

Aus der  
Neurologischen Universitätsklinik Tübingen  
Hertie-Institut für klinische Hirnforschung  
Zentrum für Neurologie  
Abteilung Vaskuläre Neurologie

**„Die Bedeutung eines CRISPR-Cas9 induzierten  
Knockouts von TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 in Gliomzellen *in  
vitro*“**

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

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

**vorgelegt von  
Eckhardt, Hermann**

**2025**



Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. U. Naumann

2. Berichterstatter: Professor Dr. J. Schittenhelm

Tag der Disputation: 28.03.2025



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>V</b>
------------------------------------	----------

<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>VI</b>
----------------------------------	-----------

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>VII</b>
------------------------------------	------------

<b><u>1 EINLEITUNG.....</u></b>	<b><u>1</u></b>
---------------------------------	-----------------

<b>1.1 DAS GLIOBLASTOM (GBM).....</b>	<b>1</b>
---------------------------------------	----------

1.1.1 KLASSEKATION DER DIFFUSEN GLIOME VOM ADULTEN TYP.....	3
---	---

1.1.2 EPIDEMIOLOGIE DES GLIOBLASTOMS.....	5
---	---

1.1.3 PRÄVENTION, KLINIK, DIAGNOSE, PROGNOSE UND THERAPIE DES GBM.....	5
--	---

1.1.4 NEUARTIGE THERAPIEANSÄTZE .....	7
---------------------------------------	---

1.1.5 MOTILITÄT UND IMMUNSUPPRESSION .....	10
--	----

<b>1.2 TRANSFORMING GROWTH FACTOR B .....</b>	<b>14</b>
---	-----------

1.2.1 TGF-B PROTEINE.....	15
---------------------------	----

1.2.2 GENE UND FUNKTION.....	16
------------------------------	----

1.2.3 ALTERATIONEN DES TGF-B SIGNALWEGS UND DEREN FOLGEN .....	19
--	----

1.2.3.1 Einfluss von TGF- $\beta$ auf die Proliferation .....	20
---	----

1.2.3.2 Einfluss von TGF- $\beta$ auf die Motilität .....	20
---	----

1.2.3.3 Epithelial-Mesenchymale Transition .....	21
--	----

1.2.3.4 Einfluss von TGF- $\beta$ auf die Angiogenese.....	22
--	----

1.2.3.5 Einfluss von TGF- $\beta$ auf das Immunsystem .....	23
---	----

1.2.3.6 Therapieoptionen mit Bezug auf den TGF- $\beta$ Signalweg .....	24
---	----

<b>1.3 CRISPR/Cas9.....</b>	<b>25</b>
-----------------------------	-----------

<b>1.4 FRAGESTELLUNG.....</b>	<b>28</b>
-------------------------------	-----------

<b><u>2 MATERIAL UND METHODEN .....</u></b>	<b><u>30</u></b>
---	------------------

<b>2.1 MATERIAL.....</b>	<b>30</b>
--------------------------	-----------

2.1.1 GERÄTE.....	30
-------------------	----

2.1.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	31
----------------------------------	----

2.1.3	CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN .....	31
2.1.4	MEDIEN, PUFFER & LÖSUNGEN .....	32
2.1.5	ENZYME .....	33
2.1.6	OLIGONUKLEOTIDE .....	33
2.1.7	KITS.....	34
2.1.8	ZELLINIEN .....	35
2.1.9	VEKTOREN.....	35
2.1.10	SOFTWARE .....	35
<b>2.2</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>36</b>
2.2.1	ZELLKULTUR.....	36
2.2.2	POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR) .....	37
2.2.3	AGAROSEGELELEKTROPHORESE .....	38
2.2.4	MYKOPLASMEN-NACHWEIS .....	38
2.2.5	DNA-ISOLATION .....	39
2.2.6	CRISPR/CAS9 GENALTERATION .....	39
2.2.7	CRISPR/CAS OFF-TARGET-ANALYSE.....	40
2.2.8	ZELLISOLATION UND SORTIERUNG MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE .....	40
2.2.9	SANGER-SEQUENZIERUNG.....	40
2.2.10	PROLIFERATIONSASSAY .....	42
2.2.11	MIGRATIONSASSAY .....	42
2.2.11.1	Transwell-Migrationsassay .....	42
2.2.11.2	Wundheilungs-/Scratch-Assay.....	43
2.2.12	INVASIONSASSAY .....	43
2.2.13	ZYTKIN-ARRAY .....	44
2.2.14	LENTIVIRALES LABELING.....	45
2.2.15	DATENANALYSE.....	46
<b>3</b>	<b><u>ERGEBNISSE.....</u></b>	<b><u>47</u></b>
<b>3.1</b>	<b>HERSTELLUNG UND VALIDIERUNG VON TGF-B KNOCKOUT ZELLINIEN .....</b>	<b>47</b>
3.1.1	GENERIERUNG DER TGF-B KNOCKOUTS .....	47
3.1.2	VALIDIERUNG DER TGF-B KNOCKOUTS MITTELS PCR .....	49
3.1.3	SANGER-SEQUENZIERUNG ISOLIERTER GENOMISCHER DNA VON TGF-B KNOCKOUT-GL261-ZELLEN	50

<b>3.2</b>	<b>EFFEKTE DES TGF-B KNOCKOUTS IN VITRO .....</b>	<b>53</b>
3.2.1	ZELLPROLIFERATION .....	53
3.2.2	MIGRATION .....	55
3.2.2.1	Transwell-Migration-Assay .....	55
3.2.2.2	Wundheilungs-/Scratch-Assay .....	57
3.2.3	INVASION .....	59
3.2.4	ZYTOKINPRODUKTION.....	61
3.2.4.1	Proliferation .....	61
3.2.4.2	Motilität .....	63
3.2.4.3	Angiogenese .....	65
3.2.4.4	Inflammation .....	67
<b>3.3</b>	<b>LENTIVIRALES LABELING DER TGF-B KNOCKOUTS.....</b>	<b>71</b>
<b>4</b>	<b><u>DISKUSSION .....</u></b>	<b><u>72</u></b>
<b>4.1</b>	<b>DER KNOCKOUT VON TGF-B HAT EINEN POSITIVEN EFFEKT AUF DAS MALIGNEN VERHALTEN VON GBM-ZELLEN .....</b>	<b>72</b>
4.1.1	EIN TGF-B-KO REDUZIERT DIE PROLIFERATION IM GBM IN-VITRO .....	72
4.1.2	KNOCKOUT VON TGF-B REDUZIERT DIE MOTILITÄT IM GBM IN-VITRO .....	73
<b>4.2</b>	<b>DER KNOCKOUT VON TGF-B BEEINFLUSST DIE ZYTOKINEXPRESSION VON GBM-ZELLEN .....</b>	<b>76</b>
4.2.1	IN GBM-ZELLEN HAT DIE TGF-B-KO-VERMITTELTE VERÄNDERTE ZYTOKINEXPRESSION EINEN NEGATIVEN EINFLUSS AUF ZELLPROLIFERATION .....	76
4.2.2	IN GBM-ZELLEN HAT DIE TGF-B-KO-VERMITTELTE VERÄNDERTE ZYTOKINEXPRESSION EINEN NEGATIVEN EINFLUSS AUF ZYTOKINE, DIE DIE GEFÄßARCHITEKTUR MODULIEREN.....	78
4.2.3	DIE VERÄNDERTE ZYTOKINEXPRESSION REDUZIERT DIE MOTILITÄT IN GBM-ZELLEN.....	80
4.2.4	IN GBM -ZELLEN REDUZIERT DER KO VON TGF-B DIE SEKRETION INFLAMMATORISCHER UND IMMUNEVASIVER ZYTOKINE .....	82
4.2.5	LIMITATIONEN DER ZYTOKINARRAYS .....	84
<b>4.3</b>	<b>KLINISCHE RELEVANZ FÜR ZUKÜNFTIGE THERAPIEANSÄTZE .....</b>	<b>85</b>
<b>5</b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG .....</u></b>	<b><u>88</u></b>
<b>6</b>	<b><u>LITERATURVERZEICHNIS.....</u></b>	<b><u>90</u></b>

<b><u>7</u></b>	<b><u>ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL .....</u></b>	<b><u>109</u></b>
<b><u>8</u></b>	<b><u>VERÖFFENTLICHUNGEN .....</u></b>	<b><u>110</u></b>
<b><u>9</u></b>	<b><u>ANHANG .....</u></b>	<b><u>111</u></b>
<b><u>10</u></b>	<b><u>DANKSAGUNG.....</u></b>	<b><u>119</u></b>

# Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: MOLEKULARGENETISCHE UND HISTOMORPHOLOGISCHE DIFFERENZIERUNG DER DIFFUSEN GLIOME VOM ADULTEN TYP MIT DARSTELLUNG DES DIAGNOSTISCH ZUGRUNDELIEGENDEN MUTATIONSSPEKTRUMS .....	2
ABBILDUNG 2: KRANIELLE MAGNETRESONANZTOMOGRAPHISCHE (CMRT) BILDGEBUNG DES GBM .....	2
ABBILDUNG 3: MECHANISMEN DER MIGRATION UND INVASION DES GBM .....	13
ABBILDUNG 4: GENE FÜR TGF-B1 UND 2.....	18
ABBILDUNG 5: KANONISCHE UND NICHT-KANONISCHE TGF-B SIGNALWEGE .....	19
ABBILDUNG 6: SCHEMATISCHE ABBILDUNG EINES gRNA/SpCas9-KOMPLEXES .....	26
ABBILDUNG 7: SCHEMATISCHE ABBILDUNG DER INDUZIERTEN DNA-REPARATURMECHANISMEN .....	27
ABBILDUNG 8: GATING-STRATEGIE FÜR DIE DURCHFLUSSZYTOMETRIE ZUR DETEKTION ERFOLGREICH ELEKTROPORIERTER ZELLEN .....	48
ABBILDUNG 9: AGAROSEGELELEKTROPHORESE DER PCR-AMPLIFIKATIONSPRODUKTE .....	49
ABBILDUNG 10: SANGER SEQUENZIERUNG FÜR TGF-B1 .....	51
ABBILDUNG 11: SANGER-SEQUENZIERUNG FÜR TGF-B2.....	52
ABBILDUNG 12: ZELLPROLIFERATIONSASSAY .....	54
ABBILDUNG 13: TRANSWELL-MIGRATION-ASSAY .....	56
ABBILDUNG 14: WUNDHEILUNGS-/SCRATCH-ASSAY .....	58
ABBILDUNG 15: INVASIONSASSAY .....	60
ABBILDUNG 16: ZYTOKINE MIT POSITIVEM EINFLUSS AUF DIE PROLIFERATION .....	62
ABBILDUNG 17: SEKRETION VON ZYTOKINEN, DIE EFFEKTE AUF DIE ZELLMOTILITÄT BEWIRKEN KÖNNEN .....	64
ABBILDUNG 18: SEKRETION VON ZYTOKINEN DIE EFFEKTE AUF DIE ANGIOGENESE BEWIRKEN KÖNNEN .....	66
ABBILDUNG 19: SEKRETION VON ZYTOKINEN, DIE EFFEKTE AUF DEN INFLAMMATORISCHEN PROZESS BEWIRKEN KÖNNEN....	70
ABBILDUNG 20: FLUORESCENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN MCHERRY-POSITIVER ZELLEN .....	71
ABBILDUNG 21: ZYTOKIN-ARRAY .....	111

## Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: ÜBERSICHT ÜBER DIE FUNKTIONEN DER UNTERSUCHTEN ZYTOKINE .....	111
--	-----

## Abkürzungsverzeichnis

- ABT-414:** Antibody Drug Conjugate targeting EGFR
- AK:** Antikörper
- ALK-1:** Activin Receptor-Like Kinase 1
- APC:** Antigen-Presenting Cell
- AON:** Antisense Oligonucleotide
- ATRX:** Alpha-Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-linked
- AXL:** AXL Receptor Tyrosine Kinase
- BHS:** Blut-Hirn-Schranke
- BMP:** Bone Morphogenetic Protein
- BM:** Basement Membrane
- BNCT:** Boron Neutron Capture Therapy
- BPA:** Boronophenylalanine
- CAR-T-Zellen:** Chimeric Antigen Receptor T Cells
- Cas9n:** Cas9 Nickase
- CCL:** Chemokine (C-C motif) Ligand
- CD30:** Cluster of Differentiation 30
- CD30-L:** CD30 Ligand
- CD40:** Cluster of Differentiation 40
- CDK-Inhibitoren:** Cyclin-Dependent Kinase Inhibitoren
- CDNK2A:** Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A
- CDNK2B:** Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2B
- cMRT:** Kraniale Magnetresonanztomographie
- CRISPR:** Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
- cr-RNA:** CRISPR RNA
- CTGF:** Connective Tissue Growth Factor
- CTLA-4/CD152:** Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4
- CX:** C-X-C Chemokine
- CXCL:** Chemokine (C-X-C motif) Ligand
- DAMP:** Damage-Associated Molecular Patterns
- DC:** Dendritic Cell

**DMSO:** Dimethylsulfoxid  
**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium  
**DSB:** Doppelstrangbruch  
**ECM:** Extrazelluläre Matrix  
**EGFR:** Epidermal Growth Factor Receptor  
**EMT:** Epithelial-Mesenchymal Transition  
**ERK:** Extracellular Signal-Regulated Kinase  
**EtBr:** Ethidium Bromide  
**FAK:** Focal Adhesion Kinase  
**Fas Ligand:** Fas Cell Surface Death Receptor Ligand  
**Fast1:** Forkhead Activin Signal Transducer 1  
**FDA:** Food and Drug Administration  
**FCS:** Fetal Calf Serum  
**FGF:** Fibroblast Growth Factor  
**FLAIR:** Fluid-Attenuated Inversion Recovery (MRT-Technik)  
**FN:** Fibronectin  
**FSC:** Forward Scatter  
**G-CSF:** Granulocyte Colony-Stimulating Factor  
**GDF:** Growth Differentiation Factor  
**GBM:** Glioblastoma Multiforme  
**GM-CSF:** Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor  
**HGG:** High-Grade Glioma  
**HIF:** Hypoxia-Inducible Factor  
**HDR:** Homology-Directed Repair  
**IDHWT:** Isocitrate Dehydrogenase Wild Type  
**IDH-1:** Isocitrate Dehydrogenase 1  
**IDH-2:** Isocitrate Dehydrogenase 2  
**IFN- $\gamma$ :** Interferon Gamma  
**IGFBP:** Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein  
**IL:** Interleukin  
**K.D.:** Knockdown  
**KO:** Knockout

**LAP:** Latency-Associated Peptide  
**LIX:** Lipopolysaccharide-Induced CXC Chemokine  
**LTBP:** Latent TGF- $\beta$  Binding Protein  
**MAPK:** Mitogen-Activated Protein Kinase  
**MCP-5:** Monocyte Chemoattractant Protein-5  
**MHC-II:** Major Histocompatibility Complex Class II  
**MICB:** MHC Class I Polypeptide-Related Sequence B  
**MICA:** MHC Class I Polypeptide-Related Sequence A  
**MIP-1  $\gamma$ :** Macrophage Inflammatory Protein 1 Gamma  
**MGMT:** O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase  
**MMPs:** Matrix Metalloproteinases  
**MRT:** Magnetresonanztomographie  
**mTOR:** Mechanistic Target of Rapamycin  
**NHEJ:** Non-Homologous End Joining  
**NGS:** Next-Generation Sequencing  
**NK:** Natürliche Killerzellen  
**NKG2D:** Natural Killer Group 2, Member D  
**NSCLC:** Non-Small Cell Lung Cancer  
**OD:** Optical Density  
**OV:** Oncolytic Virus  
**OVT:** Oncolytic Virotherapy  
**P21:** Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1  
**PAM:** Protospacer Adjacent Motif  
**PAR:** Protease-Activated Receptor  
**PAR6:** Partitioning Defective 6  
**PAI-I:** Plasminogen Activator Inhibitor-1  
**PBS:** Phosphate Buffered Saline  
**PD-1:** Programmed Cell Death Protein 1  
**PD-L1:** Programmed Death-Ligand 1  
**PDGF:** Platelet-Derived Growth Factor  
**PET:** Positronen-Emissions-Tomographie  
**PI3K/AKT:** Phosphoinositide 3-Kinase/Protein Kinase B Pathway

**PTEN:** Phosphatase and Tensin Homolog  
**PVSRIPO:** Poliovirus Recombinant Oncolytic Immunotherapy  
**RCT:** Randomized Controlled Trial  
**RNP-Komplex:** Ribonucleoprotein Complex  
**RNA-i:** RNA Interference  
**R-SMADs:** Receptor-Regulated SMADs  
**S1P1:** Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1  
**SARA:** SMAD Anchor for Receptor Activation  
**SCF:** Stem Cell Factor  
**SBE:** SMAD Binding Element  
**sgRNA:** Single Guide RNA  
**SLC:** Sodium Lactate Carrier  
**SLUG:** Zinc Finger Protein SNAI2  
**SNAIL:** Zinc Finger Protein SNAI1  
**SMAD:** Small Mothers Against Decapentaplegic  
**SMURF:** SMAD Ubiquitination Regulatory Factor  
**SSC:** Side Scatter  
**TAM:** Tumor-Associated Macrophage  
**TAK1-p38/JNK:** Transforming Growth Factor Beta-Activated Kinase 1/p38/c-Jun N-Terminal Kinase Pathway  
**T $\beta$ RI:** TGF- $\beta$  Receptor Type I  
**T $\beta$ RII:** TGF- $\beta$  Receptor Type II  
**TERT:** Telomerase Reverse Transcriptase  
**TF:** Transcription Factor  
**THZ:** T-Helferzelle  
**TGF- $\beta$ :** Transforming Growth Factor Beta  
**TIM:** T Cell Immunoglobulin and Mucin Domain  
**TIMP:** Tissue Inhibitor of Metalloproteinases  
**TKI:** Tyrosine Kinase Inhibitor  
**TMZ:** Temozolomide  
**TNF- $\alpha$ :** Tumor Necrosis Factor Alpha  
**TNFR:** Tumor Necrosis Factor Receptor

**TR:** Telomere Regulation

**Tregs:** Regulatory T Cells

**TWIST:** Twist-related Protein

**uPA:** Urokinase-Type Plasminogen Activator

**VEGF:** Vascular Endothelial Growth Factor

**VEGF-A:** Vascular Endothelial Growth Factor A

**VEGFR1/flt-1:** Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1

**VEGFR2/KDR:** Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2

**WHO:** World Health Organization

**XCL1:** X-C Motif Chemokine Ligand 1

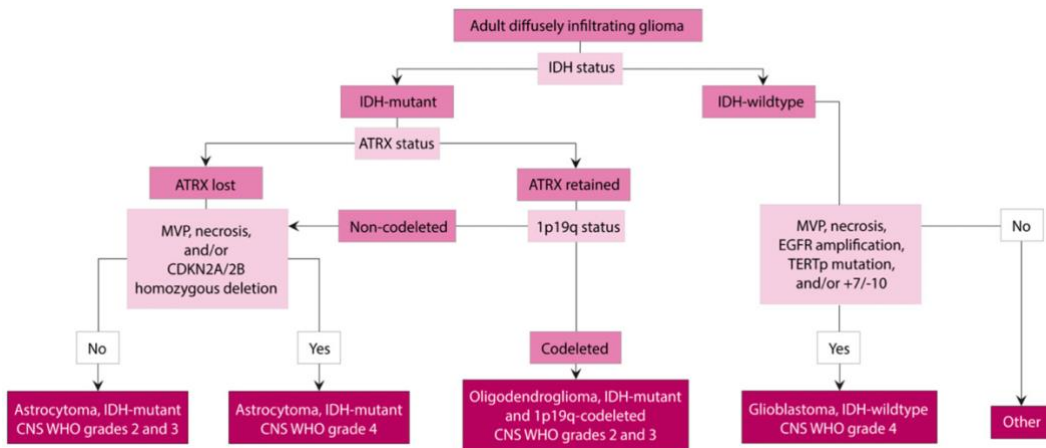
**ZEB:** Zinc Finger E-box Binding Homeobox

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Glioblastom (GBM)

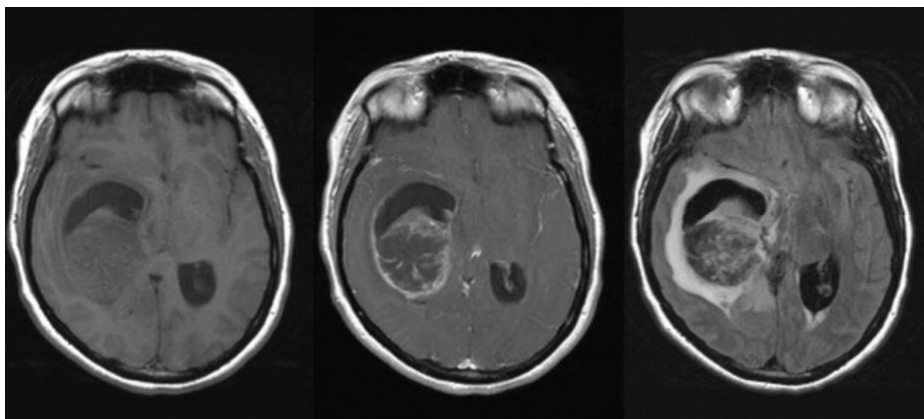
Gliome sind eine heterogene Gruppe von Hirntumoren mit Ähnlichkeit zu glialem Gewebe. Die Einteilung erfolgt dabei durch eine histopathologische, molekulargenetische und immunhistochemische Differenzierung auf Grundlage der WHO-Klassifikation und den aktuellen Empfehlungen des cIMPACT-NOW-Konsortiums (Louis et al., 2021, Brat et al., 2018, Brat et al., 2020). Es werden die diffusen Gliome vom adulten Typ (hierzu zählt auch das Glioblastom (GBM) IDH-Wildtyp [IDH<sup>WT</sup>]), die diffusen low- und high-grade-Gliome des pädiatrischen Typs und die umschriebenen astrozytischen Gliome unterschieden (Louis et al., 2021). Das tumorübergreifende Grading von ZNS-Tumoren hat man verlassen und gradiert jeden Tumor separat.

Die Differenzierung diffuser Gliome vom adulten Typ gelingt durch die Bestimmung molekulargenetischer sowie histologischer Parameter (Abbildung 1) (Martin et al., 2023). Zu den Malignitätskriterien des GBM zählen die erhöhte Zelldichte und Kernpleiomorphie, diffuse Wachstumsmuster, eine erhöhte Mitoserate, vorhandene mikrovaskuläre Proliferationen und Nekrosen (Agnihotri et al., 2013). Das GBM ist dabei der am häufigsten auftretende maligne hirneigene Tumor. Zu den Hauptmerkmalen zählen das diffus infiltrative Wachstum, die starke Inhomogenität des Tumorgewebes (Abbildung 2) und eine hohe Nekroseneigung im Tumorzentrum, welche durch ein rasantes Wachstum bedingt ist.



**Abbildung 1: Molekulargenetische und histomorphologische Differenzierung der diffusen Gliome vom adulten Typ mit Darstellung des diagnostisch zugrundeliegenden Mutationsspektrums**

Gezeigt werden genetische und histologische Aberrationen, die als diagnostische Parameter zur molekulargenetisch/histomorphologischen Differenzierung der jeweiligen Gliom-Entitäten genutzt werden. Hier sind vor allem Gene der Isocitrat-Dehydrogenase 1/2 (IDH1/2), ATP-abhängigen Helikase (ATRX), die chromosomale Co-Deletion 1p/19q und die homozygote CDKN2A/B Deletion von Bedeutung. Für die Diagnose eines GBM sind zusätzlich EGFR-Amplifikationen, TERT-Promotor Mutationen oder der Verlust von Chromosom 7/ Gewinn von Chromosom 10 entscheidend. Ergänzend werden histomorphologisch mikrovasculäre Proliferationen (MVP) und zentrale Nekrosen beurteilt. [Quelle: (Martin et al., 2023) "From Theory to Practice: Implementing the WHO 2021 Classification of Adult Diffuse Gliomas in Neuropathology Diagnosis" Brain Sci 13;5, modifiziert]



**Abbildung 2: Krianielle Magnetresonanztomographische (cMRT) Bildgebung des GBM**

MRT-Aufnahme eines gesicherten GBM in der rechten Hirnhemisphäre in drei Sequenzen. Das GBM weist einen zystischen Anteil auf und verlagert durch sein starkes Wachstum die Mittellinie. Dies führt zu einer Verbreiterung des Hinterhorns auf der kontralateralen Seite. Sequenz 1 (links) = T1-gewichtete, axiale, native Aufnahme; Sequenz 2 (mittig) = T1-gewichtete, axiale Aufnahme nach Kontrastmittelgabe mit perifokalem *Enhancement* als Zeichen der Tumoraktivität sowie zentraler hypointenser Nekrose; Sequenz 3 = Axiale FLAIR („*fluid attenuated inversion recovery*“) mit der Darstellung beginnender Liquordiapedeseseäume und Ödembildung. [Quelle: Universitätsklinikum Tübingen, Abteilung für Diagnostische und Interventionelle Radiologie]

### **1.1.1 Klassifikation der diffusen Gliome vom adulten Typ**

Die verschiedenen Entitäten können anhand des klinisch-pathologischen Verlaufs und vor allem des genetischen Aberrationsprofils unterschieden werden. Zu diesen zählen das IDH-mutierte Astrozytom WHO Grad 2 und 3, das IDH-mutierte Astrozytom WHO Grad 4, das IDH-mutierte und 1p19q-kodeletierte Oligodendrogliom WHO Grad 2 und 3 sowie das GBM IDH<sup>WT</sup> WHO Grad 4 (Wick et al., 2021, Louis et al., 2021). Diese, für jede Entität typischen genetischen Aberrationen, beeinflussen das Grading maßgeblich und ermöglichen schlussendlich die Diagnosestellung (Abbildung 2). Zu wichtigsten molekularen Biomarkern, die bei der Diagnose der häufigsten diffusen Gliomtypen bei Erwachsenen von zentraler Bedeutung sind, gehören die IDH-Mutation, 1p/19q-Kodeletion, TERT-Promotormutation, EGFR-Amplifikation, +7/–10-Genotyp und homozygote Deletion von CDKN2A/B, wobei die MGMT-Promotormethylierung als prädiktiver Marker speziell für das GBM IDH<sup>WT</sup> erwähnt wird (Martin et al., 2023, Wick et al., 2021). Diese Biomarker spielen eine entscheidende Rolle bei der genauen Diagnose und Klassifizierung der Gliome und tragen zur Prognoseabschätzung und Auswahl der optimalen Behandlungsstrategien bei.

