



**Entwicklung neuer Techniken zur Identifizierung und
Antagonisierung klonaler Therapieresistenzen bei malignen
Gliomen am Beispiel der gezielten Therapie des
Serinsyntheseweges**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

**Im Fachbereich Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften**

Vorgelegt von

Krystian Daniel Fita

Hamburg, 2021

Begutachtung der Dissertation:

Prof. Dr. Julia Kehr

Universität Hamburg

Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Fachbereich Biologie

Institut für Pflanzenwissenschaften und Mikrobiologie

Abteilung Molekulare Pflanzengenetik

Prof. Dr. Katrin Lamszus

Universtitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Kopf- und Neurozentrum

Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie

Labor für Hirntumorbiologie

Datum der Disputation: 29.09.2021

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung	1
Abstract	3
1 Einleitung	5
1.1 Tumore des zentralen Nervensystems	5
1.1.1 Histologische und Molekulare Klassifizierung von diffusen Gliomen	7
1.1.2 Glioblastome	8
1.1.2.1 Molekularpathologie und Subklassifizierung von Glioblastomen	8
1.1.3 Funktion von <i>IDH</i> -Mutationen in Gliomen	10
1.1.4 Therapien und Therapieresistenzen bei Glioblastomen	11
1.2 Der Serinsyntheseweg als Target der gezielten Therapie von Tumoren	16
1.2.1 Beteiligung von Serin an zellulären Prozessen	17
1.2.2 Bedeutung der Serinsynthese bei Tumoren	18
1.2.3 PHGDH als therapeutisches Target	19
1.3 Tumorheterogenität und klonale Therapieresistenzen	21
1.3.1 Intratumorale Heterogenität als Ursache für Therapieresistenzen bei Tumoren	21
1.3.2 Klonale Therapieresistenzen bei Tumoren	22
1.3.3 Methoden zur Erforschung intratumoraler Heterogenität <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	24
1.4 Zielsetzung	30
2 Methoden	31
2.1 Zellkultur	31
2.1.1 Zelllinien	31
2.1.2 Kultivierung und Passagierung	32
2.1.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	32
2.1.4 Zellzahlbestimmung	32
2.2 Proteinbiochemische Methoden	33
2.2.1 Proteinextraktion aus Zellen und Bestimmung der Proteinkonzentration	33
2.2.2 SDS PAGE	33
2.2.3 Immunoblotting (Western Blotting)	33
2.3 Durchflusszytometrie und FACS	34
2.3.1 Durchflusszytometrie	34
2.3.2 Zellsortierung per FACS (fluoreszenzaktivierte Zellsortierung)	34
2.4 Molekularbiologische Methoden	35
2.4.1 Plasmidpräparation von shRNA-Vektoren aus <i>E. coli</i>	35
2.4.2 Sequenzierung eines <i>IDH1</i> -Genabschnittes zur Feststellung des <i>IDH1</i> -Mutationsstatus	35
2.4.3 Genomweite DNA-Methylierungsanalyse	36
2.5 Zellbiologische Methoden	36
2.5.1 Messung von Dosis-Wirkungs-Kurven der PHGDH-Inhibitoren NCT-503 und CBR-5884	36
2.5.2 Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in lebenden Zellen	37
2.5.3 Untersuchung des Einflusses von GSH, NAC, dm- α KG und L-Serin auf den wachstumshemmenden Effekt von NCT-503 und CBR-5884	37
2.5.4 Generierung eines PHGDH- und PSAT1-Knock-Downs bei NCH644-Zellen	37

2.5.5	RGB-Markierung von Gliomzelllinien	38
2.6	Tierexperimentelle Methoden.....	39
2.6.1	<i>In vivo</i> -Injektion von Tumorzellen	39
2.6.2	Implantation von Führungsschrauben (Guide Screws) zur täglichen lokalen Injektion von Wirkstoffen in das Caudatum/Putamen	40
2.6.3	Lokale Applikation von NCT-503/Vehikellösung durch Guide Screws	40
2.6.4	Bestimmung der Tumorumfänge von NCH1681-Xenograft-Tumoren	40
2.7	Histologische Untersuchungen	41
2.7.1	Anfertigung von Mikrotomschnitten für histologische Untersuchungen	41
2.7.2	Entparaffinieren von Gewebeschnitten	41
2.7.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	41
2.7.4	Immunhistochemische Färbungen.....	41
2.8	Bioinformatische Methoden.....	42
2.8.1	Bestimmung von EC ₅₀ -Werten von Dosis-Wirkungs-Kurven	42
2.8.2	Erstellung von genomischen Methylierungsprofilen aus 450K und EPIC Methylierungsarrays	42
2.8.3	Generierung von CNV-Profilen aus genomweiten DNA-Methylierungsprofilen.....	43
2.8.4	Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis, PCA)	44
2.8.5	t-verteilte stochastische Nachbareinbettung (t-distributed Stochastic Neighbor Embedding, tSNE).....	44
2.8.6	Erstellung von Pearson-Korrelationsmatrizen	45
2.8.7	Programmierung einer Software zur Analyse von RGB-markierten Tumorzellen (<i>ChromoClone</i>)	45
3	Ergebnisse	46
3.1	Charakterisierung verwendeter Gliomzelllinien	46
3.1.1	Klassifizierung der Gliomzelllinien auf Basis von Methylierungsarrays	46
3.1.2	Verifizierung des IDH1-Mutationsstatus und der Heterozygotie der Mutation bei IDH1-mutierten Gliomzelllinien....	49
3.1.3	Wachstumsverhalten der verwendeten Gliomzelllinien <i>in vitro</i>	50
3.1.4	Quantifizierung von Schlüsselenzymen des Serinsyntheseweges	50
3.2	Auswirkungen der gezielten PHGDH-Inhibition auf Gliomzellen.....	52
3.2.1	Auswirkungen der Inhibition des Serinsyntheseweges durch NCT-503 und CBR-5884 auf die Proliferation von Gliomzellen	52
3.2.2	Auswirkungen der PHGDH-Inhibition durch NCT-503 und CBR-5884 auf die Expression von PHGDH, PSAT1 und SLC1A4.....	55
3.2.3	Auswirkungen der Serinsynthese-Inhibition durch shRNA-vermittelten <i>PHGDH</i> - und <i>PSAT1</i> -Knock-Down.....	56
3.2.4	Einfluss der ROS-Scavenger N-Acetylcystein (NAC) und Glutathion (GSH) sowie des Metaboliten α KG auf den wachstumshemmenden Effekt von NCT-503 und CBR-5884.....	58
3.2.5	Einfluss der NCT-503- und CBR-5884-vermittelten PHGDH-Inhibition auf die ROS-Bildung in Gliomzellen	62
3.2.6	Wirkung von NCT-503 auf Gliomzellen <i>in vivo</i> (Xenograft-Modell).....	65
3.3	Entwicklung und Testung neuer Verfahren und Metriken zur Erforschung intratumoraler Tumorerheterogenität und klonaler Therapieresistenzen bei Glioblastomen.....	67
3.3.1	Veränderung der klonalen Dynamik von Gliomzellpopulationen während des Tumorwachstums <i>in vivo</i>	67
3.3.2	Entwicklung und Programmierung der <i>ChromoClone</i> -FACS-Analysesoftware zur Visualisierung und Quantifizierung klonaler Heterogenität in RGB-markierten Zellpopulationen	70
3.3.3	Visualisierung klonaler Farbverteilungen durch sphärische Scatterplots	72
3.3.3.1	Punktdichte-Farbgebung.....	75
3.3.4	Entwicklung einer Methode zur automatischen Hintergrundreduzierung zur effizienten Identifikation und Abgrenzung einzelner Klone	76
3.3.5	Entwicklung der Chromatizitäts-Metrik zur Quantifizierung von Tumorerheterogenität und klonaler Restriktion	77
3.3.5.1	Berechnung der Chromatizität – Vektorbasierte Methode	77
3.3.5.2	Berechnung der Chromatizität – Rasterbasierte Methode	79
3.3.5.3	Vergleich der vektorbasierten und rasterbasierten Chromatizitätsberechnung	80
3.3.5.4	Optimierung des Radius r_{10k} zur Chromatizitätsberechnung	81
3.3.5.5	Berechnung von Chromatizitätswerten in biologischen Datensätzen.....	82

3.3.5.6	Quantifizierung der klonalen Restriktion während des Wachstums RGB-markierter Xenograft-Tumore mittels Chromatizitätswerten	84
3.3.6	Verwendung der ChromoClone-Software zur Untersuchung der Wirkung des Immunsystems auf die klonalen Wachstumsdynamiken bei Gliomen <i>in vivo</i>	85
3.3.7	Verfahren zur Quantifizierung und Charakterisierung von Einzelklonen.....	87
3.3.7.1	Identifikation und Quantifizierung von Klonen durch hierarchisches Clustering	87
3.3.7.2	Einführung von Metriken zur Charakterisierung RGB-markierter Zellklone: Chromatische Streuung und chromatische Dimensionen	87
3.3.8	Entwicklung und Testung eines Verfahrens zur Isolation einzelner Klone aus multiklonalen Zellpopulationen	89
3.3.9	Untersuchungen zur Koordinatenechtheit RGB-markierter Zellklone	92
3.4	Testung eines Verfahrens zur Untersuchung klonaler Therapieresistenzen anhand der Identifizierung, Isolierung und Analyse NCT-503- und CBR-5884-resistenter Gliomzellklone	94
3.4.1	RGB-Markierung von Gliomzellen und Verifizierung der Farbverteilung	94
3.4.2	Analyse der klonalen Dynamiken während der Behandlung RGB-markierter Gliomzelllinien mit NCT-503 und CBR-5884	95
3.4.2.1	Auswirkung der PHGDH-Inhibitoren NCT-503 und CBR-5884 auf die klonale Dynamik RGB-markierter NCH1681-Zellpopulationen.....	95
3.4.2.2	Auswirkung der PHGDH-Inhibitoren NCT-503 und CBR-5884 auf die klonale Dynamik RGB-markierter NCH644-Zellpopulationen.....	98
3.4.2.3	Fazit zu 3.4.2.1. und 3.4.2.2.	98
3.4.3	Isolierung potenziell resistenter Zellklone zur Untersuchung ihrer Sensitivität gegenüber NCT-503 und CBR-5884.. ..	100
3.4.3.1	Isolation potenziell behandlungsresistenter oder -sensitiver NCH1681-Klone	100
3.4.3.2	Isolierung potenziell behandlungsresistenter NCH644-Klone	104
3.4.3.3	Fazit zu 3.4.3.1 und 3.4.3.2	104
3.4.4	Untersuchung isolierter Zellklone auf ihre Sensitivität gegenüber NCT-503 und CBR-5884, sowie auf den Gehalt von Schlüsselproteinen der zellulären Serinversorgung	107
3.4.4.1	Analyse potenziell behandlungsresistenter NCH1681-Klone	107
3.4.4.2	Analyse potenziell behandlungsresistenter NCH644-Klone	110
3.5	Entwicklung und Testung eines Verfahrens zur prospektiven Analyse definierter Zellklone.....	112
3.5.1	Herstellung von RGB-Oligoklonen zur effizienten quantitativen Generierung differenzierbarer Zellklone	112
3.5.2	Simultane Analyse der Sensitivitäten verschiedener Klone eines RGB-Oligoklons gegenüber NCT-503 und CBR-5884	112
4	Diskussion.....	115
4.1	Einfluss der PHGDH-Inhibition auf das Wachstum von Gliomzellen.....	116
4.1.1	Wachstumshemmende Wirkung von NCT-503 und CBR-5884 auf Gliomzellen	116
4.1.2	Veränderung der Expression von PHGDH, PSAT1 und SLC1A4 durch die PHGDH-Inhibition mit NCT-503 und CBR-5884	119
4.1.3	Effekt des Knock-Downs von PHGDH und PSAT1 auf NCH644-Zellen.....	121
4.1.4	Untersuchungen zum Wirkmechanismus von NCT-503 und CBR-5884.....	121
4.1.4.1	Untersuchungen zur Wiederherstellung des Wachstums PHGDH-inhibierter Gliomzellen durch Komplementierung möglicher metabolischer Vulnerabilitäten.....	121
4.1.4.2	Untersuchung der ROS-Induktion durch NCT-503 und CBR-5884	123
4.1.5	Wirkung von NCT-503 auf Xenograft-Gliome <i>in vivo</i>	125
4.2	Entwicklung und Testung neuer Verfahren und Metriken zur Erforschung der Tumorerogenität und klonaler Therapieresistenzen bei Glioblastomen	127
4.2.1	Entwicklung neuer Analyseverfahren und sowie der ChromoClone-Software zur durchflusszytometrischen Untersuchung klonaler Dynamiken bei RGB-markierten Zellpopulationen.....	127
4.2.2	Auswirkungen des <i>in vivo</i> -Wachstums auf die klonale Zusammensetzung von Glioblastomzellpopulationen	128
4.3	Identifizierung, Isolation und Analyse NCT-503- und CBR-5884-resistenter Gliomzellklone.....	131
4.3.1	Auswirkungen der NCT-503- und CBR-5884-vermittelten PHGDH-Inhibition auf die klonale Farbverteilung RGB-markierter Gliomzellen	131

4.3.2	Isolierung und Untersuchung von NCH1681- und NCH644-Zellklonen	132
4.4	Entwicklung und Testung eines Screeningverfahrens zur prospektiven Analyse definierter Zellklone	134
4.5	Ausblick.....	135
5	Anhang	136
5.1	Western Blots	136
5.2	Materialien	137
5.2.1	Chemikalien	137
5.2.2	Laborgeräte.....	138
5.2.3	Plasmide.....	139
5.2.4	Puffer	139
5.2.5	Kits	140
5.2.6	Antikörper	140
5.2.7	Verbrauchsmaterial	140
5.2.8	Zellkultur.....	141
5.2.8.1	Zelllinien	141
5.2.8.2	Zellkulturmedien und -agenzien	141
5.3	Skripte.....	142
5.3.1	Skript zur Errechnung der EC ₅₀ -Werte aus Dosis-Wirkungs-Experimenten mit NCT-503 und CBR-5884	142
5.3.2	Laden und Prozessierung der Methylierungsarray-Daten zur Erstellung von PCA, tSNE und Korrelations-Plots ...	143
5.3.3	Erstellung von CNV-Profilen aus Methylierungsarray-Daten.....	143
5.3.4	Verwendete Chromosomlängen für die Generierung von CNV-Profilen	147
5.4	Publikationsverzeichnis	148
5.5	Abkürzungsverzeichnis.....	149
5.6	Literaturverzeichnis.....	151
5.7	Danksagung	160

ZUSAMMENFASSUNG

Glioblastome sind die häufigsten malignen Hirntumore und sind aufgrund der stark begrenzten Therapiemöglichkeiten derzeit nicht heilbar. Der Serinsyntheseweg und insbesondere die Phosphoglycerat-Dehydrogenase (PHGDH), die den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der *de novo*-Serinsynthese katalysiert, wurde in den letzten Jahren als potenzielles therapeutisches Target für die gezielte Behandlung einer Vielzahl von Tumorentitäten identifiziert. Aufgrund der begrenzten Serin-Verfügbarkeit im Gehirn wird angenommen, dass die *de novo*-Serinsynthese auch für das Wachstum von Gliomen von zentraler Bedeutung ist. Da der Serinsyntheseweg außerdem eine wichtige Quelle der zellulären α -Ketoglutarat (α KG)-Versorgung darstellt, wurde insbesondere bei *IDH*-mutierten (*IDHmut*) Gliomen aufgrund ihres beeinträchtigten α KG-Metabolismus eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber Serinsynthese-Inhibitoren vermutet. Deshalb wurde im ersten Teil dieser Arbeit untersucht, welche Rolle der Serinsyntheseweg für das Wachstum von *IDH*-Wildtyp (*IDHwt*)-Glioblastomen und *IDHmut*-Gliomen spielt und ob die Blockierung dieses Syntheseweges mittels PHGDH-Inhibition einen möglichen Ansatz zur gezielten Therapie dieser Tumore darstellt. Hierfür wurden anhand von 6 *IDHwt*-Glioblastomzelllinien und 3 *IDHmut*-Gliomzelllinien die Auswirkungen der PHGDH-Inhibitoren NCT-503 und CBR-5884 *in vitro* und *in vivo* untersucht. In der Tat konnte durch die PHGDH-Inhibition mittels NCT-503 und CBR-5884 bei den untersuchten Gliomzelllinien *in vitro* eine dosisabhängige Wachstumsinhibition erzielt werden, auf die der *IDH1*-Status der Zellen jedoch keinen nachweisbaren Einfluss hatte. Allerdings wurden wesentliche Unterschiede in der Wirkweise von NCT-503 und CBR-5884 festgestellt. So konnte keine Korrelation der Wirkung beider Inhibitoren auf das Wachstum unterschiedlicher Gliomzelllinien, sowie auf die Expression von Schlüsselenzymen der zellulären Serinversorgung beobachtet werden. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die Wirkung von CBR-5884, nicht jedoch NCT-503, primär von einer rapiden Induktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) abhängig war. Die beobachteten Effekte ließen insgesamt wesentliche unspezifische Off-Target-Effekte für CBR-5884 vermuten. Die Ergebnisse deuten außerdem darauf hin, dass der Serintransporter SLC1A4 eine Rolle bei der Resistenzbildung gegenüber PHGDH-Inhibitoren spielt und zur Umgehung des Serinsyntheseweges bei Gliomen beiträgt. Weiterhin konnte trotz der vielversprechenden Wirkung von NCT-503 auf Gliomzellen *in vitro*, selbst bei lokaler Applikation dieses Inhibitors in orthotope Gliom-Xenograft-Tumore keine signifikante Verringerung des Wachstums von Gliomen *in vivo* erreicht werden.

Das Wachstum von Tumor-Rezidiven ist einer der Hauptgründe für das Scheitern von Krebstherapien bei Gliomen und anderen Tumoren und ist häufig eine Folge der Bildung therapieresistenter Zellklone, was durch eine hohe intratumorale Heterogenität begünstigt wird. Obwohl zur Untersuchung intratumoraler Heterogenität unter anderem das RGB-Marking als Multilabelingtechnik zur Verfügung steht, fehlte es bislang an effizienten Verfahren, um die klonale Vielfalt markierter Zellpopulationen mittels Durchflusszytometrie zu visualisieren und zu quantifizieren, sowie einzelne Zellklone präzise zu verfolgen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb eine FACS-Analysesoftware namens „*ChromoClone*“ entwickelt, die mittels speziell hierfür entwickelter Analyseverfahren und Metriken eine effiziente und präzise durchflusszytometrische Untersuchung der klonalen Vielfalt sowie einzelner Zellklone in RGB-

markierten Zellpopulationen ermöglicht. Dabei wurde nicht nur die Visualisierung durchflusszytometrischer Daten mittels sphärischem Scatterplotting implementiert, die eine effiziente visuelle Einschätzung der klonalen Farbvielfalt RGB-markierter Zellpopulationen ermöglicht, sondern auch die Chromatizitäts-Metrik χ vorgestellt, die eine Quantifizierung dieser visuellen Einschätzung erlaubt. So konnte anhand der Analyse orthotoper Xenograft-Gliome aus RGB-markierten Gliomzellen mit der ChromoClone Software visuell und quantitativ nachgewiesen werden, dass die Zelllinien BT112, BS153 und U87 während des Tumorwachstums *in vivo* ein unterschiedliches Maß an klonaler Restriktion erfahren. Diese Methode kam zudem in einer Studie zur Rolle des Immunsystems bei der klonalen Restriktion von Gliomen zum Einsatz, in der unter Verwendung der *ChromoClone* Software gezeigt werden konnte, dass GL261-Mausgliome während des *in vivo*-Wachstums in immunkompetenten Mäusen eine signifikant höhere klonale Restriktion durchlaufen als in immunsupprimierten Mäusen.

Weiterhin wurde mittels dieser Software eine Methodik etabliert, die eine präzise Isolierung einzelner Zellklone aus RGB-markierten Zell-Mischpopulationen per FACS ermöglicht. Hierdurch konnten, nach der wiederholten Behandlung RGB-markierter Gliomzelllinien mit NCT-503 oder CBR-5884, einzelne Gliomzellklone isoliert werden, die signifikante Therapieresistenzen gegenüber diesen Inhibitoren aufwiesen. Im Zuge dessen wurde außerdem auch ein Gliomzellklon mit signifikant verringerter NCT-503- und CBR-5884-Resistenz extrahiert. Die Analyse resistenter Zellklone deutete darauf hin, dass Resistenzen gegenüber sowohl NCT-503 als auch CBR-5884 durch die Erhöhung der Expression von *SLC1A4* oder *PHGDH* vermittelt werden könnten. Abschließend konnte ein außerdem ein Verfahren etabliert werden, welches durch die simultane Analyse mehrerer Zellklone im selben Ansatz ein effizientes Screening einzelner Zellklone im Hochdurchsatzverfahren ermöglicht.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass PHGDH ein potenzielles Target zur gezielten Therapie von Gliomen darstellt, dass jedoch der Serintransporter SLC1A4 eine Rolle bei der Bildung von Resistenzen gegenüber einer solchen Therapie spielen könnte. Weiterhin wurden in dieser Arbeit wichtige Grundlagen zur Untersuchung intratumoraler Heterogenität und klonaler Therapieresistenzen mittels RGB-Marking geschaffen, indem Techniken etabliert wurden, die eine effiziente Identifizierung und Isolierung therapieresistenter Zellklone ermöglichen. Gleichzeitig wurde mit ChromoClone eine umfangreiche FACS-Analysesoftware entwickelt, die in Zukunft auch anderen Forschungsgruppen den Zugang zu den vorgestellten Verfahren ermöglichen kann. Die Fähigkeit zur weitergehenden Analyse therapieresistenter Zellklone ermöglicht zudem die Testung von Strategien zur Antagonisierung solcher Resistenzen.

ABSTRACT

Glioblastoma is the most common malignant brain tumor and is currently incurable. The serine synthesis pathway and in particular phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH), which catalyzes the first and rate-limiting step of de novo-serine synthesis, has been identified in recent years as a therapeutic target for treatment of various cancer types. Due to limited serine availability in the brain, de novo serine synthesis is also thought to be important for glioma growth. The serine synthesis pathway is also a major source of cellular α -Ketoglutarate (α KG) production. Since *IDH*-mutated (*IDHmut*) gliomas are known to have an impaired α KG metabolism, *IDHmut* gliomas in particular were suspected to show increased vulnerability to inhibition of serine synthesis.

Therefore, this thesis investigated the role of the serine synthesis pathway in growth of *IDH* wild-type (*IDHwt*) glioblastomas and *IDHmut* gliomas and analyzed the potential of *de novo* serine synthesis blockage by PHGDH inhibition as a targeted therapy approach for these tumors. To this end, 6 *IDHwt* glioblastoma cell lines and 3 *IDHmut* glioma cell lines were used to study the effects of the PHGDH inhibitors NCT-503 and CBR-5884 *in vitro* and *in vivo*. PHGDH inhibition by NCT-503 and CBR-5884 *in vitro* reduced proliferation of glioma cells in a dose-dependent manner, however *IDH1* status had no detectable influence on this effect. Notably, NCT-503 and CBR-5884 had different effects on glioma cells, as no correlation between these inhibitors in terms of growth inhibition on different glioma cell lines, as well as expression of key enzymes of cellular serine supply could be observed. In addition, growth inhibition by CBR-5884, but not NCT-503, was shown to be primarily dependent on rapid and strong induction of reactive oxygen species (ROS). The effects observed in this study indicated substantial nonspecific off-target effects for CBR-5884. The results also suggested that the serine transporter SLC1A4 played an essential role in the development of resistance to PHGDH inhibitors and contributed to bypassing the serine synthesis pathway in gliomas. Despite the promising effect of NCT-503 on glioma cells *in vitro*, however, local application of this inhibitor into orthotopic glioma xenograft tumors failed to significantly reduce glioma growth *in vivo*.

Tumor recurrence is a major cause for failure of cancer therapies in gliomas and other tumors and is often caused by the formation of therapy-resistant tumor cell clones, which in turn is enhanced by high intratumoral heterogeneity. Although RGB(Red-Green-Blue)-marking, among other multilabeling techniques, is available for studying intratumoral heterogeneity, efficient methods to visualize and quantify the clonal diversity of RGB-labeled cell populations by flow cytometry and to precisely track individual clones were not available. Therefore, a FACS analysis software called "ChromoClone" was developed, which uses specially developed analysis procedures and metrics to enable efficient and precise flow cytometric analysis of clonal diversity as well as individual cell clones in RGB-labeled cell populations. The visualization of flow cytometry data by spherical scatter plotting facilitated efficient visual assessment of the clonal color diversity of RGB-labeled cell populations. Also, the chromaticity metric χ was introduced, which allowed quantification of this visual assessment. Thus, analysis of orthotopic xenograft gliomas derived from RGB-labeled glioma cells using the ChromoClone software provided visual and quantitative evidence that BT112, BS153, and U87 glioma cells experience different levels of clonal

restriction during tumor growth *in vivo*. This method was also used in a study investigating the role of the immune system on clonal restriction in glioblastoma, which revealed that GL261 mouse glioblastomas undergo significantly higher levels of clonal restriction in immunocompetent compared to immunosuppressed mice during *in vivo* growth.

Furthermore, using this software, a method was established that facilitates the precise isolation of single clones from RGB-labeled mixed cell populations by FACS. Thus, after repeated treatment of RGB-labeled glioma cell lines with NCT-503 or CBR-5884, single glioma cell clones were isolated from bulk cell populations that showed significant resistance to these inhibitors. Additionally, a glioma cell clone with significantly reduced NCT-503 and CBR-5884 resistance could also be extracted. Analysis of resistant cell clones suggested that resistance to both NCT-503 and CBR-5884 was mediated by increase of *SLC1A4* or *PHGDH* expression. Finally, an additional method was established, which allows efficient screening of individual cell clones by simultaneous analysis of multiple cell clones in the same population.

In conclusion, the results indicate that PHGDH is a potential target for targeted therapy in glioma but also suggest that the serine transporter SLC1A4 may contribute to the development of resistance to such therapy. Furthermore, this thesis provides a basis for the investigation of intratumoral heterogeneity and clonal resistance to therapy using RGB marking by establishing techniques that allow efficient identification and isolation of treatment-resistant clones. Additionally, ChromoClone, a comprehensive flow cytometry analysis software, was developed that may allow other researchers to access these techniques in the future. The ability to further analyze treatment-resistant cell clones also enables testing of strategies to antagonize such resistances.

1 EINLEITUNG

1.1 Tumore des zentralen Nervensystems

Tumore des zentralen Nervensystems (ZNS-Tumore) sind unkontrolliert wachsende Zellmassen, die aus dem Gewebe des ZNS oder als Metastasen anderer Tumore entstehen. ZNS-Tumore haben eine Inzidenzrate von etwa 23,8 pro 100.000 Einwohner pro Jahr und treten bei Frauen rund 25% häufiger auf als bei Männern¹. Bei etwa der Hälfte aller ZNS-Tumore handelt es sich um vorwiegend gutartige Tumore wie Meningeome (~38%) und Hypophysentumore (~17%), welche durch chirurgische Resektion meist gut therapierbar sind^{1,2} (Abb. 1A). Dennoch besitzen ZNS-Tumore insgesamt eine hohe Mortalitätsrate von etwa 4,4 pro 100.000 Einwohner pro Jahr, die größtenteils auf maligne Gliome zurückzuführen ist, welche etwa 24% aller ZNS-Tumore ausmachen¹. Im Gegensatz zu gutartigen ZNS-Tumoren infiltrieren maligne Gliome das Gehirn diffus und dehnen sich dabei weit über die Tumormasse aus, die neuroradiologisch sichtbar gemacht werden kann. Diese Tumore dringen oft bis in die kontralaterale Hemisphäre vor, weshalb ihre vollständige Resektion in den meisten Fällen nicht möglich ist (Abb. 1B)³.

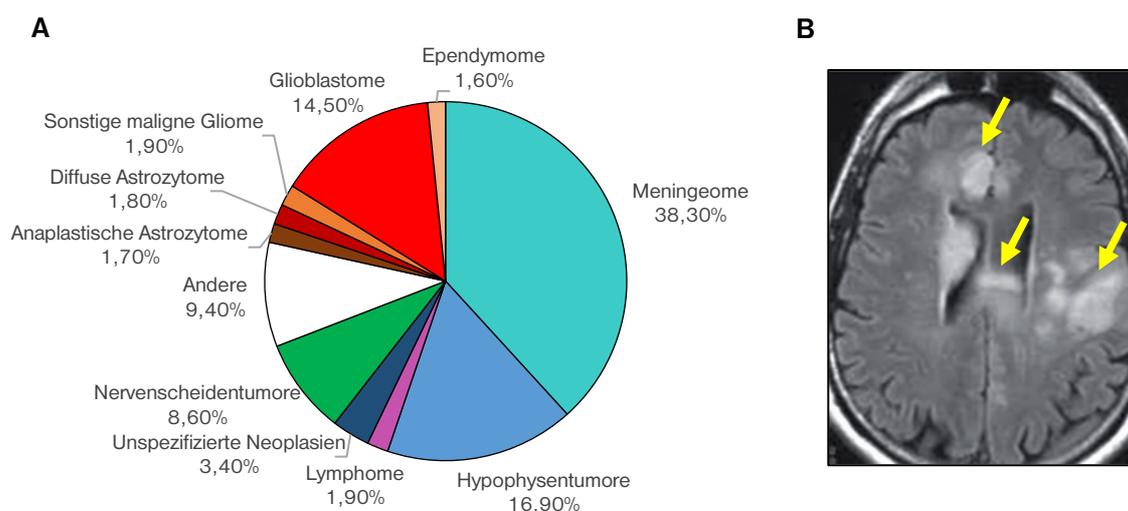


Abbildung 1 | ZNS-Tumore und Gliome. **A)** Verteilung primärer Hirntumore gemäß Histologie. Meningeome und Hypophysentumore machen den Großteil aller ZNS-Tumore aus und lassen sich in der Regel gut therapieren. Gliome sind im Kreisdiagramm rötlich oder bräunlich gekennzeichnet. Abbildung modifiziert nach CBTRUS Statistical Report 2013-2017¹. **B)** Die MRT-Aufnahme eines WHO-Grad III anaplastischen Astrozytoms (FLAIR) zeigt die infiltrative Natur von Gliomen. Pfeile markieren die Lage des Tumors am Gyrus cinguli, Corpus Callosum und der frontotemporalen subcortikalen weißen Hirnsubstanz. Es wäre nicht möglich den Tumor vollständig zu reseziieren, ohne dass der Patient schwere neurologische Schäden davonträgt. Modifiziert nach Westphal & Lamszus, Nat. Rev. Neurosci. (2016)³.

Es konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden, welcher Zelltyp den Ursprung für Gliome darstellt, jedoch deuten mehrere Studien darauf hin, dass sowohl neuronale Stammzellen, als auch Astrozyten und Oligodendrozyten-Vorläuferzellen mögliche Ursprungszellen für Gliome sein können⁴. Die Subgruppen von Gliomen sind nach denjenigen Gliazellen benannt, denen sie histologisch am ähnlichsten sehen. Hierzu zählen vor allem Astrozytome (Astrozyten), Oligodendrogliome (Oligodendrozyten) und

Ependymome (Ependymzellen)³. Eine Mischform, die als Oligoastrozytom bezeichnet wird, wird laut aktuellen Informationen mit der nächsten Aktualisierung aus der WHO-Klassifizierung von ZNS-Tumoren nicht mehr als eigene Entität anerkannt werden. Die verschiedenen Gliome sind in weitere Unterkategorien unterteilt, die sich in ihrer Aggressivität unterscheiden und sehr unterschiedliche Prognosen haben. Gemäß dem WHO-Klassifizierungsschema werden den Gliomen die WHO-Grade I bis IV zugeordnet, die die Aggressivität der Tumore abbilden. Der WHO-Grad I bezeichnet dabei gutartige, gut abgegrenzte, langsam wachsende Tumore, die eine günstige Prognose und gute Heilungschancen haben. WHO-Grad II- und III-Gliome zeigen geringe (Grad II) oder erhöhte mitotische Aktivität (Grad III) und infiltrieren das Gehirn meist diffus, weshalb Patienten mit solchen Tumoren zwar mitunter 10 Jahre und länger überleben, jedoch üblicherweise keine Aussicht auf eine vollständige Heilung haben. Der WHO-Grad IV bezeichnet bösartige, schnell wachsende astrozytäre Tumore (Glioblastome) mit einer schlechten Prognose, die nicht heilbar sind^{2,5}.

Tabelle 1 | Zusammenfassung der häufigsten Gliomentitäten. Dargestellt sind die Bezeichnungen der Tumore, sowie ihr WHO-Grad, ihre Inzidenz (je 100.000 Einwohner) und die 5-Jahres- und 10-Jahres-Überlebensraten (in %). *Kombinierte Werte für WHO-Grad II und III Oligoastrozytome. Modifiziert nach Ostrom et al., Neurooncology (2020)¹, WHO (2016)².

Gliom-Typ	Histologische Subklasse	WHO-Grad	Inzidenz	5-Jahres-Überleben [%]	10-Jahres-Überleben [%]
Astrozytome	Pilozytisches Astrozytom	I	0,35	95	93
	Diffuses Astrozytom	II	0,45	53	43
	Anaplastisches Astrozytom	III	0,42	31	23
	Glioblastom	IV	3,23	7	5
Oligoastrozytome	Oligoastrozytom	II	0,1*	58*	52*
	Anaplastisches Oligoastrozytom	III			
Oligodendrogliome	Oligodendrogliom	II	0,23	83	70
	Anaplastisches Oligodendrogliom	III	0,11	64	50
Ependymome	Subependymom	I	0,17	96	94
	Myxopapilläres Ependymom	I			
	Ependymom	II	0,25	87	81
	Anaplastisches Ependymom	III			

1.1.1 Histologische und Molekulare Klassifizierung von diffusen Gliomen

In der Vergangenheit wurden Gliome allein auf der Basis histologischer Untersuchungen klassifiziert. Zur Charakterisierung von Tumoren wurden hierbei vor allem HE-gefärbte Gewebeschnitte und in einigen Fällen auch die immunhistochemische Bestimmung der Expression einiger Proteine herangezogen². In mehreren Studien konnte jedoch festgestellt werden, dass eine molekulare Klassifizierung von Gliomen besser mit den klinischen Ergebnissen korreliert als die rein histologische Klassifizierung⁶⁻¹². In der letzten Aktualisierung der WHO Klassifikation von ZNS-Tumoren (2016) wurden deshalb erstmals neben histologischen auch molekulare Parameter in die Klassifizierung dieser Tumore miteinbezogen. Dabei liegt im Bezug auf diffuse Gliome das Hauptaugenmerk auf Mutationen der Isocitrat-Dehydrogenase (IDH), des Transkriptionsregulators ATRX und des Histons H3, sowie auf Codeletionen der Chromosomen 1p und 19q. Das Diagnoseschema ist in Abbildung 2 dargestellt.

Eine weitere diagnostische Neuerung, die direkte Implikationen für die Behandlung von Gliomen hat, ist die Erfassung des Promoter-Methylierungsstatus des O-6-Methylguanin-Methyltransferase-Gens (*MGMT*). *MGMT* ist ein DNA-Reparaturenzym, welches Resistenzen gegenüber DNA-alkylierenden Chemotherapeutika vermittelt. Bei der Behandlung von Glioblastomen führt ein methylierter *MGMT*-Promoter zum Gen-Silencing des *MGMT*-Gens und damit zu einem besseren Ansprechverhalten auf die Chemotherapie mit dem DNA-Alkylanz Temozolomid (TMZ), welches standardmäßig bei der Therapie von Gliomen eingesetzt wird¹³. Somit spricht ein nicht-methylierter *MGMT*-Promoter eher gegen eine Chemotherapie mit TMZ und wird daher bei älteren Patienten (>70 Jahre) und bei Erwartung hoher Einbußen der Lebensqualität in einigen Fällen nicht mehr verschrieben.

Zusätzlich hat in den letzten Jahren die Klassifizierung von ZNS-Tumoren auf der Basis von globalen DNA-Methylierungsprofilen nach Capper et al. besondere Aufmerksamkeit erlangt⁸. Die Bestimmung genomischer DNA-Methylierungsprofile per Mikroarray und das Clustering dieser Profile mittels t-verteilter stochastischer Nachbareinbettung (tSNE) ermöglicht es, ZNS-Tumore und ihre Subgruppen mit hoher Präzision korrekt zu klassifizieren^{8,12}. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass es gleichzeitig möglich ist, genomweite Profile von Kopienzahlvariationen (CNV-Profile; CNV: engl. copy number variation) basierend auf diesen DNA-Methylierungsprofilen zu erstellen¹⁴. Diese Methode besitzt insofern einen hohen klinischen Stellenwert, als es basierend auf einem einzigen Assay möglich ist, die Art des Tumors genau festzustellen und gleichzeitig chromosomale Veränderungen wie Deletionen und Amplifikationen bis hin zu einzelnen Genen nachzuverfolgen. Auch der *MGMT*-Promotormethylierungsstatus kann mit dieser Methode verlässlich bestimmt werden^{8,15,16}. Diese Art der Charakterisierung von Tumoren wird zurzeit jedoch nur in wenigen neuropathologischen Zentren in Deutschland durchgeführt.

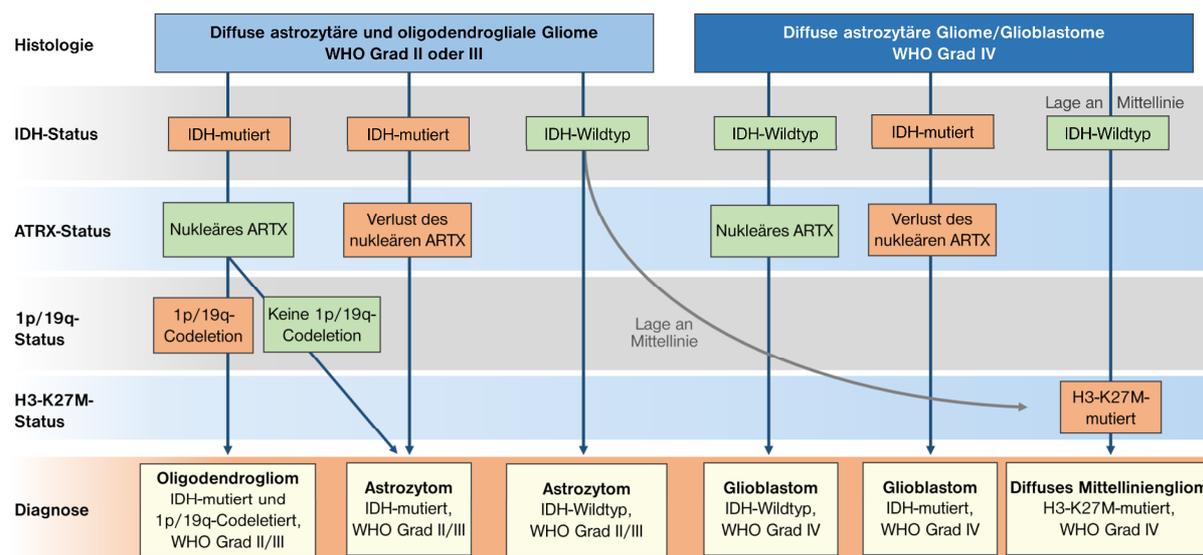


Abbildung 2 | Diagnostisches Schema zur integrierten histologischen und molekularen Klassifizierung von diffusen Gliomen gemäß der 2016 erschienenen WHO-Klassifizierung von ZNS-Tumoren². Die Mutation der Isocitrat-Dehydrogenase (IDH) ist in Abschnitt 1.1.3 genauer beschrieben. ATRX ist ein Chromatin-bindendes Tumorsuppressorprotein, welches an der epigenetischen Regulation der Genexpression beteiligt ist und dessen Verlust das Wachstum von Gliomen fördert¹⁷. Modifiziert nach Reifenberger et al., Nat. Rev. Clin. Oncol. (2017)⁷.

1.1.2 Glioblastome

Glioblastome (GBM; WHO-Grad IV) sind die häufigsten und malignesten hirneigenen Tumore und machen etwa die Hälfte aller diagnostizierten Gliome aus^{1,3}. Der Großteil aller Glioblastome (~90%) tritt bei älteren Erwachsenen über 50 Jahre auf und entsteht *de novo* (primäres Glioblastom), das heißt nicht als Rezidiv eines vormals niedriggradigeren Ursprungstumors¹⁸. Bei den weiteren 10% handelt es sich um sekundäre Glioblastome, die als Rezidive von WHO Grad II oder III Tumoren überwiegend bei jungen Erwachsenen auftreten und typischerweise eine Mutation im Gen der Isocitrat-Dehydrogenase 1 oder 2 (*IDH1* / *IDH2*) enthalten, welche bei primären Glioblastomen üblicherweise nicht zu finden ist. *IDH1*- und *IDH2*-Mutationen treten außerdem oft (>80%¹⁹) in niedriggradigen Gliomen auf und sind beispielsweise auch häufig bei akuten myeloiden Leukämien (AML) zu finden^{9,20,21}. Da der *IDH*-Mutationsstatus einen wesentlichen Einfluss auf den klinischen Verlauf von Glioblastomen hat, unterscheidet man im Allgemeinen zwischen *IDH*-Wildtyp- (*IDHwt*) und *IDH*-mutierten (*IDHmut*) Glioblastomen. Glioblastome zählen zu den aggressivsten Tumorentitäten überhaupt – die mittlere Überlebenszeit bei *IDHwt*-Glioblastomen ist mit etwa 15 Monaten nach Diagnose sehr gering^{13,22}. *IDH1mut*-Glioblastome hingegen haben eine wesentlich günstigere Prognose, mit einer mittleren Überlebenszeit von etwa 30 Monaten²² (65 Monate bei *IDHmut* Anaplastischen Astrozytomen, WHO Grad III).

1.1.2.1 Molekularpathologie und Subklassifizierung von Glioblastomen

Häufig liegen bei *IDHwt*-Glioblastomen erwachsener Patienten charakteristische genetische Veränderungen vor, wie der kombinierte Gewinn von Chromosom 7 und Verlust von Chromosom 10 (+7/-10), die Amplifikation des *EGFR*-Gens, sowie Mutationen im TERT-Promotor, Mutation oder homozygote Deletion von *PTEN* und die homozygote Deletion des *CDKN2A*- und *CDKN2B*-Gens.

IDH1-mutierte Glioblastome sind neben der *IDH1*- oder *IDH2*-Mutation gekennzeichnet durch eine DNA-Hypermethylierung an CpG-Inseln (G-CIMP), Deletionen der *CDKN2A/B*-Gene und des q-Arms von Chromosom 10, sowie Mutationen der Gene *ATRX* und *TP53*. Diese und weitere, weniger häufig vorkommende Alterationen sind in einer Übersicht in Abbildung 3 zusammengefasst.

Durch die Analyse von mRNA-Expressionsprofilen können Glioblastome zudem in drei verschiedene Transkriptions-Subtypen unterteilt werden: Proneurale, klassische und mesenchymale Glioblastome²³. Die klinische Anwendung dieser Einteilung ist jedoch limitiert, da Zellen mit unterschiedlichen Subgruppen heterogen im Tumor verteilt sein können und sich ihr Expressionsprofil als Antwort auf externe Stimuli oder Therapien ändern kann. Es wurde dennoch gezeigt, dass ein mesenchymales Expressionsprofil mit Resistenz gegen Strahlentherapie und einer schlechteren Prognose einhergeht, während ein proneurales Profil bei *IDHwt*-Gliomen mit einer erhöhten Wirkung antiangiogenetischer Therapien assoziiert ist^{24,25}.

Auf Basis von DNA-Methylierungsprofilen wurden außerdem drei verschiedene Subtypen von IDHwt-Glioblastomen ermittelt^{8,26}. Der Subtyp „Rezeptor-Tyrosinkinase I“ (RTK I) kommt häufig bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen vor und ist üblicherweise durch eine PDGFRA-Amplifikation und ein proneurales Genexpressionsprofil gekennzeichnet. Dagegen tritt der Subtyp RTK II fast ausschließlich bei älteren Erwachsenen (>50) auf und zeigt häufig EGFR-Amplifikationen, sowie eine generell erhöhte Anzahl an Kopienzahlvariationen (CNVs) und ein klassisches Expressionsprofil. Mesenchymale Glioblastome wiederum zeigen ein mesenchymales Expressionsprofil und kommen überwiegend bei älteren Erwachsenen vor²⁷.

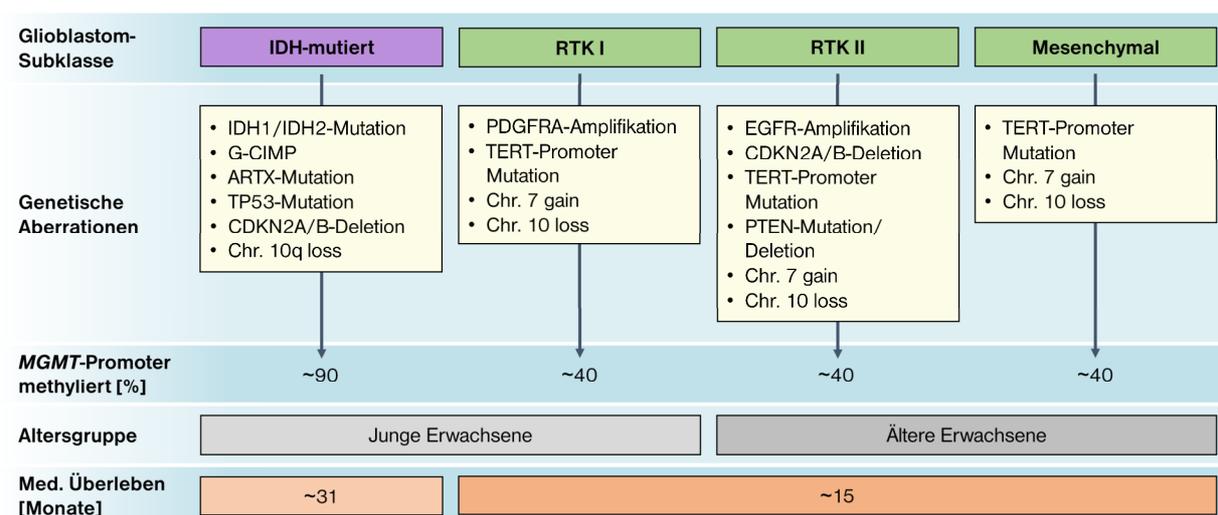


Abbildung 3 | Molekulare Subklassifizierung von Glioblastomen auf Basis genetischer und epigenetischer Profile.^{7,22} RTKI-Tumore treten auch in jungen Patienten auf, während RTKII- und mesenchymale Glioblastome hauptsächlich in Patienten über 50 vorkommen und mit einer ungünstigeren Prognose assoziiert sind. (Chr.: Chromosom) Modifiziert nach Reifenberger et al., Nat. Rev. Clin. Oncol. (2017)⁷.

1.1.3 Funktion von *IDH*-Mutationen in Gliomen

IDH1 und IDH2 sind Isoformen der Isocitrat-Dehydrogenase, die im Zytoplasma bzw. in den Mitochondrien lokalisiert sind. *IDH1*-Mutationen machen etwa 96% aller diagnostizierten, pathologischen *IDH*-Mutationen bei Gliomen aus, während *IDH2*-Mutationen nur selten vorkommen^{19,22}. *IDH1*-Mutationen, welche nachweislich bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Tumorigenese auftreten, bewirken in Zellen eine Veränderung des Metabolismus und die Ausbildung eines spezifischen molekularen Phänotyps, der zur malignen Transformation von Gliomen beiträgt und deshalb als Driver-Mutation betrachtet wird. Die Implikationen der metabolischen Modulation durch die *IDH1*-Mutation werden im Folgenden kurz erläutert.

IDH1 ist ein wichtiges Enzym des Citratzyklus und katalysiert die NADP⁺-abhängige Umwandlung von Isocitrat und NADP⁺ zu α -Ketoglutarat (α KG), NADPH und CO₂. Die Veränderung dieses Enzyms durch spezifische *IDH1*-Mutationen resultiert in einer neoenzymatischen Aktivität, bei der zelluläres α KG unter Verwendung von NADPH in den Onkometaboliten 2-Hydroxyglutarat (2HG) umwandelt wird (Abb. 4)²⁸. Dadurch erhöht sich die intrazelluläre Konzentration von 2HG in *IDH1*-mutierten Zellen um das bis zu 100-fache gegenüber normalen Zellen, während gleichzeitig große Mengen von α KG verbraucht werden²⁹. α KG kann in Zellen aber auch aus zellulärem Glutamat hergestellt werden, welches im Gehirn in hohen Konzentrationen zu finden ist^{30,31}. Hohe Konzentrationen von 2HG führen aufgrund dessen struktureller Ähnlichkeit zu α KG zu einer Inhibierung α KG-abhängiger DNA-Demethylasen der TET-Familie, was in einer Hypermethylierung der DNA an CpG-Inseln resultiert^{21,32}. Dieser sogenannte G-CIMP-Phänotyp (Glioma CpG island methylator phenotype) ist eines der Hauptmerkmale *IDH*-mutierter Tumore^{21,33}.

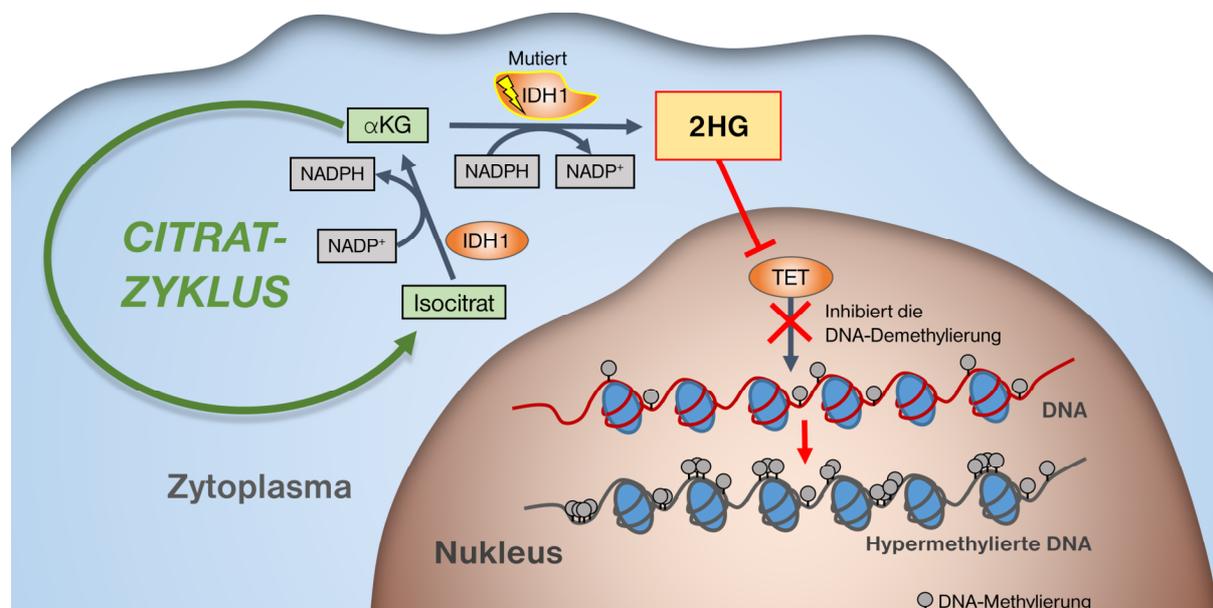


Abbildung 4 | Auswirkungen einer *IDH1*-Mutation auf den Metabolismus von Tumorzellen. Vereinfachte schematische Ansicht einer Tumorzelle und der metabolischen Prozesse, die durch mutiertes *IDH1* veranlasst werden. Durch die neoenzymatische Aktivität von mutiertem *IDH1* werden große Mengen des Onkometaboliten 2-Hydroxyglutarat (2HG) hergestellt. 2HG inhibiert unter anderem DNA-Demethylasen der TET-Familie, was in einer genomweiten Hypermethylierung der DNA resultiert.

Zur 2HG-Synthese in *IDH1*-mutierten Zellen wird NADPH als Cofaktor benötigt und somit auch in hohem Maße verbraucht. NADPH wird für viele anabole Reaktionen in Zellen verwendet und ist daher gerade für Wachstum schnell proliferierender Tumore wichtig³⁴. NADPH ist außerdem ein wichtiges Reduzierungsäquivalent, das unter anderem für die Reduktion von Glutathion (GSSG/GSH) und die Aktivität des Thioredoxinsystems essenziell ist, und damit zellulären Schutz vor oxidativem Stress vermittelt. So konnte nachgewiesen werden, dass *IDH1*-mutierte Tumorzellen deshalb eine erhöhte Sensitivität gegenüber oxidativem Stress besitzen³⁵.

Für die neoenzymatische Aktivität von mutiertem IDH1 ist auch das Vorhandensein von Wildtyp-IDH1 von Bedeutung. So führt der Verlust des Wildtyp-*IDH1*-Allels bei *IDH1*-mutierten Gliomzellen (*IDH1^{mut/-}*) zu einer wesentlichen Verringerung der 2HG-Produktion (~Faktor 14-87) im Vergleich zu heterozygot *IDH1*-mutierten (*IDH1^{mut/wt}*) Zellen³⁶. In diesem Zusammenhang wird vermutet, dass Wildtyp-IDH1 vor allem für die Bereitstellung von α KG für die 2HG-Produktion wichtig ist³⁷. Weiterhin resultiert der Verlust des Wildtyp-*IDH1*-Allels bei *IDH1*-mutierten Zellen nachweislich in einer Reprogrammierung der DNA-Methylierung und einem teilweisen Verlust des G-CIMP-Phänotyps, da durch die Verringerung der 2HG-Produktion die Aktivität α KG-abhängiger DNA-Demethylasen wiederhergestellt wird^{37,38}. Dies wiederum führt zu einer weitreichenden Veränderung der onkogenen Eigenschaften dieser Tumorzellen. So konnte gezeigt werden, dass der Verlust des IDH1-Wildtyp-Allels zu einer signifikanten Erhöhung des Wachstums *IDH1*-mutierter Gliomzellen *in vitro* beitrug³⁹. Da mutiertes IDH1 offenbar das Wachstum von Gliomzellen eher beeinträchtigt als fördert, werden *IDH*-Mutationen trotz ihrer Beteiligung bei der Tumorigenese häufig mit einer intrinsischen tumorsupprimierenden Wirkung in Verbindung gebracht, die sich auch beim Vergleich des medianen Gesamtüberlebens von *IDHmut*- und *IDHwt*-Glioblastomen zeigt (vgl. Abb. 3). Ein weiterer Hinweis auf diese tumorsupprimierende Wirkung der *IDH1*-Mutation ist die Tatsache, dass häufig die Deletion des Wildtyp-*IDH1*-Allels bei Rezidiven von *IDH1mut*-Gliomen in Patienten, sowie bei der Kultivierung von *IDH1mut*-Gliomzelllinien beobachtet werden kann^{40,41}. Dies lässt vermuten, dass die *IDH1*-Mutation trotz ihrer wichtigen Rolle bei der Tumorigenese, bei zunehmender Progression der Gliome nur noch eine untergeordnete Rolle spielt.

Bei Gliomen stellt die R132H-Mutation die häufigste Form der *IDH1*-Mutation dar (~90%⁴²), bei der ein Argininrest im aktiven Zentrum des Enzyms durch Histidin substituiert wird. Die hohe Prävalenz dieser spezifischen Mutation hat zur Entwicklung von Antikörpern geführt, die die Mutation spezifisch erkennen können und mit denen es möglich ist, mutiertes IDH1 immunhistochemisch und per Western Blotting von Wildtyp-IDH1 zu unterscheiden^{43,44}. Auch die therapeutische Inhibition des mutierten IDH1-Enzyms wird für Gliome erforscht (siehe Abschnitt 1.1.4).

1.1.4 Therapien und Therapieresistenzen bei Glioblastomen

Mit den verfügbaren Therapiemöglichkeiten bei Glioblastomen lässt sich derzeit lediglich eine Lebensverlängerung um einige Monate oder maximal wenige Jahre erreichen^{5,45}. Trotz großer Fortschritte beim Verständnis der genetischen und epigenetischen Faktoren, die das Wachstum von Gliomen beeinflussen, sowie der Weiterentwicklung von Chemo-, Strahlen- und gezielten molekularen Therapien,

hat sich die Standardtherapie von Glioblastomen in den letzten Jahrzehnten nicht wesentlich verändert. Diese besteht in der Regel aus der chirurgischen Resektion des Tumors, gefolgt von einer Strahlentherapie und begleitender Chemotherapie mit TMZ. Dabei konnte durch den Einsatz von TMZ bei Glioblastompatienten in Kombination mit Strahlentherapie eine Verlängerung des medianen Überlebens um 2,5 Monate gegenüber alleiniger Strahlentherapie erreicht werden⁵.

Sowohl die Bestrahlung des Tumors, als auch die Behandlung mit TMZ hemmen das Tumorwachstum, indem sie Schäden in der DNA induzieren, die die DNA-Replikation in diesen Zellen verhindert. Bei der Strahlentherapie induziert die ionisierende Strahlung unter anderem DNA-Doppelstrangbrüche, die, bei ausreichender Dosierung, zu Zellzyklusarrest und Apoptose bestrahlter Zellen führen. TMZ alkyliert extrazyklische Sauerstoff- und Stickstoffatome, was in der zellulären DNA vor allem die Bildung von O⁶-Methylguanin, N⁷-Methylguanin und N³-Methyladenin bewirkt. Die zelluläre DNA-Fehlpaarungsreparatur (mismatch repair; MMR), die nicht in der Lage ist, diese Schäden zu reparieren, sorgt in der Folge für einen Zellzyklusarrest und die Apoptose der Zellen. Trotz der prinzipiellen Wirksamkeit der postoperativen Chemo- und Strahlentherapie kommt es jedoch meist binnen kurzer Zeit zur Ausbildung von Therapieresistenzen⁴⁶. Ein gut untersuchtes Beispiel hierfür stellt die MGMT-vermittelte TMZ-Resistenz dar^{13,47,48}. So liegt bei resistenten Glioblastomen infolge einer verringerten *MGMT*-Promotormethylierung häufig ein erhöhter MGMT-Gehalt vor. MGMT wiederum kann die durch TMZ verursachten DNA-Schäden teilweise reparieren, indem es die TMZ-vermittelte Guanin-O⁶-Methylierung wieder entfernt, womit der Zellzyklusarrest und die Apoptose behandelter Tumorzellen verhindert werden kann. Auch der Verlust von MMR-Genen kommt bei Glioblastomen vor und trägt zur Resistenz der Tumore gegen TMZ bei, da hierdurch die zelluläre MMR gestört wird, deren Funktionalität zur Induzierung der Apoptose bei TMZ-behandelten Zellen essenziell ist⁴⁹.

Das Gesamtüberleben von Glioblastompatienten ist somit besonders vom Erfolg der chirurgischen Resektion abhängig, jedoch ist aufgrund der diffusen Infiltration dieser Tumore eine vollständige Resektion fast nie möglich^{3,50,51}. Aus diesem Grund werden zurzeit zahlreiche neue Therapien für die Behandlung von Glioblastomen erforscht. Die Entwicklung neuer Therapieoptionen ist dabei unter anderem durch die geringe Auswahl an Substanzen begrenzt, die in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Es wurde zwar nachgewiesen, dass diese Schranke im Bereich von Tumoren und anderen Läsionen durchlässig für Makromoleküle ist, jedoch betrifft dies meist nur Teile des Tumors, sodass sie in anderen Teilen des Tumors intakt bleibt und die meisten Wirkstoffe hier nicht wirken können⁵². Obwohl in den letzten Jahren viele innovative Therapien erforscht wurden, die zum Beispiel gezielt auf bestimmte Signal- und Stoffwechselwege wirken sollen (gezielte Therapie / „targeted therapy“), konnte bislang noch keine dieser gezielten Therapien eine dauerhafte Heilung bewirken. Die wichtigsten und vielversprechendsten Therapien, die noch in klinischen Studien getestet werden (oder getestet werden sollen), werden im Folgenden kurz vorgestellt:

Deregulation zellulärer DNA-Reparaturwege – TMZ-Resistenzen entstehen meist durch erhöhte direkte DNA-Reparatur (MGMT) oder durch Verringerung der MMR-Effektivität und könnten somit durch die Inhibierung von Enzymen antagonisiert werden, die an diesen Reparaturmechanismen beteiligt

sind. Obwohl die Deregulation solcher DNA-Reparaturmechanismen therapeutischen Nutzen haben könnte, kann sie auch zu erhöhter genomischer Instabilität in normalen Zellen führen, was die Entstehung neuer Neoplasien begünstigen könnte. Therapien solcher DNA-Reparaturwege (z.B. mit PARP-Inhibitoren) werden zur Zeit noch in klinischen Studien untersucht⁵³. Dabei konnten bereits erste Erfolge für die Behandlung von Prostatakrebs mit dem PARP-Inhibitor Olaparib erzielt werden, der das Gesamtüberleben von Prostatakrebs-Patienten signifikant erhöhte⁵⁴. Die Behandlung rezidivierender Glioblastome mit einer Kombinationsbehandlung aus Olaparib und TMZ resultierte jedoch häufig in schweren Nebenwirkungen in Form von hämatologischer Toxizität⁵⁵. Bei Glioblastomzelllinien zeigte Olaparib eine radiosensitivierende Wirkung, weshalb die Behandlung rezidivierender Glioblastome mit diesem Inhibitor und in Verbindung mit Strahlentherapie weiterhin in klinischen Studien untersucht wird⁵⁶.

Alkylierende Nitrosoharnstoffe (Carmustin/Gliadel, Lomustin, Nimustin) – Neben TMZ wurde in der Vergangenheit auch die systemische Applikation weiterer DNA-Alkylanzien wie Lomustin, Carmustin und Nimustin untersucht, jedoch konnte hier in Phase III-Studien kein Überlebensvorteil gegenüber alleiniger Strahlentherapie festgestellt werden⁴⁵. Die Erforschung weiterer Applikationsformen für diese Therapeutika führte zur Entwicklung von Carmustin-freisetzenden Implantaten (Gliadel-Implantate). Gliadel-Implantate sind biologisch abbaubare Plättchen, die nach der chirurgischen Tumorresektion in das Tumorbett implantiert werden und über einen Zeitraum von 2-3 Wochen Carmustin freisetzen⁵⁷. Die Verwendung dieser Implantate wird aufgrund eines fraglichen Überlebensvorteils und Nebenwirkungen kontrovers diskutiert, ist jedoch für die Erstbehandlung von Glioblastomen in Deutschland zugelassen.

Bevacizumab (Avastin) – Hierbei handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper gegen VEGF (vascular-endothelial growth factor), der die Angiogenese von Tumoren *in vivo* hemmt⁵⁸ und in Europa zur Behandlung einiger Tumorarten wie Brust-, Darm- und Lungenkrebs zugelassen ist. Die Wirksamkeit von Bevacizumab konnte in klinischen Studien auch bei Glioblastomen nachgewiesen werden (AVAglio⁵⁹ 2014, 921 Patienten; RTOG 0825⁶⁰ 2014, 621 Patienten; EORTC 26101⁶¹ 2017, 437 Patienten). Die letzte Phase III-Studie (EORTC 26101) bestätigte dabei im Wesentlichen bei Patienten mit rezidivierenden Glioblastomen, was die Vorgängerstudien bereits für die Behandlung neu diagnostizierter Glioblastome zeigten. Hier konnte durch die Kombinationstherapie mit Bevacizumab nur eine Erhöhung des progressionsfreien Überlebens (PFS; radiologisch sichtbare Effekte), nicht jedoch des Gesamtüberlebens erreicht werden. Dennoch erhielt Bevacizumab auf Basis dieser Studie in den USA eine vollständige Zulassung zur Therapie rezidivierender Glioblastome. Grund hierfür war, dass Bevacizumab-Patienten weniger Steroide benötigten und ein erhöhtes PFS zeigten, was mit einer tendenziell verbesserten Lebensqualität und einem insgesamt positiven palliativen Effekt einherging. In Hinblick auf laufende Immuntherapie-Studien ist außerdem der Ersatz von Steroiden durch Bevacizumab von besonderem Interesse, da Steroide immunsupprimierend wirken und daher die Wirksamkeit solcher Immuntherapien herabsetzen könnten. Beim Einsatz von Bevacizumab und anderen Angiogenesehemmern konnte weiterhin beobachtet werden, dass es häufig zur Ausbildung von Therapieresistenzen kommt⁶². In präklinischen Studien wurde beispielsweise gezeigt, dass VEGF-Inhibitoren als Ergebnis ihrer antiangiogenetischen Wirkung die Invasivität und Metastasierung von Tumoren fördern^{63,64}.

Tumor-behandelnde elektrische Felder (TTFields) – Die Behandlung von Glioblastomen mit TTFields ist in Deutschland zugelassen und wurde neben chirurgischer Resektion, Chemo- und Strahlentherapie als „vierte Modalität der Krebstherapie“ bezeichnet^{65,66}. Hier verhindern elektrische Wechselfelder von geringer Intensität die Zellteilung, indem sie eine Fehlausrichtung von Mikrotubuli während der Zellteilung verursachen. Diese Therapie ist gut verträglich und hat, vor allem in Verbindung mit TMZ, in einer klinischen Phase III Studie (EF-14) mit insgesamt mehr als 700 Patienten signifikante Überlebensvorteile gezeigt⁶⁷. Dabei konnte das mediane Gesamtüberleben durch die Kombination aus TTFields- und TMZ-Behandlung gegenüber alleiniger TMZ-Behandlung um 30-80% gesteigert werden. Jedoch wird diese Studie oft dafür kritisiert, dass ihr ein Placebo-Kontrollarm fehlte und ihre Aussagekraft insofern gering ist.

EGFR-Inhibitoren (z.B. Erlotinib, Rindopepimut) – Das Gen des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) liegt auf Chromosom 7 und ist in etwa 40 – 60% aller Glioblastome amplifiziert^{2,19,68}. Die EGFR-Amplifikation ist dabei zu etwa 50% mit einer Expression der onkogenen Variante III dieses Rezeptors assoziiert (EGFRvIII), bei der die Exons 2-7 fehlen, was zu einer konstitutiven Aktivierung dieser Rezeptortyrosinkinase führt^{69,70}. Die Überexpression von EGFR oder EGFRvIII trägt zur Proliferation und Invasion von Glioblastomen bei, weshalb EGFR als attraktives Target für die gezielte Therapie von Glioblastomen angesehen wird^{71,72}. Dies führte zur Entwicklung niedermolekularer EGFR-Inhibitoren wie Erlotinib und Gefitinib, sowie der EGFRvIII-spezifischen Peptidvakzine Rindopepimut, welche jedoch in klinischen Studien bei Glioblastomen bislang keine signifikante Wirksamkeit gegenüber Standardtherapien zeigten⁷³⁻⁷⁶. Bei der Behandlung mit Erlotinib wurde außerdem bereits mehrfach die Ausbildung spezifischer Resistenzen beobachtet⁷⁷⁻⁷⁹. So konnte beispielsweise an Glioblastomzelllinien gezeigt werden, dass Erlotinib-Resistenzen mit einer starken Hochregulierung von EGFRvIII assoziiert sind und durch den EGFRvIII-Knock-Down eine Re-sensitivierung Erlotinib-resistenter Zellen erreicht werden kann⁷⁸.

Inhibitoren gegen mutiertes IDH1 (Ivosidenib / AG-120) – Durch den Einsatz von Ivosidenib wird die neoenzymatische Aktivität von mutiertem IDH1, und damit auch das Wachstum IDH1-mutierter Tumore unterdrückt⁸⁰. Zur Behandlung der AML ist Ivosidenib in einigen Ländern wie den USA bereits zugelassen⁸¹ und wird zur Anwendung bei IDH1-mutierten Gliomen noch in klinischen Studien getestet. Eine klinische Studie zur Untersuchung von Rezidiven bei AML-Patienten zeigte, dass primäre Resistenzen gegen Ivosidenib durch Mutationen von Rezeptortyrosinkinasen vermittelt werden und weitere Resistenzen durch sekundäre *IDH1*-Mutationen oder *IDH2*-Mutationen akquiriert werden können⁸².

Immuntherapien – Eine weitere wichtige Therapiestrategie, die derzeit erforscht wird, zielt auf eine Aktivierung der Immunabwehr ab, die nachweislich an der körpereigenen anti-Tumor-Antwort beteiligt ist (Immuntherapien), aber von Tumoren oft gezielt unterdrückt wird^{83,84}. Hierzu zählen vor allem folgende Therapien:

- **Pembrolizumab und Nivolumab (Anti-PD-1)** – Der „programmed cell death 1 receptor“ (PD-1) wird von aktivierten T-Zellen exprimiert und vermittelt als Immun-Checkpoint in Verbindung mit

seinen Liganden, PD-L1 und PD-L2 (programmed cell death ligand 1/2) die Inhibierung der T-Zell-Aktivierung⁸⁵. Bei Glioblastomen konnte nachgewiesen werden, dass PD-L1 von einer kleinen Fraktion von Glioblastomzellen exprimiert wird, die damit in der Lage sind, tumorinfiltrierende aktivierte T-Zellen zu inhibieren und so die Immunantwort zu unterdrücken. Pembrolizumab und Nivolumab sind humanisierte, monoklonale anti-PD-1-Antikörper und verhindern durch die Blockierung von PD-1 die Interaktion zwischen PD-1 und PD-L1 und damit auch die Inhibition aktivierter T-Zellen⁸⁶. Bei Patienten mit rezidierten Glioblastomen konnte in einer ersten klinischen Studie demonstriert werden, dass die systemische Gabe von Pembrolizumab vor und nach Resektion das Gesamtüberleben und das progressionsfreie Überleben signifikant erhöhte⁸⁷.

- **DNX-2401 (Delta24RGD)** – Hierbei handelt es sich um ein onkolytisches Adenovirus, das Tumorzellen selektiv abtötet, da es nur in Zellen mit nicht funktionalem Retinoblastom-Protein-Signalweg (Tumorzellen) replikationsfähig ist⁸⁸. Eine klinische Phase I-Studie an Patienten mit rezidierten malignen Gliomen demonstrierte, dass die einfache Injektion dieses Virus in Rezidivtumore zu einer gravierenden Antitumorantwort führte, die offenbar durch die onkolytische Wirkung des Virus und die darauf folgende Immunantwort hervorgerufen wurde⁸⁹.
- **PVSRIPO (Rekombinantes Poliovirus)** – PVSRIPO ist eine nicht-pathogene, rekombinante Polio-Rhinovirus-Chimäre, die den Poliovirus-Rezeptor CD155 erkennt, der bei neoplastischen Zellen weit verbreitet ist und eine starke Immunantwort auslöst⁹⁰. Bei der Behandlung von Patienten mit rezidierten Glioblastomen in einer ersten klinischen Studie, konnte durch die Infusion von PVSRIPO in Rezidive ein signifikanter Überlebensvorteil gegenüber historischen Kontrollen ermittelt werden. Das Überleben betrug nach 36 Monaten noch etwa 21% in der PVSRIPO-Gruppe gegenüber 4% in der Kontrollgruppe. Weiterhin konnte bestätigt werden, dass dieses Virus nicht neurovirulent ist.

1.2 Der Serinsyntheseweg als Target der gezielten Therapie von Tumoren

Für viele Tumorarten konnte gezeigt werden, dass sie unabhängig von der Verfügbarkeit von Sauerstoff bevorzugt Glucose metabolisieren (Warburg-Effekt)^{91,92}. Obwohl die aerobe Glykolyse für die ATP-Produktion energetisch weniger effizient ist als die oxidative Phosphorylierung, ermöglicht dieser Stoffwechselweg die Balance zwischen der Produktion von Energie und Biomasse in Tumorzellen. Durch die Bereitstellung von Glykolyseintermediaten werden mehrere anabolische Synthesewege mit Substraten versorgt, die zur Herstellung wichtiger Makromoleküle benötigt werden. Zu diesen anabolischen Seitenarmen der Glykolyse gehört, neben dem Pentose-Phosphat-Weg, insbesondere der Serinsyntheseweg, der in den letzten Jahren zunehmend als potenzielles Target zur gezielten Krebstherapie identifiziert wurde.

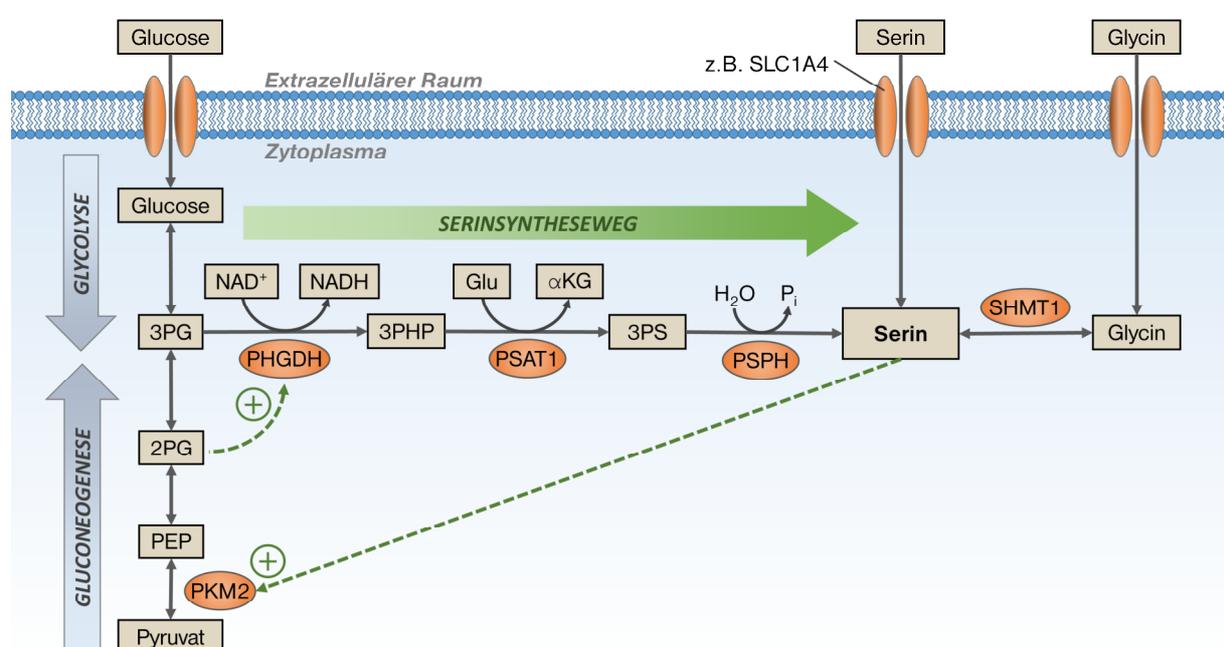


Abbildung 5 | Schematische Darstellung des Serinsyntheseweges als Seitenarm der Glykolyse. Das Glykolyseintermediat 3PG wird in drei Schritten zu Serin umgewandelt, die von den Enzymen PHGDH, PSAT1 und PSPH katalysiert werden. Als Coprodukte fallen während der Serinsynthese außerdem NADH und α KG an. Serin kann zudem durch verschiedene Aminosäuretransporter wie SLC1A4 importiert, oder aus Glycin hergestellt werden. Im Zytoplasma kann Glycin durch die Serinhydroxymethyltransferase 1 (SHMT1) zu Serin umgewandelt werden (SHMT2 in Mitochondrien). Durch hohe Serinkonzentrationen wird die Pyruvatkinase M2 (PKM2) aktiviert und sorgt so für einen erhöhten metabolischen Fluss der Glykolyse⁹³. 2PG wirkt als Aktivator auf PHGDH, sodass ein erhöhter metabolischer Fluss der Glykolyse auch die Serinsynthese hochreguliert⁹⁴. Modifiziert nach Yang & Vousden, Nat. Rev. Cancer (2016)⁹⁵.

Serin kann einerseits über verschiedene Transporter wie SLC1A4 (solute carrier family 1 member 4; auch Alanin/Serin/Cystein/Threonin-Transporter 1: ASCT-1) oder SLC1A5 (ASCT-2) von außen in die Zelle hineingelangen oder andererseits in Zellen *de novo* synthetisiert werden. Während SLC1A5 hauptsächlich für den zellulären Import von Glutamin genutzt wird, wird angenommen, dass SLC1A4 für einen Großteil des Serintransportes über die Plasmamembran zuständig ist^{96,97}. Bei der *de-novo*-Serinsynthese wird das

Glykolyseintermediat 3-Phosphoglycerat (3PG) in drei Schritten zu Serin umgewandelt (Abb. 5). Die Phosphoglycerat-Dehydrogenase (PHGDH) katalysiert den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Serinsyntheseweges, in dem unter Verwendung von NAD^+ als Cofaktor 3PG zu 3-Phosphohydroxypyruvat (3PHP) umgewandelt wird, wobei NADH als Nebenprodukt entsteht. Als nächstes katalysiert die Phosphoserintransaminase 1 (PSAT1) die Glutamat-abhängige Reaktion von 3PHP zu 3-Phosphoserin (3PS), bei der αKG als Nebenprodukt anfällt. Der letzte Schritt besteht in der Umwandlung von 3-Phosphoserin zu Serin durch die Phosphoserinphosphatase (PSPH)^{92,98,99}.

