikation über Gap Junctions und einer Resistenz gegenüber zytotoxischen Medikamenten beschreiben (Munoz et al., 2014; Osswald et al., 2015; Weil et al., 2017). Die genauen molekularen Mechanismen dieses Zusammenhangs sind jedoch noch nicht ausreichend verstanden. Es wird spekuliert, dass die Bildung eines multizellulären und funktionellen Netzwerkes fähig ist, einzelne Tumorzellen vor schädigenden Anstiegen intrazellulären Calciums oder hohen Spiegeln zytotoxischer Medikamente zu bewahren (Osswald et al., 2015; Weil et al., 2017). Außerdem rückt die Bedeutung von nicht-kodierender RNA in den

letzten Jahren immer mehr in den Fokus (Menachem et al., 2016; Zong et al., 2016). Eine aktuelle Studie konnte beispielsweise zeigen, dass über Gap Junctions übertragene microRNA unter anderem durch Hochregulierung von BCL2L1 zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Chemotherapeutika ins Gehirn metastasierter Lungenkrebszellen führt (Menachem et al., 2016). Darüber hinaus könnte eine Kommunikation von Glioblastomzellen mit nicht-malignen Astrozyten über Gap Junctions einen zusätzlichen Schutzmechanismus gegenüber zytotoxischen Therapien darstellen. So wurde gezeigt, dass metastasierte Brust- und Lungenkarzinomzellen interzelluläre Gap Junctions zu umgebenden Astrozyten nutzen, um über den Second Messenger cGAMP die Bildung proinflammatorischer Zytokine anzuregen, welche wiederum über Aktivierung des STAT1- und NF- $\kappa$ B-Signalweges das Wachstum sowie die Chemotherapieresistenz der Tumorzellen fördern (Chen et al., 2016).

Auf molekularer Ebene zeigen unsere Ergebnisse, dass eine Kombinationsbehandlung aus TMZ und INI-0602 mit einer Aufregulierung des JNK-Signalweges verbunden ist. Passend hierzu wird dem beteiligten Onkogen c-Jun eine zentrale Rolle innerhalb des sogenannten „Cx43-Interaktoms“ zugesprochen, welches auf Basis einer STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins)-Analyse aufgestellt wurde und aus Proteinen besteht, die eine starke Interaktion mit Cx43 aufweisen (Aasen et al., 2016). Allerdings wird der JNK-Signalweg hinsichtlich seiner Bedeutung für die Tumorentstehung und Tumorprogression kontrovers diskutiert. So konnte beim Mammakarzinom der Verlust von JNK1 und JNK2 mit einem Tumorwachstum in Zusammenhang gebracht werden, wohingegen beispielsweise beim hepatozellulären Karzinom eine verringerte Proliferation und ein langsames Tumorwachstum beobachtet wurde (Cellurale et al., 2012; Cellurale et al., 2010; Das et al., 2011; Sakurai et al., 2006). Anhand dieser aktuellen Datenlage scheint es so, als sei es vielmehr die Balance zwischen pro- und anti-apoptischen Signalkaskaden, die das Schicksal der einzelnen Zelle bestimmt und nicht die alleinige Aktivierung des JNK-Signalweges (Dhanasekaran et al., 2017; Ebelt et al., 2013). Weitere Studien werden erforderlich sein, um die genaue Rolle des JNK-Signalweges bei einer gegen Gap Junctions gerichteten Therapie im Glioblastom zu identifizieren. Zu beantworten wird hier unter anderem sein, ob die Aktivierung des JNK-Signalweges eine direkte Folge der Inhibition

von Gap Junctions ist oder ob die Aktivierung vielmehr eine zelluläre Ausweichreaktion auf die Inhibition interzellulärer Kommunikation über Gap Junctions darstellt.

### **1.5 Zusammenfassung**

Durch interzelluläre Kontakte über Gap Junctions können Glioblastomzellen ein multizelluläres und funktionelles Netzwerk aufbauen, das Kommunikation über lange Distanzen hinweg ermöglicht. Dieses Netzwerk stellt ein wesentliches Charakteristikum zur Erlangung einer Therapieresistenz dar. In dieser Hinsicht könnten Therapien, die die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions unterbinden, zu einer funktionellen Isolierung der Zellen beitragen und somit zu einer größeren Vulnerabilität der Tumorzellen gegenüber dem Standardtherapeutikum Temozolomid (TMZ) führen. In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass die pharmakologische Inhibition von Gap Junctions durch INI-0602 - einem neuartigen und erstmals für die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke optimierten Gap Junction-Inhibitor - zu einer Sensitivierung für einen durch TMZ-vermittelten Zelltod führt. Auf molekularer Ebene war dies mit einer erhöhten Aktivierung des JNK-Signalweges verbunden. Die liquorgängige Eigenschaft macht INI-0602 zu einem aussichtsreichen Medikament für eine potentielle Translation einer gegen Gap Junctions gerichteten Therapie in die Klinik.

### **1.6 Literaturverzeichnis**

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

Bhowmik A, Khan R, Ghosh MK. Blood brain barrier: a challenge for effectual therapy of brain tumors. *Biomed Res Int*. 2015. 2015: 320941

Broekman ML, Maas SLN, Abels ER, Mempel TR, Krichevsky AM, Breakefield XO. Multidimensional communication in the microenvirons of glioblastoma. *Nat Rev Neurol*. 2018. 14: 482-495

Cellurale C, Girnius N, Jiang F, Cavanagh-Kyros J, Lu S, Garlick DS, Mercurio AM, Davis RJ. Role of JNK in mammary gland development and breast cancer. *Cancer Res*. 2012. 72: 472-481

Cellurale C, Weston CR, Reilly J, Garlick DS, Jerry DJ, Sluss HK, Davis RJ. Role of JNK in a Trp53-dependent mouse model of breast cancer. *PLoS One*. 2010. 5: e12469

Chen Q, Boire A, Jin X, Valiente M, Er EE, Lopez-Soto A, Jacob L, Patwa R, Shah H, Xu K, Cross JR, Massague J. Carcinoma-astrocyte gap junctions promote brain metastasis by cGAMP transfer. *Nature*. 2016. 533: 493-498

Das M, Garlick DS, Greiner DL, Davis RJ. The role of JNK in the development of hepatocellular carcinoma. *Genes Dev*. 2011. 25: 634-645

De Witt Hamer PC, Van Tilborg AA, Eijk PP, Sminia P, Troost D, Van Noorden CJ, Ylstra B, Leenstra S. The genomic profile of human malignant glioma is altered early in primary cell culture and preserved in spheroids. *Oncogene*. 2008. 27: 2091-2096

Dhanasekaran DN, Reddy EP. JNK-signaling: A multiplexing hub in programmed cell death. *Genes Cancer*. 2017. 8: 682-694

Ebelt ND, Cantrell MA, Van Den Berg CL. c-Jun N-Terminal Kinases Mediate a Wide Range of Targets in the Metastatic Cascade. *Genes Cancer*. 2013. 4: 378-387

Giese A, Bjerkvig R, Berens ME, Westphal M. Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *J Clin Oncol.* 2003. 21: 1624-1636

Gilbert MR, Wang M, Aldape KD, Stupp R, Hegi ME, Jaeckle KA, Armstrong TS, Wefel JS, Won M, Blumenthal DT, Mahajan A, Schultz CJ, Erridge S, Baumert B, Hopkins KI, Tzuk-Shina T, Brown PD, Chakravarti A, Curran WJ, Jr., Mehta MP. Dose-dense temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: a randomized phase III clinical trial. *J Clin Oncol.* 2013. 31: 4085-4091

Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005. 352: 997-1003

Kar R, Batra N, Riquelme MA, Jiang JX. Biological role of connexin intercellular channels and hemichannels. *Arch Biochem Biophys.* 2012. 524: 2-15

Laird DW. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J.* 2006. 394: 527-543

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

Lim PK, Bliss SA, Patel SA, Taborga M, Dave MA, Gregory LA, Greco SJ, Bryan M, Patel PS, Rameshwar P. Gap junction-mediated import of microRNA from bone marrow stromal cells can elicit cell cycle quiescence in breast cancer cells. *Cancer Res.* 2011. 71: 1550-1560



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

Mettang M, Meyer-Pannwitt V, Karpel-Massler G, Zhou S, Carragher NO, Fohr KJ, Baumann B, Nonnenmacher L, Enzenmüller S, Dahlhaus M, Siegelin MD, Stroh S, Mertens D, Fischer-Posovszky P, Schneider EM, Halatsch ME, Debatin KM, Westhoff MA. Blocking distinct interactions between Glioblastoma cells and their tissue microenvironment: A novel multi-targeted therapeutic approach. *Sci Rep*. 2018. 8: 5527

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*. 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

Osswald M, Jung E, Sahm F, Solecki G, Venkataramani V, Blaes J, Weil S, Horstmann H, Wiestler B, Syed M, Huang L, Ratliff M, Karimian Jazi K, Kurz FT, Schmenger T, Lemke D, Gömmel M, Pauli M, Liao Y, Häring P, Pusch S, Herl V, Steinhäuser C, Kronic D, Jarahian M, Miletic H, Berghoff AS, Griesbeck O, Kalamakis G, Garaschuk O, Preusser M, Weiss S, Liu H, Heiland S, Platten M, Huber PE, Kuner T, von Deimling A,

Wick W, Winkler F. Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network. *Nature*. 2015. 528: 93-98

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

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*. 2009. 15: 7092-7098

Sakurai T, Maeda S, Chang L, Karin M. Loss of hepatic NF-kappa B activity enhances chemical hepatocarcinogenesis through sustained c-Jun N-terminal kinase 1 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006. 103: 10544-10551

Sasaki T, Numano R, Yokota-Hashimoto H, Matsui S, Kimura N, Takeuchi H, Kitamura T. A central-acting connexin inhibitor, INI-0602, prevents high-fat diet-induced feeding pattern disturbances and obesity in mice. *Mol Brain*. 2018. 11: 28

Schneider M, Ströbele S, Nonnenmacher L, Siegelin MD, Tepper M, Stroh S, Hasslacher S, Enzenmüller S, Strauss G, Baumann B, Karpel-Massler G, Westhoff MA, Debatin KM, Halatsch ME. A paired comparison between glioblastoma "stem cells" and differentiated cells. *Int J Cancer*. 2016. 138: 1709-1718

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*. 2010. 12: 750-756

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

Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht CJ, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross JG, Mirimanoff RO, European Organisation for R, Treatment of Cancer Brain T, Radiation Oncology G, National Cancer Institute of Canada Clinical Trials G. 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.* 2009. 10: 459-466

Takeuchi H, Mizoguchi H, Doi Y, Jin S, Noda M, Liang J, Li H, Zhou Y, Mori R, Yasuoka S, Li E, Parajuli B, Kawanokuchi J, Sonobe Y, Sato J, Yamanaka K, Sobue G, Mizuno T, Suzumura A. Blockade of gap junction hemichannel suppresses disease progression in mouse models of amyotrophic lateral sclerosis and Alzheimer's disease. *PLoS One.* 2011. 6: e21108