Als diagnostischer Marker für IDH-mutierte Gliome sind die IDH1<sup>R132</sup> oder IDH2<sup>R172</sup> Mutation von höchster Relevanz, da hierdurch die Bildung des Onkometaboliten 2-Hydroxyglutarat stattfindet und eine erhöhte DNA-Methylierung (CpG Insel-Methylierungsphänotyp) zu beobachten ist (Han et al., 2020, Brat et al., 2020). Astrozytome mit einer Mutation in der IDH-Genfamilie weisen häufig auch eine Mutation im *alpha-thalassemia/mental retardation, X-linked* (ATRX)-Gen auf oder zeigen einen nachweisbaren Verlust der nukleären Expression von ATRX durch immunhistochemische Tests (Weller et al., 2021, Wick et al., 2021). ATRX-Mutationen spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation der zellulären Proliferation und der Förderung der zellulären Langlebigkeit durch alternative Mechanismen zur Verlängerung von Telomeren (Ohba et al., 2020). Zusätzlich finden sich in diesen Tumoren auch Mutationen im Tumorsuppressorgen TP53. Es ist wichtig anzumerken, dass bei diesen IDH-mutierten Astrozytomen per Definition keine 1p/19q-Kodeletion vorliegt. Neben den bekannten histologischen Merkmalen wie dem Vorhandensein von Nekrosen

und/oder mikrovaskulären Proliferaten wird eine homozygote Deletion von *cyclin dependent kinase inhibitor 2 (CDKN2)A/B* als ein molekularer Marker für Astrozytome WHO Grad 4 angesehen, welche zur Inaktivierung der *retinoblastoma (Rb)1*- und p53-Signalwege durch die biallelische Deletion von p16<sup>INK4a</sup>, p14<sup>ARF</sup> und p15<sup>INK4b</sup> führt (Fortin Ensign et al., 2023). Eine nukleäre ATRX-Positivität hingegen hat eine 1p/19q-Kodeletionsanalyse zufolge, welche die Differenzierung zwischen Astrozytom und Oligodendrogliom ermöglicht (Weller et al., 2021, Wick et al., 2021). Bei der 1p/19q-Kodeletion sind biallelisch verschiedene Tumorsuppressorgene inaktiviert (Wesseling et al., 2015). Das GBM IDH<sup>WT</sup> ist in der Regel durch histologische Merkmale der Dysplasie gekennzeichnet, wie pathologische Gefäßproliferationen und/oder Nekrosen. Bei diffusen Astrozytomen, die weder eine mikrovaskuläre Proliferation noch Nekrosen aufweisen und zudem IDH<sup>WT</sup> sind, sollten genetische Veränderungen untersucht werden, die mit dem GBM IDH<sup>WT</sup> assoziiert sind (Wick et al., 2021). Hierzu zählen insbesondere die Amplifikation des *epidermal growth factor receptors (EGFR)*, Promotormutationen des *telomerase reverse transcriptase (TERT)*-Gens und/oder Veränderungen in den Chromosomen 7 und 10 (Verlust von Chromosom 10 und Gewinn von Chromosom 7, auch als +7/-10 bezeichnet) (Brat et al., 2018). Die Amplifikation des EGFR-Gens bewirkt in diesem Kontext eine Steigerung der Zellteilung, eine erhöhte Invasion von Krebszellen und eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber apoptotischen Signalen, welches durch eine abnormale Aktivierung des Signalwegs der Rezeptortyrosinkinasen zustande kommt (Oprita et al., 2021). Ergänzend bewirkt die TERT-Promotormutation eine gesteigerte Expression von TERT, was wiederum zu einer Stabilisierung der Telomere führt (Ohba et al., 2020). Dies verhindert den Eintritt der Zellen in die Seneszenz und fördert die Zellproliferation (Ohba et al., 2020). Schlussendlich führt der +7/-10 Genotyp zu einer Aktivierung von Genen auf Chromosom 7, die das Tumorwachstum fördern, wobei es gleichzeitig zur Inaktivierung von Genen auf Chromosom 10 kommt, die eine tumorsuppressive Funktion haben wie z.B. dem *phosphatase and tensin homolog (PTEN)*-Gen (Brat et al., 2018).

Wenn eine oder mehrere dieser Veränderungen festgestellt werden, werden diese Tumoren auch ohne histologischen Nachweis von mikrovaskulären Proliferationen und Nekrosen als GBM IDH<sup>WT</sup> eingestuft (Wick et al., 2021, Weller et al., 2021).

### **1.1.2 Epidemiologie des Glioblastoms**

Die Inzidenz des GBM in den USA liegt bei 3,26/100.000 und das mittlere Überleben bei 15 Monaten (Ostrom et al., 2022). Dabei nimmt die Inzidenz mit steigendem Alter zu, wobei ein Peak bei 75-84 Jahren erreicht wird (Ostrom et al., 2022). GBM machen 14,2 % aller primären Hirntumore aus und haben unter den malignen primären Hirntumoren einen Anteil von 50% (Ostrom et al., 2022). Betroffen sind vor allem Männer mit einer Inzidenzrate, die 1.6-mal höher ist als die von Frauen (Ostrom et al., 2013, Ostrom et al., 2022). Die schlechte Prognose wird vor allem in der nur 6.9%igen 5-Jahres-Überlebensrate sichtbar (Ostrom et al., 2013, Ostrom et al., 2022). Ein Vergleich von weißer und schwarzer Bevölkerung zeigt zudem eine doppelt so hohe Inzidenz in der weißen Bevölkerung (Ostrom et al., 2022).

### **1.1.3 Prävention, Klinik, Diagnose, Prognose und Therapie des GBM**

Patienten zeigen je nach Lokalisation und Wachstum variable Symptomatik. Das Wachstum im Frontallappen kann mit Persönlichkeitsänderungen und Gemütsschwankungen einhergehen, die leicht mit dementiellen oder psychiatrischen Erkrankungen verwechselt werden können (Wirsching et al., 2016). Typische Anzeichen, die den Verdacht auf eine Raumforderung lenken können, umfassen neu auftretende fokale oder generalisierte epileptische Anfälle, neurologische Symptome, Persönlichkeitsveränderungen sowie allgemeine Anzeichen erhöhten Hirndrucks wie Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen oder Beeinträchtigungen des Bewusstseins. (Yuile et al., 2006). Zusammenfassend ist die zu beobachtende Symptomatik äußerst heterogen.

Prävention und Früherkennung spielen beim GBM keine wesentliche Rolle, da es derzeit keine verfügbaren Parameter zur Früherkennung gibt. Allerdings wurde festgestellt, dass spezifische Mutationen, die mit Gliomen in Verbindung stehen, wie zum Beispiel IDH- und TERT-Promotor-Mutationen sowie 1p/19q-Kodeletion, in freier Tumor-DNA im Blutserum und Liquor nachweisbar sind (Miller et al., 2019, Muralidharan et al., 2021).

Die neuroradiologische Diagnostik wird mittels Magnetresonanztomografie (MRT)-Untersuchung ohne und mit Kontrastmittelgabe durchgeführt. MRT-Aufnahmen zeigen in der T2-Wichtung sowie in der *Fluid-Attenuated Inversion Recovery* (FLAIR) eine verstärkte Kontrastmittelaufnahme im Randbereich als Zeichen einer Unterbrechung der Blut-Hirn-Schranke (BHS) und perifokalen Ödembildung, sowie ein zentral gelegenes hypodenses Nekroseareal (Abbildung 1). Perfusions-MR-Untersuchungen und Aminosäure- *positron emission tomography* (PET) werden nicht als Standarddiagnostik verwendet, können jedoch metabolische Hotspots bei Tumoren identifizieren, wenn diese sich an geeigneten Stellen befinden (Law et al., 2019). Dies dient der präzisen Planung von Operationen und Biopsien. Die Bildgebung ist hierbei auch für die Verlaufsbeurteilung während der Gliomtherapie von großer Bedeutung (Okada et al., 2015). Das präoperative Management eines Hirnödems, welches prä- als auch postoperativ auftritt sowie tumorassoziierter epileptischer Anfälle, ist ebenso ausgesprochen wichtig (Wick et al., 2021).

Um ein maßgeschneidertes Therapiekonzept zu erstellen, ist eine histologische Untersuchung des Tumorgewebes erforderlich. In vielen Fällen wird zusätzlich eine molekularpathologische Analyse durchgeführt, welche durch die Gewebesicherung mittels Operation oder stereotaktischer Biopsieentnahme ermöglicht wird (Wick et al., 2021). Die Diagnosestellung des GBM IDH<sup>WT</sup> beruht dabei auf der Identifizierung von drei genetischen Parametern (TERT Promotor Mutation, EGFR-Gen Amplifikation und der kombinierte Verlust von Chromosom 7 bzw. Zugewinn von Chromosom 10), wobei nur einer dieser drei Parameter für eine Diagnose ausreicht (Brat et al., 2018). Ebenso ausreichend ist die histologische Sicherung von mikrovaskulären Proliferationen oder Nekrosen (Brat et al., 2018, Louis et al., 2021). Ergänzend ermöglicht das Next-Generation-

Gen-Panel-Sequencing (NGS) es, alle oder die meisten genetischen und chromosomalen Abweichungen, die diagnostisch relevant sind, in einem einzigen Test zu erfassen (Zacher et al., 2017). Darüber hinaus hat sich die DNA-Methylierungsprofilierung mittels Array-Technologie als effektive und innovative diagnostische Methode erwiesen (Capper et al., 2018).

Als prognostisch relevant haben sich verschiedene molekulare Marker bewährt. Zu diesen zählen IDH1/2 Mutationen, Methylierung des *O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA Methyltransferase* (MGMT) Promotors, EGFR- sowie p53 Mutationen (Thakkar et al., 2014). Prognostisch positiv ist vor allem eine nachweisbare Methylierung des MGMT-Promotors. MGMT ist ein Reparaturenzym, das Alkylgruppen von Guaninbasen entfernt und so mit dem alkylierenden Zytostatikum Temozolomid (TMZ) interferiert und dessen Wirkung aufhebt. Die Methylierung in der MGMT-Promotorregion verringert somit Resistenzen gegen TMZ (Hegi et al., 2005).

Die derzeitige Primärtherapie besteht aus einem multidisziplinären Ansatz mit chirurgischer Resektion oder Biopsie und Chemoradiotherapie mit TMZ und 6 Zyklen TMZ-Erhaltungstherapie sowie ggf. der *Tumor Treating Fields* (TTF) Behandlung (Weller et al., 2021, Wick et al., 2021). Bei vulnerableren Patienten findet eine hypofraktionierte Chemoradiotherapie und 12 Zyklen TMZ-Erhaltungstherapie oder Radio- oder Chemotherapie nach MGMT-Status statt (Weller et al., 2021, Wick et al., 2021). Die Rezidivtherapie besteht aus Resektion, Systemtherapie und/ oder Strahlentherapie (Weller et al., 2021, Wick et al., 2021).

#### **1.1.4 Neuartige Therapieansätze**

Abgesehen von der in Absatz 1.1.3 erwähnten Standardtherapie, sind in den letzten Jahren zunehmend neue Therapieansätze entwickelt worden, um die Erfolgsaussichten einer Behandlung zu steigern. Diese umfassen TTFs, die *boron neutron capture therapy* (BNCT), antiangiogene Ansätze, Immunotherapie und die onkolytische Virotherapie (OVT).

In zahlreichen Studien zeigen TTFs vielversprechende Effekte und sind seit 2015 von der *Food and Drug Administration* (FDA) in den USA für primäre GBM und deren Rezidive zugelassen. So beispielsweise auch in einer Studie von Stupp et al., (2017) bei der TTFs in einer randomisierten kontrollierten (RCT)-Studie mit 695 Patienten das mittlere Gesamtüberleben um 4.9 Monate im Vergleich zur Kontrollgruppe gesteigert haben (TTFs + TZM 20.9 Monate vs. TZM 16 Monate). TTFs zeigen dabei durch Applikation von alternierenden elektrischen Impulsen mit 200 kHz eine selektiv-anti-mitotische Wirkung auf GBM-Zellen und führen somit zu Mitosearrest und Apoptose in stark proliferierenden Zellpopulationen (Kirson et al., 2007, Giladi et al., 2015).

Ein anderer Ansatz ist die BNCT, bei der Boron-10 in Form von Boronophenylalanin (BPA) selektiv in das Tumorgewebe eingeschleust wird. Durch Applikation eines Neutronenstrahls wird das Boron-10 in einen energetisch höheren Zustand versetzt und zerfällt in ein hochenergetisches  $\alpha$ -Teilchen ( $He-4$ ) und  $Li-7$  (Barth et al., 2018). Da  $\alpha$ -Teilchen nur 5-9  $\mu m$  in menschliches Gewebe eindringen, fokussiert sich die Radiatio auf die adressierte Krebszelle (10 $\mu m$ ), sodass gesunde Zellen nicht von dieser Intervention betroffen sind (Barth et al., 2018). In einer klinischen Studie aus Japan, die mit 23 IDH<sup>WT</sup>-GBM-Patienten durchgeführt wurde, zeigte sich in der Interventionsgruppe, welche postoperativ nur BNCT erhielt, ein mittleres Gesamtüberleben von 19.5 Monaten und war somit der Standardtherapie überlegen (Kawabata et al., 2009).

In den letzten Jahren sind antiangiogene Therapiemöglichkeiten stark in den Fokus gerückt. Zu diesen zählen der humanisierte monoklonale Antikörper Bevacizumab, der die Funktion des *vascular endothelial growth factors* (VEGF) hemmt. Bevacizumab wirkt dabei, durch fehlende Aktivierung der VEGF-Rezeptoren VEGFR1/flt-1 und VEGFR2/KDR auf Endothelzellen, als Inhibitor der Angiogenese und des damit verbundenen Tumorwachstums (Winkler et al., 2018, Ameratunga et al., 2018). Ernüchternd waren die Ergebnisse einer randomisierten, kontrollierten Studie von 2014 mit einer repräsentativen Probandenzahl von 978. In dieser Studie erzielte die Behandlung mit Bevacizumab, im Vergleich zur Standardtherapie, keine signifikante Verlängerung des Gesamtüberlebens; dennoch zeigte sich ein Therapieerfolg im

progressionsfreien Intervall (Gilbert et al., 2014b). Einen interessanten Ansatz bietet der monoklonal-konjugierte Antikörper Depatuxizumab mafodotin (ABT-414), der die Blockade des EGF-Rezeptors auf der Oberfläche von GBM-Zellen ermöglicht und zusätzlich Tubulin-Polymerisation mittels Monomethyl-auristatin-F blockiert (Phillips et al., 2016). In zwei internationalen Phase-I-Multi-Centerstudien wurde bei Rezidivpatienten ein mittleres Gesamtüberleben von 10.7 bzw. 7.4 Monaten beobachtet und die Wirksamkeit beziehungsweise Sicherheit von ABT-414 evaluiert (Gan et al., 2018, Lassman et al., 2019). Eine weitere klinische Studie (NCT02573324) evaluiert derzeit den Effekt auf das IDH<sup>WT</sup> GBM.

Bessere Resultate sollen Immuntherapie-Studien unter Verwendung von *chimeric antigen receptor T-cells* (CAR-T-Zellen) oder Immun-Checkpoint-Inhibitoren liefern. CAR-T-Zellen sind genetisch modifizierte, meist autologe, tumorspezifische T-Zellen, die z.B. tumorspezifische Oberflächenmarker wie dem trunkierten, konstitutiv aktiven EGFR (EGFRvIII) adressieren (Yang et al., 2022, Mahmoud et al., 2022). Eine Phase-I-Studie für EGFRvIII-spezifische CAR-T-Zellen bestätigte Wirksamkeit und Sicherheit der verwendeten CAR-T-Zellen (O'Rourke et al., 2017). Bei Immun-Checkpoint-Inhibitoren wird die immunsuppressive Wirkung von inhibitorischen Proteinen wie *programmed cell-death-protein-1* (PD-1), *programmed cell-death-ligand-1* (PD-L1) oder *cytotoxic-T-lymphocyte-associated-protein 4* (CTLA-4/CD152) gehemmt, um eine verstärkte Immunantwort durch zytotoxische T-Zellen zu erzielen (Huang et al., 2017). Vor allem der PD-1-Signalweg zeigt sowohl in der Grundlagenforschung (Zeng et al., 2013), als auch in klinischen Studien (Cloughesy et al., 2019) eine Verlängerung des Gesamtüberlebens, muss jedoch mit anderen Therapieoptionen kombiniert werden, um im GBM einen durchbrechenden Effekt zu erzielen.

Eine weitere Therapiestrategie ist die onkolytische Virotherapie (OVT), die 1950 erstmals beschrieben wurde (Pack, 1950). Ein Comeback der OVT mit neuen Anwendungsmöglichkeiten inklusive der Gliomtherapie zeigt sich in den letzten 5-10 Jahren. Der Wirkmechanismus von genetisch modifizierten onkolytischen Viren (OV) verschiedenster Herkunft beruht auf der Fähigkeit der selektiven

Replikation und Lyse von Krebszellen, wobei u.a. auch anti-angiogene Wirkungen, vermutlich durch Infektion von Endothelzellen im tumorassoziierten Gewebe, beobachtet wurden (*Bartlett et al., 2013, Mahmoud et al., 2022*). Zusätzlich induzieren OV erhöhte Immunantworten, bedingt durch eine generelle, infektionsbedingte Stimulation des Immunsystems sowie durch während der Onkolyse freigesetzte Tumorantigene und *Damage-Associated Molecular Pattern* (DAMP) Moleküle (Workenhe and Mossman, 2014, Gujar and Lee, 2014, Harrington et al., 2019). Zurzeit werden mehr als 20 OV im präklinischen und klinischen Einsatz getestet wobei Adenoviren einen Großteil der OV ausmachen (Mahmoud et al., 2022). Mehrere klinische Phase-I/II-Studien zeigen Verlängerungen des Gesamtüberlebens oder des progressionsfreien Intervalls (Geletneky et al., 2017, Fukuhara et al., 2016). Modifizierte rekombinante Parvo-Rhinoviren (PVSRIPO) zeigten in einer klinischen Phase-I-Studie eine signifikante Erhöhung der 24- bzw. 36-Monats-Überlebensrate und somit den progressiven Fortschritt der OVT (Desjardins et al., 2018). In Kombination mit weiteren immunotherapeutischen Ansätzen wird derzeit untersucht, ob OV kumulativ wirksam sind (Hardcastle et al., 2017). Die Entwicklung verbesserter OVs und OVTs ist Gegenstand aktueller Forschung (Mahmoud et al., 2022).

### **1.1.5 Motilität und Immunsuppression**

Ein aberrantes Verhalten bezüglich Migration und Invasion sowie die ausgeprägte Immunsuppression sind zentrale Charakteristika des GBM, die größtenteils zum jahrzehntelangen Misserfolg der GBM-Therapie beigetragen haben.

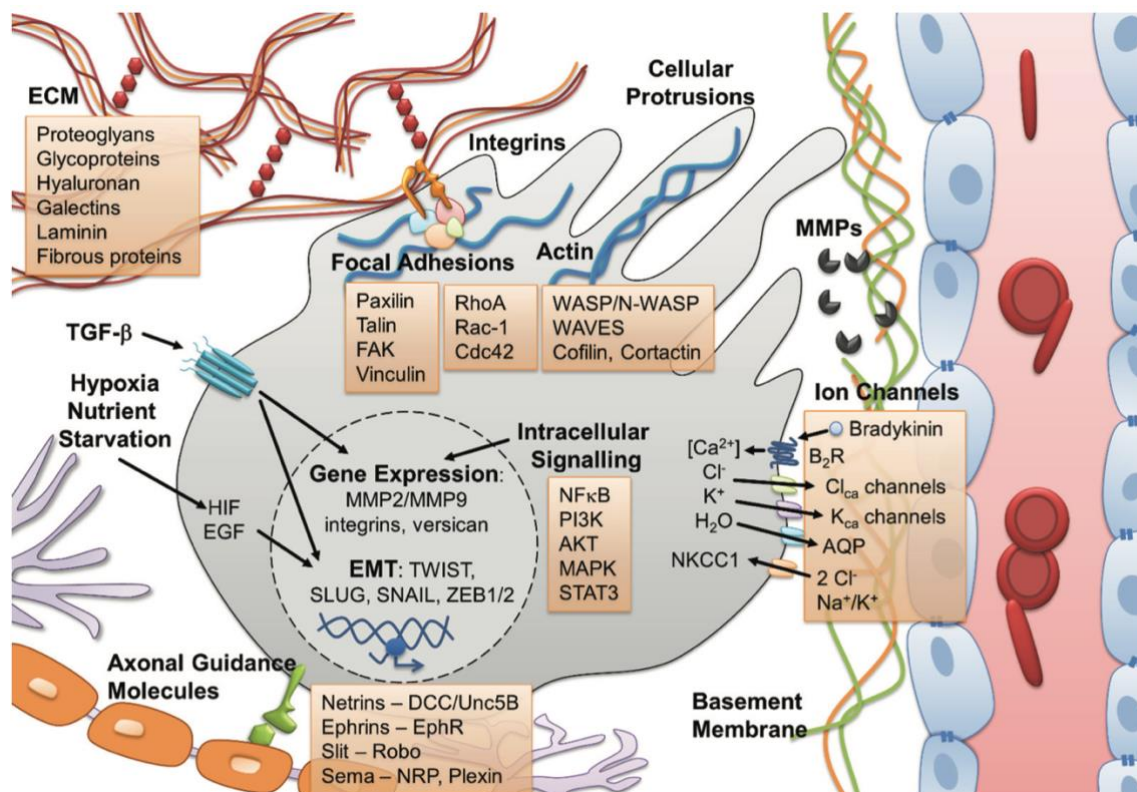
Die molekularen Mechanismen der Motilität sind dabei ursächlich für das infiltrative Wachstum beziehungsweise die schlechte Prognose des GBM. Es findet eine sukzessive Infiltration und Übernahme der gesunden neuronalen Netzwerke statt, was die Ursache für Therapieversagen und Rezidivbildung darstellt (Demuth and Berens, 2004, Venkatesh et al., 2019). Dazu trägt ein multifaktorieller Prozess aus Veränderungen in GBM-Zellen und Arealen des Extrazellulärraumes, also des Tumor-Mikromilieus, bei (Abbildung 3) (Armento et

al., 2017). So migrieren Zellen in die kontralaterale Hirnhemisphäre und fungieren dort als Vorläufer eines Rezidivs lange bevor klinische Symptome auftreten (Chicoine and Silbergeld, 1995). Dabei dienen Gliomzellen, die noch nicht in Tumor-Tumor- oder Astrozyten-Tumor-Netzwerke integriert sind als zentrale Treiber der Invasion (Venkataramani et al., 2022). Zur Migration nutzen GBM-Zellen die gleichen Routen wie noch undifferenzierte Neurone. So okkupieren GBM-Zellen nicht nur den perivaskulären und perineuronalen Raum, sondern migrieren auch entlang myelinisierter Axone und der Pia mater (Miyai et al., 2023). Ergänzend verfügen Gliomzell-Netzwerke über sogenannte „tumor-microtubes“, welche für die Invasion, als auch das Analysieren des Tumor-Mikromilieus verantwortlich sind (Osswald et al., 2015). Nicht-konnectierte Gliomzellen, welche eine Subpopulation bilden, zeigen dabei ein Migrationsverhalten, das Neuronen gleicht, welche sich am Anfang der neuronalen Entwicklung befinden (Venkataramani et al., 2022). Zwecks Invasion und Migration werden Signalproteine wie Endothelzell-sezerniertes Bradykinin, oder Ephrine und Netrine, welche von Neuronen produziert werden, als Leitproteine der Chemotaxis genutzt (Chédotal et al., 2005, Montana and Sontheimer, 2011). Während der Migration wurden hydrodynamische Veränderungen mit Verlusten des Zellvolumens um bis zu 35% beobachtet. Dies wird durch den „Missbrauch“ von Ionenkanälen bewerkstelligt (Watkins and Sontheimer, 2011). Weiterhin zeigte sich die autokrine Ausschüttung von Glutamat im Tumorareal, die zu Nekrosen führt und derart Raum für die Tumorzell-Infiltration und Besiedlung dieser Nische bereitstellt (Lyons et al., 2007). GBM-Zellen zeigen im Verlauf der Migration Hypoxie-induzierte metabolische Veränderungen; Migration wird dabei u.a. durch Hypoxie initiiert. Wie bereits erwähnt, spielt das Tumor-Mikromilieu und das extrazelluläre Tumorareal eine wichtige Rolle bezüglich Zellmotilität. So hat die Konsistenz der Extrazellulärmatrix (ECM) großen Einfluss auf die GBM-Zell-Motilität (Lo et al., 2000, Cuddapah et al., 2014). Während der Tumorzellinfiltration wird das Areal durch sukzessive Ausschüttung von Matrixmetalloproteinasen (MMPs), Matrixmetalloproteinasen mit Thrombospondin Motiv (ADAMTS), Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA), Cathepsin B und A-Disintergrin remodelliert (Lu et

al., 2012, Hatoum et al., 2019). Darüber hinaus werden Komponenten der ECM wie Laminin, Fibronectin (FN) und Kollagen, sowie auch der vaskulären Basalmembran (BM) wie Tenascin (TNC) sezerniert (Mahesparan et al., 2003). Neben dem extrazellulären Areal muss bei migratorischen Prozessen auch das Zytoskelett der migrierenden Zelle moduliert werden. Für die Zellprotusion sind Modifikationen der Aktinpolymerisation und der Zellpolarisation von essenzieller Bedeutung, es kommt zur Ausbildung von Filopodien, Lamellopodien, und Invadopodien (Yamaguchi and Condeelis, 2007, Fabian et al., 2021). Interaktionen zwischen Zytoskelett und den intrazellulären Integrindomänen werden moduliert und fokale Adhäsionskomplexe am migrierenden Pol der Zelle gebildet (Ridley et al., 2003). Integrine sind dabei das Bindeglied zwischen Extrazellulärraum und Zelle und kontaktieren mittels FN, Kollagen und Laminin an die ECM. Via Bindung der Liganden an Integrinkomplexe wird eine Aktivierung der *focal adhesion kinase* (FAK) erzielt, intrazelluläre Signalwege aktiviert und derart migratorische Prozesse unterstützt (Mitra et al., 2005).