1.2.1 Beteiligung von Serin an zellulären Prozessen

Serin spielt eine wichtige Rolle für anabolische Prozesse in Zellen. Es ist zum einen wichtig für die Synthese von Glycin und die daran gekoppelte Aufrechterhaltung des Ein-Kohlenstoffzyklus, welcher Methylgruppen zur Modifizierung von Lipiden, Nukleinsäuren und Proteinen bereitstellt^{95,99-104}. Serin ist außerdem ein Vorläufer zur Synthese der Aminosäure Cystein, welches, zusammen mit Glycin und Glutamat zur Synthese von Glutathion benötigt wird, dass bei der Aufrechterhaltung der Redox-Homöostase eine entscheidende Rolle spielt und dabei speziell zum Abbau reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) benötigt wird^{105,106}. Außerdem werden aus Serin Vorläufermoleküle zur Synthese von Phosphatidylserin, Sphingomyelin und Cerebrosiden generiert, welche zur Wahrung der Integrität der Plasmamembran essenziell sind. In Abbildung 6 sind die wichtigsten metabolischen Wechselwirkungen schematisch dargestellt. Insbesondere für die Entwicklung und Instandhaltung des Gehirns spielen diese Moleküle eine wichtige Rolle und es wurde nachgewiesen, dass sowohl die *de novo*-Serinsynthese, als auch der SLC1A4-vermittelte Serinimport zur Serinversorgung im Gehirn beitragen. Hier ist die *de novo*-Serinsynthese von besonderer Wichtigkeit, da die Serinkonzentration im Liquor des ZNS durch die geringe Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke vergleichsweise gering ist und ein hoher Bedarf des Neurotransmitters D-Serin besteht, welcher durch die enzymatische Racemisierung von L-Serin gewonnen wird¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. Mehrere Studien demonstrierten die Wichtigkeit der Serinsynthese im Gehirn, indem sie zeigten, dass sich klinische PHGDH-Defizienzen durch Mutationen des *PHGDH*-Gens besonders auf die Serinkonzentration im Gehirn und in geringerem Maße auf die Konzentration im Plasma auswirken und so neurologische Entwicklungsstörungen hervorrufen^{107,110,111}. Das Ergebnis ist das sogenannte Serin-Mangel-Syndrom, welches bereits im Säuglingsalter einsetzt und klinisch durch psychomotorische und Wachstums-Retardierung, Mikroenzephalie und Krampfanfälle gekennzeichnet ist. Serinmangel wird zudem mit Krankheiten wie Alzheimer und Epilepsie in Verbindung gebracht^{107,110,112-114}. Auch der Import extrazellulären Serins durch SLC1A4 ist in diesem Zusammenhang von Bedeutung. So wurde nachgewiesen, dass Patienten mit Störungen des SLC1A4-abhängigen Serinimports durch *PHGDH*- und *SLC1A4*-Mutationen ähnliche klinische Phänotypen mit den entsprechenden neurologischen Symptomen ausbilden wie Patienten mit einem Serin-Mangel-Syndrom aufgrund einer PHGDH-Defizienz¹¹⁴⁻¹¹⁶.

1.2.2 Bedeutung der Serinsynthese bei Tumoren

Auch für das Wachstum von Tumoren spielt die *de novo*-Serinsynthese eine wichtige Rolle. So konnte nachgewiesen werden, dass der Serinsyntheseweg für einige Tumorarten, wie Brustkrebs und AML essenziell sind und dass ein signifikanter Anteil des metabolischen Flusses der Glykolyse in die Serinsynthese geleitet wird^{117,118}. An Mammakarzinomzellen, die PHGDH in hohem Maße exprimierten, konnte beispielsweise gezeigt werden, dass etwa 9% des Glykolyseintermediates 3-Phosphoglycerat (3PG) in den Serinsyntheseweg umgeleitet werden. Zudem kam dieser Stoffwechselweg für die Synthese von etwa der Hälfte des zellulären α KG auf, das bei der Umwandlung von 3PHP zu 3PS durch PSAT1 als Coprodukt gebildet wird (Abb. 5)¹¹⁷. Auch bei Gliomen ist davon auszugehen, dass der Serinsyntheseweg ein potenzielles Target zur gezielten Therapie darstellt. Es wird vermutet, dass Gliomzellen aufgrund der geringen Serinkonzentration im Gehirn überwiegend von der *de novo*-Serinsynthese abhängig sind und der Serinbedarf dieser rasch proliferierenden Zellen durch den Serin-Import alleine nicht gedeckt werden kann, um eine ausreichende Versorgung mit Nukleotiden, Lipiden und Proteinen, aber auch mit α KG, GSH und aktiven Einkohlenstoff-Einheiten zu gewährleisten¹¹². Insbesondere bei IDH-mutierten Gliomen ist eine erhöhte Abhängigkeit vom Serinsyntheseweg zu erwarten, da dieser große Mengen von α KG bereitstellt und hierdurch möglicherweise ein Teil des hohen α KG-Verbrauch kompensiert wird, der bei diesen Gliomen durch die neoenzymatische Aktivität von mutiertem IDH entsteht.

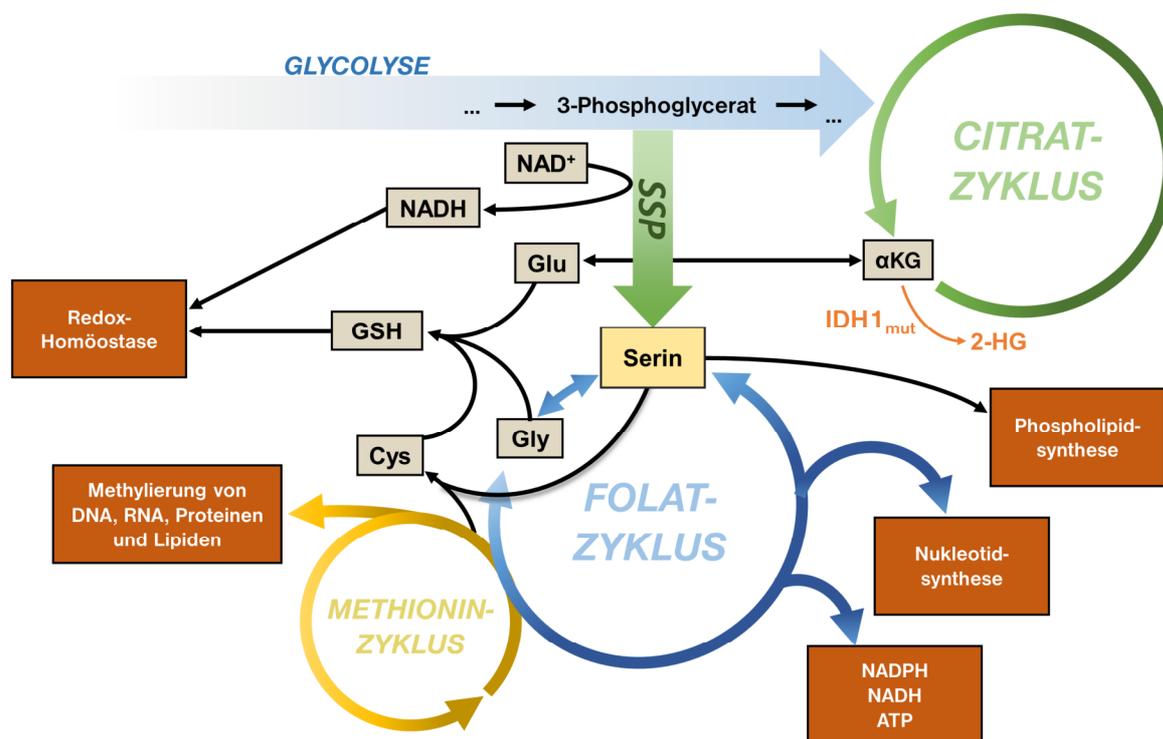


Abbildung 6 | **Übersicht des Serinmetabolismus und beteiligter Metabolite.** Serin ist die Grundlage zur Synthese von Phospholipiden und Cystein. Es wird als Teil des Folatzyklus unter Abgabe von Kohlenstoff-Einheiten zu Glycin umgewandelt, welches wiederum zur Synthese von Glutathion und Nucleinsäuren benötigt wird. Im Folatzyklus werden außerdem NADH, NADPH und ATP erzeugt. Der Folatzyklus ist an den Methioninzyklus gekoppelt, der neben der Cysteinsynthese auch für die Methylierung von DNA, RNA, Proteinen und Lipiden zuständig ist. Modifiziert nach Yang & Vousden, Nat. Rev. Cancer (2016)⁹⁵.

1.2.3 PHGDH als therapeutisches Target

PHGDH wird in einigen Tumorarten wie Melanomen und Mammakarzinomen häufig überexprimiert und ist oft mit besonders aggressiven Tumor-Subtypen assoziiert¹¹⁹⁻¹²². Aktuelle Studien zeigen, dass PHGDH, welches es den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Serinsynthese katalysiert, ein vielversprechendes Target zur Inhibition des Serinsyntheseweges darstellt^{98,100,104,106,117,123-129}. Beispielsweise liegt bei etwa 70% aller Östrogen-Rezeptor-negativen Mammakarzinomen ein erhöhtes PHGDH-Niveau vor und es wurde gezeigt, dass die Herunterregulierung von PHGDH per Knock-Down zu einer Wachstumsinhibition bei Mammakarzinomzellen mit hoher PHGDH-Expression führt^{98,117,130}. Mammakarzinomzelllinien, die wenig PHGDH exprimieren, sind hingegen resistenter gegenüber einem PHGDH-Knock-Down, was vermuten lässt, dass der Serinbedarf in diesen Zellen durch den Import von extrazellulärem Serin gedeckt werden kann^{117,120}. Es ist jedoch unklar, warum einige Zelllinien mehr auf die *de novo*-Serinsynthese und andere mehr auf den Serin-Import angewiesen sind. Auch für Glioblastome ist PHGDH von zentraler Bedeutung. So wird *PHGDH* in Astrozytomen generell wesentlich höher exprimiert als in normalem Hirngewebe, wobei die *PHGDH*-Expression mit erhöhtem Tumorgrad steigt¹²⁵. Bei einer Auswahl von Gliomzelllinien führte die Herunterregulierung von PHGDH per Knock-Down zu einer Verringerung der Proliferation und Invasivität *in vitro* und *in vivo*¹²⁵.

Die Entwicklung neuer, niedermolekularer PHGDH-Inhibitoren wie NCT-503 und CBR-5884 (Abb. 7) in den letzten Jahren ermöglichte eine genauere Untersuchung dieses Stoffwechselweges und erste Studien zeigten, dass beide Inhibitoren in der Lage sind, das Wachstum PHGDH-überexprimierender Brustkrebszelllinien zu inhibieren^{100,131}. CBR-5884 eignet sich jedoch nicht für den Einsatz *in vivo*, da dieser Inhibitor eine zu geringe Stabilität in Plasma aufweist¹³¹. Für NCT-503 konnte hingegen eine Wirksamkeit im Mausmodell *in vivo* nachgewiesen werden. Dabei wurde durch die Behandlung subkutaner humaner Xenograft-Tumore von PHGDH-hochexprimierenden Mammakarzinomzellen mit NCT-503 eine signifikante Verringerung des Tumorwachstums erreicht¹⁰⁰.

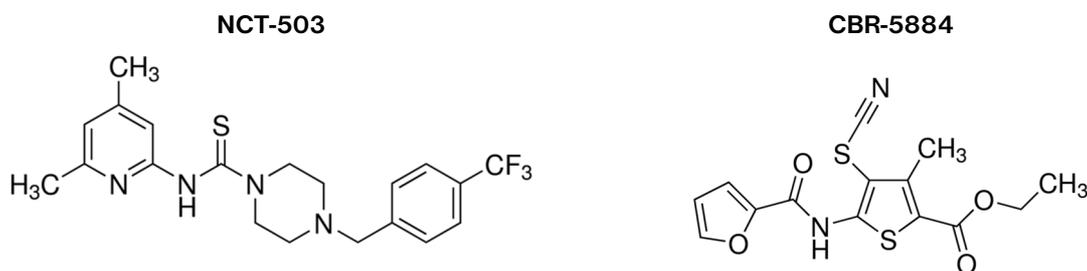


Abbildung 7 | Strukturformeln der PHGDH-Inhibitoren NCT-503 und CBR-5884. Quelle: Sigma-Aldrich/Merck

Darüber hinaus zeigen aktuelle Studien, dass PHGDH nicht nur zum Wachstum von Tumorzellen beiträgt, sondern auch Wirkstoffresistenzen vermittelt, die zudem durch die NCT-503-vermittelte PHGDH-Inhibition antagonisiert werden können. So wurde beispielsweise nachgewiesen, dass Erlotinib-Resistenzen bei Lungen-Adenokarzinomzellen durch die Zugabe von NCT-503 überwunden werden können⁷⁷. Zusätzlich wurde anhand von hepatozellulären Karzinomen (HCC) demonstriert, dass PHGDH

eine Wirkstoffresistenz gegenüber Sorafenib vermittelt, welche sich ebenfalls durch den Einsatz von NCT-503 überwinden ließ¹²⁴. Eine Studie an multiplen Myelomzellen zeigte außerdem, dass die Redox-Kapazität von Tumorzellen durch den Einsatz von NCT-503, sowie durch den shRNA-vermittelten PHGDH-Knock-Down signifikant reduziert wurde¹²⁶. In dieser Studie konnte durch die Kombinationstherapie mit NCT-503 eine signifikante Erhöhung der Wirksamkeit des Proteasom-Inhibitors Bortezomib erreicht werden.

Zusammenfassend wurde PHGDH bei mehreren Tumorarten als potenzielles Target für die gezielte Krebstherapie identifiziert und stellt aus verschiedenen Gründen auch für die gezielte Therapie von Gliomen ein vielversprechendes Target dar. IDH-mutierte Gliome sind in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse, da ihr stark modifizierter Metabolismus und ihr hoher Verbrauch von α KG im speziellen, Vulnerabilitäten darstellen, die eine erhöhte Abhängigkeit vom Serinsyntheseweg zur Folge haben könnten.

1.3 Tumorheterogenität und klonale Therapieresistenzen

1.3.1 Intratumorale Heterogenität als Ursache für Therapieresistenzen bei Tumoren

Wirkstoffresistenzen wurden schon vor langer Zeit als wichtige Ursache für das Scheitern von Therapien bei Krebspatienten identifiziert¹³². Intratumorale Heterogenität (im Weiteren als „Tumorheterogenität“ bezeichnet) wird dabei als eine der Hauptursachen für die Entwicklung von Therapieresistenzen angesehen und ist allgemein mit einer schlechten Prognose assoziiert¹³². Dieses Phänomen bezeichnet die Eigenschaft von Tumoren, innerhalb desselben Tumors eine Vielzahl von Tumorzellvarianten (Zellklone) auszubilden, die sich signifikant in verschiedenen Eigenschaften wie ihrer Morphologie, Proliferation, Migration oder Resistenz gegenüber bestimmten Therapien unterscheiden können. Bereits in vielen Studien konnte auf genetischer, transkriptomischer, epigenetischer und phänotypischer Ebene das Vorhandensein mehrerer Zellklone im selben Tumor nachgewiesen werden¹³³. Bei diffusen Gliomen konnte auch in einem klinischen Zusammenhang gezeigt werden, dass Tumorheterogenität und klonale Selektion eine signifikante Rolle bei der Ausbildung von Therapieresistenzen spielen und mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert sind¹³⁴.

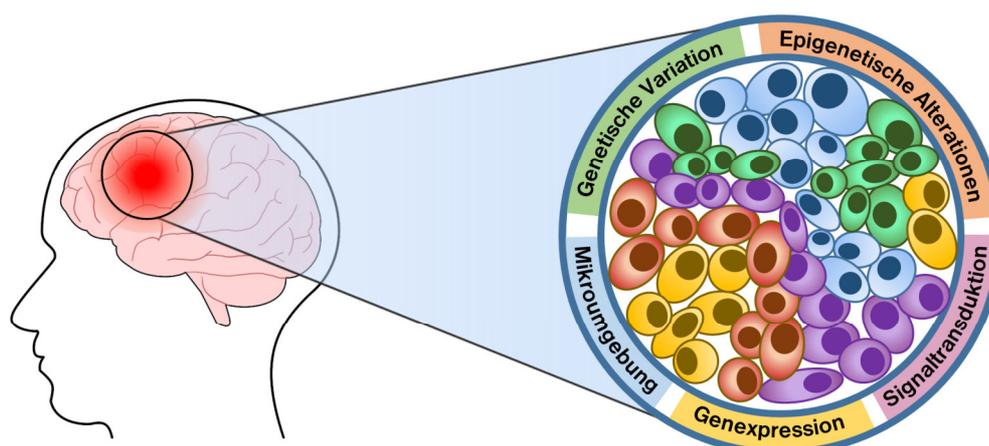


Abbildung 8 | **Modell für die räumliche intratumorale Heterogenität eines malignen Glioms.** Maligne Gliome, aber auch viele andere Tumore, bestehen aus vielen unterschiedlichen Zellklonen, die sich durch intrinsische Faktoren wie genomischen oder epigenetischen Alterationen und der Plastizität der Genexpression und Signaltransduktion unterscheiden können, aber auch durch extrinsische Faktoren wie ihre Mikroumgebung beeinflusst werden. Modifiziert nach Sun & Yu, *Acta Pharmacol. Sin.* (2015)¹³⁵.

Intratumorale Heterogenität entsteht als Ergebnis dynamischer Veränderungen in Tumoren, die vor allem im Verlauf der zunehmenden Malignisierung verstärkt auftreten. Als Ursachen für die Entstehung intratumoraler Heterogenität wurden im Laufe der Zeit bereits eine Vielzahl verschiedener Faktoren identifiziert. Diese umfassen insbesondere die genomische und epigenetische Instabilität von Tumorzellen, sowie auch andere Faktoren, wie die Anpassung des Zellmetabolismus an eine veränderte Mikroumgebung (z.B. Hypoxie) oder chemische Noxen (z.B. Chemotherapie)^{23,132,136–143}. Eine der meistuntersuchten Ursachen für intratumorale Heterogenitäten ist die genomische Instabilität von Tumorzellen, die gerade bei hochmalignen und fortgeschrittenen Tumoren häufig zu DNA-Mutationen und -Kopienzahlvariationen führt^{144,145}. Durch Ereignisse wie Punktmutationen, unkontrollierte DNA-

Rekombination und asymmetrische Zellteilungen wird dabei die Entstehung vieler individueller Zellklone begünstigt. Solche genetischen Alterationen können verschiedenste Auswirkungen auf diese Zellklone haben und ihre Überlebensfähigkeit und Proliferation beeinflussen. Werden durch diesen Prozess Zellklone generiert, die einen signifikanten Wachstumsvorteil gegenüber anderen Klonen haben, dann erlangen diese Klone langsam Dominanz und ihr Anteil in der Tumorzellpopulation erhöht sich mit der Zeit^{146,147}. Aber auch bei diesen Klonen kommt es durch genomische oder epigenetische Instabilität zur Ausbildung von Subklonen, sodass ein konstanter (wenn auch langsamer) Selektionsdruck auf die Tumorzellpopulation herrscht. Dieser Vorgang wird allgemein hin als „klonale Evolution“ oder „klonale Selektion“ bezeichnet und spielt eine zentrale Rolle für die Ausbildung von Wirkstoffresistenzen bei Tumoren¹⁴⁸⁻¹⁵⁴.

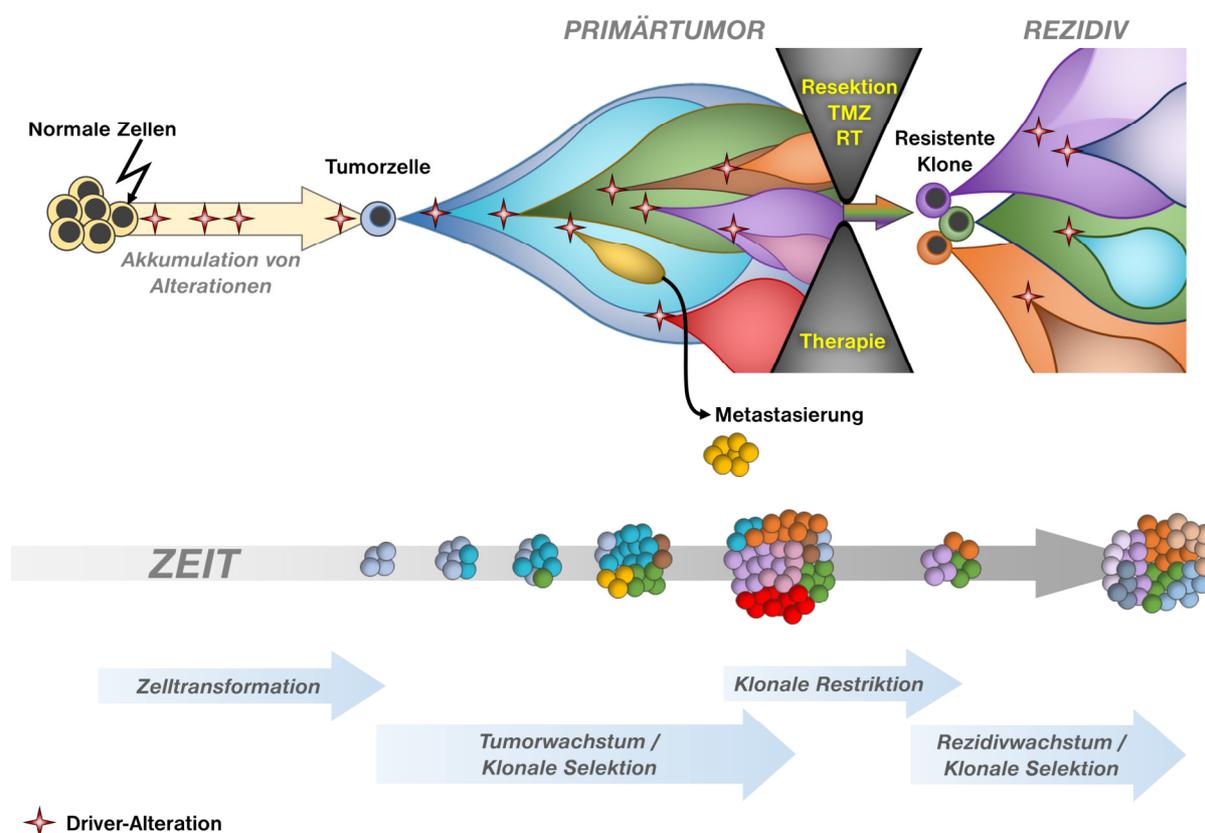


Abbildung 9 | Schematische Darstellung eines Modells für die klonale Evolution und Selektion bei Tumoren. Die Akkumulation genetischer und epigenetischer Driver-Alterationen kann zur malignen Transformation einer normalen Zelle zur Tumorzelle führen. Weitere Alterationen während des Tumorstadiums führen zur klonalen Diversifizierung des Tumors, was zur Progression und Metastasierung des Tumors beitragen kann. Die Behandlung des Tumors und die damit einhergehende klonale Restriktion überleben nur wenige resistente Klone, welche nach der Behandlung zu Rezidiven heranwachsen. Modifiziert nach Alizadeh et al., Nat. Med. (2015)¹⁵⁵.

1.3.2 Klonale Therapieresistenzen bei Tumoren

Wie das Modell in Abbildung 9 zeigt, kommt es durch die klonale Evolution des Tumors während des Tumorstadiums auch zur Bildung solcher Klone, die gegenüber spezifischen Therapien oder Wirkstoffen bereits initial, also zu Beginn der Behandlung, resistent sind. Solche resistenten Klone würden nicht nur die Behandlung überleben, sondern nach der Behandlung auch zu Rezidiven heranwachsen, die ebenfalls gegenüber dieser Therapie resistent wären. Eine erneute Behandlung mit derselben Therapie

hätte daher keine oder nur eine verminderte Wirkung auf ein solches Rezidiv^{138,150,152-154}. Neben der initialen (oder intrinsischen) Resistenz von Zellklonen ist es aber auch möglich, dass Klone erst während der Behandlung, bzw. durch die Behandlung Resistenzen aquirieren. Im Gegensatz zu initialen Resistenzen ist bei aquirierten Resistenzen also die Therapie selbst der Auslöser für deren Entstehung^{156,157}. Bei Glioblastomen kann beispielsweise nach der Behandlung mit TMZ eine erhöhte Anzahl von Mutationen in Rezidiven beobachtet werden¹⁵⁸. Es wäre also denkbar, dass diese DNA-Alterationen als Ergebnis der TMZ-Therapie entstehen und nicht allein durch intrinsische genomische Instabilität.

In der Tat konnte die Ausbildung klonaler Therapieresistenzen durch klonale Selektion schon mehrmals im klinischen Zusammenhang nachgewiesen werden. Einige Studien an Lungenkarzinomen identifizierten beispielsweise Resistenz-vermittelnde de novo-Genalterationen in therapierten Tumoren und konnten diese Alterationen mit niedrigen Allelfrequenzen bereits im Ursprungstumor vor der Therapie nachweisen^{147,159}. Damit konnte demonstriert werden, dass kleinere Populationen initial resistenter Klone bereits im Primärtumor zu finden sind und eine wesentliche Rolle bei der Rezidivierung von Tumoren spielen. Dies hat auch klinische Auswirkungen, da sogar kleine resistente Tumorzellpopulationen die Effektivität von Therapien drastisch senken können. So wurde zum Beispiel bei der Therapie von Lungenkarzinomen beim Vorhandensein selbst kleiner Zellpopulationen mit einer EGFR T790M-Mutation, die eine Resistenz gegenüber Erlotinib vermittelt, von der Therapie mit dem EGFR-Inhibitor Erlotinib abgeraten, da die Effizienz der Behandlung auch bei geringen Allelfrequenzen dieser Mutation deutlich gemindert war¹⁴⁷.

Auch bei Glioblastomen wurde beobachtet, dass die klonale Tumorevolution zur Bildung klonaler Therapieresistenzen führt. So wurde beispielsweise bei TMZ-behandelten Maus-Xenografttumoren aus Glioblastom-Primärzellen nachgewiesen, dass die Chemotherapie zur Expansion präexistierender Wirkstoff-resistenter Tumorzellklone beiträgt¹⁶⁰. Zudem wird vermutet, dass die geringe Effektivität der EGFRvIII-Peptidvaccine Rindopepimut auf die heterogene Verteilung dieser Mutation in der Tumorzellpopulation zurückzuführen ist⁷⁶. Da gezeigt werden konnte, dass diese Mutation auf genetischer und Protein-Ebene nur in Subklonen von Glioblastomen vorkommt¹⁶¹⁻¹⁶³ wird angenommen, dass durch Behandlung mit Rindopepimut genau diese Subklone selektiv abgetötet werden, während die restliche Zellpopulation nicht auf diese Behandlung anspricht.

Die zeitliche Veränderung der klonalen Komposition von Tumoren und die damit verbundene Bildung von Therapieresistenzen verdeutlicht, dass eine klinische Einschätzung der Heterogenität von Tumoren anhand einer einzigen Biopsie vor der Behandlung unzureichend ist und sie im Laufe der verschiedenen Behandlungsstadien regelmäßig überprüft werden muss. Da die genomische Komplexität von Tumoren mit der Durchführung mehrerer sequenzieller Therapieversuche zunimmt, muss damit gerechnet werden, dass die initiale Einschätzung der genomischen Landschaft eines Tumors nach der Durchführung einer Therapie nicht mehr aktuell ist^{133,142}.

1.3.3 Methoden zur Erforschung intratumoraler Heterogenität *in vitro* und *in vivo*

Da intratumorale Heterogenität einen negativen Einfluss auf jede denkbare Therapieform haben kann, ist die Erforschung ihrer Entstehung und ihrer Antagonisierung von besonderer Wichtigkeit für die Entwicklung neuer, effektiverer Krebstherapien. Die Verfolgung klonaler und subklonaler Tumorzellpopulationen *in vitro* und *in vivo* kann dabei Aufschluss über genetische und andere Veränderungen geben, die während der Tumorigenese, Progression und Rezidivierung eines Tumors akkumuliert werden. Bei der Messung intratumoraler Heterogenität unterscheidet man im Allgemeinen zwischen räumlicher und temporaler Heterogenität^{11,133}. Die räumliche Heterogenität meint die Ungleichverteilung unterschiedlicher Tumorzellsubpopulationen im selben Tumor, während mit dem Begriff der temporalen Heterogenität die zeitliche Veränderung der Tumorzusammensetzung im Hinblick auf zelluläre Subpopulationen (z.B. zwischen Primärtumoren und Rezidiven) bezeichnet wird. Die Analyse räumlicher Heterogenität erlaubt es, die Tumorigenese und Progression von Tumoren besser zu verstehen, während durch die Analyse temporaler Heterogenität wertvolle Informationen über die Tumorevolution und Therapieresistenzen gewonnen werden können.

Um die Entstehung und den Einfluss räumlicher und temporärer Tumorerheterogenität auf das Tumorzellwachstum und die Resistenzbildung in kontrollierten Umgebungen wie in Zellkultur oder in Tiermodellen zu untersuchen, ist eine stabile Markierung von Zellen über mehrere Generationen essenziell.

Eine der ersten Methoden, die hierfür entwickelt wurden, war das sogenannte genetische Barcoding oder DNA-Barcoding. Hierbei handelt es sich um ein rein DNA-basiertes Markierungssystem, bei dem durch virale Transduktion eine Vielzahl verschiedener, kurzer DNA-Sequenzen in Tumorzellen integriert werden^{150,164-166}. Dabei wird eine gleichzeitige Transduktion mit beliebig vielen verschiedenen DNA-Fragmenten durchgeführt, um eine zufällige Mehrfachmarkierung von Tumorzellen zu erreichen, wodurch einzigartige „DNA-Barcodes“ in transduzierten Zellen generiert werden. Diese Barcodes werden anschließend per DNA-Sequenzierung ausgelesen, um daraus das Verhältnis der einzelnen Klone zueinander zu berechnen. Bei Glioblastomzellen wurde diese Technik bereits erfolgreich angewendet, um die Bildung klonaler Resistenzen nach Therapie mit TMZ oder RTK-Inhibitoren zu verfolgen^{160,167}. So konnte beispielsweise bei der Therapie von Glioblastomzellen mit RTK-Inhibitoren mit Hilfe von DNA-Barcoding beobachtet werden, dass viele Klone einen Notch-abhängigen Persister-Phänotyp ausbildeten, der die Zellen in frühen Phasen der Behandlung schützte, während seltene Subklone spezifische genetische Alterationen akquirierten, was zum erhöhten Wachstum dieser Subklone führte.

Obwohl das DNA-Barcoding eine sehr genaue Verfolgung klonaler Dynamiken in Tumorzellpopulationen gewährleistet, ist eine optische Identifizierung einzelner Zellklone, zum Beispiel in Gewebeschnitten oder durchflusszytometrisch hiermit nicht möglich. Eine gut erforschte, stabile Methode zur optischen Markierung von Tumorzellen ist die DNA-Transduktion von Fluoreszenzgenen wie *GFP*, bei der Zellen auch nach dem Tumorzellwachstum *in vivo* noch verlässlich identifiziert werden können und die mittlerweile zum Standardrepertoire der meisten zellbiologischen Labore gehört. Allerdings ermöglicht eine Markierung mit einzelnen Fluoreszenzproteinen keine Analyse klonaler

Dynamiken von Zellpopulationen. Die gleichzeitige Verwendung mehrerer Fluoreszenzmarker ermöglicht jedoch die Generierung eines komplexeren Farbcodes. In den letzten Jahren wurde hierzu das sogenannte „RGB-Marking“ entwickelt, bei dem Zellen durch lentivirale Transduktion gleichzeitig und zufällig mit Genen verschiedener Fluoreszenzproteine in den Farben Rot (R), Grün (G) und Blau (B) markiert werden. Durch die gleichzeitige Transduktion aller drei Genabschnitte werden diese zufällig an die Zellen verteilt und in das Genom dieser Zellen integriert, sodass Zellen unterschiedlich viele Kopien dieser Gene erhalten, die an verschiedenen Orten im Genom integriert werden¹⁶⁸. Erhalten Zellen alle drei Fluoreszenzmarker, kann durch das Prinzip der additiven Farbmischung mit diesen drei Farben (ähnlich RGB Displays) eine große Anzahl verschiedener Farben entstehen, welche anschließend dazu genutzt werden kann diese Zellen und ihre Abkömmlinge („Klone“) zu reidentifizieren und über längere Zeiträume *in vitro* und *in vivo* zu verfolgen^{137,146,164,169-173}. Die apparente Farbe der Zellen ist dabei nicht nur von der Anzahl und dem Verhältnis integrierter Genkopien der jeweiligen fluoreszenten Proteine abhängig, sondern hängt auch vom Expressionsniveau dieser Proteine ab, welches je nach Integrationsort im Genom variieren kann. Somit ist es also nicht zwingend gegeben, dass Zellklone mit derselben Anzahl von Genkopien dieser Fluoreszenzgene auch dieselbe apparente Farbe besitzen, was zusätzlich zur Individualität der Markierung der Zellklone beiträgt.

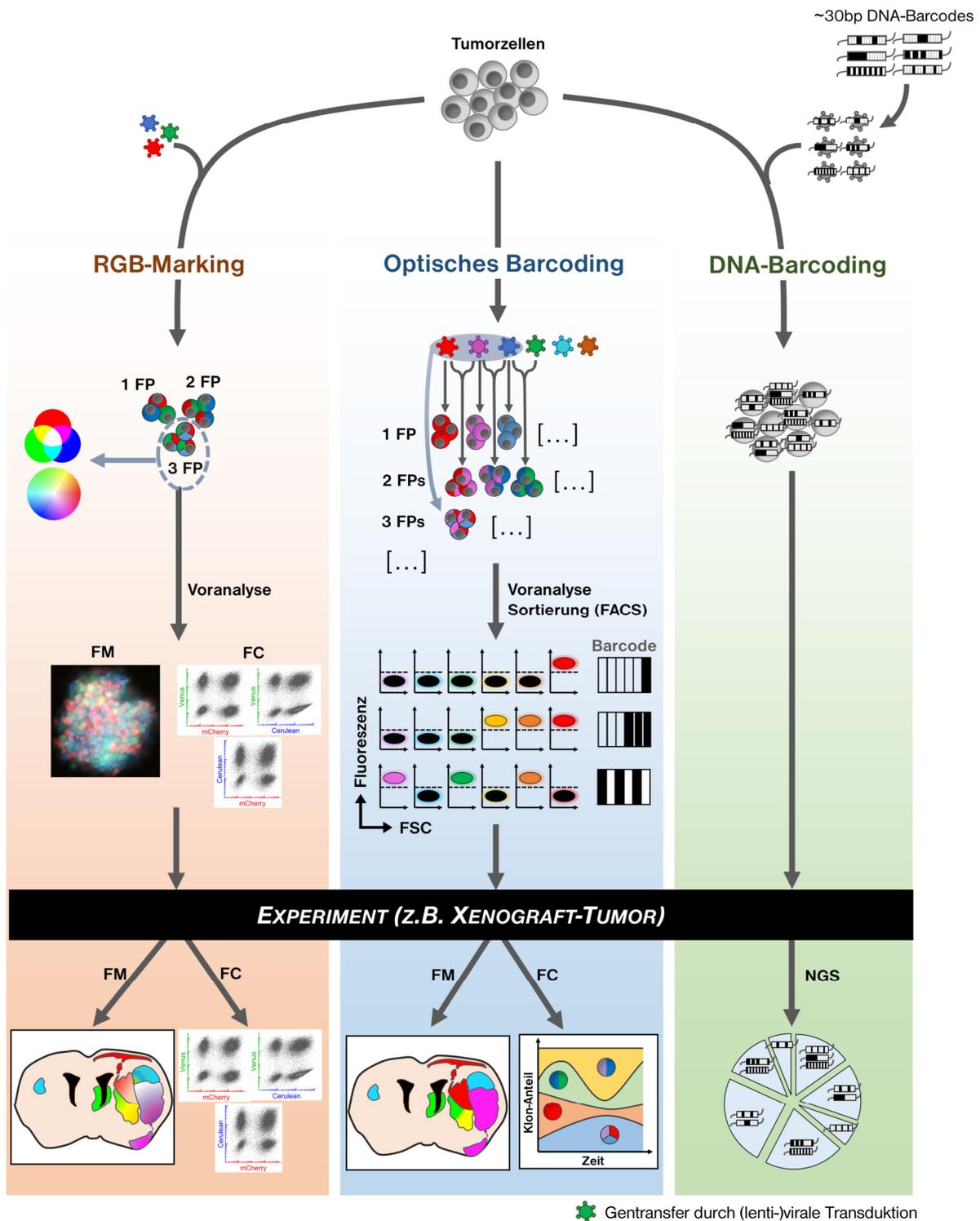


Abbildung 10 | Schematische Gegenüberstellung unterschiedlicher Markierungsmethoden für Zellklone, die zur Erforschung intratumoralen Heterogenität verwendet werden. Beim RGB-Marking werden Tumorzellen gleichzeitig mit drei verschiedenen Fluoreszenzmarkern (Rot, Grün, Blau) transduziert, die zufällig an die Zellen verteilt und in das Genom der Zellen integriert werden. Zellen, die sowohl rote, als auch grüne und blaue Fluoreszenzmarkierungen enthalten, können dabei durch additive Farbmischung alle Farbtöne des RGB (Rot/Grün/Blau)-Spektrums zeigen. Die apparenten Farben der Zellklone können fluoreszenzmikroskopisch *in vitro* und in Gewebeschnitten aus *in vivo*-Experimenten direkt beobachtet werden oder durchflusszytometrisch gemessen werden. Während zur Identifizierung von Klonen beim RGB-Marking auf ein kontinuierliches Farbspektrum im RGB-Farbraum gesetzt wird, wird beim optischen Barcoding eine Bibliothek von Klonen mit festgelegten, binären Farbkombinationen generiert. RGB-Marking und optisches Barcoding ermöglichen die fluoreszenzmikroskopische und durchflusszytometrische Analyse markierter Zellpopulationen, die jedoch beim optischen Barcoding durch die binäre Farbkodierung der Klone weniger komplex ist. Die Auswertung von DNA-Barcoding-Experimenten bedarf der Hochdurchsatz-DNA-Sequenzierung und einer komplexen bioinformatischen Analyse. Die Einbringung von DNA-Barcodes in Tumorzellen geschieht ebenfalls durch virale Transduktion. FP: Fluoreszenzprotein; FM: Fluoreszenzmikroskopie; FACS: Durchflusszytometrie.

Als Alternative zum RGB-Marking wurde außerdem das optische Barcoding entwickelt¹⁷⁴. Bei dieser Technik werden Zellklone durch die Kombination mit verschiedenen Fluoreszenzmarkern binärcodiert (Fluoreszenz: ja/nein), das heißt zur Identifizierung der Klone wird nur ihre Farbauswahl betrachtet und nicht die genauen Signalintensitäten einzelner Fluoreszenzmarker. So wurden beispielsweise in der Studie, in der diese Technik vorgestellt wurde, 41 Glioblastomzellklone durch die Kombination von bis zu 3 aus insgesamt 6 Fluoreszenzmarkern generiert, die sich *in vitro* und *in vivo* sowohl fluoreszenzmikroskopisch als auch durchflusszytometrisch eindeutig identifizieren ließen. Diese Methode ermöglicht somit eine quantitative Analyse einiger definierter Zellklone aus ganzen (3D-) Tumoren per Durchflusszytometrie. Im Gegensatz zu den anderen beiden Methoden werden beim optischen Barcoding oligoklonale Zellpopulationen durch die Expansion von Einzelzellen generiert und die entsprechenden Klone müssen erst einzeln isoliert und expandiert werden, bevor sie später in Versuchen gemischt und eingesetzt werden können. Diese Methode erlaubt die Verfolgung und robuste Identifizierung einer definierten Anzahl einzelner Zellklone mit optischen Verfahren, ist jedoch aufgrund der geringen Anzahl verfügbarer Klone für die Untersuchung klonaler Dynamiken nur bedingt geeignet, da insgesamt nur eine kleine Auswahl von Zellklonen gleichzeitig untersucht werden kann. Zur Durchführung dieses Verfahrens sind außerdem die technischen Voraussetzungen an das zu verwendende Durchflusszytometer recht hoch. Denn umso höher die Anzahl verwendeter Fluoreszenzmarker gewählt wird, desto mehr verkompliziert die Überlappung der Fluoreszenzspektren die Messung und Dekonvolution der verschiedenen Fluoreszenzkanäle. Je nach Anzahl und Art der verwendeten Fluoreszenzmarker müssen nicht nur die benötigten Laser und Filter vorliegen, sondern auch die entsprechende Anzahl von Messkanälen, bzw. Detektoren, um alle Fluoreszenzmarker gleichzeitig messen zu können.

Das RGB-Marking unterscheidet sich in einigen Punkten vom genetischen und optischen Barcoding und ist dabei gleichzeitig komplexer, aber auch vielseitiger. So ermöglicht das RGB-Marking im Gegensatz zum optischen Barcoding auch die Analyse klonaler Dynamiken vieler verschiedener Zellklone und eine effizientere Untersuchung klonaler Therapieresistenzen, da hierbei mit kompletten transduzierten Zellpopulationen gearbeitet wird, die im Vergleich zur limitierten Anzahl selektierter Zellklone beim optischen Barcoding eine wesentlich höhere Komplexität besitzen. Gegenüber rein DNA-basierten Techniken wie dem genetischen Barcoding bietet RGB-Marking den Vorteil, dass es mehrere Möglichkeiten zur Beobachtung markierter Zellen gibt. Einerseits ist es möglich Zell-Zell-Interaktionen und die räumliche Verteilung von Zellklonen durch Fluoreszenzmikroskopie rein visuell nachzuvollziehen. Dabei kann beispielsweise das Wachstum und die Migration bestimmter Tumorzellklone *in vivo* studiert werden, wie bereits am Beispiel von Leberkarzinom- und Osteosarkom-Xenograft-Modellen in Mäusen gezeigt wurde^{146,171}. Außerdem können Vorgänge auch an lebenden Zellen in Echtzeit verfolgt werden, was zum Beispiel beim DNA-Barcoding durch die Notwendigkeit der DNA-Sequenzierung und damit verbundenen Zerstörung der Zellen nicht möglich ist. Weiterhin ist es durch die fluoreszenzmikroskopische Identifizierung von Zellklonen in Gewebeschnitten auch möglich, diese detaillierter zu untersuchen. So war es zum Beispiel in einer kürzlich erschienenen Studie möglich, durch fluoreszenzmikroskopische Analysen einzelne Klone auf Gewebeschnitten von Maus-Xenografts zu identifizieren und anschließend massenspektrometrisch zu untersuchen. So konnte in dieser Studie

gezeigt werden, dass sich verschiedene Tumorzellklone nicht nur in ihren Fluoreszenzmarkierungen, sondern auch in ihren Protein-Profilen voneinander unterscheiden¹⁷².

Die Messung klonaler Dynamiken RGB-markierter Zellen kann zudem durchflusszytometrisch erfolgen. Hierdurch ist es möglich, die Fluoreszenzintensitäten jedes Markers für jede Zelle einzeln und sehr präzise zu bestimmen und so einen detaillierten Überblick über die Farbverteilung einer Zellpopulation, und damit auch ihre Heterogenität (verglichen mit der Ausgangszellpopulation) zu erhalten. Beispielsweise konnten hierdurch bereits klonale Dynamiken bei der Bildung von Osteosarkomen im Xenograft-Modell in Mäusen studiert werden¹⁴⁶. Diese Studie verdeutlichte jedoch gleichzeitig zwei fundamentale Probleme, die bei der durchflusszytometrischen Messung RGB-markierter Zellpopulationen auftreten. So gestaltet sich die quantitative Auswertung und Visualisierung komplexer, dreidimensionaler (Rot/Grün/Blau), durchflusszytometrischer Datensätze aufgrund des Fehlens geeigneter Analyseverfahren und zugänglicher Software als schwierig. Die Autoren der genannten Studie griffen daher auf eine sehr grobe Messung klonaler Dynamiken zurück, bei der Zellen anhand ihrer Farbkombinationen in insgesamt 12 Gruppen unterteilt und diese Gruppen anschließend quantifiziert wurden. Eine Verfolgung einzelner Klone konnte hiermit nicht erreicht werden. Zudem wurde versucht, die Ergebnisse anhand von dreidimensionalen Scatterplots zu visualisieren, die sich jedoch aufgrund ihrer Komplexität nur bedingt dazu eignen, klonale Farbverteilungen im zweidimensionalen Printformat verständlich darzustellen.

Ein vielversprechenderer Ansatz zur Visualisierung und Analyse einzelner Klone stammt aus der Arbeit von Wu et al. und stützt sich auf die Verwendung sogenannter sphärischer Scatterplots¹⁷⁵. Dabei handelt es sich um eine sphärische Projektion eines 3D-Scatterplots auf eine Kugel mit dem Radius 1. Dazu werden lediglich die Ursprungsvektoren aller Datenpunkte auf die Länge 1 normalisiert, wodurch alle Datenpunkte denselben Abstand vom Ursprung (0|0|0) erhalten und somit auf einer Kugel liegen. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, dreifarbige Zellklone anhand ihres Farbtons voneinander zu unterscheiden und Klone auf Basis ihrer Koordinaten auf dem sphärischen Scatterplot – oder dem „Chromatizitätsraster“, wie es auch genannt wird – zu definieren und zu identifizieren.

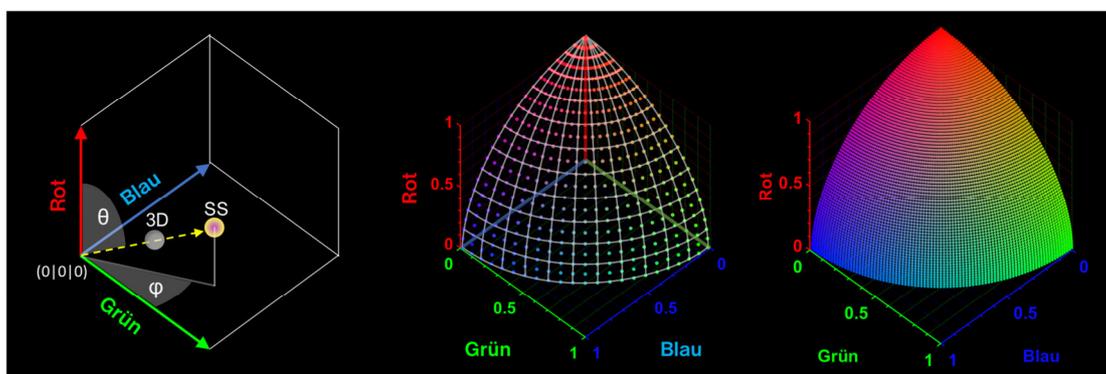


Abbildung 11 | Grundlagen der Darstellung durchflusszytometrischer Datensätze RGB-Markierter Zellen als sphärische Scatterplots. Dies kann als Projektion normalisierter Datenpunkte auf eine Kugel mit dem Radius 1 verstanden werden. Dabei werden die Koordinaten von Datenpunkten eines 3D-Scatterplots (3D) so verändert, dass sie die Länge 1 haben und damit auf dem sphärischen Scatterplot liegen (SS). Auch die Umwandlung der Lage der Datenpunkte auf dem Chromatizitätsraster (r.) lässt eine erste Einschätzung über die apparente Farbe von Zellklonen zu. Klone erscheinen als Datenpunktcluster auf dem sphärischen Scatterplot. Modifiziert nach Wu et al., *Sci. Rep.* (2016)

Allerdings zeigte dieser Ansatz trotz seines großen Potenzials einige Schwachstellen und wurde auch fünf Jahre nach seiner Vorstellung nie in anderen Studien adaptiert. Ein großes Hindernis bei der Anwendung der von Wu et al. vorgestellten Visualisierungs- und Analysetechniken stellt das Fehlen einer zugänglichen und leicht bedienbaren Software zur Analyse durchflusszytometrischer Daten dar. Obwohl in dieser Arbeit eine Reihe von Matlab-Skripten zur Analyse solcher Daten veröffentlicht wurde, fehlte es hier an vielen Funktionen, Effizienz und einfacher Bedienung. Weiterhin wurde in dieser Studie ausschließlich die Identifizierung von prädefinierten Klonen demonstriert, die aus vorsortierten Einzelzellen expandiert wurden. Dies suggerierte fälschlicherweise, dass mit diesem Ansatz nur die Analyse einer sehr begrenzten Anzahl von Klonen möglich war (hier waren es 15), die zudem erst einzeln voranalysiert werden mussten. Für derartige Zwecke stand allerdings mit dem optischen Barcoding bereits eine Technik zur Verfügung, mit der dies wesentlich effizienter, genauer, und mit wesentlich mehr Klonen erreicht werden konnte¹⁷⁶. Die Verwendung von RGB-Marking zur Generierung lediglich einiger weniger definierter Farbkclone ist aber auch deshalb für die meisten Arbeitsgruppen von geringem Interesse, da RGB-Marking in den meisten Studien zur Markierung und Verfolgung einer möglichst großen Anzahl von Klonen eingesetzt werden soll, um möglichst komplexe klonale Dynamiken (auch kleiner Subklone) zu untersuchen. Für solche Studien schien dieser Ansatz daher ungeeignet.

Trotz des großen Potenzials des RGB-Markings gibt es bislang noch keine Studien, in denen diese Methode zur Untersuchung klonaler Therapieresistenzen eingesetzt wurde, da es hierfür noch an Techniken, Metriken und Programmen zur quantitativen Analyse RGB-markierter Zellpopulationen sowie zur Isolierung resistenter Zellklone mangelt.

1.4 Zielsetzung

Diese Arbeit gliedert sich in zwei Teile, in denen einerseits die Rolle des Serinsyntheseweges bei Gliomen untersucht wurde und andererseits ein Verfahren zur Untersuchung intratumoraler Heterogenität und klonaler Therapieresistenzen entwickelt wurde, mit dem die Entwicklung klonaler Resistenzen infolge der gezielten Antagonisierung des Serinsyntheseweges bei Glioblastomen untersucht wurde.

Das Ausgangsziel des ersten Teils der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, welche Rolle der Serinsyntheseweg für das Wachstum von Glioblastomen spielt und ob die Inhibition der Serinsynthese einen möglichen Ansatz zur Therapie dieser Tumoren darstellt. Dazu sollte überprüft werden, ob die niedermolekularen PHGDH-Inhibitoren NCT-503 und CBR-5884 eine Wachstumsinhibition bei verschiedenen Gliomzelllinien bewirken können. Im Zuge dessen sollten außerdem die Wirkweisen beider Inhibitoren untersucht werden, um einerseits mögliche Unterschiede der Spezifität der Inhibitoren festzustellen und andererseits die Frage zu klären, welche Auswirkungen die PHGDH-Inhibition auf den Metabolismus von Gliomzellen hat, beziehungsweise welcher Aspekt der PHGDH-Inhibition ursächlich für die Wachstumsinhibition in Gliomzellen ist. Als potenzielle Wirkmechanismen sollten vor allem der Serinmangel selbst, aber auch die verringerte α KG-Produktion und die Induktion reaktiver Sauerstoffspezies untersucht werden, die infolge der PHGDH-Inhibition erwartet wurden. Gleichzeitig sollte überprüft werden, ob der Serintransporter SLC1A4 an der Ausbildung von Resistenzen gegen die PHGDH-Inhibition beteiligt ist. In diesem Zusammenhang sollte außerdem die Hypothese überprüft werden, dass IDH1-mutierte Gliomzellen durch ihren erhöhten Verbrauch von α KG eine erhöhte Sensitivität gegenüber PHGDH-Inhibition aufweisen könnten.

Zudem sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob es bei der Behandlung mit PHGDH-Inhibitoren zum Auftreten von klonalen Therapieresistenzen kommt. Denn bisherige gezielte Therapieansätze waren aufgrund solcher Resistenzen und intratumoraler Heterogenität nie in der Lage, alle Tumorzellen abzutöten bzw. das Tumorstadium vollständig zu unterbinden. Deshalb wurde parallel im zweiten Teil der Arbeit das Ziel verfolgt, Mechanismen und Dynamiken der Bildung klonaler Therapieresistenzen zu erforschen, um resistente Tumorzellklone in Zukunft besser identifizieren und analysieren zu können. Hierzu sollte ein Verfahren entwickelt werden, das es ermöglicht, klonale Resistenzen bei RGB-markierten Tumorzellen mittels Durchflusszytometrie zu erkennen und resistente Klone effizient zu extrahieren. Solche Klone könnten im Anschluss zur Entwicklung von Strategien für die Antagonisierung von Resistenzmechanismen eingesetzt werden und somit zur Verbesserung der Effizienz existierender Tumorthapien beitragen. Aufgrund des Fehlens einer spezialisierten FACS-Analysesoftware zur Durchführung dieses Verfahrens bestand ein Ziel dieser Arbeit zunächst in der Entwicklung solch einer Software, die eine präzise klonale Analyse RGB-markierter Zellpopulationen aus durchflusszytometrischen Datensätzen zulässt und gleichzeitig weitere Analyseverfahren beinhaltet, die eine Isolation ausgewählter Zellklone ermöglichen. Im Zuge dessen sollten außerdem neue Metriken entwickelt werden, die eine effektive Beschreibung und Quantifizierung klonaler Heterogenität in RGB-markierten Zellpopulationen erlauben. Anschließend sollte dieses Verfahren angewendet werden, um NCT-503- bzw. CBR-5884-resistente Zellklone aus Gliomzelllinien zu extrahieren und zu analysieren.

2 METHODEN

2.1 Zellkultur

2.1.1 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden neben 9 verschiedenen Gliomzelllinien auch 2 Adenokarzinomlinien und eine humane embryonale Nierenzelllinie verwendet. Alle GS-Linien (Tabelle 2) wurden im Labor für Hirntumorbiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) aus reseziertem Glioblastom-Tumorgewebe etabliert. NCH-Zelllinien wurden dankenswerterweise von Christel Herold-Mende (Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Bei BT112, BS153, U87, MDA-MB-468, MDA-MB-231 und HEK293FT handelte es sich um kommerziell erhältliche Zelllinien. Der Großteil der Versuche wurde mit den Zelllinien NCH644, NCH1681, NCH551b, NCH620, GS-57, GS-74, GS-86, GS-90 und GS-101 durchgeführt. BT112, BS153 und U87 wurden aufgrund ihrer Wachstumseigenschaften *in vivo* zur Etablierung eines Verfahrens zur Untersuchung von Tumorheterogenität mittels RGB-Markierung ausgewählt. Die Adenokarzinomzelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-468 wurden aufgrund ihrer vorigen Verwendung in Verbindung mit den PHGDH-Inhibitoren CBR-5884 und NCT-503 als Vergleichskontrollen zur Skalierung des PHGDH-Gehalts bei Gliomzelllinien verwendet. HEK293FT-Zellen wurden zur Produktion von replikationsdefizienten Lentiviren verwendet, mit denen anschließend die Transduktion von Genabschnitten zum Knock-Down von PHGDH und PSAT1, sowie zur RGB-Markierung von Gliomzellen durchgeführt wurde.

Tabelle 2 | **Verwendete Zelllinien, deren Ursprung und Wachstumsverhalten in Zellkultur, sowie die Angabe, ob sie in serumfreiem oder serumhaltigem Medium kultiviert wurden.**

Zelllinie	Spezies	Zellkultur	Medium	Ursprung
BT112	human	Neurosphären	Serumfrei	Glioblastom
BS153	human	Neurosphären	Serumhaltig	Glioblastom
NCH644	human	Neurosphären	Serumfrei	Glioblastom
NCH551b	human	Neurosphären	Serumfrei	Glioblastom (sekundär)
NCH620	human	Neurosphären	Serumfrei	Glioblastom (sekundär)
NCH1681	human	Neurosphären	Serumfrei	Astrozytom (WHO Grad III)
GS-57	human	Neurosphären	Serumfrei	Glioblastom
GS-74	human	Neurosphären	Serumfrei	Glioblastom
GS-86	human	Neurosphären	Serumfrei	Glioblastom
GS-90	human	Neurosphären	Serumfrei	Glioblastom
GS-101	human	Neurosphären	Serumfrei	Glioblastom
HEK293FT	human	Adhärent	Serumhaltig	Humane embryonale Nierenzellen
MDA-MB-468	human	Adhärent	Serumhaltig	Adenokarzinom, Brustkrebs
MDA-MB-231	human	Adhärent	Serumhaltig	Adenokarzinom, Brustkrebs
U87	human	Adhärent	Serumhaltig	Glioblastom

2.1.2 Kultivierung und Passagierung

Alle Zelllinien wurden im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Als Wachstumsmedium für U87-, HEK293FT-, MDA-MB-468- und MDA-MB-231-Zellen wurde DMEM mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (siehe Materialliste im Anhang) verwendet. Als Wachstumsmedium für alle weiteren Zelllinien wurde Neurobasal A Medium mit 1x B27 Supplement, 1x Glutamax, 20 ng/ml FGF, 20 ng/ml EGF, 32 IE/ml Heparin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin verwendet.

Zur Passagierung aller nicht-adhärenen Zelllinien (T75 Flaschen) wurden die Zellen bei 300 x g zentrifugiert und der Überstand wurde abgenommen. Das Zellpellet wurde entweder direkt in 1 mL Medium resuspendiert oder zuvor in 200 µL Accutase aufgenommen und für 5 Minuten bei 37°C dissoziiert. Anschließend wurde ein Teil der Zellen wieder in der Zellkulturflasche mit frischem, auf 37°C vorgewärmtem Medium ausgesät. Zur Passagierung adhärenter Zelllinien wurde zunächst das Medium von den Zellen abgesaugt und 1x mit PBS gewaschen. Zur Dissoziation der Zellen wurden diese bei 37°C mit 4 mL Trypsin/EDTA für 5 Minuten inkubiert. Zur Inhibition des Trypsins wurden dann 6 ml DMEM mit Zusätzen zugegeben und die Zellen wurden für 5 Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Medium resuspendiert und ein Teil der Zellen wurde wieder in frischem Medium ausgesät.

2.1.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden Zellen zunächst bei 300 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in dem entsprechenden Medium mit Zusatz von 10% DMSO aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen gefüllt, welches zum langsamen Einfrieren in einen -80°C Kühlschrank gestellt wurde. Nach dem Einfrieren wurden die Röhrchen entweder in flüssigen Stickstoff überführt oder bei -80°C gelagert.

Zum Auftauen von kryokonservierten Zelllinien wurden die Kryoröhrchen rasch aufgewärmt, dann schnell in ein 50 ml Röhrchen mit 10 ml vorgewärmtem Medium überführt und bei 300 x g 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 1 ml Zellkulturmedium aufgenommen und in eine vorbereitete Zellkulturflasche mit vorgewärmtem Medium überführt.

2.1.4 Zellzahlbestimmung

Vor dem Ausplattieren von Zellen für Experimente wurde eine Zellzahlbestimmung mittels Neubauer Zählkammer durchgeführt. Hierfür wurden Zellen wie in Abschnitt 2.1.2 beschrieben zunächst dissoziiert, wobei zur Dissoziation nicht-adhärenter Zelllinien stets Accutase verwendet wurde. Anschließend wurden die Zellen erneut abzentrifugiert, in Zellkulturmedium resuspendiert und in der Neubauer-Zählkammer manuell gezählt.

2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.1 Proteinextraktion aus Zellen und Bestimmung der Proteinkonzentration

Zellen wurden für 5 Minuten bei 300 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zellpellets wurden in RIPA-Puffer resuspendiert und die Zellen so lysiert. Lysate wurden für 30 Minuten bei 12.000 x g und 4°C zentrifugiert, die Überstände in neue Reaktionsgefäße transferiert und die Pellets verworfen. Zur Quantifizierung der Proteinkonzentrationen der Zellysate wurde der BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific) gemäß der Bedienungsanleitung des Herstellers verwendet.

2.2.2 SDS PAGE

Für die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese genutzt. Die Proben wurden mit einer Proteinkonzentration von 1 µg/µl in 1x Laemmli-Puffer angesetzt und für 5 Minuten auf 96°C erhitzt. Für die Elektrophorese wurden vorgefertigte 4-15% Gele (Bio-Rad) und die zugehörige Laufkammer von Biorad genutzt. Die Elektrophorese wurde bei 42 mA/Gel in Lauffpuffer durchgeführt. Durch die Verwendung des Precision Plus Protein Markers (BioRad) wurde die Laufgeschwindigkeit überprüft und der Lauf bei ausreichender Auftrennung abgeschlossen.

2.2.3 Immunoblotting (Western Blotting)

Die Nachweise von PHGDH, PSAT1, GLS, SLC1A4, IDH1wt und IDH1mut wurden per Western Blotting durchgeführt. Dazu wurde zunächst eine SDS PAGE durchgeführt und die Proteine wurden anschließend von dem SDS PAGE Gel per Elektrophorese auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Membran wurde dann für 30 min bei RT mit Blockierlösung (Roth) behandelt um unspezifische Bindungen von Antikörpern zu verhindern und 2x für 10 Minuten in TBST gewaschen. Die Erstantikörper wurden in folgenden Konzentrationen in 5% Trockenmilchpulver in TBST angesetzt und zugegeben: anti-PHGDH (Maus IgG, 1:2000), anti-PSAT1 (Maus IgG, 1:500), anti-SLC1A4 (Kaninchen IgG, 1:1000), anti-β-Aktin (Maus IgG, 1:1000). Nach einer 45-minütigen Inkubationszeit wurde die Membran 3x für 5 Minuten in TBST gewaschen und Sekundär-Antikörper wurden in folgenden Konzentrationen in 5% Milchpulver in TBST angesetzt und zugesetzt: Goat-anti-Rb-HRP (1:80.000), Rb-anti-Ms-HRP (1:40.000). Als Ladekontrolle wurde β-Aktin verwendet. Die Membran wurde 3x mit TBST gewaschen, kurz mit ddH₂O ausgespült und mit 2 ml frisch nach Gebrauchsanleitung hergestellter SuperSignal West Pico ECL Lösung (Thermo Fisher Scientific) versetzt. Anschließend wurde die Membran zusammen mit einem Röntgenfilm unter verschiedenen Expositionszeiten in einer Dunkelkammer inkubiert, der in einem entsprechenden Entwickler entwickelt wurde. Alternativ dazu wurde die Membran mit dem Biorad ChemiDoc Imager entwickelt. Zur Quantifizierung der Proteinbanden wurde eine densitometrische Analyse mit Fiji (ImageJ) durchgeführt. Dazu wurde das Graustufenbild der Membran in einzelne Laufrinnen unterteilt, und das Integral der entsprechenden Bande im densitometrischen Histogramm nach Abzug des Hintergrundes bestimmt und gegen die Ladekontrolle (β-Aktin) normalisiert.

2.3 Durchflusszytometrie und FACS

2.3.1 Durchflusszytometrie

Um die klonale Farbvielfalt in RGB-Markierten Tumorzellpopulationen bestimmen zu können, wurden die Fluoreszenzintensitäten aller eingesetzten Fluoreszenzmarker (Venus, Cerulean, mCherry) durchflusszytometrisch gemessen. Dabei werden Zellen einzeln durch einen schmalen Kanal in einer Messküvette geleitet, wo sie mit verschiedenen Lasern bestrahlt werden. Das Fluoreszenzlicht wird im 90°-Winkel zum Laser gemessen und vor der Quantifizierung des Signals durch optische Filter geleitet, um ungewünschte Wellenlängen, wie zum Beispiel die des Lasers selbst, herauszufiltern. Gleichzeitig werden auch die Vorwärtsstreuung (FSC) und Seitwärtsstreuung (SSC) der Zellen bei der Bestrahlung mit einem 488 nm Laser bestimmt, die ein Maß für die Größe (FSC) bzw. Granularität (SSC) der Zellen sind. Die durchflusszytometrischen Messungen wurden mit dem Fortessa LSR Durchflusszytometer (BD) und der dazugehörigen Software FACSDiva durchgeführt. Für die verwendeten Kanäle wurde folgende Laser- und Filterkonfiguration verwendet:

Tabelle 3 | Laser- und Filterkonfiguration zur Detektion der verwendeten Fluoreszenzmarker

Fluoreszenz	Laser	LP Filter	BP Filter
Blau	405 nm	leer	450/50 nm
Grün	488 nm	505 nm	530/30 nm
Rot	561 nm	600 nm	610/20 nm

Zur durchflusszytometrischen Analyse des CM-H2DCFDA-Assays (ROS-Assay) wurde das PAS-Durchflusszytometer von PARTEC und die Flomax Software verwendet.

2.3.2 Zellsortierung per FACS (fluoreszenzaktivierte Zellsortierung)

Das Sortieren von dreifarbigem, RGB-markierten Gliomzellen, sowie das Sortieren einzelner Klone und die Generierung von RGB-Oligoklonen wurde an einer Aria Illu (BD) FACS Sorting Unit durchgeführt. Zellen wurden hierfür wie in 2.1.2 beschrieben mit Accutase dissoziiert und in Vollmedium (NBM) resuspendiert. Es wurde die Filterkonfiguration aus Tabelle 3 verwendet. Zur Generierung dreifarbigem, RGB-markierter NCH1681- und NCH644 Zellpopulationen für Experimente zur Isolierung NCT-503- und CBR-5884-resistenter Zellklone (vgl. 3.4) wurden Fluoreszenz-positive Zellen in allen drei Kanälen ausgewählt („gated“) und anschließend sortiert. Die Sortierung von RGB-Oligoklonen wurde analog hierzu durchgeführt, jedoch wurden hierbei je 100 Zellen/Well in eine 96 Well Zellkulturplatte sortiert. Zur Sortierung einzelner Klone aus NCT-503 oder CBR-5884-behandelten NCH644- oder NCH1681-Gesamtzellpopulationen (vgl. 3.4.3) wurden die Zellpopulationen erst an der FACS Sorting Unit gemessen und die durchflusszytometrischen Daten mit ChromoClone ausgewertet. Nach der Auswahl entsprechender Klone und dem Setzen der entsprechenden Gates im „GateFinder“-Subprogramm der ChromoClone Software wurden die Gating-Koordinaten manuell auf die FACS Sorting Unit übertragen und sortiert. Zur Sortierung von „Kontrollklonen“ wurden die Gating-Koordinaten des entsprechenden resistenten Klons verwendet, der aus der Kontroll-Gesamtpopulation sortiert werden sollte.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Plasmidpräparation von shRNA-Vektoren aus *E. coli*

Da die pGIPZ-shRNA-Vektoren für den PHGDH- und PSAT1-Knock-Down in Form von *E. coli*-Glycerolstocks geliefert wurde, wurde zunächst eine Plasmidpräparation durchgeführt, um die Vektoren später zur Transduktion in HEK293-FT-Zellen und zur Generierung lentiviraler Partikel verwenden zu können. Hierfür wurden Übernachtskulturen der verschiedenen *E. coli*-Glycerolstocks in 2x LB-Medium (low salt) mit 100 mg/ml Ampicillin angesetzt und bei 37°C im Inkubationsschüttler inkubiert. Am Folgetag wurden aus diesen Kulturen die Plasmide mit dem NucleoBond Xtra Maxiprep-Kit (Macherey Nagel) gemäß der Gebrauchsanweisung des Herstellers präpariert. Zur Qualitätskontrolle wurden die isolierten Plasmide einem SacII-Restriktionsverdau (New England Biolabs) gemäß Herstellerangaben unterzogen und mittels Agarose-Gelelektrophorese (1% Agarose in TAE-Puffer, 0,5 µg/ml Ethidiumbromid, 100 V, 30 min) analysiert.

2.4.2 Sequenzierung eines IDH1-Genabschnittes zur Feststellung des IDH1-Mutationsstatus

Zur Bestimmung des *IDH1*-Mutationsstatus wurde bei den Zelllinien NCH620 und NCH551b eine Sequenzierung des IDH1-Genabschnittes, auf dem diese Mutation liegt, durchgeführt. Zur DNA-Isolierung wurden die Zellen zunächst bei 300 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Aus dem Zellpellet wurde die DNA mit dem NucleoSpin™ Tissue XS Kit (Macherey-Nagel) nach dem Protokoll des Herstellers isoliert. Die Nukleinsäurekonzentration wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie mit dem NanoDrop Photospektrometer (Thermo Fisher Scientific) durch Absorptionsmessung bei 260 nm und anschließender Berechnung nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz ermittelt. Die Amplifizierung des DNA-Abschnittes erfolgte per Polymerasekettenreaktion (PCR). Für die hier durchgeführten PCR-Reaktionen wurde das Phusion® High-Fidelity PCR Kit (Thermo Fisher Scientific) entsprechend der Bedienungsanleitung des Herstellers verwendet. Für die 50 µL PCR Ansätze wurden 240 ng (NCH551b) bzw. 280 ng (NCH620) Template-DNA eingesetzt. Die Primer wurden so designed, dass sie einen etwa 500 bp langen Abschnitt auf Exon 4 des IDH1 Gens um Codon 132 amplifizieren, auf dem die Mutation liegt. Außerdem wurden die Primersequenzen so gewählt, dass sie eine Länge von 20-25 bp besitzen, sowie eine ähnliche Schmelztemperatur (T_m) von 60-65°C. Zur Berechnung von T_m wurde das webbasierte Tool „ T_m Calculator“ von Thermo Fisher Scientific genutzt. Die Primer wurden bei der GATC Biotech AG (mittlerweile Teil von Eurofins Scientific, Luxemburg) hergestellt. Die Annealing-Temperatur von 67°C wurde bei einem Vorversuch bestimmt, nachdem eine Annealing-Temperatur von 61,5°C zu langen, unspezifischen Produkten führte.

Um die DNA-Matrize, sowie alle genomische DNA nach der PCR aus dem Ansatz zu beseitigen, wurde ein DNA-Verdau mit der Endonuklease DpnI durchgeführt. Anschließend wurden die PCR-Produkte mit dem NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel) gereinigt. Für die Sequenzierung wurden Ansätze aus jeweils 250 ng PCR-Produkt und 25 pmol IDH1_R132_for Primer hergestellt.

Tabelle 4 | PCR-Programm für die Amplifizierung eines *IDH1*-Genabschnittes zur Evaluierung des *IDH1*-Mutationsstatus

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	98°C	30s	1
Denaturierung	98°C	10s	
Annealing	67°C	30s	30
Verlängerung	72°C	20s	
Finale Verlängerung	72°C	5 min	1
	4°C	halten	

Tabelle 5 | Primer zur Amplifizierung des mutierten *IDH1(R132H)*-Genabschnitts mittels PCR

Name	Sequenz	T _m	Annealing-Temp.
IDH1_R132_for	TGAGCTCTATATGCCATCACTGC	65,2°C	67°C
IDH1_R132_rev	CAATTCATACCTTGCTTAATGGG	61,5°C	67°C

2.4.3 Genomweite DNA-Methylierungsanalyse

Zur Charakterisierung von Gliomzelllinien wurden genomweite DNA-Methylierungsprofile dieser Zelllinien erstellt. Diese sollten einerseits zur Bestimmung des Tumorsubtyps und MGMT-Status nach Capper et al.⁸ bzw. Bady et al.¹⁵, sowie dem Vergleich der Zelllinien untereinander verwendet werden. Andererseits sollten die DNA-Methylierungsprofile auch zur Erstellung genomischer Kopienzahlprofile (CNV-Profile; copy number variation profiles) genutzt werden¹⁷⁷. CNV-Profile wurden unter anderem zur Bestimmung der *IDH1*-Kopienzahl bei *IDH1*-mutierten Zelllinien, sowie zur Bestimmung der *EGFR*-Kopienzahl und zur Bestimmung der Kopienzahl von Schlüsselgenen der Serinsynthese wie *PHGDH*, *PSAT1* und *SLC1A4* eingesetzt. Zur Bestimmung globaler DNA-Methylierungsprofile wurden Infinium MethylationEPIC Arrays (850K, Illumina) verwendet. Die DNA-Extraktion aus den verwendeten Zelllinien wurde mit dem NucleoSpin™ Tissue XS Kit (Macherey Nagel) gemäß der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Reinheit der erhaltenen DNA wurde mit dem NanoDrop-Photospektrometer (Thermo Fisher Scientific) überprüft. Die Bisulfit-Behandlung, gesamtgenomische DNA-Amplifikation, Einzelbasenerweiterung, Fluoreszenzfärbung und das Scannen der Chips wurde gemäß der Gebrauchsanweisung des Herstellers (Illumina) im Institut für Neuropathologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (AG Schüller) durchgeführt.

2.5 Zellbiologische Methoden

2.5.1 Messung von Dosis-Wirkungs-Kurven der *PHGDH*-Inhibitoren NCT-503 und CBR-5884

Zur Bestimmung der Sensitivität der verwendeten Zelllinien gegenüber den *PHGDH*-Inhibitoren NCT-503 und CBR-5884 wurden 500-3.000 Zellen/Well in einer 96-well-Zellkulturplatte in 100 µL Vollmedium (NBM, DMEM bei adhärennten Zelllinien) ausgesät. Weiter wurden 500 µM Lösungen beider Inhibitoren in Vollmedium hergestellt und alle 5x Konzentrationen der Inhibitoren durch serielle 1:2-Verdünnung dieser Lösung mit Vollmedium erzeugt. Am Tag nach dem Aussäen der Zellen wurden je 25 µL der 5x Konzentrationen zu den entsprechenden Wells hinzugegeben, geschüttelt und weiter inkubiert. Am Tag 4 nach Zugabe der Inhibitoren wurden je 100 µL CellTiterGlo zugegeben und die Zell-Viabilität am Plattenlesegerät gemessen. Die EC₅₀-Werte wurden wie in Abschnitt 2.8.1 beschrieben bestimmt.

2.5.2 Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in lebenden Zellen

Zur Bestimmung der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in Tumorzellen nach Zugabe von NCT-503 und CBR-5884 wurde der ROS-Indikator Chloromethyl-2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetat (CM-H₂DCFDA) verwendet. Dabei handelt es sich um ein Chloromethylderivat von H₂DCFDA, welches eine höhere Retention in lebenden Zellen zeigt. CM-H₂DCFDA kann passiv in Zellen perfundieren, wo dessen Acetylgruppen von intrazellulären Esterasen abgespalten werden und die thiol-reaktive Chloromethylgruppe mit intrazellulärem Glutathion und anderen Thiolen reagiert. Durch die anschließende Oxidation reagiert das nicht-fluoreszierende Edukt zu einem stark fluoreszierenden 2',7'-Dichlorofluorescein(DCF)-Derivat, welches in den Zellen eingeschlossen ist, was die Durchführung von Langzeitstudien ermöglicht. Mit CM-H₂DCFDA werden hauptsächlich Hydroxylradikale und Peroxynitritanionen nachgewiesen, allerdings ist auch der indirekte Nachweis von Singulett-Sauerstoff durch dessen Reaktion mit zellulären Substraten und der damit einhergehenden Generierung von Peroxidradikalen möglich.

Dazu wurden etwa 20.000 Zellen/well in einer 24-well-Zellkulturplatte ausgesät und für 24 h inkubiert bevor NCT-503 oder CBR-5884 in einer finalen Konzentration von 80 µM zugegeben wurden. Zu den Zeitpunkten 0 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 24 h, 48 h und 72 h wurden die Ansätze in 1 mL Eppendorf-Reaktionsgefäßen für 5 min bei 300 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 500 µL Indikatorlösung (PBS+5 µM CM-H₂DCFDA) aufgenommen und für 30 min bei 37°C inkubiert und erneut für 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1 mL PBS aufgenommen und am Durchflusszytometer gemessen.

2.5.3 Untersuchung des Einflusses von GSH, NAC, dm-α KG und L-Serin auf den wachstumsinhibitorischen Effekt von NCT-503 und CBR-5884

Zur Bestimmung des Einflusses von L-Serin, dm-αKG, GSH und NAC auf die Wachstumsinhibierende Wirkung der PHGDH-Inhibitoren NCT-503 und CBR-5884 wurden zunächst 500-3.000 Zellen/Well in einer 96-well-Zellkulturplatte in 100 µL Vollmedium (NBM, DMEM bei adhärenen Zelllinien) ausgesät und für 24 h im Zellinkubator inkubiert. Dann wurden 400 µM Lösungen der Wirkstoffe in Vollmedium, inklusive der zu Untersuchenden Stoffe (5 bzw. 50 mM L-Serin, dm-αKG, GSH, NAC) angesetzt und je 25 µL dieser 5x-konzentrierten Lösungen wurden pro well zugegeben und weiter inkubiert. Am Tag 4 nach Zugabe der Inhibitoren wurden je 100 µL CellTiterGlo® zugegeben und die Lumineszenz am Plattenlesegerät gemessen und so die Zellviabilität bestimmt.

2.5.4 Generierung eines PHGDH- und PSAT1-Knock-Downs bei NCH644-Zellen

Zur Durchführung von PHGDH und PSAT1-Knock-Downs bei NCH644-Zellen für wurden je 4 verschiedene pGIPZ shRNA-Vektoren gegen PHGDH (shPHGDH) und PSAT1 (shPSAT1) von Thermo Fisher Scientific bezogen. Als Kontrolle wurde ein unspezifischer, nicht-inhibierender shRNA-Vektor verwendet (non-silencing). Die lentivirale Transduktion dieser Vektoren in NCH644-Zellen wurde mit dem „ViraPower™ Lentiviral Expression System“ (Invitrogen) entsprechend der Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Herstellung replikationsdefizienter Lentiviren wurden HEK293FT-Zellen genutzt. Zur

Selektion transduzierter Zellen wurde Puromycin (1 µg/ml) verwendet. Nach der Insertion der Zielsequenzen in NCH644-Zellen exprimieren diese genspezifische small-hairpin-RNAs (shRNAs), die durch RNA-Interferenz einen Abbau der Ziel-RNA (in diesem Fall PHGDH- bzw. PSAT1-mRNA) bewirken. Dies führt folglich zu einer Verringerung der Proteinsynthese des entsprechenden Zielproteins. Da die shRNA-Sequenzen sehr genspezifisch sind, beschränkt sich der Effekt üblicherweise auf die Expression des untersuchten Gens.

2.5.5 RGB-Markierung von Gliomzelllinien

Um die Identifikation und Isolation einzelner Klone der verwendeten Gliomzelllinien *in vitro* und *in vivo* zu ermöglichen und die klonale Dynamik dieser Zelllinien, z.B. während der Behandlung mit Inhibitoren verfolgen zu können, wurden sie per RGB-Markierung (Rot-Grün-Blau-Markierung) fluoreszenzmarkiert. Hierbei wurden Gene der fluoreszierenden Proteine mCherry (rot), Venus (grün) und Cerulean (blau) unter Verwendung der Vektoren pLeGO-mCherry, pLeGO-Venus und pLeGO-Cerulean durch gleichzeitige lentivirale Transduktion in Gliomzellen eingebracht und das Prinzip der additiven Farbgebung genutzt, um Zellen mit einzigartigen Farben (bzw. Farbkombinationen) zu markieren. Die Transduktion der Gliomzelllinien wurde mit einer MOI (multiplicity of infection) von 3, 10 und 30 durchgeführt. Die transduzierten Zellen wurden dann mit 1 µg/µl Puromycin selektiert, sodass nicht-markierte Zellen aus der Zellpopulation entfernt wurden. Die gleichzeitige Markierung der Zellen mit allen drei Fluoreszenzmarkern sorgt dafür, dass jede Zelle eine zufällige Kombination dieser Marker erhält. Durch die unterschiedlichen Mengen, Kombinationen und Insertionsstellen der eingefügten Fluoreszenzgene wird eine individuelle Farbmarkierung der Zellen erreicht, die zudem an Tochterzellen weitergegeben wird. So lassen sich auch die Nachkommen dieser Zellen noch über viele Generationen identifizieren¹⁶⁹.