Tan AC, Ashley DM, Lopez GY, Malinzak M, Friedman HS, Khasraw M. Management of glioblastoma: State of the art and future directions. *CA Cancer J Clin.* 2020. 70: 299-312

Umebayashi D, Natsume A, Takeuchi H, Hara M, Nishimura Y, Fukuyama R, Sumiyoshi N, Wakabayashi T. Blockade of gap junction hemichannel protects secondary spinal cord injury from activated microglia-mediated glutamate excitotoxicity. *J Neurotrauma.* 2014. 31: 1967-1974

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

Yulyana Y, Endaya BB, Ng WH, Guo CM, Hui KM, Lam PY, Ho IA. 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

Zong L, Zhu Y, Liang R, Zhao HB. Gap junction mediated miRNA intercellular transfer and gene regulation: A novel mechanism for intercellular genetic communication. *Sci Rep.* 2016. 6: 19884

### 3. Veröffentlichung



Article

## Inhibition of Gap Junctions Sensitizes Primary Glioblastoma Cells for Temozolomide

Anna-Laura Potthoff <sup>1</sup>, Dieter Henrik Heiland <sup>2,3,4</sup> , Bernd O. Evert <sup>5</sup>,  
Filipe Rodrigues Almeida <sup>6</sup>, Simon P. Behringer <sup>2,3</sup>, Andreas Dolf <sup>7</sup>, Ági Güeresir <sup>1</sup>,  
Erdem Güeresir <sup>1</sup> , Kevin Joseph <sup>2,3</sup> , Torsten Pietsch <sup>6</sup>, Patrick Schuss <sup>1</sup>, Ulrich Herrlinger <sup>8</sup>,  
Mike-Andrew Westhoff <sup>9</sup> , Hartmut Vatter <sup>1</sup>, Andreas Waha <sup>6</sup> and Matthias Schneider <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Neurosurgery, Rheinische Friedrich-Wilhelms-University Hospital, Sigmund-Freud-Strasse 25, 53127 Bonn, Germany; s4anpott@uni-bonn.de (A.-L.P.); agi.gueresir@ukbonn.de (Á.G.); erdem.gueresir@ukbonn.de (E.G.); patrick.schuss@ukbonn.de (P.S.); hartmut.vatter@ukbonn.de (H.V.)

<sup>2</sup> Translational NeuroOncology Research Group, University of Freiburg, Breisacher Strasse 64, 79106 Freiburg im Breisgau, Germany; dieter.henrik.heiland@uniklinik-freiburg.de (D.H.H.); simon.behringer@uniklinik-freiburg.de (S.P.B.); kevin.joseph@uniklinik-freiburg.de (K.J.)

<sup>3</sup> Faculty of Medicine, University of Freiburg, Breisacher Strasse 64, 79106 Freiburg im Breisgau, Germany

<sup>4</sup> Department of Neurosurgery, University of Freiburg, Breisacher Strasse 64, 79106 Freiburg im Breisgau, Germany

<sup>5</sup> Department of Neurology, Rheinische Friedrich-Wilhelms-University Hospital, Sigmund-Freud-Strasse 25, 53127 Bonn, Germany; b.evert@uni-bonn.de

<sup>6</sup> Department of Neuropathology, Rheinische Friedrich-Wilhelms-University Hospital, Sigmund-Freud-Strasse 25, 53127 Bonn, Germany; filipe.almeida@gmx.de (F.R.A.); torsten.pietsch@ukb.uni-bonn.de (T.P.); andreaswaha1@mac.com (A.W.)

<sup>7</sup> Institute of Experimental Immunology, Rheinische Friedrich-Wilhelms-University Hospital, Sigmund-Freud-Strasse 25, 53127 Bonn, Germany; andreas.dolf@uni-bonn.de

<sup>8</sup> Division of Clinical Neurooncology, Department of Neurology, Rheinische Friedrich-Wilhelms-University Hospital, Sigmund-Freud-Strasse 25, 53127 Bonn, Germany; ulrich.herrlinger@ukbonn.de

<sup>9</sup> Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, University Medical Center Ulm, Eythstrasse 24, 89075 Ulm, Germany; Andrew.Westhoff@uniklinik-ulm.de

\* Correspondence: matthias.schneider@ukbonn.de; Tel.: +49-228-28716518

Received: 10 June 2019; Accepted: 18 June 2019; Published: 20 June 2019



**Abstract:** Gap junctions have recently been shown to interconnect glioblastoma cells to a multicellular syncytial network, thereby allowing intercellular communication over long distances as well as enabling glioblastoma cells to form routes for brain microinvasion. Against this backdrop gap junction-targeted therapies might provide for an essential contribution to isolate cancer cells within the brain, thus increasing the tumor cells' vulnerability to the standard chemotherapeutic agent temozolomide. By utilizing INI-0602—a novel gap junction inhibitor optimized for crossing the blood brain barrier—in an oncological setting, the present study was aimed at evaluating the potential of gap junction-targeted therapy on primary human glioblastoma cell populations. Pharmacological inhibition of gap junctions profoundly sensitized primary glioblastoma cells to temozolomide-mediated cell death. On the molecular level, gap junction inhibition was associated with elevated activity of the JNK signaling pathway. With the use of a novel gap junction inhibitor capable of crossing the blood–brain barrier—thus constituting an auspicious drug for clinical applicability—these results may constitute a promising new therapeutic strategy in the field of current translational glioblastoma research.

**Keywords:** glioblastoma; gap junctions; INI-0602; cell death; c-Jun

## 1. Introduction

Despite therapeutic modalities that range from surgical resection alone to surgery followed by radiotherapy with concomitant and adjuvant chemotherapy, glioblastomas continue to rank among the most disastrous and deadly tumors [1]. There are several cellular aspects that make this entity a highly lethal and difficult to treat disease. First and foremost, glioblastoma cells are characterized by a nearly unlimited proliferation capacity, marked resistance to chemotherapeutic agents, as well as fatal dissemination into healthy brain tissue [2–5].

In recent years, gap junctions as intercellular ion channels have drawn growing attention in the context of cancer pathogenesis [6]. Composed of integral membrane proteins called connexins, gap junctions allow intercellular bidirectional exchange of ions, second messengers, microRNAs, and other small molecules, therefore crucially mediating tissue homeostasis as well as cellular growth and differentiation [7–9]. Considering pivotal intercellular communication within a tumor's syncytial interiority and architecture, breakdown of gap junction-based cellular co-operation has been shown to inhibit proliferation capacity as well as cellular metastatic potential in breast, melanoma and lung cancer among others [10–13]. In the context of glioblastoma biology, Osswald et al. recently revealed gap junctions—composed of two connexin-43-based hexamers—to interconnect glioblastoma cells to a multicellular network allowing intercellular communication over long distances as well as enabling glioblastoma cells to fatally invade the healthy brain tissue [14,15]. Therefore, gap junction-targeted therapies might provide an essential contribution to the isolation of glioblastoma cells from the brain. A tumor cell deprived of crucial intercellular contacts, therefore weakened to receive essential survival signals from surrounding cells, should significantly be restricted in its marked proliferation capacity, its resistance to chemotherapeutic agents, and its fatal invasive nature.

In this context, our project was aimed at evaluating the potential of gap junction inhibition as a novel therapeutic approach in glioblastoma research. We used INI-0602, the first gap junction inhibitor that had been optimized for crossing the blood–brain barrier—an important step towards a clinical applicability, as the transition of this barrier poses an additional major challenge in glioblastoma therapy [16]. Our results show that INI-0602 profoundly sensitizes primary glioblastoma cells to temozolomide-mediated cell death. Therefore, pharmacological gap junction inhibition constitutes a promising new therapy strategy in the course of current translational glioblastoma research.

## 2. Results

### 2.1. Characterization of Primary Human Glioblastoma Cell Populations

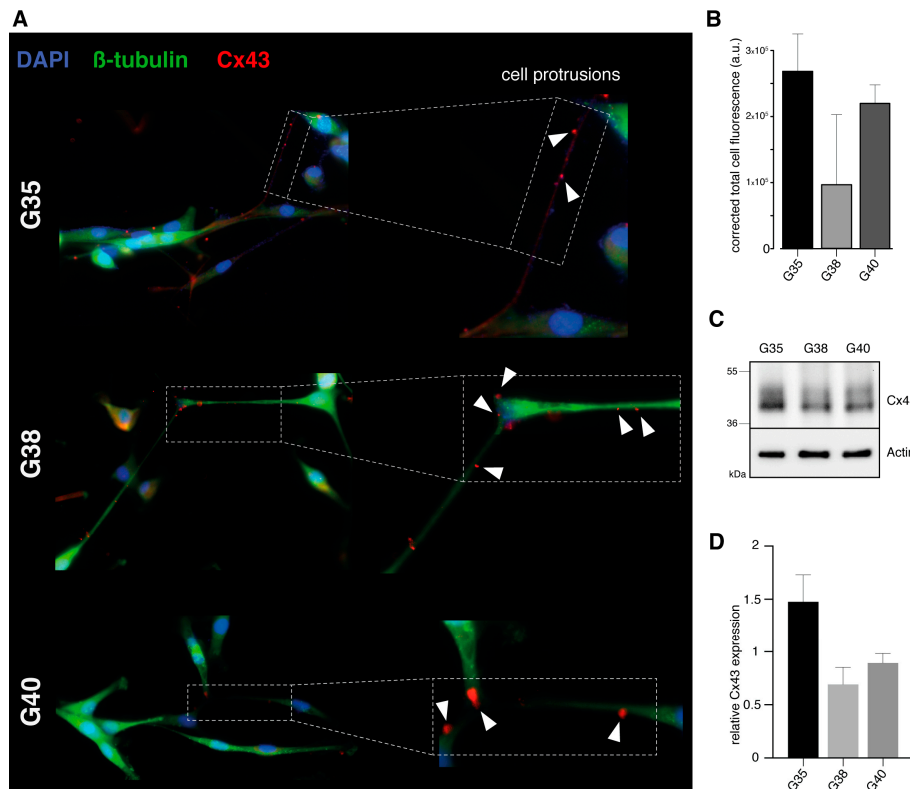
Three primary glioblastoma cell populations (G35, G38, and G40) were chosen from our collaborators' collection of human brain tumor stem cells in order to gain differentiated adherent cell populations of short-term expansion for experiments [17] (see Material and Methods Section). Cells were obtained from surgical specimens of a 44-year old male, a 75-year old male, and a 57-year old female patient, as previously described [17]. The three cell populations showed significant hypermethylation in the investigated region of the MGMT gene. No mutation of the hotspot positions R132 or R172 of IDH1 and IDH2, respectively, was identified in the three cell populations (Figure S1).

### 2.2. Verification of Connexin-43 Expression in Primary Glioblastoma Cell Populations

A prerequisite for successful gap junction-targeted therapy is the evidence of target protein expression in abovementioned primary glioblastoma cell populations. Therefore, expression of intercellular gap junctions was visualized by means of immunofluorescence staining for connexin-43. All three primary glioblastoma cell populations proved to be positive for connexin-43 expression (Figure 1A,B).