Eine essenzielle Rolle in der Invasion nimmt die Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT) ein. Obwohl das GBM kein epithelialer Tumor ist, finden im Tumor dennoch EMT-ähnliche Prozesse statt. Neueste Forschung hat gezeigt, dass Gliomzellen mit einem mesenchymalen Phänotyp vornehmlich im Tumorkern sitzen, an das Tumor-Tumor-Netzwerk angeschlossen sind und sich nicht in der Randzone des GBM befinden (Venkataramani et al., 2022). Dies steht im Kontrast zu Arbeiten, die einen mesenchymalen Phänotyp als Grundlage für die Invasion ansehen (Iwadate, 2016), stimmt jedoch mit ersten Beobachtungen überein, dass der mesenchymale Phänotyp mit einer Ausbildung multizellulärer Netzwerke mit Membranausstülpungen begleitet wird (Venkataramani et al., 2022). EMT-Prozesse mit der Ausbildung eines mesenchymalen Phänotyps zeichnen sich durch einen Verlust von Zelladhäsion und Polarität aus, wobei Signalmoleküle wie *hypoxia inducible factor* (HIF), *transforming growth factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ), *epidermal growth factor* (EGF), *platelet derived growth factor* (PDGF) oder *fibroblast growth factor* (FGF)-2 EMT fördern (Moustakas and Heldin, 2007, Iwadate, 2016). Vor einigen Jahren wurde die 'Go or Grow'-Hypothese

favorisiert, die die Dichotomie zwischen Proliferation und Migration postuliert - beide Prozessen finden jeweils exklusiv statt (Hatzikirou et al., 2012). Dies wird in neuen Studien in Frage gestellt, in denen eine komplette Dichotomie als unwahrscheinlich angenommen wird (Scribner and Fathallah-Shaykh, 2017).



**Abbildung 3: Mechanismen der Migration und Invasion des GBM**

Dargestellt sind zelluläre und extrazelluläre Mechanismen und beteiligte Strukturen, welche maßgeblich zum Invasions- und Migrationsverhalten einer GBM-Zelle beitragen und somit dessen Phänotyp bedingen und die Komplexität der verschiedenen Interaktionen verdeutlichen sollen. [Quelle: (Armento et al., 2017) „Molecular Mechanisms of Glioma Cell Motility“ In: Glioblastoma. Steven De Vleeschouwer (Editor), Codon Publications, Brisbane, Australia ISBN: 978-0-9944381-2-6, p.76]

Das GBM ist ein heterogener, stark immunsuppressiver, aber nur schwach immunogener Tumor. Deutlich wird dies bei Betrachtung der Effektivität von aktuellen Immunotherapien. Ein durchschlagender Erfolg, wie beispielweise beim hoch-immunogenen Melanom wurde, sehr wahrscheinlich aufgrund dieser

Charakteristika des GBM, noch nicht beobachtet. Die Immunevasion des GBM basiert auf diversen Mechanismen zu denen die Überexpression von PD-L1 auf Tumorzellen, CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten, Mikrogliazellen und Tumor-assoziierten Makrophagen (TAM) und eine Überexpression von PD-1 auf CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten, Natürlichen Killerzellen (NK) und B-Lymphozyten gehört (Rafii et al., 2023). Ergänzend tritt eine Überexpression von CTLA-4/CD152 auf allen T-Lymphozyten sowie von *T-cell immunoglobulin and mucin-domaincontaining* (TIM)-3/HAVCR2 auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten auf (Rafii et al., 2023).

Neftel et al. (2019) postulieren vier Zustände von GBM-Zellen, die maßgeblich die intratumorale Heterogenität definieren und so die Immuntherapie erschweren. Eine interessante Eigenschaft ist auch die reduzierte Migration von T-Zellen aus dem Knochenmark ins Blut, was durch den Verlust des *surface sphingosine-1-phosphate receptor 1* (S1P1) erklärt werden kann (Thangada et al., 2010). Immunmodulatorische Prozesse finden jedoch nicht nur in peripheren, hirnexternen Arealen des menschlichen Körpers statt. Sobald T-Zellen das GBM infiltrieren wird ein Großteil dieser T-Zellen funktionell inaktiviert. Mechanismen, die diese Inaktivierung vermitteln, sind u.a. die Hochregulation von PD-L1 und/oder B7-1 und -2 auf GBM-Zellen oder PD-L1 bindet an den „*exhaustion*“ Rezeptor PD-1, an die *Cluster of Differentiation*-Proteine CD80/B7-1/2 und CD86/B7-2 sowie an CTLA-4/CD152 auf aktivierten T-Zellen. Dies führt zu deren Inaktivierung, wird aber auch der Hyposensitivität von T-Zellen zugeschrieben (Woroniecka et al., 2018). Der Verlust des Tumorsuppressors PTEN erhöht die Expression von PD-L1 auf GBM-Zellen und führt somit zur *T cell exhaustion*, der T-Zell-Ermüdung und -inaktivierung (Parsa et al., 2007).

Zusammenfassend bedienen sich GBM verschiedenster molekularer Mechanismen. Allesamt tragen zur Pathogenität, Letalität und Therapieresistenz bei.

## 1.2 Transforming Growth Factor $\beta$

Die TGF- $\beta$ -Superfamilie besteht aus strukturell ähnlichen Proteinen, zu denen TGF- $\beta$ 1 bis -3, *bone morphogenetic proteins* (BMP), *growth differentiation factors* (GDF) sowie die Activin- und Nodal-Subfamilie zählen (Kaminska and

Cyranowski, 2020). Die TGF- $\beta$ -Subfamilie besteht dabei aus multifunktionalen Zytokinen, die in die ECM sezerniert werden und dort eine Vielzahl an Aufgaben verrichten. Die Signalwirkung dieser Zytokine spielt dabei eine zentrale Rolle im Rahmen der Proliferation, Differenzierung, Migration, ECM-Produktion und Überleben vieler verschiedener Zelltypen (Ferrer et al., 2018). Darüber hinaus zeigten verschiedene Studien eine Schlüsselrolle von TGF- $\beta$  in inflammatorischen und immunregulatorischen Prozessen (Gorelik and Flavell, 2001, Thomas and Massague, 2005, Massague, 2008). Die Dysregulation der TGF- $\beta$ -Expression und/oder -Signalwirkung wird dabei mit der Pathogenese vieler Erkrankungen und vor allem Krebs in Verbindung gebracht (Massague, 2008).

### **1.2.1 TGF- $\beta$ Proteine**

Der TGF- $\beta$  Subfamilie werden TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3 zugeordnet. Sie zeigen strukturelle Übereinstimmungen, werden jedoch von verschiedenen Genen kodiert und wirken in autokrinen und parakrinen regulatorischen Netzwerken (Gilbert et al., 2016). Obwohl die Aminosäuresequenz der drei Zytokine zu mehr als 80% übereinstimmt und die Signalwirkung über dieselben kanonischen Mediatoren (*small body size mothers against decapentaplegic*, SMAD 2/3) erfolgt, zeigen sich dennoch unterschiedliche physiologische Wirkungen (Lavery et al., 2009). Jedes TGF- $\beta$ -Gen wird von einem spezifischen Promotor flankiert und zeigt dabei unterschiedliche Expressionsmuster, je nach Gewebetyp (Roberts et al., 1991). Alle drei Proteine werden als Dimer, gekoppelt an das *latent TGF- $\beta$  binding protein* (LTBP) sezerniert und sind zunächst inaktiv (Robertson et al., 2015). Auch nicht-kanonische Signalwege wie der RAS/MAPK/ERK-, PI3K/AKT-, TAK1-p38/JNK- und PAR6-Polarity-Signalweg, werden von allen drei Proteinen, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, aktiviert (Kaminska and Cyranowski, 2020). Sowohl die Gewichtung der Signalwege, die Adressierung verschiedener Zellen, als auch die in der ECM und im Zytosol vorhandene Konzentration bilden dabei ein sich deutlich

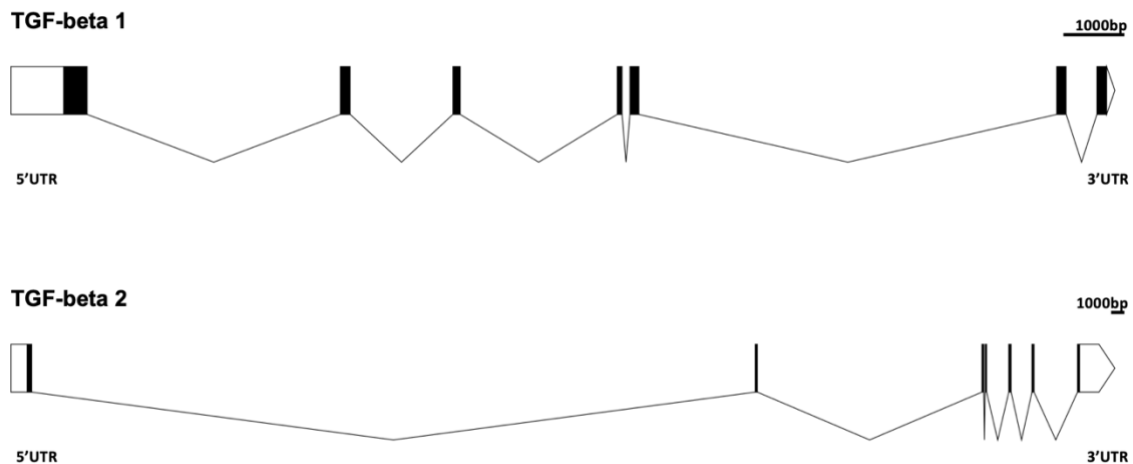
unterscheidendes Muster und müssen deshalb kontextabhängig betrachtet werden (Gilbert et al., 2016).

### **1.2.2 Gene und Funktion**

Alle TGF- $\beta$ -Gene besitzen 7 Exons und kodieren für ein Prä-Propeptid mit 390 Aminosäuren (Abbildung 4). Das Prä-Propeptid wird im Golgi-Apparat von Furin-Proteasen in ein 112 Aminosäuren langes Fragment, welches der bioaktiven Form entspricht, und ein vom Protein-Aminoende ausgehendes Fragment, welches nicht-kovalent an die bioaktive Form gebunden ist, gespalten (Derynck et al., 1985). Das nicht-kovalent gebundene Fragment wird auch als *latency associated peptide* (LAP) bezeichnet, es wird gemeinsam mit LTBP und dem bioaktiven Peptid als latentes TGF- $\beta$  in das extrazelluläre Areal sezerniert. Dort wird es von spezifischen Proteasen aktiviert, indem LAP und LTBP abgespalten werden. LTBP spielt dabei in der Adressierung der Zielzellen und der Stabilität von TGF- $\beta$  eine entscheidende Rolle. Dieses liegt nach der Abspaltung als homodimeres Protein vor, welches durch Disulfidbrücken miteinander verbunden ist und ein Molekulargewicht von 25 kDa ausweist. Die Abspaltung erfolgt durch Plasmin, MMPs, Integrine oder Thrombospondin-1 (Shi et al., 2011, Robertson et al., 2015). Dimeres TGF- $\beta$  bindet an den auf der Zelloberfläche vorhandenen Typ-I/II-Rezeptor (T $\beta$ RI/II) und aktiviert die intrazelluläre TGF- $\beta$ -Signalkaskade (Abbildung 5). Die Rezeptoren bestehen aus der extrazellulären, der Transmembran- und der intrazellulären Domäne. Nach Ligand-Bindung erfolgt eine Konformationsänderung des T $\beta$ RII, die mit der Serin/Threonin-Phosphorylierung der T $\beta$ RII-Kinasedomäne, Aktivierung von T $\beta$ RI und Bildung eines heterotetrameren Komplexes aus zwei T $\beta$ RII und zwei T $\beta$ RI einhergeht (Heldin and Moustakas, 2016).

Auf Endothelzellen findet sich ebenfalls T $\beta$ RI, der *activin-receptor-like-kinase-1* (ALK-1) genannt wird. Es folgt eine durch T $\beta$ RI hervorgerufene Phosphorylierung von SMAD-Proteinen (v.a. SMAD 2/3). Die Phosphorylierung von SMAD wird durch *anchor for receptor activation* (SARA) unterstützt, welches an die intrazelluläre Membran gebunden ist (Miura et al., 2000). Zeitgleich findet die

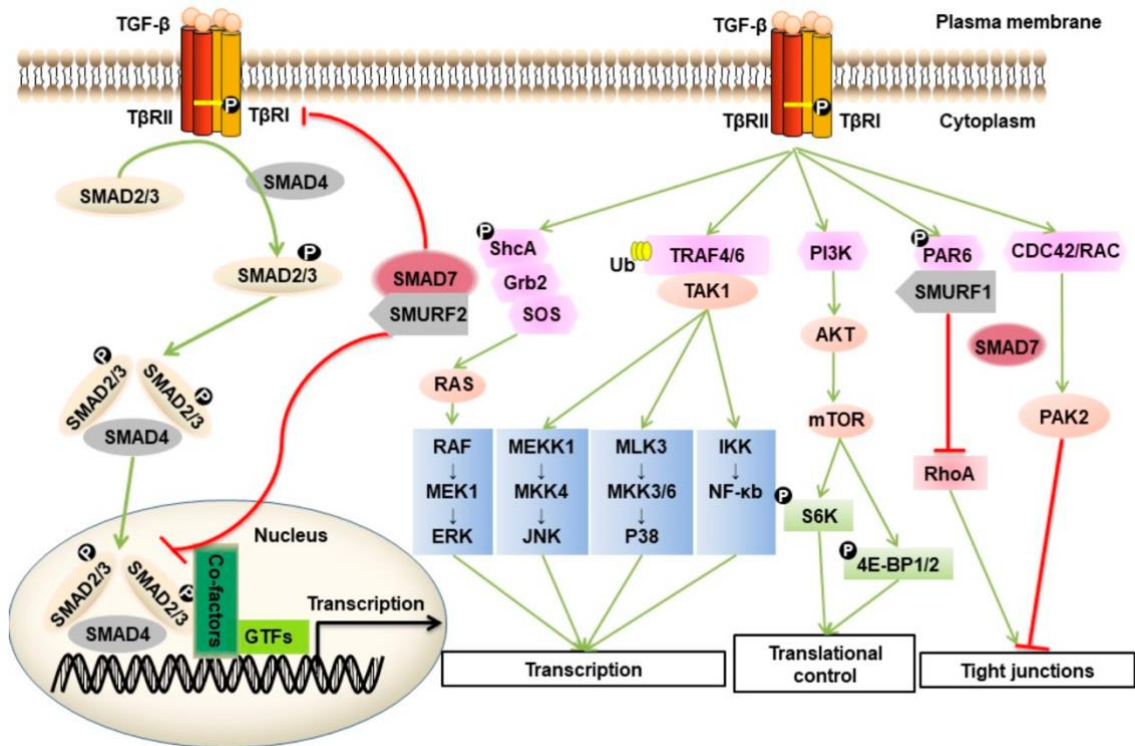
Internalisierung der TGF- $\beta$ -Rezeptoren statt. Aktivierte SMAD-Proteine werden in diesem Rahmen als R-SMADs bezeichnet und fungieren als intrazelluläre Effektoren der Transkription. SMADs werden dabei grundsätzlich in drei verschiedene Gruppen eingeteilt. R-SMADs interagieren mit T $\beta$ RI (SMAD-1,2,5,8), I-SMADs dienen als negative Regulatoren der kanonischen Signalkaskade (SMAD 6, 7), Co-SMAD 4 bildet einen Komplex mit R- und I-SMAD-Proteinen (Wrana, 2013). Wichtig für die SMAD-Phosphorylierung und Translokation in den Nukleus sind die konservierten Domänen *mad homology* (MH) 1 und 2 am C-terminalen Ende und durch eine sogenannte Linker-Region miteinander verbunden sind. MH2 ist dabei essenziell für die Komplexbildung von R-SMADs und SMAD 4, da somit ein Import in den Nukleus stattfinden und die Wirkung als Transkriptionsfaktor (TF) durch Bindung an das *SMAD binding element* (SBE), ein Element, lokalisiert im Promotorbereich diverser Gene, zusammen mit anderen TF erfolgen kann (Hill, 2016). Die geringe Selektivität von SMAD 1,3 und 4 bedingen, dass sogenannte DNA-bindende Partner wie *forkhead activin signal transducer-1* (Fast1) oder die Jun/Fos rekrutiert werden müssen, um eine hohe Affinität zu erzielen (Massague and Wotton, 2000, Massague et al., 2005). I-SMADs (v.a. SMAD 7) wirken auf verschiedene Weise als Antagonisten dieser Signalkaskade, indem sie beispielsweise die *SMAD-specific E3-Ubiquitin-Ligase* (SMURF)2 rekrutieren und so T $\beta$ RI-Rezeptoren inaktivieren, durch rekrutierte Phosphatasen aktivierte T $\beta$ RI-Rezeptoren dephosphorylieren, inaktivieren und degradatorischen Prozessen zuführen (Miyazawa and Miyazono, 2017).



**Abbildung 4: Gene für TGF- $\beta$ 1 und 2**

Gendarstellung mit Exons (schwarz) und Introns (Linie), sowie 5' und 3'-untranslatierten Region (weiß). TGF- $\beta$ 1 und 2 zeigen je 7 Exons. Maßstab ist je mit 1000bp angegeben. [Quelle: <http://www.wormweb.org/exonintron>, Exon-Intron Graphic Maker]

Abseits der kanonischen Signalkaskade gibt es auch nicht-kanonische Aktivierungswege (Abbildung 5). So werden beispielsweise PDGF und EGF durch Aktivierung des TGF- $\beta$ -Signalwegs indirekt vermehrt exprimiert und aktivieren ihrerseits nicht-kanonische Signalwege. „Downstream“ von T $\beta$ RII werden *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK), Rho-like GTPase und der *phosphatidylinositol-3* (PI3K)/AKT-Signalwege aktiviert (Zhang, 2017). Im Bereich der *Tight Junctions* (TJ) von Gefäß-Endothelzellen phosphoryliert T $\beta$ RII Mitglieder der *Partitioning Defective* (PAR) Proteinfamilie und rekrutiert SMURF1, welches zusammen mit dem T $\beta$ R durch Herabregulation und Degradation TJ assoziierter Proteine deren Auftreten reduziert, was zelluläre Protrusionen ermöglicht (Ozdamar et al., 2005). Die translationale Regulation kann darüber hinaus auch über *target of rapamycin* (mTOR) erfolgen, indem T $\beta$ R mit der p85-Untereinheit der PI3K interagieren und den PI3K/AKT-Signalweg aktivieren (Bakin et al., 2000). Essenziell für das Verständnis dieser komplexen Signalwege ist, dass es Interaktionen der kanonischen und nicht-kanonischen Signalwege gibt.



**Abbildung 5: Kanonische und nicht-kanonische TGF-β Signalwege**

TGF-β Signalwege. P = Phosphorylierung, Ub = Ubiquitynylierung, Grüner Pfeil = Aktivierung, Roter Pfeil = Hemmung, GTFs = Basale Transkriptionsfaktoren [Quelle: (Hao et al., 2019) „TGF-β Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis“ Int J Mol Sci 20(11):3]

### 1.2.3 Alterationen des TGF-β Signalwegs und deren Folgen

Durch die mannigfaltigen Effekte von TGF-β und dessen Kopplung an eine Vielzahl von relevanten Signalwegen wirken sich Alterationen in dieser Signalkaskade ganz besonders auf die Tumorphprogression aus (Korkut et al., 2018). Es gibt hinreichende Belege, die einen Zusammenhang zwischen solchen Veränderungen und dem Gesamtüberleben aufzeigen. So konnte die TGF-β-Expression signifikant mit progressionsfreiem und Gesamtüberleben korreliert und als prognostischer Biomarker identifiziert werden (Roy et al., 2018).

Obwohl TGF-β eine Reihe von inhibitorischen Effekten auf Zellzyklus und Zellwachstum ausübt, zeigen Studien in hochgradigen Gliomen eine erworbene Resistenz auf (Massague, 2008). Bei anderen Effekten, wie beispielsweise der

positiven Regulation von Matrixproteinen oder der Angiogenese, wird jedoch genau das Gegenteil beobachtet. Ein äußerst raffiniertes Zusammenspiel aus Resistenz gegenüber tumorhemmenden und Potenzierung von tumorfördernden Effekten scheinen so maßgeblich zur Malignität des GBM beizutragen (Han et al., 2015).

#### 1.2.3.1 Einfluss von TGF- $\beta$ auf die Proliferation

TGF- $\beta$  moduliert Proliferation durch Induktion der Expression von Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren (CDK-Inhibitoren) wie p21 und p15/INK4B, sowie durch Repression des Protoonkogens c-myc. In Folge arretieren TGF- $\beta$ -responsive Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus (Iavarone and Massague, 1997, Chen et al., 2002). Im GBM ist in der Regel die TGF- $\beta$  Sekretion signifikant erhöht, jedoch ist diese Hochregulation begleitet vom Verlust der Zellzyklus-hemmenden Funktion von TGF- $\beta$ . Aufgrund dieser fehlenden Funktion werden p21 und p15<sup>INK4B</sup>, aber auch die *cyclin-dependent-kinase* (CDK)4 und Cyclin D1, trotz erhöhter TGF- $\beta$  Konzentrationen im Tumorareal, nicht hochreguliert (Zhang et al., 2006). Auch scheint der Komplex aus TGF- $\beta$  und SMAD 2/3 onkogenes Potenzial im Rahmen des Zellwachstums aufzuweisen, indem es als transkriptioneller Aktivator des PDGF-B Gens fungiert, wenn dieses, wie in mehreren GBM-Proben nachgewiesen, einen demethylierten Promotor aufweist (Bruna et al., 2007).

#### 1.2.3.2 Einfluss von TGF- $\beta$ auf die Motilität

Infiltration von Tumorzellen in das gesunde Hirnparenchym ist eines der zentralen Malignitätskriterien des GBM und zeichnet sich durch Degradierung der ECM aus (Platten et al., 2001). Auch in diesem Prozess spielt TGF- $\beta$  eine zentrale Rolle. So hat rekombinantes TGF- $\beta$ 1, durch vermehrte Expression der Integrin-Untereinheiten  $\alpha$ 2,5 und  $\beta$ 3 (Platten et al., 2000), sowie durch Hochregulation und Aktivierung von MMP-2, -9 und MT1-MMP, einen direkten Einfluss auf die Motilität. Eine Erhöhung der MMP2 Aktivität kann jedoch auch über TGF- $\beta$ 2 erzielt werden. (Wick et al., 2001). Darüber hinaus kann TGF- $\beta$ 1

die Expression der MMPs ADAM17 und ADAMTS-1 induzieren, welche vornehmlich das Proteoglykan Vesican, aber auch andere Proteoglykane wie Aggrecan und Brevican spalten; resultierend in der Degradierung der ECM (Lu et al., 2011). Neben ECM-modulierenden Mechanismen spielen TGF- $\beta$ -vermittelte EMT-ähnliche Prozesse eine zentrale Rolle bei der GBM-Zell-Motilität, da diese migratorische und invasorische Prozesse einleiten (siehe 1.2.3.3).

### 1.2.3.3 Epithelial-Mesenchymale Transition

EMT zeichnet sich aus durch den Verlust der Zell-Zell-Adhäsion, Zellpolarität, und dem „Shift“ hin zu einem mesenchymalen Phänotyp, der sich durch erhöhte Motilität, Stammzeleigenschaften und invasivem Verhalten auszeichnet. EMT-Prozesse spielen somit eine zentrale Rolle in der Metastasierung und Tumorprogression. Unter physiologischen Bedingungen findet EMT in der Wundheilung und Embryogenese statt (Lamouille et al., 2014). Da die Zellen in späten Stadien der Tumorgenese immer weniger auf inhibitorische TGF- $\beta$  Wirkungen reagieren, gestaltet TGF- $\beta$  den EMT-Prozess maßgeblich mit (Hao et al., 2019). Einhergehend mit der EMT-vermittelten Steigerung der Zellmotilität ist der Verlust von E-Cadherin und Vimentin und die Überexpression von N-Cadherin, der sogenannte „Cadherin-Switch“, welcher jedoch momentan in der Literatur diskutiert wird (Noronha et al., 2021). Dies führt zu einem Verlust der Zellpolarität der Zelle (Thiery, 2002). Die Folgen des „Cadherin-Switches“ sind verminderte Zell-Zell-Adhäsion, der Verlust von TJs und eine erhöhte Tendenz zur Metastasierung, Invasion und Motilität (Noronha et al., 2021). Auch im GBM, obwohl kein epithelialer Tumor, zeigt sich ein Zusammenhang zwischen mesenchymalem Phänotyp, Chemotherapieresistenz und schlechter Prognose (Verhaak et al., 2010). Auf molekularer Ebene induzieren SMADs die Expression transkriptioneller Repressoren wie SNAIL1, SNAIL2/SLUG, Zink-Finger E-box Binding homeobox Proteine (ZEB) und TWIST, die die E-Cadherin-Expression herunterregulieren und so zur EMT-Progression führen (Lamouille et al., 2014). Hypoxie-Indikatoren wie HIF1 $\alpha$  sowie ZEB wurden im Tumormikromilieu nachgewiesen und deuten ebenso auf eine Beteiligung an der Tumorpathologie

hin (Huang et al., 2018). Der *Knockdown* (K.D.) von ZEB2 bewirkte beispielsweise die Hochregulation der E-Cadherin-Expression und reprimierte die Expression von N-Cadherin- und SNAIL (Qi et al., 2012). Im Mausmodell wurde darüber hinaus durch K.D. von ZEB1 verringerte Invasivität nachgewiesen (Zhang et al., 2019). Auch eine nicht-kanonische, TGF- $\beta$ -abhängige EMT-Induktion über Komponenten diverser Rezeptortyrosinkinase-abhängiger Signalkaskaden wurde beschrieben (Edlund et al., 2002).