Nach der ein- bis zweiwöchigen Expansion RGB-markierter Zellen wurden diese durchflusszytometrisch gemessen und mit Hilfe der in dieser Arbeit vorgestellten ChromoClone-Software analysiert, um die optimale MOI zu bestimmen, mit der in weiteren Experimenten gearbeitet werden sollte (vgl. Abschnitt 3.4.1). Dabei wurde einerseits ein hoher Anteil dreifarbigiger Zellen und andererseits ein möglichst weiter Farbraum angestrebt. Die RGB-Markierung der Gliomzellen erfolgte in Kooperation mit PD Dr. Kristoffer Riecken und Prof. Boris Fehse aus der Klinik für Stammzelltransplantation am Zentrum für Onkologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

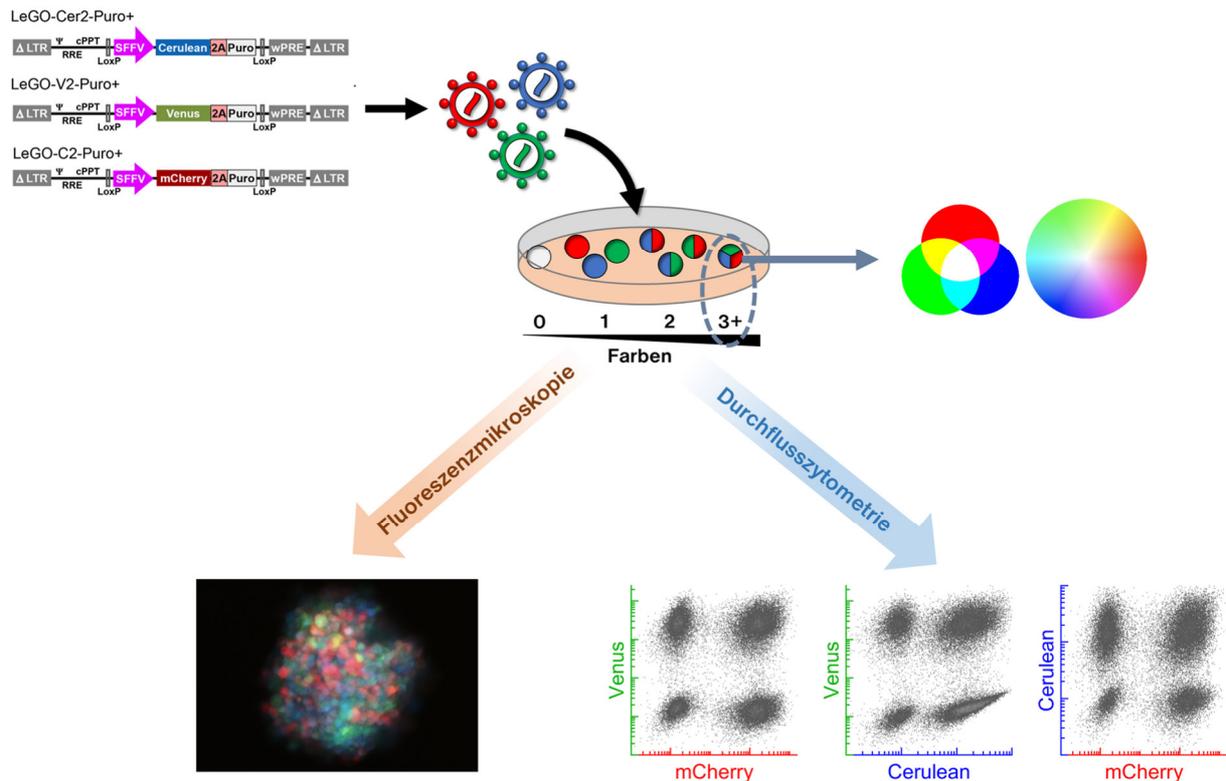


Abbildung 12 | **Prinzip der RGB-Markierung von Tumorzellen.** Schematische Darstellung der lentiviralen Transduktion zur RGB-Markierung von Zellen. Die resultierende Zellpopulation enthält Zellen, die mit 0 bis 3 Farben markiert sind. Durch das Prinzip der additiven Farbmischung lassen sich Zellen generieren, die eine beliebige Farbe im sichtbaren Farbspektrum besitzen. Oben links dargestellt ist der Aufbau des lentiviralen Vektors aus dem pLeGO-Plasmid, das zur RGB-Markierung genutzt wurde. Der jeweilige Marker (Venus, Cerulean oder mCherry) und ein SFV-Promoter sind in LoxP-Translokationsstellen eingefasst, über die dieser Abschnitt in das Genom der Wirtszelle eingebracht wird. Unten links: RGB-markierte Neurosphäre von NCH644-Zellen. Modifiziert nach Maire et al., *J. Clin. Invest.* (2020).

2.6 Tierexperimentelle Methoden

2.6.1 *In vivo*-Injektion von Tumorzellen

Um die Wirkung von NCT-503 auf Gliome *in vivo* zu untersuchen, wurden orthotope Xenograft-Tumore von NCH644- bzw. NCH1681-Gliomzellen in immundefizienten $Foxn1^{nu/nu}$ -Mäusen generiert. Außerdem sollte zur Untersuchung der Tumorerogenität das Wachstum und die Entwicklung der klonalen Dynamik orthotoper BT112-RGB-, BS153-RGB- und U87-RGB-Tumoren in immundefizienten $Foxn1^{nu/nu}$ -Mäusen untersucht werden. Hierfür erhielten die Tiere zunächst eine Vollnarkose durch intraperitoneale Injektion von Ketamin (120 mg/kg) und Xylazin (16 mg/kg). Die Kopfhaut wurde desinfiziert und der Kopf in der Stereotaxievorrichtung fixiert. Nach Eröffnen der Kopfschwarte durch einen sagittalen Mittellinienschnitt wurde das Bregma identifiziert. Die Bohrlochstelle lag 2,5 mm lateral und 1 mm anterior des Bregmas und wurde mit einer sterilen Kanüle eröffnet. Durch dieses Bohrloch erfolgte dann über 5 min die Injektion der Tumorzellen (NCH644, BT112-RGB, BS153-RGB, U87-RGB: 100.000 Zellen; NCH1681: 200.000 Zellen in einem Gesamtvolumen von 5 μ l) in das Caudatum/Putamen mit einer Hamilton-Spritze. Anschließend wurde die Kopfhaut mit einem chirurgischen Histoacrylkleber verschlossen.

2.6.2 Implantation von Führungsschrauben (Guide Screws) zur täglichen lokalen Injektion von Wirkstoffen in das Caudatum/Putamen

Um eine tägliche lokale Injektion des Wirkstoffes NCT-503 oder Vehikellösung zu gewährleisten, wurden sogenannte Guide Screws verwendet¹⁷⁸⁻¹⁸⁰. Die Guide Screw ist eine Hohlschraube, die insgesamt nur 2,6 mm lang ist und damit gerade oberflächlich dem Hirn aufliegt. Dieser Port ähnelt z.B. einem Rickham-Reservoir, das bei Hirntumorpatienten unter die Kopfhaut gelegt werden kann, und bleibt während der gesamten Versuchsdauer in der Kalotte verankert. Durch diesen Kanal, der durch das Zentrum der Schraube verläuft, können Testsubstanzen mit einer Hamilton-Spritze exakt in das Tumorzentrum injiziert werden.

Die Implantation der Guide Screws (Fa. Plastics One, Roanoke, VA, USA) erfolgte eine Woche (NCH644) bzw. 6 Wochen nach der intrakraniellen Injektion der Gliomzellen. Zur Implantation der Führungsschrauben erhielten die Mäuse eine Vollnarkose durch die intraperitoneale Injektion von Ketamin (120 mg/kg) und Xylazin (16 mg/kg) oder durch Gasnarkose mit Isofluran. Nach Eröffnen der Kopfschwarte durch einen sagittalen Mittellinienschnitt wurde das Bregma identifiziert. Die Bohrlochstelle liegt 2,5 mm lateral (rechts) und 1 mm anterior des Bregmas und wurde zunächst durch eine kleine Ritzung mit einer sterilen Kanüle am Knochen markiert. Dann wurde mit einem sterilen Spezialhandbohrer (Fa. Plastics One) an der markierten Stelle ein Loch durch die Schädelkalotte gebohrt. In dieses Loch wurde die sterile Guide Screw perpendikulär in die Schädelkalotte eingeschraubt und die Haut mit Gewebekleber partiell readaptiert. Zur Linderung post-operativer Schmerzen bekamen die Tiere noch während der Narkose Carprofen (Rimadyl) 5 mg/kg s.c. verabreicht, sowie postoperativ 25 mg Novalgin in 20 ml Trinkwasser über 3 Tage. Dieser Eingriff wurde erfahrungsgemäß hervorragend vertragen, und die Mäuse verhielten sich nahezu sofort nach Aufwachen aus der Narkose wieder wie zuvor.

2.6.3 Lokale Applikation von NCT-503/Vehikellösung durch Guide Screws

Die Applikation von NCT-503 bzw. Vehikellösung (Kontrollgruppe) durch die Guide Screw erfolgte in Kurzvollnarkose (5% Isofluran, 0,4 l/min O₂; dann 2,5% Isofluran) über 2 Wochen hinweg. In der Narkose wurden 2 µl Vehikellösung (VLA) bzw. NCT-503 (100 µM in VLA) über 2 Minuten hinweg mit einer Hamiltonspritze in das Caudatum/Putamen bzw. in den Tumor injiziert. Die lokalen Behandlungen von Tumoren mit den Inhibitoren erfolgten ebenfalls in Kurzvollnarkose. Bei der Zelllinie NCH644 wurde an Tag 7 nach der Tumorzellimplantation mit der täglichen Behandlung begonnen, bei NCH1681 nach 6 Wochen. Die Behandlung wurde bis zur Entwicklung von Symptomen fortgesetzt. Bei NCH644-Tumoren war damit zu rechnen, dass die Kontrollmäuse nach knapp 5 Wochen symptomatisch werden, bei NCH1681-Tumoren dauert dies erfahrungsgemäß ca. 3 Monate. Jede Maus die Symptome aufwies, wurde umgehend durch CO₂-Narkose und anschließende zervikale Dislokation getötet.

2.6.4 Bestimmung der Tumorumfänge von NCH1681-Xenograft-Tumoren

Zur Bestimmung der Tumorumfänge wurden die Gehirne entnommen und zunächst in PBS inkubiert. Es folgte die Fixierung der Gehirne in Formalin für 3 Tage. Nach einem koronaren Schnitt wenige

Millimeter posterior zur Injektionsstelle, folgte die Einbettung der Gehirne in Paraffin. Serielle 5 µM-Schnitte wurden angefertigt und HE-gefärbt (siehe 2.7.3). Die maximale Querschnittsfläche der intrakraniellen Xenograft-Tumore wurde durch die computergestützte Bildauswertung mikroskopischer Aufnahmen der HE-gefärbten Gewebeschnitte bestimmt. Tumorumfänge wurden anhand folgender Formel berechnet¹⁸¹: $\text{Volumen} = (\text{Wurzel aus maximaler Tumorquerschnittsfläche})^3$

2.7 Histologische Untersuchungen

2.7.1 Anfertigung von Mikrotomschnitten für histologische Untersuchungen

Für histologische Untersuchungen bei Maushirnen wurden Gewebeschnitte mit einer Dicke von 5 µm von in Paraffinblöcken eingebetteten Maushirnen in der Koronarebene angefertigt. Die Schnitte wurden in einem kalten Wasserbad auf einen Objektträger aufgezogen und in einem warmen Wasserbad auf diesem Objektträger fixiert und bei 37°C getrocknet.

2.7.2 Entparaffinieren von Gewebeschnitten

Um eine Färbung des Gewebes in Paraffinschnitten zu ermöglichen, wurden die Schnitte entparaffiniert. Hierfür wurden die Schnitte zweimal für 10 min in Xylol eingelegt und anschließend zur Rehydrierung des Gewebes einer absteigenden Alkoholreihe unterzogen. Dabei wurden die Schnitte für je 2 min in 100% (2x), 96%, 90%, 80% und 70% Ethanol (v/v) eingelegt und danach für 5 min in H₂O inkubiert.

2.7.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Um die Lokalisation und Ausdehnung orthotoper Xenograft-Tumoren in Maushirnen zu analysieren, wurden coronare Gewebeschnitte der Maushirne mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt. Dabei werden Zellkerne durch das Hämatoxylin blau gefärbt, während der zytoplasmatische Raum durch die Färbung mit Eosin eine rötliche Farbe erhält. Damit lassen sich verdichtete Zellmassen wie Tumoren aufgrund der hohen Dichte an blau gefärbten Zellkernen schnell identifizieren.

Dazu wurden die Schnitte zunächst entparaffiniert und dann für 10 min in Hämalaun eingelegt und für 5 min in Leitungswasser, durch die damit verbundene Erhöhung des pH-Wertes gegenüber destilliertem Wasser, gebläut. Anschließend wurde eine Eosinfärbung für 7 min durchgeführt, gefolgt von einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 1-minütiger Inkubation in 90%, 96% und 100% Ethanol. Die Schnitte wurden dann mit Eukitt und einem Deckgläschen bedeckt und so versiegelt.

2.7.4 Immunhistochemische Färbungen

Um mutiertes IDH1(R132H) in den Zelllinien NCH1681, NCH551b und NCH620 nachzuweisen, wurden immunhistologische Färbungen dieses Proteins an Mikrotomschnitten von Neurosphären durchgeführt. Dazu wurden Neurosphären zunächst mittels eines speziellen Gels zur Präparateeinbettung (Richard-Allan Scientific HistoGel, Thermo Fisher Scientific) eingekapselt und in Paraffin eingebettet. Die Paraffinschnitte wurden wie beschrieben entparaffiniert und für 1 h in kochendem Citratpuffer (vgl. Materialliste im Anhang) demaskiert, um eine bessere Zugänglichkeit des Epitops für den Antikörper zu

erreichen. Nach Inkubation in ddH₂O für 5 min wurden die Schnitte für 5 min in TTP äquilibriert und das Gewebe auf dem Objektträger mit einem Dako Pen (Dako A/S, Glostrup, Dänemark) umrandet, damit die Flüssigkeit innerhalb dieser Umrandung bleibt. Anschließend wurden sie in einer feuchten Kammer bei 4°C über Nacht mit Erstantikörper in TTP inkubiert. Für den Erstantikörper (IDH1(R132H), H09, Dianova) wurde eine Verdünnung von 1:200 verwendet. Die Schnitte wurden nach 3-maligem Waschen mit TTP für 1 h bei RT mit Histofine Simple Stain Mouse MAX PO (Nichirei Corporation, Chuo, Japan) inkubiert und erneut 3-mal mit TTP gewaschen. Zur Entwicklung wurde Diaminobenzidin (Carl Roth) nach Angaben des Herstellers verwendet und so lange inkubiert, bis mit bloßem Auge eine leichte Färbung zu erkennen war. Die Schnitte wurden anschließend 5 min mit Leitungswasser gewaschen und für 20 Sekunden mit Hämatoxyllin gegengefärbt und 10 min in Leitungswasser gebläut und mit Eukitt und einem Deckgläschen versiegelt.

2.8 Bioinformatische Methoden

2.8.1 Bestimmung von EC₅₀-Werten von Dosis-Wirkungs-Kurven

Die Dosis-Wirkungs-Kurven, die in Abschnitt 3.2.1 erstellt wurden, wurden durch ein eigens in R programmiertes Skript (siehe Anhang 5.3.1) ausgewertet. Dazu wurde eine sigmoide Kurve der Form $f(x) = \frac{A}{1 + e^{\frac{B - \log_{10}(x)}{C}}}$ erstellt und die Werte A, B und C durch nicht-lineare Regression an die gemessenen Punkte mit Hilfe der *nls*-Funktion in R angenähert. Die EC₅₀-Werte wurden anschließend durch Wendepunktbestimmung dieser Funktion mit Hilfe der *bede*-Funktion (*inflection* package Version 1.3.5) in R bestimmt.

2.8.2 Erstellung von genomischen Methylierungsprofilen aus 450K und EPIC Methylierungsarrays

Zur Erstellung von genomischen Methylierungsprofilen aus den Daten, die mit EPIC DNA-Methylierungsarrays erzeugt wurden, wurde ein eigens dafür in R geschriebenes Skript genutzt. Zur Vorbereitung der Daten wurde zunächst ein Proben-Datenblatt als Komma-delimitierte Textdatei angelegt, in dem alle Proben mit den zugehörigen Sentrix IDs und Sentrix Positionen verzeichnet wurden. Zur Einspeisung, Normalisierung und Qualitätskontrolle der Daten wurde das ChAMP Packet (Version 2.18.3) in R genutzt. Die Daten wurden über die Funktion *champ.load* eingelesen, wobei eine automatische Qualitätskontrolle stattfand. Dabei wurden Sonden herausgefiltert, die 1) einen Detektions-p-Wert <0,01 besaßen, 2) in mindestens 5% der Proben pro Sonde <3 Beads hatten, 3) nicht-CpG-Sonden waren, 4) SNP-assoziierte Sonden waren, 5) multi-hit Sonden waren und 6) auf dem X oder Y-Chromosom lagen.

Zur Normalisierung der beta-Werte wurde die Beta-Quantil Normalisierungsmethode (BMIQ) in der *champ.norm*-Funktion (ChAMP package) genutzt¹⁷⁷. Dabei handelt es sich um eine Methode, bei der Fehler bzw. Verzerrungen von Typ-2 Sonden in einem 3-schrittigen Verfahren korrigiert werden. Zunächst wird ein 3-Zustände-Modell für Beta-Werte erstellt bzw. angepasst. Dann werden die Zustandswahrscheinlichkeiten der TypII-Sonden in die TypI-Verteilung transformiert und die Beta-

Werte der hemimethylierten Sonden so transformiert, dass sie die Lücke zwischen den methylierten und unmethylierten Sonden schließen. Die normalisierten Beta-Werte wurden für alle weitere Analysen verwendet.

2.8.3 Generierung von CNV-Profilen aus genomweiten DNA-Methylierungsprofilen

Zur Charakterisierung der Gliomzelllinien wurden auch genomische Kopienanzahlvariations(CNV)-Profile aus den Daten der DNA-Methylierungsarrays erstellt. Dies diente z.B. der Bestimmung der Kopienanzahl ganzer Chromosomen (z.B. Chr7, Chr10) oder Chromosomenarme (z.B. 1p, 19q), aber auch bestimmter Gene, wie IDH1 oder PTEN. Eine Möglichkeit zur Generierung dieser CNV-Profile aus DNA-Methylierungsarrays wurde 2014 von Feber et al. beschrieben¹⁷⁷. Dazu werden die Intensitäten aus den Signalen der Sonden zur Detektion von methyliertem und unmethyliertem Status addiert. Dieser Wert reflektiert dabei die Gesamt-DNA-Menge, die für die jeweilige Sonde vorliegt. Die Sonden werden dann so gebinnt, dass ein Bin etwa 50.000 Basenpaare (bp) umfasst. Die Werte werden dann anhand von Kontrollen im \log_2 -Verhältnis normalisiert und so verschoben, dass die absolute Abweichung des Medians aller bins auf 0 gesetzt wird um den neutralen Zustand der Kopienzahl zu bestimmen. Abweichungen von diesem Wert (\log_2 -Verhältnis) Richtung +1 werden dann als Gewinn bzw. „Gain“ bezeichnet, Abweichungen Richtung -1 als Verlust oder „Loss“. Dabei wurde angenommen, dass ab einer Erhöhung des Wertes von 0,2 eine Kopienzahlerhöhung von +1 vorliegt und das \log_2 -Verhältnis beim Vorliegen höherer Kopienzahlen sukzessive um denselben Wert steigt. Auf der anderen Seite wurde generell ab einem Wert von etwa -0,33 ein heterozygoter Verlust eines Allels und ab etwa -0,66 ein homozygoter Verlust beider Allele angenommen^{177,182}.

Zur Generierung und Visualisierung von CNV-Profilen der untersuchten Gliomzelllinien wurde ein eigens hierfür programmiertes Skript in R genutzt (siehe Anhang 5.3.3). Für die Importierung der Daten wurde die *champ.load*-Funktion (vgl. 2.8.2) verwendet. Die Signalintensitäten aller Sonden wurden manuell aus dem Datensatz herausgelesen (\$intensity-Wert) und es wurde ein neues MethylSet-Objekt aus diesen Daten generiert. Das Binning der Sonden, die Errechnung der Einzelwerte für jedes Bin und die Verschiebung des Nullwertes auf das Niveau des neutralen Zustands der Kopienzahl wurde mit den Funktionen *cnv_fit* und *cnv_bin* (conumee package Version 1.22.0) erreicht. Für die Segmentierung des Genoms in Abschnitte mit gleichem CNV-Status bzw. die Vereinigung von benachbarten Bins mit ähnlichen Werten wurde jedoch nicht die *cnv_segment*-Funktion genutzt. Hier wurde die Tendenz beobachtet, dass diese Funktion sehr viele Bins vereinigt und so manchmal ungenaue, in jedem Fall jedoch undetaillierte CNV-Profile generiert werden. Stattdessen wurde hier ein eigens geschriebenes Skript verwendet, welches alle Bins einzeln und nacheinander durchgeht, einen laufenden Mittelwert aus diesen Werten und benachbarten Werten generiert und so lange Bins vereinigt, solange keine signifikante Abweichung von diesem laufenden Mittelwert ermittelt werden kann (genaue Werte und Berechnung siehe Skript im Anhang). Das so generierte CNV-Profil ist somit wesentlich detaillierter und kann damit auch genauer analysiert werden.

Um die Darstellung der CNV-Profile auf die gezeigte Art und Weise zu ermöglichen, wurde ebenfalls ein Skript in R programmiert. Zunächst wurden dazu die aus dem vorigen Schritt erhaltenen genomischen

Positionen in genomische Distanzen umgewandelt. Um die Start- und Endpositionen der Chromosomen zu berücksichtigen, wurden diese zuvor für das Referenzgenom GRCh37 hg19 ermittelt und im CNV-Profil in die passenden Positionen eingefügt. Außerdem wurden alle kleinsten ermittelten Distanzen in die Datensätze aller Proben eingefügt, sodass jede Probe die gleiche Anzahl an genomischen Distanzen enthält. Die Distanzen wurden dann durch die Gesamtbasenanzahl des Genoms geteilt, um die Fraktion am Genom zu erhalten, die der entsprechende DNA-Abschnitt ausmacht. Die so erhaltene Tabelle wurde permutiert und ein Balkendiagramm wurde erstellt, welches jeden dieser DNA-Abschnitte in der entsprechenden Größe auf dem Genom abbildet. Für die Farbskalierung der Abschnitte auf dem Balkendiagramm wurden die zuvor ermittelten CNV-Werte verwendet. Die Zentromere wurden nachträglich als horizontaler Strich eingefügt. Dazu wurde die Position der Zentromere im Gesamt-Genom ermittelt und durch die Anzahl an Basenpaaren im Gesamt-Genom dividiert.

Zur Extraktion der CNV-Werte für bestimmte Gene wurde ein Skript programmiert, welches für die DNA-Abschnitte zwischen dem Start- und Endpunkt des Gens alle Werte ausliest und den Mittelwert dieser Werte ausgibt. Zur Ermittlung der Start- und Endpunkte der Gene wurde die Datenbank des Weizmann Institute of Science (Rehovot, Israel; www.genecards.org) verwendet.

2.8.4 Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis, PCA)

Um die Methylierungsdaten der Gliomzelllinien, die eine Vielzahl von Dimensionen umfassten, miteinander vergleichen zu können, wurde unter anderem die Hauptkomponentenanalyse (kurz: PCA) als Methode zur Dimensionsreduzierung verwendet. Dabei werden nacheinander die Richtungen bzw. Dimensionen mit der maximalen Streuung im Datensatz zu Hauptkomponenten erklärt, welche eine Linearkombination der eingegebenen Dimensionen darstellen. Zur 2-dimensionalen Darstellung dieser Werte wurden nur die Hauptkomponenten 1 und 2 verwendet. Zur Berechnung der PCA wurde die Funktion *prcomp* in R verwendet, zur Darstellung wurde die *fviz_pca_ind*-Funktion (factoextra package, Version 1.0.7) in R genutzt.

2.8.5 t-verteilte stochastische Nachbareinbettung (t-distributed Stochastic Neighbor Embedding, tSNE)

Zum Vergleich der DNA-Methylierungsdaten der Gliomzelllinien wurde als Alternative zur PCA auch die tSNE als Methode zur Dimensionsreduzierung verwendet. Diese Methode wird vor allem bei komplexen Datensätzen mit nicht-linearen Korrelationen genutzt, um Datensätze zu gruppieren. Dabei liegt der Schwerpunkt dieser Methode im Gegensatz zur PCA nicht in der Neudefinierung von Dimensionen als Linearkombination der Eingangsdimensionen, sondern auf der Abstandsbestimmung der nächsten Nachbarn zwischen den Punkten in jeder Dimension. Dadurch kann eine Dimensionsreduktion von sehr hochdimensionalen Daten bei gleichzeitiger Konservierung von lokalen Strukturen erreicht werden. Zur Durchführung der tSNE wurde die Funktion *Rtsne* (Rtsne package Version 0.15) verwendet, wobei die Anzahl der Dimensionen auf 2 festgelegt wurde. Die Darstellung der tSNE-Analyse erfolgte mit der *ggplot*-Funktion (*ggplot2* package Version 3.3.2) in R.

2.8.6 Erstellung von Pearson-Korrelationsmatrizen

Zur Erstellung von Pearson-Korrelationsmatrizen wurde die *cor*-Funktion in R verwendet, wobei die paarweise Pearson-Korrelation als Methode gewählt wurde. Für die Darstellung als Heatmap wurde die *pheatmap*-Funktion (*pheatmap* package Version 1.0.12) genutzt. Alternativ dazu wurde die Funktion *ggcorr* (*GGally* package Version 2.0.0) für die Berechnung und Darstellung der Korrelationsmatrizen verwendet. Auch hier wurde die paarweise Pearson-Korrelation als Methode gewählt.

2.8.7 Programmierung einer Software zur Analyse von RGB-markierten Tumorzellen (*ChromoClone*)

Um die durchflusszytometrischen Daten der RGB-markierten Gliomzellen zu visualisieren, zu quantifizieren und die Identifikation und Isolation von Einzelklonen zu ermöglichen, entwickelte und programmierte ich im Rahmen dieser Arbeit eine umfassende Software zur Analyse dieser Daten in Matlab. Da der Quellcode des Programms zu lang ist, um ihn in printform darzustellen, wurde er auf der beigefügten CD bereitgestellt. Die mathematischen Schritte und die Eckpunkte zur Programmierung von *ChromoClone* sind im Ergebnisteil beschrieben.

3 ERGEBNISSE

3.1 Charakterisierung verwendeter Gliomzelllinien

Um den Einfluss der Inhibition des Serinsyntheseweges auf Gliomzellen zu untersuchen wurde im Rahmen dieser Arbeit mit 9 verschiedenen Gliomzelllinien gearbeitet. Das erste Ziel bestand zunächst in der Charakterisierung dieser Zelllinien. Aus Voruntersuchungen war bereits bekannt, dass alle der verwendeten Zelllinien im orthotopen Xenograft-Modell in Mäusen tumorigen waren. Außerdem handelte es sich bei den Zelllinien NCH1681, NCH551b und NCH620 bekanntermaßen um Gliomzelllinien mit IDH1(R132H)-Mutation. Diese Zelllinien dienten im Rahmen dieser Arbeit als Modellsysteme für IDH1-mutierte Gliome. Zur detaillierten Charakterisierung der verwendeten Zelllinien wurden einerseits genomweite DNA-Methylierungsprofile dieser Zelllinien erstellt und analysiert, um die molekularen Subtypen und genetische Alterationen in diesen Linien zu bestimmen. Andererseits wurden auch die Proteinniveaus wichtiger, an der Serinsynthese oder dem Serintransport beteiligter Enzyme ermittelt. Weiterhin wurde bei IDH1-mutierten Gliomzelllinien der IDH1-Status verifiziert und dabei überprüft, ob diese Zelllinien sowohl das WT-Allel als auch das mutierte Allel exprimierten.

3.1.1 Klassifizierung der Gliomzelllinien auf Basis von Methylierungsarrays

Um eine Bestimmung der Gliom-Subtypen der verwendeten Zelllinien durchzuführen, wurden globale DNA-Methylierungsprofile mit Illumina EPIC DNA Methylierungsarrays generiert. Die Rohdaten wurden mittels eigens in R programmierter Skripte und mit Hilfe des Hirntumor-Classifiers des deutschen Krebsforschungszentrums (Heidelberg, www.molecularneuropathology.org, nach Capper et al., 2018) ausgewertet. Bei letzterem handelt es sich um eine Art der Klassifizierung von Hirntumoren, der eine Analyse mittels t-verteilter stochastischer Nachbareinbettung (t-SNE) von DNA-Methylierungsprofilen zugrunde liegt. Zudem wurden aus diesen DNA-Methylomdaten genomische CNV-Profile erstellt, die zur Bestimmung der Kopienzahlen von Chromosomen und einigen wichtigen Genen verwendet wurden.

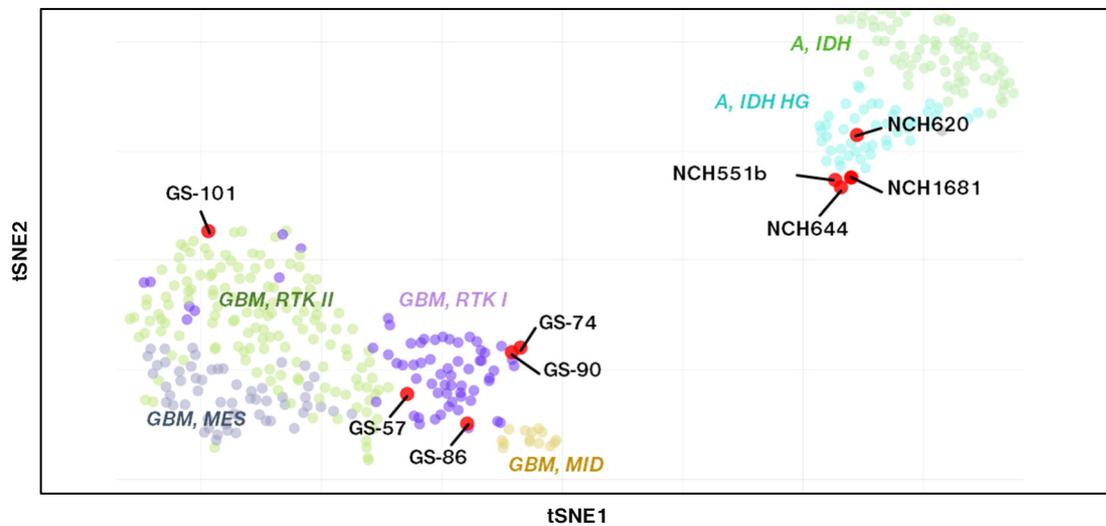
Tabelle 6 | Klassifizierung der Gliomzelllinien auf Basis der DNA-Methylierung. Die dargestellten Klassifizierungen und Scores, sowie die Bestimmung des Methylierungsstatus des MGMT-Promoters wurden aus Methylierungsdaten der Zelllinien mit Hilfe des Classifier-Algorithmus nach Capper et al. (www.molecularneuropathology.org) generiert. (A: Astrozytom; IDH: IDH-mutiert; HG: Hochgradiges Gliom)

Zelllinie	Meth.-Klasse	Score	Subklasse	Score	MGMT-Status
GS-57	GBM, IDHwt	0,53	RTKII/RTKI	0,28/0,21	Methyliert
GS-74	GBM, IDHwt	0,81	RTKI	0,77	Unmethyliert
GS-86	GBM, IDHwt	0,99	RTKI	0,98	Unmethyliert
GS-90	GBM, IDHwt	0,99	RTKI	0,99	Methyliert
GS-101	GBM, IDHwt	0,98	RTKII	0,68	Unmethyliert
NCH1681	Gliom, IDHmut	0,95	A, IDH HG	0,94	Methyliert
NCH551b	Gliom, IDHmut	0,73	A, IDH HG	0,71	Methyliert
NCH620	Gliom, IDHmut	0,66	A, IDH HG	0,52	Methyliert
NCH644	GBM, IDHwt	0,32	RTKI	0,23	Methyliert

Tabelle 4 zeigt die Gliom-Subklassen der verwendeten Gliomzelllinien, die mit Hilfe des Classifier-Algorithmus nach Capper et al. (www.molecularneuropathology.org) untersucht wurden. Weiterhin sind die Ergebnisse der tSNE-Analyse und die ermittelten CNV-Profile in Abbildung 13 dargestellt. So wurden die Zelllinien GS-74, GS-86 und GS-90 als IDH-Wildtyp-Glioblastome der Subklasse RTKI klassifiziert. Diese Subklasse ist zumeist mit einer PDGFRA-Amplifikation assoziiert, die auf Basis der CNV-Analysen (Abb. 13) allerdings in keiner dieser Zelllinien festgestellt werden konnte. Weiterhin wurde bei diesen Zelllinien eine PTEN-Deletion und ein Chromosom 7 Gain ermittelt, was typische Merkmale für IDH-Wildtyp-Glioblastome sind. Im Gegensatz zu GS-90 und GS-74 konnte bei GS-86 eine CDKN2A-Deletion, sowie eine Chromosom-10-Monosomie festgestellt werden, was auf einen besonders aggressiven Tumor schließen ließ. Weiter wurde die GS-101-Zelllinie als IDH-Wildtyp-Glioblastom der Subklasse RTKII klassifiziert. Bei dieser Zelllinie konnte ebenfalls eine CDKN2A-Deletion beobachtet werden, wobei aufgrund der CNV-Intensitäten davon auszugehen ist, dass es sich um eine homozygote Deletion handelt.

Die Zelllinien NCH1681, NCH551b und NCH620 wurden als hochgradige, IDH1-mutierte Astrozytome klassifiziert, was sich mit den vorliegenden Daten zu diesen Zelllinien deckte. Für diese Zelllinien konnten zudem Teildeletionen von Chromosom 10q und CDKN2A-Deletionen festgestellt werden. Auch die bei dieser Art von Tumor verbreitete Methylierung des MGMT-Promotors konnte bei diesen Zelllinien nachgewiesen werden. Die GS-57-Zelllinie konnte auf Basis der Methylomdaten nicht eindeutig klassifiziert werden. Hier zeigte der Klassifizierungsalgorithmus die Subtypen RTKII (Score: 0,28) und RTKI (Score: 0,21) an, jedoch reichten die Scores dabei nicht aus, um eine eindeutige Klassifizierung zu gewährleisten. Es lag zudem eine Erhöhung der Kopienzahl von Chromosom 7, jedoch keine CDKN2A-Deletion vor. Auch die NCH644-Zelllinie konnte nicht eindeutig klassifiziert werden, wobei sie mit einem Score von 0,23 die höchste Übereinstimmung mit der Subklasse RTKI zeigte. Ferner lag hier eine Erhöhung der Kopienzahl für Chromosom 7q, sowie eine CDKN2A-Deletion vor. Für keine der hier verwendeten Zelllinien konnte eine Veränderung der Kopienzahl für PHGDH (Chr. 1p) oder SLC1A4 (Chr. 2p) festgestellt werden. Für PSAT1 (Chr. 9q) konnte lediglich bei der GS-101-Zelllinie eine Erhöhung der Kopienzahl detektiert werden, die vermutlich Teil einer Kopienzahlerhöhung des gesamten Chromosoms 9 war.

A



B

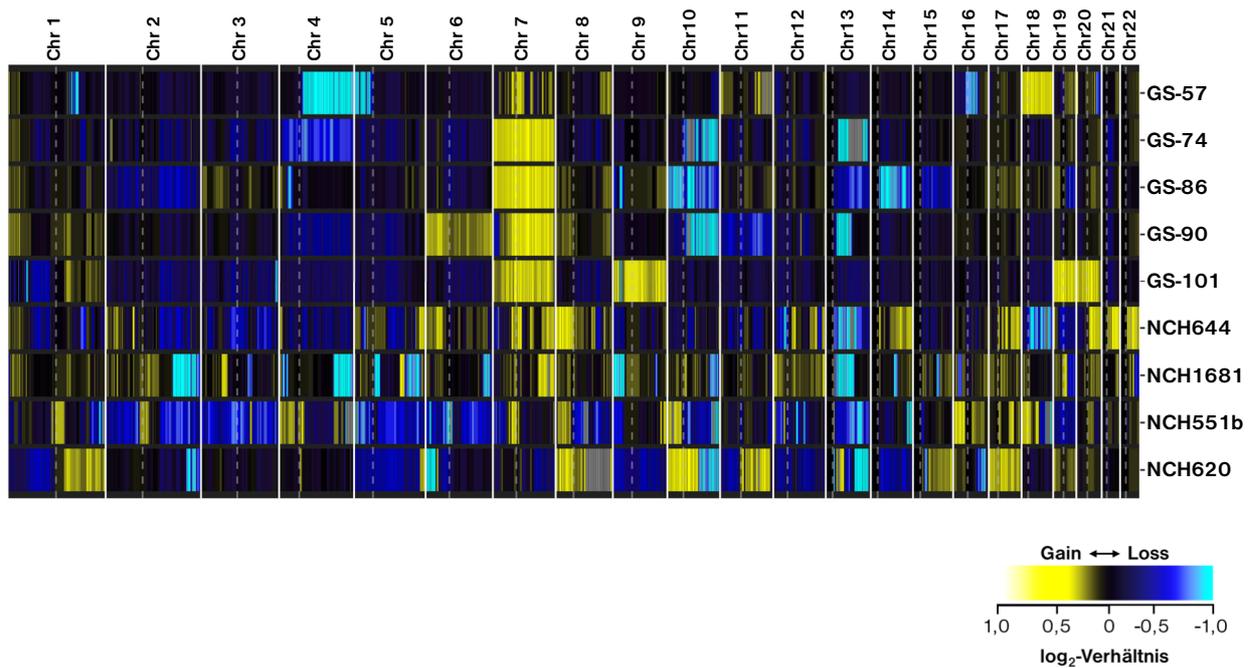


Abbildung 13 | Charakterisierung der verwendeten Gliomzelllinien auf Basis globaler DNA-Methylierungsprofile. **A)** t-stochastische Nachbareinbettung (tSNE) der Methylomdatensätze der verwendeten Gliomzellen zusammen mit definierten Referenzdatensätzen, bezogen von Capper et al.⁸. NCH644-Zellen clustern hier zusammen mit der Gruppe der IDH-mutierten hochgradigen Astrozytome, jedoch konnte diese Zelllinie nach Korrektur der tSNE-Analyse mittels des Klassifizierungsalgorithmus nach Capper et al. am ehesten IDH-Wildtyp-Glioblastomen der Subklasse RTKI zugeordnet werden (vgl. Tabelle 6). GBM, MES: Mesenchymale GBMs; GBM, MID: Mittellinien-GBMs; A, IDH: IDH-mutierte Astrozytome **B)** Genomweite Kopienzahlvariations(CNV)-Profile der verwendeten Zelllinien aus DNA-Methylierungsarrays. Das dargestellte CNV-Profil zeigt vor allem die für Gliome typische Erhöhung der Kopienzahl von Chromosom 7. Auch die Zelllinien GS-57, NCH644 und NCH551b, bei denen nur für Teile von Chromosom 7 Kopienzahlerhöhungen vorlagen, wurde eine erhöhte EGFR-Kopienzahl beobachtet. Außerdem konnte bei einigen Zelllinien der vollständige oder teilweise Verlust von Chromosom 10 und Deletionen in Chromosom 13 beobachtet werden. Letztere gehen meist mit dem Kopienzahlverlust des Retinoblastomprotein-1-Gens (RB1) einher.

3.1.2 Verifizierung des IDH1-Mutationsstatus und der Heterozygotie der Mutation bei IDH1-mutierten Gliomzelllinien

Wie bereits aus Voranalysen bekannt war, handelte es sich bei den Zelllinien NCH1681, NCH551b und NCH620 um IDH1-mutierte Gliomzelllinien^{183,184}. Zur Bestätigung des *IDH1*-Status dieser Zelllinien wurden Mikrotomschnitte von Neurosphären dieser Linien hergestellt und per IHC mit einem Antikörper angefärbt, der spezifisch die IDH1(R132H)-Mutante erkennt. Wie aus Abbildung 14A hervorgeht, zeigten NCH1681-, NCH551b- und NCH620-Zellen eine deutliche IDH1(R132H)-Färbung, sodass der mutierte *IDH1*-Status dieser Zelllinien verifiziert werden konnte. Außerdem ist bekannt, dass bei Gliom-Rezidiven⁴⁰ und Zelllinien¹⁸⁵ mit einer *IDH1*(R132H)-Mutation das *IDH1*-Wildtyp-Allel häufig deletiert ist und dies zur signifikanten Verringerung der 2HG-Produktion¹⁸⁶ und einer hiermit verbundenen Veränderung des Phänotyps *IDH1*-mutierter Zellen führen kann. Deshalb wurden diese Zelllinien auf eine mögliche Deletion des IDH1-Wildtyp-Allels untersucht. Hierfür wurde die *IDH1*-Kopienzahl aus dem zuvor ermittelten CNV-Profil (vgl. Abschnitt 3.1.4) extrahiert, wobei mit Werten von weniger als -0.39 der Verlust eines *IDH1*-Allels bei den Zelllinien NCH1681, NCH551b und NCH620 ermittelt werden konnte (Abb. 14B). Aufgrund des Nachweises von mutiertem IDH1(R132H)-Protein in diesen Zelllinien konnte dies nur mit dem Verlust des *IDH1*-WT-Allels erklärt werden. Zur Verifizierung dieser IDH1-WT-Deletion wurden bei NCH620- und NCH551b-Zellen Sequenzierungen des Genabschnitts durchgeführt, in dem die IDH1(R132H)-Mutation liegt. Dabei konnte weder für NCH551b noch NCH620 das *IDH1*-WT-Allel nachgewiesen werden, was somit für den Verlust dieses Allels spricht (Abb. 14C).

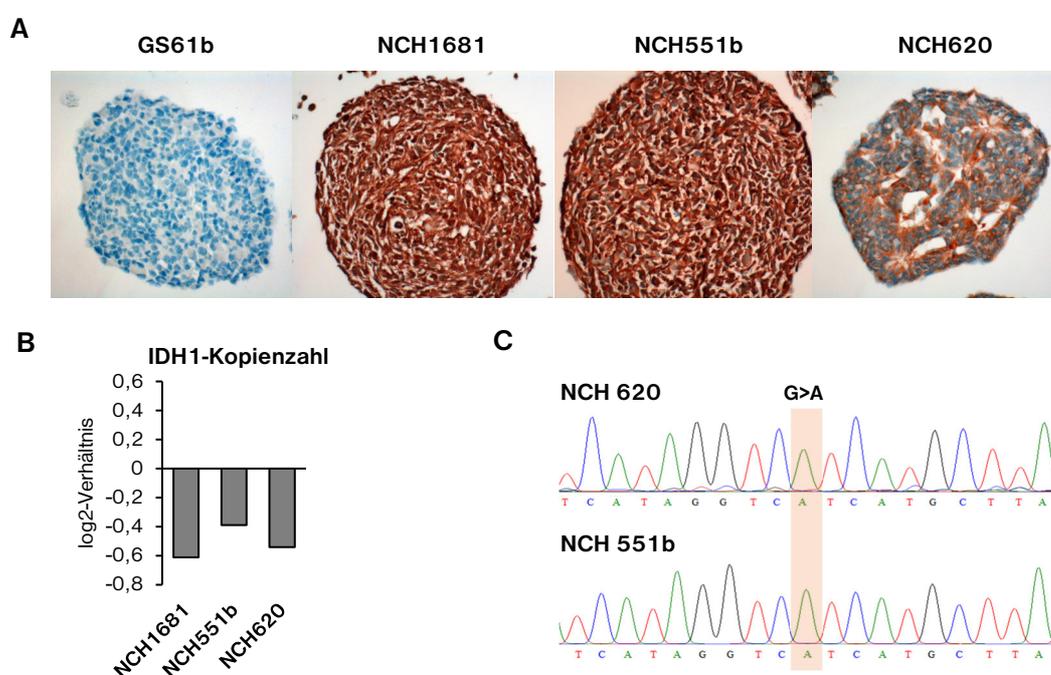


Abbildung 14 | Mutations- und Kopienzahl-Analysen der Zelllinien NCH1681, NCH551b und NCH620. A) Die immunhistochemische Färbung von Mikrotomschnitten kultivierter Neurosphären zeigen in NCH1681, NCH551b und NCH620-Zellen mutiertes IDH1(R132H) an. Nicht-IDH1-mutierte GS-61b-Zellen dienten als Negativkontrolle und zeigten keine Färbung. B) Das Kopienanzahlprofil, welches auf Basis von DNA-Methylierungsarrays erstellt wurde, zeigte für das *IDH1*-Gen bei den Zelllinien NCH1681, NCH551b und NCH620 den Verlust eines *IDH1*-Allels. C) Nach der DNA-Sequenzierung des genomischen Bereiches, in dem die IDH1-Mutation auftritt, ließ sich für NCH551b und NCH620 nur das mutierte, nicht jedoch das Wildtyp-Allel nachweisen.

3.1.3 Wachstumsverhalten der verwendeten Gliomzelllinien *in vitro*

Im Rahmen der Charakterisierung der Gliomzelllinien wurden außerdem deren Proliferationsraten, bzw. Verdopplungszeiten bestimmt. Dazu wurden die Gliomzellen in 96-well Zellkulturplatten ausgesät und mittels eines ATP-abhängigen Zellviabilitäts-Assays täglich hinsichtlich ihrer Zellviabilität überprüft. Abbildung 15 zeigt, dass NCH644- und GS-74-Zellen mit einer Verdopplungszeit von 1,9 Tagen die höchste Teilungsrate unter den untersuchten Zelllinien hatten, gefolgt von GS-101 (2,2 Tage), GS-57 (2,5 Tage), GS-90 (3,4 Tage) und GS-86 (3,6 Tage). Die IDH1-mutierten Zelllinien NCH551b (3,9 Tage), NCH1681 (6,4 Tage) und NCH620 (6,8 Tage) zeigten die längsten Verdopplungszeiten.

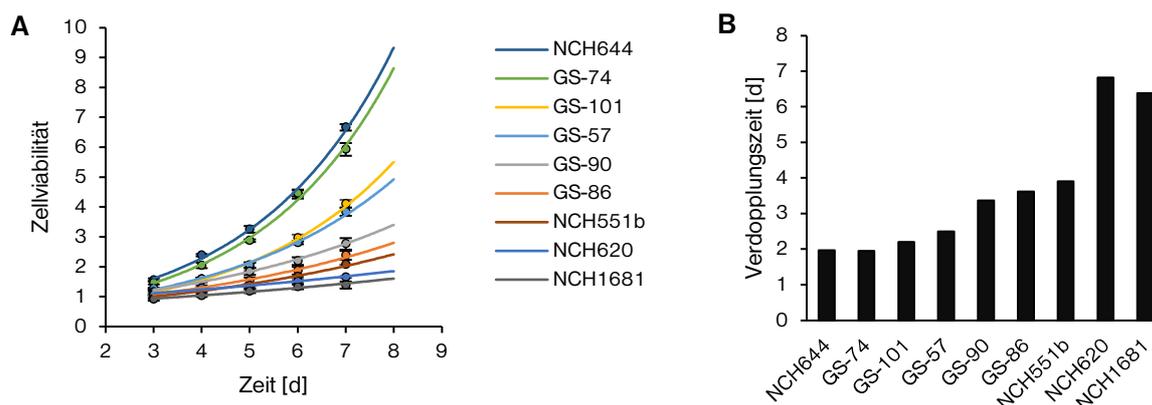


Abbildung 15 | **Untersuchung der Proliferationsrate der verwendeten Gliomzelllinien.** Gliomzellen wurden mit einer Dichte von 2000 Zellen/Well in 96-well Zellkulturplatten ausgesät und nach drei Tagen wurde täglich über 5 Tage die Zellviabilität mit einem ATP-basierten Zellviabilitäts-Assay gemessen. **A)** Der Vergleich der Wachstumskurven der verschiedenen Gliomzelllinien zeigt deutliche Unterschiede der Wachstumsgeschwindigkeiten dieser Zelllinien. **B)** Vergleich der Verdopplungszeiten der Gliomzellen nach Berechnung aus exponentiellen Kurven-Fits an den Datenpunkten aus A).

3.1.4 Quantifizierung von Schlüsselenzymen des Serinsyntheseweges

In vorangegangenen Studien zur Inhibition von PHGDH mit NCT-503 und CBR-5884 wurde gezeigt, dass ein hohes zelluläres PHGDH-Niveau mit einer hohen Effektivität dieser Inhibitoren korrelierte^{100,131}. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass sowohl der Knock-Down von PHGDH, als auch PSAT1 zu einer Verringerung des Wachstums von Zelllinien mit hohem PHGDH-Gehalt führte⁹⁸. Deshalb sollte zunächst das Proteinniveau von PHGDH und PSAT1 in den verwendeten Gliomzellen quantifiziert werden, um herauszufinden, ob diese Proteine prädiktive Marker für die Sensitivität der Zelllinien gegenüber der Inhibition der Serinsynthese sein könnten. Da der Serintransporter SLC1A4 eine wichtige Rolle für den Serinimport im Gehirn spielt und daher auch für die Serinversorgung von Gliomen von Bedeutung sein könnte, wurde zusätzlich zu PHGDH und PSAT1 auch der Proteingehalt von SLC1A4 untersucht. Um den PHGDH-Proteingehalt der verwendeten Gliomzelllinien mit vorangegangenen Studien an Mammakarzinomzelllinien vergleichen zu können, wurden außerdem die Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-468 als Vergleichskontrollen verwendet, welche in der Literatur respektive als Zelllinien mit niedrigem, bzw. hohem PHGDH-Gehalt beschrieben wurden^{100,120,122,131,187}.

Wie aus Abbildung 16B hervorgeht, lag der PHGDH-Gehalt von 6 der 9 untersuchten Gliomzelllinien im intermediären Bereich zwischen denen der Brustkarzinomzelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-468. Die Zelllinien GS-101 und GS-90 zeigten einen deutlich geringeren PHGDH-Gehalt als MDA-MB-231-Zellen. Trotz einer nachgewiesenen Erhöhung der Kopienzahl des PSAT1-Gens war der PSAT1-Gehalt von GS-101-Zellen gegenüber anderen Zelllinien nicht maßgeblich erhöht. NCH644-Zellen zeigten selbst im Vergleich zu MB-MDA-468-Zellen einen höheren PHGDH-Gehalt, was auf eine erhöhte Abhängigkeit dieser Zellen vom Serinsyntheseweg hindeuten könnte. Auf Basis einer paarweisen Pearson-Korrelationsanalyse konnte zudem eine mögliche Korrelation ($R=0,45$) zwischen PHGDH- und SLC1A4-Gehalt festgestellt werden. Es ließ sich außerdem kein eindeutiger Zusammenhang zwischen den molekularen Subtypen (vgl. Tabelle 6) und dem PHGDH- oder PSAT1-Gehalt der Zelllinien nachweisen.

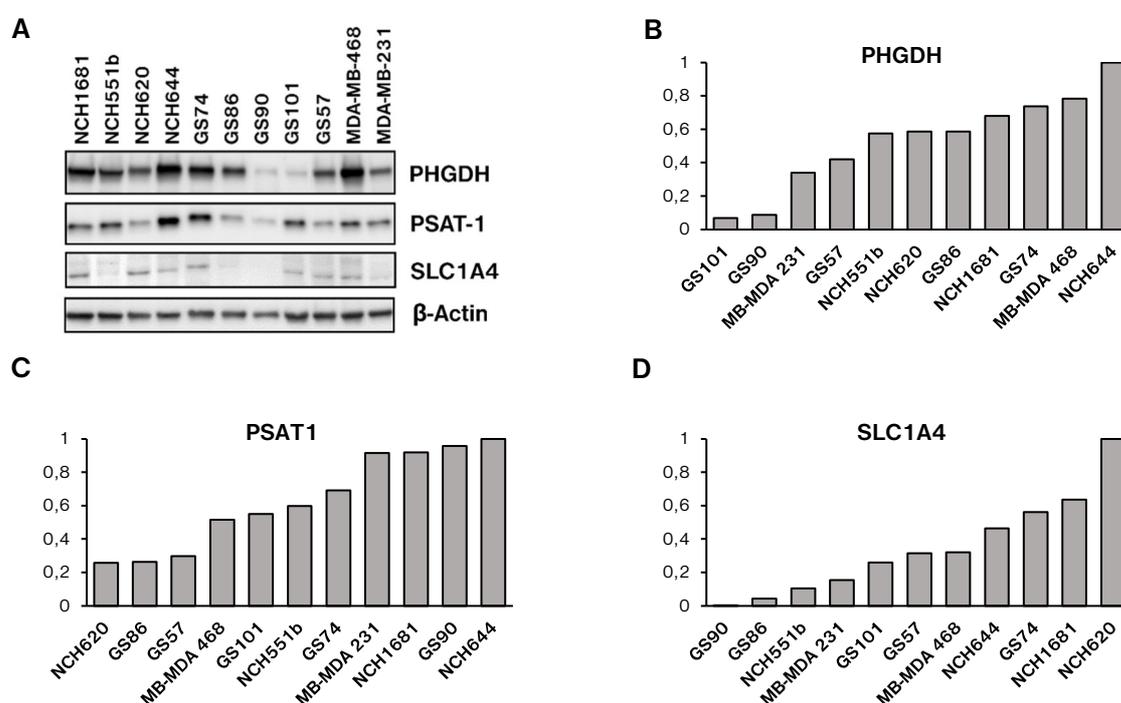


Abbildung 16 | **Expressionsanalyse von Schlüsselenzymen der zellulären Serinversorgung in Gliomzelllinien.** A) Untersuchung der Proteinmengen von PHGDH, PSAT1 und SLC1A4 mittels Western Blot. β -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. B-D) Densitometrische Quantifizierung der Western Blots aus A, sortiert nach aufsteigendem Gehalt der untersuchten Proteine und normalisiert auf die Maximalwerte. Zusätzlich wurden die Werte auf die Ladekontrolle (β -Aktin) normalisiert.

3.2 Auswirkungen der gezielten PHGDH-Inhibition auf Gliomzellen

Der Serinsyntheseweg wurde in den letzten Jahren als mögliches Target für gezielte Krebstherapien identifiziert und es konnte bereits in einigen Studien demonstriert werden, dass die Inhibition von PHGDH durch die Inhibitoren NCT-503¹⁰⁰ und CBR-5884¹³¹ oder durch shRNA-vermittelten Knock-Down¹¹⁷ zu einer Verminderung des Wachstums bei Brust- und Leberzellkarzinom-Zelllinien führte.

Um zu herauszufinden, ob PHGDH auch einen möglichen Angriffspunkt zur Therapie von Glioblastomen oder IDH1-mutierten Gliomen darstellt, wurde zunächst untersucht, wie sich die Inhibition dieses Enzyms auf das Wachstumsverhalten von Gliomzelllinien auswirkt. Zur Inhibition des Serinsyntheseweges wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt: Einerseits wurden zwei kürzlich entwickelte niedermolekulare Inhibitoren gegen PHGDH, NCT-503 und CBR-5884, genutzt, um dieses Enzym selektiv zu inhibieren und so den Serinsyntheseweg an der Stelle zu hemmen, an der der geschwindigkeitsbestimmende Schritt dieses Syntheseweges stattfindet. Andererseits wurden shRNA-Vektoren genutzt, um PHGDH und PSAT1 selektiv per Knock-Down herunterzuregulieren und so den Serinsyntheseweg durch Verringerung der Verfügbarkeit dieser Enzyme zu hemmen.

3.2.1 Auswirkungen der Inhibition des Serinsyntheseweges durch NCT-503 und CBR-5884 auf die Proliferation von Gliomzellen

Um zu untersuchen, ob eine Inhibition von PHGDH zu einer Wachstumsinhibition bei Gliomzellen führt und um herauszufinden, ob und aus welchem Grund bestimmte Zelllinien sensitiver auf PHGDH-Inhibition reagieren, wurden Dosis-Wirkungs-Kurven beider PHGDH-Inhibitoren für die hier verwendeten Gliomzelllinien erstellt. Aus diesen Dosis-Wirkungs-Kurven wurden anschließend die effektiven Konzentrationen (EC_{50} -Werte) durch nicht-lineare Regression bestimmt.

Abbildung 17 zeigt, dass für alle untersuchten Zelllinien ein konzentrationsabhängiger, wachstumshemmender Effekt für beide PHGDH-Inhibitoren nachgewiesen werden konnte, der je nach Inhibitor und Zelllinie jedoch stark variierte. Die EC_{50} -Werte lagen für NCT-503 bei 18-77 μM (Mittelwert: 43 μM) und für CBR-5884 bei 14-63 μM (Mittelwert: 33 μM). Zudem wurden die Steigungen der Dosis-Wirkungs-Kurven für beide Inhibitoren miteinander verglichen. Dabei wurden Kurven mit EC_{50} -Werten >50 μM vernachlässigt, da bei hohen Dosierungen aufgrund unspezifischer, cytotoxischer Effekte ohnehin mit steilen Dosis-Wirkungs-Kurven zu rechnen war. Dieser Vergleich ergab, dass die Dosis-Wirkungs-Kurven für NCT-503 im Mittel flacher ausfielen, was für eine bessere Dosierbarkeit von NCT-503 gegenüber CBR-5884 sprach (Abb. 17D).

Bei den meisten der untersuchten Zelllinien konnte festgestellt werden, dass sie für beide Inhibitoren recht unterschiedliche Sensitivitäten aufwiesen. So zeigte zum Beispiel GS-74 mit einem EC_{50} -Wert von 58 μM im Vergleich zu anderen Zelllinien eine geringe Sensitivität gegenüber NCT-503, während sie gegenüber CBR-5884 mit einem EC_{50} -Wert von 20 μM eine im Vergleich hohe Sensitivität zeigte. Andersherum zeigten NCH1681-Zellen mit einem EC_{50} -Wert von 18 μM eine relativ hohe Sensitivität gegenüber NCT-503, während sich der EC_{50} -Wert für CBR-5884 mit 44 μM im mittleren Wertebereich befand. Ähnliche

Effekte konnten für GS-86, GS-101, NCH551b und NCH620 beobachtet werden. Bei den Zelllinien NCH644, NCH620 und GS-57 ließ sich jedoch für beide Inhibitoren eine erhöhte Resistenz feststellen.

Um herauszufinden, ob die beobachteten Effekte mit den Proteinniveaus von PHGDH, PSAT1 oder SLC1A4 korrelierten, wurde eine Pearson-Korrelationsmatrix aus den EC_{50} -Werten für CBR-5884 und NCT-503, sowie den zuvor quantifizierten Proteinniveaus aller verwendeten Zelllinien generiert (paarweise Pearson-Korrelation). Dabei konnte nur zwischen SLC1A4-Gehalt und EC_{50} -Werten für CBR-5884 eine signifikante Korrelation beobachtet werden (Pearson-Korrelation: $r=0,6$; siehe Abb. 18A). Die grafische Darstellung dieser Werte (Abb. 18B) zeigt den linearen Zusammenhang zwischen dem SLC1A4-Gehalt und den CBR-5884- EC_{50} -Werten der Gliomzelllinien, wobei die Zelllinien GS-74, GS-101 und GS-86 deutlich von der Regressionslinie abweichen. Dies deutet darauf hin, dass die Sensitivität von Gliomzellen gegenüber CBR-5884 noch von anderen Faktoren als der konstitutiven SLC1A4-Expression abhängig ist. Weiterhin konnte eine Korrelation zwischen den EC_{50} -Werten für CBR-5884 und den Verdopplungszeiten der Zelllinien festgestellt werden. Langsam wachsende Zelllinien zeigten im Mittel eine geringere Sensitivität gegenüber CBR-5884 als schneller wachsende Zelllinien.

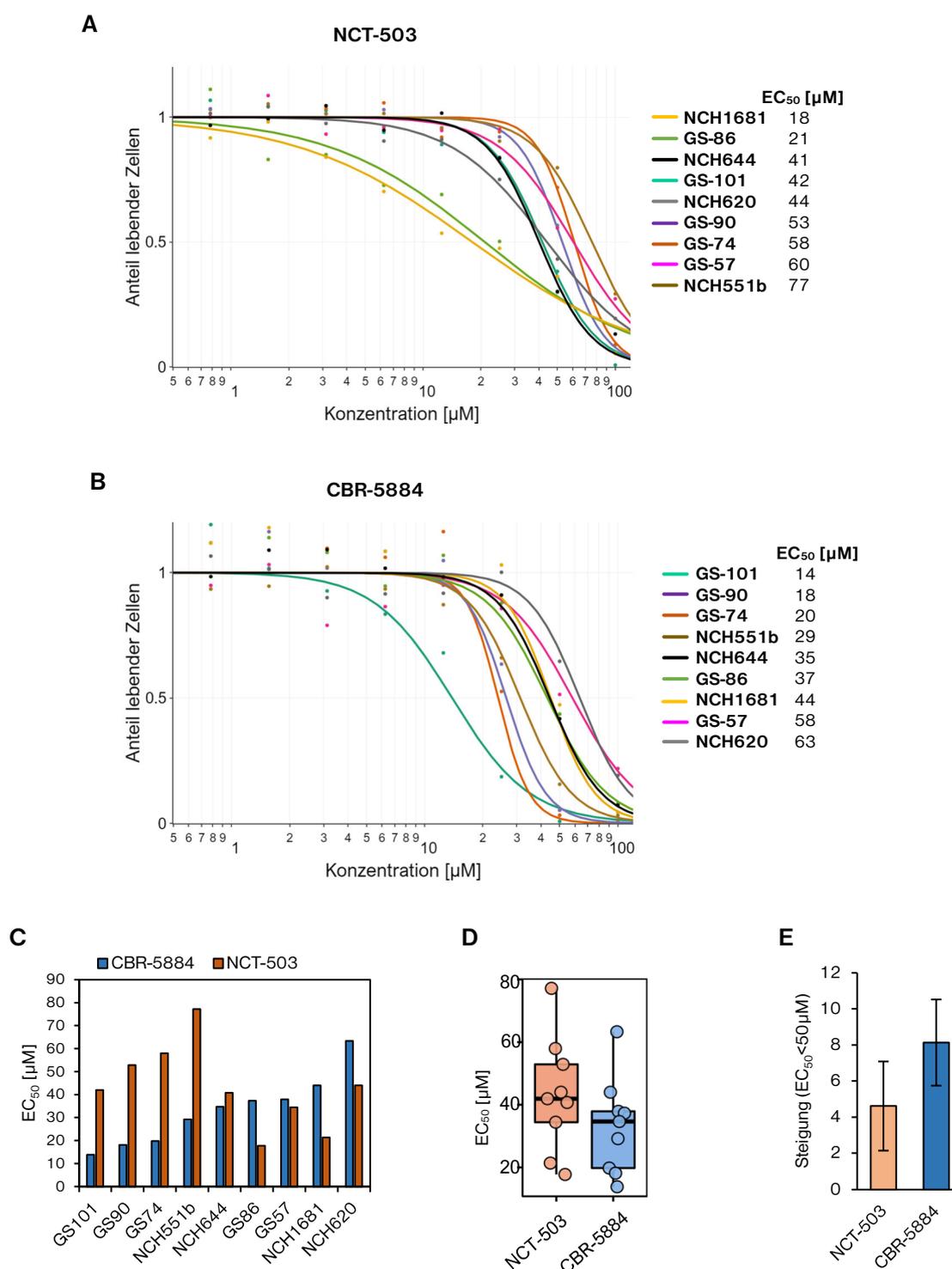


Abbildung 17 | Wachstumsinhibierende Wirkung der PHGDH-Inhibitoren NCT-503 und CBR-5884 auf Gliomzellen. Dargestellt sind die repräsentativen Ergebnisse eines von zwei unabhängigen Experimenten. **A-B)** Dosis-Wirkungskurven und EC₅₀-Werte der PHGDH-Inhibitoren NCT-503 (A) und CBR-5884 (B), getestet an verschiedenen Gliomzelllinien. Gliomzellen wurden für 4 Tage mit den entsprechenden Inhibitoren inkubiert, anschließend wurde die Zellviabilität der Zellen gemessen. Abgebildete Messwerte sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen. **C)** Die graphische Darstellung der EC₅₀-Werte zeigt, dass die mittlere effektive Konzentration für CBR-5884 geringer ist als für NCT-503. Insgesamt war zu beobachten, dass sich die Sensitivitäten der Zelllinien GS-74, GS-86, GS-90, GS-101, NCH1681, NCH551b und NCH620 für beide Inhibitoren gegensätzlich verhielten. **D)** Die Dosis-Wirkungskurven zeigen für NCT-503 geringere Steigungen als für CBR-5884, was für eine bessere Dosierbarkeit und geringere Zytotoxizität von NCT-503 spricht.

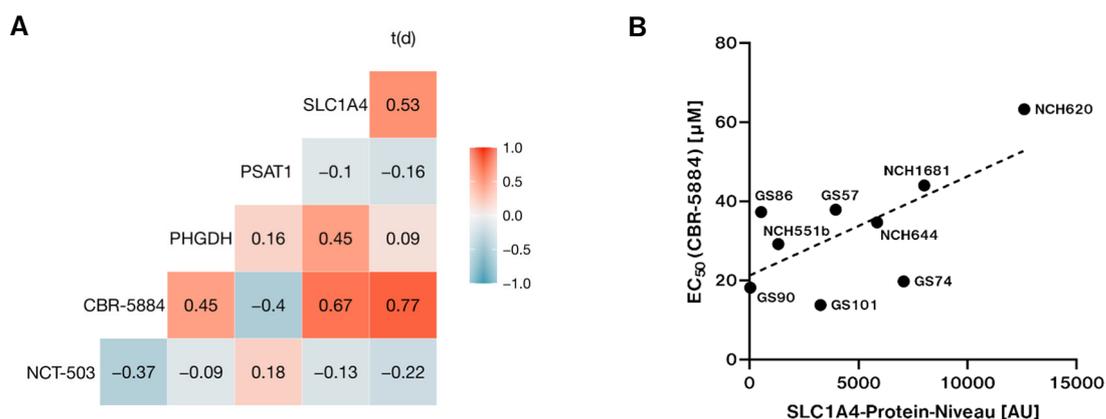


Abbildung 18 | **Korrelationsanalyse der EC₅₀-Werte, Verdopplungszeiten, sowie des PHGDH-, PSAT1- und SLC1A4-Protein-Gehalts aller 9 verwendeten Glioblastomzelllinien.** **A)** Korrelationskarte einer paarweisen Pearson-Korrelationsmatrix zwischen den relativen Proteinniveaus von PHGDH, PSAT1 und SLC1A4, den EC₅₀-Werten für NCT-503 und CBR-5884 (NCT-503/CBR-5884), sowie die Verdopplungszeiten (t(d)) aller untersuchten Zelllinien. Hierbei zeigt sich mit einem Wert von 0,67 eine Korrelation zwischen SLC1A4-Proteingehalt und EC₅₀-Werten von CBR-5884. Ebenso wurde eine hohe Korrelation zwischen diesen Werten und den Verdopplungszeiten der Zelllinien ermittelt. **B)** Grafische Darstellung der Korrelation zwischen zellulärem SLC1A4-Gehalt und CBR-5884-EC₅₀-Werten aus A.

3.2.2 Auswirkungen der PHGDH-Inhibition durch NCT-503 und CBR-5884 auf die Expression von PHGDH, PSAT1 und SLC1A4

Um zu überprüfen, wie bei Gliomzellen die Expression wichtiger Schlüsselenzyme der zellulären Serinversorgung infolge der PHGDH-Inhibition verändert wird, wurden die Folgen der NCT-503- und CBR-5884-vermittelten PHGDH-Inhibition auf die Expression von *PHGDH*, *PSAT1* und *SLC1A4* in NCH644-Zellen untersucht. Dazu wurden NCH644-Zellen mit 50 µM NCT-503 oder 50 µM CBR-5884 inkubiert und der Gehalt dieser Proteine nach 1, 2, 4, 24, 48 und 72 h mittels Western Blotting und der anschließenden densitometrischen Quantifizierung der Proteinbanden gemessen.

Wie Abbildung 19 zeigt, hatte die Zugabe von NCT-503 und CBR-5884 unterschiedliche Auswirkungen auf die *PHGDH*-, *PSAT1*- und *SLC1A4*-Expression von NCH644-Zellen. So verursachte NCT-503 eine vorübergehende Erhöhung der *PHGDH*-Expression, die nach 24 h ihr Maximum erreichte, gefolgt von einer deutlichen Erhöhung der *PSAT1*-Expression nach 48 h. Dieser zeitliche Verlauf könnte darin begründet sein, dass zunächst aufgrund der PHGDH-Inhibition 3PG, und infolgedessen auch 2PG akkumulierte, was zu einer Erhöhung der *PHGDH*-Expression führte (Feedback-Loop, vgl. Abb. 5). Sobald die Wirkung des Inhibitors nachließ und die PHGDH-Aktivität wieder stieg, könnte es durch die hohen vorliegenden Mengen an PHGDH zu einer rapiden Produktion von 3PHP gekommen sein, was wiederum die Erhöhung der *PSAT1*-Expression erklären könnte. Im Gegensatz zu NCT-503 und entgegen den Erwartungen verursachte CBR-5884 bei NCH644-Zellen eine deutliche Verringerung der PHGDH- und *PSAT1*-Expression um etwa 40% bzw. 60%, die über den kompletten Versuchsverlauf anhält.

Im Einklang mit der initialen Hypothese, dass SLC1A4 durch den Serinimport eine Umgehung der Serinsynthese bei PHGDH-inhibierten Zellen vermittelt, konnte außerdem in Verbindung mit beiden Inhibitoren eine wesentliche Erhöhung der *SLC1A4*-Expression beobachtet werden. Jedoch wurde durch CBR-5884 verglichen mit NCT-503 eine wesentlich schnellere und stärkere Induktion der *SLC1A4*-

Expression hervorgerufen, die jedoch nur von kurzer Dauer war und nach 48 h wieder nahezu Ausgangsniveau erreichte. NCT-503 hingegen verursachte eine wesentlich langsamere, sukzessive Steigerung der *SLC1A4*-Expression über den kompletten betrachteten Zeitrahmen.

Zusammenfassend zeigte dieser Versuch, dass die PHGDH-Inhibitoren NCT-503 und CBR-5884 die Expression von *PHGDH*, *PSAT1* und *SLC1A4* unterschiedlich beeinflussen. NCT-503 erhöhte die *PHGDH*- und *PSAT1*-Expression, was im Einklang zu den Erwartungen einer spezifischen PHGDH-Inhibition steht, wogegen CBR-5884 eine deutliche Reduktion der *PHGDH*- und *PSAT1*-Expression bewirkte. Außerdem verursachten beide Inhibitoren eine Erhöhung der *SLC1A4*-Expression, die für NCT-503 langsamer und sukzessive und für CBR-5884 kürzer, aber wesentlich schneller und stärker ausfiel. Dies könnte auf die Beteiligung dieses Serintransporters bei der Komplementierung des Serindefizits infolge der PHGDH-Inhibition und damit auch auf die Vermittlung einer Resistenz gegenüber PHGDH-Inhibition mittels *SLC1A4* hindeuten.

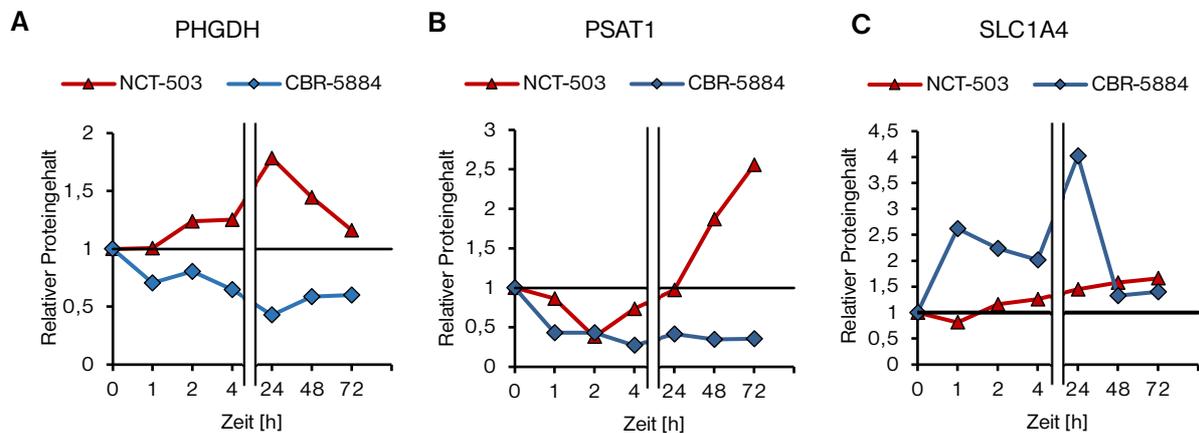


Abbildung 19 | Zeitverlauf der mittels Westen Blot bestimmten Proteinmengen von PHGDH, PSAT1 und SLC1A4 während der PHGDH-Inhibition von NCH644-Zellen mit NCT-503 und CBR-5884. NCH644-Zellen wurden mit 50 μ M NCT-503 oder 50 μ M CBR-5884 versetzt und über 72 Stunden inkubiert. Gezeigt ist die densitometrische Quantifizierung der Proteinbanden von Western Blots zum Nachweis der Proteine PHGDH (A), PSAT1 (B) und SLC1A4 (C), normalisiert zu nicht behandelten Zellen zu Beginn des Experimentes. Aufnahmen der Western Blots siehe Anhang.

3.2.3 Auswirkungen der Serinsynthese-Inhibition durch shRNA-vermittelten *PHGDH*- und *PSAT1*-Knock-Down

Um die Auswirkungen der gezielten Serinsynthese-Inhibition auf die *SLC1A4*- und *PHGDH* bzw. *PSAT1*-Expression bei Gliomzellen zu untersuchen, ohne hierbei auf niedermolekulare Inhibitoren zurückgreifen zu müssen, wurde eine gezielte, shRNA-vermittelte Herunterregulierung (Knock-Down) der *PHGDH*- und *PSAT1*-Expression bei NCH644-Zellen durchgeführt. Hierbei sollte vor allem untersucht werden, ob es sich bei der beobachteten Erhöhung der *SLC1A4*-Expression durch die PHGDH-Inhibitoren NCT-503 und CBR-5884 (vgl. 3.2.2) um einen spezifischen Effekt der gezielten Serinsynthese-Inhibition handelte. Insgesamt wurden je 4 verschiedene shPHGDH- bzw. shPSAT1-Vektoren auf ihre Fähigkeit untersucht, die Synthese dieser Proteine in Gliomzellen zu unterdrücken. Dazu wurden aus den lentiviralen Vektoren zunächst nicht-replikationsfähige Lentiviren hergestellt, die dann zur Transduktion der shRNA-

exprimierenden Genabschnitte in das Genom von NCH644-Zellen genutzt wurden. Zur Kontrolle unspezifischer Effekte der shRNA-Vektoren wurden außerdem Zellen mit einem nicht-inhibierenden shRNA-Vektor (non-silencing Kontrolle) transduziert. Nach der Selektion der transduzierten NCH644-Zellen mit Puromycin und einer fluoreszenzmikroskopischen Sichtkontrolle des GFP-Reportergens (Abb. 20A) wurde der Gehalt an PHGDH bzw. PSAT1 mittels Western Blots bestimmt.

Wie Abbildung 20B zeigt, konnte bei NCH644-Zellen mit je einem der verwendeten shRNA-Vektoren eine deutliche Verringerung der *PHGDH*- (shPHGDH#4) bzw. *PSAT1*-Expression (shPSAT1#1) gegenüber der non-silencing-Kontrolle erreicht werden. Hierdurch wurde die Proliferation von shPHGDH#4- und shPSAT1#1-Knock-Down-Zellen gegenüber non-silencing Kontrollzellen jedoch nicht signifikant beeinträchtigt. Es ist daher möglich, dass diese Zellen die Herunterregulierung von PHGDH und PSAT1 bereits effizient kompensiert haben und die Selektion resistenter Zellen bereits während der Etablierung der Knock-Downs stattgefunden hat, da es sich hier um konstitutiv exprimierende (nicht induzierbare) Knock-Down-Vektoren handelte. Es wäre also denkbar, dass bei der Verwendung induzierbarer Vektoren eine Wachstumsinhibierung sichtbar geworden wäre.

Weiterhin konnte keine wesentliche Veränderung des PSAT1-Gehalts infolge des *PHGDH*-Knock-Downs festgestellt werden, und umgekehrt führte der *PSAT1*-Knock-Down bei diesen Zellen nicht zu einer Veränderung des PHGDH-Gehalts. Interessanterweise führte sowohl der Knock-Down von *PHGDH* als auch *PSAT1* zu einer deutlichen Erhöhung der *SLC1A4*-Expression (Abb. 20C). Die Erhöhung der *SLC1A4*-Expression infolge des *PHGDH*- bzw. *PSAT1*-Knock-Downs könnte somit einen Kompensations- bzw. Resistenzmechanismus gegen die gezielte Inhibition der Serinsynthese bei diesen Zellen darstellen, was gemäß der initialen Hypothese für eine Beteiligung dieses Serintransporters bei der Umgehung der zellulären Serinsynthese spricht. Zudem deckt sich dieses Ergebnis mit Ergebnissen aus dem vorigen Versuch (vgl. 3.2.2), bei dem die Inkubation von Glioblastomzellen mit sowohl NCT-503 als auch CBR-5884 zu einer sukzessiven (NCT-503) bzw. sofortigen (CBR-5884) Erhöhung des SLC1A4-Gehalts in NCH644-Zellen führte.

Zusammenfassend konnte in diesem Abschnitt gezeigt werden, dass Glioblastomzellen in der Lage sind, die spezifische Inhibition der Serinsynthese mittels shRNA-vermitteltem Knock-Down effizient zu umgehen und dass SLC1A4 hieran beteiligt sein könnte.