Interestingly, connexin-43 was detected along characteristic ultra-long and lathy cell protrusions that interconnected tumor cells over long distances (Figure 1A). Semiquantitative analysis revealed that the G35 primary glioblastoma population exhibits higher corrected total cell fluorescence for

connexin-43 compared to G38 and G40 cell populations (Figure 1B). Western blot analysis confirmed connexin-43 protein expression for all three cell populations (Figure 1C), and reflected observed differences in the expression of relative connexin-43 (Figure 1D). Positive connexin-43 expression was also detected in primary suspension cell populations, where differentiated glioblastoma cells were derived from for short term expansion (Figure S2).



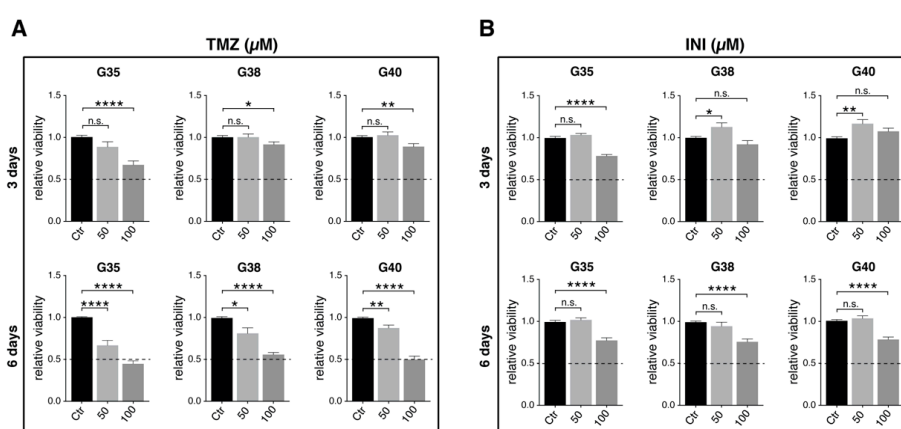
**Figure 1.** Verification of connexin-43 expression in primary glioblastoma cell populations. (A) Immunofluorescence staining: differentiated glioblastoma cells (G35, G38, and G40) were stained for Cx43 (red),  $\beta$ -tubulin (green), and DAPI (blue). One representative image for each primary glioblastoma cell population is shown. White arrowheads point at positive Cx43 staining detected along characteristic ultra-long and lathy cell protrusions. Magnification: 40 $\times$ . (B) Quantification of Cx43 protein expression: The relative expression level of Cx43 is shown as corrected total cell fluorescence. Mean  $\pm$  SD of three measurements is depicted. (C,D) Western blot analysis and densitometric quantification of Cx43 protein expression: Actin was used as loading control. Mean  $\pm$  SD of two measurements is shown. All three cell populations are positive for Cx43. G, glioblastoma; and Cx43, connexin-43.

### 2.3. Determination of Effective Drug Concentrations

In order to find effective concentrations of temozolomide and INI-0602, and define significant readout time points after drug application, metabolic activity of glioblastoma cells was monitored over 144 h after treatment, as we had recently described a significant reduction in cell viability for G35, G38, and G40 cell populations 120–144 h after temozolomide treatment [18] (Figure 2A,B; for detailed information see Figure S3). In case of temozolomide, maximal inhibitory effect for all three cell

populations was achieved at a concentration of 100  $\mu\text{M}$  measured 144 h after treatment (Figure 2A). However, 100  $\mu\text{M}$  did not correspond to a range of concentrations detected in the brain interstitium of temozolomide-treated patients [19]. Therefore, a physiologically relevant concentration of 50  $\mu\text{M}$ —that could also yield a significant reduction of relative cell viability 144 h post treatment—was chosen for the following experiments.

INI-0602 exhibited only slight effects on cell viability and we could not reach conditions that corresponded to the half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub> value) in MTT-analyses (Figure 2B). Therefore, 100  $\mu\text{M}$  was taken for further analyses with regard to corresponding treatment concentrations in murine models of amyotrophic lateral sclerosis and Alzheimer's disease [16].

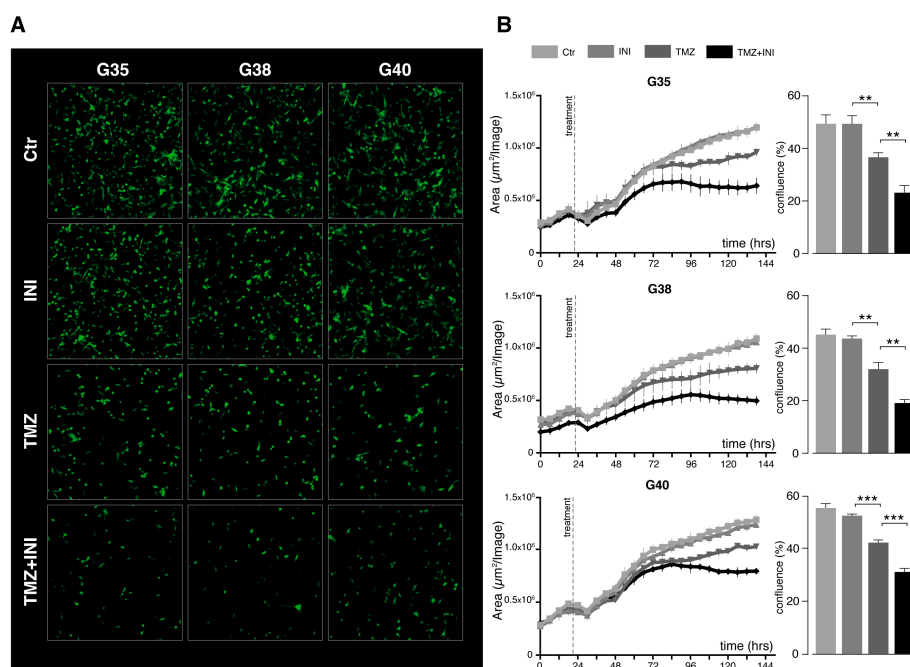


**Figure 2.** Determination of effective drug concentrations. Glioblastoma cells were treated with various concentrations of TMZ and INI. Cell viability was assessed 3 and 6 days after treatment by MTT assay (see Materials and Methods). Untreated controls were defined as 100%. Mean of relative cell viability of three independent experiments performed in triplicate are depicted. Two-tailed *t*-test was performed for comparison between different time points of treatment for concentrations of 50  $\mu\text{M}$  and 100  $\mu\text{M}$  of TMZ (A) and INI (B), respectively. Dotted lines represent the IC<sub>50</sub> levels. \*, \*\*, and \*\*\*\* denote  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ , and  $p < 0.0001$ . G, glioblastoma; IC<sub>50</sub>, half maximal inhibitory concentration; and TMZ, temozolomide.

#### 2.4. Additional Gap Junction-targeted Therapy Significantly Diminishes Glioblastoma Cell Confluence

Under the abovementioned drug concentrations and readout time points, fluorescence images revealed an expected decrease in cellular confluence for temozolomide treatment compared to untreated control (Figure 3B). While INI-0602 did not seem to markedly affect glioblastoma cell confluence, cell density was profoundly weakened for combination treatment compared to the standard chemotherapeutic agent temozolomide measured at day 6 (Figure 3A). Live cell imaging over a time span of 144 h confirmed these observations, and analysis of cellular confluence at day 6 yielded significantly diminished values for additional gap junction inhibition compared to temozolomide single treatment for all three cell populations (24.3% versus 36.8% averaged over all three primary cell populations; untreated control 49.7%;  $p < 0.01$ ) (Figure 3B).





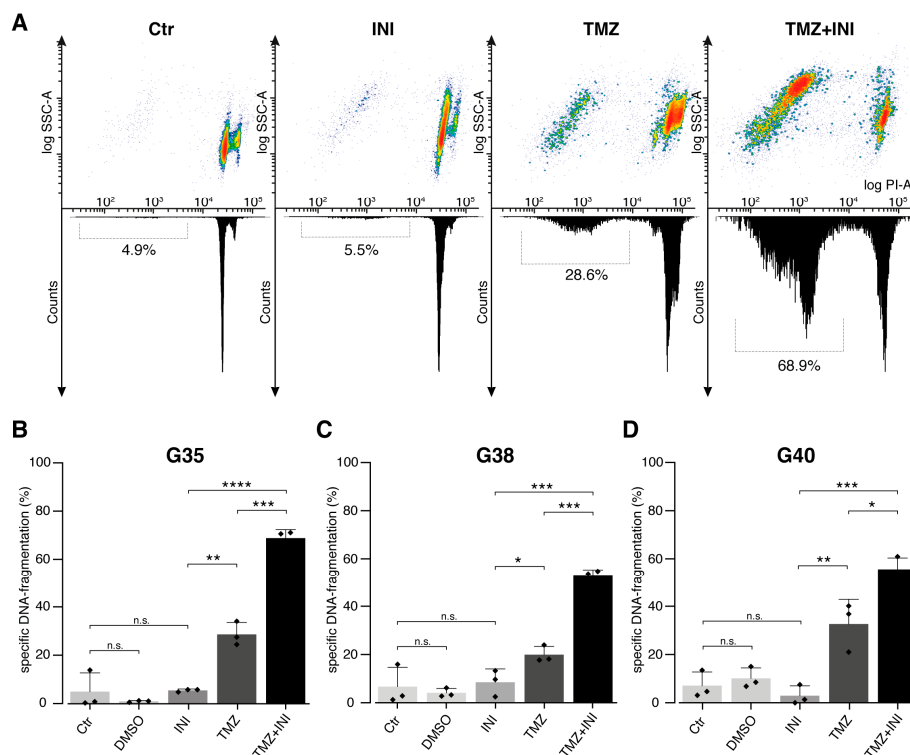
**Figure 3.** Gap junction-targeted therapy diminishes glioblastoma cell confluence. **(A)** Fluorescence images: cells were treated with 50  $\mu\text{M}$  TMZ, 100  $\mu\text{M}$  INI, combination of both, or left untreated. Images were taken after 6 days. One representative image out of three is shown for each cell population and treatment modality. Magnification: 10 $\times$ . **(B)** Analysis of cellular confluence: quantification of fluorescence images taken with The IncuCyte<sup>®</sup> S3 Live-Cell Analysis System. Cells were treated with 50  $\mu\text{M}$  TMZ, 100  $\mu\text{M}$  INI, combination of both, or left untreated. Cell confluence was calculated as  $\mu\text{m}^2/\text{Image}$  and is depicted in 6 h intervals over a period of 6 days. Barplots to the right represent confluence in percent after 6 days for the different treatment modalities. Mean  $\pm$  SD of three measurements is depicted. \*\* and \*\*\* denote  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ . Ctr, control; G, glioblastoma; and TMZ, temozolomide.

### 2.5. INI-0602 Sensitizes Glioblastoma Cells to Temozolomide-mediated Cell Death

In order to characterize the underlying mechanisms of the observed effects of gap junction inhibition on cellular confluence, specific DNA-fragmentation of propidium iodide-stained nuclei was assessed as readout for cell death. Mere gap junction inhibition did not significantly increase the percentage of specific DNA-fragmentation compared to untreated control populations, however, additional administration of INI-0602 profoundly increased DNA-fragmentation rates seen for temozolomide single treatment from 27.1% up to 59.1% ( $p < 0.0001$ ) (Figure 4A,B). Notwithstanding sensitization to temozolomide-mediated cell death was markedly present for all three cell populations, G35 and G38 primary glioblastoma cells exhibited more than a doubling of DNA-fragmentation rates compared to temozolomide alone (Figure 4C). Sub G1 peak as surrogate for cell death was highest for G35 cell population (Figure 4).