#### 1.2.3.4 Einfluss von TGF- $\beta$ auf die Angiogenese

Angiogenese ist essenziell für die Versorgung von Tumoren und Metastasen, die größer als 1-2mm sind, da Diffusionsprozesse nur eine sehr geringe Reichweite haben, für das Tumorwachstum jedoch die ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen stets gewährleistet sein muss (Quintero-Fabian et al., 2019). Verschiedenste Wachstumsfaktoren werden in den Extrazellularraum abgegeben. So bindet TGF- $\beta$  beispielsweise an ALK1 und induziert über SMAD- und den *DNA-binding protein inhibitor* (ID)1 Angiogenese (Goumans et al., 2002). Unter hypoxischen Bedingungen wird die Expression von VEGF und Ras induziert, gefolgt von vermehrter Zellinvasion und Angiogenese (Breier et al., 2002). Auch bilden HIF1 $\alpha$  und SMAD3 einen gemeinsamen Komplex, der die VEGF-Expression fördert (Sanchez-Elsner et al., 2001). Für die Reifung von Blutgefäßen ist darüber hinaus der *plasminogen activator inhibitor* (PAI-I) wichtig, dessen Expression durch TGF- $\beta$  ebenfalls stimuliert wird (Goumans et al., 2002). TGF- $\beta$  bewirkt weiterhin eine vermehrte Bildung von *connective tissue growth factor* (CTGF), MMP- 2, -9 und -10 sowie die Hemmung von *tissue inhibitor of metalloproteinase* (TIMP), was zu einer vermehrten Bildung von Blutgefäßen führt (Kaminska and Cyranowski, 2020). Die proangiogenen Eigenschaften von TGF- $\beta$  tragen somit auch zur chaotischen Vaskularisierung des GBM bei (Quintero-Fabian et al., 2019)

### 1.2.3.5 Einfluss von TGF- $\beta$ auf das Immunsystem

Das Immunsystem ist eines der wichtigsten Komponenten der anti-tumoralen Antwort, Zellen des angeborenen (NK-Zellen) und des erworbenen (T-Zellen) Immunsystems zeigen anti-tumorale Wirkung. Das GBM hat die Eigenschaft, sich der immunologischen Kontrolle zu entziehen. Immunevasion ist hierbei ein zentrales Malignitätskriterium des GBM (David and Massague, 2018).

Einige der immunsuppressiven Eigenschaften des GBM basieren auf von Tumorzellen sezerniertem TGF- $\beta$  (Donkor et al., 2011). Nicht nur die tumorale TGF- $\beta$ 1-Produktion scheint in diesem Zusammenhang weitreichende immunevasive Effekte zu erzielen, sondern auch die TGF- $\beta$ 1-Produktion durch T-Zellen (Donkor et al., 2012). So wird über eine dysfunktionale Erkennung von tumoralen Antigenen und den Verlust von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) im Gehirn in diesem Zusammenhang diskutiert (Zagzag et al., 2005). Der Verlust dendritischer Zellen (DC) wird durch die TGF- $\beta$  vermittelte Induktion von Apoptose und Hemmung der Migration herbeigeführt (Imai et al., 2012). Darüber hinaus hemmt TGF- $\beta$ 1 die Expression von *Major Histocompatibility Complex II* (MHC II) auf Gliomzellen, Mikroglia und Makrophagen (Zagzag et al., 2005). Ebenso wurde nachgewiesen, dass die Differenzierung naiver T-Zellen zu CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen und CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen (THZ) durch TGF- $\beta$ 1 gehemmt, die Differenzierung hin zu immunsuppressiven regulatorischen T-Zellen jedoch gefördert wird. Weiterhin wird durch Reduktion der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-, NO- und des *Tumor Necrosis Factors* (TNF) $\alpha$ - und vermehrter Produktion von immunsuppressivem *Interleukin* (IL)-10 die Makrophagenaktivierung gehemmt (Nduom et al., 2015). Gliom-sezerniertes TGF- $\beta$  führt darüber hinaus zur proteolytischen Abspaltung, dem „Shedding“, des aktivierenden Rezeptors NKG2D auf NK-Zellen sowie von NKG2D-Liganden wie *Major Histocompatibility Complex Class I Chain-Related Protein* (MIC)A, MICB und Mitgliedern der *UL16-Binding Protein* (ULBP)-Familie auf Gliomzellen. Eine Herabregulation der TGF- $\beta$ -Expression in Gliomzellen mittels RNA-Interferenz (RNAi) reaktivierte den NKG2D-Rezeptor auf NK-Zellen (Friese et al., 2004). Alternativ führte auch die Reexpression des NKG2D-Liganden MICA auf Gliomzellen zu einer vermehrten, gliomspezifischen NK-Zell-Aktivität (Friese et al., 2003).

#### 1.2.3.6 Therapieoptionen mit Bezug auf den TGF- $\beta$ Signalweg

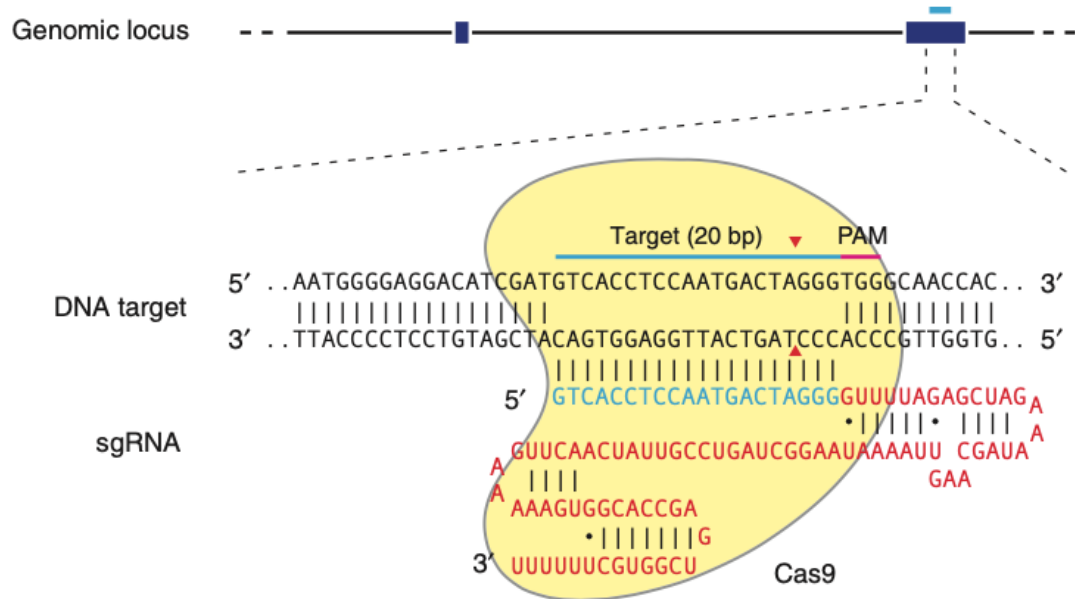
Aufgrund der vielseitigen Funktionen und Beteiligung von TGF- $\beta$  an zahlreichen Signalwegen erscheint dieser als interessantes Ziel für therapeutische Ansätze. Derzeit werden verschiedene TGF- $\beta$ -Signalweg-Inhibitoren getestet, darunter neutralisierende Antikörper (AK), Antisense-Oligonukleotide (AON) und Rezeptor-Kinase-Inhibitoren (RKI) (Akhurst, 2017). AON werden eingesetzt, um TGF- $\beta$ -mRNA in Immunzellen zu degradieren und deren Translation zu hemmen. Bislang fanden diese jedoch nur bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (NSCLC), Melanomen und Pankreaskarzinomen in klinischen Phase-I- und -II-Studien Anwendung (Jaschinski et al., 2011, Zappa and Mousa, 2016). Mit RKI wird vor allem T $\beta$ R1 adressiert. Eine Studie, in der RKI in Kombination mit 1D11, einem pan-TGF- $\beta$ -neutralisierenden Antikörper, und dem immunstimulierenden OX40-Antikörper eingesetzt wurde, zeigte eine reduzierte Tendenz zur Metastasierung. Derzeit laufen Studien, in denen die Funktion von TGF- $\beta$  gehemmt und parallel die Bindung von PD-1 an PD-L1 mittels eines Anti-PD1-AK blockiert wird (Garrison et al., 2012, Fujiwara et al., 2015).

### 1.3 CRISPR/Cas9

CRISPR/Cas9 ist ein präzises Werkzeug zur Durchführung von Modifikationen auf genomischer Ebene. Dazu zählen Deletionen, Insertionen, die Induktion oder Repression der Transkription sowie der Austausch einzelner Nukleotide. Dieses System nutzt Komponenten, die als Teil des adaptiven antiviralen Immunsystems von Bakterien identifiziert wurden. CRISPR steht für *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* und bildet zusammen mit einer spezifischen Guide-RNA, einer Tracer-RNA und der bakteriellen Endonuklease SpCas9 ein funktionelles System. In Bakterien dient ein CRISPR-Array als immunologisches Gedächtnis. Dazu werden virale palindromische Sequenzen nach einer Phageninfektion in das bakterielle Genom integriert und bei Bedarf abgelesen (Zhang, 2019, Doudna and Charpentier, 2014)

Um eine präzise Veränderung eines Genabschnitts zu bewirken, wird eine crRNA benötigt, die das Transkript eines CRISPR- „Arrays“ darstellt und für molekularbiologische Anwendungen synthetisch hergestellt wird. Diese crRNA ist komplementär zur Zielsequenz und 20 Nukleotide (nt) lang. Zusätzlich wird die Endonuklease SpCas9 benötigt, die an die crRNA-gebundene Zielsequenz bindet und dort einen Doppelstrangbruch (DSB) induziert (Abbildung 6). Für die Induktion eines DSB ist das *Protospacer Adjacent Motif* (PAM, 5'-NGG-3') unabdingbar, da es als Erkennungssequenz für SpCas9 dient. Der DSB erfolgt dabei drei Basenpaare in 5'-Richtung vom PAM entfernt. Die PAM-Sequenz variiert bei verschiedenen Cas-Proteinen.

Um SpCas9 gezielt an den gewünschten Genabschnitt zu leiten, wird zusätzlich eine *Trans-Activating crRNA* (tracrRNA) benötigt, die teilweise komplementär zur crRNA ist, sie bindet und gemeinsam die Guide-RNA (gRNA) bildet. In molekularbiologischen Anwendungen werden crRNA und tracrRNA oft zusammen synthetisiert und dann als *Single Guide RNA* (sgRNA) bezeichnet. (Ran et al., 2013b, Adli, 2018, Doudna and Charpentier, 2014)

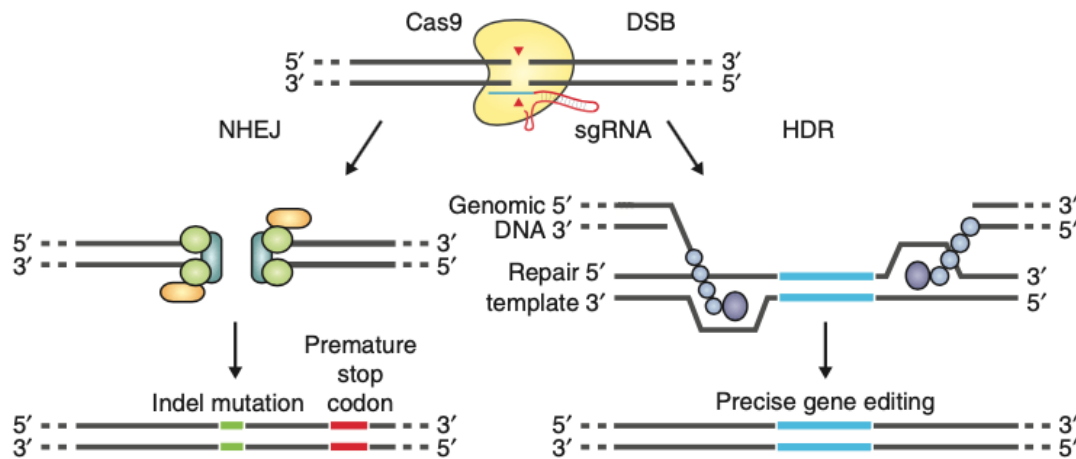


**Abbildung 6: Schematische Abbildung eines gRNA/SpCas9-Komplexes**

Die SpCas9-Endonuklease (gelb) wird von der sgRNA, bestehend aus crRNA (blau) mit einer Länge von 20 Nucleotiden und der tracrRNA (rot), zur genomischen Zielsequenz geleitet, um dort einen Doppelstrangbruch (DSB) zu induzieren (markiert durch den roten Keil). [Quelle: (Hao et al., 2019, Ran et al., 2013b), „Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system.“ Nat Protoc 8(11): 2281-2308:2282]

Modifikationen auf genomischer Ebene durch das CRISPR/Cas-System werden durch zelluläre Reparaturmechanismen ausgelöst. Der durch CRISPR/Cas induzierte Doppelstrangbruch (DSB) aktiviert die fehleranfällige *Non-Homologous End Joining* (NHEJ)-Reparatur und führt dabei zu kleinen Insertionen oder Deletionen, den sogenannten „Indels“ (Abbildung 7). Wenn diese Indels in ein Exon oder einen Exon-Intron-Übergang fallen, resultieren sie in einer Frameshift-Mutation mit vorzeitigem Stoppcodon und führen zu einem stark verkürzten, funktionslosen Protein, was in einem Knockout (KO) resultiert. Beim selteneren *Homology Directed Repair* (HDR) wird eine kurze DNA-Reparaturvorlage zwischen die beiden Enden des DSB eingefügt. Der Effekt ähnelt dem der Indels (Ran et al., 2013b). Um mehrere Loci gleichzeitig zu adressieren, sind mehrere gRNAs erforderlich. Schon zwei gRNAs erhöhen die

Chancen auf eine Deletion und damit auf einen Gen-Knockout erheblich (Ran et al., 2013b, Acosta et al., 2018).



**Abbildung 7: Schematische Abbildung der induzierten DNA-Reparaturmechanismen**

Durch die CRISPR/Cas-Methode induzierte Doppelstrangbrüche (DSB) führen zur fehlerhaften DNA-Reparatur über die Mechanismen NHEJ oder HDR. Diese Reparaturwege erzeugen Veränderungen im Gen, die letztendlich zu einem Knockout führen. [Quelle: (Hao et al., 2019, Ran et al., 2013b), „Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system.“ Nat Protoc 8(11): 2281-2308:2282]

Modifikationen von Cas-Endonukleasen ermöglichen eine höhere Spezifität und erweitern das Anwendungsspektrum der CRISPR-Technologie. So ist es beispielsweise mit der Cas9-Nickase (Cas9n) möglich, gezielt einen Einzelstrangbruch zu induzieren. Dabei gewährleistet die Kombination zweier gRNAs für denselben Genlokus eine höhere Präzision (Ran et al., 2013a). Auch weitere Anwendungsbereiche wurden inzwischen entwickelt: Modifikationen in der Endonuklease führten beispielsweise zur katalytisch defizienten SpCas9-Variante (dCas9), die durch Bindung an einen bestimmten Locus für die Expressionsregulation genutzt werden kann. Zusätzliche Modifikationen ermöglichen die Bildgebung von Insertionen mithilfe von Tracking-Sequenzen oder die Durchführung epigenetischer Veränderungen (Gilbert et al., 2014a, Duan et al., 2018).

## 1.4 Fragestellung

TGF- $\beta$ 1 und - $\beta$ 2 sind im GBM, im Vergleich zu normalem Hirngewebe, deutlich hochreguliert (Roy et al., 2018). High-Grade Gliome (HGG) zeigen eine erworbene Resistenz gegenüber der proliferationshemmenden Wirkung von TGF- $\beta$ . Für TGF- $\beta$ -basierte angiogene Effekte wurde Konträres beobachtet (Han et al., 2015). GBM weisen eine ausgeprägte Tumervaskularisierung mit stark dysmorphen Gefäßstrukturen auf und zeigen eine Destruktion der BHS, die es näher zu untersuchen gilt.

TGF- $\beta$  spielt, durch Induktion von EMT-Transkriptionsaktivatoren und -repressoren, eine Schlüsselrolle bei EMT-Prozessen und ist eng mit dem malignen Verhalten von Gliomen verknüpft. EMT-Prozesse induzieren in Zellen einen Shift hin zu einem mesenchymalen Phänotyp (Hao et al., 2019). Dies erfolgt nicht nur in Gliomzellen, sondern auch in Perizyten. Vorarbeiten zeigten erhöhte SLUG-Level exklusiv in Perizyten Gliom-assoziiertes Gefäße, nicht aber in Perizyten auf Gefäßen des gesunden Hirngewebes (Mäder et al., 2018).

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Auswirkungen eines TGF- $\beta$ -Knockouts in murinen GL261-Gliomzellen hinsichtlich Proliferation, Migration und Invasion sowie die daraus resultierenden Veränderungen der Zytokin- und Chemokinproduktion *in vitro* zu untersuchen. Nach intensiver Charakterisierung der Einzel- (TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2) und Doppel- (TGF- $\beta$ 1 plus TGF- $\beta$ 2) Knockout-Zellen soll im Weiteren der Einfluss von Gliom-sezerniertem TGF- $\beta$  auf die Morphologie gliom-assoziiertes Gefäße sowie auf die Integrität der Blut-Hirn-Schranke (BHS) in einem autologen, orthotopen Maus-Gliommodell untersucht werden.

Mittels der vorgelegten Arbeit werden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Welchen Einfluss hat ein CRISPR-Cas9-induzierter Knockout von TGF- $\beta$ 1 und/oder TGF- $\beta$ 2 auf die Eigenschaften muriner GL261-Gliomzellen hinsichtlich Proliferation, Migration, Invasion sowie Zytokin- und Chemokinexpression?

2. Inwieweit unterscheiden sich Einzel- und Doppel-Knockout TGF- $\beta$  GL261-Gliomzellen?

Folgende Arbeiten werden dazu durchgeführt:

1. Generierung von TGF- $\beta$ 1-, TGF- $\beta$ 2- und TGF- $\beta$ 1/2-Knockout (KO) GL261-Zellen.
2. Validierung und Sequenzierung der CRISPR-Cas9-induzierten Knockouts mittels PCR und Sanger-Sequenzierung.
3. Evaluation der Proliferation, Migration, Invasion sowie Zytokin- und Chemokinproduktion in Einzel- und Doppel-KO-Zellen.
4. Markierung der TGF- $\beta$ 1-, TGF- $\beta$ 2- und TGF- $\beta$ 1/2-Knockout-GL261-Zellen mit dem Fluoreszenzprotein mCherry mittels lentiviraler Transduktion.

Die derart generierten und charakterisierten TGF- $\beta$ -KO-Gliomzellen werden bei weiteren Fragestellungen *in-vivo* Maus-Gliommodellen verwendet, um den Einfluss von Gliom-sezerniertem TGF- $\beta$  auf Perizyten und somit auf Angiogenese, Gefäßstruktur und Integrität der Blut-Hirn-Schranke (BHS) zu untersuchen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Name	Hersteller
10/100/1000 µl Pipetten	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
ChemiDoc™ Imaging System	Biorad; München, Deutschland
CO <sub>2</sub> Brutschrank	Sanyo; München, Deutschland
ELISA Reader (Thermo Electron Multiscan EX)	Thermo Electron Cooperation; Karlsruhe, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop (Axioscope 5)	Carl Zeiss Microscopy GmbH; Jena, Deutschland
SH800 Cellsorter	Sony Biotechnology; San Jose, USA
Großzentrifuge (Multifuge 3 S-R)	Heraeus; Hanau, Deutschland
Mikroskop (Eclipse TS 100)	Nikon Instruments; Kingston, UK
MilliQ Integral	Merck; Darmstadt, Deutschland
Nano-Drop® ND-1000 UV-Vis Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific; Braunschweig, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Marienfeld; Bad Mergentheim, Deutschland
PT-200 Thermo Cycler	Biorad; München, Deutschland
PowerPac™ Basic	Biorad; München, Deutschland
Sterilwerkbank (Hera Safe)	Heraeus; Hanau, Deutschland
Thermomixer Comfort	Eppendorf; Hamburg, Deutschland

Tischzentrifuge (Biofuge pico)	Heraeus; Hanau, Deutschland
Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf; Hamburg, Deutschland

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Combitips Advanced 2.5/ 5ml	Eppendorf; Hamburg, Germany
Deckgläser	R. Langenbrick; Emmendingen, Deutschland
Einmalpipetten	Corning; New York, USA
Falcon Tubes 15/ 50ml	Greiner Bio-One; Frickenhausen, Deutschland
Nitrozellulose Membran	Whatmann GmbH; Dassel, Deutschland
Objektträger 76x26 mm	R. Langenbrick; Emmendingen, Deutschland
Pipetten Spitzen	Ratiolab; Dreieich, Deutschland
PVDF 0.45 Transfer Membran	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Reaktionsgefäße 0.5/ 1.5/ 2ml	Greiner Bio-One; Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflaschen T25/75/125	Greiner Bio-One; Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatten CELLSTAR® 6/ 12/ 24/ 48/ 46	Greiner Bio-One; Frickenhausen, Deutschland

### 2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Name	Hersteller
Bovine Serum Albumine (BSA)	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland

Bromphenolblau	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth; Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 99%	Merck; Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid (EtBr)	Carl Roth; Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure	Merck; Darmstadt, Deutschland
Glyzerol	Carl Roth; Karlsruhe, Deutschland
Kristallviolett	Merck; Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck; Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	AppliChem; Darmstadt, Deutschland
10x PCR Buffer	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Sephadex® G50	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Triton X 100	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Trypan Blau 0.4%	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland

#### **2.1.4 Medien, Puffer & Lösungen**

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM)	PAA Laboratories GmbH; Pasching, Österreich
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA Laboratories GmbH; Pasching, Österreich
Fetal Calf Serum (FCS)	Biochrom; Berlin, Deutschland
G418 (Neomycin)	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland

Penicillin/ Streptomycin	PAA Laboratories GmbH; Pasching, Österreich
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories GmbH; Pasching, Österreich

### 2.1.5 Enzyme

Name	Hersteller
Alt-R® S.p Cas9 Nuclease V3	Integrated DNA Technologie Inc.; Coralville, IA, USA
Taq DNA-Polymerase	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland

### 2.1.6 Oligonukleotide

Name (5'→3' Richtung)	Hersteller
ATTO™ 550 CRISPR-Cas9 tracrRNA	Integrated DNA Technologie Inc.; Coralville, IA, USA
dNTP's 100mM	Invitrogen; Darmstadt, Deutschland
mTGFB1_FRW (GTCAGAGCCTCACCGCGA)	Merck; Darmstadt, Deutschland
mTGFB1_REV (TTCCTCCAGCCAGTTTCCTCTG)	Merck; Darmstadt, Deutschland

mTGFB2_FRW_Crisprdetect (CGTTTCTTCCTTTTAAAAACATG)	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
mTGFB2_REV_Crisprdetect (TGTCGATTTTATAAACCTCCTTG)	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
MTGFB1 guide_2 (Alt-R® CRISPR-Cas9 crRNA) (GGCAGUAGCCGCAGCCCCGAGUUUUAGAGCUAUGCU)	Integrated DNA Technologie Inc.; Coralville, IA, USA
MTGFB1 guide_10 (Alt-R® CRISPR-Cas9 crRNA) (GUACAAAGCGAGCACCGCCUGUUUUAGAGCUAUGCU)	Integrated DNA Technologie Inc.; Coralville, IA, USA
MTGFB2 guide 4_4 (Alt-R® CRISPR-Cas9 crRNA) (GCUCCGCUCGCGCUCGCAGGGUUUUAGAGCUAUGCU)	Integrated DNA Technologie Inc.; Coralville, IA, USA
MTGFB2 guide (Alt-R® CRISPR-Cas9 crRNA) (GCGCCACCGGGACCAGAUGCGUUUUAGAGCUAUGCU)	Integrated DNA Technologie Inc.; Coralville, IA, USA

### 2.1.7 Kits

Name	Hersteller
Amaxa™ Cell Line Nucleofactor™ Kit V	Lonza Group Ltd; Basel, Schweiz

BigDye® Terminator v 3.0	Applied Biosystems; Carlsbad, Deutschland
DNeasy® Blood & Tissue Kit	Qiagen GmbH; Hilden, Deutschland
Mouse Cytokine Array C3 (AAM-CYT-3-2)	RayBiotech; GE, USA
MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit	Lonza Group Ltd; Basel, Schweiz
NucleoSpin® Gel and PCR Clean Up Kit	MACHERY-NAGEL GmbH & Co. KG; Düren, Deutschland

### 2.1.8 Zelllinien

Name	Hersteller
GL261	Naumann Lab, Hertie-Institut
GL261 GFP	Naumann Lab, Hertie-Institut
GL261 mCherry	Naumann Lab, Hertie-Institut

### 2.1.9 Vektoren

Name	Hersteller
Lenti-pLV-mCherry (#36084)	Addgene; MA, USA

### 2.1.10 Software

Name	Hersteller
FinchTV Version 1.5	Geospiza Research Team
Image Lab Version 6.0.1	Biorad; München, Deutschland
JMP 14	SAS; Böblingen, Deutschland
Microsoft Word	Microsoft; Redmond, WA, USA
NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific; MA, USA
Prism GraphPad Version 10.0.3	GraphPad Software; San Diego, CA, USA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Alle Zelllinien wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in einer gesättigten Atmosphäre kultiviert. Als Kulturmedium kam Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM) zum Einsatz, welches mit 10 % fetalem Kälberserum (vor der Nutzung 30 Minuten lang bei 56 °C hitzeinaktiviert), 100 IU/ml Streptomycin und 100 µg/ml Penicillin ergänzt wurde. Vor der Arbeit mit den Zellkulturen wurden das Medium, PBS und Trypsin-EDTA im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Alle Arbeiten fanden unter einer Sterilwerkbank statt.

Wurden Zellen für ein Experiment benötigt, wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen, welches anschließend ebenfalls abgesaugt wurde. Um die Zellen vom Flaschenboden zu lösen, wurde Trypsin-EDTA für 2–3 Minuten hinzugegeben und bei 37 °C inkubiert. Zusätzlich wurden die Zellen nach der Inkubationszeit durch leichtes Klopfen gelöst. Anschließend wurden die Zellen mit Vollmedium aufgenommen, sorgfältig suspendiert und in ein Falcon-Röhrchen überführt. Danach wurde die Zelldichte mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt, und die benötigte Zellzahl wurde aus der Suspension entnommen.

Für die Passage der Zellen wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und Trypsin-EDTA hinzugegeben. Die Zellen wurden nach kurzem Klopfen vom Flaschenboden gelöst, in DMEM resuspendiert und in ein Falcon-Röhrchen überführt. Das Splitten erfolgte im Verhältnis 1:2 bis 1:4, wobei frisches Vollmedium hinzugegeben wurde.

Um die Zellen zu konservieren, wurde die Zellsuspension für 5 Minuten bei 1200 rpm und 4 °C zentrifugiert, das Medium entfernt und die Zellen in PBS erneut für 5 Minuten unter denselben Bedingungen zentrifugiert und gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium (70 % DMEM, 20 % FCS, 10 % DMSO) resuspendiert und schrittweise bei 4 °C, -20 °C, -80 °C und schließlich bei -142 °C heruntergekühlt und gelagert.