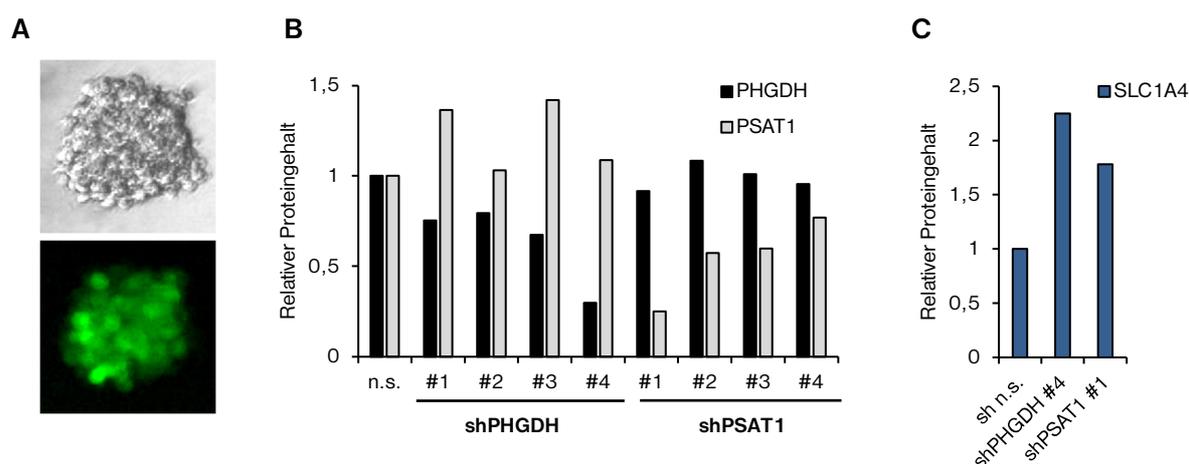


Abbildung 20 | Einfluss des shRNA-vermittelten PHGDH- und PSAT1 Knock-Downs auf die PHGDH-, PSAT1- und SLC1A4-Expression in NCH644-Zellen. **A)** Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme Puromycin-selektierter NCH644-shPHGDH#4-Zellen zeigt durch die grüne Fluoreszenz der Zellen die Expression des GFP-Reportergens an. **B)** Relativer Proteingehalt von PHGDH und PSAT1 nach shRNA-induziertem PHGDH- bzw. PSAT1-Knock-Down mit verschiedenen shRNA-Vektoren, verglichen mit non-silencing shRNA-exprimierenden Kontrollzellen (n.s.). Proteinniveaus wurden mittels Western Blot-Analysen und anschließender densitometrischer Quantifizierung der Proteinbanden bestimmt. Die shRNAs shPHGDH#4 und shPSAT1#1 zeigten die höchste Effizienz bei der Reduzierung der intrazellulären PHGDH- bzw. PSAT1-Konzentrationen. **C)** Vergleich des SLC1A4-Gehalts bei shPHGDH#1- und shPSAT1#4-Zellen mit non-silencing-Kontrollzellen durch Quantifizierung eines SLC1A4-Western Blots analog zu B). PHGDH- und PSAT1-Knock-Downs führten hier zu einer deutlichen Erhöhung der SLC1A4-Expression. Aufnahmen der Western Blots siehe Anhang.

3.2.4 Einfluss der ROS-Scavenger N-Acetylcystein (NAC) und Glutathion (GSH) sowie des Metaboliten α KG auf den wachstumsinhibierenden Effekt von NCT-503 und CBR-5884

Bislang ist wenig über die Wirkmechanismen von NCT-503 und CBR-5884 und die daran beteiligten Metabolite bekannt. In vorangegangenen Studien zur Rolle des Serinsyntheseweges bei Tumoren wurde postuliert, dass die Reduzierung von oxidativem Stress durch die Aktivität des Serinsyntheseweges eine entscheidende Rolle für das Wachstum und die Widerstandsfähigkeit von Tumoren spielen könnte und einen möglichen Grund für die Hochregulierung von PHGDH in vielen Tumorentitäten darstellt^{105,128}. Es wäre denkbar, dass die mit der PHGDH-Inhibition einhergehende verringerte NADH-Produktion oder die verringerte Cystein- und Glutathionproduktion infolge einer geringen Serin-Verfügbarkeit zu einer Erhöhung des Redox-Stresses und einer Induktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) beitragen. Einen anderen potenziellen Mechanismus der Wachstumsinhibition infolge einer PHGDH-Inhibition stellt die hierdurch verursachte Verringerung der Produktion des Citratzyklusintermediaten α KG durch PSAT1 dar¹²⁰. Dies könnte besonders bei Gliomzellen mit mutiertem *IDH1* von Bedeutung sein, da der α KG-Metabolismus bei diesen Zellen ohnehin bereits beeinträchtigt ist.

Um die Wirkung von NCT-503 und CBR-5884 auf Gliomzellen genauer zu untersuchen und festzustellen, ob ein α KG-Defizit oder die ROS-Produktion eine Rolle bei der Wachstumsinhibition von Gliomzellen mit diesen Inhibitoren spielt, wurde ermittelt, ob sich die Wirkung von NCT-503 und CBR-5884 durch die zusätzliche Inkubation mit den ROS-abbauenden Substanzen (ROS-Scavenger) Glutathion (GSH; reduziert) und N-Acetylcystein (NAC) oder dem zellpermeablen α KG-Derivat Dimethyl- α KG (dm- α KG)

antagonisieren lässt. Dazu wurden Gliomzellen mit 80 μ M NCT-503 bzw. 80 μ M CBR-5884, und zusätzlich dazu entweder mit 1 bzw. 10 mM GSH, NAC, dm- α KG oder Serin (Kontrolle) versetzt und für 4 Tage inkubiert. Anschließend wurde mittels eines ATP-abhängigen Zellproliferations-Assays bestimmt, ob diese Substanzen zu einer Wiederherstellung des Wachstums NCT-503- bzw. CBR-5884-behandelter Gliomzellen beitragen.

Wie aus Abbildung 21B hervorgeht, konnte nachgewiesen werden, dass die wachstumshemmende Wirkung von CBR-5884 bei allen Gliomzelllinien durch die Zugabe von 1 mM NAC oder GSH signifikant verringert wurde. Hierbei im Mittel eine Wiederherstellung des Wachstums CBR-5884-behandelter Gliomzellen um 50% (1 mM GSH; 24-85%) bzw. 58% (1 mM NAC; 20-100%) beobachtet, während unter Verwendung höherer Konzentrationen (10 mM) dieser Substanzen ein weitaus geringerer, wenngleich oft ebenfalls noch signifikanter Effekt erzielt wurde (Mittelwert: 10%/11% für 10 mM GSH/NAC). Somit konnte gezeigt werden, dass NAC und GSH die Wirkung von CBR-5884 effizient und teils vollständig antagonisieren können, was die Vermutung nahelegt, dass der primäre Wirkmechanismus dieses Inhibitors von der Induktion reaktiver Sauerstoffspezies abhängig ist. Auch bei der zusätzlichen Gabe von dm- α KG konnte bei 5 von 9 Gliomzelllinien (GS-57, GS-86, NCH1681, NCH620, NCH644) eine signifikante Wiederherstellung des Wachstums CBR-5884-behandelter Zellen festgestellt werden, die bei 4 dieser Linien jedoch sehr gering ausfiel (< 10%). Folglich lässt sich zwar die Beteiligung eines α KG-Defizits bei der Wirkung von CBR-5884 nicht ausschließen, jedoch wird aufgrund der wesentlich stärkeren Antagonisierung dieses Inhibitors mittels GSH und NAC nicht von einer essenziellen Rolle des α KG-Metabolismus bei der Wirkung von CBR-5884 ausgegangen.

Im Gegensatz zu CBR-5884 ließ sich die Wirkung von NCT-503 nur bei 3 Zelllinien (GS-57, GS-101, NCH644) durch die Zugabe von GSH oder NAC signifikant antagonisieren (Abb. 21A). Zudem fielen die beobachteten Effekte dieser Substanzen hier deutlich geringer aus, als dies bei CBR-5884 der Fall war (10-20% Wachstumswiederherstellung). Somit ist nicht davon auszugehen, dass die Wirkung von NCT-503 wesentlich von der ROS-Induktion abhängig ist. Weiter konnte durch die Zugabe von 1 mM dm- α KG in den Zelllinien GS-74, GS-86 und GS-90 das Wachstum NCT-503-behandelter Zellen signifikant um 34%, 8%, und 23% wiederhergestellt werden. Der antagonisierende Effekt von 1 mM dm- α KG fiel damit im Vergleich zwar gering aus, könnte jedoch auf eine mögliche Ineffizienz des α KG-Metabolismus bei diesen Zelllinien oder die Beteiligung dieses Metaboliten an der NCT-503-vermittelten Wachstumshemmung hinweisen. Es konnte außerdem beobachtet werden, dass es unter dem Einfluss von NCT-503 im Gegensatz zu CBR-5884 durch die Zugabe von 10 mM dm- α KG, GSH oder NAC zu einer signifikanten Wachstumshemmung oder zur vollständigen Abtötung der Gliomzellen kam (Abb. 21C), was die unterschiedlichen Wirkweisen dieser Inhibitoren zusätzlich unterstreicht und darauf hindeutet, dass hohe Konzentrationen von GSH, NAC und dm- α KG in Kombination mit NCT-503 toxisch sind.

Bezüglich der *IDH1mut*-Gliomzelllinien wurden keine kollektiven Unterschiede im Vergleich mit den verwendeten *IDH1wt*-Glioblastomzelllinien festgestellt. So konnte bei den *IDH1mut* Zelllinien NCH620, NCH1681 und NCH51b für keinen der Inhibitoren eine kongruente Erhöhung des Zellwachstums durch die Zugabe von dm- α KG erreicht werden. Dies deutet darauf hin, dass der beeinträchtigte α KG-

Metabolismus *IDH1*-mutierter Gliomzellen entgegen der initialen Hypothese keine besondere Vulnerabilität gegenüber einer PHGDH-Inhibition darstellt.

Zusammengefasst konnte in diesem Abschnitt erneut die unterschiedliche Wirkung von NCT-503 und CBR-5884 auf Gliomzellen demonstriert werden. So konnte an allen verwendeten Gliomzelllinien nachgewiesen werden, dass die wachstumsinhibierende Wirkung von CBR-5884, nicht jedoch NCT-503 durch Zugabe der ROS-Scavenger GSH und NAC effizient antagonisiert wurde. Somit scheint die Wirkung von CBR-5884 offenbar von der Induktion reaktiver Sauerstoffspezies abhängig zu sein, während NCT-503 diese Abhängigkeit nicht aufweist. Zudem konnte entgegen der initialen Hypothese nachgewiesen werden, dass die wachstumsinhibierende Wirkung der PHGDH-Inhibitoren NCT-503 und CBR-5884 bei *IDH1*-mutierten Gliomzellen nicht primär durch den α KG-Mangel infolge der *IDH1*-Mutation ausgelöst wird. Dies bestätigt die Vermutung aus Abschnitt 3.2.1, dass *IDH1*-mutierte Gliomzellen verglichen mit *IDH1*-WT-Zellen keine erhöhte Sensitivität gegenüber der Inhibition von PHGDH besitzen.

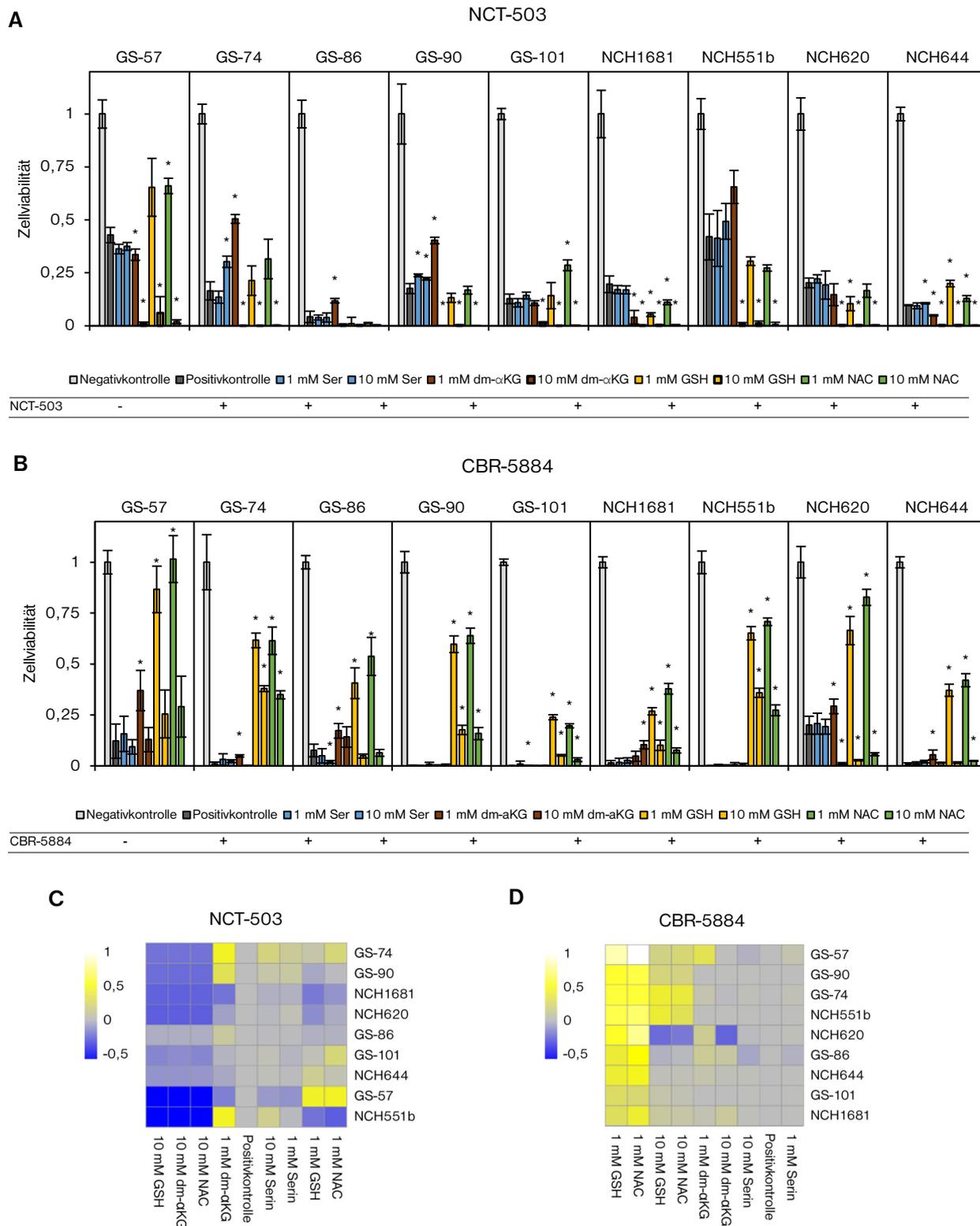


Abbildung 21 | Einfluss von GSH, NAC, dm-αKG und Serin auf die wachstumsinhibierende Wirkung von NCT-503 und CBR-5884. Dargestellt sind die repräsentativen Ergebnisse eines von zwei unabhängigen Experimenten in Triplikaten. Die gezeigten Zelllinien wurden in 96-well Zellkulturplatten ausgesät und für 24 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von NCT-503 bzw. CBR-5884 (je 80 μ M) und 1 bzw. 10 μ M GSH, NAC, dm-αKG oder Serin. Nach der Inkubation für weitere 96 h wurde die Zellviabilität mittels eines ATP-basierten Zellviabilitäts-Assays bestimmt. **A und B**) Balkendiagramme zeigen die Zellviabilität der Gliomzelllinien (Mittelwerte +/- Standardabweichung) relativ zur Negativkontrolle ohne Inhibitor und zugesetzte Substanzen. (* $p < 0,05$, t-Test) **C und D**) Heatmaps der absoluten Differenzen zwischen Positivkontrollen (+Inhibitor) und den stoffspezifischen Zellviabilitäts-Werten aus A und B. Spalten wurden der Übersichtlichkeit halber (unbeachtigt) geclustert. Hohe Werte bedeuten in beiden Fällen eine Wiederherstellung der Zellproliferation.

3.2.5 Einfluss der NCT-503- und CBR-5884-vermittelten PHGDH-Inhibition auf die ROS-Bildung in Gliomzellen

Nachdem gezeigt wurde, dass insbesondere die Wirkung von CBR-5884 bei Gliomzellen durch den Einsatz der ROS-Scavenger NAC und GSH antagonisiert werden kann, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, in welchem Maße und zu welchen Zeitpunkten NCT-503 und CBR-5884 die ROS-Bildung in Gliomzellen induzieren und welchen Effekt die zusätzliche Inkubation mit NAC auf die ROS-Induktion hat. Der ROS-Gehalt wurde hierfür mit Hilfe eines ROS-spezifischen CM-H₂DCFDA-Assays in 7 Gliomzelllinien nach Zugabe dieser beiden Inhibitoren (50 µM) über einen Zeitraum von 96 Stunden verfolgt. Dabei wurden NCH1681 und NCH551b als *IDHmut* Zelllinien, GS-86 als NCT-503-sensitive Zelllinie, GS-90 als CBR-5884-sensitive Zelllinie, GS-57 als besonders resistente Zelllinie gegenüber NCT-503 und CBR-5884, und NCH644 und GS-74 als besonders schnell wachsende Zelllinien mit hoher, bzw. geringer Sensitivität gegenüber CBR-5884 für diesen Versuch ausgewählt.

Wie Abbildung 22 zeigt, konnte bei allen Zelllinien direkt nach der Zugabe von CBR-5884 (0,25 h-Zeitpunkt) verglichen mit nicht-behandelten Zellen ein sprunghafter Anstieg des intrazellulären ROS-Gehalts beobachtet werden. Das Maß dieser ROS-Überproduktion war dabei mit dem ROS-Niveau der verwendeten Positivkontrollen (100 µM Menadion) vergleichbar. Die Höhe ROS-Anstiegs fiel jedoch bei den verschiedenen Zelllinien unterschiedlich aus. Während das ROS-Niveau bei GS-57-, GS-74-, GS-86- und GS-90-Zellen nach 15 Minuten um 25-40% erhöht war, zeigten NCH644-, NCH1681- und NCH551b-Zellen mit etwa 10% einen geringeren ROS-Anstieg. Der Vergleich der absoluten ROS-Werte der verschiedenen Zelllinien (Abb. 23) ergab jedoch, dass NCH644-, NCH1681- und NCH551b-Zellen bereits ein deutlich erhöhtes Basis-ROS-Niveau gegenüber anderer Zelllinien ($4-4,5 \times 10^5$) besaßen. Unabhängig davon erreichten die absoluten ROS-Werte nach 15-minütiger Inkubation mit CBR-5884 bei allen Zelllinien einen ähnlichen Wertebereich ($5,5-6,5 \times 10^5$). Im Anschluss an die initiale ROS-Spitze kam es in den nächsten 4 Stunden bei allen Zelllinien zu einem deutlichen Abfall des ROS-Niveaus, das nach 24 h gegenüber dem Ausgangswert im Mittel nur noch leicht (5-10%) erhöht war und im weiteren Verlauf weiter sank. Bei Zellen, die zusätzlich zu CBR-5884 auch mit 1 mM NAC behandelt wurden, konnte hingegen eine deutliche Verringerung der initialen ROS-Produktion und somit eine Dämpfung dieser ROS-Spitze beobachtet werden. Anstelle der initialen ROS-Spitze wurde jedoch im weiteren Versuchsverlauf eine deutliche und langanhaltende Erhöhung der ROS-Produktion zu späteren Zeitpunkten (24 h+) beobachtet, die bei allen untersuchten Zelllinien zum 24 h-Zeitpunkt das ROS-Niveau des CBR-5884-Ansatzes ohne NAC-Zusatz überstieg.

Im Gegensatz zur Behandlung mit CBR-5884 kam es bei der Behandlung der Gliomzelllinien mit NCT-503 zu keinem sprunghaften initialen ROS-Anstieg. Stattdessen wurde bei den Zelllinien GS-57, GS-74, GS-90 und NCH644 erst zu späteren Zeitpunkten (24 h+) eine Erhöhung der ROS-Niveaus beobachtet. Die ROS-Induktion geschah hier wesentlich langsamer und konnte erst nach 24 Stunden, jedoch über einen wesentlich längeren Zeitraum und einer geringeren Intensität nachgewiesen werden als in den CBR-5884-behandelten Ansätzen. Nach 24 h kam es hier im Mittel zu einer Erhöhung der ROS-Produktion um 15% (GS-86, NCH1681, NCH551b ausgenommen), die durch die Zugabe von NAC signifikant verringert wurde. Auffällig war jedoch, dass bei der Behandlung von GS-86 mit NCT-503 über den gesamten

Zeitraum kein Anstieg der ROS-Produktion beobachtet werden konnte, obwohl GS-86 gegenüber NCT-503 vergleichsweise sensitiv war ($EC_{50} \sim 18 \mu\text{M}$, vgl. Abb. 17).

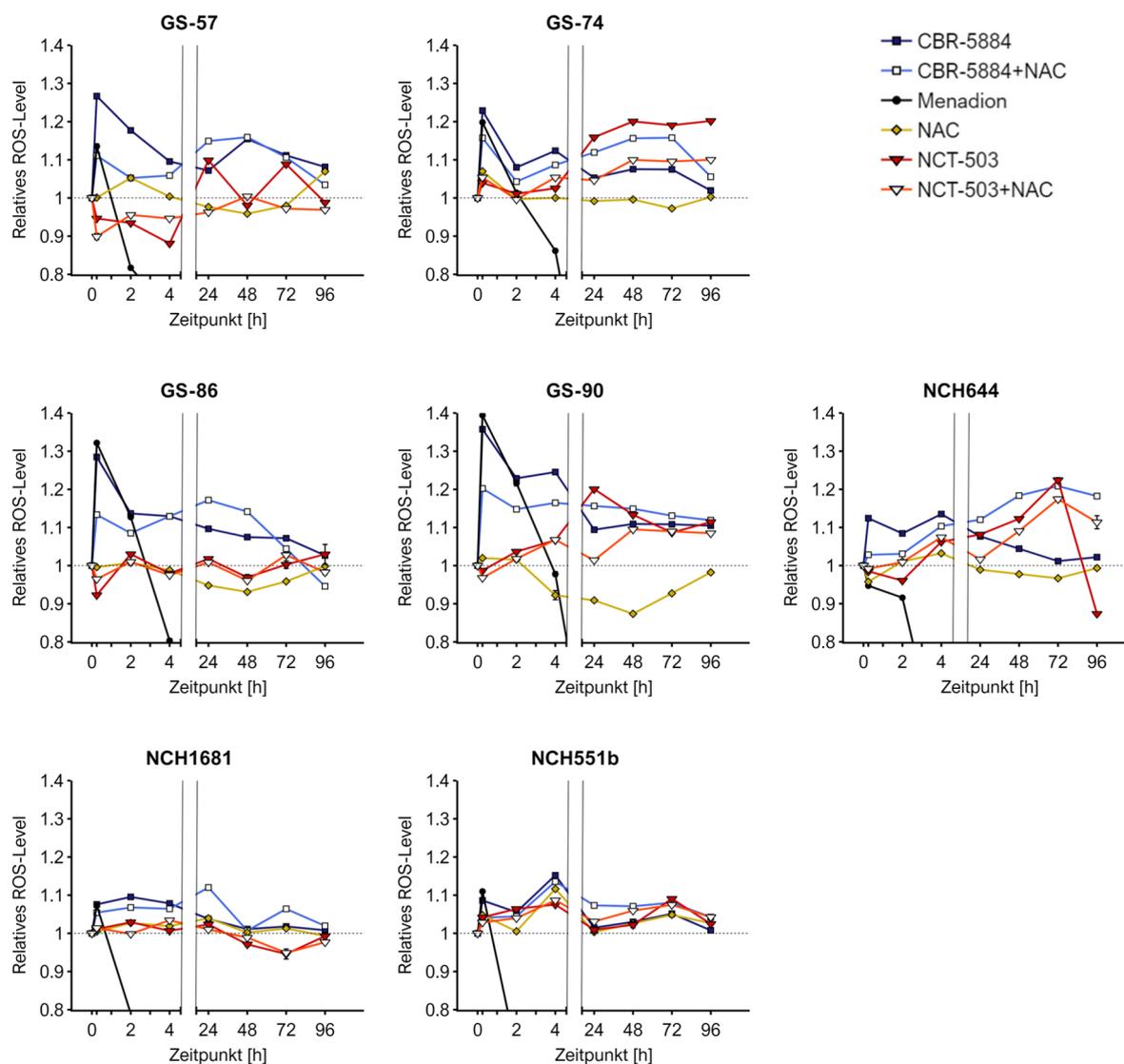


Abbildung 22 | Zeitabhängige Bestimmung der relativen ROS-Niveaus während der Behandlung von Gliomzelllinien mit den PHGDH-Inhibitoren NCT-503 und CBR-5884. GS-57, GS-74, GS-86, GS-90, NCH644, NCH1681 und NCH551b- Zellen wurden mit $50 \mu\text{M}$ CBR-5884 oder NCT-503 sowie mit und ohne 1 mM NAC behandelt. Zur Kontrolle wurden Zellen mit $100 \mu\text{M}$ Menadion (Positivkontrolle), reinem Zellkulturmedium (Negativkontrolle) oder 1 mM NAC versetzt. Proben wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten genommen und mit einem $\text{CM-H}_2\text{DCFDA}$ -Assay durchflusszytometrisch untersucht. Gezeigt sind die Mittelwerte aller Fluoreszenzintensitäten über einem zuvor gewählten Schwellenwert (\pm S.E.M.), normalisiert gegen die Werte der Negativkontrollen zu den gegebenen Zeitpunkten. Die Zugabe von CBR-5884 führte zu einem sprunghaften Anstieg der ROS-Produktion, der durch die Zugabe von NAC verringert werden konnte. Bei der Behandlung mit NCT-503 blieb dieser sprunghafte ROS-Anstieg aus, jedoch wurde hier zu späteren Zeitpunkten (24 h +) ein langanhaltender ROS-Anstieg beobachtet werden.

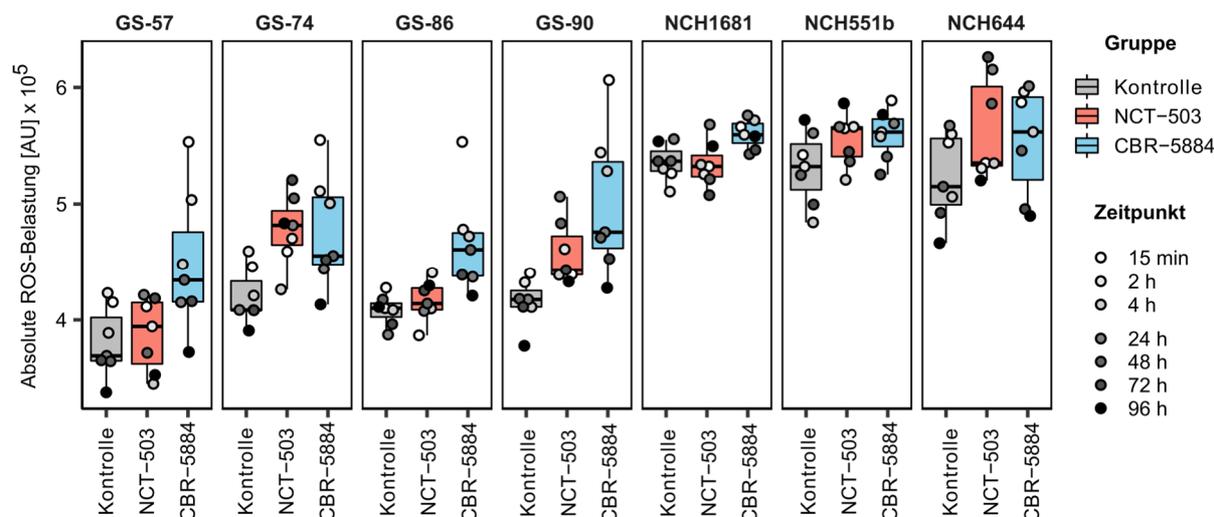


Abbildung 23 | **Zeitabhängige Bestimmung der ROS-Produktion (absolute Werte) während der Behandlung mit NCT-503 (rot) oder CBR-5884 (blau).** Gezeigt sind die absoluten Werte (Rohdaten) der in Abb. 22 dargestellten ROS-Bestimmung bei Gliomzellen während der Behandlung mit NCT-503 und CBR-5884 (+ nicht-behandelte Kontrollen). Die Werte der Kontrollansätze zeigen, dass das ROS-Basis-Niveau bei NCH1681-, NCH551b- und NCH644-Zellen im Vergleich zu den anderen Zelllinien deutlich erhöht ist. Aufgrund dessen scheint der ROS-Anstieg relativ zu Kontrollzellen bei diesen Zelllinien deutlich geringer auszufallen.

Zusammenfassend konnte demonstriert werden, dass CBR-5884 eine starke und schnelle Induktion reaktiver Sauerstoffspezies in allen untersuchten Gliomzelllinien verursachte und dieser Effekt durch die zusätzliche Gabe von NAC abgemildert werden konnte. Die Abdämpfung der anfänglichen ROS-Spitze geschah zwar zugunsten einer deutlichen Erhöhung der ROS-Produktion zu späteren Zeitpunkten, war aber dennoch mit einem positiven Einfluss auf die Zellproliferation assoziiert (vgl. Abschnitt 3.2.4). Bei der Stärke der ROS-Induktion war unter anderem das ROS-Basisniveau ausschlaggebend, welches in den untersuchten Gliomzelllinien teils deutlich unterschiedlich hoch ausfiel. Dabei wurde für die *IDH1*-mutierten Zelllinien NCH1681 und NCH551b, sowie die *IDH1*-Wildtyp-Zelllinie NCH644 ein erhöhtes Basis-ROS-Niveau beobachtet. Für NCT-503 konnte eine erhöhte ROS-Produktion für die meisten Zelllinien erst nach 24 h nachgewiesen werden, was für einen alternativen Wirkmechanismus dieses Inhibitors spricht. Die Tatsache, dass NCT-503 bei GS-86-Zellen trotz ihrer hohen Sensitivität gegenüber diesem Inhibitor keine erhöhte ROS-Produktion verursachte, spricht zudem dafür, dass der Wirkmechanismus von NCT-503 im Gegensatz zu CBR-5884 nicht von der ROS-Induktion abhängig ist.

3.2.6 Wirkung von NCT-503 auf Gliomzellen *in vivo* (Xenograft-Modell)

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die PHGDH-Inhibitoren NCT-503 und CBR-5884 eine wachstumsinhibierende Wirkung auf Gliomzellen *in vitro* haben. Allein auf Basis dieser Daten konnte jedoch kein Rückschluss auf die Wirksamkeit *in vivo* gezogen werden, da die möglichen Wechselwirkungen *in vivo* wesentlich komplexer sind als *in vitro*. Deshalb sollte die Wirkung von NCT-503 im Anschluss an die *in vitro*-Versuche auch an Xenograft-Gliomen *in vivo* getestet werden. NCT-503 wurde hierfür ausgewählt, da sich dieser Inhibitor im Gegensatz zu CBR-5884 für den Einsatz *in vivo* eignet¹³¹ und bereits in Mäusen getestet wurde, wo er das Wachstum orthotoper MDA-MB-468-Tumore signifikant inhibierte¹⁰⁰.

Für diesen Versuch wurde ein orthotopes Xenograft-Modell verwendet, bei dem Gliomzellen der Zelllinien NCH644 oder NCH1681 in das Striatum (Caudatum/Putamen) von immundefizienten *Foxn1^{nu/nu}*-Mäusen injiziert wurden. Diese Zelllinien wurden ausgewählt, da sie im Mausmodell bereits etabliert waren und als Beispiele für schnell- und langsam wachsende Zelllinien dienen sollten. Als Applikationsmethode wurde die lokale Applikation gewählt, da eine Studie von Pacold et al. zeigte, dass bei einer systemischen Gabe von NCT-503 bei Mäusen keine ausreichend hohen NCT-503-Konzentrationen über längere Zeiträume im Gehirn erreicht werden konnten, die eine effiziente Wachstumsinhibierung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Gliomzelllinien erlaubt hätten¹⁰⁰. Zur lokalen Applikation von NCT-503 wurden deshalb eine Woche (NCH644) bzw. sechs Wochen (NCH1681) nach der Injektion der Tumorzellen kleine Hohlschrauben („Guide-Screws“) in die Schädelkalotten der Tiere implantiert. Diese Zeitpunkte wurden gewählt, da auf Basis voriger *in vivo*-Versuche mit diesen Zelllinien davon auszugehen war, dass es hier bereits zur Bildung eines Tumors bei beiden Zelllinien gekommen war.

Vor Beginn des Versuches wurde außerdem ein Toxizitätstest an zwei gesunden *Foxn1^{nu/nu}*-Mäusen durchgeführt, um zu gewährleisten, dass die lokale, interkraniale Applikation von NCT-503 die Tiere nicht schädigt. Dazu wurden Guide Screws in die Schädelkalotten von 2 Mäusen implantiert, durch welche anschließend täglich über 7 Tage je 1 μL oder 2 μL 100 μM NCT-503 (in VLA) injiziert wurden. Hierbei konnten keine neurologischen Auffälligkeiten bei den Tieren festgestellt werden, sodass geschlussfolgert werden konnte, dass diese Behandlung verträglich ist und mit dem Versuch wie geplant fortgeföhren werden konnte. Durch die Öffnungen in diesen Hohlschrauben wurden dann täglich über einen Zeitraum von 14 Tagen je 2 μL 100 μM NCT-503 oder Vehikellösung (VLA, siehe Materialliste im Anhang) direkt in den Tumor injiziert. Für die Zelllinie NCH644 diente in dieser Studie das Gesamtüberleben der Tiere als Ergebnis. Als Endpunkt wurde dabei ein Gewichtsverlust von >10% oder das Auftreten neurologischer Störungen definiert. Da NCH1681-Tumore wesentlich langsamer wachsen als NCH644-Tumore, wurde der Endpunkt für NCH1681-Tumore 9 Wochen nach der 14-tägigen Applikationsphase gesetzt und die Tumorumlumina bestimmt.

Wie aus Abbildung 24A hervorgeht, hatte die lokale Behandlung orthotoper NCH644-Tumore mit 100 μM NCT-503 keine signifikante Wirkung auf das Überleben der Mäuse. Zwar betrug das mittlere Überleben in der Gruppe der NCT-503 behandelten Mäuse 29 Tage und in der Kontrollgruppe 25 Tage,

jedoch ergab ein Log-rank-Test keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ($p = 0,465$). Zudem zeigt die Kaplan-Meier-Kurve (Abb. 24A) bei beiden Gruppen einen ähnlichen Verlauf.

Obwohl NCH1681-Zellen *in vitro* eine wesentlich höhere Sensitivität gegenüber NCT-503 zeigten als NCH644-Zellen, konnte auch bei der lokalen Behandlung orthotoper NCH1681-Tumore mit NCT-503 keine signifikante Wirkung dieses Inhibitors auf das Tumorstadium festgestellt werden. So zeigte sich beim Vergleich der Tumorstadien kein signifikanter Unterschied zwischen der NCT-503-behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe (Abb. 24B).

Zusammenfassend konnte in diesem Versuch trotz der vielversprechenden Wirkung von NCT-503 auf Gliomzellen *in vitro* keine signifikante Wirkung dieses Inhibitors auf das Wachstum orthotoper Xenograft-Tumore *in vivo* erzielt werden.

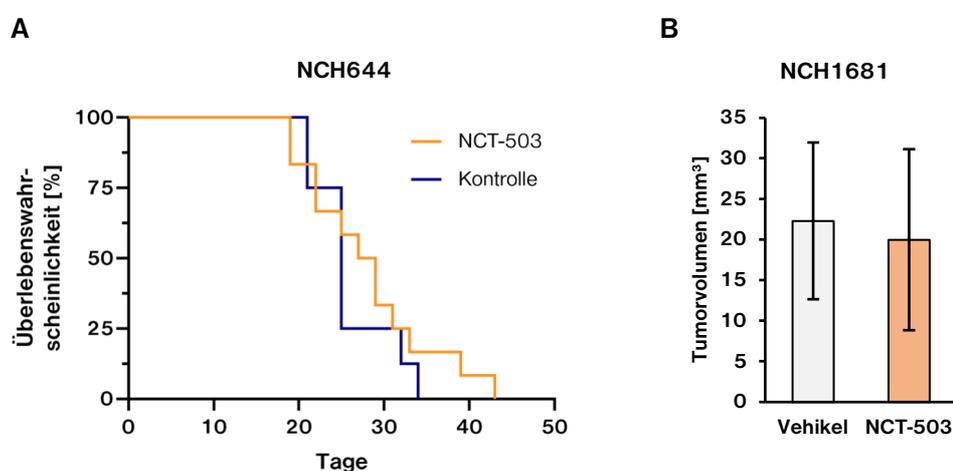


Abbildung 24 | Einfluss von NCT-503 auf das Wachstum orthotoper NCH644- und NCH1681-Tumore *in vivo*. Es wurden je 100.000 (NCH644) bzw. 200.000 Zellen (NCH1681) intrakraniell in $Foxn1^{nu/nu}$ -Mäuse injiziert und nach 1 Woche (NCH644) bzw. 3 Wochen (NCH1681) Guide Screws zur lokalen Applikation von NCT-503 implantiert. Die intrakraniellen Injektionen von je 2 μ L 100 μ M NCT-503 durch die Guide Screw erfolgten täglich über einen Zeitraum von 14 Tagen. **A)** Kaplan-Meier-Kurve des Überlebens von Mäusen mit NCH644-Tumoren. Das mittlere Überleben betrug für Kontrolltiere 25 Tage ($n=8$) und für Tiere, die mit NCT-503 behandelt wurden 28 Tage ($n=12$). Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant ($p = 0,465$; Log-rank-Test). **B)** Beim Vergleich der Tumorstadien von NCH1681-Tumoren ($n=4$ pro Gruppe) nach der Bestimmung der Tumorareale aus HE-gefärbten Hirnschnitten konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der NCT-503-behandelten Gruppe festgestellt werden.

3.3 Entwicklung und Testung neuer Verfahren und Metriken zur Erforschung intratumoraler Tumorheterogenität und klonaler Therapieresistenzen bei Glioblastomen

Im vorigen Teil der Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass das Wachstum von Gliomzellen durch die PHGDH-Inhibitoren NCT-503 und CBR-5884 inhibiert werden konnte. Doch selbst wenn einer dieser Inhibitoren jemals als onkologisches Therapeutikum eingesetzt werden sollte, stellt das Auftreten therapieresistenten Zellklonen ein grundlegendes Problem bei der gezielten Therapie von Gliomen dar. Es wird angenommen, dass die intratumorale Heterogenität von Tumoren eine der Hauptursachen für Therapieresistenzen und ein damit verbundenes schlechtes Gesamtüberleben bei Krebspatienten ist.

Parallel zu den Experimenten zur PHGDH-Inhibition *in vitro* und *in vivo* wurde daher mit der Entwicklung eines Verfahrens begonnen, um mittels RGB-Marking den Einfluss der Tumorheterogenität auf das Auftreten von Therapieresistenzen in Gliomzellen genauer zu untersuchen. Damit sollte im Anschluss überprüft werden, ob die Inhibition mit NCT-503 oder CBR-5884 das Wachstum unterschiedlicher Zellklone gleichmäßig beeinträchtigt oder ob es zur Expansion spezifischer resistenter Zellklone kommt und ob die Analyse dieser Klone auf mögliche Resistenzmechanismen schließen lässt. Dieser Modellversuch sollte außerdem als konzeptioneller Beweis für ein Verfahren zur Identifizierung und Isolierung therapieresistenter Zellklone dienen, welches die Testung von Strategien zur Antagonisierung solcher Klone ermöglicht. Um dies zu erreichen, lag das Ziel dieses Versuchsteils zunächst darin, die Grundlagen zur effizienten Untersuchung klonaler Dynamiken bei RGB-markierten Zellpopulationen sowie zur Identifizierung und Isolierung einzelner Zellklone zu etablieren.

3.3.1 Veränderung der klonalen Dynamik von Gliomzellpopulationen während des Tumorwachstums *in vivo*

Um zu untersuchen, wie stark der Selektionsdruck und die damit verbundene klonale Restriktion bei der Tumorigenese von Glioblastomen *in vivo* ist und die klonalen Dynamiken beim Wachstum von Tumoren besser verstehen zu können, wurde das Wachstum RGB-markierter, orthotoper Xenograft-Tumore verschiedener Glioblastomzelllinien in Foxn1^{nu/nu}-Mäusen studiert. Dazu wurden Glioblastomzellen durch lentivirale Transduktion RGB-markiert, das heißt sie wurden mit 3 verschiedenen Fluoreszenzmarkern (Rot, Grün, Blau) gleichzeitig transduziert. Hierdurch wurden Zellpopulationen generiert, die durch die zufällige Verteilung und die additive Farbkombination verschiedenfarbiger Markerproteine mit unterschiedlichen Farben des kompletten RGB-Farbspektrums markiert wurden. Die Farbkombination dieser Zellen sollten später dazu verwendet werden, einzelne Zellklone zu identifizieren und zu verfolgen. Im Anschluss daran sollte die klonale Dynamik beim Wachstum der Tumore durch durchflusszytometrische Analysen untersucht werden. Dabei sollten die Farbverteilungen der Zelllinien vor Injektion und nach Wachstum der Tumoren verglichen werden, um so das Ausmaß der Veränderung klonaler Farbverteilungen durch das Tumorwachstum *in vivo* zu ermitteln. Hierfür wurden RGB-markierte Zellpopulationen verschiedener Glioblastomzelllinien in das Striatum (Caudatum/Putamen) immundefizienter Foxn1^{nu/nu}-Mäuse injiziert und die Tumoren explantiert, sobald die Tiere einen

Gewichtsverlust von >10% oder neurologische Störungen aufwiesen. Die Tumore wurden anschließend dissoziiert und durchflusszytometrisch analysiert, um die Farbkomposition der extrahierten Tumorzellpopulation zu ermitteln.

Abbildung 25A zeigt, dass für alle Zelllinien vor der Injektion eine homogene Farbverteilung vorlag, was sich durch die gleichmäßige Punkteverteilung in allen fluoreszenz-positiven Quadranten der Graphen erkennen, aber nicht quantifizieren ließ. Im Gegensatz dazu zeigten die Zellpopulationen aus *in vivo*-gewachsenen Tumoren der verschiedenen Zelllinien (Abb. 25A, Maus 1/2) deutlich unterschiedliche Farbverteilungen. Dabei veränderte sich die Farbvielfalt der BT112-Tumor nicht maßgeblich im Vergleich zum Zeitpunkt vor der Injektion. Dies weist darauf hin, dass beim Wachstum von BT112-Zellen *in vivo* viele verschiedenfarbige Klone zur Tumorentstehung beitrugen und dabei keine signifikante Restriktion der Tumorzellpopulation stattfand. Somit ist hier von einer hohen Tumorigenität des Großteils aller eingesetzten Zellklone bei einem gleichzeitig homogenen Wachstumsverhalten der Gesamtzellpopulation auszugehen. Bei BS153- und U87-Tumoren konnten jedoch erhebliche Veränderungen in der Farbverteilung der Zellpopulationen vor und nach dem Tumorwachstum beobachtet werden. Die ungleichmäßige Verteilung der Datenpunkte sowie erkennbare diagonale Streifen in den Fluoreszenzintensitätsgraphen der BS153-Tumore (Abb. 25A, BS153 Maus 1/2) lassen eine klonale Restriktion vermuten, ohne dass diese jedoch quantifiziert werden konnte. Noch ausgeprägter ließ sich dieser Effekt bei Tumoren der U87-Zelllinie (Abb. 25A, U87 Maus 1/2) beobachten. Hier lagen vorrangig einzelne, getrennte Zellpopulationen vor, was darauf hindeutet, dass der Tumor nur aus wenigen, definierten Klonen gebildet wurde. Dies wiederum ist ein Indikator für ein hohes Maß an klonaler Restriktion während des Wachstums von U87-Tumoren, was sich jedoch mit herkömmlichen Analyseverfahren ebenfalls nicht quantifizieren ließ. Aufgrund der beschränkten Möglichkeiten zur Visualisierung der Daten war keine Aussage darüber möglich, wie viele Klone genau im Tumor enthalten waren.

Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass BS153-, BT112- und U87-Zellen beim Wachstum *in vivo* unterschiedlich starke klonale Restriktionen durchlaufen. Eine Quantifizierung oder adäquate visuelle Repräsentation dieses Effektes war auf Basis herkömmlicher Analysetechniken jedoch nicht möglich. Die visuelle Darstellung der Daten als 2-dimensionale Punktdiagramme eignete sich nur zum Nachweis größerer Veränderungen klonaler Dynamiken auf Basis visueller Eindrücke und war für eine detaillierte Analyse der klonalen Zusammensetzung RGB-markierter Zellpopulationen und die Quantifizierung klonaler Wachstumsdynamiken ungeeignet.

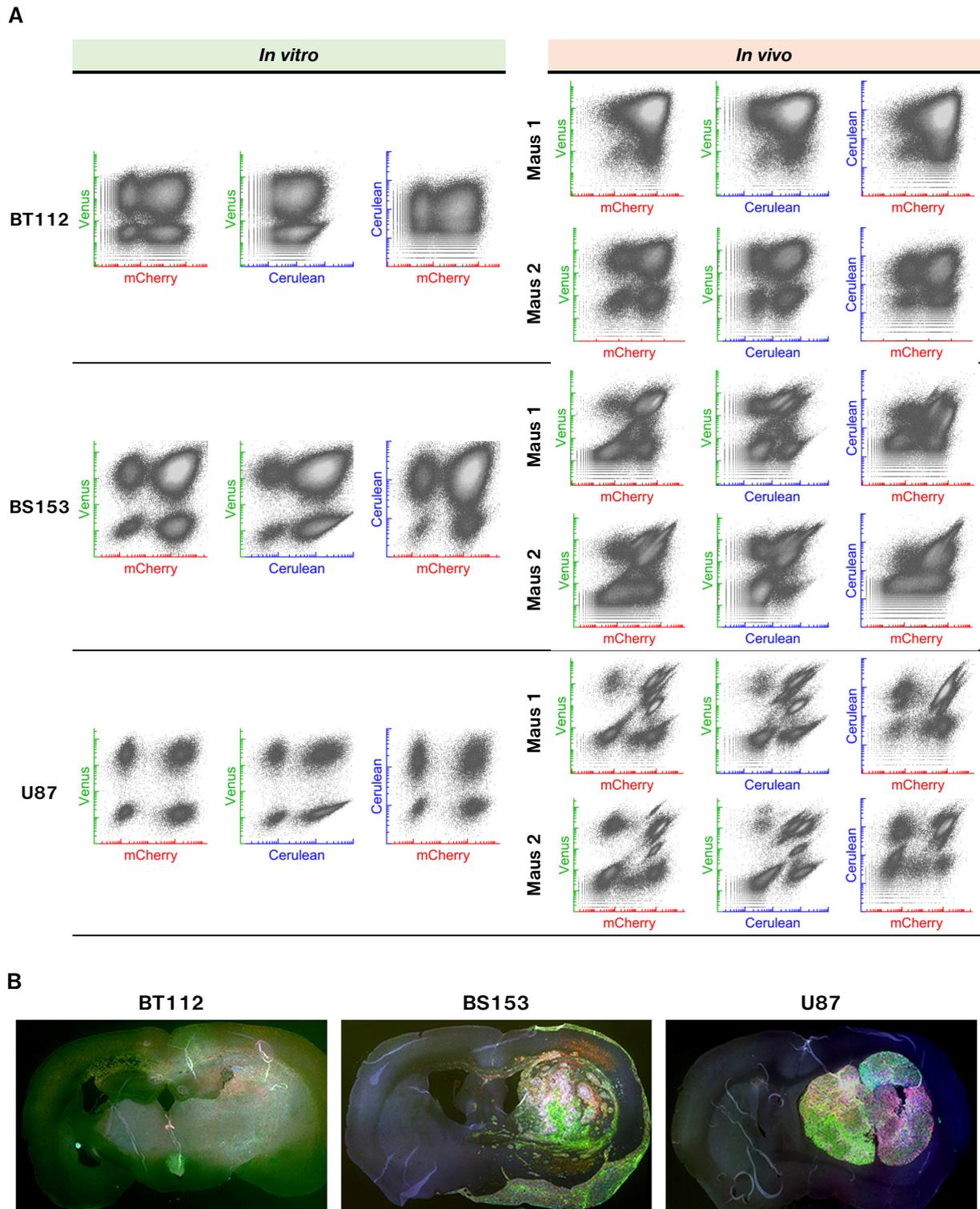


Abbildung 25 | Untersuchung der Wachstumsdynamik RGB-markierter Zellpopulationen der Glioblastomzelllinien BT112, BS153 und U87 *in vivo*. 1×10^5 RGB-markierte BT112, BS153- und U87-Zellen wurden intrakraniell in immundefiziente Foxn1^{nu/nu}-Mäuse injiziert. Tumore wurden entweder explantiert und durchflusszytometrisch untersucht (A) oder es wurden Gewebeschnitte des Gehirns angefertigt, die fluoreszenzmikroskopisch analysiert wurden (B). **A)** Gezeigt sind Punktdiagramme der Fluoreszenzintensitäten für die verwendeten Markerproteine mCherry, Cerulean und Venus nach der durchflusszytometrischen Messung von Tumorzellpopulationen vor Injektion (*in vitro*) sowie von explantierten Tumorzellpopulationen aus je 2 orthotopen Xenograft-Tumoren (*in vivo*: Maus1/Maus2). **B)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Gehirn-Gewebeschnitten zeigen die unterschiedliche räumliche Verteilung verschiedenfarbiger Zellklone in BT112-, BS153- und U87-Tumoren.

3.3.2 Entwicklung und Programmierung der *ChromoClone*-FACS-Analysesoftware zur Visualisierung und Quantifizierung klonaler Heterogenität in RGB-markierten Zellpopulationen

Im vorigen Abschnitt konnte festgestellt werden, dass die Analyse durchflusszytometrischer Daten von RGB-markierten Zellpopulationen mit herkömmlichen Verfahren nur begrenzt möglich war. Nicht nur die effiziente Visualisierung der klonalen Diversität, sondern auch ihre Quantifizierung konnte mit diesen Verfahren nicht erreicht werden und insbesondere die Identifizierung und Isolierung expandierter Zellklone ist hiermit nicht möglich. In einer Studie von Wu et al. wurde eine effektive Methode zur Prozessierung durchflusszytometrischer Daten von RGB-markierten Zellpopulationen vorgestellt, welche sich sogenannten „sphärischen Scatterplots“ (vgl. Abb. 11) bedient und mittels derer eine effiziente Visualisierung und Identifizierung von Einzelzellklonen in einem Chromatizitätsraster erreicht wurde¹⁷⁵. Da RGB-markierte Klone eher durch ihre relative Farbzusammensetzung (Farbton) als durch ihre absoluten Farbtintensitäten (Sättigung) definiert sind, sollte diese Art der Darstellung eine sofortige Übersicht über die klonale Diversität RGB-markierter Zellpopulationen erlauben und weitere Folgeanalysen ermöglichen. Die Studie von Wu et al. fokussierte sich jedoch auf die Identifizierung prädefinierter Zellklone, weshalb der Programmcode, der dieser Arbeit beigelegt war, für tieferegehende Analysen polyklonaler Zellpopulationen, wie denen aus dem vorigen Abschnitt nicht geeignet war. Zudem fehlte es in diesem Programmcode an Funktionen, die eine Identifizierung (Clustering) und Isolierung von Zellklonen aus solchen Zellpopulationen ermöglichen würden.

Deshalb wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit unter Weiterentwicklung vorhandener und der Einführung neuer Analysetechniken mit der Entwicklung einer spezialisierten Analysesoftware zur Untersuchung klonaler Farbzusammensetzungen nicht zuvor definierter, RGB-markierter Zellpopulationen aus durchflusszytometrischen Daten begonnen. Ziel war es, Funktionalitäten in einer Software zu vereinen, die nicht nur eine effiziente visuelle Einschätzung und Quantifizierung klonaler Dynamiken, sondern auch die Analyse klonaler Zusammensetzungen sowie eine robuste Identifizierung und Isolierung einzelner Zellklone ermöglichen sollte. Als Basis diente die Erstellung sphärischer Scatterplots aus durchflusszytometrischen Daten, anhand derer Folgeanalysen durchgeführt werden sollten. Im Zuge dessen wurden auch neue Metriken zur genaueren Charakterisierung von Zellpopulationen und Klonen, sowie Möglichkeiten zur Identifizierung und Isolierung einzelner Klone entwickelt. Die Software, welche in Matlab programmiert und „ChromoClone“ genannt wurde, sowie deren Funktionen und Arbeitsschritte werden im Folgenden erläutert.

Grafische Benutzeroberfläche: Als Basis für die Verwendung von ChromoClone dient eine grafische Benutzeroberfläche, die eine einfache Benutzung ermöglichen soll und gleichzeitig der Übersichtlichkeit bei der Datenanalyse dient (Abb. 26). Zudem wurde das Programm auch mit dem Ziel entwickelt, dass es auch von anderen Forschungsgruppen nutzbar sein sollte, und es wurden viele Schritte automatisiert, um eine effiziente Datenanalyse zu ermöglichen.

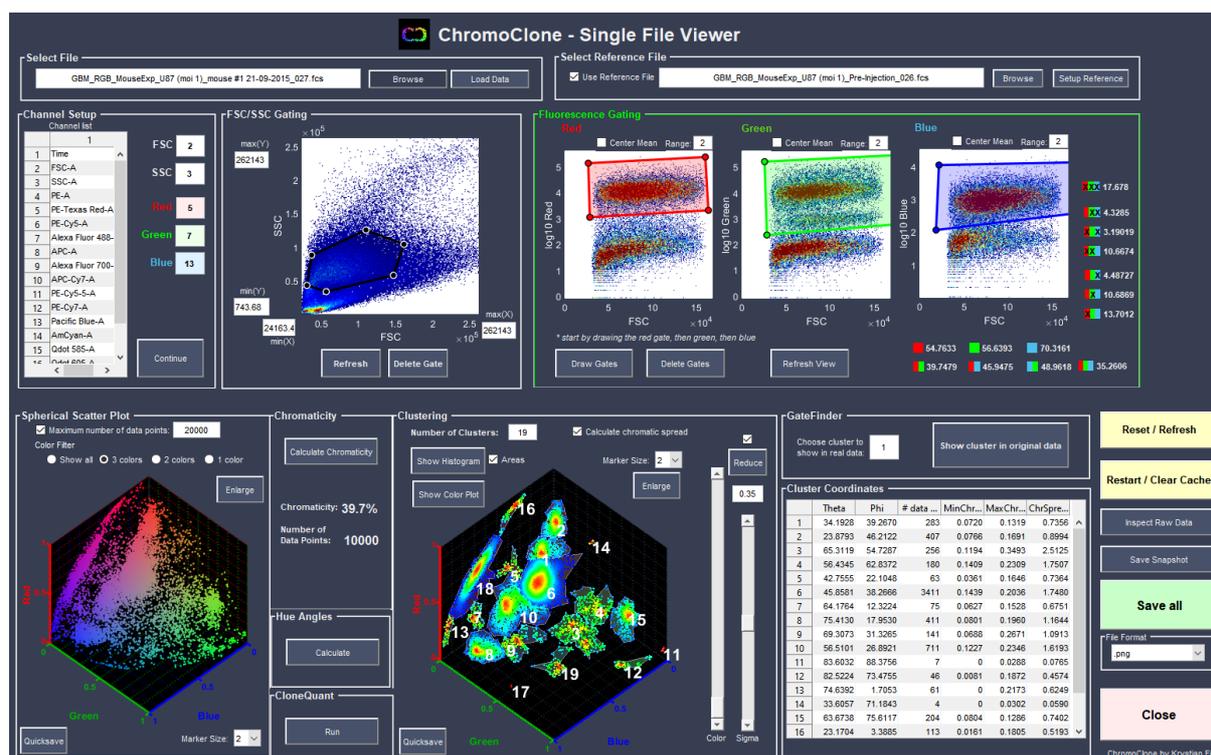


Abbildung 26 | Grafische Benutzeroberfläche der ChromoClone FACS-Analysesoftware. Die Benutzeroberfläche ermöglicht eine einfache Bedienung der Software und eine effiziente Analyse der Proben. Die zu untersuchende Datei wird eingelesen und die entsprechenden Kanäle für rote, grüne und blaue Fluoreszenz aus einer Tabelle ausgewählt (oben links). Es kann außerdem eine Referenzdatei zur Normalisierung der Fluoreszenzintensitäten verwendet werden (oben rechts). Die gesuchte Zellpopulation wird im FSC/SSC-Graphen ausgewählt und die fluoreszenzpositiven Zellen in den Fluoreszenz-Graphen selektiert und gefiltert. Die Statistiken neben diesen Graphen geben einen Überblick über die Verteilung von ein-, zwei- und dreifarbigem, sowie nicht markierten Zellpopulationen. Auf Basis der ausgewählten Datenpunkte wird der sphärische Scatterplot der Zellpopulation erstellt (siehe Abschnitt 3.3.3). Im nächsten Schritt kann eine Berechnung der Chromatizität mit den Punkten aus dem sphärischen Scatterplot durchgeführt werden (siehe Abschnitt 3.3.5). Für eine genaue Analyse und Quantifizierung einzelner Cluster in diesem Graphen steht ein hierarchischer Clusteringalgorithmus zur Verfügung (siehe Abschnitt 3.3.7.1). Neben der Quantifizierung der Anzahl der Datenpunkte jedes Clusters können auch der Variationskoeffizient dieser Quantifikation, sowie die sphärischen Koordinaten der Clusterzentroide, die chromatische Streuung und die chromatischen Dimensionen (siehe Abschnitt 3.3.7.2) bestimmt werden. Weiterhin bietet der integrierte GateFinder die Möglichkeit, Gate-Koordinaten aus Rohdaten von Clustern (Klonen) zu erstellen, um diese per FACS zu sortieren (siehe Abschnitt 3.3.8).

Importierung der Rohdaten aus dem FCS-Dateiformat und Kanalauswahl: ChromoClone ist in der Lage, die meisten FCS-Datenformate, in denen durchflusszytometrische Daten standardmäßig gespeichert werden, direkt zu importieren. Dazu verwendet das Programm die Funktion *fca_readfcs* von Laszlo Balkay (mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/9608-fca_readfcs). Unabhängig davon können Rohdaten auch als tabulatorgetrennte Textdateien eingelesen werden. Zur Kanalauswahl wird eine Tabelle aller verfügbaren Kanäle und deren Position in der Datenmatrix auf der Benutzeroberfläche dargestellt. Benötigt werden für die Ausführung von ChromoClone die Kanäle für die Vorwärts-(FSC) und Seitwärtsstreuung (SSC), sowie drei Fluoreszenz-Kanäle.

Datenfilterung durch FSC/SSC Gating: ChromoClone bietet die Möglichkeit, lebende Zellen auf Basis ihrer FSC und SSC-Werte auszuwählen (Gating). Dafür werden die FSC- und SSC-Werte zunächst mit der *hist3*-Funktion als farbiges 2D-Histogramm dargestellt, um neben der Datenpunktverteilung auch die Dichte der Datenpunkte sichtbar zu machen und so das Gating zu vereinfachen. Über die *drawpolygon*-Funktion wird nun das Areal mit den gewünschten Datenpunkten auf dem Histogramm mit einem

Polygon umschlossen. Die Matrix mit den Ausgangswerten wird dann über die *inpolygon*-Funktion auf die im ausgewählten Bereich enthaltenen Datenpunkte reduziert.

Auswahl Fluoreszenz-positiver Populationen und Normalisierung: Nach der zuvor erwähnten Datenfilterung müssen die verschiedenen Farbkanäle untereinander normalisiert werden, damit eine gleichmäßige Verteilung der Datenpunkte auf dem sphärischen Scatterplot erreicht werden kann. Um eine Normalisierung der Fluoreszenzintensitäten der drei Farbkanäle durchzuführen, werden Fluoreszenz-positive Datenpunkte nach Fluoreszenzintensitäten in den entsprechenden 2D-Histogrammen (FSC/Fluoreszenz-Gating) ausgewählt. Falls keine Referenzdatei eingerichtet wurde, werden diese ausgewählten Datenpunkte für die anschließende Normalisierung Fluoreszenz-positiver Werte verwendet, bei der zunächst für jeden Kanal der Mittelwert dieser Datenpunkte bestimmt wird. Ebenso wird der Mittelwert der Intensitäten Fluoreszenz-negativer Punkte zur Normalisierung Fluoreszenz-negativer Werte ermittelt. Dabei ist es wichtig, dass Fluoreszenz-positive und fluoreszenz-negative Werte getrennt voneinander normalisiert werden, da beispielsweise bei den hier verwendeten Markern zur RGB-Markierung der Zellen die Fluoreszenz-positiven und -negativen Populationen im Cerulean(Blau)-Kanal z.B. deutlich dichter zusammen liegen als bei den anderen Kanälen und in einigen Fällen sogar überlappen. Dies hätte zur Folge, dass nach einer Normalisierung gegen den Intensitätsmittelwert Fluoreszenz-positiver Werte die Blau-negativen Werte wesentlich höher wären als die Rot- und Grün-negativen Werte, was zu einer Verzerrung der Datenpunkte auf dem Chromatizitätsraster führen würde.

Normalisierung zu Referenzdatensätzen: ChromoClone ermöglicht auch die Normalisierung von Datensätzen mit einem Referenzdatensatz. Dies ist zum Beispiel dann vorgesehen, wenn Zellpopulationen vor und nach klonaler Restriktion verglichen werden sollen, da sich durch eine starke Verringerung der klonalen Vielfalt die mittleren Fluoreszenzintensitäten einzelner Kanäle, und damit auch die Normalisierungsfaktoren, verändern können. Dies hätte zur Folge, dass die Positionen von Klonen auf dem sphärischen Scatterplot zwischen verschiedenen Datensätzen nicht mehr deckungsgleich wären und kann verhindert werden, indem alle Subpopulationen zum Original- oder Referenzdatensatz normalisiert werden. Hierfür wurde ein Subprogramm erstellt, in dem die Referenzpopulation ausgewählt und analysiert werden kann.

Auf Basis der gerade vorgestellten Grundfunktionen wurde das Programm anschließend weiter ausgebaut und schrittweise neue Funktionalitäten, wie die Erstellung sphärischer Scatterplots, hinzugefügt. Auf diese Funktionen wird im Folgenden weiter eingegangen.

3.3.3 Visualisierung klonaler Farbverteilungen durch sphärische Scatterplots

Wie bereits beschrieben wurde, sollte die Visualisierung von FACS-Daten durch sphärisches Scatterplotting eine sofortige und intuitive Einschätzung der klonalen Farbverteilungen ermöglichen. Um dies zu testen, wurden mittels der ChromoClone-Software sphärische Scatterplots der RGB-markierten Zellpopulationen von BS153-, BT112- und U87-Zellen vor und nach Tumorwachstum *in vivo* aus Abschnitt 3.3.1 erstellt und analysiert. Zur Erstellung sphärischer Scatterplots wurden lebende Zellen per

FSC/SSC-Gating gefiltert und die Gates zur Detektion von Fluoreszenz in den drei Farbkanälen gesetzt. Zellen, die in keinem der drei Kanäle Fluoreszenz zeigten, wurden aus dem Datensatz herausgefiltert. Zur Normalisierung der Datensätze wurden stets die *in vitro* Zellpopulationen vor Injektion als Referenz verwendet. Anschließend wurden die normalisierten Intensitäten aller Datenpunkte für rote, grüne und blaue Fluoreszenz verwendet und die Länge der Ortsvektoren dieser Punkte nach folgender Formel auf den Wert 1 festgesetzt:

$$(1) \text{ [R G B]}_{\text{Sphere}} = \text{[R G B]}_{\text{Space}} \times \frac{1}{\sqrt{R^2 + G^2 + B^2}}$$

Hierbei sind $[\text{RGB}]_{\text{Sphere}}$ die Koordinaten im sphärischen Scatterplot und $[\text{RGB}]_{\text{Space}}$ die normalisierten Koordinaten im dreidimensionalen Raum. Diese transformierten Koordinaten wurden anschließend als dreidimensionale Scatterplots dargestellt.

Die in Abbildung 27 gezeigten sphärischen Scatterplots ermöglichten, verglichen mit zweidimensionalen Scatterplots aus Abschnitt 3.3.1 eine verbesserte Einschätzung der klonalen Diversität der Zellpopulationen. Besonders bei der Tumor-Probe der U87-Zelllinie konnte beobachtet werden, dass einzelne Farbkclone als definierte Cluster im sphärischen Scatterplot erscheinen. Zudem ließ sich so eine genauere Einschätzung über die Anzahl und Verteilung dominanter Klone gewinnen. Auch die apparente Farbe der Klone (nach Weißabgleich) ließ sich auf diese Weise abschätzen, was auch zur fluoreszenzmikroskopischen Identifizierung und Verfolgung von Klonen dienen könnte.

Insgesamt können auf Basis der sphärischen Scatterplots aus Abbildung 27 viele der Aussagen über die klonale Diversität der verschiedenen Zellpopulationen aus 3.3.1 bestätigt und besser verdeutlicht werden. Zunächst zeigten alle Zellpopulationen vor Injektion eine gleichmäßige Farbverteilung, die sich durch die Visualisierung mit sphärischen Scatterplots intuitiver nachvollziehen lässt. Weiter zeigt sich bei der BT112-Zelllinie kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Datenpunkte *in vitro* und *in vivo*. Somit konnte hier keine klonale Selektion oder Restriktion während des Tumorwachstums beobachtet werden. Im starken Kontrast dazu steht die U87-Zelllinie. Trotz der homogenen Farbverteilung der Zellpopulation vor Injektion zeigt die Farbverteilung der Tumor-Probe erhebliche Inhomogenitäten, wobei sich im dreifarbigem Bereich des Graphen nur etwa 10 definierte Klone nachweisen ließen. Für die BS153-Zelllinie ergab sich wiederum ein Bild, welches zwischen dem der U87 und BT112 lag. Hier zeigte sich eine überwiegend homogene Farbverteilung, jedoch mit einigen dominanten Klonen, die deutlich expandiert waren.

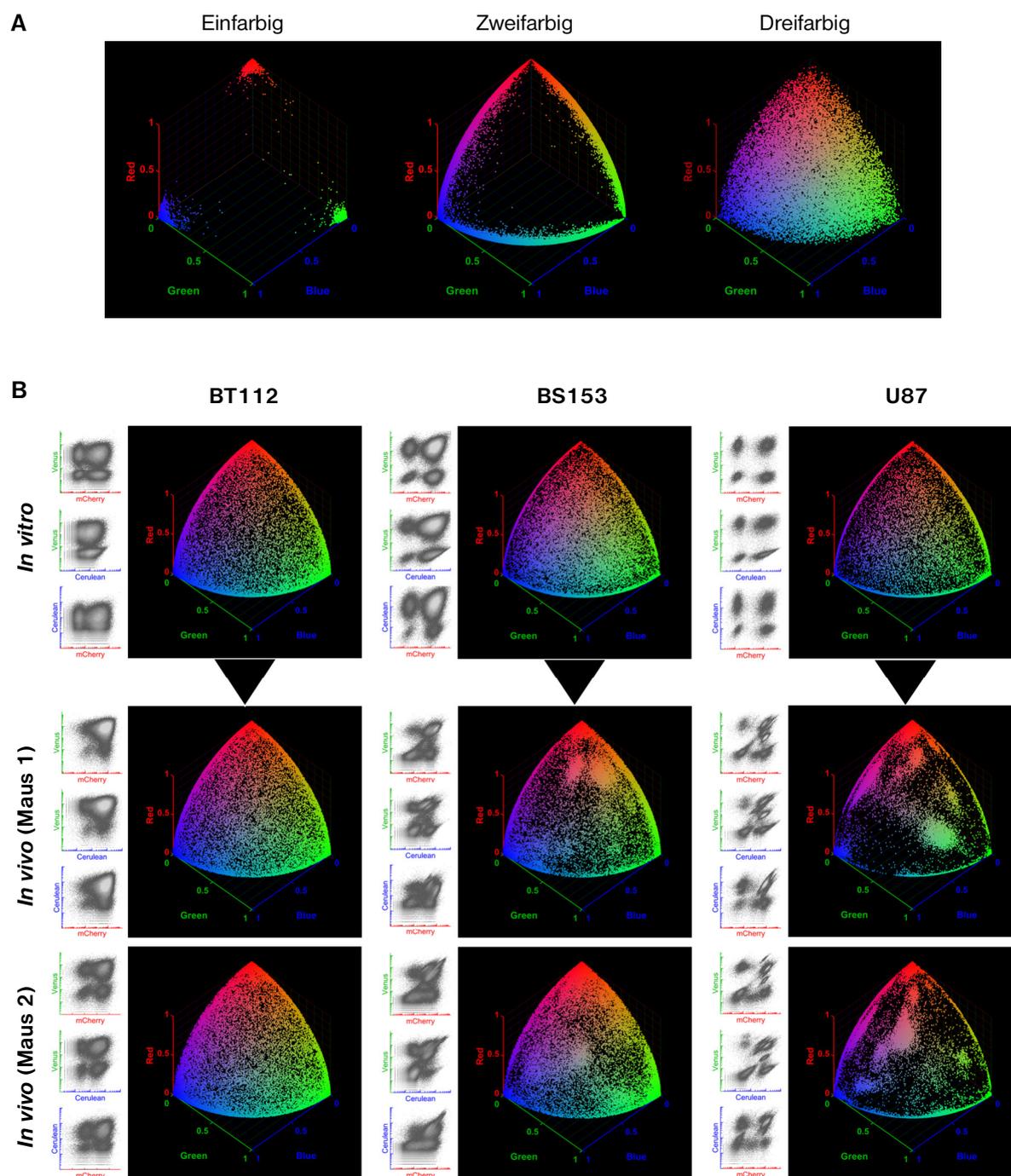


Abbildung 27 | Visualisierung der Unterschiede zwischen RGB-markierten Zelllinien vor und nach Tumorwachstum *in vivo* durch sphärische Scatterplots. **A**) Die Darstellung durchflusszytometrischer Daten von ein-, zwei- und dreifarbigem BS153-Zellen (vor Injektion) als sphärische Scatterplots verdeutlicht, in welchen Bereichen des Graphen diese Zellen dargestellt werden. **B**) Vergleich der Darstellung durchflusszytometrischer Datensätze der RGB-markierter Zellpopulationen von BT112-, BS153- und U87-Zellen vor (*in vitro*) und nach (*in vivo*) Tumorwachstum *in vivo* als klassische 2D-Scatterplots und als sphärische Scatterplots. Sphärische Scatterplots erlauben eine intuitivere Einschätzung der klonalen Heterogenität des Tumors, da hochproliferative Zellklone als Cluster sichtbar werden.

3.3.3.1 Punktdichte-Farbgebung

Um die Unterscheidung überlappender Cluster auf dem Chromatizitätsraster zu vereinfachen und eine optische Hilfestellung für die Trennung und Quantifizierung von Clustern zu geben, wurde eine spezielle Farbgebung implementiert, die Datenpunkte basierend auf der Anzahl benachbarter Datenpunkte innerhalb eines bestimmten Radius färbt. Hierzu wird für jeden Punkt $P(i) = [R \ G \ B]$ die Anzahl der Datenpunkte N_P innerhalb eines Radius von 0,03 bestimmt und diesem Punkt zugeordnet. Diese Werte $N_P(i)$ werden dann gegen den maximalen N_P -Wert normalisiert und Farbtöne werden den Punkten auf Basis dieser Werte zugewiesen. Dabei wurden ausschließlich dreifarbige Zellpopulationen analysiert, da diese aufgrund ihrer großen Variation von Farbkombinationen (>90% der Fläche des sphärischen Scatterplots; vgl. Abb. 27A) das größte Potenzial zur Identifizierung und Unterscheidung von Klonen bieten und daher im Rahmen dieser Arbeit primär von Interesse waren. Weiterhin sollte durch die Exklusion von ein- und zweifarbigen Zellen eine Erhöhung der Datenpunktdichte im dreifarbigem Farbraum erreicht werden, da sich dreifarbige Zellen sonst aufgrund der hohen Datenpunktdichten im ein- und zweifarbigem Bereich des sphärischen Scatterplots in den Hintergrund rücken würden.

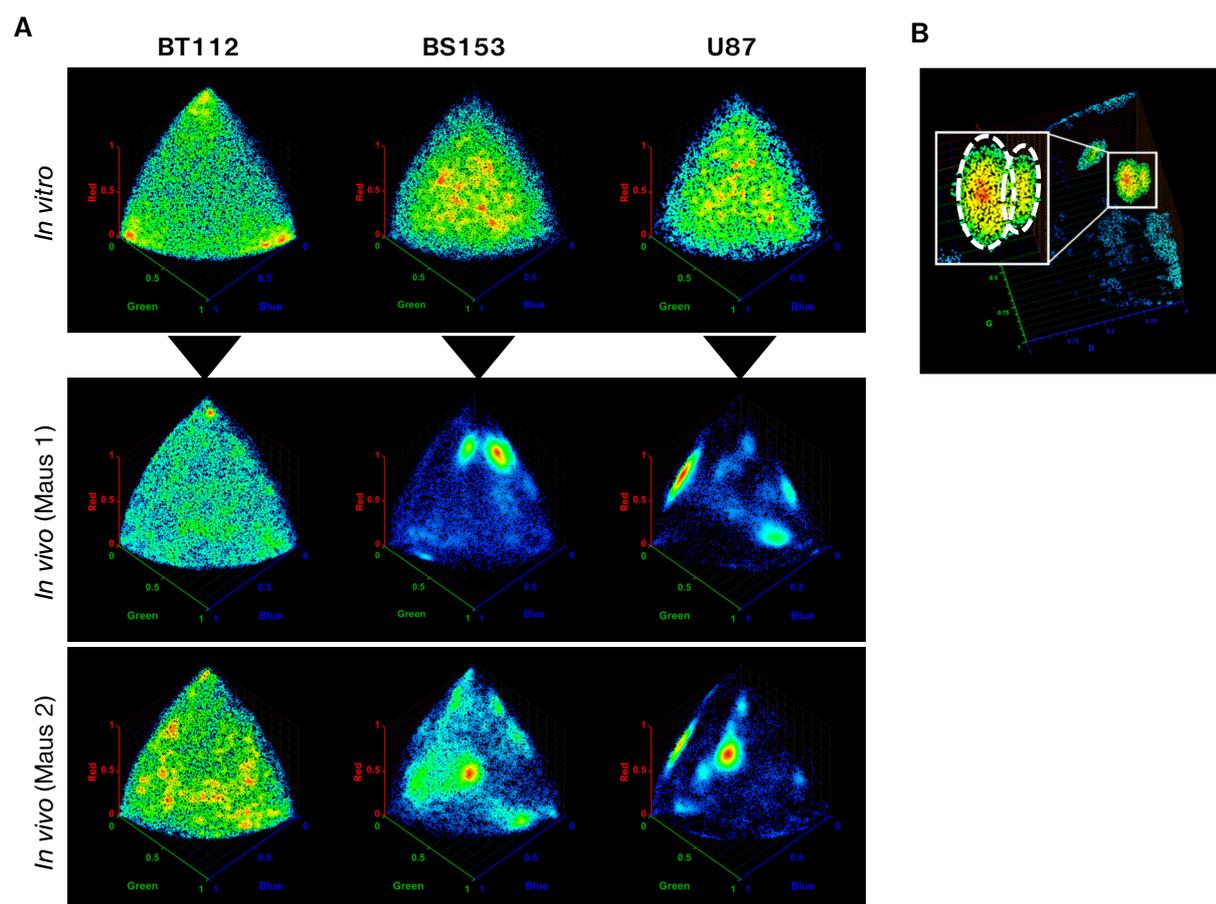


Abbildung 28 | Die Farbgebung der Punkte nach Punktdichte ermöglicht eine deutlichere optische Einschätzung der klonalen Farbverteilung und Abgrenzung von Clustern. **A)** Datensätze aus Abbildung 27, gefiltert nach dreifarbigen Zellen und dargestellt als sphärische Scatterplots mit Punktdichte-Farbgebung. Diese Farbgebung ermöglicht auch die Erkennung von weniger dominanten Klonen (siehe z.B. BS153, Maus 2). **B)** Aufsicht auf ein Cluster des sphärischen Scatterplots eines BS153-Tumors (Maus 1) aus Abschnitt 3.3.1. Mit Hilfe der Punktdichte-Farbgebung war es möglich zu zeigen, dass es sich hier um zwei überlappende Cluster handelt.

Nach Anwendung dieser Farbgebung auf alle dreifarbigigen Zellpopulationen der Datensätze aus dem vorigen Abschnitt, lassen sich die klonale Farbverteilung und die Bildung von Clustern leichter nachvollziehen (siehe Abb. 28). Anhand eines BS153-Tumors (Maus 1) konnte zudem gezeigt werden, dass es sich bei einem der dominanten Cluster im rot-grünen Bereich des Chromatizitätsrasters um zwei überlappende Cluster handelte (siehe Abb. 28B). Die Fähigkeit, Cluster und ihre Zentroide zu identifizieren ist gerade für ihre Quantifizierung und Isolation unabdingbar, weshalb für weitere Analysen hauptsächlich diese Art der Farbgebung genutzt wurde.

3.3.4 Entwicklung einer Methode zur automatischen Hintergrundreduzierung zur effizienten Identifikation und Abgrenzung einzelner Klone

Um den Kontrast von Clustern, bzw. Klonen auf dem sphärischen Scatterplot zu erhöhen und Datenpunkte aus Arealen mit besonders niedrigen Datenpunktdichten entfernen zu können, wurde auf Basis der in 3.3.3.1 vorgestellten Punktedichte-Farbgebung eine optionale Hintergrundreduzierung in ChromoClone integriert. Dabei werden Datenpunkte anhand der Anzahl benachbarter Punkte aus dem Datensatz gefiltert. Wie in 3.3.3.1 beschrieben wurde, wird dabei für alle Datenpunkte die Anzahl benachbarter Punkte N_P innerhalb des Radius 0,03 bestimmt (vgl. Abschnitt 3.3.3.1). Punkte mit N_P -Werten $<$ Cutoff werden aus dem Datensatz entfernt. Der Cutoff-Wert wird dabei wie folgt berechnet:

$$(4) \text{ Cutoff} = \text{Faktor} \times \frac{1}{n} \times \sum_{i=1}^n N_P(i)$$

Hier ist n die Anzahl der Datenpunkte im Datensatz ist und $N_P(i)$ die Anzahl der Datenpunkte innerhalb eines Radius von 0,03 vom Punkt $P(i)$. Der Faktor kann frei gewählt werden, um je nach Intensität des Hintergrunds den Schwellenwert für die Entfernung von Datenpunkten anzupassen (Abb. 29).