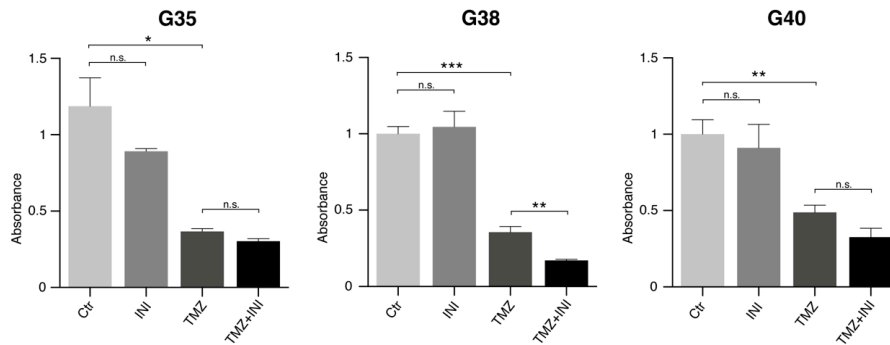
Based on the DNA-fragmentation rates the Bliss independence equation was used to investigate the interaction between TMZ and INI-0602. Bliss synergy was found for the combination treatment of TMZ and INI-0602. The observed drug effects in case of combination treatment were up to 7.3-times higher than the expected effects under the Bliss independent zero-interaction hypothesis (G35: 6.6-times higher, G38: 7.3-times higher, G40: 4.6-times higher).

Taken together, INI-0602 showed a significantly sensitizing effect for temozolomide-mediated cell death.



**Figure 4.** Gap junction-targeted therapy sensitizes glioblastoma cells to temozolomide-mediated cell death. (A) Effects on cell death: Treatment was performed with 50  $\mu$ M TMZ, 100  $\mu$ M INI, or combination of both. Percentage of DNA-fragmentation of propidium iodide-stained nuclei was determined by flow cytometric analysis 144 h after treatment. Representative density plots and histograms are shown for different treatment modalities for G35 cell population. The SubG1 peak is accentuated within the histograms and the mean percentage of DNA-fragmentation is depicted below. (B) Mean  $\pm$  SD of specific DNA-fragmentation is shown for G35 (B), G38 (C), and G40 (D) primary glioblastoma cell populations. For each cell population three independent experiments were performed in triplicates. INI sensitizes glioblastoma cells to temozolomide-mediated cell death. Among the three glioblastoma cell populations, G35 exhibited the highest DNA-fragmentation rates. \*, \*\*, \*\*\*, and \*\*\*\* denote  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ , and  $p < 0.0001$ . Ctr, control; G, glioblastoma; TMZ, temozolomide; PI, propidium iodide; and SSC, Side Scatter.

As evaluation of cellular confluence alone (Figure 3) does not adequately represent cell proliferation with regard to changing cell shape and size under treatment, cell proliferation analysis was performed. Similarly to the findings deduced from analysis of DNA-fragmentation rates, single gap junction inhibition did not significantly affect glioblastoma cell proliferation compared to untreated control populations (Figure 5, for effects on cell viability see Figure S4). While temozolomide yielded expected proliferation-inhibiting effects in all three primary cell populations, combination treatment demonstrated further significant reduction of cellular proliferation only in case of G38 cell population ( $p < 0.01$ ).

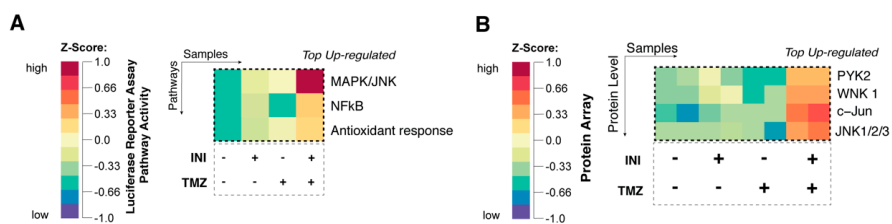


**Figure 5.** Gap junction-targeted therapy did not markedly affect glioblastoma cell proliferation. Treatment was performed with 50  $\mu$ M TMZ, 100  $\mu$ M INI, or combination of both. The amount of incorporated BrdU as surrogate readout for cell proliferation was determined by measuring the absorbance at 370 and 492 nm 144 h after treatment. Mean  $\pm$  SD is depicted. \*, \*\* and \*\*\* denote  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ . Ctr, control; G, glioblastoma; and TMZ, temozolomide.

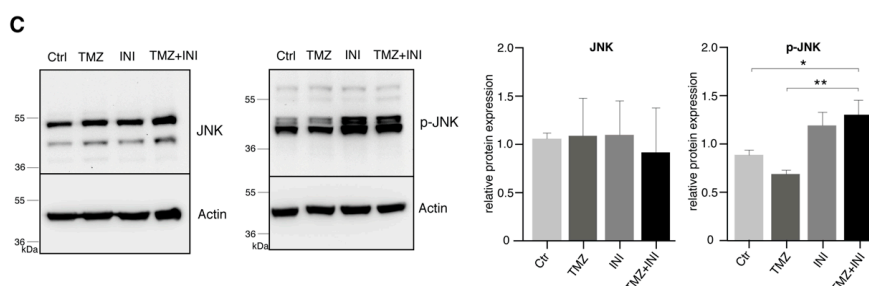
#### 2.6. Additional Gap Junction Inhibition Leads to Elevated Activation of the JNK Signaling Pathway

Utilizing the Signal Finder Reporter Array, 45 oncologically relevant cell signaling pathways were assessed through reverse transfection of preformed reporter constructs into G35 primary human cell population. Measurement of luciferase activities revealed NF-kappaB as well as Activator Protein-1 (AP-1)—the major transcription factor for the JNK pathway—to be the most upregulated for combination treatment compared to single administration of INI-0602 or temozolomide (Figure 6A, for detailed information see Figure S5A).

On the protein level, c-Jun and JNK1/2/3 could be confirmed as the top up-regulated transcription factors and protein kinases in case of combination versus single drug treatment (Figure 6B, for detailed information see Figure S5B). Western blot analysis demonstrated elevated levels of p-JNK for single gap junction inhibition therapy as well as combination treatment, whereas unphosphorylated JNK did not markedly differ between untreated control populations and the treatment strategies depicted (Figure 6C).



**Figure 6.** Cont.



**Figure 6.** Additional gap junction inhibition leads to elevated activation of the JNK signaling pathway. (A) Gene expression heatmap of Cignal™ Finder 45-pathway Reporter Gene Array: treatment was performed using 50  $\mu$ M TMZ, 100  $\mu$ M INI, or combination of both. Activity of firefly and Renilla luciferases were measured 72 h after treatment. Data were normalized for activity of Renilla luciferase to account for transfection efficiency. Experiments were performed in duplicates. Top upregulated pathways for combined treatment of TMZ and INI are displayed for G35 cell population. (B) Heatmap of Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array: cells were treated with 50  $\mu$ M TMZ, 100  $\mu$ M INI, or combination. Experiments were performed in duplicates. Top upregulated transcription factors and protein kinases are depicted for G35 cell population. (C) Western blot analysis and densitometric quantification of JNK and p-JNK protein expression. Actin was used as a loading control. Mean  $\pm$  SD of relative protein expression is depicted. Experiments were performed in triplicate. Ctr, control; and TMZ, temozolomide. \* and \*\* denote  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ .

### 3. Discussion

Glioblastoma cells have been recently reported to exhibit ultra-long and thin membrane protrusions that extend into the surrounding brain and tumor tissue in order to interconnect tumor cells over long distances. On a microscopical level, these intercellular contact points are composed of connexin-43-based gap junctions enabling glioblastoma cells to fatally assemble to a multicellular functional network [14]. The resulting syncytial structures have been shown to significantly contribute to mechanisms of therapy resistance as well as to facilitate glioblastoma invasion and proliferation capacity [15]. Therefore, we hypothesized that the inhibition of intercellular communication via gap junctions might constitute a promising novel therapeutic approach. By utilizing the first blood–brain barrier-permeable gap junction inhibitor in an oncological setting, we aimed to evaluate the potential of gap junction inhibition in the context of current translational glioblastoma research.

With regard to various studies that have observed an inverse association of gap junction expression level and glioma grade as well as less connexin-43 expression in high grade gliomas compared to normal brain tissue [20,21], we validated connexin-43 expression in three primary glioblastoma cell populations. Consistent with the recent observations of a gap junction-based multicellular syncytial network [14,15], connexin-43 expression was confirmed for all of the three glioblastoma cell populations used. In addition, positive connexin-43 staining was visualized along thin and lathy cell protrusions that interconnected glioblastoma cells over long distances, therefore providing a clinically relevant setting of human glioblastoma cell populations in order to address pivotal issues of gap junction inhibition as a novel therapeutic strategy for glioblastoma.

Current available studies on pharmacological gap junction inhibition in glioblastoma are mainly based on the use of the glycyrrhetic acid-derivative carbenoxolone as a potent gap junction blocker [22–27]. However, carbenoxolone has been shown not to reach therapeutically relevant concentrations for gap junction inhibition in the brain interstitium after systemic administration [28]. Considering the high concentrations of carbenoxolone of about 50–100  $\mu$ M that are needed in order to significantly impede intercellular communication via gap junctions in glioblastoma, measured concentrations of carbenoxolone of maximal 1  $\mu$ M in the brain tissue of rats are far from therapeutically

required. With regard to an impeded function of the blood–brain barrier induced by the tumor itself, carbenoxolone partly could yield sensitizing effects to TRAIL-induced apoptosis in murine models of glioblastoma [22]. However, today's requirements for sufficient additional strategies in glioblastoma therapy include the selection of drugs that harbor the capability to effectively penetrate the brain interstitium in order to reach areas with already consisting tumor infiltration, but absent blood–brain barrier impairment and contrast medium-absorbance in magnetic resonance-guided imaging. Therefore, there is a need for alternative pharmacological gap junction inhibitors that should allow for this capability. In the present study, INI-0602 as the first gap junction inhibitor optimized for crossing the blood–brain barrier that had been successfully used in murine models of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and Alzheimer's disease (AD) among others [16,29,30], was evaluated in a clinically relevant human oncological setting. Thereby, gap junction inhibition has been shown to significantly sensitize glioblastoma cells to temozolomide-mediated cell death. Compared with this, proliferation-inhibiting effects could only be detected in case of one primary glioblastoma population. On the molecular level, gap junction inhibition was associated with elevated activation of the JNK as well as the NF-kappaB signaling pathway.