Einfriermedium:

Volumen/Menge	Inhalt
45ml (90%)	Vollmedium (DMEM + FCS)
5ml (10%)	DMSO

### 2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um spezifische DNA-Abschnitte zu amplifizieren und nachzuweisen, wurde das Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) angewendet. Mithilfe dieses Verfahrens ist es möglich, einen Nukleinsäureabschnitt mithilfe sequenzspezifischer Primer über mehrere Zyklen zu vervielfältigen.

Ansatz für die PCR (20 µl):

Volumen/Menge	Inhalt
100ng	DNA
2µl	10x PCR Puffer Standard
0.4µl	dNTP (10mM)
0.4µl	Primer forward (100µM)
0.4µl	Primer reverse (100µM)
0.2µl	Taq-Polymerase
11.6µl	ddH <sub>2</sub> O

Konditionen der PCR im PTC-200 Thermo-Cycler:

Schritte	Dauer	Temperatur
1. Initiale Denaturierung	5 Minuten	94 °
2. Denaturierung	45 Sekunden	94°
3. Annealing	30 Sekunden	primerspezifisch
4. Elongation	1:30 Minuten	72°
Schritte 2-4 25-40x wiederholen		
5. Primer Extension	7 Minuten	72°
6. Aufbewahrung	unbegrenzt	4°

Für den Nachweis der amplifizierten PCR-Produkte wurde ein 1–2 %-iges Agarosegel verwendet, das durch Zugabe von Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) unter UV-Licht sichtbar gemacht wurde.

### **2.2.3 Agarosegelelektrophorese**

DNA und PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Das Gel bestand aus 1–2 % (w/v) Agarose und 0,5x TAE-Puffer. Die jeweiligen Proben wurden mit dem Peqlab 6x Orange Loading Dye im Verhältnis 1:5 vorbereitet und bei 100 Volt separiert. Zur Größenbestimmung wurde die GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific) als Maßstab verwendet. Zur Visualisierung wurde Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) unter UV-Licht eingesetzt.

### **2.2.4 Mykoplasmen-Nachweis**

Um eine mögliche Kontamination mit Mykoplasmen in allen verwendeten Zelllinien auszuschließen, wurde das MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit eingesetzt. Dazu wurden zunächst je Zelllinie 500 µl Überstand von etwa 80–90 % konfluenten Zellen zentrifugiert (2000 rpm, 5 Minuten). Davon wurden 50 µl in eine weiße 96-Well-Platte pipettiert. Zu jeder Probe wurden 50 µl Reagenz hinzugefügt, für 5 Minuten inkubiert und die Lumineszenz gemessen (Wert A). Nach der ersten Messung wurden erneut 50 µl Reagenz hinzugefügt, 10 Minuten inkubiert und die Lumineszenz gemessen (Wert B). Überschreitet das Verhältnis von B zu A den Wert 1,2, wird dies gemäß Herstellerangaben als Kontamination klassifiziert. Kontaminierte Zelllinien wären mit den BIOMYC-Lösungen 1–3 behandelt worden. Für die Experimente wurden ausschließlich negative Zelllinien verwendet.

### **2.2.5 DNA-Isolation**

Zur DNA-Isolation wurde das DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) verwendet. Die Isolation erfolgte stets gemäß den Herstellerangaben. Sowohl die Konzentration (ng/µl) als auch die Reinheit der isolierten DNA wurden mit dem NanoDrop®-Spektrophotometer bestimmt. Die Reinheit wurde anhand der optischen Dichte (OD) gemessen, wobei die Messungen bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge erfolgten. Ein Verhältnis von 1,8–2,0 OD<sub>260</sub>/280 wurde als optimal betrachtet. Nach der Isolation wurde die DNA bei -80 °C gelagert.

### **2.2.6 CRISPR/Cas9 Genalteration**

Für die Induktion eines Knockouts mittels CRISPR/Cas9-Technologie (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) wurden die Zellen 24 Stunden vor dem Experiment in ein Penicillin- und Streptomycin-freies Medium überführt. Für das Experiment werden  $1-5 \times 10^5$  Zellen benötigt. Um einen gezielten Knockout zu induzieren, werden die ATTO™ 550 nm-markierte tracrRNA und die crRNA des Sense- und Antisense-Strangs (jeweils für TGF-β1 oder TGF-β2) in äquimolaren Mengen gemischt (je 200 µM) und für 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, um den gRNA-Komplex des Sense- und Antisense-Strangs zu bilden. Jeweils zwei gRNA-Komplexe pro Gen werden vorbereitet.

Anschließend werden 1,18 µl der gRNA-Komplexe mit 2,0 µl SpCas9-Endonuklease gemischt und 1,0 µl *Electroporation Enhancer* hinzugefügt. Die Mischung wird erneut für 15 Minuten bei RT inkubiert. Währenddessen wird für die Elektroporation 82 µl *Nucleofactor*-Lösung mit 18 µl Supplement gemischt. Die vorbereiteten Zellen werden vorsichtig in 100 µl Elektroporationslösung resuspendiert und 5,36 µl Ribonucleoprotein-Komplex (RNP-Komplex) mit *Enhancer* hinzugefügt. Das Gemisch wird in eine *Nucleofactor*-Küvette überführt und mit einem zellspezifischen Programm (T-024) transfiziert.

Nach der Elektroporation wird das transfizierte Zellgemisch mithilfe einer Plastikpipette in 2 ml 37 °C-warmes Vollmedium überführt.

### **2.2.7 CRISPR/Cas Off-Target-Analyse**

Die CRISPR Off-Target Analyse wurde mit dem Online-Tool CCTop der Universität Heidelberg durchgeführt (Stemmer et al., 2015). Dabei wurden nur Off-Targets in Betracht gezogen, die ein Mismatch von 1–3 Basenpaaren (bp) in der Erkennungssequenz aufwiesen. Mismatches von 4 bp oder mehr hätten keinen Doppelstrangbruch verursacht. Die Ergebnisse wurden mittels Excel ausgewertet, und die Off-Targets wurden mithilfe einer PCR überprüft. Eine verkürzte Sequenz in der Gelelektrophorese weist dabei auf einen Off-Target-Effekt hin. Alle mit CRISPR/Cas9 veränderten Zelllinien wurden dahingehend untersucht, um mögliche Off-Target-Effekte auszuschließen.

### **2.2.8 Zellisolation und Sortierung mittels Durchflusszytometrie**

Das transfizierte und fluoreszenzmarkierte Zellgemisch wurde daraufhin mit dem SH800 Cellsorter (AG Neher, DZNE Tübingen) (Sony Biotechnology; San Jose, USA) sortiert. Während dem Sortieren wurden als Kontrolle nicht transfizierte GL261-Zellen verwendet. Die Gating-Strategie befindet sich in Abbildung 8. Die Zellen wurden in ein 15 ml Falconröhrchen sortiert (100 Zellen pro ml) und in eine 10 cm Zellkulturschale überführt. Hierbei sind 100 Zellen in 10 ml ausgesät und für 1-2 Wochen inkubiert worden um Einzelzellkolonien zu etablieren. Nach 1-2 Wochen wurden die Einzelzellkolonien mittels 50 µl Pipette in eine 96-Well Platte überführt. Nach erneuten 1-2 Wochen wurde die jeweilige Kolonie mittels PCR evaluiert.

### **2.2.9 Sanger-Sequenzierung**

Zunächst wird die zu sequenzierende DNA mittels PCR amplifiziert (siehe Abschnitt 2.2.2). Das PCR-Produkt wird mit einem PCR-Clean-up-Kit aufgereinigt und für die Sequenzier-PCR (Sequencing-PCR) verwendet. Anschließend erfolgt ein weiterer Aufreinigungsschritt des Amplifikats. Dazu wird ein Teil der PCR-

Reaktion mit drei Teilen Natriumacetat/Ethanol (0,4 ml 3 M Natriumacetat, gelöst in 10 ml 100 % Ethanol) gemischt und für 45 Minuten bei 5500 rpm und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und 100 µl 70 % Ethanol auf das Pellet gegeben. Es folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt unter den zuvor genannten Bedingungen für 15 Minuten.

Der Überstand wird erneut verworfen, und das Pellet wird für eine Minute bei 2400 rpm und RT zentrifugiert. Anschließend wird das Pellet bei 40 °C erhitzt, sodass das restliche Ethanol verdampft. Danach wird das Pellet mit 30 µl ddH<sub>2</sub>O für 30 Minuten im ThermoMixer bei 300 rpm resuspendiert und ist bereit für das Sanger-Sequencing, das freundlicherweise „in-domo“ in der Arbeitsgruppe von Professor Thomas Gasser durchgeführt werden konnte. Die Daten wurden anschließend mit FinchTV ausgewertet.

Ansatz für die Sequencing-PCR (20 µl):

Volumen/Menge	Inhalt
8 µl	PCR-Produkt
3.3 µl	Sequencing Buffer 5x
2 µl	Primer forward (100µM)
2 µl	Primer reverse (100µM)
1.4 µl	Big Dye v3 1.0
5.3 µl	ddH <sub>2</sub> O

Konditionen der Sequencing-PCR im PTC-200 Thermo-Cycler:

Schritte	Dauer	Temperatur
1. Initiale Denaturierung	1 Minute	94 °
2. Denaturierung	10 Sekunden	94°
3. Annealing	5 Sekunden	50°
4. Elongation	4 Minuten	60°
Schritte 2-4 30x wiederholen		
5. Aufbewahrung	unbegrenzt	4°

### **2.2.10 Proliferationsassay**

Es wurden 2000 Zellen in Triplikaten in einer 96-Well-Platte ausgesät und über Nacht inkubiert. Für die Färbung wurde bei jeweils einem Triplikat nach 0 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 100 µl Kristallviolett für 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) angefärbt und fixiert. Anschließend wurde das Kristallviolett entfernt und die Wells dreimal mit PBS gewaschen. Nach Lufttrocknung wurden alle Wells mit 50 µl Zitratpuffer versetzt. Die Absorption wurde anschließend bei 570 nm mit einem Photometer gemessen.

Zur Berechnung der Verdopplungszeit der modifizierten Zelllinien wurde die folgende Formel angewendet:

$$\text{Verdopplungszeit} = \frac{\ln(2)}{\text{Wachstumsrate}}$$

Die Wachstumsrate wurde mit Excel berechnet.

### **2.2.11 Migrationsassay**

#### 2.2.11.1 Transwell-Migrationsassay

Zunächst werden die Migrationskammern (8 µm Porengröße) in eine 24-Well-Platte eingesetzt und mit 100 µl serumfreiem Medium über Nacht rehydriert. Gleichzeitig wird das Medium der für das Experiment benötigten Zellen abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und durch DMEM mit 2 % FCS ersetzt. Nach 8–12 Stunden werden die Zellen wie oben beschrieben mit Trypsin abgelöst, gewaschen und eine Zellsuspension von 200 µl je Migrationskammer vorbereitet, die  $2,5 \times 10^4$  Zellen enthält. Die Zellen wurden zuvor für 3 Stunden mit Mitomycin C (0,5 µg/µl) behandelt, um die Proliferation zu hemmen. Das Medium für die Zellsuspension enthält 2 % FCS.

Als Attraktionsmedium dient NIH-3T3-Zell-konditioniertes Medium (700 µl, enthält 10 % FCS). Die Migrationsdauer beträgt je nach Experiment 24–48 Stunden. Danach wird das Medium vorsichtig aus der Migrationskammer entfernt und die Kammer zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgt eine Färbung und Fixierung mit Kristallviolett für 5 Minuten. Die Migrationskammern werden erneut zweimal mit PBS gewaschen. Nicht migrierte Zellen werden vorsichtig mit einem Wattestäbchen von der Innenseite der Migrationskammer entfernt, und das Insert wird für 30 Minuten getrocknet.

Die Membran wird anschließend mit einem Skalpell entfernt und auf einem Objektträger mit Permount® fixiert. Die Zählung der migrierten Zellen, die sich auf der Unterseite der Membran befinden, erfolgt manuell unter dem Mikroskop.

#### 2.2.11.2 Wundheilungs-/Scratch-Assay

Für den Wundheilungsassay wird pro Well einer 6-Well-Platte eine Zellsuspension von  $1 \times 10^6$  Zellen in 2 ml benötigt. Nach einer Inkubationszeit von 8–12 Stunden werden die Zellen für 3 Stunden mit Mitomycin C ( $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) behandelt, um die Proliferation zu hemmen. Anschließend wird das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen, um das Mitomycin C zu entfernen, und serumfreies Medium hinzugegeben. Mit einer 200-µl-Pipettenspitze wird dann eine vertikal verlaufende „Wunde“ (Scratch) in die Zellschicht gezogen, die danach vorsichtig mit PBS gewaschen wird, um abgelöste Zellen und Zellbruchstücke zu entfernen. Zu den Zeitpunkten 0, 12, 24 und 36 Stunden werden Bildaufnahmen des sich schließenden Zellrasens unter dem Mikroskop angefertigt, und die Größe des Scratches wird mit ImageJ gemessen.

#### **2.2.12 Invasionsassay**

Zunächst werden die Invasionskammern, die mit Matrigel-beschichteten Membranen (8 µm Porengröße) ausgestattet sind, in eine 24-Well-Platte überführt und mit 100 µl serumfreiem Medium über Nacht rehydriert. Gleichzeitig

wird das Medium der für das Experiment benötigten Zellen abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und wie beim Migrationsassay durch DMEM mit 2 % FCS ersetzt. Nach 8–12 Stunden wird das Medium vollständig entfernt, die Zellen mit Trypsin abgelöst, in Medium aufgenommen und für 3 Stunden mit Mitomycin C (0,5 µg/µl) behandelt. Nach Entfernen des Mitomycins durch Waschen mit PBS werden die Zellen gezählt.

Für jede Invasionskammer wird eine Zellsuspension mit 200 µl und  $2,5 \times 10^4$  Zellen in DMEM mit 2 % FCS vorbereitet. Als Attraktionsmedium dient in der unteren Kammer NIH-3T3-Zell-konditioniertes Medium (700 µl, enthält 10 % FCS). Je nach Experiment beträgt die Invasionsdauer 24–48 Stunden. Anschließend wird das Medium vorsichtig aus der Invasionskammer entfernt und die Zellen werden zweimal mit PBS gewaschen. Danach erfolgt eine Färbung und Fixierung mit Kristallviolett für 5 Minuten. Die Invasionskammern werden erneut zweimal mit PBS gewaschen. Nicht invadierte Zellen werden mit einem Wattestäbchen von der Innenseite der Invasionskammer entfernt, und das Insert wird für 30 Minuten getrocknet.

Anschließend wird die Membran vorsichtig mit einem Skalpell entfernt und auf einem Objektträger mit Permount® fixiert. Die Zählung der invadierten Zellen, die sich auf der Unterseite der Membran befinden, erfolgt manuell unter dem Mikroskop.

### **2.2.13 Zytokin-Array**

Zur Evaluation der Zytokinproduktion der modifizierten Zelllinien wurde das *Mouse Cytokine Array C3* (AAM-CYT-3-2) verwendet, das dem Nachweis von 62 Zytokinen dient. Das Zytokin-Array wurde gemäß dem Herstellerprotokoll unter Verwendung von 1 ml unverdünntem Zellkulturüberstand pro Membran durchgeführt. Der Überstand wurde durch Inkubation von  $5 \times 10^5$  Zellen in einer 6-Well-Platte in FCS-freiem Medium für 48 Stunden gewonnen, da FCS Zytokine enthält, die das Messergebnis verfälschen könnten.

Der Überstand wurde aliquotiert, bei 20000 rpm und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert und mit 25 µl/ml ProteaseArrest™ versetzt. Für das Array wurde der Überstand aufgetaut, erneut zentrifugiert (20000 rpm, 5 Minuten, 4 °C) und 1 ml unverdünnter Überstand verwendet. Die Inkubation der Membranen erfolgte über Nacht bei 4 °C. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit einem biotinylierten Antikörpercocktail und HRP-Streptavidin gemäß den Herstellerangaben. Die Membranen wurden mit dem ChemiDoc™ Imaging System (Bio-Rad) für 10 Sekunden belichtet.

Die numerischen Densitometriedaten aller Spots wurden mit ImageJ und dem Add-On *Protein Array Analyzer for ImageJ* (Gilles Carpentier, *Protein Array Analyzer for ImageJ*, 15. Oktober 2010, Update 1.1.c vom 07.09.2018) berechnet. In Excel wurden der Mittelwert der Duplikate berechnet und der Hintergrund (negative Kontrollspots) subtrahiert. Zum Vergleich der Ergebnisse wurden alle Werte über mehrere Arrays auf die Positivkontrolle des Zytokin-Arrays normalisiert. Außerdem wurden alle Werte der GL261 TGF-β1-KO-, GL261 TGF-β2-KO- und GL261 TGF-β1/2-Doppel-KO-Zellen auf die Werte der parentalen GL261-Zellen normalisiert und die relative Zytokinproduktion im Vergleich zur Kontrolle berechnet.

#### **2.2.14 Lentivirales Labeling**

Zunächst wurden 50.000 Zellen pro Well einer 6-Well-Platte ausgesät und über Nacht zur Adhäsion inkubiert. Nach 24 Stunden wurden diese Zellen mit 20 µl Lenti-mCherry (Addgene #36084) unter leichtem Schwenken transduziert. Das Lenti-mCherry-Virus kodiert parallel zum mCherry-Gen auch für ein Puromycin-Resistenzgen. Der Umgang mit dem Lentivirus erfolgte stets in einem S2-Labor unter Einhaltung aller notwendigen Sicherheitsrichtlinien. Nach weiteren 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel zu DMEM-Vollmedium. Die Transduktionseffizienz wurde fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Anschließend wurde Puromycin (G418; 2 µg/ml) zur Selektion mCherry-positiver Zellen hinzugefügt. Nach 2–3 Tagen wurde die mCherry-Positivität erneut überprüft.

### **2.2.15 Datenanalyse**

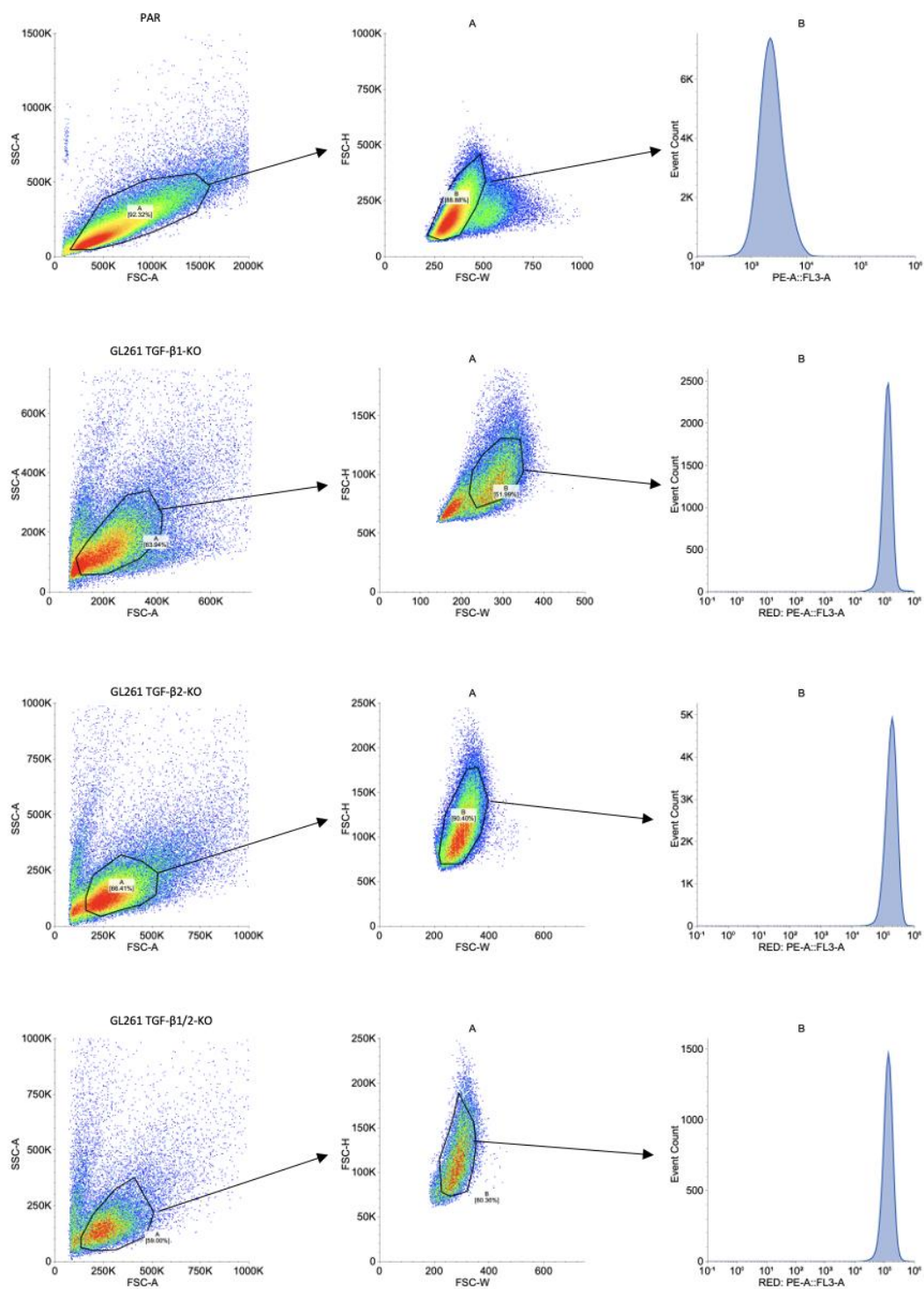
Für die Datenanalyse wurden Excel, ImageJ, GraphPad Prism (Version 10.0.2, GraphPad Software, Inc.), Floreada.io und FinchTV verwendet. Die statistische Signifikanz wurde wie folgt definiert: ns = nicht signifikant, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Zur Bearbeitung der Mikroskopbilder wurde ZEN 3.5 (Blue Version) verwendet. Alle *in vitro*-Experimente wurden, sofern nicht anders beschrieben, in mindestens dreifacher Ausführung durchgeführt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Herstellung und Validierung von TGF- $\beta$ Knockout Zelllinien

#### 3.1.1 Generierung der TGF- $\beta$ Knockouts

Für die Induktion eines Knockouts von TGF- $\beta$ 1 bzw. TGF- $\beta$ 2 wurde die CRISPR-Cas9 Methode verwendet, um in den entsprechenden Genen einen Doppelstrangbruch zu erzeugen. Dieser Bruch führt nach NHEJ dazu, dass im weiteren Verlauf des Gens ein vorzeitiges Stoppcodon entsteht. Dadurch wird das Genprodukt nicht mehr durch den zellulären Proteinsyntheseapparat hergestellt. Um den CRISPR-Cas9-Proteinkomplex in die Zelle zu bringen, wurde eine Elektroporation durchgeführt, bei der die tracrRNA mit einer Markierung von ATTO™ 550 nm für spätere Detektion in die Zelle eingeführt wurde. Da die tracrRNA ein rotes Fluoreszenzsignal erzeugt, wurde mittels Durchflusszytometrie (Abbildung 8) der Nachweis einer erfolgreichen Transfektion erbracht, wodurch auf einen möglichen Knockout in der jeweiligen Zelle geschlossen werden konnte. Zur Sortierung dieser Zellen wurde nach Vorwärts- und Seitwärtsstreuung (FSC und SSC) differenziert, um den Detritus von intakten Zellen zu unterscheiden (Abbildung 8). Nach der Elektroporation befand sich vermehrt Detritus in der Zellsuspension. Daraufhin wurde in Gate A nach Einzelzellen sortiert, um verklumpte Zellen auszusortieren. In Gate B wurde schließlich das rote Fluoreszenzsignal der Zellen detektiert. In untransfizierten Kontrollzellen lag das Fluoreszenzsignal auf der logarithmischen X-Achse zwischen  $10^3$  und  $10^4$  (keine Fluoreszenz). In elektroporierten Zellen hingegen (GL261 TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 1/2-Doppelknockout) lag das Fluoreszenzsignal bei  $10^5$  bis  $10^6$  (positives Signal). Zellen mit einem Fluoreszenzsignal von  $\geq 10^5$  wurden für die Validierung des jeweiligen Knockouts weiterverwendet. Diese generierten Zellen wurden in unserer Publikation (Merk et al., 2024) für weiterführende Experimente verwendet.

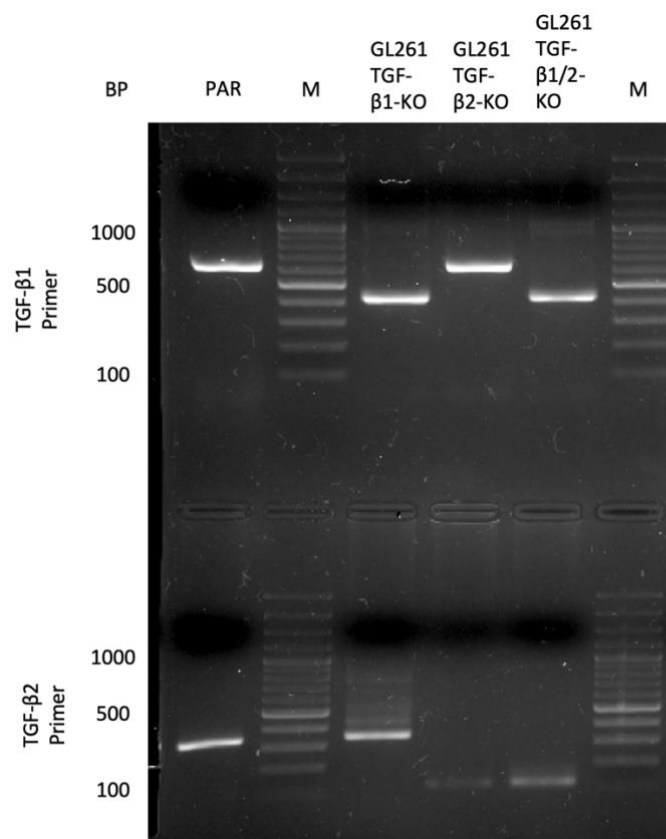


**Abbildung 8: Gating-Strategie für die Durchflusszytometrie zur Detektion erfolgreich elektroporierter Zellen**

Kontrolle (PAR) mitsamt den modifizierten Zelllinien (GL261 TGF-β1-, TGF-β2-KO und TGF-β1/2-Doppelknockout). Die Knockouts zeigen in Gate B eine rote Fluoreszenz, resultierend aus der erfolgreichen Elektroporation mit der ATTO™ 550 tracrRNA (IDT DNA Technologies, USA). Die Grafik wurde mit Floreada.io erstellt.