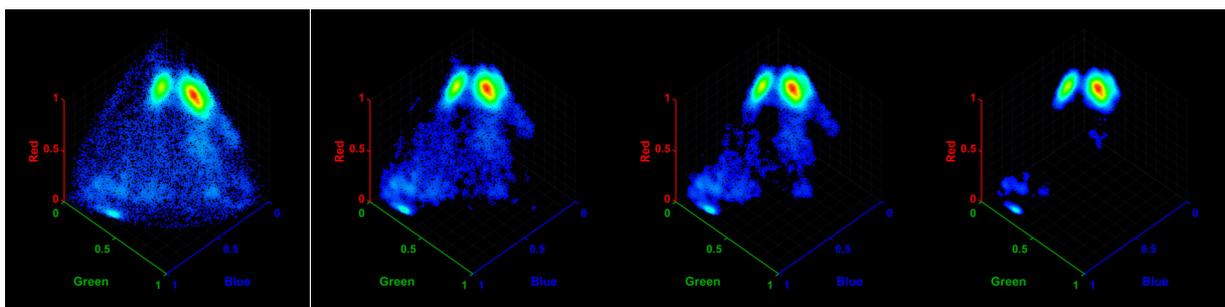


Abbildung 29 | Hintergrundreduzierung von sphärischen Scatterplots am Beispiel durchflusszytometrischer Daten eines BS153-Tumors (vgl. Abschnitt 3.3.3.1). Links: Originaldaten ohne Hintergrundreduzierung. Für die Berechnung des Cutoffs in Formel (4) wurden für die weiteren dargestellten Datensätze (von links nach rechts) die Faktoren 0,75 (2.v.l.), 1 (2.v.r.) und 2 (rechts) verwendet.

3.3.5 Entwicklung der Chromatizitäts-Metrik zur Quantifizierung von Tumorheterogenität und klonaler Restriktion

Um Unterschiede der klonalen Farbverteilungen zwischen Zellpopulationen nicht nur visuell, sondern auch quantitativ untersuchen zu können, musste eine neue Metrik entwickelt werden, auf Basis derer statistisch signifikante Aussagen über die klonale Farbvielfalt RGB-markierter Zellpopulationen getroffen werden konnten. Dies war einerseits wichtig für die generelle Auswertbarkeit von Experimenten, ist andererseits aber auch für die Publizierbarkeit gewonnener Daten von zentraler Bedeutung. Diese Metrik sollte ein Maß dafür sein, welcher Anteil der Fläche des sphärischen Scatterplots mit Datenpunkten „belegt“ ist, oder genauer, welcher Anteil des möglichen Farbspektrums in einer Gesamtzellpopulation vorhanden war und wurde als „Chromatizität“ χ (chi, vom griechischen $\chi\rho\acute{\omega}\mu\alpha$ oder „chroma“ = „Farbe“) bezeichnet. Sie war damit auch ein Maß für die klonale Farbvielfalt oder -Restriktion RGB-markierter Zellpopulationen. Definiert wurde dieser Wert als die Fläche des mit Datenpunkten „besetzten“ Bereiches des sphärischen Scatterplots, geteilt durch die Gesamtfläche dieses Graphen (in Prozent). Die Gesamtfläche dieser Achtersphäre berechnet sich dabei aus der Oberfläche einer Kugel mit Radius 1: $A_{\text{Gesamt}} = 4\pi r^2/8 = \pi/2$. Der Chromatizitäts-Wert χ wird in % ausgegeben, wobei hohe Werte (Maximum 100%) eine homogene Farbverteilung beschreiben, während ein niedriger Wert für eine heterogenere Farbverteilung oder eine erhöhte klonale Restriktion spricht.

Aufgrund der Tatsache, dass die Datenpunkte auf dem sphärischen Scatterplot selbst eindimensional sind, also keine räumliche Ausdehnung besitzen, kann die Berechnung des von Datenpunkten „besetzten“ Areal nicht ohne Weiteres erfolgen. Um das „besetzte“ Areal zu berechnen, welches als der Schnittpunkt der Datenpunkte mit der Oberfläche des sphärischen Scatterplots definiert ist, musste den Datenpunkten zunächst ein Radius (und damit eine kreisförmige Oberfläche auf dem sphärischen Scatterplot) zugewiesen werden. Damit Proben auch dann vergleichbar sind, wenn sie nicht die gleiche Anzahl von Datenpunkten besitzen, musste sich der Radius abhängig von der Anzahl der Datenpunkte verändern. Deshalb wurde dieser Radius für eine Anzahl von 10.000 Datenpunkten festgelegt und anhand folgender Formel angepasst (vgl. Abb. 33A):

$$(5) r_n = r_{10k} \times \frac{10,000}{n}$$

Hier ist n die Anzahl der Datenpunkte, r_n der Radius bei n Datenpunkten und r_{10k} der auf 10.000 Datenpunkte festgelegte Radius (der in dieser Arbeit ermittelte optimale Wert lag bei 0,014; siehe Abschnitt 3.3.5.4).

3.3.5.1 Berechnung der Chromatizität – Vektorbasierte Methode

Zur exakten Berechnung der Chromatizität wurde zunächst eine vektorbasierte Methode genutzt. Dabei wurde für jeden Punkt zunächst die Fläche berechnet, die dieser auf dem sphärischen Scatterplot „belegt“. Hierfür wurde jedem Punkt eine Fläche zugeteilt, die der Mantelfläche eines Kugelsegments einer Kugel mit dem Radius 1 innerhalb des Radius r_n entspricht und nach folgender Formel berechnet wurde:

$$(6) A_{\text{Punkt}} = 2\pi(1 - \cos(\alpha)) \quad , \text{ mit } \alpha = \arcsin\left(\frac{r_n}{2}\right)$$

Dabei stellt der Winkel α den Winkel von einem Punkt bis zur Schnittgrenze des sphärischen Scatterplots mit einer Kugel mit Radius r_n (ausgehend von diesem Punkt) dar. Von dieser Fläche wurden weiter die überlappenden Flächen anderer Punkte subtrahiert, die zuvor schon analysiert wurden. Dazu überprüfte ein Algorithmus, ob sich solche Punkte in der Nähe ($2 \times r_n$) des untersuchten Punktes befanden. Die Einzelflächen wurden dann zu einer Gesamtfläche addiert, die ins Verhältnis zur maximalen Gesamtfläche des sphärischen Scatterplots ($\pi/2$) gesetzt wurde. Als nächstes wurde die Überlappung zwischen dem beobachteten Datenpunkt und allen zuvor untersuchten Datenpunkten innerhalb des Radius r_n berechnet. Dazu wurden Richtung und Distanz dieser Punkte im Bezug auf den untersuchten Punkt als Wertepaar aus dem Winkel θ ($0-360^\circ$) und der euklidischen Distanz berechnet. Um dies zu erreichen wurden für jeden Punkt 2 Hilfsvektoren konstruiert.

$$(7) \vec{OS} = \langle -y_n | x_n | 0 \rangle$$

$$(8) \vec{OT} = \left\langle -\sqrt{\frac{z_n^2}{1 + \frac{y_n^2}{x_n^2}}} \mid -\frac{y_n}{x_n} \times \sqrt{\frac{z_n^2}{1 + \frac{y_n^2}{x_n^2}}} \mid \sqrt{x_n^2 + y_n^2} \right\rangle \quad \text{für } x_n \neq 0, y_n \neq 0, z_n \neq 0$$

Hier sind x_n , y_n und z_n die entsprechenden x, y und z -Koordinaten (blau, grün, rot) von Punkt n.

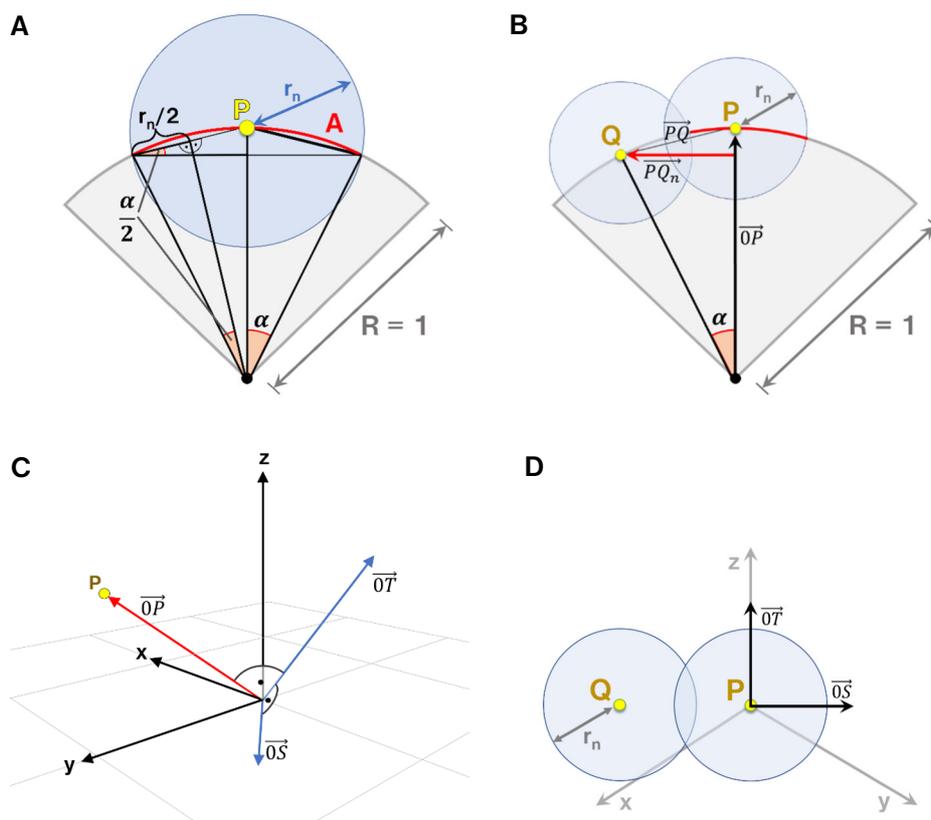


Abbildung 30 | Geometrische Grundlagen der vektorbasierten Berechnung der Chromatizität. A-B) Grundsätze für die Berechnung der Kalottenfläche A (rot), die vom Punkt P mit dem Radius r_n eingeschlossen ist. Die Grundfläche des sphärischen Scatterplots ist in grau dargestellt. B) Berechnung des Normalenvektors PQ_n für die Richtungsbestimmung des Punktes Q relativ zu Punkt P. C-D) Orientierung der Normalenvektoren OT und OS relativ zum Ursprungsvektor des untersuchten Punktes OP. D) Frontale Aufsicht des Punktes P auf dem sphärischen Scatterplot und Orientierung der Vektoren OT und OS im Vergleich.

\vec{OT} diente primär der Normalisierung zur Winkelberechnung (Festlegung des 0° -Winkels), da alle Winkel zwischen \vec{OT} und dem Ursprungsvektor des Punktes n berechnet werden. \vec{OS} hingegen wurde ausschließlich verwendet um zu bestimmen, ob der errechnete Winkel zwischen $0-\pi$ oder $\pi-2\pi$ lag. Beide Vektoren waren Normalvektoren zu $(x_n|y_n|z_n)$.

Zur Berechnung der Richtung aller Punkte I_n relativ zum Ausgangspunkt N , wurden zunächst alle Normalvektoren zu \vec{ON} berechnet, die in Richtung der Punkte I_n verliefen:

$$(9) \quad \vec{PQ}_n = \vec{PQ} - \vec{OP} \times \frac{\vec{OP} \cdot \vec{OQ}_n}{\vec{OP} \cdot \vec{OP}}$$

Um zu bestimmen, ob der Winkel θ zwischen $0-\pi$ oder $\pi-2\pi$ lag, wurde folgende Formel verwendet:

$$(10) \quad Dir = \frac{\vec{PQ}_n \cdot \vec{OS}}{|\vec{PQ}_n| \cdot |\vec{OS}|}, \quad \text{wo } Dir = 1 \text{ f\"ur } 0 < \theta < \pi \text{ und } Dir = -1 \text{ f\"ur } \pi < \theta < 2\pi$$

Die Berechnung des Winkels θ erfolgte wie folgt:

$$(11) \quad \theta = \arccos\left(\frac{\vec{PQ}_n \cdot \vec{OT}}{|\vec{PQ}_n| \times |\vec{OT}|}\right) \quad \text{wenn } Dir = 1$$

$$(12) \quad \theta = 2\pi - \arccos\left(\frac{\vec{PQ}_n \cdot \vec{OT}}{|\vec{PQ}_n| \times |\vec{OT}|}\right) \quad \text{wenn } Dir = -1$$

Wenn die Berechnung des Winkels und der Distanz abgeschlossen war, wurde eine 501×501 Binärmatrix konstruiert und ein Kreis mit einem Radius von 125 in der Mitte dieser Matrix mit Einsen gefüllt, während alle anderen Positionen dieser Matrix mit Nullen gefüllt wurden. Dieser gefüllte Kreis beschreibt die Fläche dieses Punktes, welche später zur Chromatizität addiert wurde. Das Negativ dieser Matrix ($(-1) \times$ Matrix) wurde als Vorlage für überlappende Punkte verwendet. Für jeden überlappenden Punkt wurde eine solche Negativ-Matrix konstruiert und der Offset der Matrix (Position des Kreises in der Matrix) wurde basierend auf den zuvor errechneten Winkeln und Distanzen verändert. Nach elementweiser Multiplikation aller Matrizen wurde der Anteil der nicht-überlappenden Fläche dieses Punktes berechnet, mit A_{Punkt} multipliziert und zur „besetzten“ Gesamtfläche addiert.

3.3.5.2 Berechnung der Chromatizität – Rasterbasierte Methode

Obwohl die vektorbasierte Methode zur Berechnung der Chromatizität verwendet werden konnte, war sie aufgrund ihrer hohen Rechenzeit in der praktischen Anwendung nicht praktikabel. Um die Rechenzeit wesentlich zu verringern wurde eine rasterbasierte Methode zur Berechnung der Chromatizität implementiert und mit der vektorbasierten Methode verglichen, um sicherzustellen, dass sich die Chromatizitätswerte zwischen den beiden Methoden nicht signifikant unterschieden. Bei der rasterbasierten Methode wurde zunächst ein Theta-Phi Raster mit Winkeln von 0.25° zwischen den Rasterpunkten generiert (360×360 Matrix). Alle Rasterpunkte, die innerhalb eines Radius von r_n zu einem beliebigen Datenpunkt lagen wurden markiert. Die Anzahl von Trapezen und Dreiecken, die von markierten Punkten eingeschlossen waren, wurden für jedes Wertepaar $(\varphi, \varphi + 0.25)$ berechnet und mit der (vorberechneten) Trapezoberfläche für jedes dieser Wertepaare multipliziert. Für die Berechnung der

Anzahl an Trapezen für jedes $(\varphi, \varphi+0.25)$ wurde Kantenglättung verwendet, das heißt es wurde jede Fläche, die von nur 3 statt 4 Punkten eingeschlossen wurde als halbe Fläche gezählt.

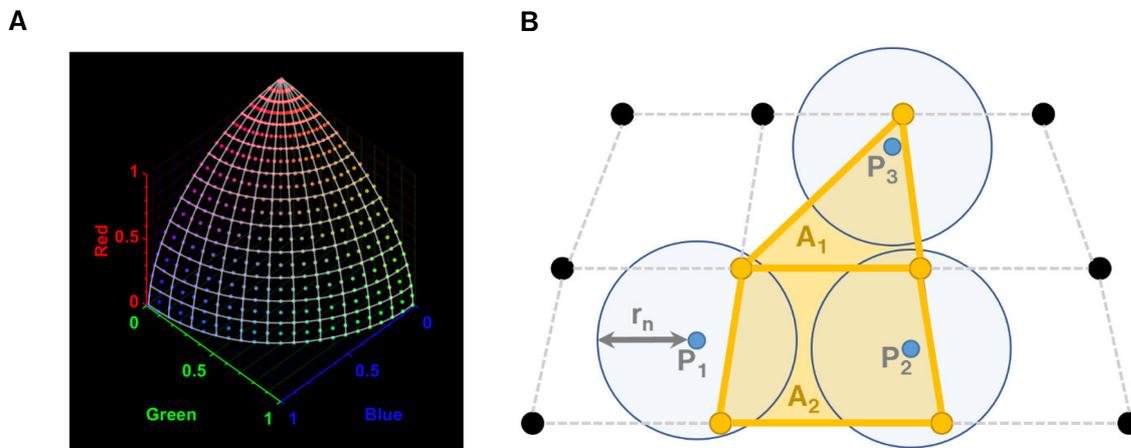


Abbildung 31 | Grundlagen der rasterbasierten Berechnung des Chromatizitätswertes. A) Veranschaulichung eines Theta-Phi-Rasters mit einem Abstand von etwa 4° zwischen den Rasterpunkten. B) Darstellung der Markierung von Rasterpunkten innerhalb des Radius r_n von den entsprechenden Datenpunkten sowie der Berechnung der Flächen zwischen den markierten Rasterpunkten.

3.3.5.3 Vergleich der vektorbasierten und rasterbasierten Chromatizitätsberechnung

Um die beiden Methoden für die Berechnung der Chromatizität zu testen und zu vergleichen, wurden zunächst Datensätze mit festgelegten Chromatizitätswerten simuliert und anschließend die Berechnung der Chromatizitätswerte mit beiden Methoden durchgeführt. Dazu wurden Datensätze aus zufällig verteilten Datenpunkten generiert, die aus je 10.000 Datenpunkten bestehen. Die Fläche auf dem Chromatizitätsraster, auf dem diese Datenpunkte verteilt wurden, wurde dabei so gewählt, dass sie 100%, 75%, 50%, 25%, 10% und 5% der Gesamtfläche des sphärischen Scatterplots entsprachen, womit sich definitionsgemäß Chromatizitätswerte von 100%, 75%, 50%, 25%, 10% und 5% ergaben. Hierfür wurde der mögliche φ -Winkel auf die entsprechende Fraktion der maximal möglichen 90° begrenzt (z.B. bei $\chi(\text{soll}) = 50\% \rightarrow \varphi_{\text{max}} = 0.5 \times 90^\circ = 45^\circ$; Abb. 32C). Bei der Berechnung der Chromatizitätswerte zeigte sich, dass die Chromatizitätswerte aus beiden Methoden nur geringe Abweichungen von den Sollwerten zeigten (Abb. 32A). Die maximale absolute Abweichung wurde bei einem Sollwert von $\chi = 100\%$ beobachtet und betrug für $r_{10k}=0.014$ (siehe Abschnitt 3.3.5.4) weniger als 5%. Bei der Messung der Rechenzeiten (Abb. 32B) zeigte sich, dass diese bei der rasterbasierten Methode wesentlich kürzer ausfielen als bei der vektorbasierten Methode. Die Berechnung dauert vor allem bei der vektorbasierten Methode bei Datensätzen mit geringeren Chromatizitätswerten deutlich länger, da die Rechenintensität dieses Algorithmus mit zunehmender Datenpunktdichte deutlich steigt, was bei der rasterbasierten Methode nur marginal zu beobachten ist. Da die rasterbasierte Methode ähnliche Chromatizitätswerte berechnete wie die vektorbasierte Methode und sie zudem wesentlich kürzere Rechenzeiten zeigte, wurde sie als Methode der Wahl für alle weiteren Chromatizitäts-Berechnungen verwendet.

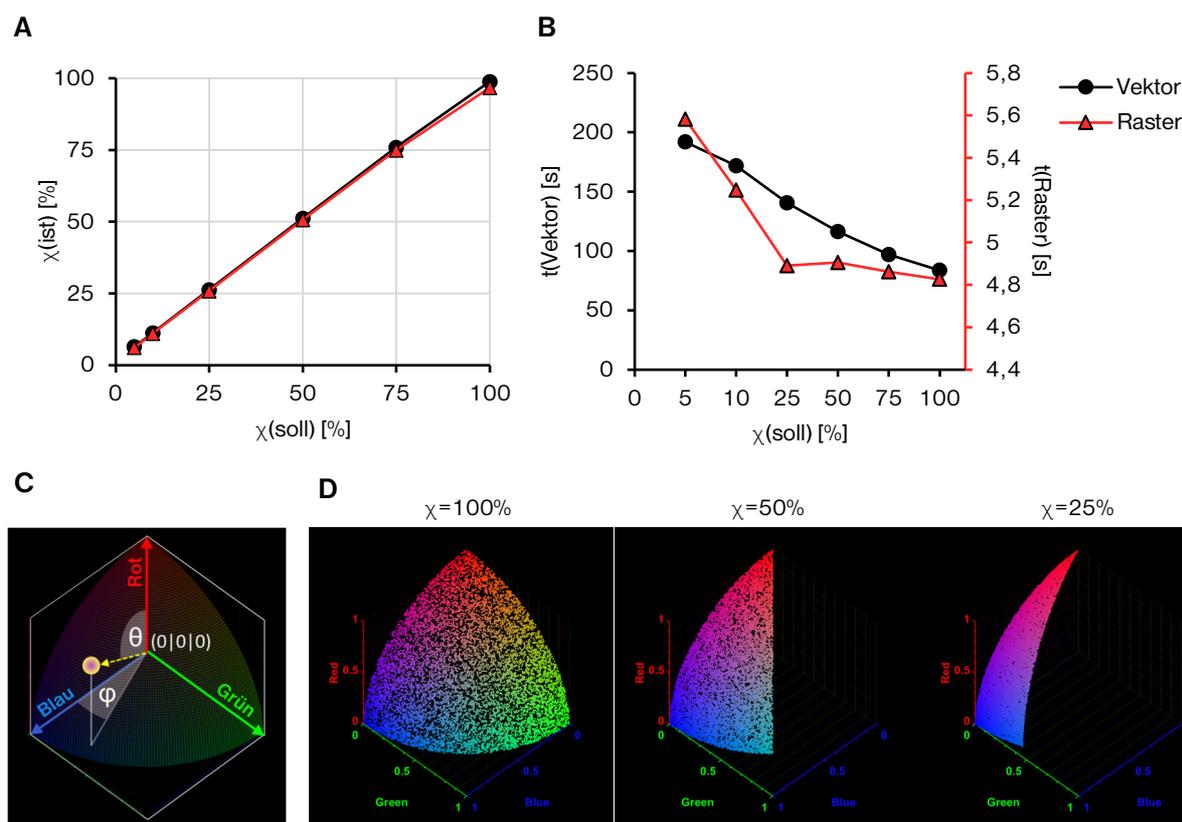


Abbildung 32 | Test und Vergleich der vektorbasierten (Vektor) und rasterbasierten (Raster) Methoden zur Berechnung des Chromatizitätswertes an simulierten Datensätzen. **A)** Die berechneten Chromatizitätswerte ($\chi(\text{ist})$) aus simulierten Datensätzen mit festgelegten Chromatizitätswerten (5, 10, 25, 50, 75, 100%) zeigen bei beiden Methoden nur geringe Abweichungen zu den Sollwerten ($\chi(\text{soll})$). Für beide Methoden wurde ein r_{10k} von 0.014 ausgewählt (siehe Abschnitt 3.3.5.4). **B)** Vergleich der Rechenzeiten für die Chromatizitätsberechnung mit beiden Methoden. Während die rasterbasierte Methode zur Berechnung nur wenige Sekunden benötigt ($t(\text{Raster})$), dauert sie mit der vektorbasierten Methode mehrere Minuten ($t(\text{Vektor})$). **C)** Sphärische Scatterplots simulierter Datensätze mit je 10.000 Datenpunkten, wie sie zur Kalibrierung für die Chromatizitätswerte 100%, 50% und 25%, und zur Optimierung des Radius r_{10k} (Abschnitt 3.3.5.4) verwendet wurden.

3.3.5.4 Optimierung des Radius r_{10k} zur Chromatizitätsberechnung

Nach der Festlegung auf ein Verfahren zur Berechnung der Chromatizität wurde als nächstes der Radius r_{10k} optimiert. Dabei handelt es sich um den für die Chromatizitätsberechnung festgelegten Radius von Datenpunkten bei einem Datensatz mit 10.000 Datenpunkten (siehe Formel(5)). Diese Optimierung war notwendig, um möglichst hohe Chromatizitätswerte zu erreichen und gleichzeitig möglichst große Unterschiede der Chromatizitätswerte zwischen verschiedenen Proben zu generieren. Zum Beispiel steigt bei einer Erhöhung von r_{10k} die Ausdehnung der Punkte auf dem Chromatizitätsraster und damit auch der Chromatizitätswert (vgl. Abb. 33A), jedoch sinkt gleichzeitig die Standardabweichung zwischen verschiedenen Proben, da die Größe der Fläche auf dem sphärischen Scatterplot unverändert bleibt. Um die oberen und unteren Grenzen des Radius r_{10k} zu bestimmen, wurden sowohl simulierte Datensätze, als auch biologische Datensätze verwendet. Für die untere Grenze wurden simulierte Datensätze verwendet, bei denen je 10.000 Datenpunkte zufällig auf dem sphärischen Scatterplot verteilt wurden (analog Abschnitt 3.3.5.3, Abb. 32). Nach der Berechnung der Chromatizität mit verschiedenen Radien zeigte die erhaltene Chromatizität/Radius-Kurve für einen Chromatizitätswert von 100% eine sigmoide Form mit Konvergenz Richtung 100% (siehe Abb. 33C). Um den Wert mindestens im 5%-Intervall zum Sollwert

von 100% zu belassen, wurde die untere Grenze von r_{10k} auf 0.014 festgelegt, da hier ein Chromatizitätswert von 95,9% (+/- 0,27%) erreicht werden konnte.

Als nächstes wurden die biologischen Datensätze aus Abschnitt 3.3.1 verwendet, um die obere Grenze von r_{10k} festzulegen. Dazu wurden die Chromatizitätswerte der Tumor-Datensätze mit verschiedenen Radien r_{10k} sowie die Standardabweichungen dieser Werte zwischen allen Proben bestimmt. Das Ziel dabei war, die Standardabweichung zwischen den Proben zu maximieren und den Radius dabei so groß wie möglich zu belassen. Einerseits stellte dies sicher, dass die Unterschiede zwischen den Proben möglichst gut sichtbar waren und andererseits blieben die Chromatizitätswerte möglichst nahe an den Erwartungswerten. Dabei konnte für $r_{10k}=0.012$ die höchste Standardabweichung ermittelt werden, die jedoch für r_{10k} -Werte zwischen 0.010 und 0.014 nur geringfügig variierte. Als bester Kompromiss beider Ergebnisse wurde ein Radius r_{10k} von 0.014 für alle weiteren Berechnungen festgelegt.

3.3.5.5 Berechnung von Chromatizitätswerten in biologischen Datensätzen

Damit Chromatizitätswerte aus biologischen Datensätzen aussagekräftig sind, müssen sie im dreifarbigem Farbraum erfolgen. Dies rührt daher, dass die Datenpunktdichte in den ein- und zweifarbigem Bereichen des sphärischen Scatterplots wesentlich höher ist als im dreifarbigem Bereich (vgl. Abb. 27). Eine gleichmäßige Verteilung von Datenpunkten auf dem Chromatizitätsraster wäre somit nicht gegeben und der Anteil ein- und zweifarbigem Zellen hätte einen direkten Einfluss auf den Chromatizitätswert. Da dreifarbige Zellen aufgrund ihrer guten Unterscheidbarkeit im Chromatizitätsraster im Rahmen dieser Arbeit von besonderem Interesse waren, wurden somit ein- und zweifarbige Zellen bei der Analyse RGB-markierter Zellpopulationen weitestgehend ignoriert. Daher wurde in ChromoClone die Möglichkeit implementiert, Chromatizitätswerte aus ausschließlich dreifarbigem Zellen zu berechnen. Das Herausfiltern von ein- und zweifarbigem Zellen hat jedoch zur Folge, dass die ein- und zweifarbigem Bereiche des Chromatizitätsrasters nicht mit Datenpunkten besetzt sind (Ecken und Kanten des sphärischen Scatterplots; vgl. Abb. 27 l. und m.). Dies bedeutet, dass der Chromatizitätswert von ausschließlich dreifarbigem Zellen auch bei einer homogenen Farbverteilung wesentlich geringer ausfällt als bei einem vollständigen Datensatz. Die Berechnung der Chromatizitätswerte von ein- und zweifarbigem Zellen der *in vitro*- und *in vivo*-Datensätze aus Abschnitt 3.3.1 ergab Chromatizitäten von 15-20% (Daten nicht gezeigt). Es war also bei der Verwendung ausschließlich dreifarbigem Zellen damit zu rechnen, dass sich für einen Datensatz mit homogener Farbverteilung ein Chromatizitätswert von etwa 80-85% (statt ~96%) ergibt.

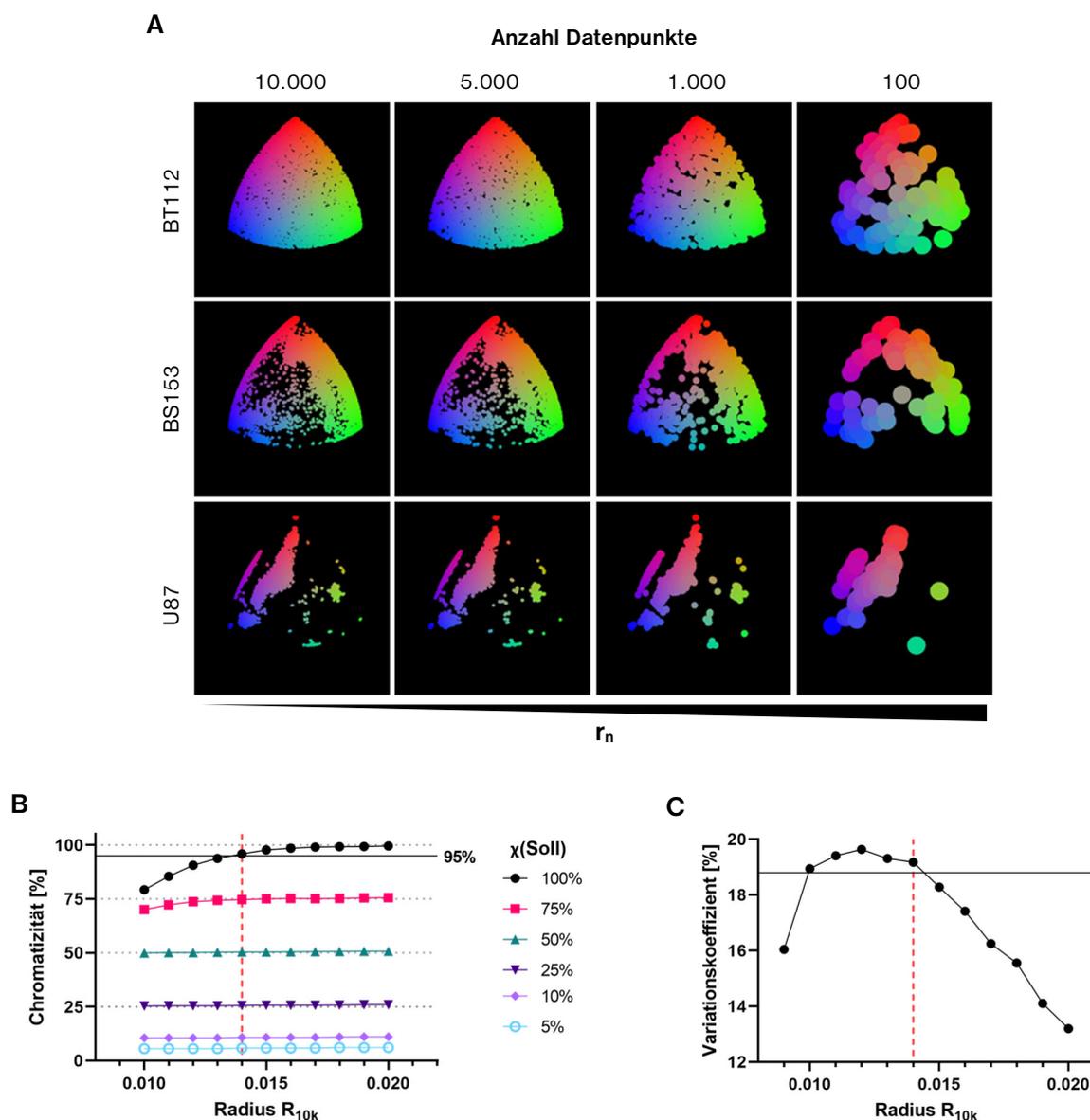


Abbildung 33 | **Auswirkung der Änderung des Radius r_{10k} bzw. r_n auf die Ausdehnung der Datenpunkte und die berechneten Chromatizitätswerte.** **A)** Sphärische Scatterplots zeigen die Erhöhung von r_n (Radien der Datenpunkte) mit abnehmender Anzahl von Datenpunkten nach Formel (5) **B)** Einfluss des Radius r_{10k} auf die berechnete Chromatizität von simulierten Datensätzen mit festgelegten Chromatizitätswerten. Eine Erhöhung des Radius r_{10k} führt dabei zu einer Erhöhung der Chromatizitätswerte. **C)** Einfluss des Radius auf die Standardabweichung der Chromatizitätswerte zwischen drei untersuchten Tumor-Datensätzen von BT112-, BS153- und U87-Tumoren (jeweils Maus 1). Ein zu großer Radius r_{10k} von $> 0,014$ führt zu einer deutlichen Verringerung der Unterschiede zwischen den berechneten Chromatizitätswerten dieser Datensätze.

3.3.5.6 Quantifizierung der klonalen Restriktion während des Wachstums RGB-markierter Xenograft-Tumore mittels Chromatizitätswerten

Nach der Etablierung des Chromatizitätswertes χ war das nächste Ziel, diese neue Metrik in der Anwendung zu testen und zu untersuchen, ob sie für die Quantifizierung von Veränderungen klonaler Farbverteilungen geeignet ist. Dazu wurden Chromatizitätswerte für die vorhandenen *in vitro*- und *in vivo*-Datensätze der Zelllinien BS153, BT112 und U87 bestimmt und ermittelt, ob die klonalen Restriktionen und der Grad dieser Restriktionen mit Hilfe dieser Metrik zuverlässig quantifiziert werden konnten. Gleichzeitig wurde hierbei auch die Skalierung des Radius r_n nach Formel (5) getestet, um zu untersuchen, wie gering die Anzahl von Datenpunkten für eine verlässliche Bestimmung des Chromatizitätswertes sein darf. Hierfür wurden die Chromatizitätswerte aus den durchflusszytometrischen Daten je eines Tumors der verschiedenen Zelllinien unter Verwendung von 10.000, 8.000, 6.000, 4.000, 2.000, 1.000 und 500 Datenpunkten berechnet und verglichen.

Abbildung 34A zeigt, dass die mit ChromoClone errechneten Chromatizitäten für alle drei Ausgangspopulationen (*in vitro*) zunächst hohe Werte von 81% (BT112), 75% (BS153) und 76% (U87) zeigten, was für eine hohe Farbvielfalt dieser Zellpopulationen spricht. BT112-Tumore ($\bar{\chi} = 81\%$) zeigten ebenfalls hohe Chromatizitätswerte, während die Chromatizitätswerte bei BS153-Tumoren ($\bar{\chi} = 61\%$) und U87-Tumoren ($\bar{\chi} = 38\%$) deutlich verringert waren. Somit konnte nun auch quantitativ nachgewiesen werden, dass BT112-Zellen während des Tumorwachstums *in vivo* keine Veränderung der klonalen Dynamik zeigten, während BS153 und U87-Zellen eine klonale Restriktion durchliefen. Diese klonale Restriktion war für U87-Zellen während des Tumorwachstums zudem höher als für BS153-Zellen.

Abbildung 34B zeigt außerdem, dass die Chromatizitätswerte für Datensätze mit 2000 oder mehr Datenpunkten unabhängig von der Anzahl der Datenpunkte verlässlich berechnet werden konnten (2000 Datenpunkte: $\Delta\chi < 3\%$). Die in Formel (5) vorgeschlagene Skalierung des Radius r_n konnte somit verifiziert werden.

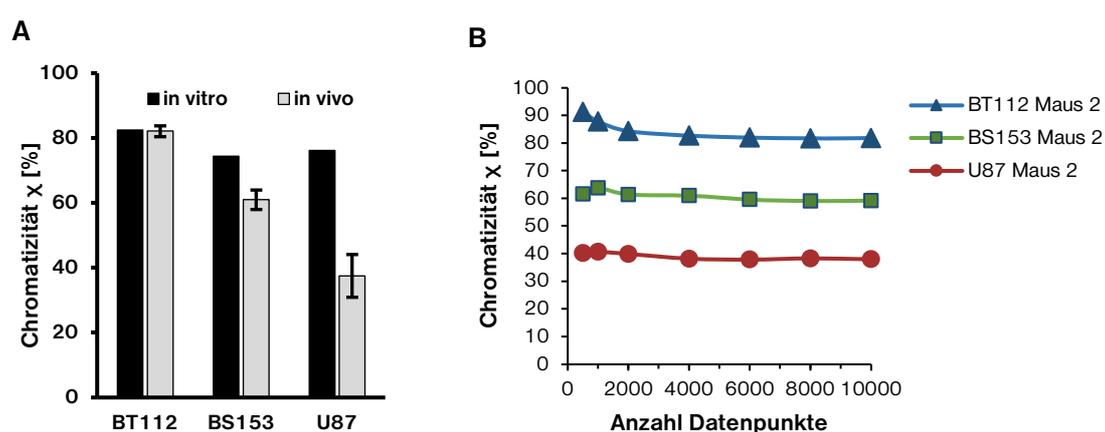


Abbildung 34 | Visualisierung und Quantifizierung der klonalen Restriktion während des Wachstums von RGB-markierten Xenograft-Tumoren der Gliomzelllinien BT112, BS153 und U87. **A)** Chromatizitätswerte für BT112-, BS153- und U87-Zellen *in vitro* ($n=1$) und BT112-, BS153- und U87-Xenograft-Tumore (\pm SD, $n=2$) aus Abschnitt 3.3.1. Die Chromatizitätswerte der untersuchten Zellpopulationen zeigen einen deutlichen Unterschied der klonalen Restriktion zwischen verschiedenen Zelllinien. Dies verifiziert den visuellen Eindruck, der durch die sphärischen Scatterplots in Abbildung 22 entsteht. **B)** Chromatizitätswerte für Zellpopulationen aus Xenograft-Tumoren der Zelllinien BT112 (Maus 2), BS153 (Maus 2) und U87 (Maus 2), unter Verwendung unterschiedlich vieler Datenpunkte.

3.3.6 Verwendung der ChromoClone-Software zur Untersuchung der Wirkung des Immunsystems auf die klonalen Wachstumsdynamiken bei Gliomen *in vivo*

Wie im vorigen Abschnitt beschrieben wurde, ermöglichte die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte ChromoClone-Software die Verfolgung und Quantifizierung der klonalen Restriktion RGB-markierter Gliomzellpopulationen während des *in vivo*-Wachstums. Die beschriebene Methodik wurde daraufhin in einem Experiment getestet, in dem untersucht wurde, inwieweit das Immunsystem bei der klonalen Restriktion von orthotopen Hirntumoren in Mäusen beteiligt ist. Es wurde ein Mausexperiment durchgeführt, in dem ermittelt werden sollte, ob orthotope Hirntumore während des Wachstums in immunsupprimierten Mäusen verglichen mit immunkompetenten Mäusen ein unterschiedliches Maß an klonaler Restriktion erfahren. Hierfür wurde die Maus-Gliomzelllinie GL261 RGB-markiert und intrakraniell in immunkompetente C57BL/6 WT oder immunsupprimierte *Pfp*^{-/-} *Rag2*^{-/-}-Mäuse injiziert. Als Endpunkt des Experiments wurde ein Gewichtsverlust von >10% oder das Auftreten neurologischer Störungen definiert. Resultierende Tumore wurden durchflusszytometrisch analysiert und die Datensätze mit ChromoClone ausgewertet, um die Chromatizitätswerte der Proben als Maß der klonalen Restriktion zu bestimmen.

Immunkompetente C57BL/6 WT Mäuse zeigten mit einer mittleren Überlebenszeit von 22 Tagen gegenüber *Pfp*^{-/-} *Rag2*^{-/-}-Mäusen mit einer mittleren Überlebenszeit von 18 Tagen ein signifikant verlängertes Überleben ($p = 0,012$). Wie Abbildung 35 zeigt, besaß die *in vitro*-Zellpopulation (vor Injektion) erwartungsgemäß die höchste Chromatizität ($\chi = 89\%$). Verglichen damit ergab sich für Tumoren aus immunsupprimierten *Pfp*^{-/-} *Rag2*^{-/-}-Mäusen im Mittel ein signifikant geringerer Chromatizitätswert von 66%. Für Tumoren aus WT-Mäusen wiederum, ließ sich eine gegenüber *Pfp*^{-/-} *Rag2*^{-/-}-Mäusen signifikant verringerte Chromatizität von 50% feststellen, was auf eine erheblich stärkere klonale Selektion während des Tumorwachstums bei WT-Mäusen hinwies. Zusammenfassend ließ sich also nachweisen, dass ein funktionales Immunsystem an der klonalen Restriktion während des Tumorwachstums von Gliomen beteiligt ist. Dabei spielte die Fähigkeit der Quantifizierung der klonalen Restriktion mit Hilfe der Chromatizitäts-Metrik in ChromoClone eine entscheidende Rolle, da sie letztlich die Publikation dieser Daten ermöglichte (erschieden im *Journal of Clinical Investigation*, 2020: Maire CL, [...], Fita KD, [...], Lamszus K. Glioma escape signature and clonal development under immune pressure)¹⁸⁸.

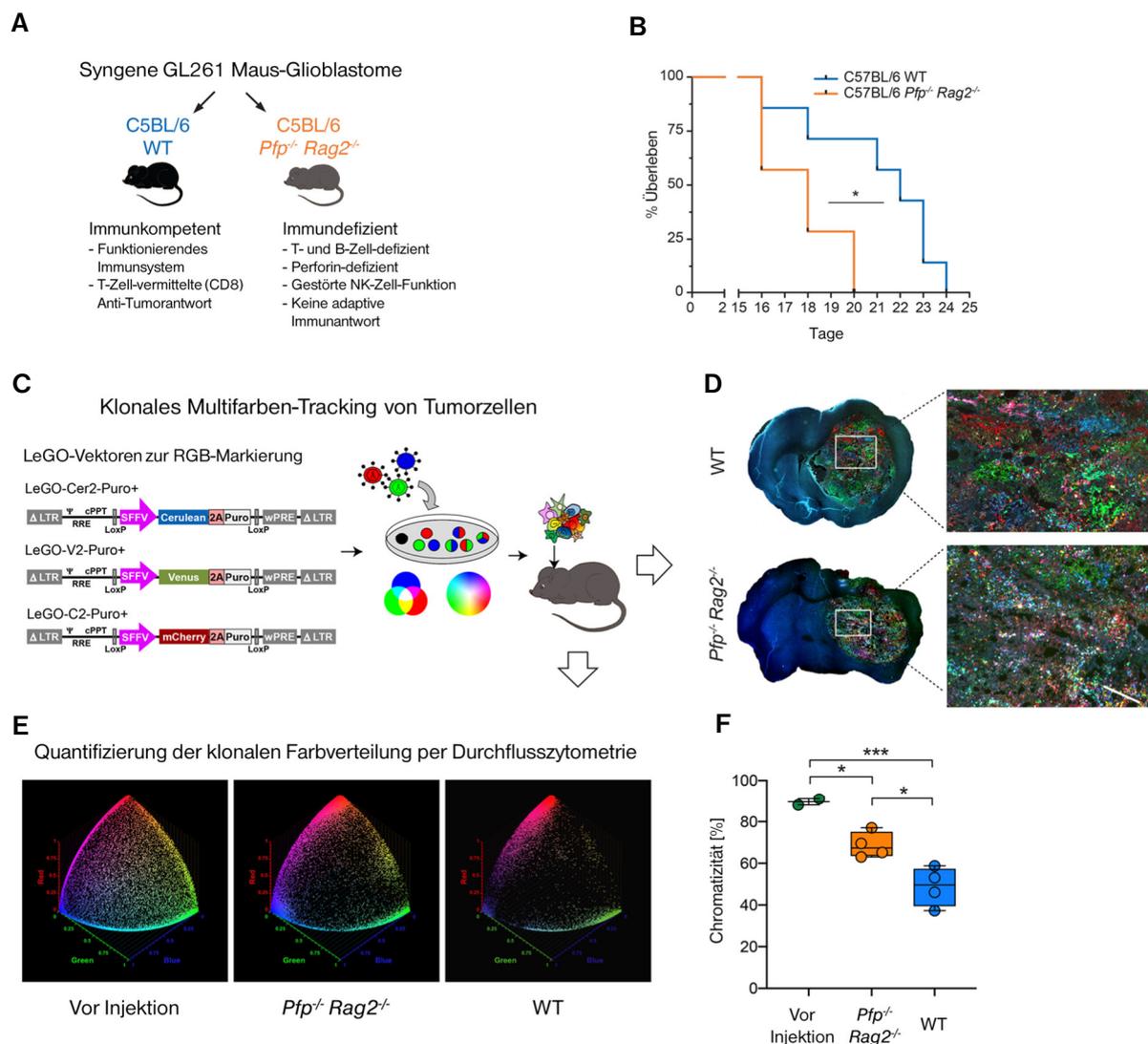


Abbildung 35 | Einfluss des Immunsystems auf die klonale Restriktion während des Tumorwachstums von RGB-markierten GL261-Tumoren in immunkompetenten WT- und immunsupprimierten *Pfp^{-/-} Rag2^{-/-}*-Mäusen. RGB-markierte GL261-Zellen wurden intrakraniell in C57BL/6 WT und immunsupprimierte *Pfp^{-/-} Rag2^{-/-}*-Mäuse (n=4) injiziert. Zum Endpunkt des Experimentes wurden die Tumoren reseziert und durchflusszytometrisch untersucht. **A**) Skizze des Versuchsaufbaus. **B**) Analyse der Überlebensraten nach Kaplan-Meier von WT und *Pfp^{-/-} Rag2^{-/-}* Mäusen (n = 7 pro Gruppe) nach intrazerebraler Injektion von GL261-Zellen. Log-rank-test; *p = 0,0124. **C**) Schematische Skizze des Experimentes zeigt die RGB-Markierung von Tumorzellen mit den entsprechenden LeGO-Vektoren und die anschließende Implantation in WT- oder *Pfp^{-/-} Rag2^{-/-}*-Mäuse **D**) Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von orthotopischen GL261-Tumoren ergab eine höhere Farbvielfalt und eine diffusere klonale Verteilung bei WT-Mäusen gegenüber *Pfp^{-/-} Rag2^{-/-}*-Mäusen **E**) Sphärische Scatterplots der GL261-Tumorzellen vor Injektion (*in vitro*) und nach Tumorwachstum in WT und *Pfp^{-/-} Rag2^{-/-}* Mäusen. Nach Tumorwachstum ist eine geringere Farbvielfalt der Tumorzellen zu beobachten. **F**) Quantifizierung der Chromatizität von Zellpopulationen aus GL261-Tumoren aus WT und *Pfp^{-/-} Rag2^{-/-}* Mäusen (n=4 pro Gruppe) und GL261-Zellen vor Injektion (n=2). Tumoren in WT-Mäusen zeigten eine signifikant verringerte Chromatizität (erhöhte klonale Restriktion) gegenüber Tumoren in *Pfp^{-/-} Rag2^{-/-}*-Mäusen. Abbildung modifiziert nach Maire CL, [...], Fita KD, [...], Lamszus K., Journal of Clinical Investigation, 2020¹⁸⁸.

3.3.7 Verfahren zur Quantifizierung und Charakterisierung von Einzelklonen

3.3.7.1 Identifikation und Quantifizierung von Klonen durch hierarchisches Clustering

Um definierte Klone innerhalb einzelner Proben zu identifizieren, zu quantifizieren und zu isolieren, wurde ein hierarchischer Clustering-Algorithmus in ChromoClone implementiert, der die automatische Trennung von Klonen auf sphärischen Scatterplots ermöglicht. Gleichzeitig werden dabei die sphärischen Koordinaten $(\theta|\varphi)$ der Clusterzentroide berechnet, die zur Identifizierung von Zellklonen genutzt werden (siehe Abschnitt 3.3.8). Um die Effektivität des hierarchischen Clustering-Algorithmus bei sphärischen Scatterplots zu testen, wurde dieser genutzt, um je einen der *in vivo*-Datensätze pro Zelllinie aus Abschnitt 3.3.1 in je 12 Cluster zu unterteilen. In Abbildung 36 lässt sich erkennen, dass der Algorithmus bei dem U87-Tumor die meisten der offensichtlichen Cluster identifizieren konnte. Die Quantifizierung der Cluster offenbarte zudem erhebliche Wachstumsungleichgewichte bei den verschiedenen Clustern, die bei BS153-Zellen ebenfalls beobachtet werden konnten. Um diese Ungleichgewichte der verschiedenen Zellpopulationen zu quantifizieren, wurde der Variationskoeffizient der Zellzahlen pro Cluster berechnet, der im Rahmen dieser Arbeit als Clustervariationswert (VK-Wert) bezeichnet wurde. Für die recht homogene Clusterverteilung des BT112-Tumors wurde ein VK-Wert von 33% ermittelt. Deutlich höher fielen die VK-Werte für den BS153-Tumor (121%) und den U87-Tumor (181%) aus.

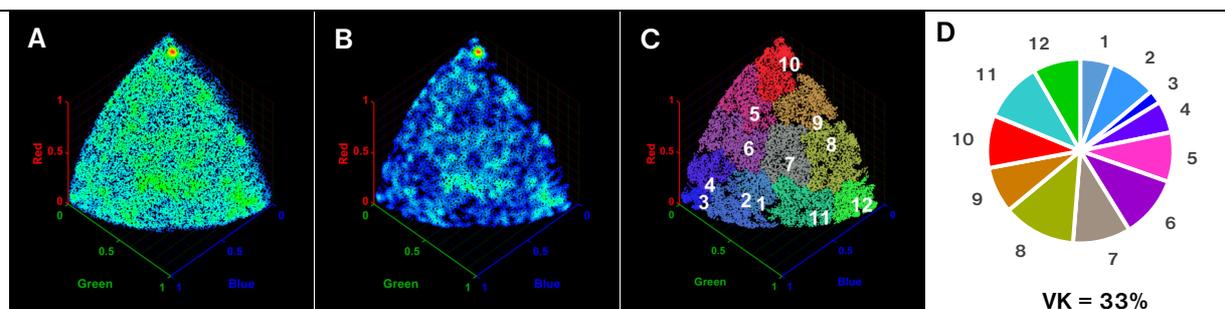
3.3.7.2 Einführung von Metriken zur Charakterisierung RGB-markierter Zellklone: Chromatische Streuung und chromatische Dimensionen

Einer der clusterspezifischen Werte, die zur genaueren Charakterisierung von Klonen verwendet werden konnten war die chromatische Streuung, welche die Ausdehnung eines bestimmten Klones auf dem sphärischen Scatterplot angibt und in ähnlicher Form bereits von Wu et al. beschrieben wurde. Anders als bei Wu et al. wird dieser Wert jedoch nicht als Größe der Isofläche des Klones in Pixeln berechnet, da es sich hier um eine arbiträre Größe handelt, deren Berechnung schwer zu reproduzieren ist. Stattdessen wird die im Rahmen dieser Arbeit als Fraktion der vom Klon besetzten Fläche (siehe Chromatizitätsberechnung), relativ zur Fläche des sphärischen Scatterplots ($\pi/2$) in Prozent angegeben. Zusätzlich dazu wurden chromatische Dimensionen als neue Metrik eingeführt. Dabei handelt es sich um ein Wertepaar ($\text{ChrDim}_{\max} | \text{ChrDim}_{\min}$), welches die minimale und maximale Ausdehnung des Clusters, ausgehend vom Centroid beschreibt. Dadurch kann eine Aussage darüber getroffen werden, welche Form ein Cluster hat, also ob es sich um ein rundes oder elliptisches Cluster handelt.

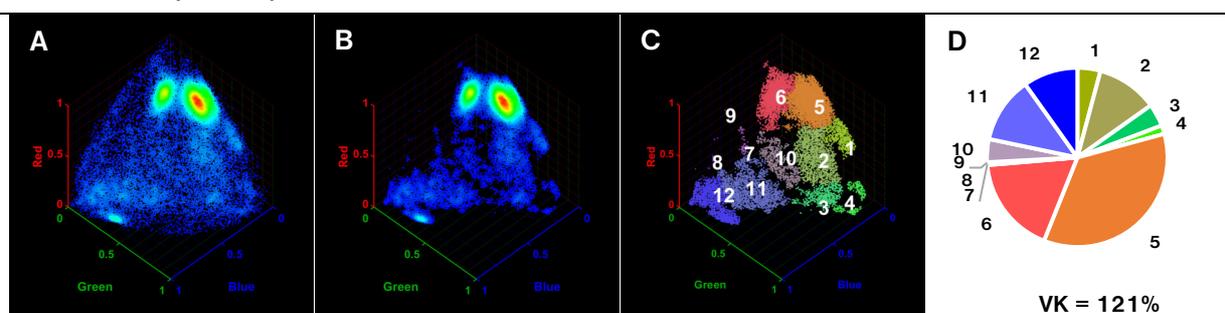
Der erste Schritt zur Berechnung der chromatischen Streuung bestand im Binning aller Datenpunkte eines Clusters basierend auf ihren sphärischen Koordinaten auf einem Chromatizitätsraster mit Abständen von $(\theta, \varphi) = (0.25^\circ, 0.25^\circ)$. Der Bin mit der maximalen Anzahl von Datenpunkten n_{\max} wurde als Referenz benutzt und alle Datenpunkte in Bins mit $n_{bin} > \frac{n_{\max}}{2}$ wurden für die weitere Berechnung der chromatischen Streuung und chromatischer Dimensionen verwendet. Die Berechnung der chromatischen Streuung erfolgte dabei analog der Berechnung der Chromatizität, mit dem Unterschied, dass nur die Punkte des entsprechenden Clusters (bei unverändertem Radius r_n) für die Berechnung verwendet wurden. Werte für die chromatischen Dimensionen wurden erhalten, indem zunächst ein Cluster in 30°-Fraktionen unterteilt wurde, mit dem Centroid als Mittelpunkt. Diese Fraktionen wurden in Paare unterteilt, wobei gegenüberliegende Fraktionen jeweils ein Paar sind. Die maximale Distanz zwischen

Centroid und allen anderen Punkten pro Fraktion wurde berechnet. Maxima der jeweiligen Fraktionspaare wurden addiert und das Maximum dieser Werte wurde als maximale chromatische Dimension ChrDim_{\max} bezeichnet. Um sowohl die Länge als auch die Breite des Clusters zu erhalten wurde (wie zuvor beschrieben) ein zweites Maximum berechnet, wobei alle Punkte innerhalb von 45° zu den zuvor berechneten Punkten nicht berücksichtigt wurden.

BT112 *in vivo* (Maus 1)



BS153 *in vivo* (Maus 1)



U87 *in vivo* (Maus 1)

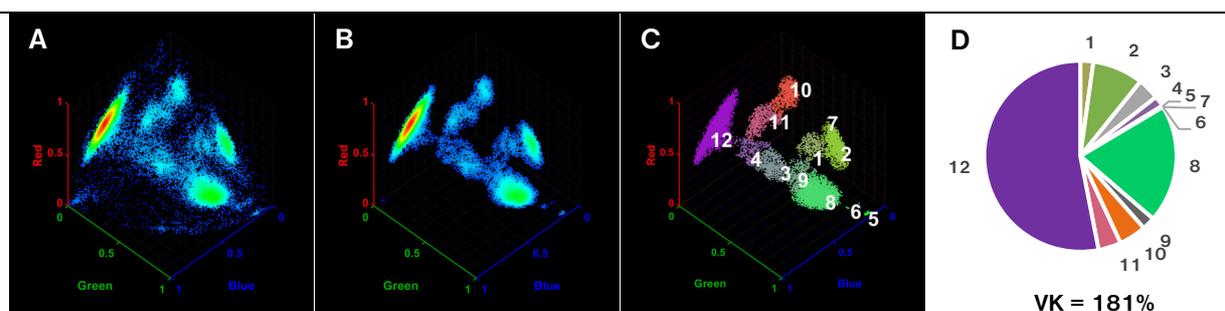


Abbildung 36 | Einsatz von hierarchischem Clustering zur Abgrenzung und Quantifizierung von Klonen. A) Sphärische Scatterplots von FACS-Daten orthotopischer BT112-, BS153- und U87-Tumore (ausschließlich dreifarbigige Zellen) B) Scatterplots der Datensätze aus A) nach Hintergrundreduzierung. C) Hierarchisches Clustering der Datenpunkte aus B) ermöglichte die Abgrenzung und Quantifizierung einzelner Klone. Abgebildet sind sphärische Scatterplots mit Farbgebung nach Farbverhältnis der Zentroide. Für das Clustering wurden 12 Cluster verwendet. D) Die Quantifizierung der Anzahl der Datenpunkte pro Cluster aus C) sowie Variationskoeffizienten aus der Anzahl der Datenpunkte jedes Clusters (VK).

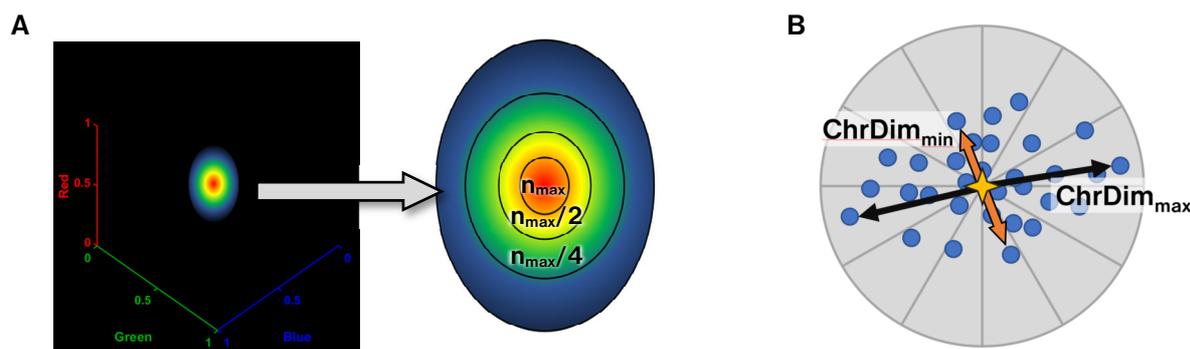


Abbildung 37 | Schematische Darstellungen zur Bestimmung der chromatischen Streuung und der chromatischen Dimensionen.
 A) Aufbau eines klonalen Clusters und Einteilung des Clusters in verschiedene Zonen (vgl. 3.3.7.2) Nur Datenpunkte, die sich in der Zone befinden für die $n_{bin} > n_{max}/2$ gilt, werden für die Berechnung der chromatischen Streuung (analog Chromatizität) und der chromatischen Dimensionen verwendet. B) Schematische Bestimmung der chromatischen Dimensionen eines Clusters. Das Cluster wird ausgehend vom Zentroid in 30°-Abschnitte unterteilt und die maximalen Distanzen zwischen dem Zentroid in den Punkten in jedem Abschnitt werden ermittelt. Gegenüberliegende Abschnitte mit den größten ermittelten Distanzen werden zu maximalen chromatischen Ausdehnung $ChrDim_{max}$ addiert, während Abschnitte mit den kleinsten maximalen Distanzen zur Berechnung von $ChrDim_{min}$ verwendet werden.

3.3.8 Entwicklung und Testung eines Verfahrens zur Isolation einzelner Klone aus multiklonalen Zellpopulationen

Um das Ziel der Entwicklung einer Pipeline zur Identifizierung, Isolierung und Antagonisierung therapieresistenter Tumorzellklone realisieren zu können, musste ein Verfahren zur Isolierung von Zellklonen aus multiklonalen Zellpopulationen entwickelt werden. Dieses sollte dazu verwendet werden, im Anschluss einer Behandlung von Zellen mit einem Wirkstoff Zellklone zu isolieren, bei denen eine erhöhte Resistenz gegenüber dieser Behandlung vermutet wird. Dazu wurde für ChromoClone ein Subprogramm mit dem Namen „GateFinder“ entwickelt, welches zur Findung der Gate-Koordinaten zur Zellsortierung dieser Klone per FACS dienen sollte. Der GateFinder stellt dabei die durchflusszytometrischen Rohdaten als 2D Punktdiagramme dar, in denen die Fluoreszenzintensitäten der drei Farbkanäle gegeneinander aufgetragen werden. Die Datenpunkte eines ausgewählten, nach hierarchischem Clustering bestimmten Clusters (siehe 3.3.7.1) werden farblich markiert, was eine manuelle Erstellung der entsprechenden Gates ermöglicht. Nach dem Einzeichnen der Gates werden ihre Koordinaten, sowie die Fehlerrate, die das Verhältnis von Punkten des ausgewählten Clusters zu Punkten anderer Cluster angibt, unter den Graphen abgebildet (siehe Abb. 38A). Diese Koordinaten können anschließend manuell in das entsprechende FACS-Analyseprogramm (hier FACSDiva) am FACS Sorter eingegeben werden, was eine spezifische Sortierung des ausgewählten Klons ermöglicht.

Um die Durchführbarkeit und die Effektivität dieses Verfahrens nachzuweisen, sollte die Isolation von Einzelklonen aus einer oligoklonalen Zellpopulation testweise durchgeführt werden. Eine oligoklonale Zellpopulation war hierfür notwendig, da die zu isolierenden Klone möglichst gut unterscheidbar sein sollten, um eine gute Trennung bei der Sortierung zu gewährleisten. Dazu wurde eine oligoklonale Zellpopulation durch die Sortierung von 100 Zellen pro Well einer 96-Well Zellkulturplatte und anschließender Expansion dieser Zellen generiert (siehe Abb. 38A). Zur Sortierung einzelner Klone wurde nach der initialen durchflusszytometrischen Analyse dieser Zellpopulation am FACS Sorter der GateFinder in ChromoClone verwendet, um Gate-Koordinaten für 3 der 6 sichtbaren Cluster zu erstellen (Abb. 38C). Diese wurden in die Software des FACS Sorters übertragen und jeweils 3000, 400 und 5200

Zellen der ausgewählten Klone 01, 02 und 03 wurden mit Fehlerraten <2% sortiert. Nach zweiwöchiger Expansion dieser Klone wurden sie durchflusszytometrisch auf ihre Reinheit untersucht. Dabei konnte bei keinem der untersuchten Klone eine Kontamination mit andersfarbigen Klonen festgestellt werden (siehe Abb. 38B). Zudem wurden für jeden dieser Klone klon-spezifische Metriken, wie die im vorigen Abschnitt vorgestellten chromatischen Streuung und den chromatischen Dimensionen, errechnet und verglichen, um zu untersuchen, ob diese Metriken stabil sind und sich zur Identifizierung einzelner Klone eignen. Zur primären Identifikation der Klone sollten jedoch die sphärischen Koordinaten ($\theta|\phi$) der klonalen Cluster auf dem sphärischen Scatterplot dienen, die die mittlere Position dieser Klone auf dem Chromatizitätsraster, bzw. ihre „Farbe“ beschreiben. Die Analyse einzelner Klone erfolgte bei den oligoklonalen Zellpopulationen nach Anwendung des in ChromoClone integrierten hierarchischen Clustering-Algorithmus. Zur Bestimmung der sphärischen Koordinaten der Klone wurde zuvor eine Hintergrundreduzierung durchgeführt und die Zentroide der entsprechenden Cluster bestimmt.

Tabelle 7 zeigt die sphärischen Koordinaten der Klone vor und nach Isolation, mit Winkelabweichungen von 0,8 – 2,8°. Auch die chromatischen Dimensionen zeigten ähnliche Werte vor und nach Isolation, womit die Identität der Klone zusätzlich verifiziert werden konnte. Es konnten zudem Unterschiede durch die Bildung des Quotienten $\text{ChrDim}_{\min}/\text{ChrDim}_{\max}$ ermittelt werden, welcher die „Kreisförmigkeit“ des Clusters beschreibt. Für perfekt kreisförmige Cluster zeigt dieser Quotient einen Wert von 1 und wird umso kleiner, desto elliptischer ein Cluster ist. Hier zeigte Klon 01 nach Isolierung eine höhere Kreisförmigkeit, während Klon 02 vor der Isolation eine höhere Kreisförmigkeit zeigte. Bei Klon 3 war keine Veränderung dieses Quotienten festzustellen. Weiterhin konnten Unterschiede in der chromatischen Streuung der Klone vor und nach Isolation festgestellt werden, wobei die Werte bei den isolierten Klonen etwas höher ausfielen als in der Mischpopulation.

Tabelle 7 | Vergleich klonspezifischer Metriken RGB-markierter NCH644-Zellklone vor (Mix) und nach (Klon) Isolierung per FACS und anschließender zweiwöchiger Expansion. Es wurden die sphärischen Koordinaten der Klone als ($\theta|\phi$)-Wertepaar, sowie der Winkel zwischen diesen Koordinaten vor und nach Isolierung berechnet (Δ Winkel). Zudem sind die chromatische Streuung, die chromatischen Dimensionen ChrDim_{\min} und ChrDim_{\max} , sowie der Quotient $\text{ChrDim}_{\min}/\text{ChrDim}_{\max}$ abgebildet.

	Klon 01		Klon 02		Klon 03	
	Mix	Klon	Mix	Klon	Mix	Klon
Koordinaten ($\theta \phi$) [°]	(54,6 34,9)	(59,9 37,0)	(81,5 48,5)	(83,5 44,9)	(74,2 23,9)	(75,2 25,3)
Δ Winkel [°]	2,8		2,0		0,8	
ChrSpr	2,9	5,2	1,7	2,3	1,1	2,6
ChrDim_{\min}	0,20	0,26	0,13	0,09	0,11	0,14
ChrDim_{\max}	0,35	0,40	0,28	0,30	0,28	0,36
$\frac{\text{ChrDim}_{\min}}{\text{ChrDim}_{\max}}$	0,57	0,65	0,46	0,30	0,39	0,39

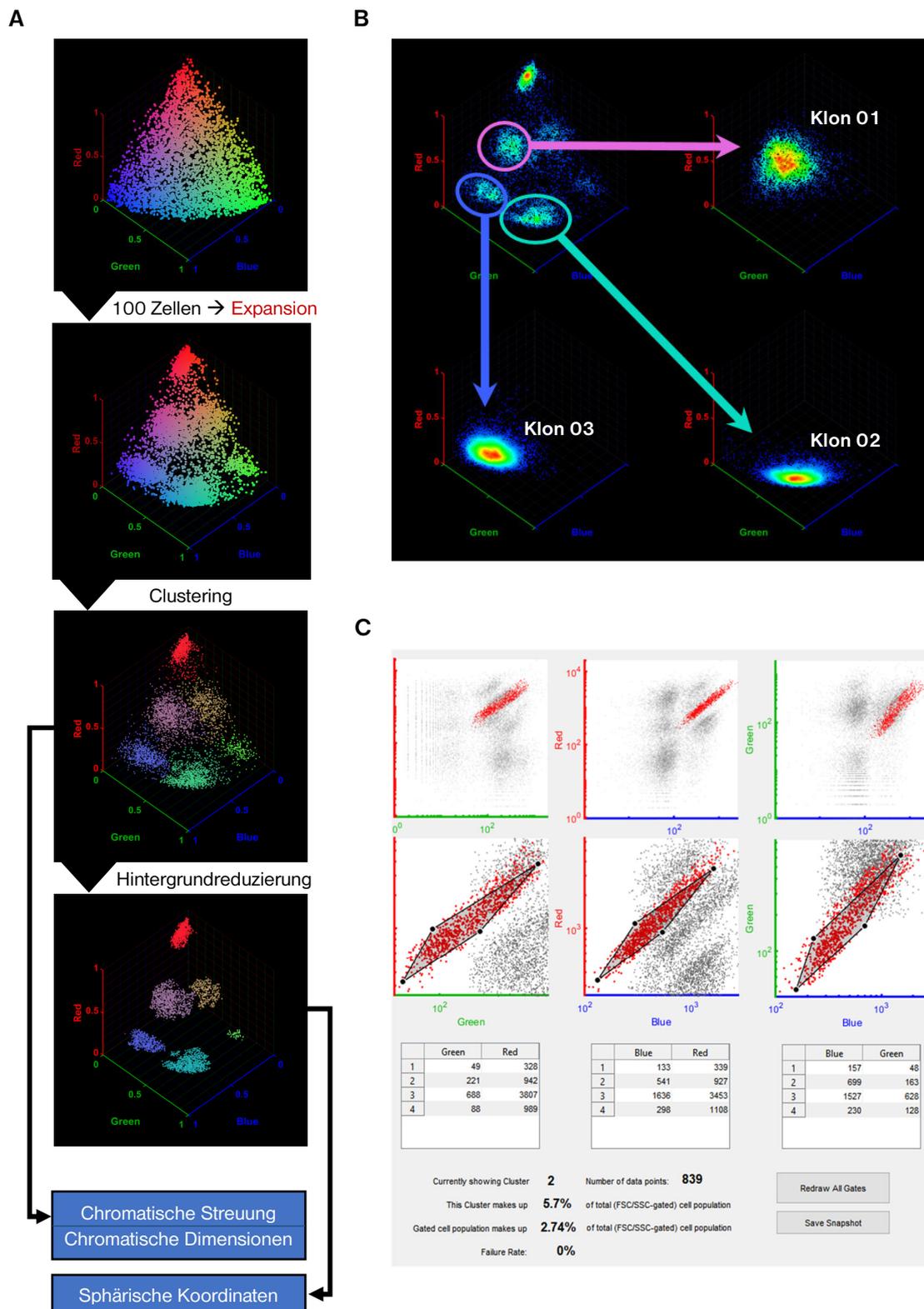


Abbildung 38 | **Etablierung der Sortierung von Einzelklonen aus oligoklonalen Zellpopulationen.** **A)** Herstellung und Schritte zu Analyse einer oligoklonalen NCH644-Zellpopulation. Die verwendete Zellpopulation wurde durch Sortierung von 100 Zellen/Well einer 96 Well-Zellkulturplatte und anschließender Expansion generiert. **B)** Jeweils 3000 (Klon 01), 5200 (Klon 02) und 400 (Klon 03) Zellen konnten für die gezeigten Cluster sortiert werden. Die Klone wurden nach zweiwöchiger Expansion erneut durchflusszytometrisch untersucht. **C)** Mit Hilfe des GateFinder-Subprogramms der ChromoClone Software wurden Gating-Koordinaten für 3 der 6 sichtbaren Klone erstellt und auf den FACS-Sorter übertragen. Exemplarisch ist die Erstellung der Gates für Klon 01 gezeigt.

Zusammenfassend wurde in diesem Teil der Arbeit ein Verfahren zur Isolation einzelner, RGB-markierter Zellklone aus Mischpopulationen vorgestellt und demonstriert, dass es sich zur Isolation einzelner Klone aus oligoklonalen Zellpopulationen eignet. Gleich drei verschiedene Klone wurden erfolgreich aus einer oligoklonalen Zellpopulation isoliert, wobei keine Kontaminationen mit andersfarbigen Klonen nachgewiesen werden konnten. Anhand klonspezifischer Metriken konnten diese Klone zudem identifiziert und charakterisiert werden, womit zugleich der Nutzen dieser Metriken demonstriert werden konnte. Dieses Verfahren kann somit zur Isolierung beliebiger Klone aus Mischpopulationen eingesetzt werden, um die Eigenschaften dieser Zellklone im Detail zu studieren. Dies ist zur Erfüllung des Ziels dieser Arbeit – der Entwicklung einer Technik zur Isolation und Untersuchung therapieresistenter Zellklone – von entscheidender Bedeutung.

3.3.9 Untersuchungen zur Koordinatenechtheit RGB-markierter Zellklone

Um die neu etablierten Techniken rund um die ChromoClone-Software sinnvoll einsetzen zu können, musste gewährleistet sein, dass einzelne Zellklone auch über längere Zeiträume noch eindeutig identifiziert werden können. Deshalb wurde untersucht, inwieweit sich die sphärischen Koordinaten und die chromatische Streuung RGB-markierter Zellklone über mehrere Wochen verändern. Hierfür wurden einzelne, RGB-markierte NCH644-Zellen per FACS in drei 96-well Zellkulturplatten ausgesät und expandiert. Dabei wuchsen nur in 6 von 288 Wells Klone heran, was einer Effizienz von etwa 3% entspricht. Nach der Expansion der Klone wurde exemplarisch ein dreifarbiges Klon (NCH644 Einzelzellklon-1 oder NCH644-EZK1) zur weiteren Untersuchung ausgewählt und während der *in vitro*-Kultivierung regelmäßigen FACS-Analysen unterzogen. Zur Bestimmung von Abweichungen der Koordinaten von (Sub-)Klonen auf dem Chromatizitätsraster über die Versuchsdauer wurden die Koordinaten der Cluster-Zentroide in kartesische Koordinaten umgewandelt und die Winkel zwischen den Ursprungsvektoren vor und nach 10 Passagen gemessen.

Dabei konnte für den untersuchten Klon NCH644-EZK1 (Cluster 2) nach 10 Passagen keine wesentliche Veränderung der Lage des Klons auf dem Chromatizitätsraster festgestellt werden (siehe Abb. 39A,C). Eine Berechnung der Abweichung der Cluster-Zentroide ergab dabei stets Abweichungen von weniger als 2°. Es konnte also nachgewiesen werden, dass die Koordinaten des Klons auch über 10 Passagen hinweg stabil blieben. Weiterhin wurde beobachtet, dass es zur Bildung von zweifarbigem Subklonen kam, was unter Berücksichtigung der Position dieser Subklone im Chromatizitätsraster auf den Verlust des grünen, bzw. roten Markers beim dominanten (3-farbigem) Klon zurückzuführen war (Abb. 39A). Zudem kam es mit der Zeit zu einer leichten Zunahme des Anteils dieser zweifarbigem Subklone, was auf einen moderaten Wachstumsvorteil der zweifarbigem Subklone gegenüber dem dreifarbigem Hauptklon hinweist (Abb. 39B). Darüber hinaus ergab die Berechnung der chromatischen Streuung des Klons und beider Subklone (Abb. 39D), dass sich diese im Verlauf dieses Versuches trotz der Veränderung der Anteile der Cluster 2 und 3 nicht signifikant änderte, was die Stabilität dieser Metrik und ihre Eignung zur Charakterisierung von Zellklonen demonstriert.

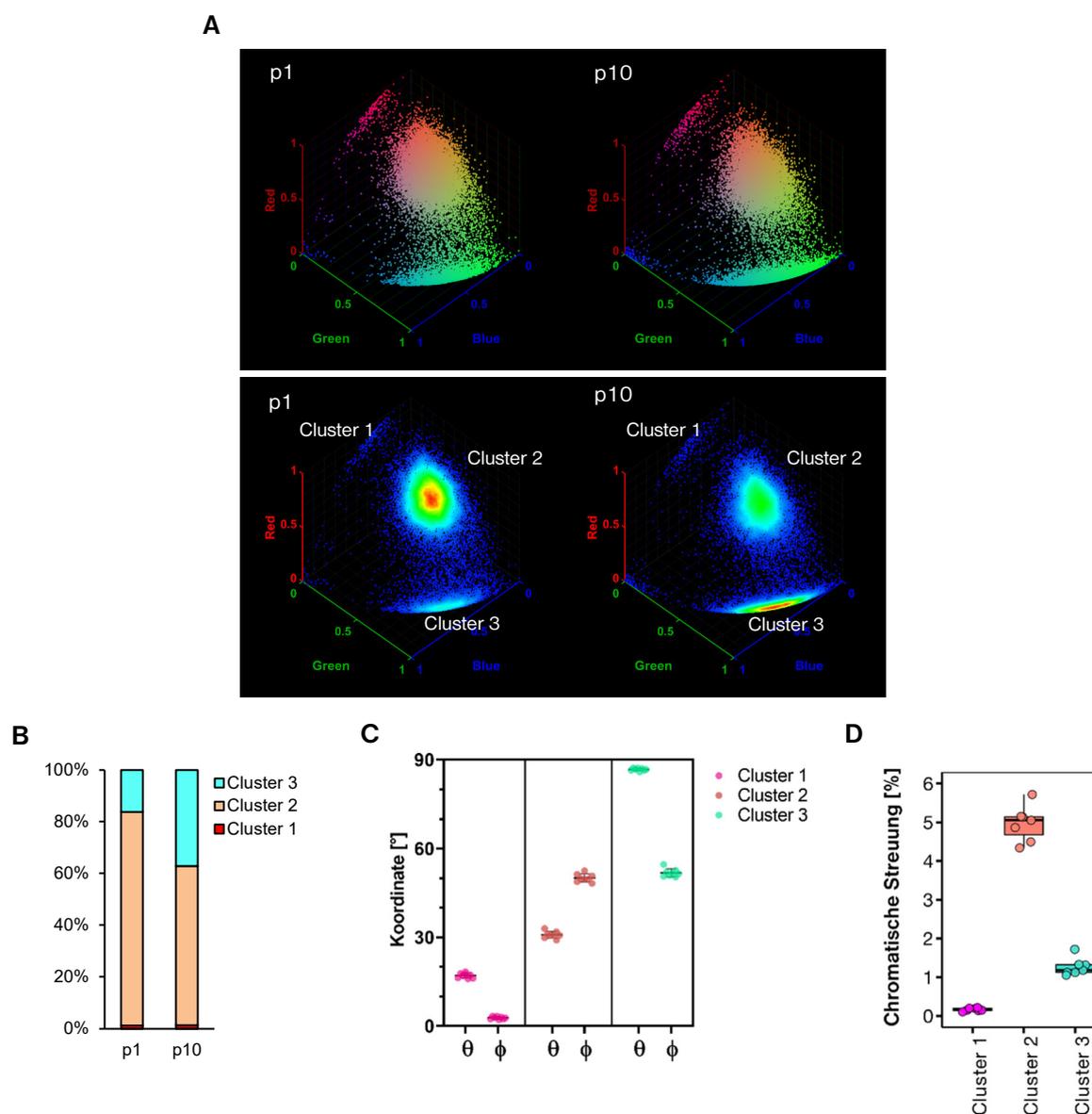


Abbildung 39 | Untersuchung der Stabilität der sphärischen Koordinaten und der chromatischen Streuung von Einzelzellklonen über 10 Passagen. Der Einzelzellklon EZK1 wurde durch Sortierung einzelner, RGB-markierter NCH644-Zellen per FACS gewonnen, expandiert und über eine Dauer von etwa 8 Wochen (10 Passagen) regelmäßig durchflusszytometrisch untersucht. **A)** Sphärische Scatterplots des Klons EZK1 zu Beginn des Experimentes und nach 10 Passagen. 3 erkennbare Cluster mit dem dreifarbigem Hauptklon (Cluster 2) und 2 zweifarbigem Subklonen wurden entsprechend annotiert. **B)** Quantifizierung der Cluster aus Klon EZK1 unter Verwendung von hierarchischem Clustering (vgl. Abschnitt 3.3.7.1) nach Hintergrundreduzierung (vgl. Abschnitt 3.3.4). **C)** Die Verteilung der sphärischen Koordinaten der drei Cluster in Klon EZK1 über 10 Passagen zeigt eine hohe Stabilität der Koordinaten über die gesamte Dauer des Versuches (n=6, SD < 2°) **D)** Die Werte für die chromatische Streuung der drei Cluster in Klon EZK1 über 10 Passagen zeigt bei dem dreifarbigem Hauptklon (Cluster 2) eine maximale Abweichung von < 2% (n=6)

3.4 Testung eines Verfahrens zur Untersuchung klonaler Therapieresistenzen anhand der Identifizierung, Isolierung und Analyse NCT-503- und CBR-5884-resistenter Gliomzellklone

In den vorigen Abschnitten wurde gezeigt, dass es mit der ChromoClone-Software möglich war, die klonalen Dynamiken von RGB-markierter Zellpopulationen im Detail zu analysieren und einzelne Klone zu identifizieren, zu charakterisieren und zu quantifizieren. Weiterhin wurde ein Verfahren zur Isolierung einzelner Klone durch Zellsortierung per FACS vorgestellt. Als nächstes wurden diese Methodiken in einem Verfahren kombiniert, dessen Zweck in der gezielten Isolierung wirkstoffresistenter Zellklone aus RGB-markierten Zellpopulationen lag. Zur Testung dieses Verfahrens wurden RGB-markierte NCH1681- bzw. NCH644-Zellen je als Duplikate in drei unterschiedliche Ansätze aufgeteilt. Der erste Ansatz (Kontroll-Gesamtpopulationen K1 und K2) bestand aus unbehandelten Zellen, die über die Dauer des Versuches unter normalen Zellkulturbedingungen kultiviert wurden. Die Gesamtzellpopulationen N1 und N2 wurden als Duplikatsansätze über mehrere Zyklen mit NCT-503 behandelt, um eine klonale Restriktion dieser Gesamtzellpopulationen und das vermehrte Anwachsen resistenter Zellklone in diesen Ansätzen zu erreichen. Analog hierzu wurden Zellen in den Ansätzen C1 und C2 wiederholt mit CBR-5884 behandelt. Nach der durchflusszytometrischen Analyse dieser Zellpopulationen wurden potenziell resistente Zellklone mit Hilfe der ChromoClone-Software identifiziert und isoliert. Der Nachweis einer erhöhten Resistenz dieser Zellklone erfolgte im Anschluss durch die Bestimmung der wachstumshemmenden Wirkung von NCT-503 und CBR-5884 mittels eines ATP-abhängigen Zellviabilitäts-Assays. Zur genaueren Untersuchung dieser Zellklone wurde außerdem deren PHGDH-, PSAT1- und SLC1A4-Gehalt überprüft.