Compared to a considerable number of reports that initially suggested connexins to primarily function as a tumor suppressor in several cancers like tumors of the thyroid, liver, and stomach, our results are consistent with recent evidence of connexins to rather promote tumorigenesis and cancer metastasis [31–33]. Along these lines, gap junctions have been implicated in the intra- and extra-vascular of melanoma cells through gap junction formation between tumor and endothelial cells [10]. Furthermore, connexin-43-mediated gap junction coupling has been linked to the capability of breast cancer cells to metastasize into the healthy brain tissue [34]. Recently, breast and lung cancer cells have been shown to use connexin-43-based gap junctions in order to induce a paracrine loop with surrounding cells via transfer of the second messenger cGAMP. As a result the STAT1 and NF-kappaB pathways were activated in tumor cells thereby facilitating tumor growth and chemotherapy resistance [13]. Compared with this, effects of gap junction inhibition on cancer cell proliferation still remain a pivotal issue to be addressed. Considering this, connexins have been implicated both in promoting and decreasing tumor cell proliferation capacity [14,35,36]. These apparently contradictory findings might partly be driven by differing connexin expression levels within a tumor's multicellular syncytium as well as reflect tumor microenvironmental disparities depending on the tumor entity studied [6,37,38]. In terms of glioblastoma biology pharmacological gap junction inhibition by carbenoxolone yielded additive effects on survival rates in temozolomide-treated orthotopic xenograft models in mice and a study of Munoz et al. could link resistance to standard chemotherapeutic agent temozolomide to intercellular connexin-43-mediated gap junction communication [27,39]. These findings support the idea of a connexin-43-based multicellular syncytium whereby glioblastoma cells might be protected from therapy-induced cytotoxic effects. Though the underlying molecular mechanisms are far from understood, recent studies could reveal pro-survival small noncoding RNA to be transferred via intercellular gap junctions resulting in increased resistance of brain metastatic lung cancer cells to chemotherapeutic agents [40,41]. Furthermore, gap junction inhibition might lead to a breakdown of intracellular homeostasis of gap junction-permeable small molecules such as  $Ca^{2+}$  thereby increasing the tumor cell's susceptibility to chemotherapeutic agents [15]. Current available data suggest this susceptibility to be reflected by an activation of the NF-kappaB pathway as well as the JNK signaling system on a molecular level [13,42]. In line with our results of the JNK pathway to constitute the most upregulated signaling cascade for the proposed novel gap-junction based treatment strategy, the oncogene c-Jun has been described as a pivotal player within the so-called 'Cx43 interactome' [37]. According to this, the JNK signaling system exhibits among the strongest confidence score prediction value among connexin-43 related pathway activation and might therefore reflect main molecular insights in microscopical visible treatment strategies of the inhibition of intercellular communication via gap junctions. In the current literature, JNK signaling is controversially discussed as both pro- and anti-tumorigenic [43,44]. Along these lines, loss of JNK1 or JNK2 has been

linked to elevated mammary tumor development, while impaired tumor cell proliferation and cancer development in hepatocellular carcinoma models, for example [45–48]. It appears that the balance between pro- and anti-apoptotic cellular signaling inputs finally determines the cells' commitment to proliferation or programmed cell death [44,49]. With regard to our findings of pAKT and pERK to be downregulated under gap junction inhibition (see Figure S5B), JNK might be activated as a cellular survival strategy by NfκB in order to compensate impeded AKT and ERK signaling. However it has to be mentioned critically, that affected pathway activation was identified by the use of a Reporter gene assay as well as a Proteome array. As mere screening methods validity may be limited by the initial selection of individual transcription factors examined that certainly cannot reflect the variety of transcription factors and protein kinases within a particular oncological signaling pathway, and therefore might lead to initial exclusion of affected signaling pathways with regard to subsequent examination. Further investigation will be needed to identify the exact underlying mechanisms of JNK signaling involvement in the case of gap junction inhibition in glioblastoma biology—among them, whether JNK might be activated as a cellular mechanism of response to or rather reflect a direct molecular consequence of the inhibition of gap junctions.

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Cell Culture and Lentiviral Transduction

After patients' informed consent was obtained, primary human glioblastoma stem cell-like cells were isolated by mechanical disaggregation from surgical specimens obtained from three patients with WHO IV glioma (G35, G38 and G40) as previously described [50]. The resulting primary suspension cell populations were cultured in DMEM/F-12 (HAM) medium (Gibco, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), supplemented with EGF (Biomol GmbH, Hamburg, Germany), FGF (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) and B27 (Gibco), and served as a stable cell pool [51]. Subsequently, suspension cells were provoked into differentiation by letting them adhere in a serum-enriched environment consisting of uncoated cell culture material in the presence of DMEM (Gibco), supplemented with 10% FCS (Gibco) and 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco). Differentiated cell populations were maintained for no more than twelve cell passages [51].

For the fluorescence and live imaging experiments, glioblastoma cells were transduced with lentiviral particles (rLV.EF1.ZsGreen1-9, Clontech, Mountain View, CA, USA). Briefly, suspension cells were seeded into petri dishes (Falcon, Corning Inc., Corning, NY, USA) with a density of  $5 \times 10^4$ /mL. After incubation overnight (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>), the medium was changed and a mixture of 5 μL Polybrene® (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) and 5 μL virus was added to the cells. Efficacy of transduction was measured after two days. Then medium containing lentiviral particles was discarded and cells were transferred into cell culture flasks (Falcon, Corning, Inc., Corning, NY, USA) containing normal growth medium.

##### 4.2. Fluorescence Microscopy

Differentiated glioblastoma cells were seeded in 24-well plates (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) with a density of 1500 cells/well, on glass coverslips (Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Germany). Cells were fixed with 4% paraformaldehyde at room temperature (RT) for 20 min. The cells were then permeabilized with 20% Methanol for 15 min. To block unspecific binding of antibody, cells were then incubated with 20% Bovine serum albumin (BSA) at RT for 60 min. Primary antibody mix (200 μL; rabbit polyclonal anti-connexin-43 (Sigma, St. Louis, MO, USA) and rabbit monoclonal β-tubulin (Cell signaling, Cambridge, UK), dilution 1:1000) was added to each coverslip containing wells and incubated at 37 °C for 60 min. Incubation with secondary antibodies (goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 647 (Sigma, St. Louis, MO, USA), dilution 1:1000) was performed at RT for 60 min. DAPI Fluoromount-G® mounting medium (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) was used for nuclei staining. Images were taken with the use of AX 70 microscope and processed with Zeiss Zen

software (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Germany). Fluorescence intensity was calculated as follows: integrated density—(Area of selected cells × mean fluorescence of background).

#### 4.3. IDH1 and IDH2 Mutation Analysis

DNA was extracted from glioblastoma cell lines using the QIAamp DNA Mini Kit according to the manufacturer's standard recommendations (Qiagen, Hilden, Germany). Somatic mutations at codon R132 (IDH1) and R172 (IDH2) were investigated by pyrosequencing as recently described (20). Briefly, IDH1 PCR amplification primers flanking the R132 mutation hotspot of IDH1 were: IDH1-fwd-5'-CACCATACGAAATATTCTGG-3' and IDH1-rev-biotin-5'-CAACATGAC TTACTTGATCC-3' that amplify 135 bp of genomic DNA. An 87 bp fragment from IDH2 containing the R172 coding region was amplified using the primer set IDH2-fwd-A-5'-AAACATCCCACGCCTAGTCC-3' and IDH2-rev-5'-biotin-TCTCCACCCTGGCCTACCT-3'. Single-stranded DNA templates were immobilized on streptavidin-coated Sepharose high-performance beads (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) using the PSQ Vacuum Prep Tool and Vacuum Prep Worktable (Biotage, Uppsala, Sweden) according to the manufacturer's instructions, then incubated at 80 °C for 2 min, and allowed to anneal to 0.4 mM sequencing primer IDH1-Py-5'-GTGAGTGGATGGGTTAAAACC-3' at room temperature. IDH2 R172 was sequenced using the pyrosequencing primer IDH2-Py-5'-AGCCCATCACCATG-3'. Pyrosequencing was performed using PyroGold Reagents (Biotage, Uppsala, Sweden) on the Pyromark Q24 instrument (Biotage, Uppsala, Sweden) according to the manufacturer's instructions. Pyrogram outputs were analyzed by the PyroMark Q24 software (Biotage, Uppsala, Sweden) using the allele quantification (AQ) software to determine the percentage of mutant versus wild-type alleles. As positive control a glioblastoma sample with confirmed IDH1 mutation or IDH2 mutation as well as negative controls were included.

#### 4.4. MGMT Promoter Methylation Sequencing

DNA (500 ng) was subjected to bisulfite conversion using the EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Bisulfite converted DNA was then analyzed using direct pyrosequencing as described [52]. Briefly, a 266 bp DNA fragment of the MGMT gene was amplified from bisulfite-treated DNA using primers MGMT-forward, 5'-biotin-GGATATGTTGGGATAGTT-3 and MGMT-reverse, 5'-AAACTAAACAACACCTAAA-3. Purification and subsequent processing of the biotinylated single strand DNA was done according to the manufacturer's instructions. Sequencing was performed on a Pyromark Q24 instrument (Biotage, Uppsala, Sweden) running the CpG assay software (Biotage, Uppsala, Sweden). The primer used for primer extension reaction was 5'-CCCAAACACTCACCAAA-3, which allows sensitive quantification of the methylation status of 8 individual CpG positions, 4 of which have been shown to allow excellent separation between methylated and unmethylated cases or age matched normal brain controls.

#### 4.5. Inhibitors and Drugs

Temozolomide (Sigma, St. Louis, MO, USA).

INI-0602 (Wako Pure Chemical Ind., Ltd., Japan).

#### 4.6. Determination of Cellular Metabolic Activity

Metabolic activity, as readout for cellular viability, was assessed using a MTT assay as previously described [18]. The tetrazolium dye 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) is reduced to a colored, water-insoluble, formazan by viable cells, which can be spectrophotometrically quantified. Therefore, cells were seeded in a 96-well plate (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) with a density of 1500 cells/well. After an incubation period of 24 h, the medium was replaced to contain various concentrations of temozolomide and INI-0602. At the defined measurement time points, the medium was replaced with Phenol red-free medium containing 1 mg/mL MTT salt (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) and cells were incubated for 3 h. The reaction was stopped by the



addition of Isopropanol and optical density was determined at 550 nm using the  $\mu$ Quant Spectrometer (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA).

#### 4.7. Cell Viability

Cell viability was assessed using Cell Counting Kit 8 (Abcam, Cambridge, UK). The method is based on the reduction of tetrazolium salt to an orange formazan, which can be detected colorimetrically. The amount of produced formazan is proportional to the number of cells alive. Briefly, cells were seeded in a 384-well plate with a density of 500 cells/well/100  $\mu$ L and treated 24 h afterwards. After 6 days, 5  $\mu$ L of the premixed water-soluble tetrazolium salt solution was added into each well. After incubation for 4 h, the absorbance was measured at 460 nm using a microplate reader (Tecan infinite M200, Zurich, Switzerland).

#### 4.8. Cell Confluence Measurement

Fluorescence images were taken every 120 min for 6 days using The IncuCyte<sup>®</sup> S3 Live-Cell Analysis System (Essen BioScience Inc., Ann Arbor, MI, USA). Briefly, cells were seeded on a 384-well plate (Greiner, Kremsmünster, Austria) with a density of 500 cells/well. After incubation for 24 h, cells were treated with either temozolomide, INI-0602, both or left untreated. The data obtained were processed using the device-specific software (IncuCyte 2019B) and cell confluence was determined.