### 3.1.2 Validierung der TGF- $\beta$ Knockouts mittels PCR

Die PCR bestätigt den Knockout von TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2, denn nur in erfolgreich mit CRISPR modifizierten Zellen werden verkürzte Genabschnitte amplifiziert. Für TGF- $\beta$ 1 KO-Zellen wurde ein verkürztes Amplifikationsprodukt erwartet und synthetisiert, das eine Deletion von 214 bp aufweist. Ebenso zeigt sich für das TGF- $\beta$ 2 Gen in gecrisperten Zellen eine Deletion von 227 bp. Heterozygotie, bei der nur jeweils eines der beiden Allele des entsprechenden Gens mit CRISPR verändert wurde, kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, jedoch ist dies nicht in Abbildung 9 ersichtlich, da im Agarosegel ein PCR-Amplifikat eines unmodifizierten Gen-Allels weder für TGF- $\beta$ 1 noch für TGF- $\beta$ 2 nachgewiesen wurde. Es wird daher angenommen, dass bei allen Zelllinien ein homozygoter Knockout vorliegt. Dies wurde durch Sanger-Sequenzierung weiter validiert.

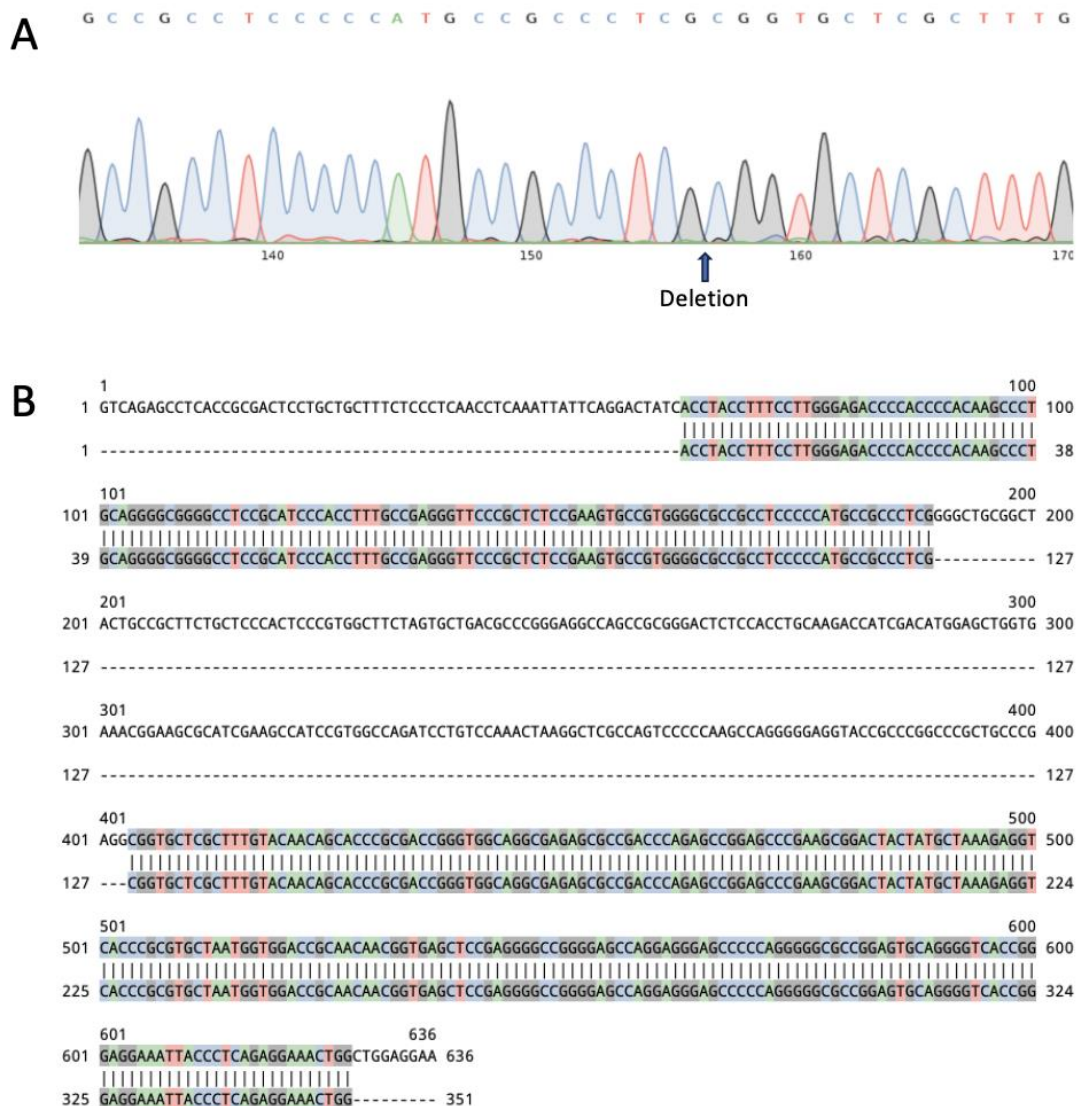


**Abbildung 9: Agarosegelelektrophorese der PCR-Amplifikationsprodukte**

Agarosegelelektrophorese (2%-iges Gel) zum Nachweis der TGF- $\beta$ 1-, TGF- $\beta$ 2-Knockouts sowie des TGF- $\beta$ 1/2 Doppelknockouts. Die amplifizierten Genabschnitte von TGF- $\beta$ 1 (636 bp), TGF- $\beta$ 1-KO (422 bp) sowie von TGF- $\beta$ 2 (342 bp) und TGF- $\beta$ 2-KO (115 bp) sind erkennbar. In Doppelknockout-Zellen sind verkürzte PCR-Amplifikate von sowohl TGF- $\beta$ 1 als auch von TGF- $\beta$ 2 erkennbar. (M: 100 bp DNA-Leiter; BP: Basenpaare).

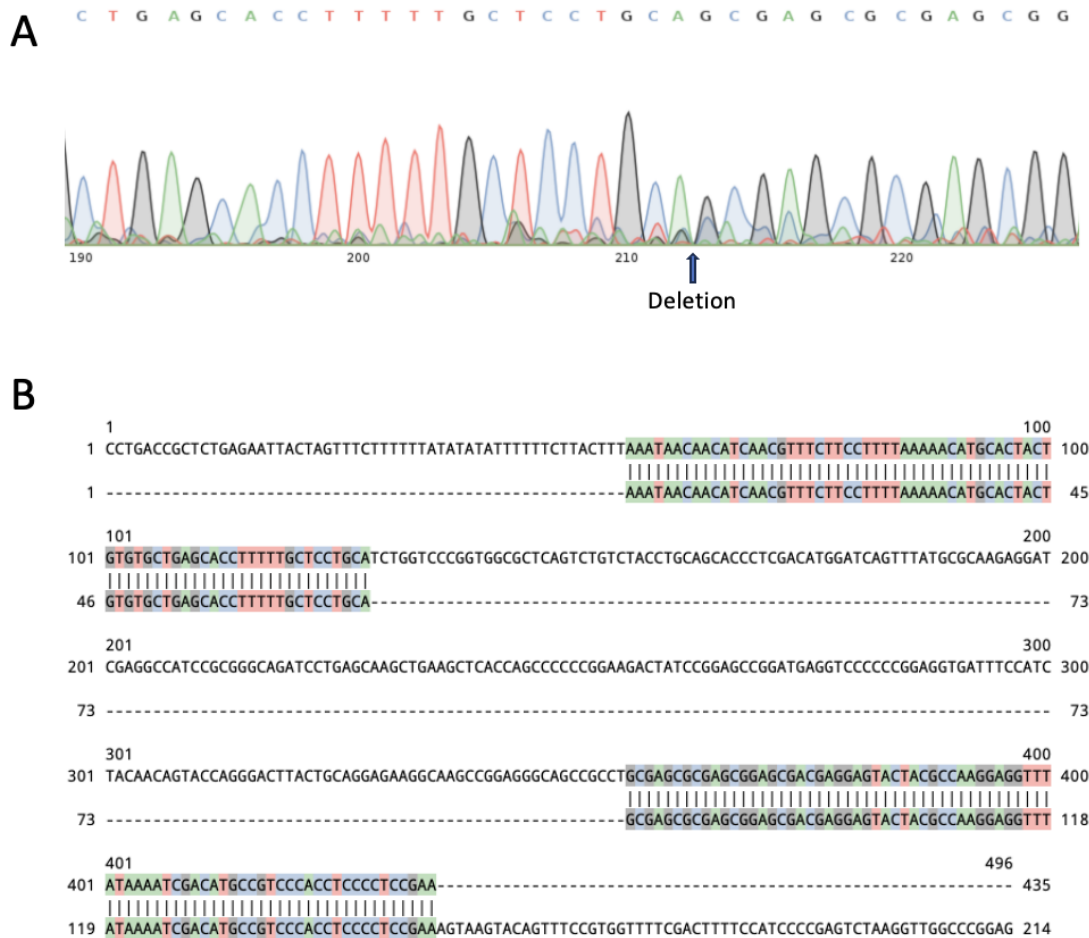
### **3.1.3 Sanger-Sequenzierung isolierter genomischer DNA von TGF- $\beta$ Knockout-GL261-Zellen**

Zur präzisen Validierung der erzeugten Knockouts für TGF- $\beta$ 1 und - $\beta$ 2 wurde eine Sanger-Sequenzierung durchgeführt. Ziel dieser Analyse war es, die genaue Abfolge der Basenpaare zu bestimmen, die Deletion exakt nachzuweisen und eine Heterozygotie auszuschließen. Abbildung 10 und 11 zeigen die detaillierte Basenpaarabfolge für TGF- $\beta$ 1 bzw. TGF- $\beta$ 2. Auch hier wurde im Vergleich zur PCR die Deletion von 214 bp im TGF- $\beta$ 1-Gen (Abbildung 10 B) und die Deletion von 227 bp im TGF- $\beta$ 2-Gen (Abbildung 11 B) nachgewiesen, was für den erfolgreichen Knockout in den korrespondierenden Zelllinien spricht. In der TGF- $\beta$ 1/2 Doppelknockoutzelllinie wurden dementsprechend beide Knockouts nachgewiesen. Da für die Sequenzierung Primer genutzt wurden, die sowohl das entsprechende „full-length“ als auch das gecrisperte Gen amplifizieren, zeigt die Reinheit der Sanger-Sequenzierung (keine überlagernden Sequenzen), dass jeweils beide Allele mit CRISPR modifiziert wurden.



**Abbildung 10: Sanger Sequenzierung für TGF- $\beta$ 1**

(A) Die Sanger-Sequenzierung zeigt die genaue Basenpaarabfolge für den Genabschnitt von TGF- $\beta$ 1, in dem die Deletion mittels CRISPR/Cas erfolgte (Pfeil) sowie in (B) den Vergleich der Deletion (untere Sequenz) mit der korrespondierenden Sequenz des „full-length“ Gens (obere Sequenz) (B). Erkennbar ist die Deletion von 214 bp. Aufgrund der Ungenauigkeit des Sequenzierverfahrens war an den Amplifikatenden ein komplettes Matching der Kontroll- mit der Knockoutsequenz am 3' und 5'-Ende der Amplifikate nicht immer möglich. Erstellt mit CRISP-ID v1.1. (Dehairs et al., 2016).



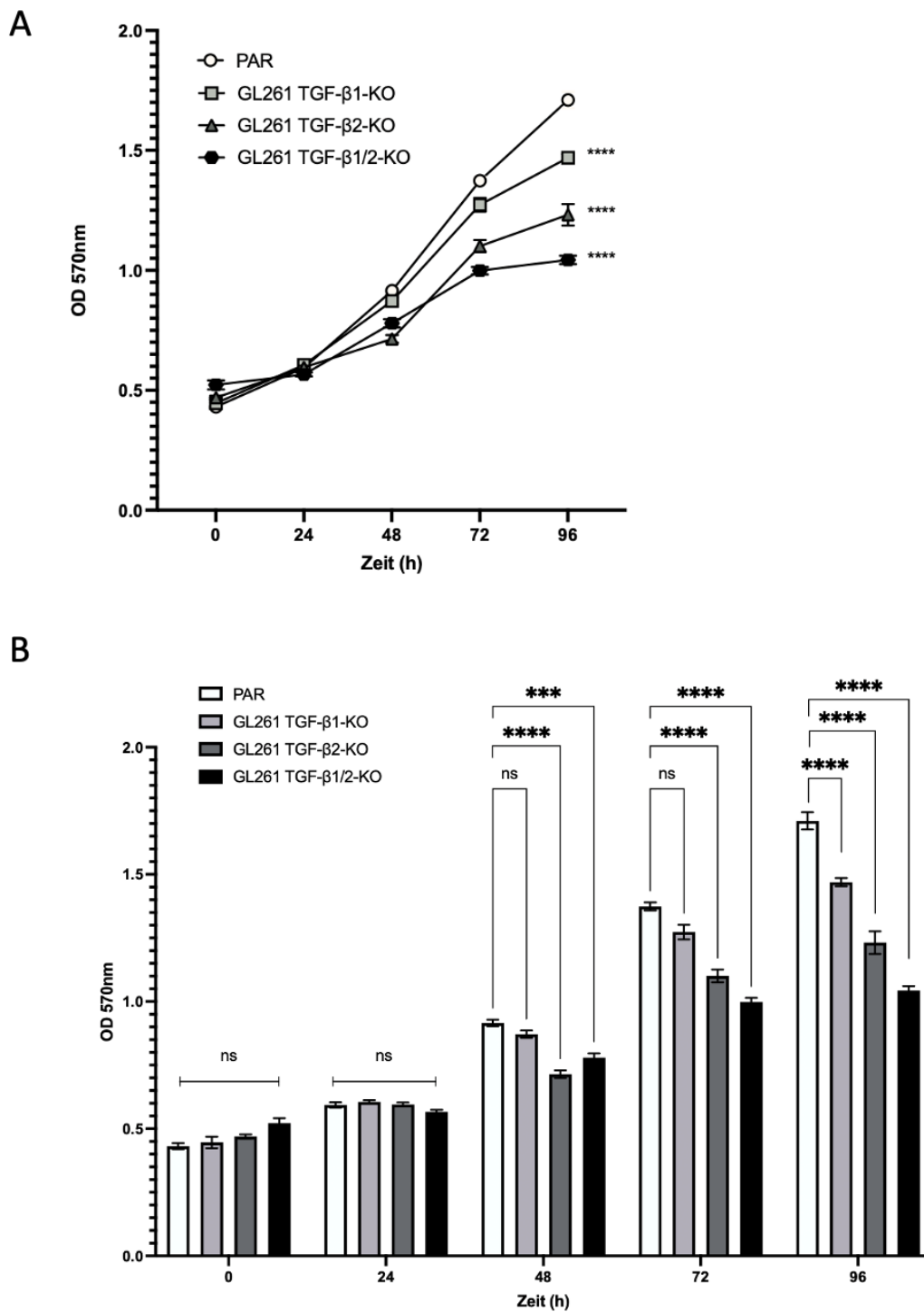
**Abbildung 11: Sanger-Sequenzierung für TGF- $\beta$ 2**

(A) Die Sanger-Sequenzierung zeigt die genaue Basenpaarabfolge für den Genabschnitt von TGF- $\beta$ 2, in dem die Deletion mittels CRISPR/Cas erfolgte (Pfeil) sowie in (B) den Vergleich der Deletion (untere Sequenz) mit der korrespondierenden Sequenz des „full-length“ Gens (obere Sequenz) (B). Erkennbar ist die Deletion von 227 bp. Aufgrund der Ungenauigkeit des Sequenzierverfahrens war an den Amplifikatenden Ein komplettes Matching der Kontroll- mit der Knockoutsequenz am 3' und 5'-Ende der Amplifikate war nicht immer möglich. Erstellt mit CRISPR-ID v1.1. (Dehairs et al., 2016).

## 3.2 Effekte des TGF- $\beta$ Knockouts in vitro

### 3.2.1 Zellproliferation

Die Proliferation wurde mittels eines photometrischen Verfahrens bei 570 nm durchgeführt, wozu die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Aussaat mit Kristallviolett-Lösung fixiert und gefärbt wurden. Eine erhöhte optische Dichte (OD) entspricht dabei einer höheren Zellzahl. Alle Knockout-Zellen (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 1/2) zeigten im Vergleich zur parentalen GL-261 Zellen eine verringerte Proliferationsrate. Dies ist besonders nach 72 und 96 Stunden hoch signifikant ( $p < 0,0001$ ) (Abbildung 12). Die Verdopplungszeit unterscheidet sich deutlich zwischen parentalen und KO-Zellen. Für parentale GL261-Zellen beträgt sie 46,2 h, für TGF- $\beta$ 1-KO - 53,3 h, für TGF- $\beta$ 2-KO- 65,4 h und für TGF- $\beta$ 1/2-Doppel-KO-Zellen 85,6 h. Der Vergleich unter den einzelnen Knockouts zeigt dabei den größten Negativeffekt auf die Proliferation von TGF- $\beta$ 1/2-Doppel-KO-Zellen. Ebenso lässt sich auch ein signifikanter Unterschied im Proliferationsverhalten zwischen TGF- $\beta$ 2-KO- und den Doppel-KO-Zellen nach 72 ( $p < 0.05$ ) und 96 h beobachten ( $p < 0.0001$ ) (nicht in Abbildung 12 B). Laut zweifaktorieller Varianzanalyse (Two-Way ANOVA) und der Posthoc Tukey-Test besteht im Hinblick auf den Genotyp, wenn dieser insgesamt keine Auswirkung hat, eine Wahrscheinlichkeit von weniger als 0,01 %, dass in einem Experiment dieser Größenordnung zufällig ein Effekt dieser Größe zu beobachten ist. Somit ist der Effekt der Genalteration von TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 auf die Zellproliferation in allen KO-Zelllinien als hoch signifikant einzustufen. Diese Ergebnisse wurden in unserer Arbeit (Merk et al., 2024) publiziert.



**Abbildung 12: Zellproliferationsassay**

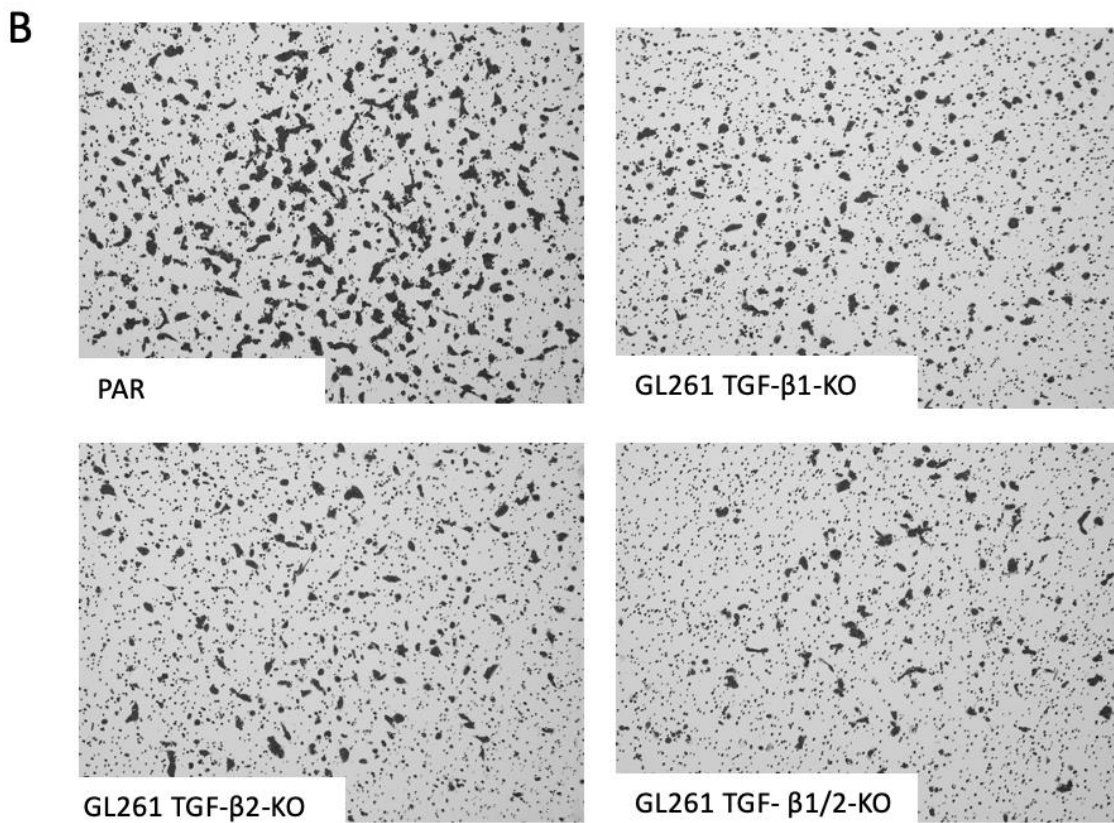
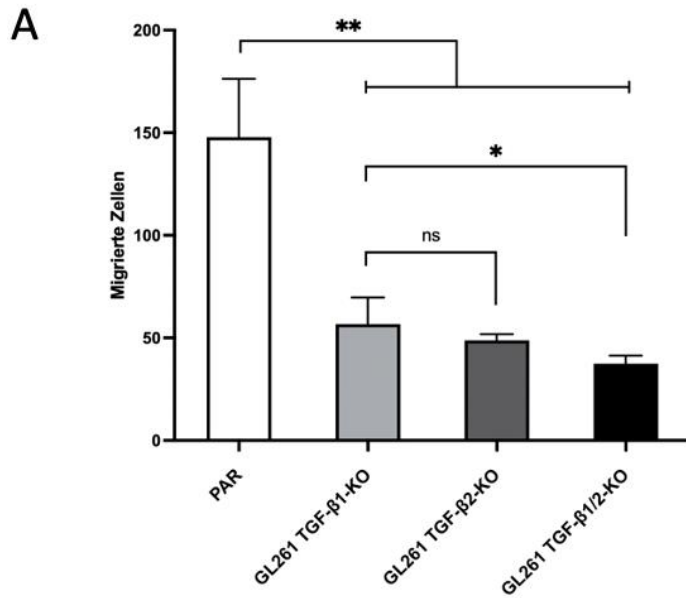
Dargestellt ist ein Proliferationsassay als Kurvendiagramm zur besseren Übersichtlichkeit (A) und als Balkendiagramm für die detailliertere Darstellung der Signifikanzwerte (B). Gezeigt ist die optische Dichte (OD) bei 570 nm aufgetragen gegen die Zeit in Stunden ( $n=4$ , SEM, Two-Way ANOVA mit Posthoc Tukey-Test, ns= nicht signifikant, \*\*\*  $p<0,001$ , \*\*\*\*  $p<0,0001$ ). (Merk et al., 2024)

### **3.2.2 Migration**

#### 3.2.2.1 Transwell-Migration-Assay

Der Transwell-Migration-Assay wurde unter Verwendung von Migrationskammern mit Membranen einer Porengröße von 8  $\mu\text{m}$  durchgeführt. Um Zellproliferation zu hemmen, welche Einfluss auf die Anzahl migrierter Zellen nehmen kann, wurden zu untersuchende Zellen mit Mitomycin C vorbehandelt, somit nur Effekte des jeweiligen KO auf Zellmotilität detektiert. Obwohl die Verdopplungszeit parentaler GL261-Zellen mindestens 46,2 Stunden beträgt (siehe Kapitel 3.2.1), war es unserer Ansicht nach dennoch erforderlich, Proliferation vollständig zu unterdrücken, um vergleichbare Ergebnisse bei der Bewertung der Migration zu erhalten. Als Attraktionsmedium wurde in der unteren Kammer der Migrationsplatte konditioniertes Medium von NIH-3T3-Zellen verwendet.

Das Migrationsverhalten von parentalen und KO-Zellen unterscheidet sich signifikant. Wie in Abbildung 13 A zu sehen ist, wanderten im Vergleich zu KO-Zellen fast doppelt so viele parentale GL261 durch die Migrationsmembran ( $p < 0,01$ ). Diese Beobachtung wird durch exemplarische Fotografien migrierter Zellen, lokalisiert auf der Unterseite der Migrationsmembran bestätigt (Abbildung 13 B). Insbesondere der Vergleich zwischen parentalen und TGF- $\beta$ 1/2-Doppel-KO-Zellen zeigt einen hochsignifikanten Unterschied im Migrationsverhalten ( $p < 0,01$ ). Die Post-hoc-Analyse mittels des Tukey-Tests zeigt ebenfalls einen Effekt zwischen TGF- $\beta$ 1-KO und dem TGF- $\beta$ 1/2-Doppel-KO-Zellen ( $p < 0,05$ ), jedoch keine Signifikanz zwischen TGF- $\beta$ 1-KO- und TGF- $\beta$ 2-KO- bzw. zwischen TGF- $\beta$ 2-KO- und TGF- $\beta$ 1/2-Doppel-KO-Zellen. Somit lässt sich aus diesen Daten schlussfolgern, dass in GL261-Zellen der Knockout von TGF- $\beta$ 1 bzw. TGF- $\beta$ 2 bzw. der Doppel-KO beider Gene einen negativen Effekt auf das Migrationsverhalten aufweist. Diese Ergebnisse wurden in unserer Arbeit publiziert (Merk et al., 2024).