3.4.1 RGB-Markierung von Gliomzellen und Verifizierung der Farbverteilung

Für die RGB-Markierung von Zellen spielt die verwendete MOI bei der Transduktion der Fluoreszenzmarker eine entscheidende Rolle. Zur RGB-Markierung der für diese Versuchsreihe verwendeten Gliomzelllinien NCH644 und NCH1681 wurden MOIs von 3, 10 und 30 verwendet und anschließend eine geeignete MOI auf Basis durchflusszytometrischer Analysen ausgewählt. Wie aus Abbildung 40 hervorgeht, führte die Erhöhung der Viruskonzentration nicht nur zu einer Erhöhung der Fluoreszenzintensitäten, sondern aufgrund dessen auch zu einer Verengung des RGB-Farbraumes. Dies war insofern von Nachteil, als dass eine Unterscheidung verschiedenfarbiger Klone schwieriger wird, je enger dieser Farbraum ist. Eine Verringerung der Viruskonzentration führte jedoch zu einer Verringerung des Anteils dreifarbiger Zellen in der Zellpopulation. Anzustreben war hier also ein Kompromiss aus einem weiten Farbraum und hohem Anteil RGB-dreifachpositiver Zellen. Im Fall von NCH644-RGB wurde eine MOI von 3 für weitere Versuche ausgewählt, da der Farbraum hier am größten war und trotzdem 71% der Zellen dreifarbig waren. Generell wurde eine MOI angestrebt, mit dem ein Anteil dreifarbiger Zellen von etwa 70-80% erreicht wurde. Für die NCH1681-Zelllinie wurden ebenfalls Zellen weiterverwendet, die mit einer MOI von 3 transduziert wurden. Da aus Gründen der besseren

Identifizierbarkeit von Klonen mit dreifarbigen Zellen gearbeitet werden sollte, wurden im nächsten Schritt ausschließlich dreifarbige Zellen dieser Zellpopulationen per FACS sortiert und expandiert.

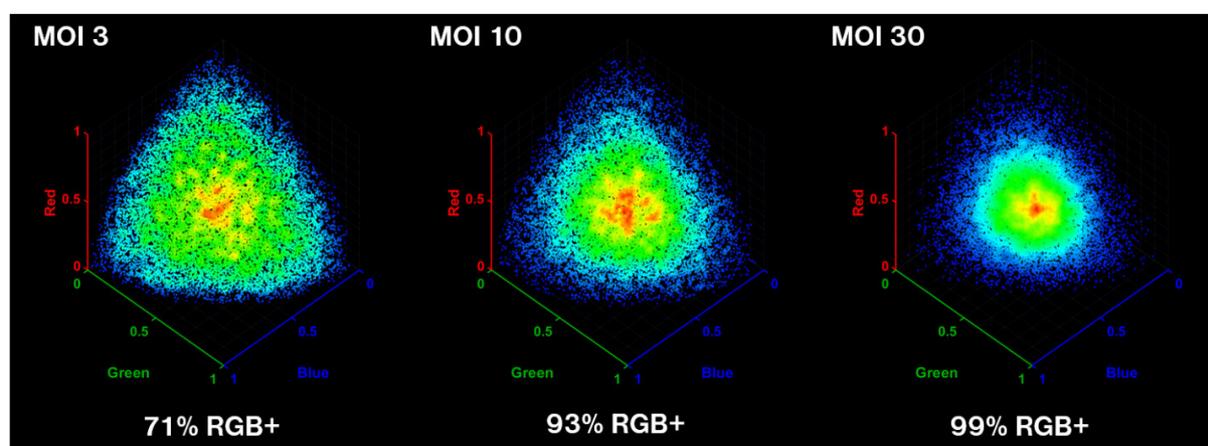


Abbildung 40 | RGB-Markierung von NCH644-Zellen durch lentivirale Transduktion mit pLeGO-Venus/Cerulean/mCherry mit verschiedenen MOIs. Gezeigt sind sphärische Scatterplots nach durchflusszytometrischen Messungen von NCH644-Zellen, die mit MOIs von 3, 10 und 30 transduziert wurden. Mit der Erhöhung der MOI nahm der Anteil der RGB-dreifachpositiven Zellen zu, jedoch verengte sich der Farbraum gleichzeitig erheblich.

3.4.2 Analyse der klonalen Dynamiken während der Behandlung RGB-markierter Gliomzelllinien mit NCT-503 und CBR-5884

Zur Selektion und der anschließenden Identifizierung behandlungsresistenter Zellklone wurden RGB-markierte Zelllinien für 3 Tage in Vollmedium mit 80 μ M NCT-503 (N1, N2) oder CBR-5884 (C1, C2) inkubiert und bis zum Nachwachsen der Zellen in reinem Vollmedium gehalten. Solche Zyklen wurden bis zur sichtbaren Expansion dominanter Klone wiederholt, was regelmäßig mittels FACS-Analyse mit ChromoClone überprüft wurde. Dabei wurde in Duplikaten gearbeitet, um beobachten zu können, ob sich die klonalen Dynamiken in parallelen Ansätzen identisch entwickelten und dabei die gleichen Klone Dominanz erlangten. Dies könnte darüber Auskunft geben, ob es sich bei den Klonen um initial resistente Klone handelte oder ob mögliche Resistenzen erst während der Behandlung erworben wurden.

3.4.2.1 Auswirkung der PHGDH-Inhibitoren NCT-503 und CBR-5884 auf die klonale Dynamik RGB-markierter NCH1681-Zellpopulationen

Es konnte zunächst festgestellt werden, dass die initiale Farbverteilung der NCH1681-Zellen zum Versuchsbeginn nicht mehr vollständig homogen war, da bereits zu Beginn des Versuches eine deutliche Clusterbildung in allen Ansätzen erkennbar waren (siehe Abb. 41A, Zyklus 0, $\chi = 68\%$). Dies war vor allem dem Umstand geschuldet, dass es sich hier um eine fortgeschrittene Passage (p15 ~ 15 Wochen) nach der RGB-Markierung handelte. Während der Behandlung der NCH1681-Zellen mit 4 Zyklen NCT-503 oder CBR-5884 über einen Zeitraum von etwa 8 Wochen zeigten sich deutliche Veränderungen der klonalen Farbverteilungen zwischen den Kontrollansätzen und den behandelten Zellpopulationen. Dabei konnte sowohl bei den behandelten Gesamtzellpopulationen (N1/N2, C1/C2), als auch in den Kontroll-Gesamtzellpopulationen (K1/K2) eine starke Ähnlichkeit bei der Entwicklung der klonalen Farbverteilungen in den Duplikaten festgestellt werden. So waren die klonalen Farbverteilungen der

Duplikate trotz signifikanter Veränderungen gegenüber den Ausgangs-Zellpopulationen, zum Ende des Experiments nahezu identisch.

Wie aus Abbildung 41 hervorgeht, zeigen die Farbverteilungen der mit CBR-5884 behandelten Ansätze nach 4 Behandlungszyklen starke Ähnlichkeiten zu den Farbverteilungen der Kontrollansätze. Dies äußerte sich neben der visuellen Ähnlichkeit der sphärischen Scatterplots auch in ähnlichen Chromatizitätswerten (K1/K2: $\chi = 68\% / 67\%$; C1/C2: $\chi = 68\% / 69\%$). Darüber hinaus wurde in den CBR-5884-behandelten Ansätzen jedoch ein Cluster bzw. ein Klon identifiziert, der in den Kontrollansätzen nicht oder kaum vorhanden war (siehe Klon C1-12 und C2-12, Abb. 43B-C). Bei solchen Klonen wurde aufgrund ihres relativen Wachstumsvorteils während der Behandlung davon ausgegangen, dass sie eine erhöhte Wirkstoffresistenz besaßen, weshalb sie bevorzugt als Zielklone für weitere Analysen ausgewählt wurden. Außerdem konnte während der Behandlung dieser Zellen mit CBR-5884 ein erhöhtes Wachstum eines bereits in der Ausgangszellpopulation dominanten Klons (vgl. Abb. 44, N1-28) beobachtet werden, der in anderen Ansätzen weniger expandierte. Anders als bei den CBR-5884-behandelten Ansätzen unterschieden sich die Farbverteilungen der mit NCT-503 behandelten Gesamtzellpopulationen (N1/N2) nach 5 Zyklen deutlich von denen der Kontrollansätze (K1/K2), was sich auch anhand der Verringerung der Chromatizitätswerte gegenüber Kontrollgesamtpopulationen (K1/K2) um etwa 6 % zeigte (N1/N2: $\chi = 61\% / 62\%$). Vor allem nach dem 2. Zyklus war verglichen mit den Kontrollansätzen eine deutliche Verschiebung der Anteile verschiedener Klone, wie Klon N1-28 zugunsten von Klon N2-11 (vgl. Abb. 44A-B) zu beobachten. Eine besondere Auffälligkeit stellte außerdem der erhebliche Rückgang eines Klones mit hohem Blauanteil unter Einfluss von NCT-503 und CBR-5884 dar, der in Kontrollansätzen deutlich dominant war (Klon K-09, vgl. Abb. 43A). Folglich wurde vermutet, dass dieser Klon eine erhöhte Sensitivität gegenüber beiden PHGDH-Inhibitoren aufwies.

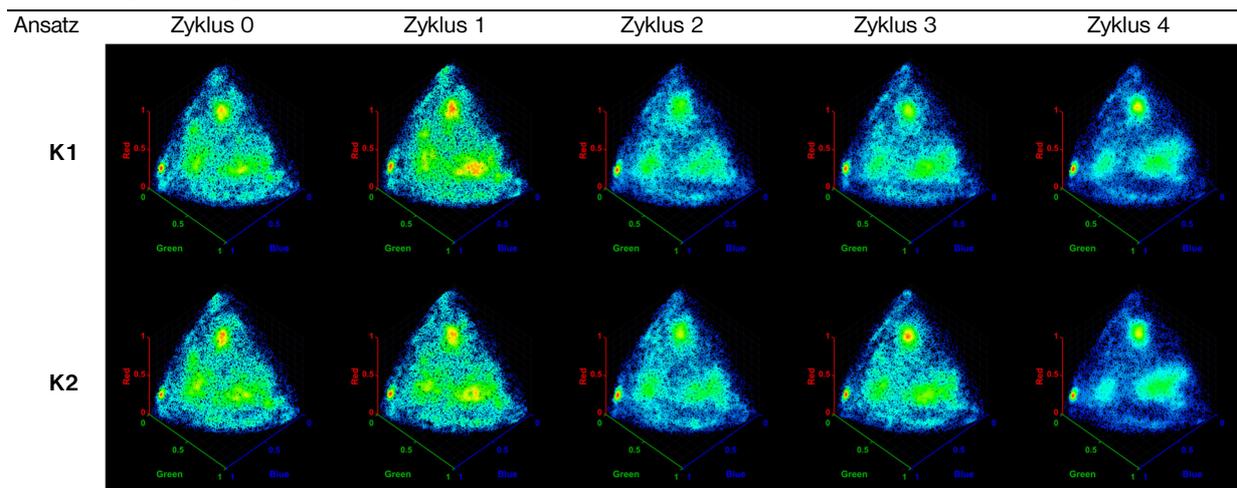
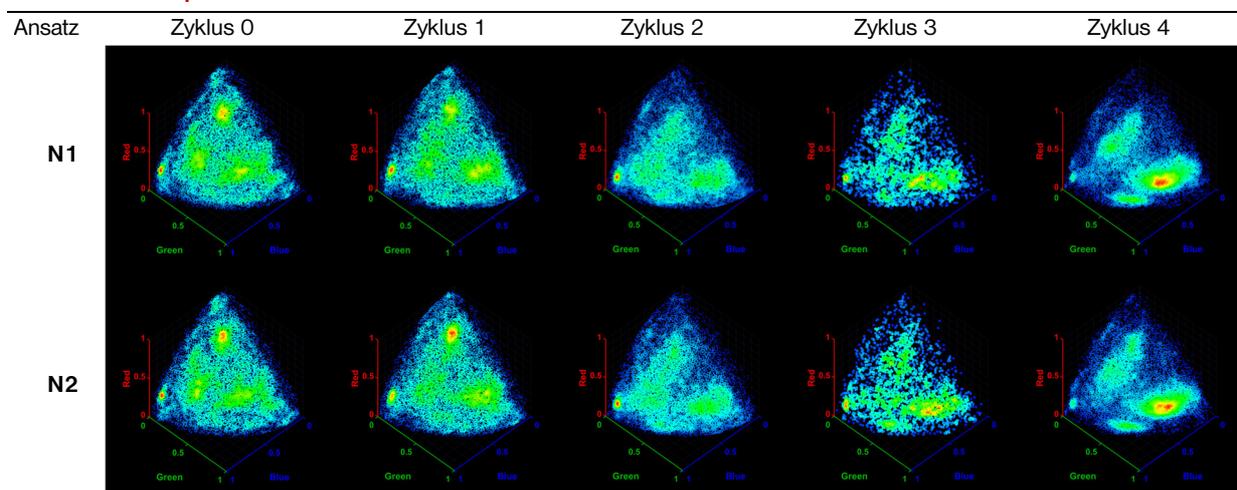
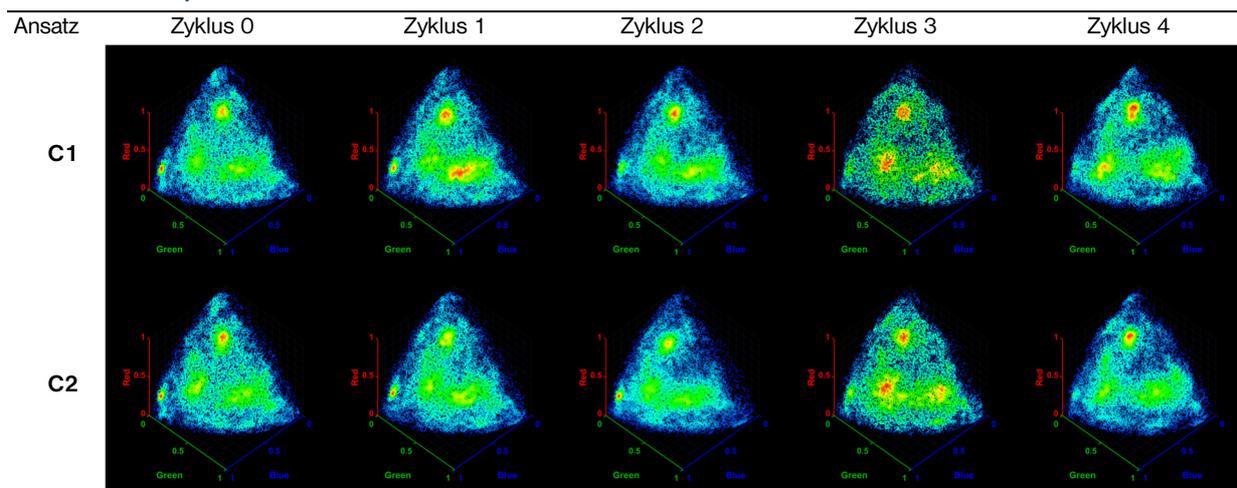
NCH1681 (Kontrolle)**NCH1681 + 80 μ M NCT-503****NCH1681 + 80 μ M CBR-5884**

Abbildung 41 | Veränderung der klonalen Dynamiken von NCH1681-Zellen während der Behandlung mit 4 Zyklen 80 μ M NCT-503 oder CBR-5884 in parallelen Duplikat-Ansätzen im Vergleich zu Kontrollzellpopulationen. RGB-markierte NCH1681-Zellen wurden für je 3 Tage mit 80 μ M NCT-503, CBR-5884 oder ohne Inhibitor (Kontrolle) inkubiert. Nach 3 Tagen wurde das Medium gewechselt und bis zum erneuten Anwachsen der Zellen gewartet, bevor die Ansätze durchflusszytometrisch analysiert und anschließend erneut behandelt wurden. Gezeigt sind sphärische Scatterplots dieser durchflusszytometrischen Daten, die die klonale Restriktion der Zellpopulationen nach wiederholter Behandlung mit NCT-503 und CBR-5884 zeigen. Deutliche Unterschiede der klonalen Farbverteilung konnten vor allem beim Vergleich der NCT-503-behandelten Zellpopulationen mit Kontrollansätzen und CBR-5884-behandelten Zellen beobachtet werden.

3.4.2.2 Auswirkung der PHGDH-Inhibitoren NCT-503 und CBR-5884 auf die klonale Dynamik RGB-markierter NCH644-Zellpopulationen

Im Gegensatz zur NCH1681-Ausgangszellpopulation war die initiale klonale Farbverteilung der NCH644-Ausgangszellpopulation zu Beginn des Versuches homogen und es konnten keine deutlichen Cluster identifiziert werden (Abb. 42, Zyklus 0), was sich auch in einem hohen Chromatizitätswert (χ) von 75% äußerte. Aufgrund der höheren Teilungsrates von NCH644-Zellen gegenüber NCH1681-Zellen (vgl. Abschnitt 3.1.3) konnten insgesamt 7 statt 4 Behandlungszyklen über einen Zeitraum von etwa 8 Wochen vollzogen werden. Die klonale Farbverteilung verblieb in den Kontrollansätzen, bis auf die geringfügige Expansion von zwei Klonen, über die Dauer des Versuches weitestgehend unverändert (K1/K2, Zyklus 7: $\chi = 75\%/74\%$). Nach dem 5. Zyklus kam es bei NCT-503- (N1/N2) und CBR-5884-behandelten Gesamtzellpopulationen (C1/C2) zu einer klonalen Restriktion sowie der Expansion einzelner Zellklone, die in einer Verringerung der Chromatizitätswerte um etwa 9% resultierte (N1/N2: $\chi = 66\%/65\%$; C1/C2: $\chi = 66\%/66\%$). Hierbei entwickelte sich die klonale Dynamik in den parallel behandelten Duplikaten – anders als bei der Behandlung von NCH1681-Zellen – deutlich unterschiedlich (Abb. 42, N1/N2/C1/C2). So kam es während der Behandlung mit insgesamt 7 Zyklen NCT-503 bei der Gesamtzellpopulation N1 zur Expansion eines einzelnen dreifarbigigen Klons, während im parallelen Ansatz N2 neben einem Klon mit ähnlichen Koordinaten (N1-02, vgl. Abb. 45A) auch ein zweiter Klon expandierte (N1-05, vgl. Abb. 45A). Zwischen den Zellpopulationen, die parallel mit CBR-5884 behandelt wurden (C1/C2), ließen sich nach 7 Behandlungszyklen ebenfalls deutliche Unterschiede bei den klonalen Farbverteilungen feststellen (Abb. 42 u.). Während im Ansatz C2 hauptsächlich die Expansion eines einzelnen Klones beobachtet wurde, der zum Ende des Versuchs einen wesentlichen Anteil (~15%) der dreifarbigigen Gesamtzellpopulation ausmachte, kam es bei der Zellpopulation C1 zu einer gleichmäßigeren Expansion mehrerer Zellklone.

3.4.2.3 Fazit zu 3.4.2.1. und 3.4.2.2.

Insgesamt konnte in diesen Versuchen gezeigt werden, dass es infolge der Behandlung RGB-markierter Gliomzellen mit NCT-503 und CBR-5884 nach mehreren Zyklen zu einer signifikanten Veränderung der klonalen Farbzusammensetzung der Zellpopulationen und zu einer zunehmenden klonalen Restriktion dieser Zellpopulationen kam. Infolgedessen konnten einige Klone identifiziert werden, für die eine erhöhte oder verringerte Resistenz gegenüber diesen Inhibitoren vermutet wurde. Die parallel auftretende Expansion scheinbar identischer Klone in Duplikaten behandelter NCH1681-Zellpopulationen ließ dabei einen initialen Wachstumsvorteil dieser Klone vermuten.

NCH644 (Kontroll-Gesamtpopulationen)

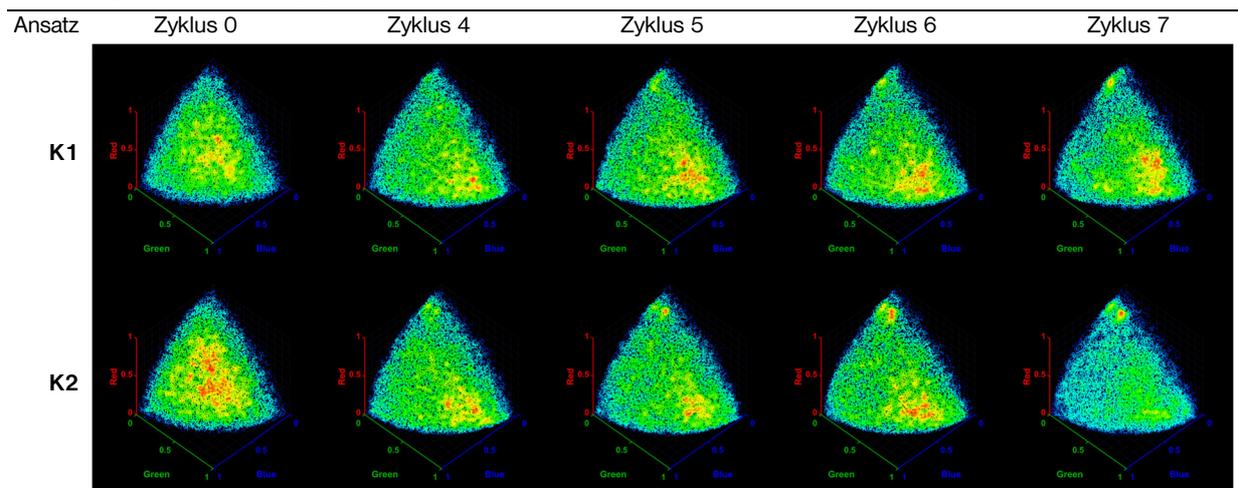
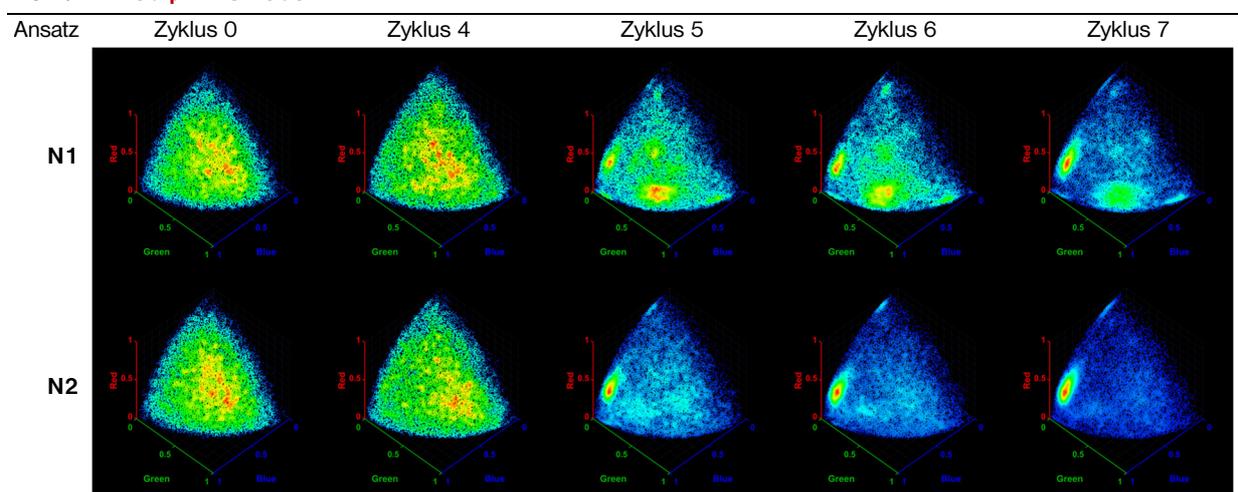
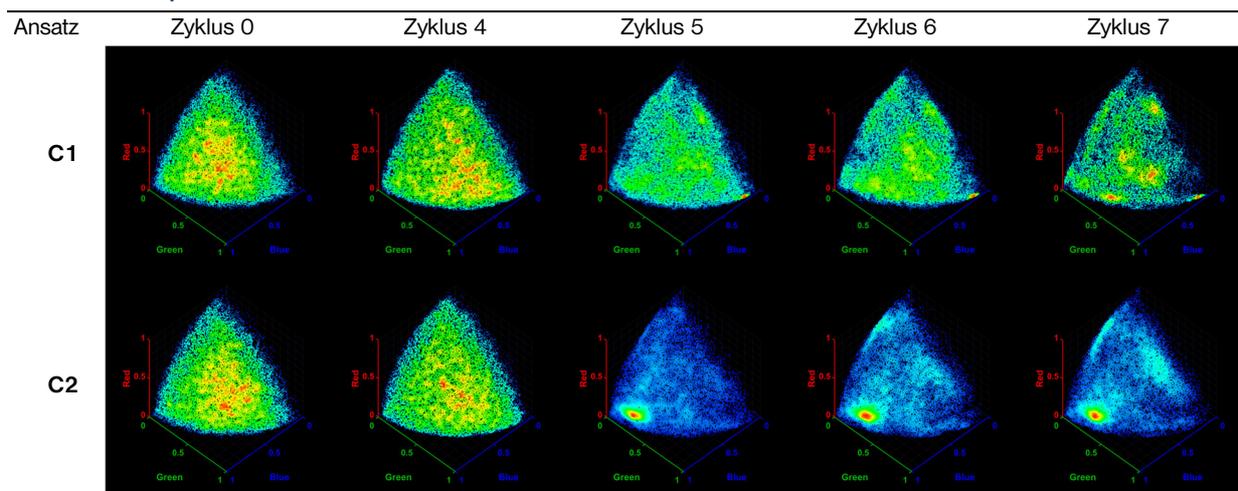
NCH644 + 80 μ M NCT-503NCH644 + 80 μ M CBR-5884

Abbildung 42 | Veränderung der klonalen Dynamiken von NCH644-Zellen während der Behandlung mit 7 Zyklen 80 μ M NCT-503 oder CBR-5884 in parallelen Duplikat-Ansätzen. RGB-markierte NCH644-Zellen wurden für je 3 Tage mit 80 μ M NCT-503, CBR-5884 oder ohne Inhibitor (Kontrolle) inkubiert. Nach 3 Tagen wurde das Medium gewechselt und bis zum erneuten Anwachsen der Zellen gewartet, bevor die Ansätze durchflusszytometrisch analysiert und anschließend erneut behandelt wurden. Gezeigt sind sphärische Scatterplots dieser durchflusszytometrischen Daten, die die klonale Restriktion der Zellpopulationen nach wiederholter Behandlung mit NCT-503 und CBR-5884 zeigen, die für beide Inhibitoren nach 5 Behandlungszyklen deutlich erkennbar war.

3.4.3 Isolierung potenziell resistenter Zellklone zur Untersuchung ihrer Sensitivität gegenüber NCT-503 und CBR-5884

Der nächste Schritt bestand in der Isolierung von NCH1681- bzw. NCH644-Zellklonen, bei denen eine erhöhte oder verringerte Resistenz gegenüber NCT-503 oder CBR-5884 vermutet wurde. Hierfür wurden auf Basis der im vorigen Abschnitt ermittelten Differenzen der klonalen Farbverteilungen zwischen behandelten und unbehandelten Zellpopulationen vor allem solche Klone ausgewählt, die in behandelten Zellpopulationen einen deutlich höheren Anteil der Gesamtzellpopulation ausmachten als in den Kontrollansätzen. Anschließend wurde die in dieser Arbeit vorgestellte Technik zur Isolierung einzelner Zellklone verwendet (siehe Abschnitt 3.3.8), um diese Klone per FACS zu isolieren und eine Reinheitsanalyse dieser Klone durchzuführen. Um zu untersuchen, ob die hier identifizierten, resistenten Zellklone bereits in der Ausgangszellpopulation vorlagen, wurde neben der Isolierung von Klonen aus behandelten Ansätzen außerdem versucht, einige dieser Klone unter Anwendung derselben (FACS-) Gating-Koordinaten aus Kontrollansätzen zu sortieren (im Folgenden als Kontrollklone bezeichnet). Für jeden der ausgewählten Klone konnten initial mehr als 5000 Zellen isoliert werden, die anschließend expandiert und erneut durchflusszytometrisch gemessen wurden. Zur Evaluierung der Reinheit der isolierten Zellklone wurde deren Quantifizierung in sphärischen Scatterplots entweder mittels hierarchischem Clustering (vgl. Abschnitt 3.3.7.1) oder aber manuell durchgeführt (CloneQuant Subprogramm, ChromoClone-Software), wenn Klone mit hierarchischem Clustering nicht erfasst werden konnten.

3.4.3.1 Isolation potenziell behandlungsresistenter oder -sensitiver NCH1681-Klone

In den Abbildungen 43 und 44 ist die Auswahl der zu isolierenden NCH1681-Klone, sowie die Analyse der durchflusszytometrischen Daten dieser Klone etwa 5 Wochen nach der Isolation per FACS dargestellt. Im Rahmen dieses Versuches konnten insgesamt 6 NCH1681-RGB-Klone mit hoher Reinheit isoliert werden.

Der Klon K2-09 wurde dabei zur Isolation ausgewählt, da aufgrund seines verringerten Anteils an NCT-503- und CBR-5884-behandelten Gesamtzellpopulationen (N1/N2, C1/C2) gegenüber Kontrollansätzen (K1/K2) von einer erhöhten Sensitivität dieses Klones gegenüber CBR-5884 und NCT-503 ausgegangen wurde. Wie Abbildung 43A zeigt, konnte Klon K2-09 aus dem Kontrollansatz K2 mit einer hohen Reinheit (>95%) isoliert werden. Aus der CBR-5884 behandelten Zellpopulation C1 wurde der Klon C1-12 isoliert, da er relativ zu Kontrollansätzen deutlich expandiert war. Aufgrund der starken Ähnlichkeit der klonalen Dynamiken bei den Duplikat-Ansätzen bei dieser Zelllinie wurde dieser Klon zusätzlich aus dem Duplikat-Ansatz C2 parallel als Klon C2-12 isoliert, um feststellen zu können, ob es sich hierbei um tatsächlich um denselben Klon handelte. Wie aus Abbildung 43B-C hervorgeht, konnten diese Klone ebenfalls erfolgreich angereichert werden, wobei ihre Reinheit bei >90% lag. Der Großteil der restlichen 10% konnte zweifarbigen Subklonen der dreifarbigem Klone zugeordnet werden, die infolge des Verlusts je eines Fluoreszenzmarkers entstehen können (vgl. Abschnitt 3.3.9). Als möglicher NCT-503-resistenter Klon wurde zunächst der Klon N2-11 aus dem NCT-503-behandelten Ansatz N2 zur Isolation ausgewählt, da dessen Anteil an der Zellpopulation N2 verglichen mit Kontrollansätzen deutlich erhöht war (Abb. 44A und B). Die klonale Reinheit der isolierten Zellen betrug für diesen Klon >94%, wobei ebenfalls der

Großteil der Verunreinigungen zweifarbigen Subklonen zugeschrieben werden konnte. Mit N1-28 wurde zudem ein Klon ausgewählt, dessen Anteil in NCT-503-behandelten Ansätzen im Laufe des Experimentes zwar leicht abnahm, für den jedoch eine deutliche Zunahme in den CBR-5884 behandelten Zellpopulationen beobachtet wurde. Für diesen Klon konnten jedoch erhebliche Verunreinigungen mit einem anderen Klon festgestellt werden (siehe Abb. 44), sodass die klonale Reinheit hier nur bei 60% lag. Ferner wurden die Gating-Koordinaten zur Isolierung des Klons N1-28 verwendet, um so zu versuchen, denselben Klon auch aus der Kontrollzellpopulation K1 zu isolieren. Wie aus Abbildung 44 hervorgeht, wies der auf diese Weise isolierte Kontrollklon K1-N1-28 auf dem Chromatizitätsraster erwartungsgemäß ähnliche Koordinaten zu N1-28 auf, zeigte aber im Gegensatz zu N1-28 keine deutlichen Verunreinigungen mit anderen Klonen, sodass hier eine höhere klonale Reinheit von >80% erreicht werden konnte.

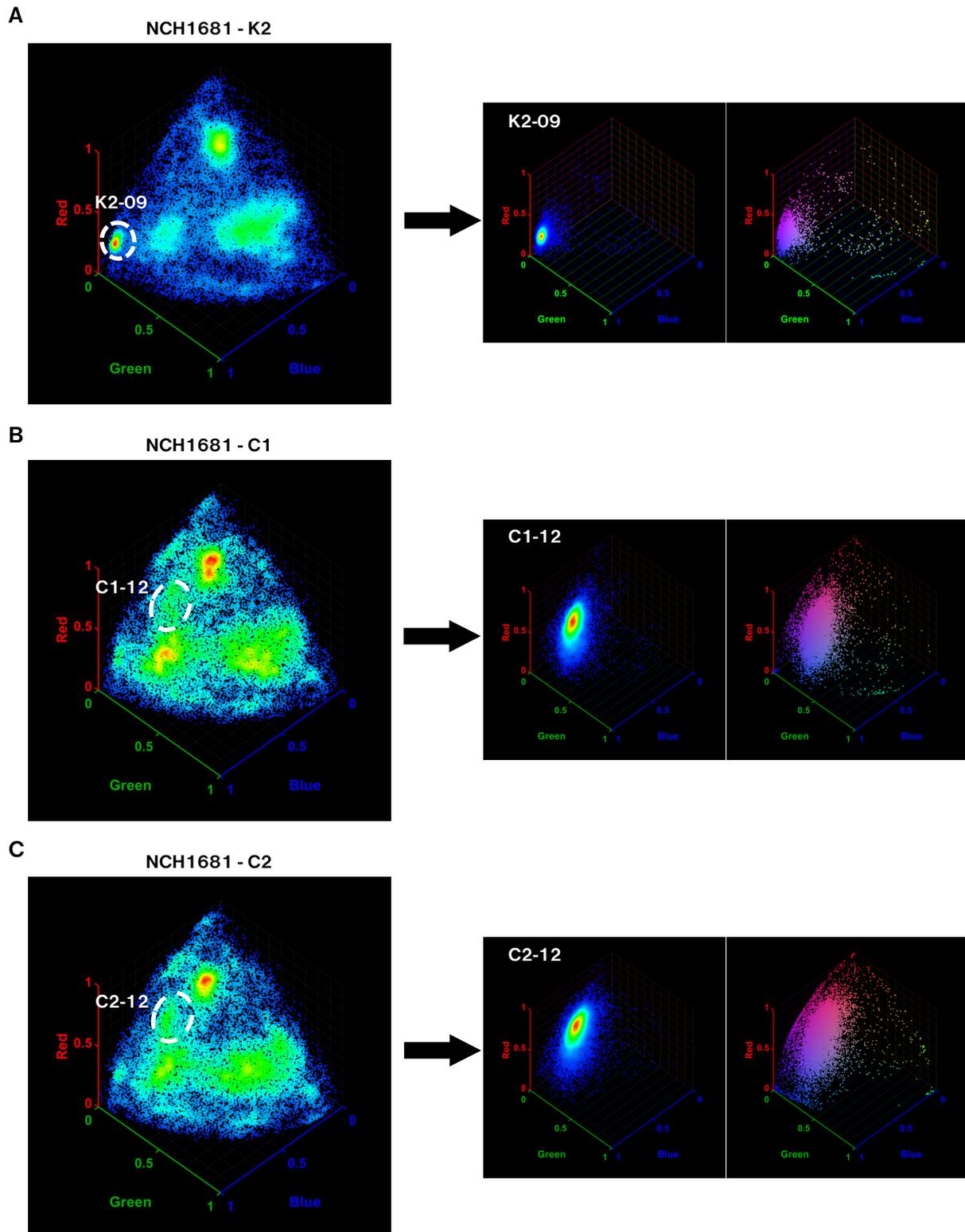


Abbildung 43 | Isolierung von NCH1681-RGB-Zellklonen, bei denen eine erhöhte oder verringerte Resistenz gegenüber NCT-503 oder CBR-5884 vermutet wurde. Die Isolierung einzelner Klone aus CBR-5884-behandelten Zellkulturen (C1, C2) bzw. Kontrollzellen (K2) erfolgte per FACS unter Verwendung des GateFinder-Subprogrammes der ChromoClone-Software gemäß dem in Abschnitt 3.3.8 vorgestellten Verfahren. **A)** Sphärische Scatterplots durchflusszytometrischer Daten zeigen die klonale Farbverteilung der Kontrollzell-population K2 (links), sowie des aus diesem Ansatz isolierten Klons K2-09 (rechts). Rechtes Graphenpaar: Der linke von beiden Graphen zeigt ausschließlich dreifarbige Zellen, während zur Evaluation der Reinheit der isolierten Zellpopulationen im rechten Graphen auch ein- und zweifarbige Zellen dargestellt sind. **B)** Klonale Farbverteilung der Gesamtzellpopulation C1 und des daraus isolierten Klons C1-12. **C)** Farbverteilung der Gesamtzellpopulation C2 und dem analog zu B) isolierten Vergleichsklon C2-12. Mit Ausnahme zweifarbiger Subklone der Hauptklone konnte bei keinem der isolierten Klone eine deutliche Verunreinigung mit anderen Klonen beobachtet werden.

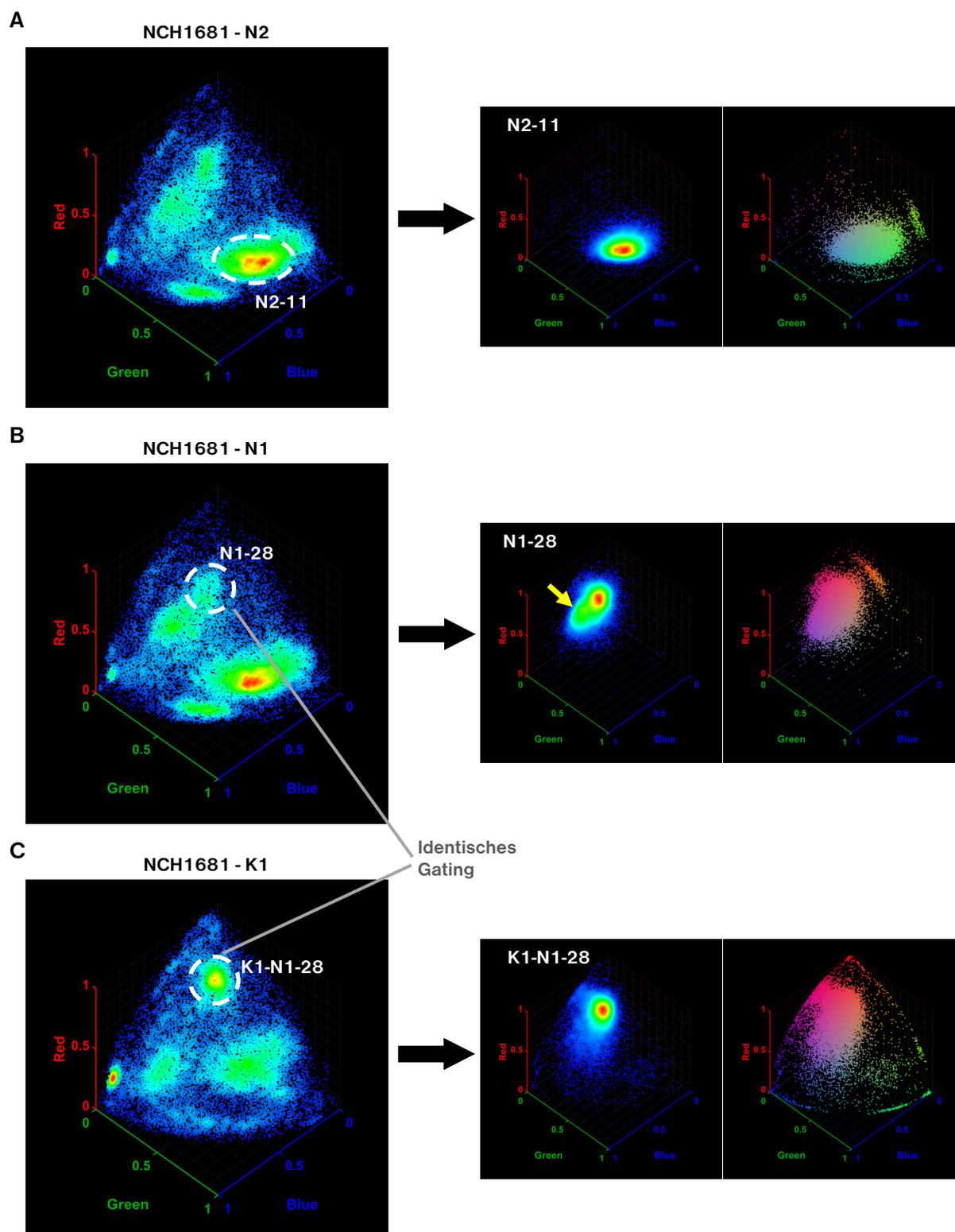


Abbildung 44 | Isolierung von NCH1681-RGB-Zellklonen, bei denen eine erhöhte Resistenz gegenüber NCT-503 vermutet wurde. Die Isolierung einzelner NCH1681-Klone aus NCT-503-behandelten Zellkulturen (N1, N2) bzw. aus Kontrollzellen (K1) erfolgte per FACS gemäß dem in Abschnitt 3.3.8 vorgestellten Verfahren. **A)** Sphärische Scatterplots durchflusszytometrischer Daten zeigen die klonale Farbverteilung der Gesamtzellpopulation N2 (links), sowie des aus diesem Ansatz isolierten Klons N2-11 (rechts). Rechtes Graphenpaar: Der linke von beiden Graphen zeigt ausschließlich dreifarbige Zellen, während zur Evaluation der Reinheit der isolierten Klone im rechten Graphen auch ein- und zweifarbige Zellen dargestellt sind. **B)** Klonale Farbverteilung der Gesamtzellpopulation N1 und des daraus isolierten Klons N1-28. **C)** Farbverteilung der Kontrollzellpopulation K1 und dem analog zu B) isolierten Kontrollklon K1-N1-28. Neben zweifarbigen Subklonen der Hauptklone, die in den meisten Klonen gefunden wurden, zeigte der Klon N1-28 zusätzliche Verunreinigungen mit einem anderen Klon (gelber Pfeil).

3.4.3.2 Isolierung potenziell behandlungsresistenter NCH644-Klone

Die Abbildungen 46 und 45 zeigen die Auswahl von NCH644-Klonen und die durchflusszytometrische Analyse isolierter Klone nach dreiwöchiger Expansion. Dabei wurden ausschließlich Klone ausgewählt, die in den behandelten Ansätzen, jedoch nicht in den Kontrollansätzen dominant waren. Da die Duplikate der NCH644-Ansätze während der Behandlung mit NCT-503 und CBR-5884 keine ähnliche Entwicklung der klonalen Farbverteilungen zeigten, wurde auf eine Isolierung derselben Klone aus Parallelansätzen verzichtet. Insgesamt wurden 2 dominante Klone aus NCT-503-behandelten Zellpopulationen (N1-02 und N1-05), 2 weitere expandierte Klone aus CBR-5884-behandelten Ansätzen (C1-03 und C2-18), sowie ein Kontrollklon (K2-C2-18) isoliert. Im Vergleich zu NCH1681-Klonen fiel besonders auf, dass die Reinheit der isolierten NCH644-Klone relativ gering war. So betrug die Reinheit der Klone N1-02, C1-03, C2-12 und K2-C2-18 lediglich 40% (N1-02), 35% (C1-03), 45% (C2-18) bzw. 58% (K2-C2-18), was größtenteils auf den erhöhten Anteil zweifarbigiger Subklone zurückgeführt werden kann (vgl. Abschnitt 3.3.9). Bei den Klonen C1-03 und K2-C2-18 konnten neben zweifarbigigen Subklonen auch größere Verunreinigungen mit anderen, farblich ähnlichen Klonen identifiziert werden.

3.4.3.3 Fazit zu 3.4.3.1 und 3.4.3.2

Zusammenfassend konnten in diesem Abschnitt verschiedene NCH1681- und NCH644-Zellklone isoliert werden, bei denen der Verdacht einer erhöhten oder verringerten Resistenz gegenüber NCT-503 bzw. CBR-5884 bestand. Gleichzeitig wurde demonstriert, dass die Isolation einzelner Klone aus multiklonalen Zellpopulationen mit hoher Präzision durchgeführt werden kann. Es wurde außerdem gezeigt, dass die Anreicherung von Klonen aus Kontrollansätzen auch dann möglich war, wenn sie in den Zellpopulationen nicht dominant oder kaum zu detektieren waren. Jedoch wurde bei der Isolierung von NCH1681-Klonen im Vergleich zu NCH644-Klonen im Mittel eine wesentlich höhere Reinheit erzielt, wobei Verunreinigungen häufig auf das Anwachsen zweifarbigiger Subklone der isolierten Klone zurückzuführen waren.

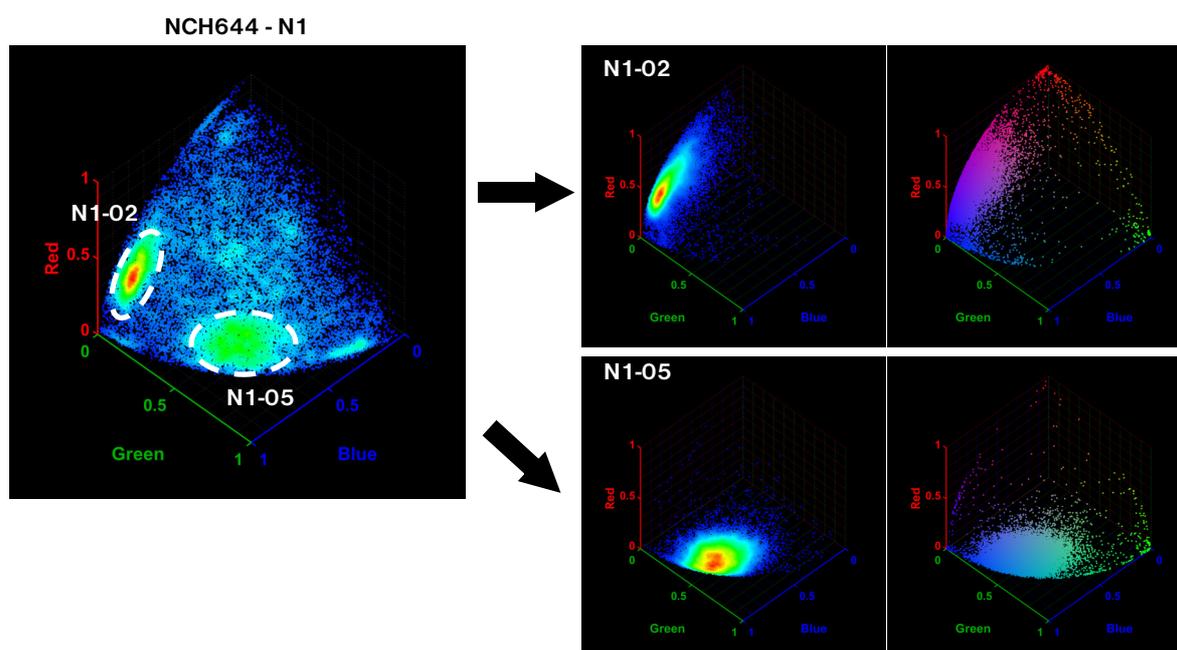


Abbildung 45 | **Isolierung von NCH644-RGB-Zellklonen, bei denen eine erhöhte Resistenz gegenüber NCT-503 oder CBR-5884 vermutet wurde.** Die Isolierung einzelner Klone aus der NCT-503-behandelten Zellkultur N1 erfolgte per FACS gemäß dem in Abschnitt 3.3.8 vorgestellten Verfahren. A) Sphärische Scatterplots durchflusszytometrischer Daten zeigen die klonale Farbverteilung der Gesamtzellpopulation N1, sowie den aus diesem Ansatz isolierten Klone N1-02 und N1-05 (rechts). Rechtes Graphenpaar: Der linke von beiden Graphen zeigt ausschließlich dreifarbigige Zellen, während zur Evaluation der Reinheit der isolierten Zellpopulationen im rechten Graphen auch ein- und zweifarbigige Zellen dargestellt sind. Mit Ausnahme zweifarbigiger Subklone der Hauptklone konnten keine deutlichen Verunreinigungen mit anderen Klone beobachtet werden.

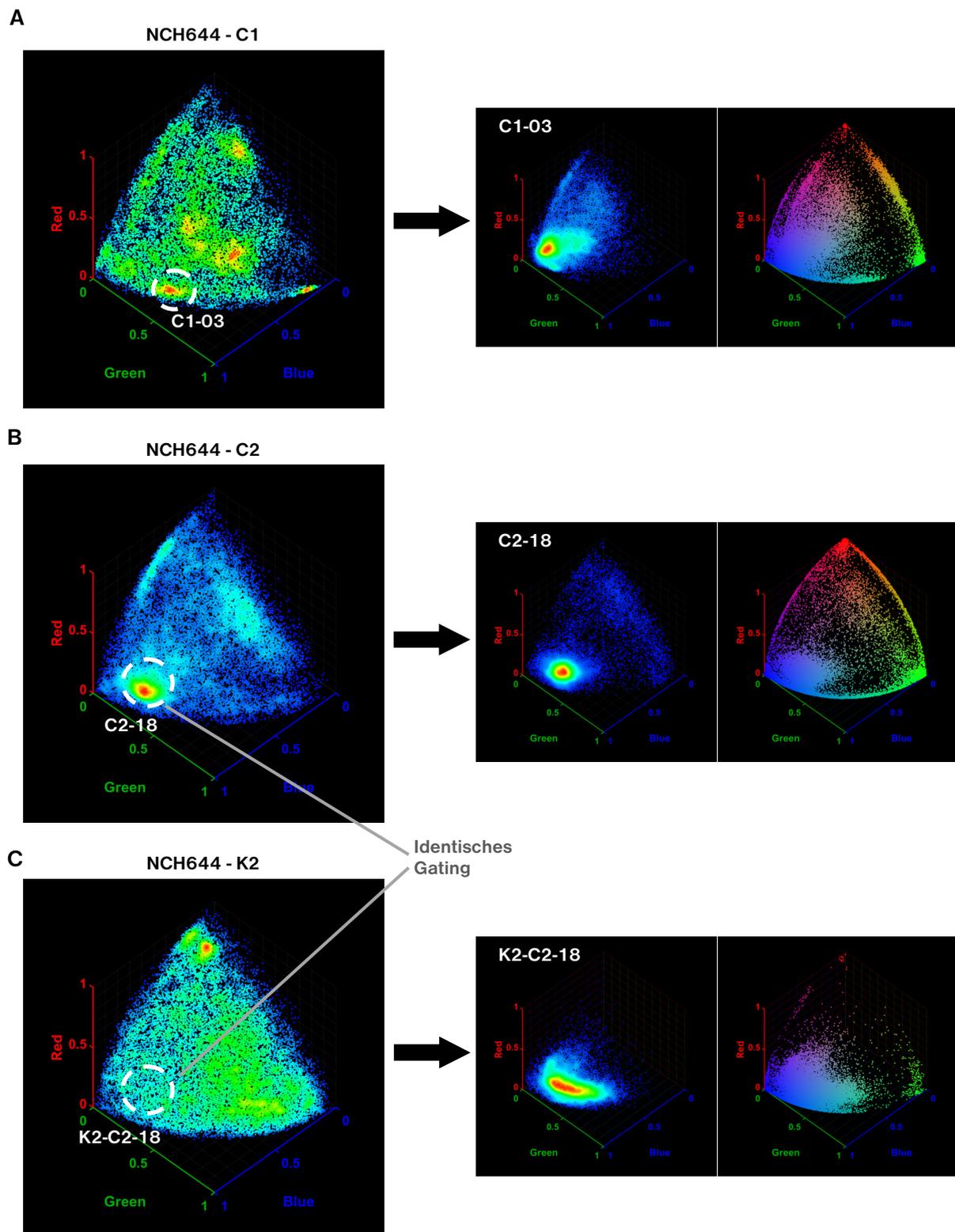


Abbildung 46 | Isolierung von NCH644-RGB-Zellklonen, bei denen eine erhöhte oder verringerte Resistenz gegenüber NCT-503 oder CBR-5884 vermutet wurde. Die Isolierung einzelner Klone aus CBR-5884 behandelten Zellkulturen (C1, C2) bzw. aus dem Kontrollansatz K2 erfolgte per FACS unter Verwendung des GateFinder-Subprogrammes der ChromoClone-Software nach dem in Abschnitt 3.3.8 vorgestellten Verfahren. **A)** Sphärische Scatterplots durchflusszytometrischer Daten zeigen die klonale Farbverteilung der Gesamtzellpopulation C1, sowie des aus diesem Ansatz isolierten Klons C1-03. Rechtes Graphenpaar: Der linke von beiden Graphen zeigt ausschließlich dreifarbige Zellen, im rechten Graphen auch ein- und zweifarbige Zellen dargestellt sind. **B)** Klonale Farbverteilung der Gesamtzellpopulation C2 und des daraus isolierten Klons C2-18. **C)** Farbverteilung der Kontrollzellpopulation K2 und dem analog zu B isolierten Kontrollklon K2-C2-18. Neben zweifarbigem Subklonen der Hauptklone, die in den meisten Klonen gefunden wurden, zeigten der Klon C1-03 und der Kontrollklon K2-C2-18 leichte Verunreinigungen mit anderen Klonen.

3.4.4 Untersuchung isolierter Zellklone auf ihre Sensitivität gegenüber NCT-503 und CBR-5884, sowie auf den Gehalt von Schlüsselproteinen der zellulären Serinversorgung

Nach der erfolgreichen Isolierung der im vorigen Abschnitt beschriebenen Zellklone wurden diese auf ihre Sensitivität gegenüber NCT-503 und CBR-5884 untersucht. Dazu wurden sie für 4 Tage mit je 25 μM bzw. 50 μM NCT-503 oder CBR-5884 inkubiert und ihre Zellviabilität relativ zu nicht behandelten Kontrollansätzen mittels ATP-abhängigem Zellviabilitäts-Assay bestimmt. Dabei wurde für Kontrollansätze unter Einfluss der Inhibitoren eine Wachstumsinhibition von 50% (Zellviabilität = 0,5) angestrebt, damit Veränderungen in der Wirksamkeit der Inhibitoren effizient detektiert werden konnten. Somit wurde für beide Wirkstoffe diejenige Konzentration ausgewählt, für die dies am besten zutraf. Weiter wurde für diese Klone der Proteingehalt für PHGDH, PSAT1 und SLC1A4 bestimmt, um zu untersuchen, ob der Gehalt dieser Proteine mit einer erhöhten oder verringerten Sensitivität gegenüber Inhibition mit NCT-503 oder CBR-5884 korreliert.

3.4.4.1 Analyse potenziell behandlungsresistenter NCH1681-Klone

Wie aus Abbildung 47A hervorgeht, konnte für den Klon K2-09, verglichen mit den Kontroll-Gesamtzellpopulationen (K1/K2), in Verbindung mit beiden Inhibitoren eine signifikant verringerte Zellviabilität nachgewiesen werden, was die initiale Erwartung bestätigte, dass dieser Klon eine erhöhte Sensitivität gegenüber NCT-503 und CBR-5884 besaß (vgl. Abschnitt 3.4.3.1). Der Vergleich des PHGDH-, PSAT1- und SLC1A4-Proteingehalts ergab jedoch keine offensichtlichen Unterschiede zwischen diesem Klon und den Kontrollzellen, sodass kein direkter Zusammenhang zwischen der intrazellulären Konzentration dieser Proteine und der erhöhten NCT-503- und CBR-5884-Sensitivität dieses Klons bestand. Außerdem zeigten die NCT-503-behandelten Klone N2-11 und N1-28 im Mittel eine erhöhte Resistenz gegenüber NCT-503, wenngleich dieses Ergebnis nur für den Klon N1-28 statistisch signifikant war ($p = 0,1$ für NCT-503 bei N2-11). In Bezug auf die NCT-503-behandelten Gesamtzellpopulationen N1 und N2, sowie den hieraus isolierten Klonen N2-11 und N1-28 fiel jedoch besonders auf, dass sie ebenfalls eine signifikant erhöhte Resistenz gegenüber CBR-5884 zeigten. Dabei kam es bei den Klonen N2-11 und N1-28 zu einem nahezu vollständigen Verlust der wachstumshemmenden Wirkung von 50 μM CBR-5884, was die Vermutung nahelegt, dass eine NCT-503-Resistenz auch zur Resistenz der Zellen gegenüber CBR-5884 beitragen könnte. Die Bestimmung des PHGDH-Gehalts (Abb. 47B) zeigte für diese beiden Klone keine offensichtlichen Unterschiede gegenüber Kontrollzellpopulationen (K1/K2), während der PSAT1-Gehalt (Abb. 47C) bei N2-11-Zellen deutlich verringert war. Auffallend war allerdings, dass der SLC1A4-Gehalt gegenüber Kontrollzellen bei N2-11-Zellen verringert war, während er bei N1-28-Zellen deutlich erhöht vorlag (Abb. 47D). Diese Differenzen zwischen beiden Klonen könnten ein Anzeichen dafür sein, dass diese Klone über unterschiedliche Resistenzmechanismen verfügen.

Auffällig ist außerdem, dass für den Kontrollklon K1-N1-28 (vergleichbare Koordinaten wie N1-28) eine ähnlich hohe Resistenz gegenüber NCT-503 und CBR-5884 beobachtet werden konnte, wie für den Referenzklon N1-28. Auch bezüglich des PHGDH-, PSAT1- und SLC1A4-Gehalts können wesentliche Parallelen zwischen diesen Zellklonen festgestellt werden. Gerade der deutlich erhöhte SLC1A4-Gehalt,

der in diesem Ausmaß nur für den Klon C2-12 beobachtet wurde legt nahe, dass es sich bei N1-28 und K1-N1-28 weitestgehend um denselben Klon handelt und ist ein deutliches Zeichen dafür, dass es sich bei diesem Klon um einen initial resistenten Klon handelte, der bereits in der Ausgangspopulation vorhanden war und im Rahmen dieses Versuches erfolgreich aus Kontrollzellen extrahiert werden konnte. Der hohe SLC1A4-Gehalt beider Klone lässt außerdem vermuten, dass SLC1A4 am Resistenzmechanismus dieses Klons gegenüber NCT-503 und CBR-5884 beteiligt sein könnte und unterstützt damit die Hypothese, dass dieser Serintransporter die Wirkung von PHGDH-Inhibitoren durch den Import von Serin verringern kann.

Weiter zeigten die CBR-5884-behandelten Zellpopulationen C1 und C2, sowie die daraus isolierten Klone C1-12 und C2-12 entgegen den Erwartungen weder eine erhöhte Resistenz gegenüber CBR-5884, noch gegenüber NCT-503 (Abb. 47A). Stattdessen deuten die Ergebnisse auf das Gegenteil hin: Während die wachstumshemmende Wirkung von CBR-5884 bei Zellen in der Gesamtzellpopulation C1 zunahm, zeigten die Klone C1-12 und C2-12 eine erhöhte Sensitivität gegenüber NCT-503. Dies legt die Vermutung nahe, dass die wiederholte Behandlung mit CBR-5884 die NCH1681-Zellen zunehmend gegen diese Inhibitoren sensitivierte. Außerdem waren diese beiden Klone insofern auffällig, als dass sie im Vergleich als einzige der untersuchten NCH1681-Zellpopulationen (inklusive der Klone) einen stark erhöhten PHGDH- und PSAT1-Gehalt zeigten (Abb. 47B-C). Bezüglich ihres SLC1A4-Gehaltes konnte jedoch ein deutlicher Unterschied zwischen diesen Klonen festgestellt werden, da der SLC1A4-Gehalt verglichen mit Kontrollzellen nur bei Klon C2-12 deutlich erhöht war (Abb. 47D). Dennoch kann auf Basis der Parallelen dieser Klone angenommen werden, dass es sich bei C1-12 und C2-12 weitestgehend um denselben Klon handelte.

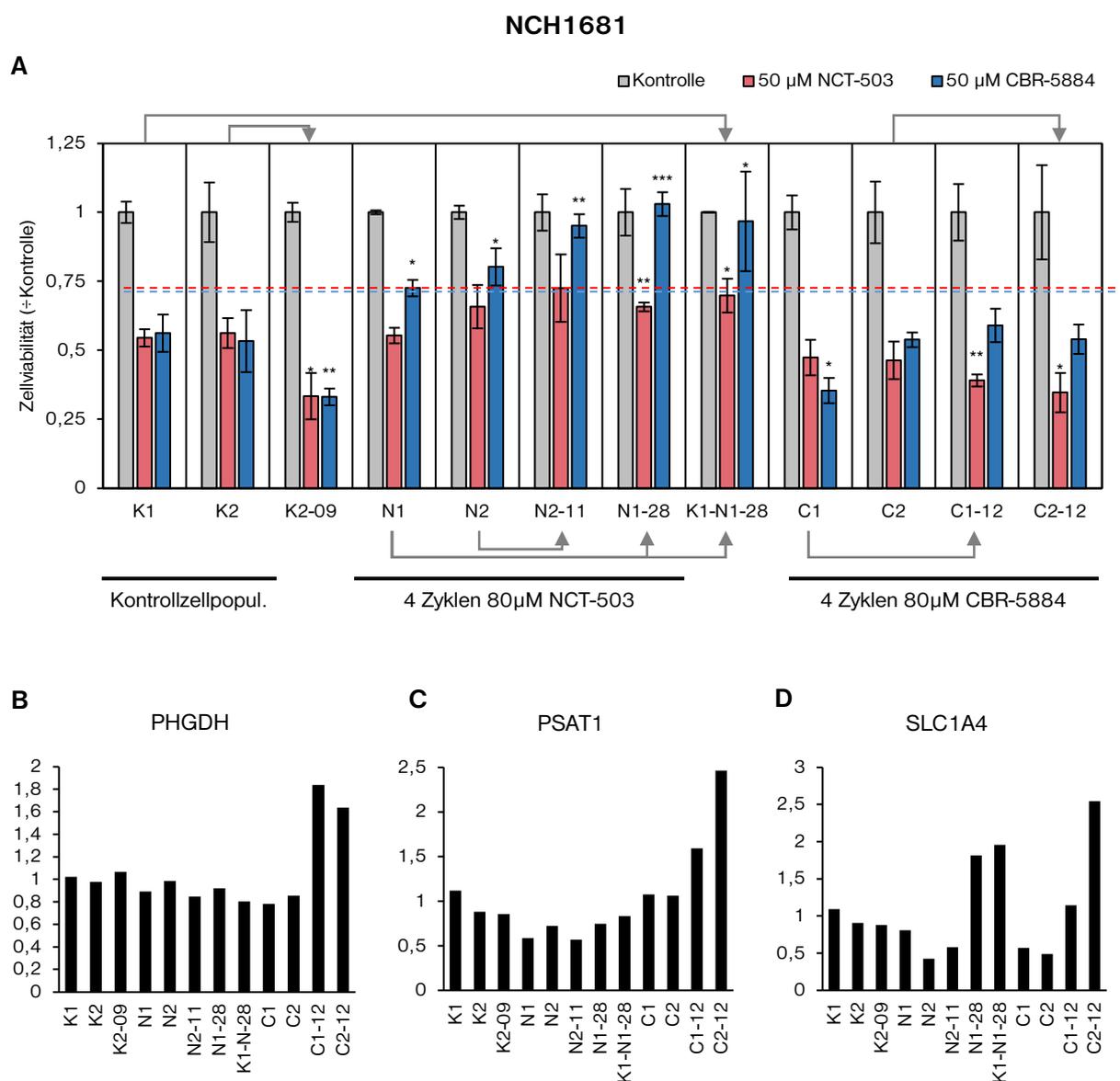


Abbildung 47 | Untersuchung von NCH1681-Klonen auf ihre Sensibilität gegenüber NCT-503 und CBR-5884, sowie auf deren PHGDH-, PSAT1- und SLC1A4-Expression. **A)** Relative Zellviabilität RGB-markierter NCH1681-Gesamtzellpopulationen und -Klonen (vgl. Abschnitte 3.4.2 und 3.4.3) als Dreifachbestimmungen eines ATP-basierten Zellviabilitäts-Assays, nach viertägiger Inkubation mit 50 µM NCT-503 oder 50 µM CBR-5884, verglichen mit unbehandelten Zellen. Signifikanzen wurden gegenüber den kombinierten Werten aus den Kontrollzellpopulationen K1 und K2 berechnet. Der Klon N2-11 zeigte bei der Behandlung mit NCT-503 verglichen mit Kontrollzellen eine erhöhte mittlere Zellviabilität, die jedoch nicht statistisch signifikant war ($p=0,1$; t-Test). Die Gesamtzellpopulationen N1 und N2, Die Klone K2-09, C1-12 und C2-12 zeigten eine signifikant verringerte Resistenz gegenüber NCT-503. Pfeile zeigen an, aus welchen Gesamtzellpopulationen die jeweiligen Klone isoliert wurden. (* $p<0,05$; ** $p<0,01$, t-Test) **B-D)** Densitometrische Quantifizierung von Western Blots der Proteine PHGDH, PSAT1 und SLC1A4 in NCH1681-Klonen, normalisiert gegen den Mittelwert der Kontrollansätze K1 und K2. PHGDH- und PSAT1-Niveaus waren in den Klonen C1-12 und C2-12 deutlich erhöht. Aufnahmen der Western Blots siehe Anhang.

3.4.4.2 Analyse potenziell behandlungsresistenter NCH644-Klone

Wie in Abbildung 48A zu erkennen ist, konnte bei den NCT-503-behandelten NCH644-Klonen N1-02 und N1-05 verglichen mit Kontrollzellpopulationen eine erhöhte Resistenz sowohl gegenüber NCT-503, als auch gegenüber CBR-5884 beobachtet werden. Allerdings zeigte die Gesamtzellpopulation N1, aus der diese Klone isoliert wurden, sowie das Duplikat dieses Ansatzes (N2) ebenfalls eine signifikant höhere Resistenz gegenüber NCT-503. Da in diesem Versuch nur dreifarbige Zellpopulationen betrachtet wurden, wäre es möglich, dass in der ein- oder zweifarbigem Zellpopulation der Gesamtzellpopulation N1 Klone zu finden sind, die höhere NCT-503-Resistenzen besitzen als die hier untersuchten Klone N1-02 und N1-05. Alternativ könnte auch die Interaktion zwischen Zellklonen in den Gesamtzellpopulationen deren Resistenz beeinflussen, sodass Klone geringere Resistenzen zeigen könnten, wenn sie einzeln vorliegen als im Verbund mit anderen Klonen. Zudem zeigte die Untersuchung des intrazellulären PHGDH-, PSAT1- und SLC1A4-Gehalts deutliche Unterschiede zwischen diesen Klonen und den Gesamtzellpopulationen N1 und N2. Während bei Zellen der Ansätze N1 und N2 analog zu den NCH1681-Klonen N1-28 und K2-N1-28 ausschließlich der SLC1A4-Gehalt erhöht war, wurde bei den NCH644-Klonen N1-02 und N1-05 stattdessen eine Zunahme des PHGDH- und PSAT1-Gehalts, sowie eine Abnahme des SLC1A4-Gehalts beobachtet. Dies bekräftigt wiederum die Annahme, dass sich ein Großteil der Zellen in den Ansätzen N1 und N2 insgesamt deutlich von den daraus isolierten Klonen unterscheiden.

Im Gegensatz zu den beobachteten Effekten bei NCH1681-Zellen konnte bei NCH644-Zellen eine signifikant erhöhte Resistenz der zuvor CBR-5884-behandelten NCH644-Gesamtzellpopulationen C1 und C2, sowie den daraus isolierten Klonen C1-03 und C2-18 gegenüber sowohl NCT-503 als auch CBR-5884 beobachtet werden. Anders als bei NCH1681-Zellen schien die wiederholte Gabe von CBR-5884 somit keine sensitivierende Wirkung auf NCH644-Zellen gegenüber NCT-503 oder CBR-5884 zu haben. Ähnlich wie bei den NCH1681-Klonen C1-12 und C2-12 konnte auch bei dem NCH644-Klon C2-18 gegenüber Kontrollzellen ein erhöhter PHGDH- und SLC1A4-Gehalt festgestellt werden. Der Klon C1-03 zeigte hingegen nur einen verringerten SLC1A4- und PSAT1-Gehalt. Zusammen mit der Tatsache, dass C2-18-Zellen gegenüber CBR-5884 eine deutlich höhere CBR-5884-Resistenz zeigte ist also davon auszugehen, dass diese Klone verschiedene Resistenzmechanismen besitzen.

Außerdem konnte im Rahmen dieses Versuches gezeigt werden, dass der Kontrollklon K2-C2-18 (vergleichbare Koordinaten wie C2-18), der aus der Kontroll-Gesamtpopulation K2 isoliert wurde, eine ähnlich erhöhte Resistenz gegenüber NCT-503 und CBR-5884 besitzt wie der Referenzklon C2-18. Somit konnte scheinbar trotz der geringen Reinheit des Zellisolates eine erfolgreiche Anreicherung dieses resistenten Klons aus der Ausgangszellpopulation erreicht werden, was zudem für die initiale Resistenz dieses Zellklons spricht. Allerdings konnten deutliche Unterschiede bei den intrazellulären Konzentrationen von PHGDH und SLC1A4 zwischen diesem Kontrollklon K2-C2-18 und dessen Referenzklon C2-18 festgestellt werden. Denn sowohl der PHGDH- als auch der SLC1A4-Gehalt war im Kontrollklon deutlich niedriger als bei C2-18. Dies könnte darauf hindeuten, dass es sich bei der Hochregulierung von PHGDH und SLC1A4 als Reaktion auf die wiederholte CBR-5884-Gabe lediglich

um eine metabolische Veränderung handelt, die für sich nicht ursächlich für die beobachtete Wirkstoffresistenz gegenüber NCT-503 und CBR-5884 ist.

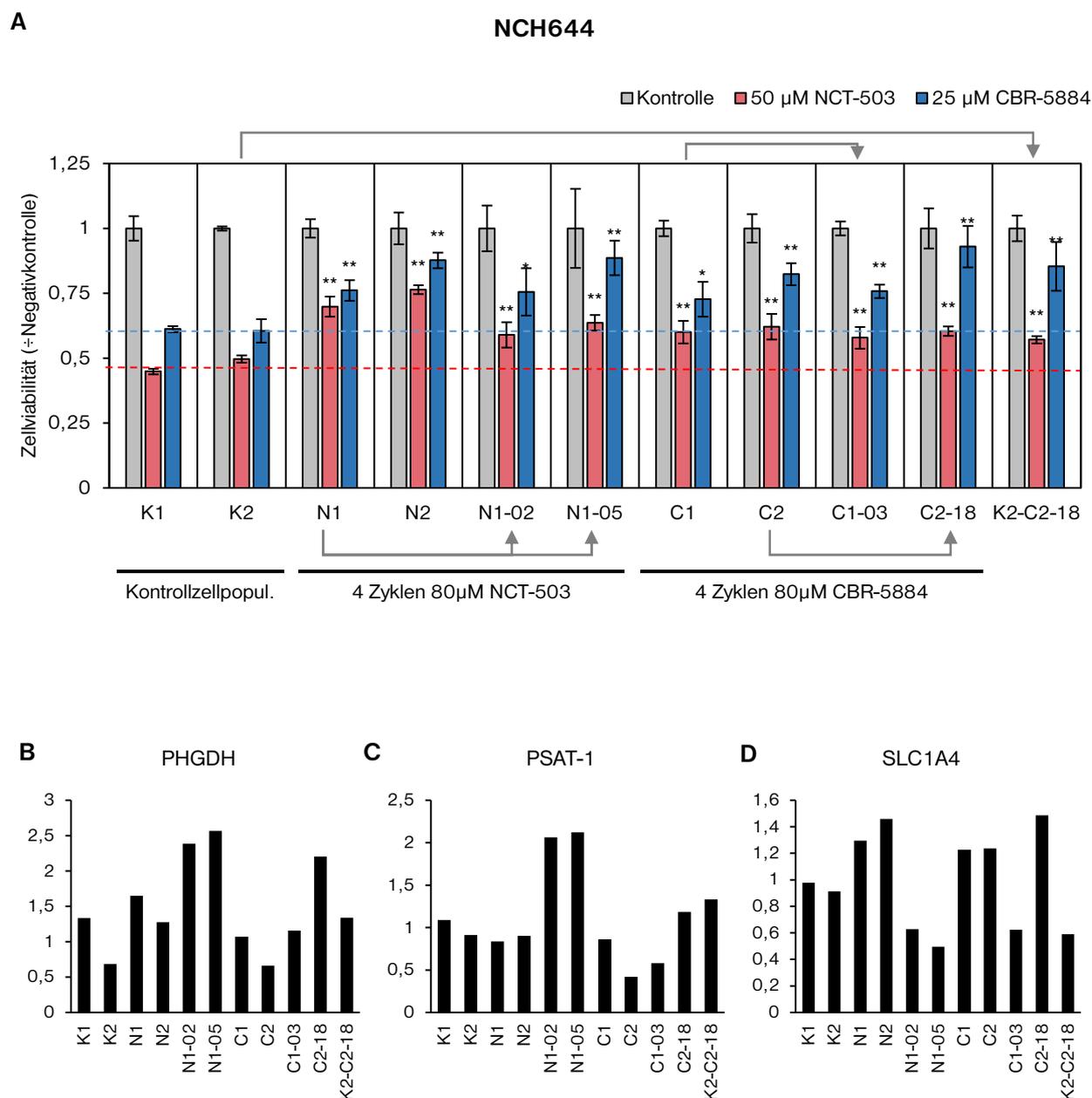


Abbildung 48 | Untersuchung von NCH644-Klonen auf ihre Sensibilität gegenüber NCT-503 und CBR-5884, sowie auf deren *PHGDH*, *PSAT1*- und *SLC1A4*-Expression. **A**) Relative Zellviabilität RGB-markierter NCH644-Gesamtzellpopulationen und -klone (vgl. Abschnitte 3.4.2 und 3.4.3) als Dreifachbestimmungen eines ATP-basierten Zellviabilitäts-Assays, nach viertägiger Inkubation mit 50 µM NCT-503 oder 25 µM CBR-5884, verglichen mit unbehandelten Zellen. Signifikanzen wurden gegenüber den kombinierten Werten aus den Kontrollzellpopulationen K1 und K2 berechnet. Pfeile zeigen an, aus welchen Gesamtzellpopulationen die jeweiligen Klone isoliert wurden. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, t-Test). **B-D**) Densitometrische Quantifizierung von Western Blots der Proteine PHGDH, PSAT1 und SLC1A4 in NCH1681-Klonen, normalisiert gegen den Mittelwert der Kontrollansätze K1 und K2. Aufnahmen der Western Blots siehe Anhang.

3.5 Entwicklung und Testung eines Verfahrens zur prospektiven Analyse definierter Zellklone

Die zuvor vorgestellte Methodik ermöglichte nach Ausübung eines Selektionsdrucks auf markierte Zellpopulationen eine retrospektive Identifizierung therapieresistenter Zellklone, ließ im Zuge dessen allerdings keine prospektive Untersuchung einzelner (auch nicht-resistenter) Zellklone zu. Es kann daher mit dieser Methode keine exakte Bestimmung der klonalen Zusammensetzung von Tumoren und Zellpopulationen erreicht werden und es können keine Informationen über den relativen Anteil resistenter Zellklone in der Ausgangszellpopulation gewonnen werden. Bei einer prospektiven Analyse einzelner Klone wäre es möglich, die Frequenzen zu bestimmen, mit denen diese Resistenzen auftreten, sodass der Fokus bei der Erforschung solcher Resistenzen zunächst auf die Antagonisierung häufig vorkommender Resistenzmechanismen gelegt werden könnte. Die Sortierung von Einzelzellklonen per FACS ist aufgrund der geringen Ausbeute anwachsender Zellklone wenig effizient (vgl. Abschnitt 3.3.9) und ist durch die separate Kultivierung aller Zellklone aufwendig. Als Alternative hierzu wurde deshalb auf Basis der vorgestellten Techniken ein System entwickelt, das nicht auf die Sortierung und Expansion von Einzelzellen angewiesen ist und stattdessen die simultane Analyse weniger, einzelner Zellklone im selben Ansatz ermöglicht. Anstatt einzelne Zellklone zu sortieren, sollten durch die Sortierung mehrerer Zellklone pro Ansatz (per FACS) Cokulturen von wenigen, unterscheidbaren Zellklonen generiert werden („RGB-Oligoklon-Kulturen“: OLC), die parallel quantifiziert werden können. Solche Zellpopulationen sollten einer Behandlung unterzogen und anschließend durchflusszytometrisch untersucht werden. Die Veränderung der quantitativen Anteile verschiedener Klone an der Gesamtzellpopulation und relativ zu Kontrollansätzen könnte dann darüber Auskunft geben, welche Klone während der Behandlung einen Wachstumsvorteil (oder -Nachteil) haben und somit eine erhöhte (oder verringerte) Resistenz aufweisen.