#### 4.9. Flow Cytometric Analysis of Cell Death

DNA-fragmentation, as readout for cell death, was assessed by flow cytometric analysis (FACSCanto II, Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) of propidium iodide-stained nuclei as previously described [50]. Briefly, cells were seeded into 24-well plates with a density of 9000 cells/well. After incubation for 24 h, the medium was replaced to contain either temozolomide, INI-0602 or a combination of both. At indicated time points, the cells and medium were harvested and centrifuged (5 min, 1300 rpm), resuspended in buffer containing propidium iodide (Sigma, St. Louis, MO, USA) and Triton-X (Sigma, St. Louis, MO, USA), and incubated at 4 °C for 1 h. Each experiment was performed in triplicates and repeated independently three times. The obtained data was analyzed using FlowJo software Version 10.4 (Ashland, OR, USA). Specific DNA-fragmentation was calculated as follows:  $100 \times (\text{experimental DNA-fragmentation (\%)} - \text{spontaneous DNA-fragmentation (\%)}) / (100\% - \text{spontaneous DNA-fragmentation (\%)})$ .

#### 4.10. Cell Proliferation Measurement

Cell proliferation was quantified using a BrdU ELISA Kit (Roche, Basel, Switzerland). Briefly, cells were seeded in a 96-well plate with a density of 1,500 cells/well and treated with temozolomide, INI-0602 or both, subsequently. After culturing the cells for 144 h, BrdU labeling solution was added and the cells were reincubated for 2 h. Medium was removed, cells were fixed and DNA was denatured. Then, anti-BrdU-POD solution was added and cells were incubated for additional 1.5 h. A tetramethyl-benzidine solution was added and the BrdU incorporation was determined by measuring the absorbance at 370 and 492 nm.

#### 4.11. Reporter Gene Assay

The Cignal<sup>™</sup> Finder 45-Pathway Reporter Array (Qiagen, Hilden, Germany) was used to concurrently assess 45 different signaling pathways in glioblastoma cells. For this, cells were seeded into the Reporter Array 96-well plates and reverse transfected with the pathway reporter constructs using Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to manufacturers instructions. Each well of the pathway reporter array contained a mixture of an inducible transcription factor responsive construct and constitutively expressing Renilla luciferase construct. Briefly, reporter constructs, present in each plate well, were resuspended with 50  $\mu$ L Opti-MEM and then mixed with



50 µL diluted (1:100) transfection reagent. Cells were resuspended in Opti-MEM supplemented with 10% of fetal bovine serum and 1% non-essential amino acids (Gibco) at a density of 8e5 cells/mL. Then, 50 µL of the cell suspension was added into each well. After 24 h, the cells were treated as indicated with vehicle (normal growth medium), temozolomide, INI-0602, or both for a period of 3 days. Cells were then lysed and luciferase activities were measured using the Dual-Luciferase® Reporter Assay (Promega, Mannheim, Germany) according to manufacturer's instructions in a microplate luminometer (Berthold, Germany). Data were normalized for activity of Renilla luciferase to account for transfection efficiency.

#### 4.12. Proteome Array

The Human Phospho-Kinase Array (R&D systems, Wiesbaden, Germany) was used to assess the relative phosphorylation level of 43 different kinases in glioblastoma cells. Briefly, cells were seeded with a density of 1e5 cells/mL. After 24 h, cells were treated either with temozolomide, INI-0602 and both or left untreated. At the indicated time points, cell lysates were added to previously blocked nitrocellulose membranes containing 43 different antibodies in duplicate, and incubated overnight at 4 °C on a rocking platform shaker. After three washings steps (10 min each), membranes were incubated with detection antibody mix for 2 h, followed by washing steps (3×) to remove unbound proteins. Then Streptavidin-HRP was applied and incubated at RT for 30 min. Post washing (3×), chemiluminescent detection reagents were added and signal detection was performed using ChemoCam Imager (Intas, Göttingen, Germany). Densitometric quantification was performed using Fiji software Version 2.0 [53].

#### 4.13. Protein Immunoblotting

Western blot analysis was performed as previously described [50] using 50 µg of protein from each sample for separation by sodium dodecyl sulphate-gel electrophoresis and following antibodies: rabbit polyclonal anti-Phospho-JNK (Cell Signaling, Cambridge, UK), rabbit polyclonal anti-JNK (Cell Signaling), rabbit polyclonal anti-Cx43 (Sigma), and mouse anti-β-Actin (Sigma). Densitometric quantification and normalization to the corresponding beta-actin levels was performed using Fiji software.

#### 4.14. Statistical Analysis and Graphing

Statistical analysis was carried out by two-tailed Student's *t*-test or two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-test. Statistical significance was depicted as \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , unless stated otherwise. For graphic processing GraphPad Prism Version 6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) and RStudio software Version 1.1 (Boston, MA, USA) was used.

## 5. Conclusions

Inhibition of intercellular communication via gap junctions profoundly sensitizes primary glioblastoma cells to temozolomide-mediated cell death, thereby constituting a promising new therapeutic strategy for patients suffering from this disastrous and currently incurable cancer. Making use of the first gap junction inhibitor optimized for crossing the blood–brain barrier—thus constituting an auspicious drug for clinical applicability—these results may be of significant importance in the course of current translational research in the field of glioblastoma therapy.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/11/6/858/s1>, Figure S1: Characterization of primary human glioblastoma cell populations, Figure S2: Verification of connexin-43 expression in primary cell population, Figure S3: Determination of effective drug concentrations, Figure S4: The effects on glioblastoma cell viability, Figure S5: Screening for affected pathway-activation.

**Author Contributions:** Conceptualization: M.S., H.V., A.W. and M.-A.W.; methodology: F.R.A., S.P.B., A.D., B.O.E., D.H.H., K.J., A.-L.P. and M.S.; software: A.D., D.H.H., K.J. and A.-L.P.; validation: D.H.H., A.-L.P., M.S., H.V., A.W. and M.-A.W.; formal analysis: F.R.A., B.O.E., D.H.H., U.H., K.J., M.S., H.V., A.-L.P. and A.W.; investigation: M.S.; resources: M.S.; data curation: B.O.E., D.H.H., A.-L.P. and M.S.; writing—original draft

preparation: D.H.H., A.-L.P., M.S. and A.W.; writing—review and editing: Á.G., E.G., T.P., M.S., P.S., H.V. and A.W.; visualization: D.H.H., A.-L.P. and M.S.; supervision: U.H., H.V., A.W. and M.-A.W.; project administration: M.S.; funding acquisition: M.S.

**Funding:** This research was funded by the ‘Familie Mehdorn Stiftung’.

**Acknowledgments:** The authors would like to thank Pia Stausberg for expert technical assistance, as well as Annika Dwucet and Andrea Schuster for instant technical advice. Furthermore, the authors are grateful for the financial support of the ‘Familie Mehdorn Stiftung’.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Preusser, M.; de Ribaupierre, S.; Wohrer, A.; Erridge, S.C.; Hegi, M.; Weller, M.; Stupp, R. Current concepts and management of glioblastoma. *Ann. Neurol.* **2011**, *70*, 9–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Stummer, W.; Meinel, T.; Ewelt, C.; Martus, P.; Jakobs, O.; Felsberg, J.; Reifenberger, G. Prospective cohort study of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide chemotherapy for glioblastoma patients with no or minimal residual enhancing tumor load after surgery. *J. Neuro-Oncol.* **2012**, *108*, 89–97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Aldape, K.; Zadeh, G.; Mansouri, S.; Reifenberger, G.; von Deimling, A. Glioblastoma: Pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol.* **2015**, *129*, 829–848. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Broekman, M.L.; Maas, S.L.N.; Abels, E.R.; Mempel, T.R.; Krichevsky, A.M.; Breakefield, X.O. Multidimensional communication in the microenvirons of glioblastoma. *Nat. Rev. Neurol.* **2018**, *14*, 482–495. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Giese, A.; Bjerkvig, R.; Berens, M.E.; Westphal, M. Cost of migration: Invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *J. Clin. Oncol.* **2003**, *21*, 1624–1636. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Sinyuk, M.; Mulkearns-Hubert, E.E.; Reizes, O.; Lathia, J. Cancer Connectors: Connexins, Gap Junctions, and Communication. *Front. Oncol.* **2018**, *8*, 646. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Lim, P.K.; Bliss, S.A.; Patel, S.A.; Tabora, M.; Dave, M.A.; Gregory, L.A.; Greco, S.J.; Bryan, M.; Patel, P.S.; Rameshwar, P. Gap junction-mediated import of microRNA from bone marrow stromal cells can elicit cell cycle quiescence in breast cancer cells. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 1550–1560. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Kar, R.; Batra, N.; Riquelme, M.A.; Jiang, J.X. Biological role of connexin intercellular channels and hemichannels. *Arch. Biochem. Biophys.* **2012**, *524*, 2–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Laird, D.W. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem. J.* **2006**, *394*, 527–543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Ito, A.; Katoh, F.; Kataoka, T.R.; Okada, M.; Tsubota, N.; Asada, H.; Yoshikawa, K.; Maeda, S.; Kitamura, Y.; Yamasaki, H.; et al. A role for heterologous gap junctions between melanoma and endothelial cells in metastasis. *J. Clin. Investig.* **2000**, *105*, 1189–1197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Pollmann, M.A.; Shao, Q.; Laird, D.W.; Sandig, M. Connexin 43 mediated gap junctional communication enhances breast tumor cell diapedesis in culture. *Breast Cancer Res.* **2005**, *7*, R522–R534. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Saito-Katsuragi, M.; Asada, H.; Niizeki, H.; Katoh, F.; Masuzawa, M.; Tsutsumi, M.; Kuniyasu, H.; Ito, A.; Nojima, H.; Miyagawa, S. Role for connexin 26 in metastasis of human malignant melanoma: Communication between melanoma and endothelial cells via connexin 26. *Cancer* **2007**, *110*, 1162–1172. [[CrossRef](#)]
13. Chen, Q.; Boire, A.; Jin, X.; Valiente, M.; Er, E.E.; Lopez-Soto, A.; Jacob, L.; Patwa, R.; Shah, H.; Xu, K.; et al. Carcinoma-astrocyte gap junctions promote brain metastasis by cGAMP transfer. *Nature* **2016**, *533*, 493–498. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Osswald, M.; Jung, E.; Sahm, F.; Solecki, G.; Venkataramani, V.; Blaes, J.; Weil, S.; Horstmann, H.; Wiestler, B.; Syed, M.; et al. Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network. *Nature* **2015**, *528*, 93–98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Weil, S.; Osswald, M.; Solecki, G.; Grosch, J.; Jung, E.; Lemke, D.; Ratliff, M.; Hanggi, D.; Wick, W.; Winkler, F. Tumor microtubules convey resistance to surgical lesions and chemotherapy in gliomas. *Neuro-Oncology* **2017**, *19*, 1316–1326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Takeuchi, H.; Mizoguchi, H.; Doi, Y.; Jin, S.; Noda, M.; Liang, J.; Li, H.; Zhou, Y.; Mori, R.; Yasuoka, S.; et al. Blockade of gap junction hemichannel suppresses disease progression in mouse models of amyotrophic lateral sclerosis and Alzheimer’s disease. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e21108. [[CrossRef](#)]