**Abbildung 13: Transwell-Migration-Assay**

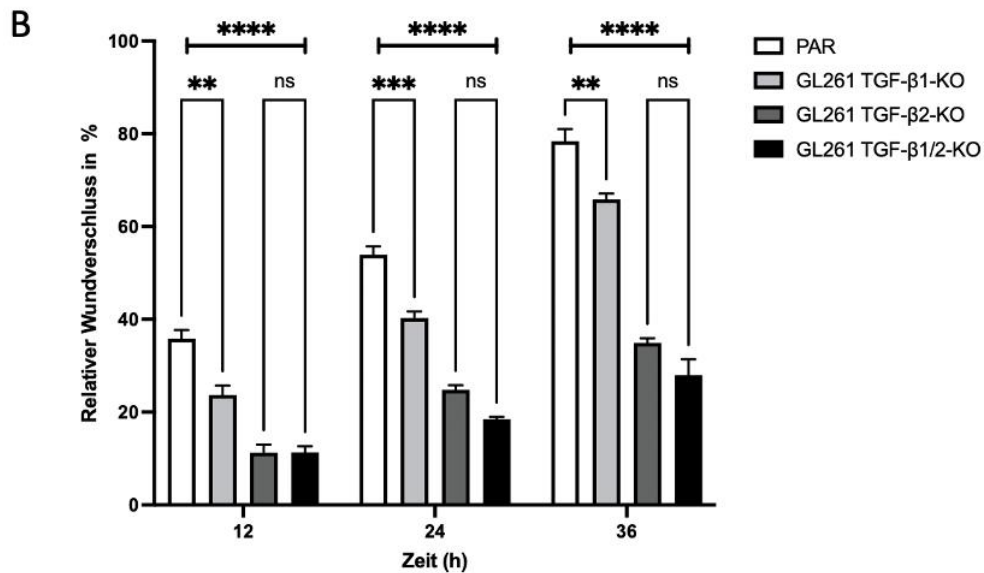
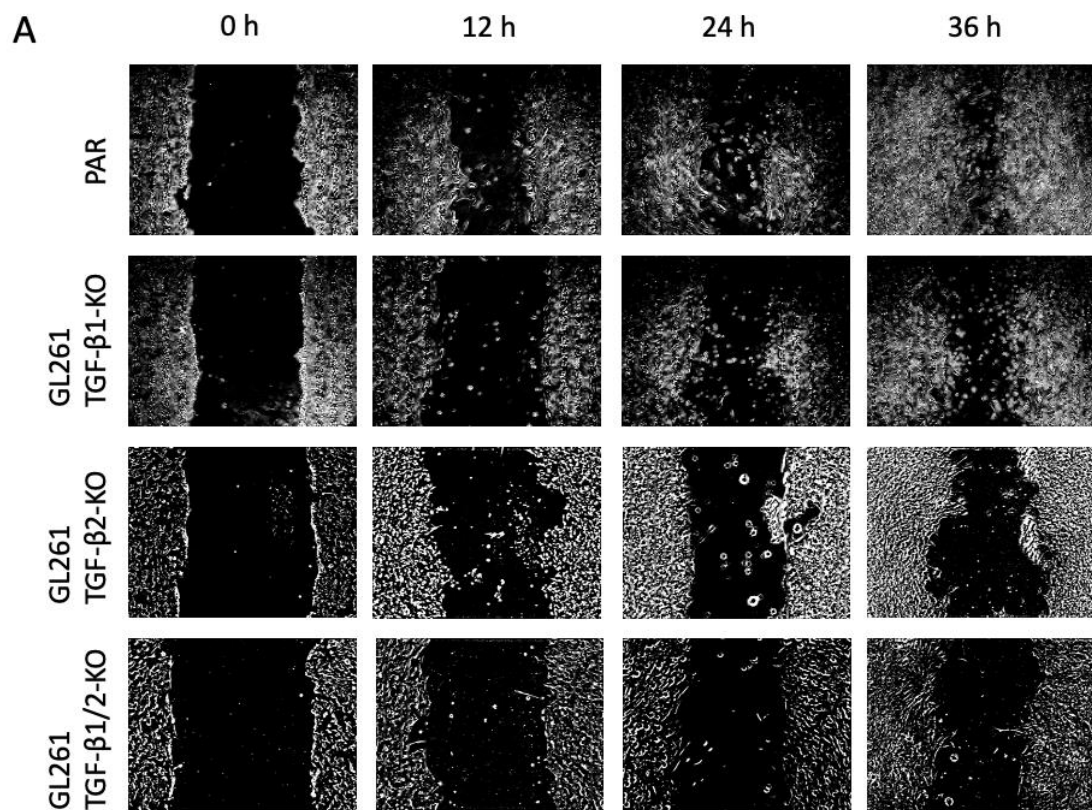
Dargestellt in A ist die Auswertung des Transwell-Migration-Assays nach 24 Stunden, welcher mit 25.000 Zellen pro Well durchgeführt wurde. Migrierte Zellen wurden manuell ausgezählt. In B sind exemplarisch mikroskopische Aufnahmen (Mikroskop: Axioscope 5) 24 Stunden nach

Migrationsbeginn auf der Unterseite von fixierten Membran-Inlays gezeigt. Die Aufnahmen wurden durch Erhöhung des Kontrasts modifiziert (n=4, SEM, One-Way ANOVA mit Posthoc Tukey-Test, ns= nicht signifikant, \* p<0,05, \*\* p<0,01) (Merk et al., 2024)

### 3.2.2.2 Wundheilungs-/Scratch-Assay

Für den Wundheilungs-/Scratch-Assay wird in jedem Well einer 12-Well Zellkulturplatte im Zellrasen eine artifizielle Wunde mittels gelber Pipettenspitze erzeugt. Vorher werden die Zellen für 3 Stunden mit Mitomycin C (0.5 µg/µl) inkubiert. Danach wurde das Medium entfernt, die Zellen gewaschen, um Mitomycin C zu entfernen und anschließend serumfreies Medium hinzugegeben. Wie in 3.2.2.1 wurde Mitomycin C genutzt, um Proliferation zu hemmen und lediglich Effekte der Zellmotilität beurteilen zu können.

Betrachtet man die Auswertung des Wundheilungs-/Scratch-Assays in Abbildung 14 B, so erkennt man, dass der relative Wundverschluss der parentalen im Vergleich zu allen KO-Zellen zu allen Messzeitpunkten einen signifikanten Unterschied aufweist (p<0.0001). Lediglich der Vergleich für TGF-β2-KO- und TGF-β1/2-Doppel-KO-Zellen zeigt keine Signifikanz. Nach 36 Stunden war in parentalen Zellen ein relativer Wundverschluss von ca. 80 % sichtbar, wohingegen bei TGF-β1/2-Doppel-KO-Zellen dieser nur ca. 30 % betrug. Nimmt man die exemplarischen Hellfeldmikroskopaufnahmen hinzu (Abbildung 14 A), so fällt der Vergleich der parentalen zu den anderen KO-Zellen ähnlich aus.



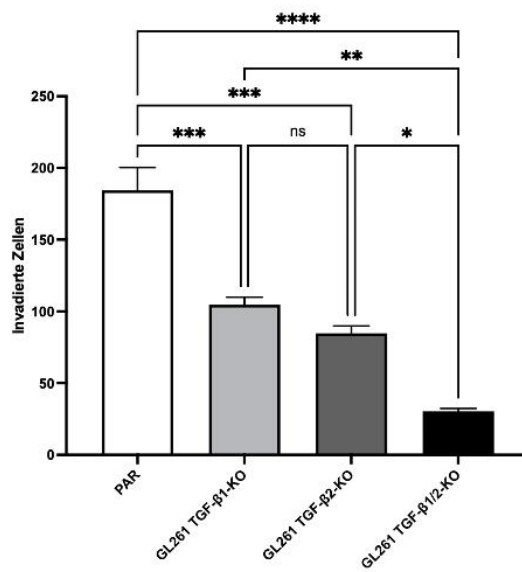
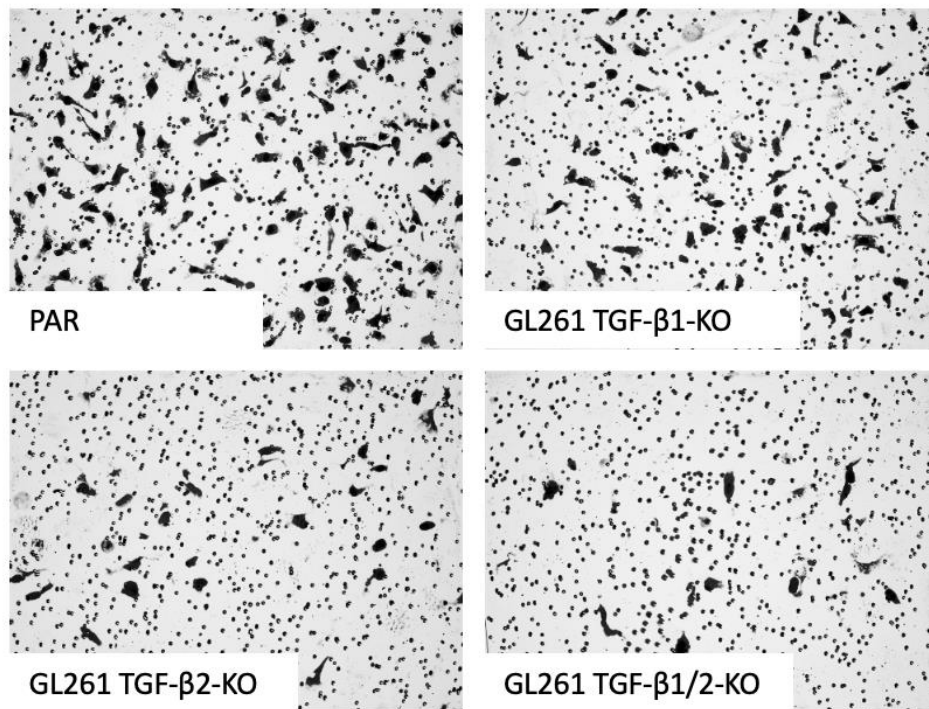
**Abbildung 14: Wundheilungs-/Scratch-Assay**

Dargestellt in A sind exemplarisch Hellfeldmikroskopaufnahmen der parentalen und KO-Zellen 0, 12, 24 und 36 h nach Migration. Die Aufnahmen sind durch Erhöhung des Kontrasts modifiziert. In B ist die Auswertung des Wundheilungs-/Scratch-Assays gezeigt, welcher den relativen Wundverschluss in Prozent darstellt. (n=3, SEM, Two-Way ANOVA mit Posthoc Tukey-Test, ns = nicht signifikant, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001)

### **3.2.3 Invasion**

Für die Invasionsassays wurden mit Matrigel beschichtete Migrationsmembranen mit einer Porengröße von 8 µm genutzt. Für die Hemmung der Proliferation wurden die Zellen analog zum Migrationsassay mit Mitomycin C (0.5 µg/µl) vorbehandelt. Als Attraktionsmedium dient NIH-3T3-Zell-konditioniertes Medium, der Zählvorgang der mit Kristallviolett fixierten Zellen erfolgte manuell.

Die Invasionsfähigkeit parentaler Zellen war (Abbildung 15 A) am größten. Diese Fähigkeit war in KO-Zellen ausgeprägt reduziert und war mit einer 8-fachen Reduktion am prominentesten in TGF-β1/2-Doppel-KO-Zellen ( $p < 0.0001$ ). Der Vergleich der Einzel-KO zeigt zwischen den TGF-β1-KO- und TGF-β2-KO-Zellen keinen statistischen Unterschied. Mikroskopische Aufnahmen invadierter Zellen (Abbildung 15 B) unterstützen die quantitative Auswertung der Invasionsassays.

**A****B****Abbildung 15: Invasionsassay**

Dargestellt in A ist die Auswertung der Invasionsassays nach 24 Stunden, welche mit 25.000 Zellen pro Well durchgeführt wurde. Die invadierten Zellen wurden manuell ausgezählt. In B sind exemplarisch mikroskopische Aufnahmen fixierter Membran-Inlays, aufgenommen mit einem Axioscope 5-Mikroskop, 24 h nach der Invasion gezeigt. Die Aufnahmen sind durch Erhöhung des Kontrasts modifiziert. (n=3, SEM, One-Way ANOVA mit Posthoc Tukey-Test, ns = nicht signifikant, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001)

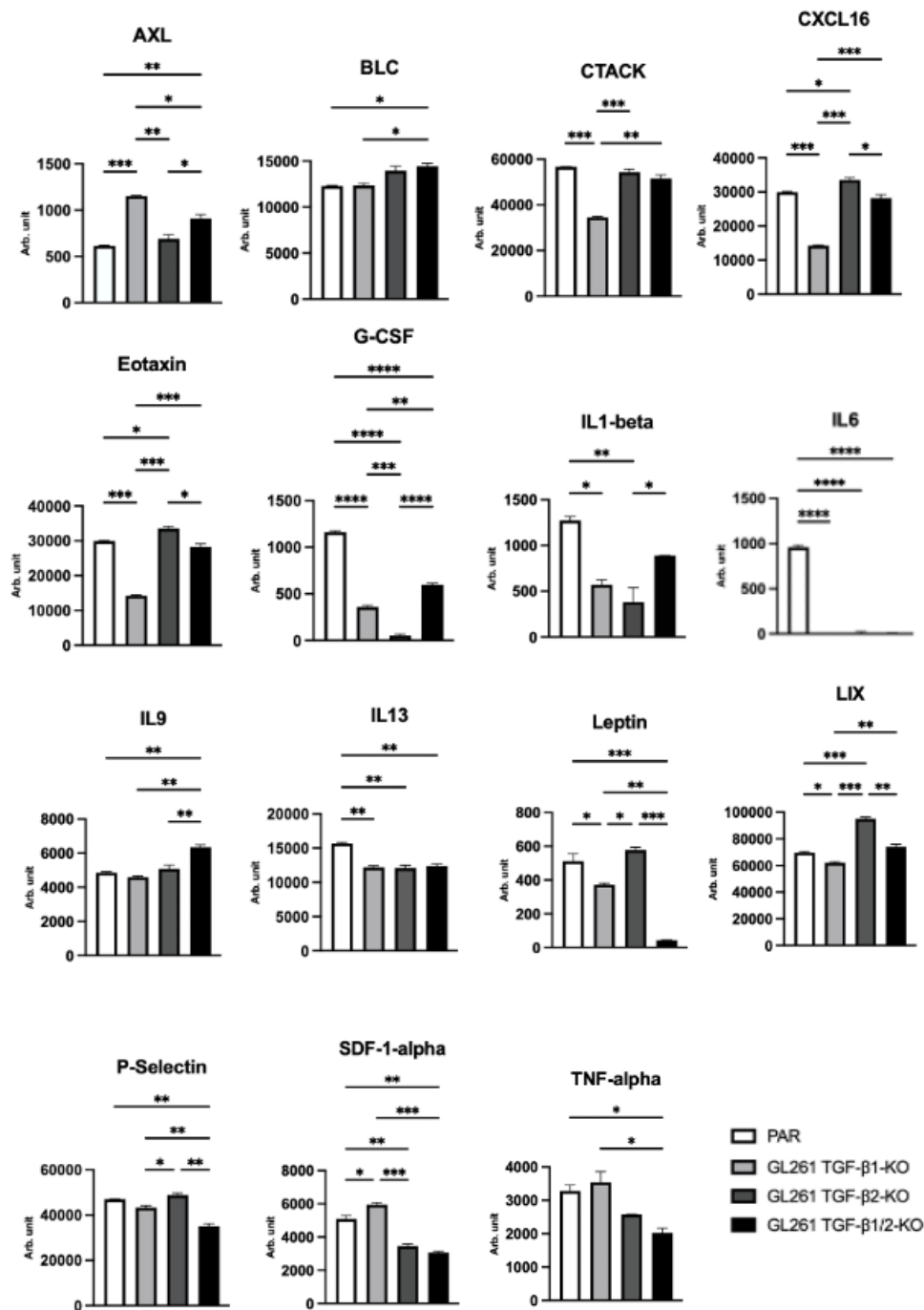
### **3.2.4 Zytokinproduktion**

Die Evaluation der Zytokinsekretion in parentalen und TGF- $\beta$ -KO GL261 Zellen wurde mittels eines Zytokin-Arrays durchgeführt, der den Nachweis der relativen Expression von 62 Zytokinen erlaubt. Die Einteilung der Zytokine erfolgte hierbei getrennt entsprechend ihrer Funktionen (Proliferation, Motilität, Angiogenese und Inflammation).

Um nicht fälschlicherweise im Wachstumsmedium (enthält FCS) enthaltene Zytokine zu detektieren, wurden parentale und TGF- $\beta$ -KO GL261 Zellen zur Gewinnung von Zellkulturüberständen in FCS-freiem Medium kultiviert. Die bildgebende Darstellung der Membranen erfolgte mit dem ChemiDoc™ Imaging System (Biorad) für jeweils 10 Sekunden. Die mit ImageJ und Excel erhobenen Densitometriedaten wurden im Anschluss für weitere Analysen genutzt.

#### **3.2.4.1 Proliferation**

Die proliferativen Eigenschaften der in Abbildung 16 dargestellten Zytokine zeigen eine deutliche Korrelation zu TGF- $\beta$ . Die Sekretion von CTACK, CXCL16, Eotaxin, G-CSF, IL1- $\beta$ , IL-6, IL-13, Leptin und LIX ist in TGF- $\beta$ 1-Zellen deutlich reduziert, bei einer Reduktion von teilweise mehr als 50 Prozent (CXCL16, Eotaxin, G-CSF, IL1- $\beta$ , IL-6). Signifikante Korrelation des TGF- $\beta$ 2-KO mit verminderter Sekretion sind für G-CSF, IL1-beta, IL-6, SDF-1- $\alpha$  und TNF-alpha erkennbar. Für G-CSF und TNF-alpha wurde dabei eine geringere Zytokinsekretion in TGF- $\beta$ 2-KO-Zellen, im Vergleich zu TGF- $\beta$ 1-KO-Zellen, gezeigt. Ein synergistischer Effekt einer reduzierten Zytokinsekretion in TGF- $\beta$ 1/2-Doppel-KO-Zellen war für IL-6, Leptin, P-Selectin, SDF-1- $\alpha$  und TNF- $\alpha$  erkennbar. Interessanterweise zeigte sich eine signifikant höhere Reduktion der Zytokinsekretion von G-CSF und IL1-beta in TGF- $\beta$ 1- bzw. TGF- $\beta$ 2-KO-Zellen, im Vergleich zu TGF- $\beta$ 1/2-Doppel-KO-Zellen, obwohl in Doppel-KO-Zellen ein additiver Effekt zu erwarten war (Abb. 16).

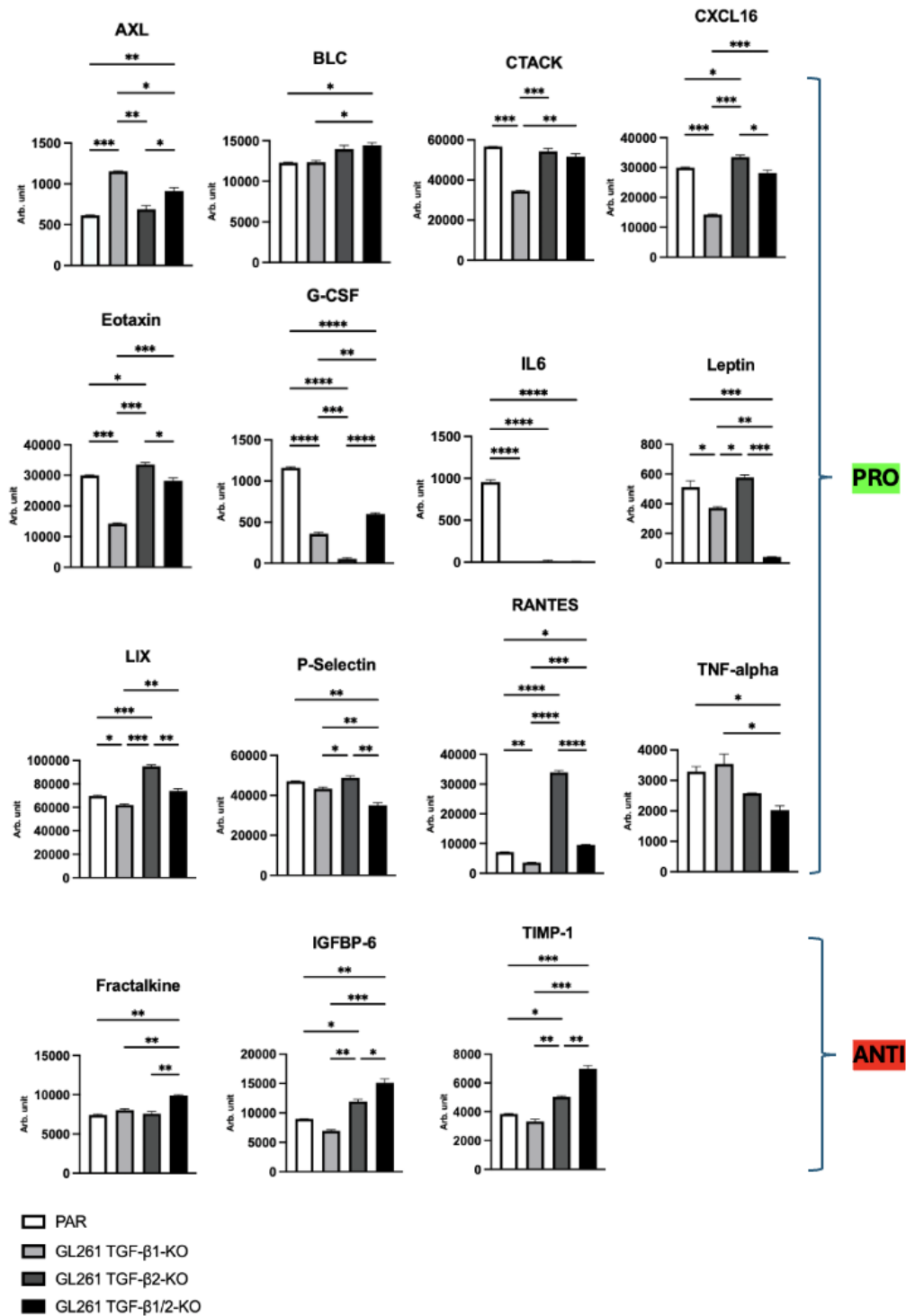


**Abbildung 16: Zytokine mit positivem Einfluss auf die Proliferation**

Dargestellt sind Zytokine, deren Sekretion in TGF-β-KO GL-261-Zellen, im Vergleich zu parentalen Zellen, signifikant verändert ist und die Einfluss auf die proliferativen Eigenschaften von Gliomzellen aufweisen. Überstände wurden pro Zelllinie jeweils einmal gewonnen, Messungen der Zytokine erfolgten mehrere Male (technische Replikate der Messungen). Der Hintergrund wurde subtrahiert. Werte unter 500 arb. units (arbitrary units) gelten als äußerst niedrig und nahe der Detektionsgrenze des Zytokin-Arrays. (n=4, SEM, One-Way ANOVA plus Posthoc Tukey-Test, \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001, \*\*\*\* p<0,0001)

#### 3.2.4.2 Motilität

Migration und Invasion von Zellen werden maßgeblich durch die in Abbildung 17 dargestellten Zytokine beeinflusst. Der KO von TGF- $\beta$ 1 in GL-261-Zellen resultierte in einer signifikanten Reduktion der Sekretion von CTACK, Eotaxin, G-CSF, IL6, Leptin, LIX und RANTES. Im Gegensatz dazu zeigt sich keine signifikante Steigerung der Sekretion für motilitätshemmende Zytokine in diesen Zellen. In TGF- $\beta$ 2-KO-Zellen ist eine signifikante Reduktion der Zytokine G-CSF und IL6 sowie eine erhöhte Sekretion von IGFBP-6 und TIMP-1 zu beobachten. Trotz motilitätsfördernder Funktion wurde ebenso eine erhöhte Sekretion von CXCL16, Eotaxin, LIX und RANTES beobachtet. Ein synergistischer Effekt ist für IL6, IGFBP-6 und TIMP-1 in TGF- $\beta$ 1/2-Doppel-KO-Zellen zu erkennen. In TGF- $\beta$ 1/2-Doppel-KO-Zellen ist insbesondere für Leptin, IL6 und TNF-alpha eine deutliche Reduktion der Zytokinsekretion erkennbar. Paradoxerweise zeigte sich für G-CSF in TGF- $\beta$ 1/2-KO-Doppel-KO-Zellen höhere Sekretion als in den Einzel-KO-Zellen. Interessanterweise ist die Sekretion des Zytokins RANTES in TGF- $\beta$ 2-KO-, im Vergleich zu parentalen Zellen, um das 3-fache erhöht, aber signifikant erniedrigt in GL261-Zellen, in denen TGF- $\beta$ 1 ausgeknockt wurde (Abb. 17).