3.5.1 Herstellung von RGB-Oligoklonen zur effizienten quantitativen Generierung differenzierbarer Zellklone

Durch die Sortierung von je 100 (dreifarbigen) RGB-markierten NCH1681-Zellen pro Well in 20 Wells einer 96-well Zellkulturplatte per FACS konnten 20 RGB-Oligoklon-Kulturen generiert werden (Abb. 49). Dabei wurde in jedem der ausgesäten Wells Zellwachstum beobachtet und pro Well konnten nach Expansion und durchflusszytometrischer Analyse der Kulturen etwa 3-7 Klone identifiziert werden. Gegenüber der Generierung von Einzelklonen durch die Einzelzellsortierung per FACS (~1 Klon pro 40 Wells, vgl. Abschnitt 3.3.9) bedeutete dies im Schnitt eine Steigerung der Effizienz für die Herstellung von Zellklonen um etwa das 12-fache.

3.5.2 Simultane Analyse der Sensitivitäten verschiedener Klone eines RGB-Oligoklons gegenüber NCT-503 und CBR-5884

Um die simultane Analyse der Sensitivität mehrerer Klone gegenüber NCT-503 und CBR-5884 im gleichen Ansatz zu testen, wurde die Oligoklon-Kultur NCH1681-OLC-14 parallel in Duplikaten mit 80 μM NCT-503, 80 μM CBR-5884 oder Vollmedium (Kontrolle) versetzt. An Tag 4 wurde das Medium gewechselt und sobald genügend Zellen für eine Analyse vorhanden waren, wurden die Ansätze

durchflusszytometrisch untersucht. Die Ansätze, die mit Vollmedium oder CBR-5884 behandelt wurden, konnten bereits 4 Tage nach dem Mediumwechsel gemessen werden. Zellen, die mit NCT-503 behandelt wurden, konnten erst 8 Tage später analysiert werden.

Die quantitative Analyse der Klone in NCH1681-OLC-14 zeigte hierbei Veränderungen der klonalen Dynamik bei verschiedenen Behandlungen, die konstant in beiden Duplikaten beobachtet werden konnten (Abb. 50). Zunächst konnte nachgewiesen werden, dass der Anteil von Klon 4 bei beiden CBR-5884-behandelten Ansätzen gegenüber den Kontrollen und NCT-503-behandelten Zellen um 41-46% verringert war. Dies spricht dafür, dass Klon 4 eine erhöhte Sensitivität gegenüber CBR-5884 besitzt. Andersherum stieg der Anteil von Klon 2 nach der Behandlung mit NCT-503 Zellen in beiden Ansätzen im Vergleich zu den anderen Ansätzen um 35-56% erhöht war, was auf eine erhöhte Resistenz dieses Klons gegenüber NCT-503 hinweist. Zudem konnten auch in diesem Versuch keine Gemeinsamkeiten zwischen Ansätzen gefunden werden, die mit NCT-503 und CBR-5884 behandelt wurden.

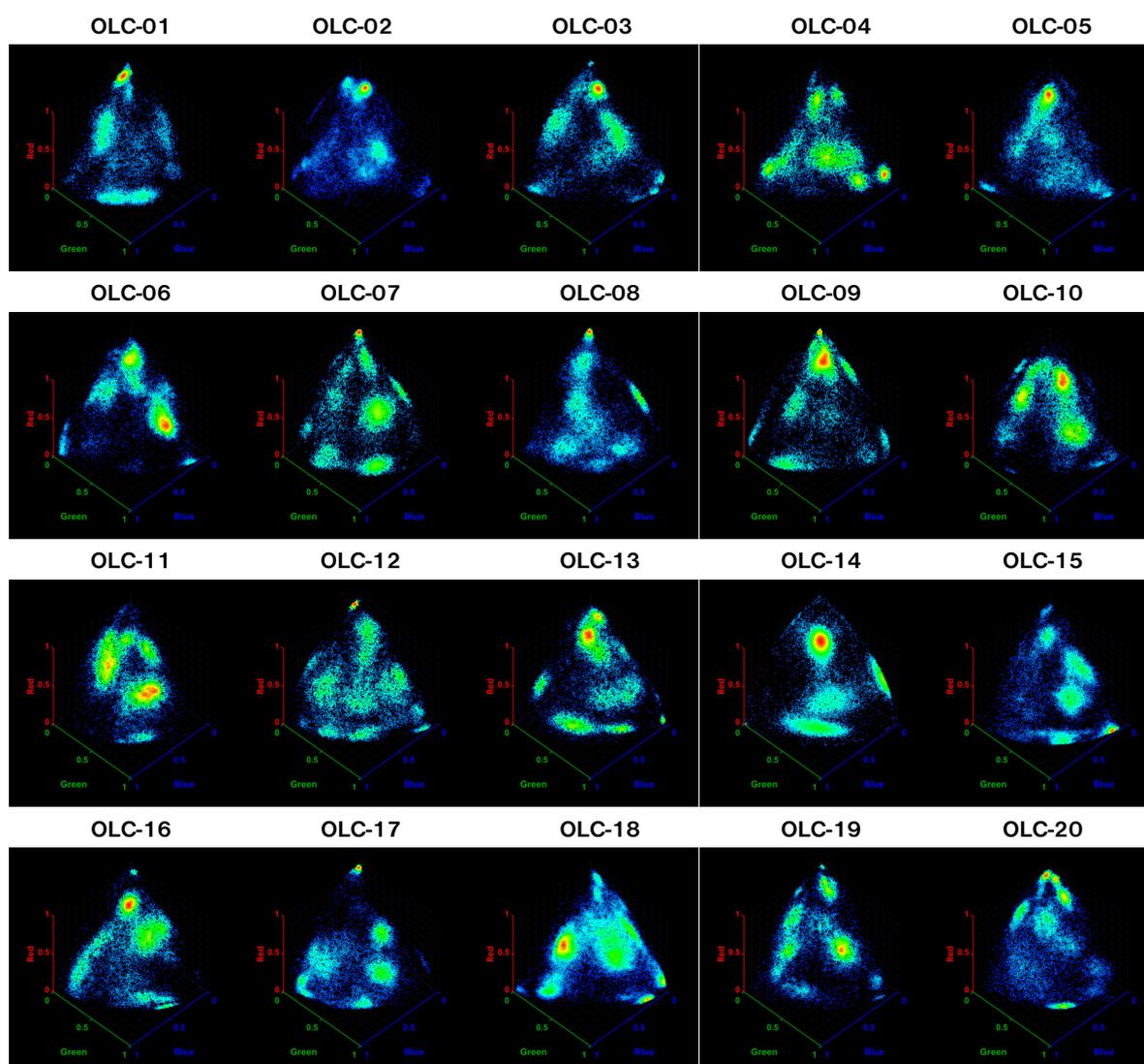
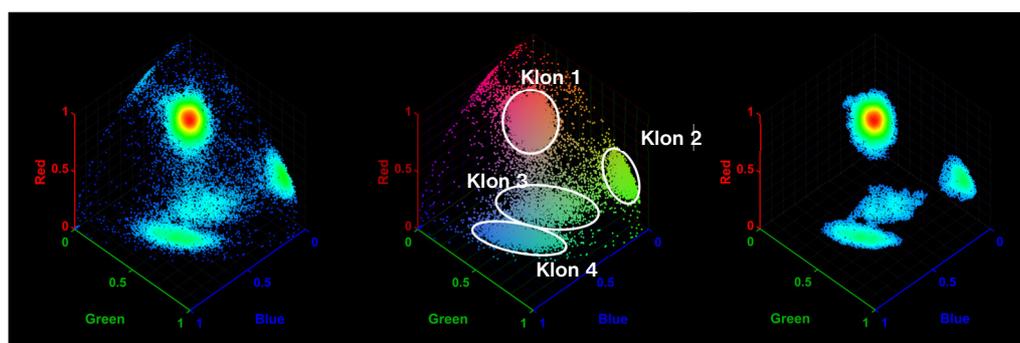
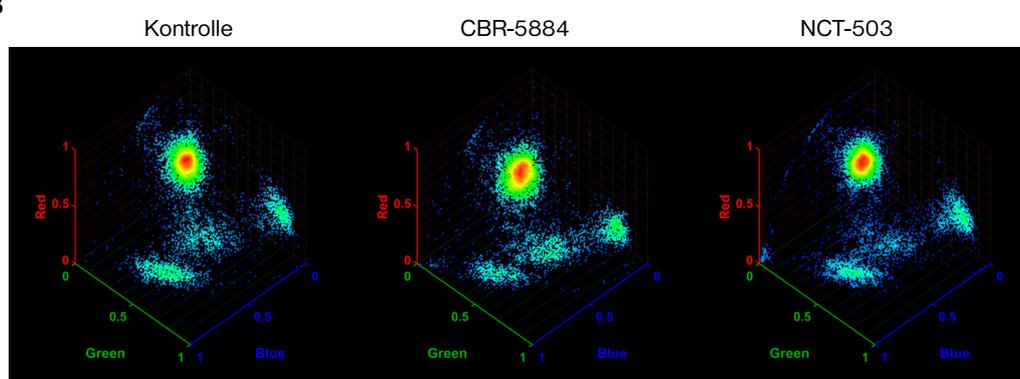


Abbildung 49 | Überprüfung der klonalen Zusammensetzung der aus RGB-markierten NCH1681-Zellen erzeugten RGB-Oligoklon-Kulturen NCH1681-OLC-01 bis NCH1681-OLC-20. Zur Generierung von RGB-Oligoklonen wurden je 100 dreifarbig markierte NCH1681-RGB-Zellen pro Well per FACS in eine 96-Well-Zellkulturplatte sortiert und expandiert. Gezeigt sind Datensätze von 20 expandierten Oligoklon-Kulturen als sphärische Scatterplots. Dabei konnten pro Oligoklon-Kultur im Mittel 6 (4-10) und insgesamt 124 unterscheidbare Klone identifiziert werden.

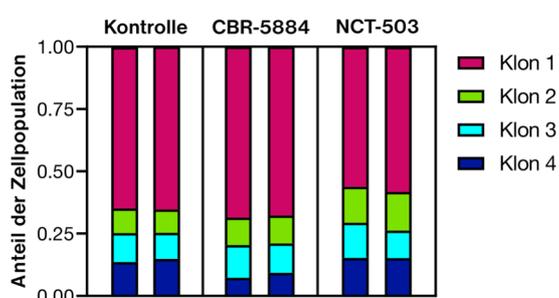
A



B



C



D

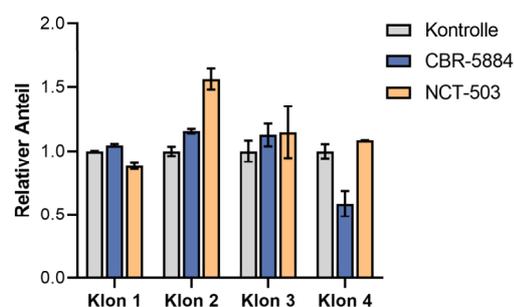


Abbildung 50 | Identifikation wirkstoffresistenter und -sensitiver Klone auf Basis der Veränderung der klonalen Komposition der RGB-Oligoklon-Kultur NCH1681-OLC-14 unter Einfluss von NCT-503 und CBR-5884. NCH1681-OLC-14-Zellen wurden mit 80 μ M NCT-503, CBR-5884 oder ohne Inhibitor für 4 Tage inkubiert, worauf ein Mediumwechsel folgte. Für eine anschließende durchflusszytometrische Messung der Zellpopulationen wurde bis zum Wachstum einer ausreichenden Anzahl von Zellen gewartet. **A)** Darstellung durchflusszytometrischer Daten der Oligoklon-Kultur NCH1681-OLC-14 als sphärische Scatterplots, mit Bezeichnungen der entsprechenden Klone (rechts: Hintergrund-reduzierte Daten). **B)** Sphärische Scatterplots durchflusszytometrischer Daten der Zellpopulationen der Oligoklon-Kultur NCH1681-OLC-14 nach Behandlung mit CBR-5884 und NCT-503. **C)** Klonale Verteilungen von 4 verschiedenen Klone nach Behandlung jeweils zweier paralleler Ansätze mit NCT-503 und CBR-5884, verglichen mit nicht-behandelten Kontrollzellen. Die Quantifizierung der Klone wurde mit ChromoClone durchgeführt. **C)** Daten aus B, dargestellt als relative Anteile der jeweiligen Klone, normalisiert zu den Kontrollansätzen. Für Klon 2 konnte eine deutliche Expansion in NCT-503-behandelten Ansätzen beobachtet werden. Klon 4 zeigte hingegen ein verringertes Wachstum unter Einfluss von CBR-5884.

4 DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit verfolgte zwei Hauptziele. Eines dieser Ziele bestand in der Untersuchung des Serinsyntheseweges als potenzielles Ziel zur Therapie von Gliomen. Dabei sollte insbesondere untersucht werden, wie sich die Inhibition von PHGDH mit den niedermolekularen Inhibitoren NCT-503 und CBR-5884 auf das Wachstum von Gliomzellen auswirkt. Außerdem sollte ermittelt werden, inwiefern sich beide Inhibitoren in ihrer Wirkweise voneinander unterscheiden und von welchen Faktoren ihre Wirkung abhängt. Im Zuge dessen sollte ebenfalls untersucht werden, ob der Serintransporter SLC1A4 eine Rolle bei der Vermittlung von Resistenzen gegen die gezielte Serinsynthese-Inhibition spielen könnte.

Das zweite Ziel bestand in der Entwicklung und Testung neuer Verfahren und Metriken zur Untersuchung von intratumoraler Heterogenität und zur Identifizierung und Isolierung therapieresistenter Zellklone mittels RGB-Marking. Hiermit sollte eine Methodik zur Identifikation und Isolation behandlungsresistenter Zellklone erstellt werden, die – nach detaillierter Analyse dieser Klone und der Identifizierung von Vulnerabilitäten – zur Antagonisierung dieser Zellklone und der Erhöhung der Effektivität vorhandener Therapien beitragen sollte. Die Identifizierung und Isolierung therapieresistenter Zellklone sollte anschließend am Beispiel der gezielten Therapie des Serinsyntheseweges mittels PHGDH-Inhibition durch NCT-503 und CBR-5884 getestet werden. Aufgrund des Fehlens passender Software-Lösungen zur Durchführung dieser Analysen wurde die Zielsetzung um die Entwicklung einer umfangreichen Software zur Analyse durchflusszytometrischer Datensätze RGB-markierter Zellpopulationen mit den hier entwickelten Analyseverfahren erweitert.

4.1 Einfluss der PHGDH-Inhibition auf das Wachstum von Gliomzellen

Zunächst wurde die Wirkung der PHGDH-Inhibition, und der damit verursachten Hemmung des Serinsyntheseweges, auf insgesamt 9 verschiedene Gliomzelllinien untersucht. Hierfür wurden die beiden PHGDH-Inhibitoren NCT-503 und CBR-5884 eingesetzt, die beide separat bereits in verschiedenen Studien zur Inhibition des Serinsyntheseweges Verwendung fanden^{100,124,126,127,131,189,190}. Es wurde ein detaillierter Vergleich der Wirkungsweisen dieser Inhibitoren in Gliomzellen durchgeführt und dabei wurden mögliche Unterschiede anhand von Dosis-Wirkungs-Kurven, ROS-Messungen und der versuchten Antagonisierung der Inhibitoren mittels GSH, NAC und dm- α KG bestimmt. Hierbei wurde auch die Rolle der Proteinniveaus von PHGDH, PSAT1 und SLC1A4 in Bezug auf die Effektivität der Inhibitoren untersucht. Ein weiterer Fokus lag auf der Frage, ob IDH1-mutierte Gliomzellen aufgrund ihres beeinträchtigten Metabolismus eine besondere Vulnerabilität gegenüber der PHGDH-Inhibition besitzen.

4.1.1 Wachstumsinhibitorische Wirkung von NCT-503 und CBR-5884 auf Gliomzellen

Bei der Untersuchung der wachstumsinhibierenden Wirkung der PHGDH-Inhibitoren NCT-503 und CBR-5884 konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der Serinsynthese, sowohl durch NCT-503 als auch CBR-5884 bei den untersuchten Gliomzelllinien zu einer deutlichen, dosisabhängigen Wachstumsinhibition führte. Diese Beobachtung steht im Einklang mit einer kürzlich erschienen Studie von Engel et al., in der anhand von drei Glioblastomzelllinien gezeigt wurde, dass die CBR-5884-vermittelte PHGDH-Inhibition, genauso wie der shRNA-vermittelte PHGDH-Knock-Down, zu einer Dysregulierung der Redoxhomöostase in Glioblastomzellen und zu einem erhöhten Hypoxie-induzierten Zelltod führte¹²⁷. Im Zuge dieser Studie wurde geschlossen, dass Serin die Adaption von Glioblastomzellen an die Tumor-Mikroumgebung erleichtert und daher das Überleben der Zellen vor allem unter Hypoxie begünstigt. In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass die Serinsynthese ein potenzielles Target zur gezielten Therapie von Glioblastomen darstellt. Ergänzend zur Studie von Engel et al. konnte zudem der wachstumsinhibierende Effekt der PHGDH-Inhibition auch mittels NCT-503 sowie an einer weitaus höheren Anzahl von Gliomzelllinien (8 Glioblastomzelllinien, 1 WHO-Grad III Astrozytomzelllinie) nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurden die verwendeten Glioblastomzelllinien im Gegensatz zur Studie von Engel et al. unter Serum-freien Wachstumsbedingungen kultiviert und stellen daher wesentlich bessere Modellzelllinien zur Untersuchung von Glioblastomen dar¹⁹¹.

Die EC_{50} -Werte für NCT-503 lagen bei den untersuchten Gliomzelllinien in der vorliegenden Arbeit bei 18 – 77 μ M und damit in einer ähnlichen Größenordnung wie die EC_{50} -Werte in einer Studie von Pacold et al., in der bei verschiedenen Mammakarzinomzelllinien nach 4-tägiger Inkubation EC_{50} -Werte von 8 bis >100 μ M gemessen wurden. In dieser Studie lagen die EC_{50} -Werte sensitiver Zelllinien bei 8 – 16 μ M und damit im Bereich der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Glioblastomzelllinien GS-86 (~18 μ M) und NCH1681 (~21 μ M). Es ist jedoch zu erwarten, dass unter Verwendung von Serin-defizientem Medium, wie in der Studie von Pacold et al., eine noch höhere Effektivität dieses Inhibitors bei Gliomzellen

erreicht werden könnte. In einer kürzlich publizierten Studie von Elsaadi et al. wurden bei multiplen Myelomzelllinien bereits nach 24-stündiger Inkubation EC_{50} -Werte von 7 – 26 μM für NCT-503 bestimmt, womit die dort untersuchten Myelomzellen deutlich sensitiver gegenüber NCT-503 waren als die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gliomzelllinien¹²⁶. Ähnliches konnte in derselben Studie für CBR-5884 beobachtet werden. Nach 24-stündiger Inkubation wurden dort EC_{50} -Werte von 2 – 35 μM gemessen, während die in der vorliegenden Arbeit ermittelten EC_{50} -Werte für Gliomzellen nach 4-tägiger Inkubation bei 14 – 63 μM lagen.

Beim Vergleich der Effektivität beider Inhibitoren auf die untersuchten Gliomzelllinien konnten zudem in der vorliegenden Arbeit einige wichtige Beobachtungen gemacht werden. Zunächst gab es signifikante Unterschiede der Effektivität der Inhibitoren zwischen den verschiedenen Gliomzelllinien. Dies wurde erwartet, da bekannt ist, dass einige Zelllinien mehr auf die *de novo*-Serinsynthese angewiesen sind als andere^{98,100,117,126,131}. Bei einer höheren Sensitivität gegenüber NCT-503 und CBR-5884 wurde daher zunächst mit einer erhöhten Abhängigkeit der jeweiligen Gliomzelllinie von der *de novo*-Serinsynthese gerechnet. Allerdings konnte weiter festgestellt werden, dass die Effektivität beider Inhibitoren bei unterschiedlichen Gliomzelllinien nicht korrelierte, obwohl beide Wirkstoffe spezifisch PHGDH hemmen, und somit dieselbe Wirkung entfalten sollten. Stattdessen zeigten viele der untersuchten Zelllinien eine hohe Sensitivität gegenüber einem Inhibitor und eine geringe Sensitivität gegenüber dem jeweils anderen. Dieser Umstand allein lässt bereits den Verdacht zu, dass sich beide Inhibitoren grundsätzlich in ihrer Wirkweise, bzw. in ihren unspezifischen Nebenwirkungen unterscheiden. In der Tat ist bereits bekannt, dass CBR-5884 die Oligomerisierung von PHGDH verhindert, während NCT-503 zur Destabilisierung und zu einer Verringerung der Schmelztemperatur von PHGDH führt^{100,131}. Über die Implikationen dieser unterschiedlichen Mechanismen für die Effektivität und mögliche Off-Target-Effekte dieser Inhibitoren ist jedoch wenig bekannt. Ein Vergleich dieser beiden Inhibitoren wurde bislang nur in der bereits erwähnten Studie von Elsaadi et al. an multiplen Myelomzellen durchgeführt und auch hier wurden, ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit, erhebliche Diskrepanzen in der Wirkung von NCT-503 und CBR-5884 bei verschiedenen Zelllinien festgestellt¹²⁶. In dieser Studie konnte durch NCT-503, nicht jedoch CBR-5884, der potenzierende Effekt eines PHGDH-Knock-Downs auf die Wirkung des Zytostatikums Bortezomib repliziert werden, was darauf hindeutet, dass der Effekt von NCT-503 im Gegensatz zu CBR-5884 auf einer spezifischen PHGDH-Inhibition beruht. Zudem zeigte hier die Wirksamkeit beider Inhibitoren an primären Tumorzellen und mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) signifikante Unterschiede bei NCT-503, während die Wirksamkeit von CBR-5884 unabhängig vom Zelltyp größtenteils gleichblieb. Da jedoch generell erwartet wird, dass verschiedene Zelltypen unterschiedlich stark von der Serinsynthese abhängig sind, deutet die Tatsache, dass die Wirksamkeit von CBR-5884 bei den meisten Zelltypen ähnlich war, ebenfalls darauf hin, dass die Wirkung dieses Inhibitors mit signifikanten unspezifischen Nebeneffekten einhergeht. Außerdem sprechen die in der vorliegenden Arbeit ermittelten, im Mittel flacher ausfallenden Dosis-Wirkungs-Kurven für NCT-503 gegenüber CBR-5884 für eine bessere Dosierbarkeit dieses Inhibitors, was gepaart mit seiner Verträglichkeit und besseren Halbwertszeit *in vivo*^{100,131} eher für die Verwendung von NCT-503 statt CBR-5884 spricht.

Im Gegensatz zu anderen Studien, wie der erwähnten Studie von Pacold et al.,^{98,100,101,127} konnte außerdem keine direkte Korrelation zwischen dem PHGDH-Gehalt und der Sensitivität der Tumorzellen gegenüber der PHGDH-Inhibition durch NCT-503 oder CBR-5884 nachgewiesen werden. Dies deckt sich wiederum mit der Studie von Elsaadi et al., in der das zelluläre PHGDH-Niveau mehrerer multipler Myelomzelllinien ebenfalls nicht mit der Wirksamkeit dieser beiden Inhibitoren korrelierte¹²⁶. Ein Grund hierfür könnte sein, dass im Gegensatz zum Beispiel zu der Studie von Pacold et al., im Rahmen der vorliegenden Arbeit und in Teilen der Studie von Elsaadi et al. mit Serin-haltigem statt Serin-defizientem Medium gearbeitet wurde, da dies im Vergleich eine bessere Repräsentation der Mikroumgebung im Patienten darstellt. Zudem war bereits aus einer Studie von Mullarky et al., in der erstmals die CBR-5884-vermittelte PHGDH-Inhibition bei Mammakarzinomzelllinien beschrieben wurde, bekannt, dass einige Zelllinien mehr auf den Serinimport als auf die *de novo*-Serinsynthese angewiesen sind¹³¹. Eine Verhinderung des Serin-Imports durch den Entzug von Serin aus dem Medium könnte somit eine künstliche Abhängigkeit vom Serinsyntheseweg erzeugen und würde daher nicht die tatsächliche Vulnerabilität einer Serinsynthese-Inhibition bei diesen Zellen unter physiologischen Bedingungen abbilden.

Bislang wurde die Bedeutung von Serintransportern wie SLC1A4 in Studien zur Bedeutung des Serinsyntheseweges in Gliomen nicht näher erforscht, da in diesem Zusammenhang vermutet wurde, dass die Serinkonzentration im Gehirn nicht hoch genug ist, als dass extrazelluläres Serin hier eine bedeutende Rolle spielen könnte¹⁹². Es ist jedoch zu beachten, dass die Integrität der Blut-Hirn-Schranke bei Glioblastomen stark beeinträchtigt ist^{52,193}. Ein Transfer niedermolekularer Stoffe wie Serin aus dem Blut, gerade bei Vorhandensein entsprechender Transporter, ist im Tumor also möglich und wahrscheinlich. Dies sollte auch bei der Untersuchung anderer Tumorentitäten beachtet werden, bei denen eine bessere Versorgung mit extrazellulärem Serin gewährleistet ist. Zum Beispiel wurden einige Studien über die Wirkung von NCT-503 und CBR-5884 an Brustkarzinomzelllinien durchgeführt, ohne dabei die Rolle von Serintransportern wie SLC1A4 beim Import von extrazellulärem Serin zu berücksichtigen. Angesichts der in der vorliegenden Arbeit präsentierten Daten sollte dieser Aspekt daher auch bei solchen Tumorentitäten evaluiert werden.

Letztlich konnte eine Korrelation zwischen dem zellulären Gehalt des Serintransporters SLC1A4 und der Sensitivität gegenüber CBR-5884, nicht jedoch NCT-503, beobachtet werden, wofür es mehrere mögliche Erklärungen gibt. Einerseits könnte es sein, dass SLC1A4 während der CBR-5884-vermittelten PHGDH-Inhibition maßgeblich an der Umgehung der *de novo*-Serinsynthese durch den Import von extrazellulärem Serin beteiligt ist. Dies würde darauf hinweisen, dass CBR-5884 eine spezifischere PHGDH-Inhibition vermittelt als NCT-503 und damit das Wachstum von Zellen mit höherem basalem SLC1A4-Niveau begünstigt, da diese eine PHGDH-Inhibition mit einem erhöhten SLC1A4-vermittelten Serininflux kompensieren können. Andererseits wäre es aber auch möglich, dass durch den erhöhten Import von Serin unspezifische Wirkungen durch CBR-5884 kompensiert werden, die keine direkte Folge der PHGDH-Inhibition sind, wie zum Beispiel eine erhöhte ROS-Produktion. Es wäre daher auch möglich, dass das basale SLC1A4-Niveau dieser Zelllinien zur Kompensierung der NCT-503-vermittelten Inhibition der Serinsynthese ohnehin nicht ausreicht und die Kapazität dieser Zellen, SLC1A4

hochzuregulieren eine größere Rolle spielt als ihr initiales SLC1A4-Niveau. Auf Basis der vorliegenden Ergebnisse sind jedoch bei CBR-5884 erhöhte unspezifische Nebeneffekte zu erwarten, weshalb die zweite Hypothese wahrscheinlicher ist.

Eine weitere wichtige Beobachtung in Bezug auf die unterschiedliche Wirkweise von NCT-503 und CBR-5884 ist die Tatsache, dass CBR-5884, nicht jedoch NCT-503, eine erhöhte Wirkung bei schnell proliferierenden Zelllinien zeigte. Da in keiner der bislang bekannten Studien zu CBR-5884 oder NCT-503 die Proliferationsrate der untersuchten Zelllinien bestimmt wurde, gibt es hierzu keine Vergleichsdaten. Andere Studien an Glioblastomzellen zeigten jedoch bereits, dass schnell wachsende Glioblastomzellen eine allgemein höhere Sensitivität gegenüber Wachstumsinhibition beispielsweise durch Hypoxie oder Strahlentherapie besitzen. So zeigte eine Studie von Steinbach et al., dass die Behandlung von Glioblastomzellen mit EGFR-Inhibitoren diese Zellen vor dem Hypoxie-induzierten Zelltod schützte, obwohl die EGFR-Inhibition unter Normoxie wachstumsinhibierend auf diese Zellen wirkt¹⁹⁴. Hier wurde vermutet, dass die EGFR-Inhibition und die damit induzierte Verringerung des metabolischen Flusses bei Glioblastomzellen unter anderem den durch Hypoxie ausgelösten ATP-Verlust länger hinauszögert und damit das Überleben der Zellen verlängert. Weiter wurde in einer Studie von Bao et al. gezeigt, dass langsam wachsende Subpopulationen innerhalb von Glioblastomzellkulturen eine erhöhte Resistenz gegenüber Strahlentherapie besitzen. Beide Studien weisen somit auf eine erhöhte Sensitivität schnell proliferierender Tumorzellen gegenüber wachstumsinhibierenden Effekten hin, was in der vorliegenden Arbeit an CBR-5884 bestätigt werden konnte. Es ist allerdings zu erwarten, dass dieser Effekt vor allem bei unspezifischen wachstumsinhibierenden Therapien auftritt, da die metabolischen Besonderheiten von Zelllinien hierbei keine größere Rolle spielen. Die fehlende Korrelation zwischen dem wachstumsinhibierenden Effekt von NCT-503 und der Proliferationsrate der Gliomzelllinien könnte daher auch ein Indikator dafür sein, dass NCT-503 weniger unspezifische Nebeneffekte zeigt als CBR-5884.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass sich PHGDH grundsätzlich als Target für die gezielte Therapie von Gliomen eignet. Durch den direkten Vergleich der Inhibitoren NCT-503 und CBR-5884 konnte demonstriert werden, dass sich die Wirkung dieser Inhibitoren deutlich unterscheidet und vor allem bei CBR-5884 mit signifikanten Off-Target-Effekten gerechnet werden sollte. Dies bedeutet in Bezug auf die vorhandene Literatur, dass Studien, die mit nur einem der beiden Inhibitoren, vor allem jedoch CBR-5884 durchgeführt wurden, nicht generalisierbar sind und reevaluiert werden sollten.

4.1.2 Veränderung der Expression von PHGDH, PSAT1 und SLC1A4 durch die PHGDH-Inhibition mit NCT-503 und CBR-5884

Um zu untersuchen, wie sich die Expression von *PHGDH*, *PSAT1* und *SLC1A4* während der PHGDH-Inhibition mit NCT-503 und CBR-5884 in Gliomzellen verändert, wurde die Konzentration dieser Proteine über einen Zeitraum von insgesamt 4 Tagen nach Zugabe von 50 μ M NCT-503 oder CBR-5884 zu NCH644-Zellen per Western Blotting gemessen.

Dabei wurde beobachtet, dass sich die Expression von *PHGDH*, *PSAT1* und *SLC1A4* bei Inkubation mit beiden Inhibitoren bei den untersuchten Gliomzellen in unterschiedlichem Maße veränderte. So führte

die Gabe von NCT-503 zu einer Hochregulierung der Expression von *PHGDH*, die nach 24 Stunden ihr Maximum erreichte und über die nächsten Tage langsam abfiel. Diese Hochregulierung spricht für eine spezifische *PHGDH*-Inhibition von NCT-503, da dieser Effekt mit einer Rückkopplung zu erklären sein könnte, wie sie häufig in metabolischen Wegen von Zellen zu finden ist (Feedback-Inhibition)^{195,196}. Dabei könnte beispielsweise durch die verringerte Leistungsfähigkeit von inhibiertem *PHGDH* und des damit verbundenen Abfalls der Konzentrationen der Produkte des Serinsyntheseweges eine Hochregulierung von *PHGDH* verursacht werden, um diesen unzureichenden Metabolismus zu kompensieren. Der *PSAT1*-Gehalt zeigte bei einer Inhibition mit NCT-503 zunächst eine Verringerung, bevor er nach 24 Stunden den Ausgangswert erreichte und über die nächsten 2 Tage stark zunahm. Dies könnte damit erklärt werden, dass die Konzentration des *PSAT1*-Eduktes, 3PHP, zunächst abfällt und daher nur wenig *PSAT1* zur Prozessierung dieser geringen Konzentrationen benötigt wird. Auf die starke Erhöhung der *PHGDH*-Konzentration nach 24 Stunden und die damit Verbundene Erhöhung der 3PHP-Produktion, folgt anschließend eine rapide Erhöhung der *PSAT1*-Produktion, welche für eine ausreichende enzymatische Umwandlung des nun in großen Mengen produzierten Eduktes benötigt wird. Zusätzlich dazu führte die Zugabe von NCT-503 zu einer langsamen und stetigen Erhöhung der *SLC1A4*-Konzentration über den gesamten Versuchsverlauf. Dies deckt sich mit der initialen Hypothese, dass *SLC1A4* eine Rolle bei der Kompensierung einer Inhibition der Serinsynthese spielt. Insofern kann davon ausgegangen werden, dass die vermehrte Produktion von *SLC1A4* zu einer erhöhten Aufnahme von Serin aus dem extrazellulären Raum führt und die Blockade des Serinsyntheseweges so umgangen werden kann.

Für CBR-5884 verlief die Entwicklung der Proteinkonzentrationen von *PHGDH*, *PSAT1* und *SLC1A4* deutlich anders, was erneut die Differenzen in der Wirkweise beider Inhibitoren hervorhebt. Hier konnte nach Zugabe von CBR-5884 eine Verringerung der *PHGDH*- und *PSAT1*-Konzentrationen beobachtet werden, wobei die Werte zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Versuches nicht wesentlich variierten. Dies spricht eher dafür, dass die *PHGDH*-Inhibition alleine nicht ursächlich für die Wachstumsinhibition war, da in diesem Fall eine Erhöhung der *PHGDH*-Expression erwartet worden wäre. Es kam allerdings schnell zu einer wesentlichen Erhöhung des *SLC1A4*-Gehalts, durch die die Inhibition der Serinsynthese vermutlich ausgeglichen werden konnte.

Zusammenfassend deutet die Veränderung der Expression von *PHGDH*, *PSAT1* und *SLC1A4* nach Zugabe von NCT-503 und CBR-5884, besonders aufgrund der beobachteten *PHGDH*-Expression darauf hin, dass die Wirkung von NCT-503 im Gegensatz zu CBR-5884 in Gliomzellen auf die *PHGDH*-Inhibition selbst und nicht auf unspezifische Nebeneffekte zurückzuführen ist. Wie bereits im vorigen Abschnitt erwähnt wurde, lassen auch die Ergebnisse dieses Versuches vermuten, dass bei der Verwendung von CBR-5884 signifikante Off-Target-Effekte auftreten, die eine zytotoxische Wirkung hervorrufen. Zudem konnte in diesem Versuch die Annahme bestätigt werden, dass *SLC1A4* ein weiteres vielversprechendes Target zur gezielten Blockierung des Serinmetabolismus bei Gliomzellen darstellt.

4.1.3 Effekt des Knock-Downs von PHGDH und PSAT1 auf NCH644-Zellen

Als Alternative zur Verwendung niedermolekularer Inhibitoren zur Blockierung des Serinsyntheseweges wurden gezielte Knock-Downs von *PHGDH* und *PSAT1* durchgeführt. Dazu wurden NCH644-Zellen mit shRNA-Vektoren transduziert, die die Synthese der entsprechenden Proteine mittels shRNA-induziertem Silencing hemmen sollten. Hierbei konnten mit je einem shRNA-Vektor effiziente Knock-Downs erreicht werden, durch die die Expression von PHGDH bzw. PSAT1 effizient inhibiert wurde. Im Gegensatz zu anderen PHGDH-Knock-Down-Studien, wie beispielsweise der Studie von Locasale et al.¹¹⁷, wurde jedoch nicht mit induzierbaren, sondern konstitutiv exprimierenden Vektoren gearbeitet. Daher muss davon ausgegangen werden, dass durch den unmittelbaren Start des *PHGDH*- und *PSAT1*-Silencing direkt nach der Transduktion bereits Zellen selektiert wurden, die nicht maßgeblich vom Serinsyntheseweg abhängig waren. Dies könnte ein möglicher Grund dafür sein, dass es durch den PHGDH- bzw. PSAT1-Knock-Down nicht zu einer signifikanten Veränderung der Zellproliferation kam. Die Untersuchung des SLC1A4-Gehaltes dieser Zellen ergab, dass er bei PHGDH- und PSAT1-Knock-Down-Zellen, verglichen mit non-silencing-Kontrollzellen, deutlich erhöht war. Dies wiederum stützt die bereits in den Abschnitten 4.1.1 und 4.1.2 erläuterte Hypothese, dass die *de novo*-Serinsynthese durch die Hochregulierung von SLC1A4 und den Transport von Serin aus dem extrazellulären Raum umgangen werden kann und somit möglicherweise zur Resistenz gegenüber PHGDH-Inhibitoren beiträgt.

4.1.4 Untersuchungen zum Wirkmechanismus von NCT-503 und CBR-5884

4.1.4.1 Untersuchungen zur Wiederherstellung des Wachstums PHGDH-inhibierter Gliomzellen durch Komplementierung möglicher metabolischer Vulnerabilitäten

Um Genaueres über den Wirkmechanismus von NCT-503 und CBR-5884 zu erfahren, wurde versucht, das Zellwachstum PHGDH-inhibierter Zellen durch Komplementierung möglicher metabolischer Vulnerabilitäten wiederherzustellen. Hierfür wurde die Zellviabilität von Gliomzellen bestimmt, die mit 80 μ M NCT-503 oder CBR-5884, sowie zusätzlich mit unterschiedlichen Konzentrationen (1 bzw. 10 μ M) von NAC, GSH, dm- α KG und Serin (Kontrolle) inkubiert wurden.

Hierbei konnte vor allem gezeigt werden, dass die wachstumsinhibierende Wirkung von CBR-5884 bei allen verwendeten Gliomzelllinien durch die Zugabe von NAC und GSH signifikant um etwa 20-100% verringert wurde. Auf die Wirkung von NCT-503 hingegen hatten diese beiden Substanzen jedoch größtenteils keinen Effekt. Nur bei drei Gliomzelllinien konnte durch NAC oder GSH eine signifikante Verringerung der NCT-503-vermittelten Wachstumsinhibition erreicht werden, welche jedoch mit nur 10 – 30% gering ausfiel. Die Tatsache, dass die Wirkung von CBR-5884 durch die Zugabe von GSH und NAC antagonisiert werden konnte, lässt zunächst den Schluss zu, dass die PHGDH-Inhibition durch CBR-5884, nicht jedoch NCT-503 von der Induktion reaktiver Sauerstoffspezies abhängig ist. Hierfür sprechen auch zwei kürzlich publizierte Studien, in denen ebenfalls CBR-5884 zur Inhibierung der Serinsynthese bei Tumorzellen eingesetzt wurde. In einer Studie von Garcia-Cuellar et al. führte die *in vitro*-Behandlung von Leukämiezellen mit CBR-5884 neben einer Wachstumsinhibition auch zu einer Überproduktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)¹⁸⁹. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass diese

ROS-Überproduktion ursächlich für die wachstumsinhibierende Wirkung dieses Inhibitors war, da sich die Wirkung von CBR-5884 durch Zugabe von N-Acetylcystein (NAC) antagonisieren ließ. Auch an Glioblastomzellen wurde in der bereits erwähnten Studie von Engel et al. eine CBR-5884-vermittelte ROS-Überproduktion festgestellt und außerdem gezeigt, dass diese ROS-Induktion nicht von der extrazellulären Serinkonzentration abhängig war¹²⁷. Auf Basis der hier vorgestellten Ergebnisse und im Kontext der verfügbaren Literatur kann daher davon ausgegangen werden, dass die Induktion reaktiver Sauerstoffspezies einen Hauptwirkmechanismus der CBR-5884-vermittelten Wachstumsinhibition von Tumorzellen darstellt.

Die im Zusammenhang mit CBR-5884 beobachtete ROS-Überproduktion kann mehrere Ursachen haben, die sowohl auf eine spezifische als auch unspezifische Wirkung hindeuten könnten. Zunächst könnte es gemäß der initialen Hypothese sein, dass die PHGDH-Inhibition durch Verringerung der intrazellulären Serinkonzentration und der damit verbundenen Verringerung der Cysteinsynthese auch eine Reduktion des GSH-Niveaus hervorruft, was in der Folge zu einem verringerten ROS-Abbau, bzw. einer erhöhten ROS-Akkumulation führt. In der Tat konnte bereits in einer Studie an Brustkarzinomzellen nachgewiesen werden, dass eine shRNA-vermittelte Suppression der PHGDH-Produktion zu einer signifikanten Verringerung des intrazellulären GSH-Niveaus führt¹²⁸. In einer anderen Studie konnte dieses Ergebnis anhand derselben Brustkarzinomzelllinien bestätigt werden, wenngleich eine Verringerung der intrazellulären GSH-Konzentration hier erst nach der ROS-Induktion durch Doxorubicin sichtbar wurde¹⁰⁶. Hier konnte außerdem für PHGDH-Knock-Down-Zellen eine signifikant höhere Sensitivität gegenüber Doxorubicin gezeigt werden, wobei diese erhöhte Sensitivität durch Zugabe von extrazellulärem GSH wieder verringert wurde. Wie bereits im vorigen Abschnitt erwähnt wurde, ist es jedoch auch möglich, dass die ROS-Überproduktion und damit auch ein Teil der wachstumsinhibierenden Wirkung von CBR-5884 durch unspezifische Wechselwirkungen des Inhibitors hervorgerufen werden, die keine direkte Folge der PHGDH-Inhibition sind.

Bezüglich der ROS-Induktion scheint sich der Wirkmechanismus von NCT-503 wesentlich von dem ROS-abhängigen Wirkmechanismus von CBR-5884 zu unterscheiden. Bei der Inkubation mit NAC oder GSH konnte nur bei zwei der neun untersuchten Zelllinien eine signifikante, wenn auch geringfügige Antagonisierung von NCT-503 erreicht werden. Da dieser Effekt nicht bei allen Zelllinien reproduzierbar war, kann davon ausgegangen werden, dass der Wirkmechanismus dieses Inhibitors nicht primär von der ROS-Induktion abhängig ist. Auch eine kürzlich publizierte Studie von Elsaadi et al. stützt diese Hypothese, da hier der GSH-Gehalt von NCT-503-behandelten multiplen Myelomzellen nicht signifikant verringert wurde.

Die Zugabe von dm- α KG zu Gliomzellen, die mit NCT-503 oder CBR-5884 behandelt wurden, führte nur bei wenigen Gliomzelllinien zu einer geringfügigen, wenn auch signifikanten Wiederherstellung des Zellwachstums. Daher ist nicht davon auszugehen, dass eine verringerte α KG-Synthese wesentlich zur wachstumsinhibierenden Wirkung dieser Inhibitoren beiträgt. Entgegen den Erwartungen konnte gerade bei *IDHI*-mutierten Gliomzelllinien durch die Zugabe von dm- α KG keine signifikante Wiederherstellung des Zellwachstums von NCT-503- bzw. CBR-5884-behandelten Zellen erreicht werden. Dies widerlegt

somit die initiale Hypothese, dass IDH1-mutierte Gliome aufgrund ihres hohen α KG-Verbrauchs eine besondere Abhängigkeit von der α KG-Produktion über den Serinsyntheseweg besitzen.

Auf Basis der vorliegenden Daten kann nicht von einer übergeordneten Rolle des GSH- oder α KG-Metabolismus bei der NCT-503-vermittelten Wachstumsinhibition ausgegangen werden. Dies deckt sich mit den Beobachtungen einer Studie von Wei et al., bei der das Wachstum von NCT-503-behandelten hepatozellulären Karzinom(HCC)-Zellen durch die Zugabe von α KG oder NAC ebenfalls nicht erhöht werden konnte¹²⁴. Dazu ist allerdings anzumerken, dass hier recht hohe Konzentrationen dieser Substanzen von 4 mM (α KG) und 5 mM (NAC) verwendet wurden und im Kontext der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, dass bereits die Zugabe dieser Substanzen in Konzentrationen von 10 μ M vor allem bei NCT-503-behandelten Zellen zu einer signifikanten Verringerung des Zellwachstums führen kann.

Zusammenfassend konnten in diesem Versuch wichtige Unterschiede der Wirkmechanismen der PHGDH-Inhibitoren NCT-503 und CBR-5884 festgestellt werden. Zum einen deuten die Ergebnisse dieser Versuche im Einklang mit der vorhandenen Literatur darauf hin, dass der primäre Wirkmechanismus von CBR-5884 von einer ROS-Induktion abhängig ist und, was in Verbindung mit anderen Studien für signifikante unspezifische Nebeneffekte dieses Inhibitors spricht. Zum anderen kann auf Basis der Ergebnisse davon ausgegangen werden, dass der Wirkmechanismus von NCT-503 nicht maßgeblich von der ROS-Induktion oder der Verringerung der intrazellulären α KG-Konzentration abhängig ist. Weiterhin sprechen die Ergebnisse gegen die initiale Hypothese, dass IDH1-mutierte Gliome aufgrund ihres hohen α KG-Verbrauchs besonders abhängig von der PSAT1-vermittelten α KG-Synthese und damit besonders vulnerabel gegenüber einer gezielten Inhibierung des Serinsyntheseweges sind.

4.1.4.2 Untersuchung der ROS-Induktion durch NCT-503 und CBR-5884

Zur Untersuchung der Rolle reaktiver Sauerstoffspezies während der PHGDH-Inhibition wurden die ROS-Niveaus von 7 verschiedenen Gliomzelllinien während der PHGDH-Inhibition mit NCT-503 und CBR-5884 über 96 Stunden mittels CM-H₂DCFDA-Assay gemessen. Parallel hierzu wurden außerdem Ansätze mit den Inhibitoren in Verbindung mit dem ROS-Scavenger N-Acetylcystein (NAC, 1 mM) generiert, um dessen Einfluss auf die ROS-Produktion zu bestimmen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von CBR-5884 in allen untersuchten Zelllinien zu einer sehr hohen, initialen ROS-Produktion führte, während die Erhöhung der ROS-Produktion bei Zugabe von NCT-503 bei den meisten Zelllinien erst nach 24 Stunden einsetzte und deutlich geringer ausfiel.

Die Ergebnisse dieses Versuches verdeutlichen erneut die unterschiedlichen Wirkmechanismen der beiden Inhibitoren. Der rapide und starke ROS-Anstieg, der direkt nach Zugabe von CBR-5884 auftrat deckt sich mit den Ergebnissen des vorigen Abschnitts und bestätigt die Annahme, dass die Wirkung von CBR-5884 mit einer ROS-Induktion assoziiert ist. Die zusätzliche Gabe von NAC, welches nachweislich das Zellwachstum CBR-5884-inhibierter Zellen erhöht (siehe vorigen Abschnitt), führte in CBR-5884-behandelten Zellen zwar zur deutlichen Suppression der initialen ROS-Spitze, erhöhte aber die ROS-Produktion zu späteren Zeitpunkten (24 h+). Auf Basis dieser Erkenntnis kann daher angenommen werden, dass die anfängliche Erhöhung des ROS-Gehalts direkt nach der Zugabe von CBR-5884 für die

Wirkweise dieses Inhibitors von entscheidender Bedeutung ist. Der rapide ROS-Anstieg, der sofort nach der Zugabe von CBR-5884 sichtbar war deutet außerdem auf einen direkten toxischen Nebeneffekt dieses Inhibitors hin. Diese Schlussfolgerung ist gerade im Hinblick auf die bereits erwähnte Glioblastom-Studie von Engel et al. von Bedeutung¹²⁷. Zwar wurde in dieser Studie, übereinstimmend mit den hier beobachteten Ergebnissen, die Erhöhung der ROS-Produktion durch die Zugabe von CBR-5884 in Glioblastomzellen nachgewiesen, allerdings wurde in diesem Zusammenhang nicht auf die zeitabhängige Veränderung der ROS-Produktion eingegangen und es wurden alle ROS-Messungen nach 24-stündiger Inkubation mit CBR-5884 durchgeführt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde jedoch bei einigen Zelllinien beobachtet, dass der ROS-Gehalt CBR-5884-behandelter Zellen nach 24 h bereits wieder nahezu Ausgangswerte erreichte. Bei der Verwendung anderer Zelllinien hätte es hier also auch sein können, dass nach 24 h fälschlicherweise keine signifikante ROS-Erhöhung festgestellt werden kann, obwohl sie zu frühen Zeitpunkten deutlich messbar gewesen wäre.

Auch bei der Behandlung mit NCT-503 konnte in diesem Versuch bei 4 von 7 untersuchten Gliomzelllinien eine Erhöhung der ROS-Produktion nachgewiesen werden, wenngleich diese, verglichen mit CBR-5884, meist erst zu späteren Zeitpunkten auftrat und wesentlich geringer ausfiel. Zusammen mit den Erkenntnissen aus dem vorigen Versuch kann somit angenommen werden, dass infolge der Behandlung mit NCT-503 zwar ROS produziert wird, aber die ROS-Produktion nicht essenziell für die Wirkung dieses Inhibitors ist. Passend hierzu entsprach der Zeitverlauf des ROS-Gehaltes nach Zugabe von NCT-503 eher den Erwartungen als der Zeitverlauf in Verbindung mit CBR-5884. Da die ROS-Induktion als indirekter Effekt der PHGDH-Inhibition zu erwarten war, wurde ein verzögertes, langsames Auftreten dieses Effektes erwartet, wie dies bei der Behandlung mit NCT-503 der Fall war. Zur ROS-Induktion durch NCT-503 bei Gliomen sind keine publizierten Daten bekannt, jedoch kann in diesem Zusammenhang eine Studie zum Einfluss von NCT-503 auf die ROS-Induktion und den GSH-Gehalt bei Burkitt-Lymphom-Zellen von Białopiotrowicz et al. zum Vergleich herangezogen werden¹⁹⁷. In dieser Studie wurde gezeigt, dass es bei der PHGDH-Inhibition mit NCT-503 nach 24 Stunden bei einer von zwei Lymphom-Zelllinien zu einer signifikanten Abnahme des GSH-Gehalts und einer signifikanten Zunahme der ROS-Produktion kam. Eine andere Zelllinie, die ein wesentlich höheres Basis-ROS-Niveau besaß, zeigte hingegen nach der Inkubation mit NCT-503 keine Zunahme der ROS-Produktion. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, da sich für NCT-503 bei den meisten Gliomzelllinien nach 24 Stunden eine deutliche Zunahme des ROS-Gehalts fand. Wie in der erwähnten Studie war dies auch in der vorliegenden Arbeit bei Zelllinien mit deutlich erhöhtem ROS-Basisniveau nicht der Fall.

Zusammenfassend konnte ein detaillierteres Verständnis über die CBR-5884- und NCT-503-abhängige ROS-Induktion bei Gliomzellen gewonnen werden. Es konnte gezeigt werden, dass CBR-5884 bereits nach wenigen Minuten eine rapide und starke ROS-Induktion verursacht, welche für die Wirkung von CBR-5884 essenziell ist und durch Zugabe von NAC unterdrückt werden kann. Dies deckt sich mit der Hypothese aus dem vorigen Abschnitt, dass der Wirkmechanismus von CBR-5884 maßgeblich von der ROS-Induktion abhängig ist. NCT-503 führte hingegen nur bei 4 von 7 Gliomzelllinien zu einer Erhöhung des ROS-Gehalts, welche stark verzögert und deutlich schwächer ausfiel als bei CBR-5884. Es

ist daher zu vermuten, dass es sich bei dieser verzögerten ROS-Induktion durch NCT-503 um einen sekundären Effekt der spezifischen PHGDH-Inhibition handelt.

4.1.5 Wirkung von NCT-503 auf Xenograft-Gliome *in vivo*

Um das Potenzial von NCT-503 zur Behandlung von Gliomen in einem präklinischen, patientennahen Rahmen zu ermitteln, wurde der Einfluss einer lokalen Applikation von NCT-503 (100 μM) auf das Wachstum humaner Gliomzelllinien im orthotopen Maus-Xenograft-Modell untersucht. Es konnte jedoch weder bei NCH644-, noch bei NCH1681-Tumoren ein wachstumshemmender Effekt dieses Inhibitors beobachtet werden. Obwohl NCT-503 *in vitro* EC_{50} -Werte von unter 50 μM zeigte, konnte hier selbst bei täglicher lokaler Gabe des Inhibitors (100 μM) durch Führungsschrauben direkt in den Tumor hinein kein signifikanter Effekt auf das Tumorstadium erzielt werden. Diese Applikationsform war ausgewählt worden, um eine möglichst gute Bioverfügbarkeit des Inhibitors im Gehirn, bzw. im Tumor zu gewährleisten. Daher wäre bei einer systemischen Gabe von NCT-503 ebenfalls nicht mit einer Wachstumsinhibition des Tumors zu rechnen. Andererseits hat die Darreichungsform des Wirkstoffs per Injektion durch Guide Screws auch Schwachstellen, die durch andere Darreichungsformen umgangen werden könnten. Zu nennen wäre hier beispielsweise, dass bei der Verwendung von Guide Screws nicht sichergestellt werden kann, dass der Wirkstoff nach der Injektion auch vollständig am Injektionsort verweilt, da ein geringer Reflux des Wirkstoffes aus dem Injektionskanal nicht komplett ausgeschlossen werden kann. Da die systemische Gabe aufgrund unzureichender NCT-503-Konzentrationen im Gehirn nicht in Frage kam¹⁰⁰ (vgl. 3.2.6), könnte die Verwendung von subkutan implantierbaren osmotischen Pumpen mit Hirnkathetern, die eine direkte Infusion in den Tumor ermöglichen, eine Alternative sein. Zur Verwendung eines solchen Systems muss der entsprechende Wirkstoff jedoch eine hohe Stabilität besitzen, da er während der gesamten Versuchsdauer im Reservoir der subkutanen osmotischen Pumpe bei Maus-Körpertemperatur verweilt. Dies ist jedoch weder für NCT-503, noch für CBR-5884 gegeben, weshalb die Anwendung dieser Methode erst mit der Entwicklung stabilerer PHGDH-Inhibitoren möglich werden könnte.

Zwei *in vivo*-Studien an anderen Tumorarten erzielten diesbezüglich teilweise gegensätzliche Ergebnisse. In diesen Studien wurde das Wachstum von Brustkarzinomzellen bzw. HCC-Zellen im orthotopen Xenograft-Modell im Brustfettpolster bzw. in der Leber bei regelmäßiger, intraperitonealer Gabe von NCT-503 untersucht^{100,124}. Dabei wurde in der Studie von Pacold et al. für eine Brustkarzinomzelllinie mit hohem PHGDH-Gehalt (MDA-MB-468) eine signifikante Verringerung des Tumorstadiums durch NCT-503-Gabe nachgewiesen, während dies bei einer Zelllinie mit niedrigem PHGDH-Gehalt (MDA-MB-231) nicht der Fall war. Deshalb wurde angenommen, dass ein hoher PHGDH-Gehalt auch bei Tumorzellen *in vivo* auf eine Vulnerabilität gegenüber NCT-503 hindeutet. In einem direkten Vergleich der PHGDH-Expression konnte in der vorliegenden Arbeit allerdings gezeigt werden, dass der PHGDH-Gehalt in den Gliomzelllinien NCH644 und NCH1681 ähnlich oder höher war als in der MDA-MB-468-Zelllinie, sodass dies nicht der Grund für die fehlende Wachstumsinhibition bei NCH644- und NCH1681-Tumoren sein kann. Weiterhin konnte in der Studie von Wei et al. das Wachstum von HCC-Xenograft-Tumoren *in vivo* nicht allein durch die systemische Gabe von NCT-503, sondern nur in Kombination mit

Sorafenib signifikant verringert werden, was die Wirkung von NCT-503 als Monotherapie in Frage stellt. Letztlich lassen sich die in diesen Studien gesammelten Ergebnisse offenbar nicht direkt auf Gliome übertragen. Wie das Beispiel der Studie von Wei et al. zeigt¹²⁴, wäre es allerdings denkbar, dass NCT-503 in Kombination mit anderen Wirkstoffen einen therapeutischen Nutzen haben könnte.

4.2 Entwicklung und Testung neuer Verfahren und Metriken zur Erforschung der Tumorheterogenität und klonaler Therapieresistenzen bei Glioblastomen

Intratumorale Heterogenität ist für die Progression von Tumoren von kritischer Bedeutung¹³² und es wird mittlerweile angenommen, dass diese eine der Hauptursachen für die Resistenzbildung bei Krebstherapien darstellt^{133,139,198}. Um intratumorale Heterogenität genauer untersuchen zu können, wurde in den letzten Jahren eine Reihe von Methoden, wie genetisches Barcoding, optisches Barcoding und RGB-Marking entwickelt, um Zellen durch DNA-Transduktion zu markieren und Zellklone so über längere Zeiträume verfolgen zu können. Obwohl das RGB-Marking als Methode zum Zeitpunkt dieser Arbeit bereits seit 10 Jahren etabliert war, fehlte es an effizienten Analyseverfahren und zugänglicher Software, um diese Technik in vollem Umfang und effizient quantitativ nutzen zu können. Trotz der Entwicklung eines vielversprechenden Ansatzes zur Analyse durchflusszytometrischer Daten von RGB-markierten Zellen durch Wu et al., wurde dieser bislang nicht in anderen publizierten Studien verwendet oder weiterentwickelt, da er zu komplex, beziehungsweise unzugänglich war.

Um intratumorale Heterogenität und klonale Therapieresistenzen bei Tumoren besser untersuchen zu können, wurden deshalb im Rahmen dieser Arbeit neue Verfahren und Metriken zur Analyse durchflusszytometrischer Daten RGB-markierter Zellpopulationen entwickelt. Diese Analyseverfahren wurden in einer Software namens „ChromoClone“ gebündelt, die eine schnelle, detaillierte und quantitative Analyse klonaler Dynamiken bei RGB-markierten Zellpopulationen mittels Durchflusszytometrie ermöglicht. Die ChromoClone-Analysesoftware wurde anschließend verwendet, um die klonale Restriktion während der Tumorigenese orthotoper Xenograft-Tumore aus verschiedenen Gliomzelllinien *in vivo* zu untersuchen. In diesem Zusammenhang wurde auch der Einfluss des Immunsystems auf die klonale Restriktion orthotoper Maus-Gliome untersucht. Um außerdem tieferegehende Analysen potenziell resistenter Zellklone aus RGB-markierten Mischpopulationen durchführen zu können, wurde ein Verfahren zur Identifizierung und Isolierung solcher Klone entwickelt und getestet.

4.2.1 Entwicklung neuer Analyseverfahren und sowie der ChromoClone-Software zur durchflusszytometrischen Untersuchung klonaler Dynamiken bei RGB-markierten Zellpopulationen

Das entwickelte Verfahren stütze sich im Kern auf die Verwendung sphärischer Scatterplots, deren prinzipieller Nutzen bereits in einer Studie von Wu et al. aufgezeigt wurden¹⁷⁵. In dieser Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass diese Plottingmethode geeignet ist, um RGB-markierte Einzelzellklone anhand ihrer Farbkombinationen zu identifizieren und zu quantifizieren. Hierbei wurde auch die chromatische Streuung als Metrik vorgestellt, die in modifizierter Form in der hier vorgestellten Arbeit Gebrauch fand. Dennoch wurde diese 2016 publizierte Methode bislang nicht zur Untersuchung RGB-markierter Zellen adaptiert, was mehrere Gründe hat. Zum einen bezieht sich die Studie von Wu et al. nur auf die Untersuchung von prädefinierten Einzelzellklonen. Dies ist insofern von Nachteil, als dass RGB-

Marking vor allem als Methode zur Verfolgung multiklonaler Zellpopulationen entwickelt wurde und in den meisten Studien, in der diese Methode Verwendung findet, auch als solche genutzt wird. Zur Untersuchung polyklonaler Zellpopulationen aus prädefinierten Einzelzellklonen stehen weiterhin andere, besser geeignete Methoden wie das optische Barcoding¹⁷⁴ zur Verfügung. Deshalb ist sicherlich einer der Hauptgründe für die fehlende Verwendung dieser Methodik, dass nie deren Nutzen zur Untersuchung nicht-prädefinierter multiklonaler Zellpopulationen demonstriert wurde. Noch kritischer für die fehlende Verwendung dieser Methode war jedoch das Fehlen einer zugänglichen und leicht bedienbaren Software, die anderen Wissenschaftlern die Verwendung dieser Methodik ermöglichen würde.

Mit ChromoClone wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Software entwickelt, die eine effiziente quantitative Analyse und Visualisierung durchflusszytometrischer Daten RGB-markierter Zellpopulationen durch sphärisches Scatterplotting ermöglicht und dabei leicht zugänglich ist. Ein besonderer Fokus bei der Entwicklung dieser Software lag hier auf der Benutzerfreundlichkeit, um die Verwendung der hier vorgestellten Methodik für die Erforschung von Tumorheterogenität mittels RGB-Marking zu unterstützen. Zudem bietet diese Software, im Hinblick auf die Arbeit von Wu et al., ein breiteres Spektrum an zusätzlichen Filter- und Analysemöglichkeiten und einige, eigens hierfür entwickelte Analyseverfahren. Hierzu zählen unter anderem die Quantifizierung der Farbvielfalt RGB-markierter Zellen durch die Berechnung von Chromatizitätswerten, die Quantifizierung einzelner Zellklone durch hierarchisches Clustering, sowie die Erstellung von Gates und die Ausgabe von Gating-Koordinaten zur Isolierung einzelner Klone per FACS mit dem Subprogramm „GateFinder“. Zudem konnte erfolgreich ein Verfahren entwickelt und etabliert werden, welches die präzise Isolierung einzelner, identifizierbarer Zellklone auf Basis ihrer Farbkombination aus RGB-markierten Mischpopulation erlaubt und in dieser Form noch nicht beschrieben war.

4.2.2 Auswirkungen des *in vivo*-Wachstums auf die klonale Zusammensetzung von Glioblastomzellpopulationen

Um den Einfluss des *in vivo*-Wachstums auf die Heterogenität von Gliomen zu untersuchen, wurde die Veränderung der klonalen Farbzusammensetzung RGB-markierter, orthotoper BT112-, BS153- und U87-Xenograft-Tumore durchflusszytometrisch gemessen und mit Hilfe der ChromoClone-Software analysiert. Dabei konnte auf Basis der Farbverteilungen RGB-markierter Gliomzellen gezeigt werden, dass orthotope Xenograft-Tumore verschiedener Gliomzelllinien während der Tumorigenese eine unterschiedlich starke klonale Restriktion durchlaufen, die unter Anwendung der hier entwickelten Chromatizitätsmetrik quantifiziert wurde. Während U87-Tumore die stärkste klonale Restriktion aufwiesen, war diese bei BS153-Tumoren deutlich geringer und für BT112-Tumore konnte nahezu keine klonale Restriktion festgestellt werden.

Die unterschiedliche Farbvielfalt in den RGB-Tumoren deutet darauf hin, dass der Anteil tumorinitiiender Zellklone in diesen Zelllinien variierte. Bei U87-Zellen war dieser Anteil recht gering, sodass nur wenige Farbkclone im Tumor gefunden werden konnten und daher bei dieser Zelllinie von einer hohen Heterogenität der Zellen bezüglich des *in vivo*-Wachstums gesprochen werden kann. Da diese

Zelllinie auch nach der *in vitro*-Kultivierung über mehrere Wochen noch eine homogene Farbverteilung zeigte, ist die beobachtete klonale Restriktion während des Wachstums von U87-Xenograft-Tumoren nicht auf Klon-inhärente Proliferationsunterschiede, sondern auf eine erhöhte Überlebens- und Anpassungsfähigkeit einiger weniger Klone an die *in vivo*-Umgebung zurückzuführen. Die hohe Farbvielfalt und homogene Farbverteilung von BT112-Tumoren weist hingegen darauf hin, dass die meisten aller injizierten Zellen eine ähnliche Tumorentstehungskapazität und Teilungsgeschwindigkeit besaßen und deshalb gleichermaßen im Tumor anwuchsen. Hinsichtlich der Tumorentstehungskapazität einzelner Zellen ist BT112 also als überwiegend homogene Zelllinie einzustufen.

Die Heterogenität von Tumorzellpopulationen und die damit verbundene Expansion dominanter Zellklone kann mehrere Ursachen haben. Unterschiede zwischen Zellklonen, die *in vivo* zur Tumorbildung beitragen und solchen, die dies nicht tun, können genetischer oder epigenetischer Natur sein, sowie durch andere Faktoren beeinflusst werden, wie zum Beispiel die Zellzyklus-Phase zum Zeitpunkt der Implantation der Tumorzellen oder die Lokalisation im Tumor. In einer Studie von Lan et al., in der die Wachstumsdynamik von Glioblastomzellklonen mittels DNA-Barcoding *in vivo* untersucht wurde, wurden vor allem Anhaltspunkte dafür gefunden, dass epigenetische Unterschiede für die präferenzielle Expansion bestimmter Klone gegenüber anderen verantwortlich waren¹⁶⁰. Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann angenommen werden, dass verschiedene Zelllinien bei der Tumorbildung *in vivo* teils erheblich unterschiedliche Grade klonaler Restriktion durchlaufen und sie deshalb in unterschiedlichem Maße zur Erforschung von Tumorerheterogenität geeignet sind. Dabei gibt es mehrere Faktoren, die die Heterogenität von Zelllinien beeinflussen können, worunter zum Beispiel die Heterogenität des zur Etablierung der Zelllinie verwendeten Tumors, die klonale Restriktion während der Etablierung der Zelllinie, aber auch die Tumorentität und die Dauer der *in vitro*-Kultivierung zählen.

Der Nutzen der hier vorgestellten Methodik konnte außerdem erfolgreich in einer Studie zur Rolle des Immunsystems bei der klonalen Restriktion von Maus-Glioblastomen demonstriert werden¹⁸⁸. Hierbei konnte mittels Chromatizitätswerten quantifiziert werden, dass RGB-markierte Tumore in immunkompetenten WT-Mäusen eine signifikant höhere klonale Restriktion durchlaufen ($\chi = 50\%$) als in immunsupprimierten *Pfp^{-/-}Rag2^{-/-}*-Mäusen ($\chi = 66\%$), was zudem mit einem verlängerten Überleben und einer verringerten Tumorentität bei WT-Mäusen einherging. Diese Studie zeigte, dass das adaptive Immunsystem das Wachstum und die klonale Zusammensetzung maligner Gliome tiefgehend beeinflusst. Sie verdeutlichte jedoch auch den Nutzen der hier vorgestellten der Chromatizitätsmetrik, da hiermit Unterschiede in der Farbheterogenität RGB-markierter Tumore mit statistischer Signifikanz berechnet werden konnten.

Insgesamt konnte mit den vorgestellten Analyseverfahren ein methodischer Fortschritt bei der Analyse klonaler Farbzusammensetzungen RGB-markierter Xenograft-Tumore mittels Durchflusszytometrie erreicht werden. Dies kann anhand eines Vergleichs der hier angewendeten Analysemethoden beispielsweise mit denen aus einer Studie von Gambera et al. verdeutlicht werden, in der klonale Dynamiken von Osteosarkomen mittels RGB-Marking *in vivo* untersucht wurden¹⁴⁶. In dieser Studie wurden, ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit, RGB-markierte Zelllinien in Mäuse implantiert und die

resultierenden Tumore durchflusszytometrisch untersucht. Dabei wurden 3D-Scatterplots aus den durchflusszytometrischen Datensätzen dieser Zellen generiert, um Zellpopulationen vor und nach dem Tumorwachstum visuell zu vergleichen und die klonale Restriktion der Zellpopulationen nachzuweisen. Zudem wurden die Zellen basierend auf ihren Farbkombinationen in eine (oder mehrere) von 12 Gruppen eingeteilt (Blau/Rot-positiv, Grün/Rot-positiv, Rot-positiv/Blau-negativ, Rot/Blau-negativ usw.), die den Quadranten der zweidimensionalen Fluoreszenz-Scatterplots (Rot/Grün, Rot/Blau, Blau/Grün) entsprachen. Übertragen auf die vorliegende Arbeit würde dies bedeuten, dass beispielsweise alle dreifarbigigen Klone der U87-Tumore (vgl. 3.3.3.1, Abb. 28) gleichzeitig in 3 von 12 dieser Gruppen quantifiziert werden würden, da sie sowohl im Rot-Grün-positiven, Rot-Blau-positiven sowie Blau-Grün-positiven Quadranten auftreten. Im Gegensatz dazu lässt die Methodik aus der vorliegenden Arbeit eine präzisere Quantifizierung der Farbhomogenität und die Identifizierung und Verfolgung einzelner, dominanter Klone zu und stellt daher im Vergleich eine bessere Alternative zur Verfolgung klonaler Dynamiken dar. Auch hinsichtlich der Visualisierung stellt das in der vorliegenden Arbeit verwendete sphärische Scatterplotting aufgrund der höheren Übersichtlichkeit eine Verbesserung der verwendeten Darstellung durchflusszytometrischer Datensätze von RGB-markierten Zellpopulationen dar.

4.3 Identifizierung, Isolation und Analyse NCT-503- und CBR-5884-resistenter Gliomzellklone

In der vorliegenden Arbeit konnte unter anderem der Nutzen der ChromoClone-Software bei der Identifizierung dominanter Zellklone in nicht prädefinierten RGB-Zell-Mischpopulationen nachgewiesen werden und zudem ein Verfahren etabliert werden, dass die präzise Isolierung einzelner Farbkclone per FACS erlaubt. Diese Techniken wurden im nächsten Schritt zu einem Verfahren kombiniert, das eine gezielte Isolierung wirkstoffresistenter Zellklone aus RGB-markierten Zell-Mischpopulationen zum Ziel hatte. Hierzu wurde die klonale Restriktion dieser Zell-Mischpopulationen durch die wiederholte Behandlung mit NCT-503 oder CBR-5884 herbeigeführt und es wurden anschließend expandierende, resistente Klone isoliert. Diese Klone, sowie die Zellpopulationen, aus denen diese extrahiert wurden, wurden dann auf deren Resistenz gegenüber NCT-503 und CBR-5884, sowie auf deren zellulären PHGDH-, PSAT1- und SLC1A4-Gehalt überprüft.

4.3.1 Auswirkungen der NCT-503- und CBR-5884-vermittelten PHGDH-Inhibition auf die klonale Farbverteilung RGB-markierter Gliomzellen

Im ersten Teil dieses Versuches wurden RGB-markierte NCH644- und NCH1681-Gliomzellen in mehreren Zyklen über 3 Tage mit 80 μM CBR-5884 bzw. 80 μM NCT-503 behandelt. Hierbei wurden deren klonale Farbverteilungen über den Versuchsverlauf durchflusszytometrisch verfolgt und mit der ChromoClone-Software analysiert.

Insbesondere NCH644-Zellen zeigten infolge der Behandlung mit beiden Inhibitoren erwartungsgemäß eine deutliche klonale Restriktion der Zellpopulation, die zu einem bevorzugten Anwachsen vereinzelter resistenter Zellklone führte. Auch bei der Behandlung von NCH1681-Zellen mit NCT-503 konnte eine Veränderung der klonalen Farbzusammensetzung beobachtet werden, die in beiden Parallelansätzen zum vermehrten Anwachsen derselben (oder farblich sehr ähnlichen) Zellklone führte. Das Wachstum farblich identischer, resistenter Klone in Parallelansätzen spricht dafür, dass diese Klone bereits in der Ausgangszellpopulation vorhanden waren und nicht spontan während der Behandlung entstanden sind. Dies steht im Einklang mit der erwähnten Studie von Lan et al., bei der die TMZ-Behandlung von Xenograft-Glioblastomen *in vivo* ebenfalls zu einer starken klonalen Restriktion führte und in einem bevorzugten Wachstum weniger, resistenter Zellklone resultierte. In dieser Studie konnte durch die Verfolgung von Zellklonen per DNA-Barcoding außerdem nachgewiesen werden, dass es in Xenograft-Tumor-Replikaten nach der TMZ-Behandlung teils zum Wachstum derselben dominanten Klone kam, was ebenfalls auf die Anwesenheit initial resistenter Zellklone in der Ausgangszellpopulation hindeutet. In der vorliegenden Arbeit konnten beim Vergleich der klonalen Dynamiken beider behandelten Gliomzelllinien während der Behandlung mit NCT-503 und CBR-5884 signifikante Unterschiede festgestellt werden. So zeigten die Duplikatsansätze bei NCH1681-Zellen im Versuchsverlauf stets nahezu identische klonale Farbverteilungen, während sie sich bei NCH644-Zellen teilweise deutlich unterschieden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die klonale Farbverteilung von NCH1681-Zellen zu Beginn des Versuches nicht mehr vollständig homogen war und somit nur noch eine begrenzte

Anzahl der initial verfügbaren Klone im Versuch präsent waren. Die geringe Anzahl von Klonen könnte somit die Selektion derselben Klone in diesen Ansätzen begünstigt haben.

4.3.2 Isolierung und Untersuchung von NCH1681- und NCH644-Zellklonen

Im nächsten Schritt wurden mehrere NCH1681- und NCH644-Klone isoliert, bei denen eine erhöhte oder verringerte Resistenz gegenüber NCT-503 bzw. CBR-5884 vermutet wurde. Zudem wurde für je einen NCH1681- bzw. NCH644-Klon versucht, diesen aus einem der Kontrollansätze (K1/K2) zu isolieren. Sowohl diese Klone als auch die Gesamtzellpopulationen, aus denen sie isoliert wurden, wurden anschließend auf ihre Resistenz gegenüber NCT-503 und CBR-5884 mittels ATP-abhängigem Zellviabilitäts-Assay überprüft und per Western Blot auf ihren zellulären PHGDH-, PSAT1- und SLC1A4-Gehalt untersucht. Hierbei konnten 2 NCH1681- und 5 NCH644-Zellklone isoliert werden, für die eine signifikant erhöhte Resistenz gegenüber sowohl NCT-503 als auch CBR-5884 nachgewiesen wurde. Die Untersuchung der *PHGDH*-, *PSAT1*- und *SLC1A4*-Expression zeigte außerdem teils deutliche Unterschiede zwischen diesen Zellklonen, sodass die Ausbildung unterschiedlicher Resistenzmechanismen vermutet wurde.

Der Resistenzmechanismus der isolierten Zellklone gegenüber NCT-503 und CBR-5884 konnte nicht auf einen einzigen spezifischen Mechanismus begrenzt werden. So konnte bei den zuvor mit NCT-503 behandelten NCH1681-Klonen N2-11 und N1-28 verglichen mit Kontrollzellen ein deutlich erhöhter SLC1A4-Gehalt festgestellt werden, was vermuten lässt, dass der Resistenzmechanismus dieser Zellen gemäß der initialen Hypothese an eine Umgehung der *de novo*-Serinsynthese durch den Import von extrazellulärem Serin über SLC1A4 geknüpft sein könnte. Jedoch zeigten die ebenfalls zuvor mit NCT-503 behandelten NCH644-Zellklone N1-02 und N1-05 statt einer erhöhten SLC1A4-Expression eine erhöhte PHGDH- und PSAT1-Expression, was eher auf eine Hochregulierung des Serinsyntheseweges hindeutet. Der Vergleich des NCH644-Klons C2-18 mit dem Kontrollklon K2-C2-18 ließ außerdem vermuten, dass das Expressionsniveau dieser Proteine nicht zwangsweise indikativ für die Resistenz dieser Klone gegenüber NCT-503 oder CBR-5884 ist. So zeigten beide Klone verglichen mit Kontrollzellen zwar signifikant erhöhte Resistenzen gegenüber NCT-503 und CBR-5884, unterschieden sich aber deutlich in ihrer PHGDH- und SLC1A4-Expression. Auf Basis der vorliegenden Daten ist somit einerseits die Beteiligung von SLC1A4 bei der Umgehung der PHGDH-Inhibition bei Gliomen plausibel, jedoch ist zudem mit der Ausbildung anderer Resistenzmechanismen gegen die PHGDH-Inhibition zu rechnen.

Anhand der Kontrollklone K1-N1-28 (NCH1681) und K2-C2-18 (NCH644) konnte in diesem Versuch außerdem gezeigt werden, dass die resistenten Referenzklone N1-28 (NCH1681) und C2-18 (NCH644) bereits in den Ausgangszellpopulationen existierten und es mit dem vorgestellten Verfahren möglich war, diese Klone auch aus nicht behandelten Kontrollzellpopulationen anzureichern. Dies deckt sich insofern mit Beobachtungen aus der erwähnten Studie von Lan et al., als dass beide Studien vor allem auf die Existenz initial resistenter Klone in den Ausgangszellpopulationen und weniger auf die spontane Ausbildung solcher Resistenzen schließen lassen¹⁶⁰. Die Möglichkeit zur Untersuchung solcher Ursprungsklone vor der Ausübung eines Selektionsdrucks stellte zuvor vor allem einen Grund zur Verwendung des optischen Barcoding-Systems dar und konnte mit der vorliegenden Arbeit in das RGB-

Marking-System integriert werden. Dies kann retrospektiv die Analyse von besonders resistenten oder sensitiven Klonen vor der Behandlung oder dem *in vivo*-Wachstum ermöglichen und bei der Klärung der Frage helfen, inwiefern sich die Klone durch die entsprechende Behandlung oder das *in vivo*-Wachstum verändern.

Die erhöhte Sensitivität CBR-5884-behandelter NCH1681-Zellen gegenüber NCT-503, welche bei NCH644-Zellen nicht beobachtet wurde, deutet außerdem darauf hin, dass die wiederholte Behandlung mit CBR-5884 möglicherweise zu einer bleibenden Schädigung dieser Zellen führt. Denkbar wäre hier auf Basis der vorliegenden Ergebnisse zum Beispiel eine Akkumulation von ROS infolge der wiederholten Inkubation mit CBR-5884, auf die IDH1mut-Gliomzellen aufgrund ihres beeinträchtigten Metabolismus möglicherweise besonders sensitiv sind.