17. Nonnenmacher, L.; Westhoff, M.A.; Fulda, S.; Karpel-Massler, G.; Halatsch, M.E.; Engelke, J.; Simmet, T.; Corbacioglu, S.; Debatin, K.M. RIST: A potent new combination therapy for glioblastoma. *Int. J. Cancer* **2015**, *136*, E173–E187. [[CrossRef](#)]
18. Strobele, S.; Schneider, M.; Schneele, L.; Siegelin, M.D.; Nonnenmacher, L.; Zhou, S.; Karpel-Massler, G.; Westhoff, M.A.; Halatsch, M.E.; Debatin, K.M. A Potential Role for the Inhibition of PI3K Signaling in Glioblastoma Therapy. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0131670. [[CrossRef](#)]
19. Portnow, J.; Badie, B.; Chen, M.; Liu, A.; Blanchard, S.; Synold, T.W. The neuropharmacokinetics of temozolomide in patients with resectable brain tumors: Potential implications for the current approach to chemoradiation. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 7092–7098. [[CrossRef](#)]
20. Soroceanu, L.; Manning, T.J., Jr.; Sontheimer, H. Reduced expression of connexin-43 and functional gap junction coupling in human gliomas. *Glia* **2001**, *33*, 107–117. [[CrossRef](#)]
21. Pu, P.; Xia, Z.; Yu, S.; Huang, Q. Altered expression of Cx43 in astrocytic tumors. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **2004**, *107*, 49–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Yulyana, Y.; Endaya, B.B.; Ng, W.H.; Guo, C.M.; Hui, K.M.; Lam, P.Y.; Ho, I.A. 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. [[CrossRef](#)]
23. Westhoff, M.A.; Zhou, S.; Bachem, M.G.; Debatin, K.M.; Fulda, S. Identification of a novel switch in the dominant forms of cell adhesion-mediated drug resistance in glioblastoma cells. *Oncogene* **2008**, *27*, 5169–5181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Sin, W.C.; Crespin, S.; Mesnil, M. Opposing roles of connexin43 in glioma progression. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1818*, 2058–2067. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Murphy, S.F.; Varghese, R.T.; Lamouille, S.; Guo, S.; Pridham, K.J.; Kanabur, P.; Osimani, A.M.; Sharma, S.; Jourdan, J.; Rodgers, C.M.; et al. Connexin 43 Inhibition Sensitizes Chemoresistant Glioblastoma Cells to Temozolomide. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 139–149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Mettang, M.; Meyer-Pannwitt, V.; Karpel-Massler, G.; Zhou, S.; Carragher, N.O.; Fohr, K.J.; Baumann, B.; Nonnenmacher, L.; Enzenmuller, S.; Dahlhaus, M.; et al. Blocking distinct interactions between Glioblastoma cells and their tissue microenvironment: A novel multi-targeted therapeutic approach. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 5527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Hitomi, M.; Deleyrolle, L.P.; Mulkearns-Hubert, E.E.; Jarrar, A.; Li, M.; Sinyuk, M.; Otvos, B.; Brunet, S.; Flavahan, W.A.; Hubert, C.G.; et al. Differential connexin function enhances self-renewal in glioblastoma. *Cell Rep.* **2015**, *11*, 1031–1042. [[CrossRef](#)]
28. Leshchenko, Y.; Likhodii, S.; Yue, W.; Burnham, W.M.; Velazquez, J.L.P. Carbenoxolone does not cross the blood brain barrier: An HPLC study. *BMC Neurosci.* **2006**, *7*, 3. [[CrossRef](#)]
29. Umebayashi, D.; Natsume, A.; Takeuchi, H.; Hara, M.; Nishimura, Y.; Fukuyama, R.; Sumiyoshi, N.; Wakabayashi, T. Blockade of gap junction hemichannel protects secondary spinal cord injury from activated microglia-mediated glutamate excitotoxicity. *J. Neurotrauma* **2014**, *31*, 1967–1974. [[CrossRef](#)]
30. Sasaki, T.; Numano, R.; Yokota-Hashimoto, H.; Matsui, S.; Kimura, N.; Takeuchi, H.; Kitamura, T. A central-acting connexin inhibitor, INI-0602, prevents high-fat diet-induced feeding pattern disturbances and obesity in mice. *Mol. Brain* **2018**, *11*, 28. [[CrossRef](#)]
31. Loewenstein, W.R.; Kanno, Y. Intercellular communication and tissue growth. I. Cancerous growth. *J. Cell Biol.* **1967**, *33*, 225–234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Jamakosmanovic, A.; Loewenstein, W.R. Intercellular communication and tissue growth. 3. Thyroid cancer. *J. Cell Biol.* **1968**, *38*, 556–561. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Kanno, Y.; Matsui, Y. Cellular uncoupling in cancerous stomach epithelium. *Nature* **1968**, *218*, 775–776. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Stoletov, K.; Strnad, J.; Zardoujian, E.; Momiyama, M.; Park, F.D.; Kelber, J.A.; Pizzo, D.P.; Hoffman, R.; VandenBerg, S.R.; Klemke, R.L. Role of connexins in metastatic breast cancer and melanoma brain colonization. *J. Cell Sci.* **2013**, *126*, 904–913. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Yu, S.C.; Xiao, H.L.; Jiang, X.F.; Wang, Q.L.; Li, Y.; Yang, X.J.; Ping, Y.F.; Duan, J.J.; Jiang, J.Y.; Ye, X.Z.; et al. Connexin 43 reverses malignant phenotypes of glioma stem cells by modulating E-cadherin. *Stem Cells* **2012**, *30*, 108–120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

36. Momiyama, M.; Omori, Y.; Ishizaki, Y.; Nishikawa, Y.; Tokairin, T.; Ogawa, J.; Enomoto, K. Connexin26-mediated gap junctional communication reverses the malignant phenotype of MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Sci.* **2003**, *94*, 501–507. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Aasen, T.; Mesnil, M.; Naus, C.C.; Lampe, P.D.; Laird, D.W. Gap junctions and cancer: Communicating for 50 years. *Nat. Rev. Cancer* **2016**, *16*, 775–788. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Aasen, T.; Leithe, E.; Graham, S.V.; Kameritsch, P.; Mayan, M.D.; Mesnil, M.; Pogoda, K.; Tabernero, A. Connexins in cancer: Bridging the gap to the clinic. *Oncogene* **2019**, *38*, 4429–4451. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Munoz, J.L.; Rodriguez-Cruz, V.; Greco, S.J.; Ramkissoon, S.H.; Ligon, K.L.; 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. 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. [[CrossRef](#)]
41. Zong, L.; Zhu, Y.; Liang, R.; Zhao, H.B. Gap junction mediated miRNA intercellular transfer and gene regulation: A novel mechanism for intercellular genetic communication. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 19884. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Westhoff, M.A.; Zhou, S.; Nonnenmacher, L.; Karpel-Massler, G.; Jennewein, C.; Schneider, M.; Halatsch, M.E.; Carragher, N.O.; Baumann, B.; Krause, A.; et al. Inhibition of NF-kappaB signaling ablates the invasive phenotype of glioblastoma. *Mol. Cancer Res.* **2013**, *11*, 1611–1623. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Ebel, N.D.; Cantrell, M.A.; Van Den Berg, C.L. c-Jun N-Terminal Kinases Mediate a Wide Range of Targets in the Metastatic Cascade. *Genes Cancer* **2013**, *4*, 378–387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Dhanasekaran, D.N.; Reddy, E.P. JNK-signaling: A multiplexing hub in programmed cell death. *Genes Cancer* **2017**, *8*, 682–694. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Cellurale, C.; Weston, C.R.; Reilly, J.; Garlick, D.S.; Jerry, D.J.; Sluss, H.K.; Davis, R.J. Role of JNK in a Trp53-dependent mouse model of breast cancer. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e12469. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Cellurale, C.; Girmius, N.; Jiang, F.; Cavanagh-Kyros, J.; Lu, S.; Garlick, D.S.; Mercurio, A.M.; Davis, R.J. Role of JNK in mammary gland development and breast cancer. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 472–481. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Sakurai, T.; Maeda, S.; Chang, L.; Karin, M. Loss of hepatic NF-kappa B activity enhances chemical hepatocarcinogenesis through sustained c-Jun N-terminal kinase 1 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 10544–10551. [[CrossRef](#)]
48. Das, M.; Garlick, D.S.; Greiner, D.L.; Davis, R.J. The role of JNK in the development of hepatocellular carcinoma. *Genes Dev.* **2011**, *25*, 634–645. [[CrossRef](#)]
49. Liu, J.; Lin, A. Role of JNK activation in apoptosis: A double-edged sword. *Cell Res.* **2005**, *15*, 36–42. [[CrossRef](#)]
50. Schneider, M.; Strobele, S.; Nonnenmacher, L.; Siegelin, M.D.; Tepper, M.; Stroth, S.; Hasslacher, S.; Enzenmuller, S.; Strauss, G.; Baumann, B.; et al. A paired comparison between glioblastoma “stem cells” and differentiated cells. *Int. J. Cancer* **2016**, *138*, 1709–1718. [[CrossRef](#)]
51. De Witt Hamer, P.C.; Van Tilborg, A.A.; Eijk, P.P.; Sminia, P.; Troost, D.; Van Noorden, C.J.; Ylstra, B.; Leenstra, S. The genomic profile of human malignant glioma is altered early in primary cell culture and preserved in spheroids. *Oncogene* **2008**, *27*, 2091–2096. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Mikeska, T.; Bock, C.; El-Maarri, O.; Hubner, A.; Ehrentraut, D.; Schramm, J.; Felsberg, J.; Kahl, P.; Buttner, R.; Pietsch, T.; et al. Optimization of quantitative MGMT promoter methylation analysis using pyrosequencing and combined bisulfite restriction analysis. *J. Mol. Diagn.* **2007**, *9*, 368–381. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 676–682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

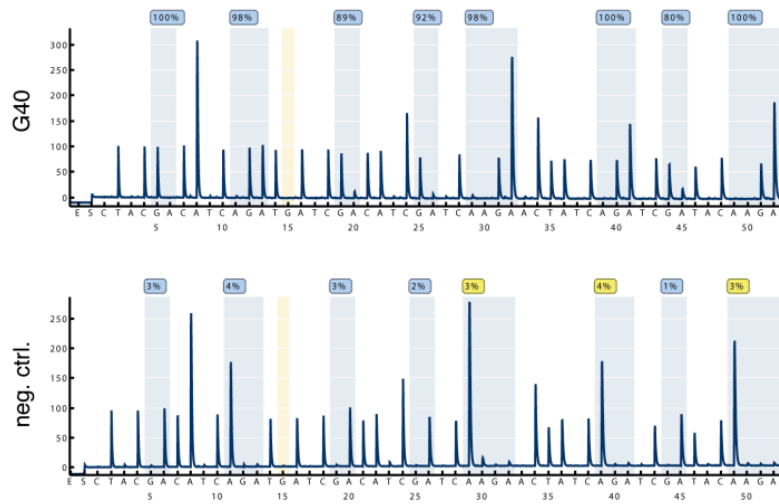


Supplementary Materials

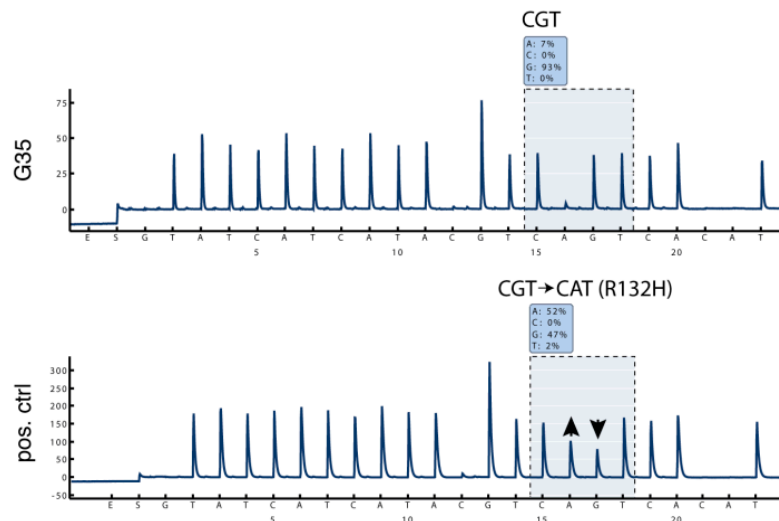
## Inhibition of Gap Junctions Sensitizes Primary Glioblastoma Cells for Temozolomide

Anna-Laura Potthoff, Dieter Henrik Heiland, Bernd O. Evert, Filipe Rodrigues Almeida, Simon Behringer, Andreas Dolf, Ági Güresir, Erdem Güresir, Ulrich Herrlinger, Kevin Joseph, Torsten Pietsch, Patrick Schuss, Mike-Andrew Westhoff, Hartmut Vatter, Andreas Waha and Matthias Schneider

**A**

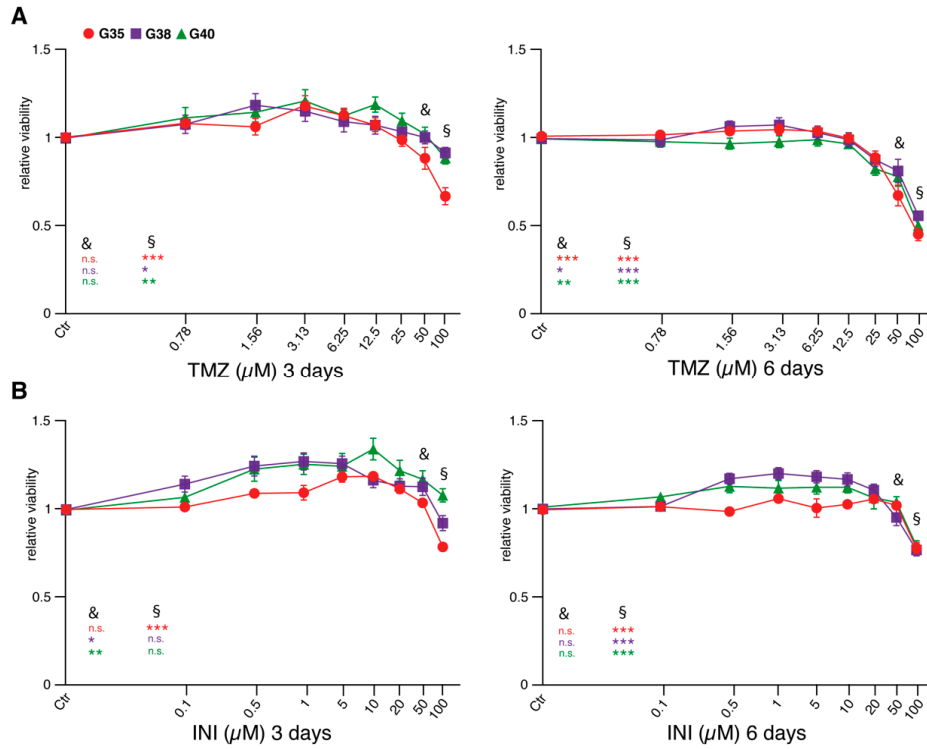


**B**

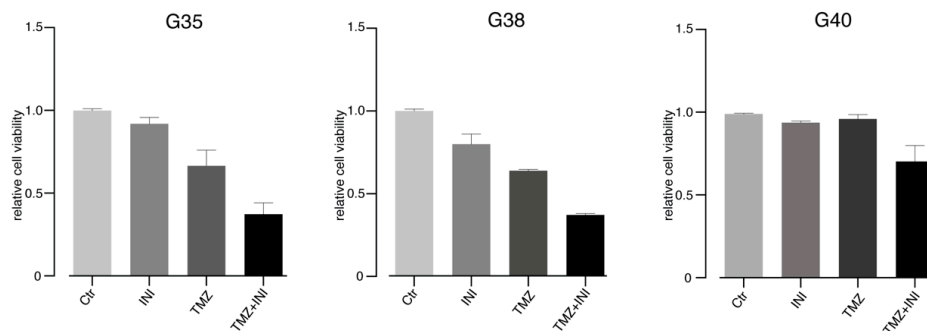




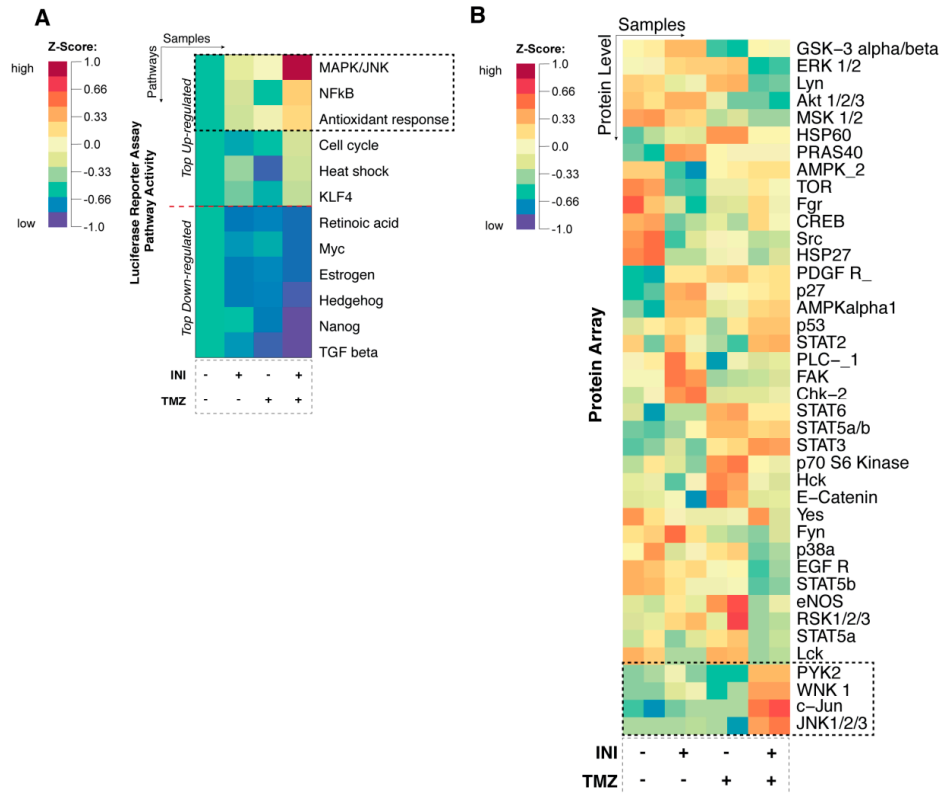
control. Positive connexin-43 expression could also be detected in case of primary suspension cell populations, whereof differentiated glioblastoma cells were derived from for short term expansion. G, glioblastoma; Cx43, connexin-43.



**Figure S3.** Determination of effective drug concentrations. Results of the MTT assay: Differentiated glioblastoma cells were treated with various concentrations of (A) TMZ and (B) INI. Cell viability was assessed 72 and 144 hrs after treatment. Untreated controls were defined as 100%. Mean of relative cell viability of three independent experiments performed in triplicates are depicted. Error bars show SEM. Ctr, control; G, glioblastoma; TMZ, temozolomide.



**Figure S4.** The effects on glioblastoma cell viability. Treatment was performed using 50  $\mu\text{M}$  TMZ, 100  $\mu\text{M}$  INI or combination of both. Reduction of tetrazolium salt to formazan as surrogate readout for cell proliferation was determined colorimetrically 144 hrs after treatment. Untreated controls were defined as 100%. Mean  $\pm$  SEM is depicted. Ctr, control; G, glioblastoma; TMZ, temozolomide.



**Figure S5.** Screening for affected pathway-activation. (A) Gene expression heatmap of Cignal™ Finder 45-pathway Reporter Gene Array: Treatment was performed using 50  $\mu$ M TMZ, 100  $\mu$ M INI or combination of both. Activity of firefly and Renilla luciferases were measured 72 h after treatment. Data was normalized for activity of Renilla luciferase to account for transfection efficiency. Experiments were performed in duplicates. Results are shown for G35 cell population. (B) Heatmap of Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array: Cells were treated with 50  $\mu$ M TMZ, 100  $\mu$ M INI or combination of both. Top upregulated transcription factors and protein kinases are depicted. Results are shown for cell population G35. TMZ, temozolomide.





### 3. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die bei der Entstehung dieser Arbeit beteiligt waren und ohne deren Hilfe diese Dissertation niemals zustande gekommen wäre.

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Hartmut Vatter, für die Ermöglichung dieses Projektes und die Betreuung dieser Arbeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Matthias Schneider, dessen Begeisterung für Forschung und Wissenschaft mich von Beginn an motiviert hat. Die Zusammenarbeit war stets geprägt von wertvollem wissenschaftlichem Austausch und gegenseitiger Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Andreas Waha danke ich für den konstruktiven Austausch, die wissenschaftliche Betreuung und die große Hilfsbereitschaft.

Darüber hinaus möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn PD Dr. Bernd Evert bedanken, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und mich immer bestärkt und ermutigt hat.

Ein weiteres großes Dankeschön gilt Herrn PD Dr. Dieter Henrik Heiland, der mich insgesamt drei Monate in seiner Arbeitsgruppe aufgenommen, und mich zudem in das Programmieren mit R und in den Umgang mit Illustrator eingeführt hat.

Bei Herrn Prof. Dr. Torsten Pietsch möchte ich mich für die Mitbenutzung seiner Laborräume und bei Verena Dreschmann, Anja zur Mühlen und Evelyn Dörner für die geduldige Einweisung in das Labor und die zügige und wertvolle Unterstützung bei praktischen Fragen bedanken.

Schließlich gebührt ein großer Dank meiner Mutter und meinen Freunden für die immerwährende Unterstützung und Motivation in dieser arbeitsreichen und bewegten Zeit.