Die Ergebnisse dieses Versuches stellen in erster Linie einen konzeptionellen Beweis für die Isolierung therapieresistenter bzw. -sensitiver Zellklone mit der vorgestellten Methodik dar, die in dieser Form noch nicht beschrieben wurde. Verglichen mit dem optischen Barcoding¹⁷⁴, bei dem eine exaktere Trennung von Zellklonen vorgenommen werden kann, liegt der Vorteil der hier vorgestellten Methode vor allem in der wesentlich größeren Anzahl an Zellklonen, die mit dieser Technik gleichzeitig untersucht werden können. So umfasst diese bei der vorgestellten Methode nahezu alle Klone einer Zelllinie, während beim optischen Barcoding, selbst bei der Verwendung 6 verschiedener Fluoreszenzmarker, nur 41 Klone parallel untersucht werden können, die zudem erst einzeln sortiert und expandiert werden müssen. Rein methodisch betrachtet stellt die vorgestellte Technik außerdem eine wichtige Ergänzung zur Untersuchung klonaler Therapieresistenzen in Bezug auf die Studie von Lan et al. dar¹⁶⁰. Zwar ist die vorgestellte Methode im Gegensatz zu der DNA-Barcoding-Methode nicht in der Lage, die Frequenzen jedes Klons exakt zu bestimmen, jedoch müssen Zellen zur Analyse in der vorgestellten Methode nicht lysiert werden, was zusammen mit der Möglichkeit zur Isolierung resistenter Zellklone deren weitergehende Untersuchung ermöglicht. Weiterhin ist es mittels der RGB-Markierung im Gegensatz zum genetischen Barcoding möglich, die klonale Architektur von Tumoren *in vivo* fluoreszenzmikroskopisch zu visualisieren.

4.4 Entwicklung und Testung eines Screeningverfahrens zur prospektiven Analyse definierter Zellklone

Um neben der retrospektiven Analyse ganzer Zellpopulationen auch die Analyse bzw. das Screening einzelner Zellklone zu ermöglichen, ohne hierbei auf die wenig effiziente Sortierung und Expansion von Einzelzellen per FACS zurückgreifen zu müssen (vgl. Wu et al.¹⁷⁵), wurde eine Methode etabliert, die durch die Generierung von Cokulturen mehrerer unterscheidbarer Zellklone eine simultane Verfolgung des Wachstums dieser Klone ermöglichte.

Da die Generierung von Klonen mit dieser Technik, im Gegensatz zum optischen Barcoding und zum Verfahren nach Wu et al., nicht auf der Sortierung und Expansion von Einzelzellen basiert, war es möglich, die Effizienz der Produktion unterscheidbarer Zellklone um das etwa 120-fache gegenüber der herkömmlichen Expansion von Einzelzellklonen zu steigern. Hochdurchsatzanalysen definierter Zellklone könnten mit diesem Verfahren somit wesentlich effizienter durchgeführt werden als mit herkömmlichen Verfahren. Zusätzlich wird durch die Nutzung von RGB-Oligoklon-Kulturen weniger Zeit für die Durchsicht und die durchflusszytometrischen Analyse der Klone sowie auch weniger Platz zur Unterbringung der Zellkulturplatten benötigt, was sowohl Zeit als auch Kosten spart.

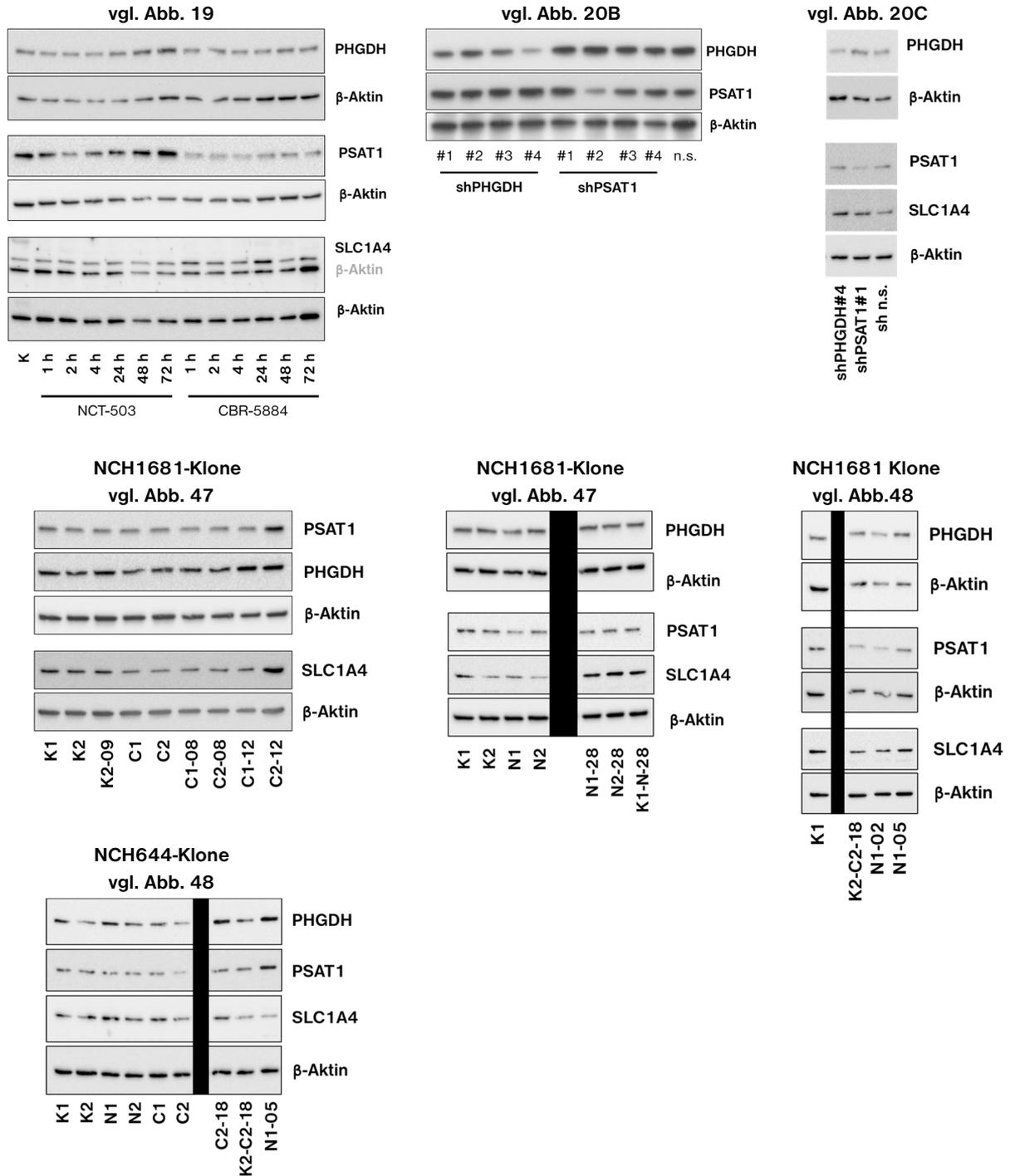
Im Rahmen eines konzeptionellen Versuches mit dieser Methode konnten zwei Zellklone identifiziert werden, die gegenüber anderen Klonen signifikant resistenter bzw. sensitiver gegenüber NCT-503 bzw. CBR-5884 waren. Somit sollte es mit dieser Methodik in einem größeren Maßstab möglich sein, die Frequenzen für das Auftreten gefundener Resistenzen genau bestimmen. Solche Frequenzen könnten indikativ für das Auftreten bestimmter Resistenzen bei Patiententumoren sein und somit potenziell als Entscheidungshilfe bei der Auswahl geeigneter gezielter Krebstherapien dienen.

4.5 Ausblick

Anhand der vorliegenden Arbeit konnte das Potenzial des vorgestellten Verfahrens zur Identifizierung klonaler Therapieresistenzen mittels RGB-Markierung veranschaulicht werden. Die ChromoClone-Software erwies sich als essenzielles Mittel zur Datenanalyse und ermöglichte die Durchführung der vorliegenden Arbeit in dieser Form. Anknüpfend an die vorliegende Arbeit sollen künftig die Möglichkeiten der vorgestellten Technik sowie der ChromoClone-Software weiter ausgebaut und genutzt werden, um klonale Therapieresistenzen gegenüber klinisch verwendeten Glioblastom-Therapien im Detail zu untersuchen. Das Ziel besteht hierbei nicht mehr nur in der Beobachtung klonaler Dynamiken und Erkennung resistenter Zellklone, sondern in der Identifizierung und Antagonisierung klonaler Resistenzmechanismen, die ultimativ zu einer Komplementierung vorhandener klinischer Therapiestrategien bei Glioblastomen beitragen soll. Hierfür soll zunächst die ChromoClone-Software weiter optimiert und publiziert werden, um auch anderen Forschungsgruppen den einfachen Zugriff auf die vorgestellten Verfahren zu ermöglichen und ihre Anwendung zu fördern.

5 ANHANG

5.1 Western Blots



5.2 Materialien

5.2.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
(2-Hydroxypropyl)- β -cyclodextrin	Merck KGaA, Darmstadt
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt
CBR-5884	Merck KGaA, Darmstadt
Citronensäure Monohydrat	Honeywell Fluka
CM-H ₂ DCFDA	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA
Dako Pen	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Dimethylsulfoxid	Merck KGaA, Darmstadt
Dimethyl- α -Ketoglutarat	Merck KGaA, Darmstadt
DNA 1kb Plus Ladder	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA
eBioscience Flow Cytometry Staining Buffer (FACS-Probenpuffer)	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA
Eosin	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
Ethidiumbromid (1%)	Merck KGaA, Darmstadt
Eukitt®	Merck KGaA, Darmstadt
Formalin	Merck KGaA, Darmstadt
Glutathion, reduziert	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Hematoxillin	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt
Isofluran	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Laemmli Probenpuffer (4x)	Biorad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
L-Serin	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt
Menadion	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt
Methanol	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
N-Acetylcystein	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt
NCT-503	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt
PBS (Dulbeccos PBS)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA
PEG300	Merck KGaA, Darmstadt
PEG-it Virus Precipitation Solution	System Biosciences, Mountain View, CA, USA
Rimadyl	Zoetis Deutschland GmbH, Berlin
RIPA-Puffer	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt
Roti-Block	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Sheath Fluid for Flow Systems (Partec Zytometer)	Sysmex Partec, Münster
TAE-Puffer (10x) UltraPure™	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA
Triton X100	Merck KGaA, Darmstadt
Trizma (Tris-base)	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt
Trypsin-EDTA	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA
Tween 20	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Wasserstoffperoxid (30%)	Merck KGaA, Darmstadt
Xylol	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt

Epredia™ Richard-Allan Scientific HistoGel
Gel zur Präparateeinbettung

Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA

5.2.2 Laborgeräte

Gerät	Hersteller
7500 Fast Real Time PCR System	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA
Biofuge Fresco	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Centrifuge 5810	Eppendorf AG, Hamburg
ChemiDoc Imager	Biorad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
ddPCR System	Biorad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
FACSAria IIIu Zellsortierer	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
FlexCycler	Analytik Jena AG, Jena
Fluoreszenzlampe	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Fluoreszenzmikroskop Axioskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Fluoreszenzmikroskop DM IRB	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Fortessa LSR Durchflusszytometer	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Magnetrührer IKAMAG RCT	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mikroskop DM IL	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Mikrotom SM2000R	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
NanoDrop 2000 Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA
Orbitalshaker (WB) Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
PAS Durchflusszytometer	Sysmex Partec GmbH, Goerlitz, Deutschland
pH-Meter CG820	Schott Geräte GmbH, Mainz
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
PowerPac 200	Biorad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Präzisionswaage	VWR International, LLC., Radnor, PA, USA
Reiskocher Pro 42518	Gastroback GmbH, Hollenstedt
Rotixa 120R	Hettich GmbH & Co. oHG, Kirchlingern
Schüttler MTS2	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
SDS PAGE Laufkammer	Biorad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Sicherheitswerkbank HeraSafe HS15	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Tank Western Blotting System	Biorad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge MiniSpin	Eppendorf AG, Hamburg
Waage 440-33	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Wasserbad	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Wasserbad (Paraffinschnitte) 1052	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Zellinkubator functionLine	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Zentrifuge 5810	Eppendorf AG, Hamburg

5.2.3 Plasmide

Verwendung	Bezeichnung	Artikelnummer / CloneID	Hersteller /Herkunft
shRNA-Vektoren	pGIPZ shPHGDH #1	RHS4430-29123817 / V2LHS_91258	
	pGIPZ shPHGDH #2	RHS4430-29123817 / V3LHS_327722	
	pGIPZ shPHGDH #3	RHS4430-29123817 / V3LHS_327719	
	pGIPZ shPHGDH #4	RHS4430-29123817 / V2LHS_327723	GE Healthcare Biosciences AB, Rosersberg, Schweden
	pGIPZ shPSAT1 #1	RHS4430-29123817 / V2LHS_66301	
	pGIPZ shPSAT1 #2	RHS4430-29123817 / V2LHS_66303	
	pGIPZ shPSAT1 #3	RHS4430-29123817 / V3LHS_398323	
	pGIPZ shPSAT1 #4	RHS4430-29123817 / V3LHS_398321	
RGB-Marking-Plasmide	pLeGO-Cer2 (Cerulean)	Dankenswerterweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. Kristoffer Riecken und Prof. Dr. Boris Fehse, Interdisziplinäre Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf	
	pLeGO-V2 (Venus)		
	pLeGO-C2 (mCherry)		

5.2.4 Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Citratpuffer	2,4 g/L Natriumcitrat 0,4 g/L Citronensäure-Monohydrat
Differenzierungslösung (HE-Färbung)	21,6 ml 25% HCl (aq) 964 ml Ethanol
Laufpuffer (SDS PAGE)	1,87 M Glycin 0,25 M Tris-HCl 1% (w/v) SDS
TBST / TNT	0,15 M NaCl 10 mM Tris-HCl 0,05% Tween 20
Transferpuffer (Western Blotting)	1,92 M Glycin 0,5 M Tris-HCl 0,05 M Tris-HCl
TTP	0,145 M NaCl 0,01% Triton X100 pH 7,6
Vehikellösung (VLA)	35% (v/v) PEG 300 5% (v/v) Ethanol 60% (30% (w/w) (2-Hydroxypropyl)- β -cyclodextrin)

5.2.5 Kits

Kit	Hersteller
CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	Promega Corp., Madison, WI, USA
Clarity Western ECL Substrat	Biorad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
NucleoSpin Tissue XS Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA
ViraPower Lentiviral Expression System	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA
NucleoBond Xtra Maxiprep-Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren

5.2.6 Antikörper

Epitop	Organismus	Art	Klon/Art.Nr.	Hersteller
IDH1 R132H	Maus	Monoklonal	H09	Dianova GmbH, Hamburg
PHGDH	Kaninchen	Polyklonal	HPA021241 (Klon Ab1)	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt
PSAT1	Kaninchen	Polyklonal	PA5-22124	Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA
SLC1A4	Kaninchen	Polyklonal	PA5-88596	Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA
β -Aktin	Maus	Monoklonal	A2228	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt
anti-Kaninchen-HRP	Ziege	Polyklonal	A0545	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt
anti-Maus-HRP	Kaninchen	Polyklonal	A9309	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt
anti-Maus-HRP (IHC)	Ziege	Histofine Simple Stain Mouse MAX PO		Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan

5.2.7 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
0,5 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
1,5 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
15 ml Zentrifugenröhrchen	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
2 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
24 Well Ultra Low Attachment Zellkulturplatten	Corning, Inc., Corning, NY, USA
24 Well Zellkulturplatten	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
50 ml Zentrifugenröhrchen	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
6 Well Ultra Low Attachment Zellkulturplatten	Corning, Inc., Corning, NY, USA
6 Well Zellkulturplatten	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
96 Well Black/Clear Bottom Zellkulturplatten	Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA
96 Well Zellkulturplatten	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Biopsie-Einbettkassetten "Swingsette"	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Durchflussszytometerröhrchen	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Filter-Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Polyacrylamidgele Mini Protean TGX 4-15%	Biorad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Guide screws – Führungsschrauben zur Implantation (1,6 mm Länge, 0,51 mm Kanal, C212SG)	Bilaney Consultants GmbH, Düsseldorf

5.2.8 Zellkultur

5.2.8.1 Zelllinien

Zelllinie	Zellkultur	Ursprung
BS153	Neurosphären	Glioblastom
BT112	Neurosphären	Glioblastom
GS-101	Neurosphären	Glioblastom
GS-57	Neurosphären	Glioblastom
GS-74	Neurosphären	Glioblastom
GS-86	Neurosphären	Glioblastom
GS-90	Neurosphären	Glioblastom
HEK293FT	Adhärent	Humane embryonale Nierenzellen
MDA-MB-231	Adhärent	Adenokarzinom, Brustkrebs
MDA-MB-468	Adhärent	Adenokarzinom, Brustkrebs
NCH1681	Neurosphären	WHO-Grad III Astrozytom
NCH421k	Neurosphären	Glioblastom
NCH551b	Neurosphären	Glioblastom
NCH620	Neurosphären	Glioblastom
NCH644	Neurosphären	Glioblastom
U87	Adhärent	Glioblastom

5.2.8.2 Zellkulturmedien und -agenzien

Medium/Reagenz	Hersteller
Accutase	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA
Accutase	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA
B27 Supplement	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA
Collagenase/Dispase	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt
Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA
Epidermal Growth Factor (Human EGF)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA
Fätales Kälberserum (FCS)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA
Fibroblast Growth Factor (Human FGF-basic)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA
Glutamax	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA
Heparin	Ratiopharm GmbH, Ulm
Neurobasal A Medium	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA
Trypsin/EDTA (0,05%)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA

5.3 Skripte

5.3.1 Skript zur Errechnung der EC₅₀-Werte aus Dosis-Wirkungs-Experimenten mit NCT-503 und CBR-5884

```

library(xlsx)
library(plotly)
library(RColorBrewer)
path<-"C:/Users/..."
order_CL=c("BT112","GS-101","GS-74","GS8","BT145","GS-90","MDA-MB-231","MDA-MB-468","GS-57","GS-86","NCH1681","NCH551b","NCH620","NCH644")
xlsxfiles=list.files(path=path,pattern="*.xlsx")
concentrations=c(100,50,25,12.5,6.25,3.125,1.5625,0.78125,0,0)
key1=c(4,3,2,1,8,7,6,5)
key2=c(8:1)
logx <- log10(conc)
x<- seq(-2,3,by=0.001)
plot_x=seq(-1,2.5,by=0.01)
start_i=1
mypalette <- brewer.pal(end_i, "Dark2")

###NCT-503 DATA#####
for(i in start_i:length(xlsxfiles)){
  ctg=read.xlsx(paste(path,"/",xlsxfiles[i],sep=""),sheetIndex = 1,startRow = 34,endRow = 42,colIndex = 2:13)
  results1=cbind(ctg[2:4,2:5],ctg[2:4,7:10])
  temp_res1=results1
  results1[2,]=temp_res1[2,key1]
  results1[3,]=temp_res1[3,key2]
  results1=cbind(results1,ctg[2:4,c(6,11)])
  results2=results1[,1:8]/mean(colMeans(results1[,7:8],na.rm=T),na.rm=T)

  ##Spacer
  spacer=array(data=NA,dim=c(5,10))
  colnames(spacer)=colnames(results1)

  if(i==start_i){
    dataset=rbind(c(order_CL[i-start_i+1],rep(NA,9)),concentrations,results1,spacer)
    plot(concentrations[1:8], colMeans(results1[,1:8]), xlim=c(0.01,1000), ylim=c(0,1.1),
type="n", xlab="log(Concentration)", ylab="Cell viability", log="x")
  }
  else{
    dataset=rbind(dataset,rep(NA,10),c(order_CL[i-start_i+1],rep(NA,9)),concentrations,results1,spacer)
  }

  #####FITTING TO SIGMOID CURVE#####
  c11=colMeans(results1[,1:8],na.rm = T)/mean(colMeans(results1[,7:8],na.rm=T),na.rm=T)

  #-----Curve Fit -----
  model.01 <- nls(c11 ~ SSlogis(logx, asym, xmid, scal))
  coef.01<-coef(summary(model.01))[,1]
  #-----Wendepunkt finden und einzeichnen -----
  est.01<-1/(1+exp((coef.01[2]-x)/coef.01[3]))
  infpcl1<-inflection:bede(x,est.01,1)
  ifpointxc11<-infpcl1$iplast[1]
  ifpointyc11<-1/(1+exp((coef.01[2]-ifpointxc11)/coef.01[3]))

  #####PLOTTING#####
  resultsSD=sapply(results2[,1:8],sd,2)
  fun1<-function(x) 1/(1+exp((coef.01[2]-log10(x))/coef.01[3]))
  c11=c11/coef.01[1]
  if(i==start_i){
    fig<-plot_ly(x=~10^plot_x)
    fig<-layout(fig, xaxis=list(type="log",range=c(log10(0.5),log10(120))))
  }
  fig<-fig %>% add_lines(y=fun1(10^plot_x),name=order_CL[i-start_i+1],color=mypalette[i-start_i+1])
  fig<-fig %>%
add_markers(x=concentrations[1:8],y=as.numeric(c11),showlegend=F,color=mypalette[i-start_i+1],
error_y=list(array=resultsSD[1:8],thickness=1))
  if(i==start_i){ec50=as.data.frame(c(order_CL[i],10^ifpointxc11))}
  else{ec50[,i]=c(order_CL[i],10^ifpointxc11)}
}
fig

```

5.3.2 Laden und Prozessierung der Methylierungsarray-Daten zur Erstellung von PCA, tSNE und Korrelations-Plots

```

library(conumee)
library(ChAMP)
library(xlsx)
library(ggplot2)
library(heatmap)
library(Rtsne)

pathepic<-"C:/Users/..."
pathControls<-"C:/Users/..."

myLoadControls<-champ.load(pathControls,arraytype="EPIC")
myLoadEpic<-champ.load(pathepic,arraytype="EPIC")

##### NORMAL METHYLATION PROCESSING
myNormEpic <- champ.norm(beta=myLoadEpic$beta,arraytype="EPIC",cores=2)
champ.QC(beta=myNormEpic, pheno=myLoadControls$pd$Sample_Name)

#PCA
pca<-prcomp(t(myNormEpic))
factoextra::fviz_pca_ind(pca,repel=TRUE, col.ind = "cos2",gradient.cols = c("#00AFBB",
"#E7B800", "#FC4E07"), labels=3)

#Korrelationsmatrix
corrmatrix=cor(myNormEpic,use = "pairwise.complete.obs", method=c("pearson"))
heatmap(corrmatrix)

## t-SNE
variables=samples=====
set.seed(55)
tsne_out <- Rtsne(t(myNormEpic), dims=2, verbose = TRUE, scale=TRUE,perplexity=3)

## getting the two dimension matrix
d_tsne_1 = as.data.frame(tsne_out$Y)
colors=colnames(myNormEpic)
tsne_plot <- data.frame(x = tsne_out$Y[,1], y = tsne_out$Y[,2], col = colors)

require("ggrepel")
## plotting the results without clustering
ggplot(tsne_plot,aes(x=tsne_out$Y[,1], y=tsne_out$Y[,2], fill=as.factor(colnames(myNormEpic)),
label=colnames(myNormEpic))) +
  scale_color_manual(values=c("#C65501","dodgerblue3","darkorchid4","black"))+
  scale_fill_manual(values=c("#C65501","deepskyblue","#B16AE0","black"))+
  geom_point(size=6,shape=21,stroke=1.3, colour="black",aes(x=tsne out$Y[,1], y=tsne out$Y[,2],
fill=as.factor(colnames(myNormEpic)))) +
  geom_text_repel(aes(color=colnames(myNormEpic)),size=4.5, show.legend = FALSE, box.padding =
0.5)+
  xlab("t-SNE 1") + ylab("t-SNE 2") +
  theme_light(base_size=20) +
  theme(legend.title=element_blank(),panel.border = element_rect(size=2,colour = "black"),
panel.grid.major = element_blank(),
panel.grid.minor = element_blank(), axis.ticks = element_line(size=1,colour = "black"))

```

5.3.3 Erstellung von CNV-Profilen aus Methylierungsarray-Daten

```

int_epic=myLoadEpic$intensity[order(row.names(myLoadEpic$intensity)),]
int_controls=myLoadControls$intensity[order(row.names(myLoadControls$intensity)),]

cna_int=merge(int_epic, int_controls, by.x=0, by.y=0)
row.names(cna_int)=cna_int[,1]
cna_int=cna_int[,-1]
cna_pd=rbind(myLoadEpic$pd,myLoadControls$pd)

cna_methset=MethylSet(Meth=cna_int/2, Unmeth=cna_int/2)
methset_annotation=c("IlluminaHumanMethylationEPIC","ilm10b4.hg19") #EPIC
names(methset_annotation)=c("array","annotation")
annotation(cna_methset)=methset_annotation

minfi.data=CNV.load(cna_methset)
Mset2 <- mapToGenome(cna_methset)

minfi.anno=CNV.create_anno(array_type = "EPIC")

```

```

minfi.anno@probes <- subsetByOverlaps(minfi.anno@probes, granges(Mset2))
minfi.controls <- cna_pd$Sample_Group == "N"

#####CALCULATE CNVs#####

#== METHOD 2: Get running means from bins and merge bins manually ==#
kk=1
for(ii in 1:length(minfi.data@intensity)){
  if(cna_pd$Sample_Group[ii] != "N"){
    cnv_fit=CNV.fit(minfi.data[ii], minfi.data[minfi.controls],minfi.anno)
    cnv_bin=CNV.bin(cnv_fit)

    #####get running mean#####
    Rmeans=cbind(as.data.frame(cnv_bin@bin$ratio), as.data.frame(cnv_bin@anno@bins@ranges))
    Rmeans=Rmeans[,c(5,2,3,1)]
    Rmeans[is.na(Rmeans[,4])]==1,4]<-0
    colnames(Rmeans)[1]="chr"
    Rmeans$chr=as.numeric(substr(Rmeans$chr,4,nchar(Rmeans$chr)-5))
    chr=1
    k=1
    lastposMeans=0
    for(i in 1:nrow(Rmeans)){
      if(Rmeans$chr[i]==chr){
        Rmeans$num[i]=k
        k=k+1
      }
      else{
        k=1
        lastposMeans[chr]=i-1
        chr=chr+1
        Rmeans$num[i]=k
      }
    }
    lastposMeans[22]=nrow(Rmeans)
    mlength=25
    mmid=12

    for(i in 1:nrow(Rmeans)){
      if(Rmeans$num[i]<=mmid){
        Rmeans$rmean[i]=mean(Rmeans[(i-Rmeans$num[i]+1):(Rmeans$num[i]+mlength),4])
      }
      else{
        if(i<(lastposMeans[Rmeans$chr[i]]-mmid)){

          Rmeans$rmean[i]=mean(Rmeans[(i-mmid+1):(i+mmid-1),4])
        }
        else{
          Rmeans$rmean[i]=mean(Rmeans[(lastposMeans[Rmeans$chr[i]]-
mlength+1):lastposMeans[Rmeans$chr[i]],4])
        }
      }
    }

    #####Binning#####
    k=1
    chr=1
    cutoff=0.05 #default: 0.05
    Rmeans$bin=0
    Rmeans$bin[1:10]=1
    for(i in 11:nrow(Rmeans)){
      if(abs(abs(Rmeans$rmean[i])-abs(mean(Rmeans$rmean[Rmeans$bin==k])))<cutoff){
        if(Rmeans$chr[i]!=chr){
          chr=chr+1
          k=k+1
        }
        Rmeans$bin[i]=k
      }
      else{
        k=k+1
        Rmeans$bin[i]=k
      }
    }

    rmsegment=as.data.frame(matrix(1:max(Rmeans$bin)))
    for(i in 1:nrow(rmsegment)){
      rmsegment$chr[i]=min(Rmeans$chr[Rmeans$bin==i])
      rmsegment$start[i]=min(Rmeans$start[Rmeans$bin==i])
      rmsegment$end[i]=max(Rmeans$end[Rmeans$bin==i])
    }
  }
}

```

```

    rmsegment$width[i]=rmsegment$end[i]-rmsegment$start[i]+1
    rmsegment$value[i]=mean(Rmeans$rmean[Rmeans$bin==i])
  }
  rmsegment=rmsegment[,-1]

  if(kk!=1){
    sample_results[[kk]]=rmsegment
    y.shift[kk]=cnv_bin@bin$shift
  }
  else{
    sample_results=list(rmsegment)
    y.shift=cnv_bin@bin$shift
  }
  names(sample_results)[kk]=names(minfi.data[ii])
  kk=kk+1
}
}

##### PREPARE DATA FOR PLOTTING #####
temp_results=sample_results[[1]]
colnames(temp_results)[2:3]=c("position","position")
allCNAPositions=rbind(temp_results[,1:2],temp_results[,c(1,3)])

for (i in 1:length(sample_results)){
  temp_results=sample_results[[i]]

  colnames(temp_results)[2:3]=c("position","position")
  allCNAPositions=rbind(allCNAPositions,temp_results[,1:2],temp_results[,c(1,3)])
}

#Import Chromosome Lengths
ChromosomeLengths=read.xlsx("C:/Users/.../ChromosomeLengths.xlsx",sheetIndex = 1)

#insert position 1 of every chromosome
PosOne=cbind(matrix(1:22,nrow = 22, ncol = 1),matrix(rep(1,22),ncol=1))
#insert last position of every chromosome
colnames(PosOne)=colnames(allCNAPositions)
#colnames(ChromosomeLengths)=colnames(allCNAPositions)
allCNAPositions=rbind(allCNAPositions,PosOne)
colnames(ChromosomeLengths)[1:2]=colnames(allCNAPositions)[1:2]
allCNAPositions_last=rbind(allCNAPositions,ChromosomeLengths[,1:2])

#Check for duplicates
allCNAPositions=unique(allCNAPositions)
allCNAPositions_last=unique(allCNAPositions_last)

#order
allCNAPositions[,1]=as.numeric(paste(allCNAPositions[,1]))
allCNAPositions=allCNAPositions[order(allCNAPositions[,1],allCNAPositions[,2]),]

allCNAPositions_last[,1]=as.numeric(paste(allCNAPositions_last[,1]))
allCNAPositions_last=allCNAPositions_last[order(allCNAPositions_last[,1],allCNAPositions_last[,2]),]

#make new matrix for all results
cna_results=matrix(0L, nrow = nrow(allCNAPositions), ncol = length(sample_results))
colnames(cna_results)=names(sample_results)

#Fill in values
for (i in 1:length(sample_results)){
  temp_results=sample_results[[i]]

  for(k in 1:nrow(temp_results)){
    cna_results[allCNAPositions$chr==temp_results$chr[k] &
allCNAPositions[,2]>=temp_results[k,2] &
allCNAPositions[,2]<=temp_results[k,3],i]=temp_results[k,5]-y.shift[i]
  }
}

#calculate distances as x values=====
cna_dist=as.data.frame(allCNAPositions[,1])
chr=1
pos=1
for(i in 1:nrow(allCNAPositions_last)){
  if(i<nrow(allCNAPositions_last)){
    if(allCNAPositions_last[(i+1),1]==chr){
      cna_dist[pos,2]=allCNAPositions_last[(i+1),2]-allCNAPositions_last[i,2]
    }
  }
}

```

```

    cna_dist[pos,1]=chr
    pos=pos+1
  }
  else{
    chr=chr+1
  }
}
}

colnames(cna_dist)=c("chr","length")
cna_dist2=cbind(cna_dist[,2],cna_results)
mutated=as.data.frame(cna_dist)
mutated$id=matrix( rep(colnames(cna_results)[1],nrow(mutated)),nrow = nrow(mutated), ncol = 1)

for(i in 2:ncol(cna_results)){
  mut_temp=as.data.frame(cna_dist)
  mut_temp$id=matrix( rep(colnames(cna_results)[i],nrow(cna_dist)),nrow = nrow(cna_dist), ncol =
1)
  mutated=rbind(mutated,mu_temp)
}

#####Set position of solid and dashed lines#####
#where the seperation lines for chromosomes and centromeres should be...
#Chromosome start/end...
solid_line_position=rbind(0,as.data.frame(ChromosomeLengths[,3]))
#Centromeres
centromeres=read.xlsx("C:/Users/.../centromeres_hg19.xlsx",sheetIndex = 1)
#remove X and Y chromosomes
centromeres=centromeres[-c(10,11),]
centromeres2=rbind(rowMeans(centromeres[1,2:3]),as.matrix(rowMeans(centromeres[2:22,2:3])+as.nu
meric(as.matrix(ChromosomeLengths[1:21,3]))))

#make everything relative to last position (chr22)
lastpos=as.numeric(solid_line_position[nrow(solid_line_position),1])
solid_line_position2=as.numeric(as.matrix(solid_line_position)/lastpos)
centromeres2=centromeres2/lastpos

##### PLOT
#####

#Chromosome Annotation
ChrText=c("chr 1","chr 2","chr 3","chr 4","chr 5","chr 6","chr 7","chr 8","chr 9","chr 10","chr
11","chr 12","chr 13","chr 14","chr 15","chr 16","chr 17","chr 18","chr 19","chr 20","chr
21","chr 22")
ChrTextPos=(ChromosomeLengths[,3]-ChromosomeLengths[,2]/2)/ChromosomeLengths[22,3]

barplot= ggplot(mutated[,2:3], aes(fill=as.vector(cna_results), y=mutated[,2], x=mutated$id)) +
  geom_bar(position="fill", stat="identity") +
  scale_y_continuous(breaks=ChrTextPos,labels=ChrText,expand = c(0,0))

#Aesthetics
barplot+scale_fill_gradientn(colours =
c("cyan","blue","midnightblue","black","yellow","yellow","white"), limits=c(-1,1) ) +
  geom_hline(yintercept=solid_line_position2, color="white",alpha=1,size=0.5) + #solid lines
default size 0.1
  geom_hline(yintercept=centromeres2,linetype="dashed",color="grey",alpha=0.5,size=0.5) +
#dashed lines
labs(fill="Gain/Loss") + #legend title
theme_classic() +
theme(axis.text.x = element_text(angle = 90),
axis.title.x = element_blank(),
axis.title.y = element_blank(),
axis.text.y = element_text(size=12,face = "bold"),
axis.ticks.y = element_blank(),
axis.line = element_blank(),
panel.spacing.y = element_blank(),
panel.background = element_rect(fill = "grey13"),
panel.border=element_blank(),
plot.margin = unit(c(1,1,1,3),"lines")
)

```

5.3.4 Verwendete Chromosomlängen für die Generierung von CNV-Profilen

Chromosom	Länge	Absolute Endposition	Centromer-Position
1	248956422	248956422	123035434
2	242193529	491149951	93826171
3	198295559	689445510	92004854
4	190214555	879660065	51160117
5	181538259	1061198324	47905641
6	170805979	1232004303	60330166
7	159345973	1391350276	59554331
8	145138636	1536488912	45338887
9	138394717	1674883629	48867679
10	133797422	1808681051	40754935
11	135086622	1943767673	53144205
12	133275309	2077042982	36356694
13	114364328	2191407310	17500000
14	107043718	2298451028	17500000
15	101991189	2400442217	18500000
16	90338345	2490780562	36835801
17	83257441	2574038003	23763006
18	80373285	2654411288	16960898
19	58617616	2713028904	26181782
20	64444167	2777473071	27869569
21	46709983	2824183054	12788129
22	50818468	2875001522	14500000

5.4 Publikationsverzeichnis

Maire CL, Mohme M, Bockmayr M, **Fita KD**, Riecken K, Börnigen D, Alawi M, Failla A, Kolbe K, Zapf S, Holz M, Neumann K, Dührsen L, Lange T, Fehse B, Westphal M, Lamszus K. Glioma escape signature and clonal development under immune pressure. *J Clin Invest.* 2020

Mohme M, Maire CL, Geumann U, Schliffke S, Dührsen L, **Fita K**, Akyüz N, Binder M, Westphal M, Guenther C, Lamszus K, Hermann FG, Schmidt NO. Local Intracerebral Immunomodulation Using Interleukin-Expressing Mesenchymal Stem Cells in Glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 2020

Ricklefs FL, **Fita KD**, Rotermund R, Piffko A, Schmid S, Capper D, Buslei R, Buchfelder M, Burkhardt T, Matschke J, Lamszus K, Westphal M, Schüller U, Flitsch J. Genome-wide DNA methylation profiles distinguish silent from non-silent ACTH adenomas. *Acta Neuropathol.* 2020

Schönherr R, Klinge M, Rudolph JM, **Fita K**, Rehders D, Lübber F, Schneegans S, Majoul IV, Duszenko M, Betzel C, Brandariz-Nuñez A, Martinez-Costas J, Duden R, Redecke L. Real-time investigation of dynamic protein crystallization in living cells. *Struct Dyn.* 2015

5.5 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung / Begriff	Erklärung
2HG	2-Hydroxyglutarat
2PG	2-Phosphoglycerat
3PG	3-Phosphoglycerat
3PHP	3-Phosphohydroxypyruvat
3PS	3-Phosphoserin
A, IDH HG	IDH-mutiertes hochgradiges Astrozytom
BSA	Bovines Serumalbumin
CBR-5884	Wirkstoff zur Inhibition von PHGDH
CDKN2A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
Cer	Cerulean
Chr	Chromosom
CM-H ₂ DCFDA	Chloromethyl-2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat
CNV	Copy Number Variation / Kopienanzahlvariation
DCF	Dichlorofluorescein
ddPCR	Digital Droplet PCR
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dm- α -KG	Dimethyl- α -Ketoglutarat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EC ₅₀	Effektive Konzentration (50): Konzentration, bei der ein 50%iger Effekt erzielt werden konnte
EGF	Endothelial Growth Factor
EGFR	Endothelial growth factor receptor
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting / Teilweise als Synonym für Durchflusszytometrie verwendet
FC	Durchflusszytometrie
FCS	Fätales Kälberserum
FCS (-Datei)	Dateiformat, in dem FACS-Daten üblicherweise gespeichert werden
FGF	Fibroblast Growth Factor
FM	Fluoreszenzmikroskopie
FSC	Forward Scatter (FACS)
GBM	Glioblastom
G-CIMP	Glioma CpG island methylator phenotype
GFP	Green Fluorescent Protein
GL261	Maus-Gliomzelllinie
GSH	Glutathion
GUI	Graphical User Interface / Graphische Benutzeroberfläche
HE-Färbung	Hämatoxillin/Eosin-Färbung
IDH1	Isocitratdehydrogenase 1
IDHmut	IDH-mutiert
IDHwt	IDH-Wildtyp
IHC	Immunhistochemie
K	Kontrolle

Abkürzung / Begriff	Erklärung
K-	Negativkontrolle
K+	Positivkontrolle
kDa	Kilodalton
LOH	Loss of Heterozygosity / Verlust der Heterozygotie
Matlab	Programmiersprache
mCh	mCherry (rot fluoreszierendes Protein)
MGMT	O ⁶ -Methylguanine-DNA-Methyltransferase
NAC	N-Acetylcystein
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NBM	Neurobasal-Medium
NBM	Neurobasal A Medium mit Zusätzen, Serumfreies Medium zur Kultivierung von Gliomzellen als Neurosphären
NCT-503	Wirkstoff zur Inhibition von PHGDH
Oligoklon	Zellpopulation, die eine kleine Anzahl verschiedenfarbiger RGB-markierter Zellklone enthält
PBS	Phosphate buffered saline / Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCA	Principal component analysis / Hauptkomponentenanalyse
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGFRA	Platelet-Derived Growth Factor Receptor A
PEP	Phosphoenolpyruvat
PHGDH	Phosphoglyceratdehydrogenase
PSAT1	Phosphoserin-Aminotransferase 1
PSPH	Phosphoserinphosphatase
PTEN	Protein / „Phosphatase And Tensin Homolog“
R	Programmiersprache
RGB	Rot Grün Blau
RGB	Rot-Grün-Blau
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RTKI	Rezeptortyrosinkinase I
RTKII	Rezeptortyrosinkinase II
SDS- PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
shRNA	Short hairpin RNA
SLC1A4 / ASCT1	Solute Carrier Family 1, Member 4 / Alanine/Serine/Cysteine/Threonine Transporter 1
SLC1A5 / ASCT2	Solute Carrier Family 1, Member 5 / Alanine/Serine/Cysteine/Threonine Transporter 2
SSC	Sideways Scatter (FACS)
tSNE	t-distributed Stochastic Neighbor Embedding
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
WT	Wildtyp
x g	X-faches der Erdanziehungskraft
ZNS	Zentrales Nervensystem
α-KG	α-Ketoglutarat / 2-Oxoglutarat
χ-Wert	Chromatizitätswert, in der vorliegenden Arbeit entwickelte Metrik zur Schätzung der klonalen Homo-/Heterogenität RGB-markierter Zellpopulationen

5.6 Literaturverzeichnis

1. Ostrom, Q. T. *et al.* CBTRUS statistical report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2013-2017. *Neuro. Oncol.* **22**, IV1–IV96 (2020).
2. WHO. *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System.* (2016).
3. Westphal, M. & Lamszus, K. The neurobiology of gliomas: From cell biology to the development of therapeutic approaches. *Nat. Rev. Neurosci.* **12**, 495–508 (2011).
4. Zong, H., Parada, L. F. & Baker, S. J. Cell of origin for malignant gliomas and its implication in therapeutic development. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, 1–13 (2015).
5. Stupp, R. *et al.* Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **352**, 987–996 (2005).
6. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N. Engl. J. Med.* **372**, 2481–2498 (2015).
7. Reifenberger, G., Wirsching, H. G., Knobbe-Thomsen, C. B. & Weller, M. Advances in the molecular genetics of gliomas-implications for classification and therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **14**, 434–452 (2017).
8. Capper, D. *et al.* DNA methylation-based classification of central nervous system tumours. *Nature* **555**, 469–474 (2018).
9. Weller, M. *et al.* Molecular classification of diffuse cerebral WHO grade II/III gliomas using genome- and transcriptome-wide profiling improves stratification of prognostically distinct patient groups. *Acta Neuropathol.* **129**, 679–693 (2015).
10. Wiestler, B. *et al.* Integrated DNA methylation and copy-number profiling identify three clinically and biologically relevant groups of anaplastic glioma. *Acta Neuropathol.* **128**, 561–571 (2014).
11. Suzuki, H. *et al.* Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas. *Nat. Genet.* **47**, 458–468 (2015).
12. Ricklefs, F. L. *et al.* Genome-wide DNA methylation profiles distinguish silent from non-silent ACTH adenomas. *Acta Neuropathol.* **140**, 95–97 (2020).
13. Hegi, M. E. *et al.* MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **352**, 997–1003 (2005).
14. Cho, S., Kim, H. S., Zeiger, M. A., Umbricht, C. B. & Cope, L. M. Measuring DNA Copy Number Variation Using High-Density Methylation Microarrays. *J. Comput. Biol.* **26**, 295–304 (2019).
15. Bady, P. *et al.* MGMT methylation analysis of glioblastoma on the Infinium methylation BeadChip identifies two distinct CpG regions associated with gene silencing and outcome, yielding a prediction model for comparisons across datasets, tumor grades, and CIMP-status. *Acta Neuropathol.* **124**, 547–560 (2012).
16. Braczynski, A. K. *et al.* High density DNA methylation array is a reliable alternative for PCR-based analysis of the MGMT promoter methylation status in glioblastoma. *Pathol. Res. Pract.* **216**, 152728 (2020).
17. Koschmann, C. *et al.* ATRX loss promotes tumor growth and impairs nonhomologous end joining DNA repair in glioma. *Sci. Transl. Med.* **8**, 328ra28 (2016).
18. Ohgaki, H. & Kleihues, P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin. Cancer Res.* **19**, 764–772 (2013).
19. Hoadley, K. A. *et al.* Cell-of-Origin Patterns Dominate the Molecular Classification of 10,000 Tumors from 33 Types of Cancer. *Cell* **173**, 291–304.e6 (2018).
20. Paschka, P. *et al.* IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication. *J. Clin. Oncol.* **28**, 3636–3643 (2010).
21. Figueroa, M. E. *et al.* Leukemic IDH1 and IDH2 Mutations Result in a Hypermethylation Phenotype, Disrupt TET2 Function, and Impair Hematopoietic Differentiation. *Cancer Cell* **18**, 553–567 (2010).

22. Yan, H. *et al.* IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *N. Engl. J. Med.* **360**, 765–773 (2009).
23. Wang, Q. *et al.* Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer Cell* **32**, 42–56.e6 (2017).
24. Bhat, K. P. L. *et al.* Mesenchymal Differentiation Mediated by NF- κ B Promotes Radiation Resistance in Glioblastoma. *Cancer Cell* **24**, 331–346 (2013).
25. Sandmann, T. *et al.* Patients with proneural glioblastoma may derive overall survival benefit from the addition of bevacizumab to first-line radiotherapy and temozolomide: Retrospective analysis of the AVAglio trial. *J. Clin. Oncol.* **33**, 2735–2744 (2015).
26. Brennan, C. W. *et al.* The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* **155**, 462–477 (2013).
27. Sturm, D. *et al.* Hotspot Mutations in H3F3A and IDH1 Define Distinct Epigenetic and Biological Subgroups of Glioblastoma. *Cancer Cell* **22**, 425–437 (2012).
28. Dang, L. *et al.* Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* **462**, 739 (2009).
29. Jin, G. *et al.* 2-hydroxyglutarate production, but not dominant negative function, is conferred by glioma-derived NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase mutations. *PLoS One* **6**, 1–8 (2011).
30. Xiao, D. *et al.* The glutamine-alpha-ketoglutarate (AKG) metabolism and its nutritional implications. *Amino Acids* **48**, 2067–2080 (2016).
31. Danbolt, N. C. Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology* **65**, 1–105 (2001).
32. Guo, J. U., Su, Y., Zhong, C., Ming, G. L. & Song, H. Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell* **145**, 423–434 (2011).
33. Noushmehr, H. *et al.* Identification of a CpG Island Methylator Phenotype that Defines a Distinct Subgroup of Glioma. *Cancer Cell* **17**, 510–522 (2010).
34. Heiden, M. G. V., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **324**, 1029–1033 (2009).
35. Gelman, S. J. *et al.* Consumption of NADPH for 2-HG Synthesis Increases Pentose Phosphate Pathway Flux and Sensitizes Cells to Oxidative Stress. *Cell Rep.* **22**, 512–522 (2018).
36. Jin, G. *et al.* Disruption of wild-type IDH1 suppresses D-2-hydroxyglutarate production in IDH1-mutated gliomas. *Cancer Res.* **73**, 496–501 (2013).
37. Ward, P. S. *et al.* The potential for isocitrate dehydrogenase mutations to produce 2-hydroxyglutarate depends on allele specificity and subcellular compartmentalization. *J. Biol. Chem.* **288**, 3804–3815 (2013).
38. Ma, S., Jiang, B., Deng, W., Gu, Z. & Wu, F. D-2-hydroxyglutarate is essential for maintaining oncogenic property of mutant IDH-containing cancer cells but dispensable for cell growth. *Oncotarget* **6**, 1–15 (2015).
39. Tiburcio, P. D. B. *et al.* Functional requirement of a wild - type allele for mutant IDH1 to suppress anchorage - independent growth through redox homeostasis. *Acta Neuropathol.* **135**, 285–298 (2018).
40. Mazar, T. *et al.* Clonal expansion and epigenetic reprogramming following deletion or amplification of mutant IDH1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 10743–10748 (2017).
41. Johannessen, T. A. *et al.* Rapid Conversion of Mutant IDH1 from Driver to Passenger in a Model of Human Gliomagenesis. **14**, 976–984 (2016).
42. Ceccarelli, M. *et al.* Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. *Cell* **164**, 550–563 (2016).
43. Capper, D., Zentgraf, H., Balss, J., Hartmann, C. & Von Deimling, A. Monoclonal antibody specific for IDH1 R132H mutation. *Acta Neuropathol.* **118**, 599–601 (2009).

44. Capper, D. *et al.* Characterization of r132h mutation-specific idh1 antibody binding in brain tumors. *Brain Pathol.* **20**, 245–254 (2010).
45. Marumoto, T. & Saya, H. Molecular biology of glioma. *Adv. Exp. Med. Biol.* **746**, 2–11 (2012).
46. Noch, E. K., Ramakrishna, R. & Magge, R. Challenges in the Treatment of Glioblastoma: Multisystem Mechanisms of Therapeutic Resistance. *World Neurosurg.* **116**, 505–517 (2018).
47. Uno, M. *et al.* Correlation of MGMT promoter methylation status with gene and protein expression levels in glioblastoma. *Clinics* **66**, 1747–1755 (2011).
48. Alonso, M. M., Gomez-Manzano, C., Bekele, B. N., Yung, W. K. A. & Fueyo, J. Adenovirus-based strategies overcome temozolomide resistance by silencing the O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter. *Cancer Res.* **67**, 11499–11504 (2007).
49. Yamashiro, K., Nakao, K., Ohba, S. & Hirose, Y. Human glioma cells acquire temozolomide resistance after repeated drug exposure via DNA mismatch repair dysfunction. *Anticancer Res.* **40**, 1315–1323 (2020).
50. Ewelt, C. *et al.* Glioblastoma multiforme of the elderly: The prognostic effect of resection on survival. *J. Neurooncol.* **103**, 611–618 (2011).
51. Sanai, N., Polley, M. Y., McDermott, M. W., Parsa, A. T. & Berger, M. S. An extent of resection threshold for newly diagnosed glioblastomas: Clinical article. *J. Neurosurg.* **115**, 3–8 (2011).
52. Van Tellingen, O. *et al.* Overcoming the blood-brain tumor barrier for effective glioblastoma treatment. *Drug Resistance Updates* **19**, 1–12 (2015).
53. Burgess, J. T. *et al.* The Therapeutic Potential of DNA Damage Repair Pathways and Genomic Stability in Lung Cancer. *Frontiers in Oncology* **10**, 1256 (2020).
54. Hussain, M. *et al.* Survival with Olaparib in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* **383**, 2345–2357 (2020).
55. Hanna, C. *et al.* Pharmacokinetics, safety, and tolerability of olaparib and temozolomide for recurrent glioblastoma: Results of the phase I OPARATIC trial. *Neuro. Oncol.* **22**, 1840–1850 (2020).
56. Lesueur, P. *et al.* Phase I/IIa study of concomitant radiotherapy with olaparib and temozolomide in unresectable or partially resectable glioblastoma: OLA-TMZ-RTE-01 trial protocol. *BMC Cancer* **19**, (2019).
57. Bregy, A. *et al.* The role of Gliadel wafers in the treatment of high-grade gliomas. *Expert Review of Anticancer Therapy* **13**, 1453–1461 (2013).
58. Kim, K. J. *et al.* Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* **362**, 841–844 (1993).
59. Chinot, O. L. *et al.* Bevacizumab plus Radiotherapy–Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **370**, 709–722 (2014).
60. Gilbert, M. R. *et al.* A Randomized Trial of Bevacizumab for Newly Diagnosed Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **370**, 699–708 (2014).
61. Wick, W. *et al.* Lomustine and Bevacizumab in Progressive Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **377**, 1954–1963 (2017).
62. Loges, S., Schmidt, T. & Carmeliet, P. Mechanisms of resistance to anti-angiogenic therapy and development of third-generation anti-angiogenic drug candidates. *Genes and Cancer* **1**, 12–25 (2010).
63. Ebos, J. M. L. *et al.* Accelerated Metastasis after Short-Term Treatment with a Potent Inhibitor of Tumor Angiogenesis. *Cancer Cell* **15**, 232–239 (2009).
64. Pàez-Ribes, M. *et al.* Antiangiogenic Therapy Elicits Malignant Progression of Tumors to Increased Local Invasion and Distant Metastasis. *Cancer Cell* **15**, 220–231 (2009).
65. Kirson, E. D. *et al.* Alternating electric fields arrest cell proliferation in animal tumor models and human brain tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 10152–10157 (2007).

66. Mun, E. J., Babiker, H. M., Weinberg, U., Kirson, E. D. & Von Hoff, D. D. Tumor-treating fields: A fourth modality in cancer treatment. *Clinical Cancer Research* **24**, 266–275 (2018).
67. Stupp, R. *et al.* LTBK-01: PROSPECTIVE, MULTI-CENTER PHASE III TRIAL OF TUMOR TREATING FIELDS TOGETHER WITH TEMOZOLOMIDE COMPARED TO TEMOZOLOMIDE ALONE IN PATIENTS WITH NEWLY DIAGNOSED GLIOBLASTOMA. *Neuro. Oncol.* **18**, i1–i1 (2016).
68. Layfield, L. J., Willmore, C., Tripp, S., Jones, C. & Jensen, R. L. Epidermal growth factor receptor gene amplification and protein expression in glioblastoma multiforme: Prognostic significance and relationship to other prognostic factors. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **14**, 91–96 (2006).
69. Wong, A. J. *et al.* Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 2965–2969 (1992).
70. Humphrey, P. A. *et al.* Anti-synthetic peptide antibody reacting at the fusion junction of deletion-mutant epidermal growth factor receptors in human glioblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 4207–4211 (1990).
71. Lal, A. *et al.* Mutant epidermal growth factor receptor up-regulates molecular effectors of tumor invasion. *Cancer Res.* **62**, 3335–3339 (2002).
72. Westermark, B., Magnusson, A. & Heldin, C. -H. Effect of epidermal growth factor on membrane motility and cell locomotion in cultures of human clonal glioma cells. *J. Neurosci. Res.* **8**, 491–507 (1982).
73. Lassman, A. B. *et al.* Molecular study of malignant gliomas treated with epidermal growth factor receptor inhibitors: Tissue analysis from North American Brain Tumor Consortium trials 01-03 and 00-01. *Clin. Cancer Res.* **11**, 7841–7850 (2005).
74. Rich, J. N. *et al.* Phase II trial of gefitinib in recurrent glioblastoma. *J. Clin. Oncol.* **22**, 133–142 (2004).
75. Van Den Bent, M. J. *et al.* Randomized phase II trial of erlotinib versus temozolomide or carmustine in recurrent glioblastoma: EORTC brain tumor group study 26034. *J. Clin. Oncol.* **27**, 1268–1274 (2009).
76. Weller, M. *et al.* Rindopepimut with temozolomide for patients with newly diagnosed, EGFRvIII-expressing glioblastoma (ACT IV): a randomised, double-blind, international phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **18**, 1373–1385 (2017).
77. Dong, J. K. *et al.* Overcoming erlotinib resistance in EGFR mutation-positive lung adenocarcinomas through repression of phosphoglycerate dehydrogenase. *Theranostics* **8**, 1808–1823 (2018).
78. Schulte, A. *et al.* Erlotinib resistance in EGFR-amplified glioblastoma cells is associated with upregulation of EGFRvIII and PI3Kp110 δ . *Neuro. Oncol.* **15**, 1289–1301 (2013).
79. Kanda, R. *et al.* Erlotinib resistance in lung cancer cells mediated by integrin β 1/Src/Akt-driven bypass signaling. *Cancer Res.* **73**, 6243–6253 (2013).
80. Popovici-Muller, J. *et al.* Discovery of AG-120 (Ivosidenib): A First-in-Class Mutant IDH1 Inhibitor for the Treatment of IDH1 Mutant Cancers. *ACS Med. Chem. Lett.* **9**, 300–305 (2018).
81. US Food and Drug Administration. FDA approves ivosidenib as first-line treatment for AML with IDH1 mutation. *Case Medical Research* (2019). doi:10.31525/cmr-14804d1
82. Choe, S. *et al.* Molecular mechanisms mediating relapse following ivosidenib monotherapy in IDH1-mutant relapsed or refractory AML. *Blood Adv.* **4**, 1894–1905 (2020).
83. Kruger, S. *et al.* Advances in cancer immunotherapy 2019 - Latest trends. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* **38**, (2019).
84. Abbott, M. & Ustoyev, Y. Cancer and the Immune System: The History and Background of Immunotherapy. *Seminars in Oncology Nursing* **35**, 150923 (2019).
85. Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K. & Honjo, T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* **11**, 3887–3895 (1992).
86. Han, Y., Liu, D. & Li, L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am. J. Cancer Res.* **10**, 727–742 (2020).

87. Cloughesy, T. F. *et al.* Neoadjuvant anti-PD-1 immunotherapy promotes a survival benefit with intratumoral and systemic immune responses in recurrent glioblastoma. *Nat. Med.* **25**, 477–486 (2019).
88. Martínez-Vélez, N. *et al.* The oncolytic virus Delta-24-RGD elicits an antitumor effect in pediatric glioma and DIPG mouse models. *Nat. Commun.* **10**, 1–10 (2019).
89. Lang, F. F. *et al.* Phase I study of DNX-2401 (delta-24-RGD) oncolytic adenovirus: replication and immunotherapeutic effects in recurrent malignant glioma. *J. Clin. Oncol.* **36**, 1419–1427 (2018).
90. Desjardins, A. *et al.* Recurrent Glioblastoma Treated with Recombinant Poliovirus. *N. Engl. J. Med.* **379**, 150–161 (2018).
91. Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science (80-.)*. **123**, 309–314 (1956).
92. Zhao, X., Fu, J., Du, J. & Xu, W. The role of D-3-phosphoglycerate dehydrogenase in cancer. *Int. J. Biol. Sci.* **16**, 1495–1506 (2020).
93. Tennant, D. A., Durán, R. V. & Gottlieb, E. Targeting metabolic transformation for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* **10**, 267–277 (2010).
94. Gottlieb, E. & Tomlinson, I. P. M. Mitochondrial tumour suppressors: A genetic and biochemical update. *Nature Reviews Cancer* **5**, 857–866 (2005).
95. Yang, M. & Vousden, K. H. Serine and one-carbon metabolism in cancer. *Nature Reviews Cancer* **16**, 650–662 (2016).
96. Yamamoto, T. *et al.* Characterization of rapid and high-affinity uptake of L-serine in neurons and astrocytes in primary culture. *FEBS Lett.* **548**, 69–73 (2003).
97. Scalise, M., Pochini, L., Console, L., Losso, M. A. & Indiveri, C. The Human SLC1A5 (ASCT2) amino acid transporter: From function to structure and role in cell biology. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **6**, 96 (2018).
98. Possemato, R. *et al.* Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. *Nature* **476**, 346–50 (2011).
99. Mattaini, K. R., Sullivan, M. R. & Heiden, M. G. Vander. The importance of serine metabolism in cancer. **214**, (2016).
100. Pacold, M. E. *et al.* A PHGDH inhibitor reveals coordination of serine synthesis and one-carbon unit fate. *Nat. Chem. Biol.* **12**, 452–458 (2016).
101. Reid, M. A. *et al.* Serine synthesis through PHGDH coordinates nucleotide levels by maintaining central carbon metabolism. *Nat. Commun.* **9**, 1–11 (2018).
102. Locasale, J. W. Serine, glycine and one-carbon units: Cancer metabolism in full circle. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 572–583 (2013).
103. Muthusamy, T. *et al.* Serine restriction alters sphingolipid diversity to constrain tumour growth. *Nature* **586**, 790–795 (2020).
104. Unterlass, J. E. *et al.* Validating and enabling phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH) as a target for fragment-based drug discovery in PHGDH-amplified breast cancer. (2016).
105. Samanta, D. & Semenza, G. L. Serine synthesis helps hypoxic cancer stem cells regulate redox. *Cancer Res.* **76**, 6458–6462 (2016).
106. Zhang, X. & Bai, W. Repression of phosphoglycerate dehydrogenase sensitizes triple-negative breast cancer to doxorubicin. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **78**, 655–659 (2016).
107. Jaeken, J. *et al.* 3-Phosphoglycerate dehydrogenase deficiency and 3-phosphoserine phosphatase deficiency: Inborn errors of serine biosynthesis. *J. Inherit. Metab. Dis.* **19**, 223–226 (1996).
108. Horio, M. *et al.* Levels of d-serine in the brain and peripheral organs of serine racemase (Srr) knock-out mice. *Neurochem. Int.* **59**, 853–859 (2011).
109. Van-Horn, M. R., Sild, M. & Ruthazer, E. S. D-serine as a gliotransmitter and its roles in brain development and disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **7**, 39 (2013).

110. Almuqbil, M. & Pearl, P. L. Genetic-metabolic disorders presenting as acute, but reversible, severe epilepsies. in *Acute Encephalopathy and Encephalitis in Infancy and Its Related Disorders* 105–115 (Elsevier Inc., 2018). doi:10.1016/B978-0-323-53088-0.00015-4
111. Smith-Hicks, C. & Raymond, G. V. Developmental Disorders. in *Cerebrospinal Fluid in Clinical Practice* 93–98 (Elsevier Inc., 2009). doi:10.1016/B978-141602908-3.50014-5
112. Van Der Crabben, S. N. *et al.* An update on serine deficiency disorders; An update on serine deficiency disorders. *J. Inherit. Metab. Dis.* **36**, 613–619 (2013).
113. Le Douce, J. *et al.* Impairment of Glycolysis-Derived L-Serine Production in Astrocytes Contributes to Cognitive Deficits in Alzheimer's Disease. *Cell Metab.* **31**, 503–517.e8 (2020).
114. Abdelrahman, H. A., Al-Shamsi, A., John, A., Ali, B. R. & Al-Gazali, L. A Novel SLC1A4 Mutation (p.Y191*) Causes Spastic Tetraplegia, Thin Corpus Callosum, and Progressive Microcephaly (SPATCCM) With Seizure Disorder. *Child Neurol. Open* **6**, 2329048X1988064 (2019).
115. Damseh, N. *et al.* Mutations in SLC1A4, encoding the brain serine transporter, are associated with developmental delay, microcephaly and hypomyelination. *J. Med. Genet.* **52**, 541–547 (2015).
116. Kaplan, E. *et al.* ASCT1 (Slc1a4) transporter is a physiologic regulator of brain D-serine and neurodevelopment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 9628–9633 (2018).
117. Locasale, J. W. *et al.* Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. *Nat. Genet.* **43**, 869–74 (2011).
118. Polet, F. *et al.* Reducing the serine availability complements the inhibition of the glutamine metabolism to block leukemia cell growth. *Oncotarget* **5**, 3–5 (2015).
119. Snell, K. Enzymes of serine metabolism in normal, developing and neoplastic rat tissues. *Adv. Enzyme Regul.* **22**, 325–400 (1984).
120. Possemato, R. *et al.* Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. *Nature* **476**, 346–50 (2011).
121. DeNicola, G. M. *et al.* NRF2 regulates serine biosynthesis in non-small cell lung cancer. *Nat. Genet.* **47**, 1475–1481 (2015).
122. Pollari, S. *et al.* Enhanced serine production by bone metastatic breast cancer cells stimulates osteoclastogenesis. *Breast Cancer Res. Treat.* **125**, 421–430 (2011).
123. Yoshino, H. *et al.* Characterization of PHGDH expression in bladder cancer: potential targeting therapy with gemcitabine/cisplatin and the contribution of promoter DNA hypomethylation. *Mol. Oncol.* **14**, 2190–2202 (2020).
124. Wei, L. *et al.* Genome-wide CRISPR/Cas9 library screening identified PHGDH as a critical driver for Sorafenib resistance in HCC. *Nat. Commun.* **10**, 1–13 (2019).
125. Liu, J. *et al.* Phosphoglycerate dehydrogenase induces glioma cells proliferation and invasion by stabilizing forkhead box M1. *J. Neurooncol.* **111**, 245–255 (2013).
126. Elsaadi, S. *et al.* Targeting phosphoglycerate dehydrogenase in multiple myeloma. *Exp. Hematol. Oncol.* **10**, 1–13 (2021).
127. Engel, A. L. *et al.* Serine-dependent redox homeostasis regulates glioblastoma cell survival. *Br. J. Cancer* **122**, 1391–1398 (2020).
128. Samanta, D. *et al.* PHGDH expression is required for mitochondrial redox homeostasis, breast cancer stem cell maintenance, and lung metastasis. *Cancer Res.* **76**, 4430–4442 (2016).
129. Polet, F. *et al.* Reducing the serine availability complements the inhibition of the glutamine metabolism to block leukemia cell growth. *Oncotarget* **7**, 1765–76 (2016).
130. Beroukhi, R. *et al.* The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* **463**, 899–905 (2010).

131. Mullarky, E. *et al.* Identification of a small molecule inhibitor of 3-phosphoglycerate dehydrogenase to target serine biosynthesis in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, 201521548 (2016).
132. Dexter, D. L. & Leith, J. T. Tumor heterogeneity and drug resistance. *J. Clin. Oncol.* **4**, 244–257 (1986).
133. Dagogo-Jack, I. & Shaw, A. T. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **15**, 81–94 (2018).
134. Barthel, F. P. *et al.* Longitudinal molecular trajectories of diffuse glioma in adults. *Nature* **576**, 112–120 (2019).
135. Sun, X. X. & Yu, Q. Intra-tumor heterogeneity of cancer cells and its implications for cancer treatment. *Acta Pharmacologica Sinica* **36**, 1219–1227 (2015).
136. Angelova, M. *et al.* Evolution of Metastases in Space and Time under Immune Selection. *Cell* **175**, 751–765.e16 (2018).
137. Van Der Heijden, M. *et al.* Spatiotemporal regulation of clonogenicity in colorectal cancer xenografts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 6140–6145 (2019).
138. Caswell-Jin, J. L. *et al.* Clonal replacement and heterogeneity in breast tumors treated with neoadjuvant HER2-targeted therapy. *Nat. Commun.* **10**, 1–12 (2019).
139. Jamal-Hanjani, M., Quezada, S. A., Larkin, J. & Swanton, C. Translational implications of tumor heterogeneity. *Clin. Cancer Res.* **21**, 1258–1266 (2015).
140. Dirkse, A. *et al.* Stem cell-associated heterogeneity in Glioblastoma results from intrinsic tumor plasticity shaped by the microenvironment. *Nat. Commun.* **10**, 1–16 (2019).
141. Sharma, A. *et al.* Non-Genetic Intra-Tumor Heterogeneity Is a Major Predictor of Phenotypic Heterogeneity and Ongoing Evolutionary Dynamics in Lung Tumors. *Cell Rep.* **29**, 2164–2174.e5 (2019).
142. Turajlic, S., Sottoriva, A., Graham, T. & Swanton, C. Resolving genetic heterogeneity in cancer. *Nat. Rev. Genet.* **20**, 404–416 (2019).
143. Black, J. R. M. & McGranahan, N. Genetic and non-genetic clonal diversity in cancer evolution. *Nat. Rev. Cancer* **0123456789**, (2021).
144. McGranahan, N. & Swanton, C. Biological and therapeutic impact of intratumor heterogeneity in cancer evolution. *Cancer Cell* **27**, 15–26 (2015).
145. Carter, S. L., Eklund, A. C., Kohane, I. S., Harris, L. N. & Szallasi, Z. A signature of chromosomal instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers. *Nat. Genet.* **38**, 1043–1048 (2006).
146. Gambera, S. *et al.* Clonal dynamics in osteosarcoma defined by RGB marking. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
147. Yu, H. A. *et al.* Poor response to erlotinib in patients with tumors containing baseline EGFR T790M mutations found by routine clinical molecular testing. *Ann. Oncol.* **25**, 423–428 (2014).
148. Nowell, P. C. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science (80-.).* **194**, 23–28 (1976).
149. Greaves, M. & Maley, C. C. Clonal evolution in cancer. *Nature* **481**, 306–313 (2012).
150. Bhang, H. E. C. *et al.* Studying clonal dynamics in response to cancer therapy using high-complexity barcoding. *Nat. Med.* **21**, 440–448 (2015).
151. Jamal-Hanjani, M. *et al.* Tracking the Evolution of Non–Small–Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **376**, 2109–2121 (2017).
152. Juric, D. *et al.* Convergent loss of PTEN leads to clinical resistance to a PI(3)K α inhibitor. *Nature* **518**, 240–244 (2015).
153. Russo, M. *et al.* Tumor heterogeneity and Lesion-Specific response to targeted therapy in colorectal cancer. *Cancer Discov.* **6**, 147–153 (2016).
154. Kwak, E. L. *et al.* Molecular heterogeneity and receptor coamplification drive resistance to targeted therapy in MET-Amplified esophagogastric cancer. *Cancer Discov.* **5**, 1271–1281 (2015).
155. Alizadeh, A. A. *et al.* Toward understanding and exploiting tumor heterogeneity. *Nat. Med.* **21**, 846–853 (2015).

156. Lippert, T. H., Ruoff, H. J. & Volm, M. Intrinsic and acquired drug resistance in malignant tumors: The main reason for therapeutic failure. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research* **58**, 261–264 (2008).
157. Kelderman, S., Schumacher, T. N. M. & Haanen, J. B. A. G. Acquired and intrinsic resistance in cancer immunotherapy. *Molecular Oncology* **8**, 1132–1139 (2014).
158. Muscat, A. M. *et al.* The evolutionary pattern of mutations in glioblastoma reveals therapy-mediated selection. *Oncotarget* **9**, 7844–7858 (2018).
159. Shaw, A. T. *et al.* Resensitization to Crizotinib by the Lorlatinib ALK Resistance Mutation L1198F. *N. Engl. J. Med.* **374**, 54–61 (2016).
160. Lan, X. *et al.* Fate mapping of human glioblastoma reveals an invariant stem cell hierarchy. *Nature* **549**, 227–232 (2017).
161. Eskilsson, E. *et al.* EGFR heterogeneity and implications for therapeutic intervention in glioblastoma. *Neuro. Oncol.* **20**, 743–752 (2018).
162. Biernat, W., Huang, H., Yokoo, H., Kleihues, P. & Ohgaki, H. Predominant expression of mutant EGFR (EGFRvIII) is rare in primary glioblastomas. *Brain Pathol.* **14**, 131–136 (2004).
163. Eskilsson, E. *et al.* EGFRvIII mutations can emerge as late and heterogenous events in glioblastoma development and promote angiogenesis through Src activation. *Neuro. Oncol.* **18**, 1–12 (2016).
164. Cornils, K. *et al.* Multiplexing clonality: Combining RGB marking and genetic barcoding. *Nucleic Acids Res.* **42**, e56–e56 (2014).
165. Lemischka, I. R., Rautlet, D. H. & Mulligan, R. C. Developmental potential and dynamic behavior of hematopoietic stem cells. *Cell* **45**, 917–927 (1986).
166. Bramlett, C. *et al.* Clonal tracking using embedded viral barcoding and high-throughput sequencing. *Nat. Protoc.* **15**, 1436–1458 (2020).
167. Eyler, C. E. *et al.* Single-cell lineage analysis reveals genetic and epigenetic interplay in glioblastoma drug resistance. *Genome Biol.* **21**, (2020).
168. Weber, K., Thomaschewski, M., Benten, D. & Fehse, B. RGB marking with lentiviral vectors for multicolor clonal cell tracking. *Nat. Protoc.* **7**, 839–849 (2012).
169. Weber, K. *et al.* Technical Reports RGB marking facilitates multicolor clonal cell tracking. **17**, 504–510 (2011).
170. Gomez-Nicola, D., Riecken, K., Fehse, B. & Perry, V. H. In-vivo RGB marking and multicolour single-cell tracking in the adult brain. *Sci. Rep.* **4**, 1–10 (2014).
171. Thomaschewski, M. *et al.* Multi-color RGB marking enables clonality assessment of liver tumors in a murine xenograft model. *Oncotarget* **8**, 115582–115595 (2017).
172. Abramowski, P. *et al.* Combined application of rgb marking and mass spectrometric imaging facilitates detection of tumor heterogeneity. *Cancer Genomics and Proteomics* **12**, 179–188 (2015).
173. Weissman, T. A. & Pan, Y. A. Brainbow: New resources and emerging biological applications for multicolor genetic labeling and analysis. *Genetics* **199**, 293–306 (2014).
174. Mohme, M. *et al.* Optical Barcoding for Single-Clone Tracking to Study Tumor Heterogeneity. *Mol. Ther.* **25**, 621–633 (2017).
175. Wu, J. W. *et al.* Defining Clonal Color in Fluorescent Multi-Clonal Tracking. *Sci. Rep.* **6**, 1–10 (2016).
176. Mohme, M. *et al.* Optical Barcoding for Single-Clone Tracking to Study Tumor Heterogeneity. *Mol. Ther.* **0**, 306–313 (2017).
177. Feber, A. *et al.* Using high-density DNA methylation arrays to profile copy number alterations. *Genome Biol.* **15**, 1–13 (2014).

178. Brockmann, M. A., Westphal, M., Lamszus, K., Mooij, J. J. A. & De Tribolet, N. Improved method for the intracerebral engraftment of tumour cells and intratumoural treatment using a guide screw system in mice. *Acta Neurochir. (Wien)*. **145**, 777–781 (2003).
179. Brockmann, M. A. *et al.* Inhibition of intracerebral glioblastoma growth by local treatment with the scatter factor/hepatocyte growth factor-antagonist NK4. *Clin. Cancer Res.* **9**, 4578–4585 (2003).
180. Grzelinski, M. *et al.* RNA interference-mediated gene silencing of pleiotrophin through polyethylenimine-complexed small interfering RNAs in vivo exerts antitumoral effects in glioblastoma xenografts. *Hum. Gene Ther.* **17**, 751–766 (2006).
181. Kunkel, P. *et al.* Inhibition of Glioma Angiogenesis and Growth in Vivo by Systemic Treatment with a Monoclonal Antibody against Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 1. *CANCER Res.* **61**, 6624–6628 (2001).
182. Capper, D. *et al.* Practical implementation of DNA methylation and copy-number-based CNS tumor diagnostics: the Heidelberg experience. *Acta Neuropathol.* **136**, 181–210 (2018).
183. Kohanbash, G. *et al.* Isocitrate dehydrogenase mutations suppress STAT1 and CD8+ T cell accumulation in gliomas. *J. Clin. Invest.* **127**, 1425–1437 (2017).
184. Maire, C. L. *et al.* Genome-wide methylation profiling of glioblastoma cell-derived extracellular vesicle DNA allows tumor classification. *Neuro. Oncol.* 1–13 (2021). doi:10.1093/neuonc/noab012
185. Luchman, H. A., Chesnelong, C., Cairncross, J. G. & Weiss, S. Spontaneous loss of heterozygosity leading to homozygous R132H in a patient-derived IDH1 mutant cell line. *Neuro. Oncol.* **15**, 979–980 (2013).
186. Jin, G. *et al.* Disruption of wild-type IDH1 suppresses D-2-hydroxyglutarate production in IDH1-mutated gliomas. *Cancer Res.* **73**, 496–501 (2013).
187. Unterlass, J. E. *et al.* Validating and enabling phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH) as a target for fragment-based drug discovery in PHGDH-amplified breast cancer. *Oncotarget* **5**, (2016).
188. Maire, C. L. *et al.* Glioma escape signature and clonal development under immune pressure. *J. Clin. Invest.* **130**, 5257–5271 (2020).
189. Garcia-Cuellar, M. P. *et al.* Exploitable metabolic dependencies in MLL-ENL-induced leukemia. *Blood Adv.* **4**, 3626–3638 (2020).
190. Zhang, T. *et al.* Disruption of De Novo Serine Synthesis in Müller Cells Induced Mitochondrial Dysfunction and Aggravated Oxidative Damage. *Mol. Neurobiol.* **55**, 7025–7037 (2018).
191. Lee, J. *et al.* Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell* **9**, 391–403 (2006).
192. Smith, Q. R., Momma, S., Aoyagi, M. & Rapoport, S. I. Kinetics of Neutral Amino Acid Transport Across the Blood-Brain Barrier. *J. Neurochem.* **49**, 1651–1658 (1987).
193. Dhermain, F. G., Hau, P., Lanfermann, H., Jacobs, A. H. & van den Bent, M. J. Advanced MRI and PET imaging for assessment of treatment response in patients with gliomas. *The Lancet Neurology* **9**, 906–920 (2010).
194. Steinbach, J. P., Klumpp, A., Wolburg, H. & Weller, M. Inhibition of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Protects Human Malignant Glioma Cells from Hypoxia-Induced Cell Death. *Cancer Res.* **64**, 1575–1578 (2004).
195. Hitosugi, T. *et al.* Phosphoglycerate Mutase 1 Coordinates Glycolysis and Biosynthesis to Promote Tumor Growth. *Cancer Cell* **22**, 585–600 (2012).
196. Locasale, J. W. New concepts in feedback regulation of glucose metabolism. *Current Opinion in Systems Biology* **8**, 32–38 (2018).
197. Białopiotrowicz, E. *et al.* Serine biosynthesis pathway supports MYC–miR-494–EZH2 feed-forward circuit necessary to maintain metabolic and epigenetic reprogramming of burkitt lymphoma cells. *Cancers (Basel)*. **12**, (2020).
198. Ramón y Cajal, S. *et al.* Clinical implications of intratumor heterogeneity: challenges and opportunities. *J. Mol. Med.* **98**, 161–177 (2020).

5.7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich gerne bei Allen bedanken, die – direkt oder indirekt – zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Katrin Lamszus möchte ich für die Ermöglichung dieser Arbeit und die Überlassung des Themas, sowie für die wissenschaftliche Begutachtung und Betreuung meiner Arbeit danken. Insbesondere möchte ich mich dabei für die angenehme und konstruktive Zusammenarbeit und die Unterstützung während dieser Zeit bedanken.

Prof. Dr. Manfred Westphal danke ich für die fortwährende und freundliche Unterstützung während meiner Arbeit.

Bei Prof. Dr. Julia Kehr vom Fachbereich Biologie der Universität Hamburg möchte ich mich herzlich für die Begutachtung der Dissertation bedanken.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Dr. Cecile Maire für ihre wissenschaftliche und technische Unterstützung, ihre stete Hilfsbereitschaft, den tollen wissenschaftlichen Diskurs und die vielen motivierenden und aufmunternden Worte. Nicht zuletzt möchte ich mich auch für die Einführung in das RGB-Marking bedanken, die letztlich zur Entwicklung der ChromoClone Software führte.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Sarina Heinemann, Mareike Holz, Katharina Kolbe und Svenja Zapf bedanken, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen und mich dabei nicht nur technisch unterstützt haben, sondern auch eine tolle Arbeitsatmosphäre geschaffen haben.

Ich möchte mich ebenfalls bei allen Kooperationspartnern bedanken, insbesondere bei Dr. Kristoffer Riecken und Prof. Dr. Boris Fehse aus dem Institut für Stammzelltransplantation am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, für die Expertise und Unterstützung bei der RGB-Markierung von Tumorzellen, sowie bei Prof. Dr. Ullrich Schüller aus dem Institut für Neuropathologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf und seiner Arbeitsgruppe für die Unterstützung bei der Durchführung genomischer DNA-Methylierungsanalysen. Auch den Mitgliedern der FACS Core Facility und der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf möchte ich mich für ihre Hilfestellung bedanken.

Ein besonders großer Dank gilt meinen Eltern, meiner Freundin Maria und meiner Schwester, die mich stets in meinem Vorhaben ermutigt haben und auf deren Unterstützung ich immer zählen konnte. Auch bei meinen Freunden möchte ich mich herzlich für die Unterstützung und die vielen aufmunternden Worte bedanken.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den 14.07.2021

Krystian Daniel Fita