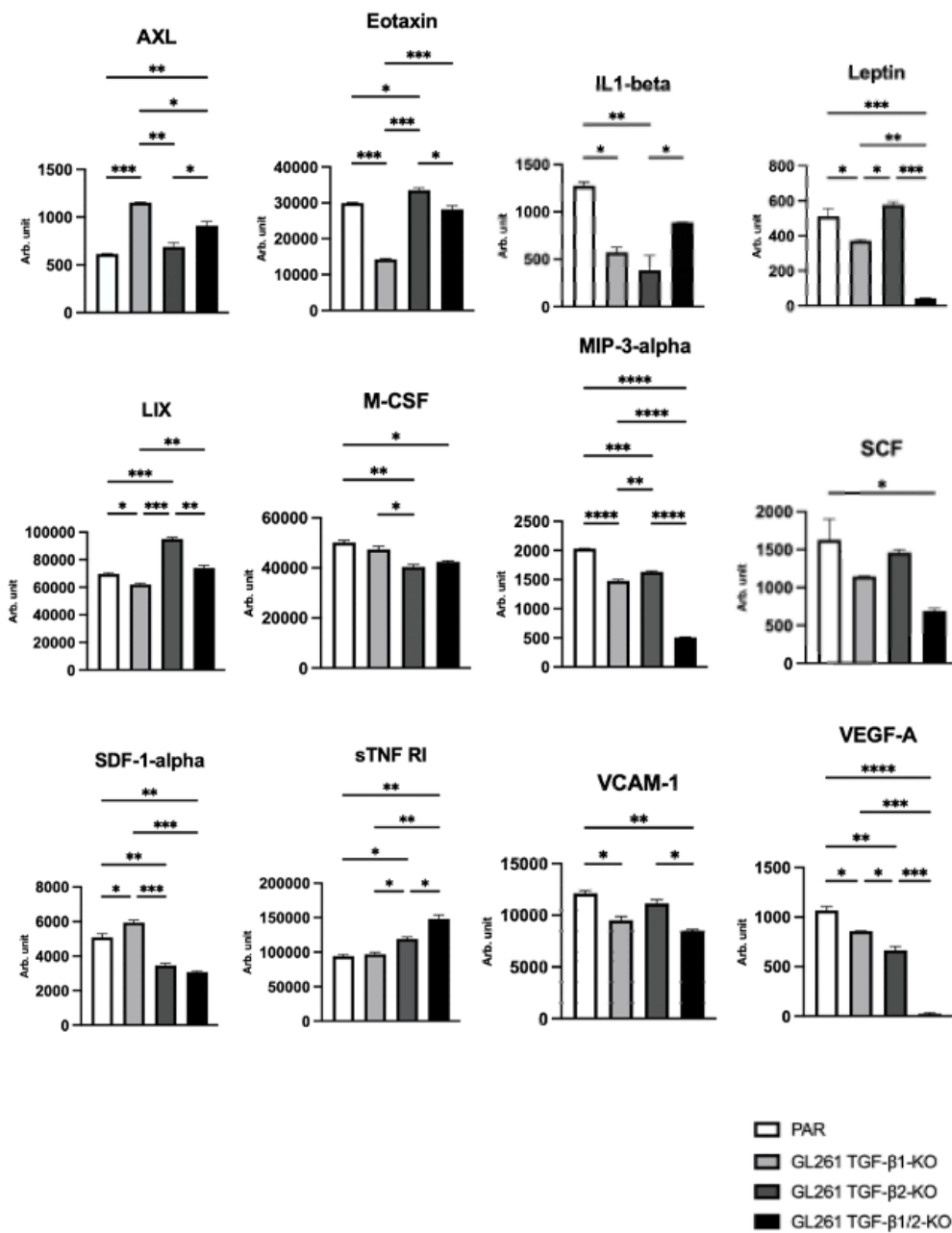


**Abbildung 17: Sekretion von Zytokinen, die Effekte auf die Zellmotilität bewirken können**

Dargestellt sind Zytokine, deren Sekretion in TGF-β-KO GL261-Zellen signifikant verändert ist und die Effekte auf die Motilität von Gliomzellen vermitteln können. Gezeigt sind motilitätsfördernde (PRO) und -hemmende (ANTI) Zytokine. Überstände wurden pro Zelllinie jeweils einmal gewonnen, Messungen der Zytokinkonzentration erfolgten mehrfach (technische Replikate). Der Hintergrund wurde subtrahiert. Werte unter 500 arb. units (arbitrary units) gelten als äußerst niedrig und nahe der Detektionsgrenze des Zytokin-Arrays. (n=4, SEM, One-Way ANOVA plus Posthoc Tukey-Test, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001)

### 3.2.4.3 Angiogenese

Angiogenese modulierende Zytokine (Abb. 18) können proangiogen wirken und somit bei Sekretion zu den typischen vaskulären Veränderungen im GBM führen. In TGF- $\beta$ 1-KO-Zellen erkennt man eine verminderte Sekretion vieler proangiogen wirksamer Zytokine (Eotaxin, IL1-beta, Leptin, LIX, MIP-3-alpha, V-CAM, VEGF-A). Einige proangiogen aktive Zytokine werden jedoch verstärkt sezerniert (AXL und SDF-1-alpha). Ähnliche Effekte sind auch in TGF- $\beta$ 2-KO-Zellen erkennbar, vor allem für IL1-beta, M-CSF, MIP-3-alpha, SDF-1-alpha und VEGF-A. Im Vergleich zu TGF- $\beta$ 1-KO-Zellen ist VEGF-A in TGF- $\beta$ 2-Zellen signifikant reduziert. In TGF- $\beta$ 1/2-Doppel-KO-Zellen ist ein ähnlicher Trend mit verminderter Sekretion der Zytokine IL-1-beta, Leptin, M-CSF, MIP-3-alpha, SCF, SDF-1-alpha, V-CAM und VEGF-A zu beobachten. Eindrucksvoll ist der additive Effekt bei Herabregulation in TGF- $\beta$ 1/2-Doppel-KO-Zellen für Leptin, MIP-3-alpha, SCF, SDF-1-alpha und vor allem für VEGF-A. Die Sekretion von VEGF-A ist in diesen Zellen um nahezu 9-fach reduziert. Konträr dazu ist die Konzentration des Zytokins sTNF R1 (eine lösliche Form des TNF-Rezeptors 1) in TGF- $\beta$ 1/2-Doppel-KO-Zellen signifikant erhöht.



**Abbildung 18: Sekretion von Zytokinen die Effekte auf die Angiogenese bewirken können**

Dargestellt sind Zytokine, deren Sekretion in TGF-β-KO GL261-Zellen signifikant verändert ist und die in Gliomzellen angiogene Effekte vermitteln. Überstände wurden pro Zelllinie jeweils einmal gewonnen, Messungen der Zytokinkonzentration erfolgten mehrfach (technische Replikate). Der Background wurde subtrahiert. Werte unter 500 arb. units (arbitrary units) gelten als äußerst niedrig und nahe der Detektionsgrenze des Zytokin-Arrays. (n=4, SEM, One-Way ANOVA plus Posthoc Tukey-Test, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001)

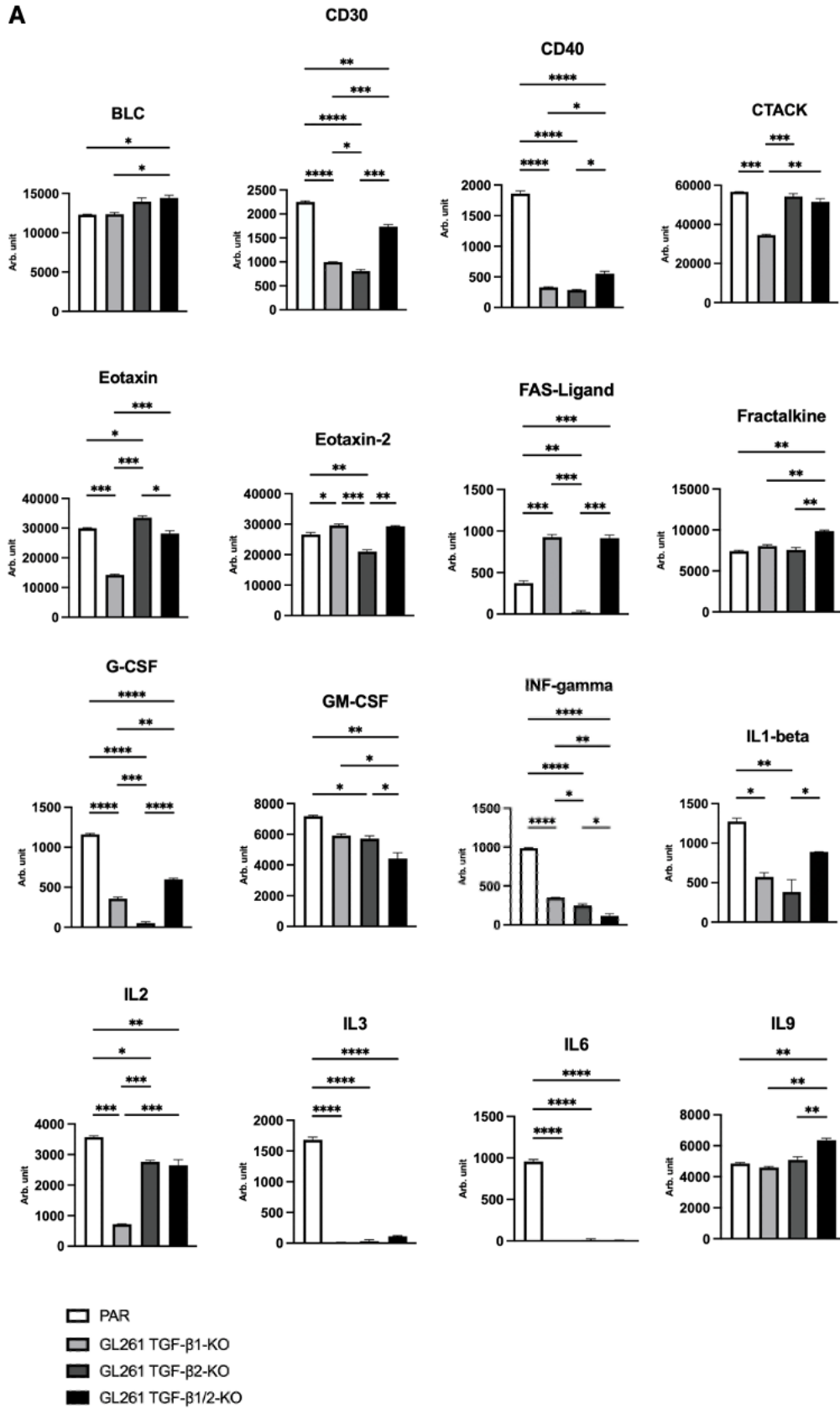
#### 3.2.4.4 Inflammation

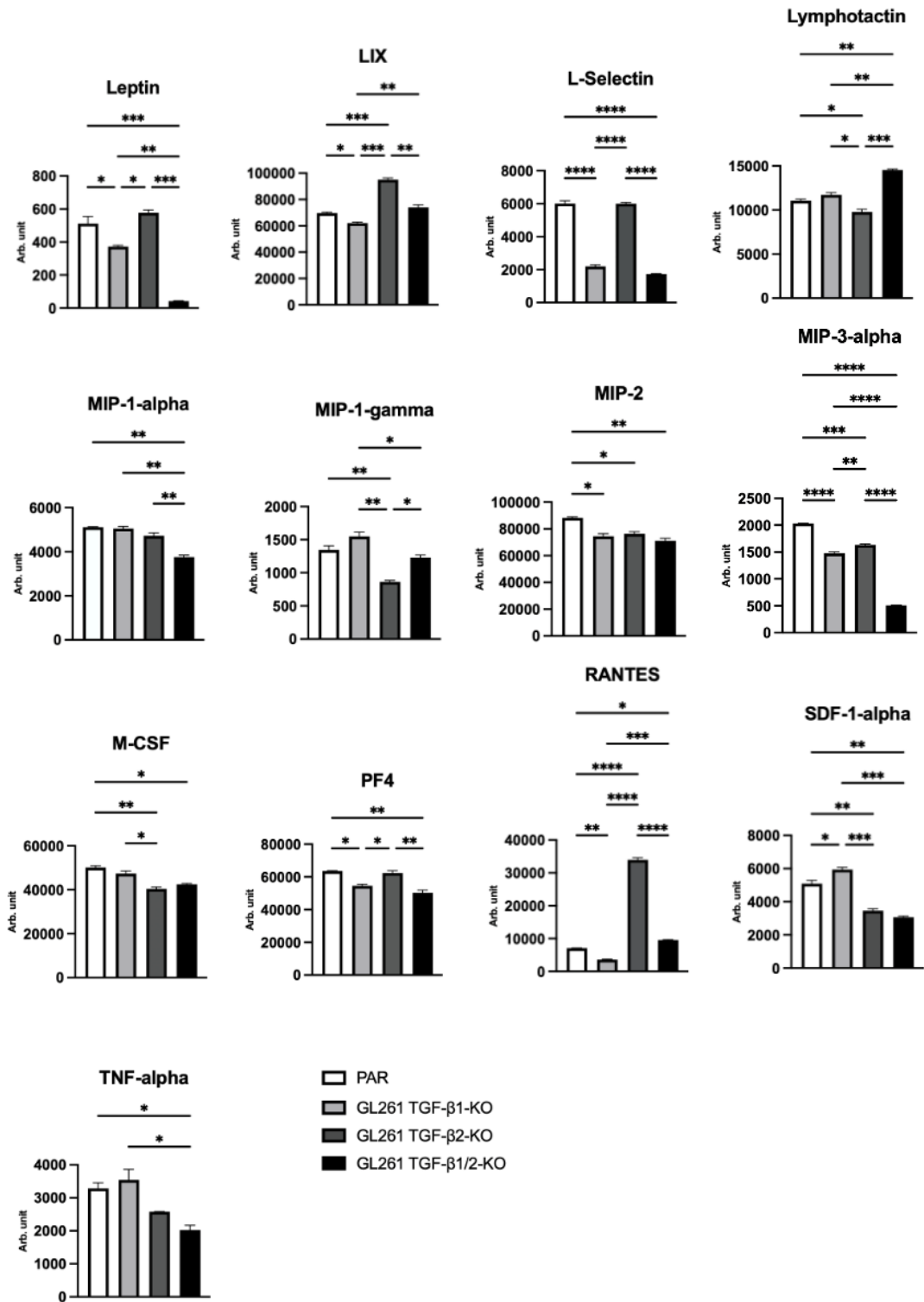
Auch die Sekretion von Zytokinen, die einen Einfluss auf das inflammatorische Geschehen und das Immunsystem haben können, wird in TGF- $\beta$ -KO-Zellen moduliert (Abb. 19) Die Einteilung der Zytokine erfolgte getrennt entsprechend ihrer Funktionen (pro-, anti- und gemischt pro-/anti-inflammatorische Zytokine).

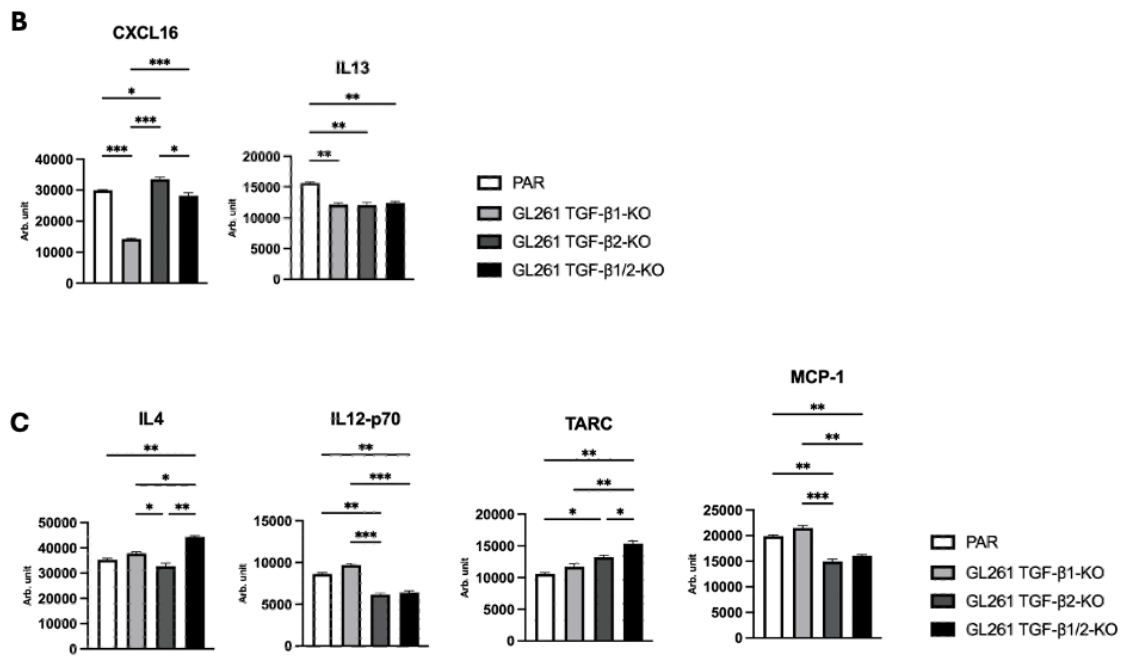
In TGF- $\beta$ 1 in GL-261-Zellen ist die Sekretion eines Großteils der proinflammatorischen Zytokine signifikant reduziert (CD30, CD40, CTACK, Eotaxin, G-CSF, INF-gamma, IL1-beta, IL2, IL3, IL6, Leptin, LIX, L-Selectin, MIP-2, MIP-3-alpha, PF4 und RANTES; Abb. 19 A). In TGF- $\beta$ -KO-Zellen sind, im Vergleich zu parentalen Zellen, vor allem die Überstands-Konzentration von CD40, IL3 und IL6 drastisch vermindert bis hin zum fehlenden Nachweis dieser Zytokine. Konträr werden einige Zytokine in TGF- $\beta$ 1-KO-Zellen vermehrt sezerniert (Eotaxin, Fas-Ligand und SDF-1-alpha). In TGF- $\beta$ 2-KO-Zellen ist eine signifikant verminderte Sekretion von CD30, CD40, Eotaxin 2, Fas-Ligand, G-CSF, GM-CSF, INF-gamma, IL1-beta, IL2, IL3, IL6, Lymphotactin, MIP-1-gamma, MIP-2, MIP-3-alpha, M-CSF, und SDF-1-alpha erkennbar. Eine drastische Reduktion bis hin zur Reduktion der Sekretion bis unterhalb der Nachweisgrenze ist für CD30, CD40, Fas-Ligand, G-CSF, INF-gamma, IL1-beta, IL3 und IL6 gezeigt. Eine erhöhte Sekretion wurde hingegen für Eotaxin, LIX und RANTES beobachtet. Eine Steigerung der Zytokinsekretion in TGF- $\beta$ 2-KO-Zellen, im Vergleich zu TGF- $\beta$ 1-KO-Zellen, wurde für CD30, G-CSF, INF-gamma und M-CSF gezeigt. In TGF- $\beta$ 1/2-Doppel-KO-Zellen ist die Konzentration nahezu aller im Array nachweisbaren Zytokine reduziert, hier lässt sich ein additiver Effekt bei INF-gamma, IL6, Leptin, MIP-1-alpha, MIP-3-alpha und TNF-alpha erkennen (Abbildung 19 A).

Für anti-inflammatorische Zytokine (Abb. 19 B), ist kein vergleichbar klares Bild erkennbar. Für gemischt anti-/proinflammatorisch aktive Zytokine (Abb. 19 C) ist in TGF- $\beta$ 1/2-KO-Zellen die Konzentration für IL4 und TARC signifikant erhöht und für IL12-p70 und MCP-1 reduziert. Ein Effekt in TGF- $\beta$ 1-KO-Zellen lässt sich bei diesen Zytokinen nicht nachweisen. In TGF- $\beta$ 2-KO-Zellen ist eine signifikante Änderung für IL12-p70, TARC (vermehrte Sekretion) und MCP-1 erkennbar.

**A**





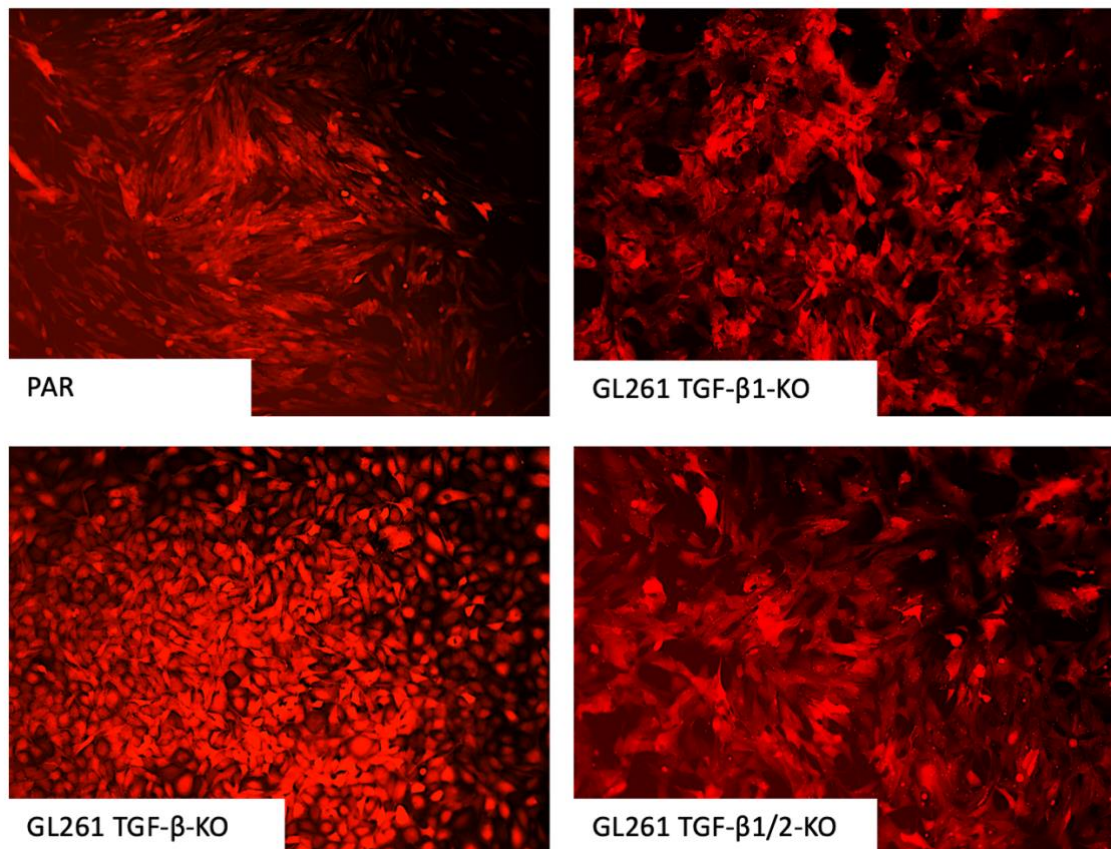


**Abbildung 19: Sekretion von Zytokinen, die Effekte auf den inflammatorischen Prozess bewirken können**

Dargestellt sind Zytokine, deren Sekretion in TGF-β-KO GL-261-Zellen, im Vergleich zu parentalen Zellen, signifikant verändert ist und die Einfluss auf inflammatorische Prozesse und das Immunsystem aufweisen. Es erfolgte eine Aufteilung in pro- (A), anti- (B) und gemischt pro-/anti-inflammatorische (C) Zytokine. Überstände wurden pro Zelllinie jeweils einmal gewonnen, Messungen der Zytokinkonzentration erfolgten mehrfach (technische Replikate). Der Background wurde subtrahiert. Werte unter 500 arb. units (arbitrary units) gelten als äußerst niedrig und nahe der Detektionsgrenze des Zytokin-Arrays. (n=4, SEM, One-Way ANOVA mit Posthoc Tukey-Test, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001)

### 3.3 Lentivirales Labeling der TGF- $\beta$ Knockouts

Durch lentivirale Transduktion mit LV-mCherry wurden gecrisperte und parentale GL261-Zellen derart genetisch modifiziert, dass nach Transduktion das mCherry Protein in diesen Zellen exprimiert wird. Abbildung 16 zeigt exemplarisch je eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der transduzierten Zellen. Bildmorphologisch erkennbar ist eine nahezu 100-prozentige Transduktionseffizienz. Die derart hergestellten Zelllinien (GL261-mCherry, GL261-TGF- $\beta$ 1-KO<sup>mCherry</sup>, GL261-TGF- $\beta$ 2-KO<sup>mCherry</sup> und GL261-TGF- $\beta$ 1/2-Doppel-KO<sup>mCherry</sup>) wurden in folgenden Experimenten in einer weiteren medizinischen Doktorarbeit für in vivo Experimente verwendet, deren Ergebnisse mittlerweile publiziert wurden.



**Abbildung 20: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mCherry-positiver Zellen**

Dargestellt sind die LV-mCherry transduzierten GL261-Zellen. Aufgenommen wurden die Bilder mit dem Axioscope 5-Mikroskop (10-fache Vergrößerung). Es wurde eine nahezu 100-prozentige Transduktionseffizienz erreicht.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob und in welchem Grad ein CRISPR-Cas9 induzierter TGF- $\beta$ -Knockout in murinen GL261-Gliomzellen Auswirkungen auf Proliferation, Migration, Invasion und das Zytokinexpressionsprofil hat. Dies geschieht vor allem in Hinblick auf die Unterschiede der so generierten Knockout-Zelllinien für TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 1/2.

EMT-Prozesse, welche maßgeblich von TGF- $\beta$  induziert werden, tragen zum malignen Verhalten von Gliomen bei (Hao et al., 2019). Gleiches gilt für die im ausgeprägte Tumervaskularisierung im GBM, wodurch sich dysmorphe Gefäßstrukturen bilden und eine Destruktion der BHS stattfindet (Hahn et al., 2019, Merk et al., 2024). In der zu Beginn der Arbeit formulierten Hypothese wird postuliert, dass das maligne Verhalten von GBM-Zellen in-vitro durch den Knockout von TGF- $\beta$  einerseits reduziert wird und andererseits das spezifische Zytokinexpressionsprofil, welches maßgeblich an den malignen Eigenschaften des GBM beteiligt ist, hin zu einem weniger tumorfördernden Phänotyp verschoben wird.

### 4.1 Der Knockout von TGF- $\beta$ hat einen positiven Effekt auf das maligne Verhalten von GBM-Zellen

#### 4.1.1 Ein TGF- $\beta$ -KO reduziert die Proliferation im GBM in-vitro

Der Knockout von TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 sowie der Doppelknockout beider Zytokine zeigen, dass die Proliferationsrate in murinen GL-261 Zellen deutlich verringert wird (Abb. 12A). Der größte Effekt hinsichtlich Reduktion der Proliferationsrate wird bei den TGF- $\beta$ 1/2-Doppel-KO-Zellen beobachtet, wobei eine Verdopplungszeit von 85,6 h vs. 46,2 h in parentalen Zellen nachweisbar ist. In mehreren Studien (Ferrer et al., 2018, Iavarone and Massague, 1997) konnte dabei belegt werden, dass die Signalwirkung dieser Zytokine eine imminente Rolle im Rahmen proliferativer Prozesse einnimmt. Eine hinreichende Differenzierung zwischen TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 im GBM findet in der Literatur

bezüglich ihrer jeweiligen Wirkung auf die Proliferation jedoch nicht hinreichend statt (Golan-Cancela and Caja, 2024). Beide Zytokine sind Isoformen und binden an die gleichen Rezeptoren, jedoch mit unterschiedlicher Affinität und daraus resultierender Wirkung und finden sich auf verschiedenen Genloci (Lavery et al., 2009). Unsere Daten belegen, dass es einen signifikanten Unterschied zwischen dem Knockout von TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 in GL-261 Zellen hinsichtlich des Einflusses auf die Proliferation gibt, wobei die Proliferationsrate von TGF- $\beta$ 2-KO-Zellen signifikant niedriger ist als die von TGF- $\beta$ 1-KO Zellen. Dies könnte durch eine höhere Affinität und Wirkung von TGF- $\beta$ 2 an den T $\beta$ R und der nachfolgenden Signalkaskade erklärt werden, bleibt jedoch eine „Black-Box“ aufgrund der hohen Komplexität der Signalwirkung der jeweiligen Zytokine (Tzavlaki and Moustakas, 2020). Ein additiver Effekt des TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2-KO ist anzunehmen, da die Verdopplungszeit bei diesen Zellen am höchsten und die Proliferationsrate am niedrigsten ist.

Verschiedene Limitationen des Kristallviolett-Assays sind im Rahmen der Interpretation der Ergebnisse zu beachten. Zu diesen zählt das Fehlen der kontinuierlichen Überwachung der Zellproliferation im Laufe der Zeit, wodurch dynamische Veränderungen in der Proliferationsrate übersehen werden können. Des Weiteren verfügt der Kristallviolett-Assay über eine begrenzte Sensitivität, da bei ihr niedrige Proliferationsraten nicht ausreichend erfasst werden können.

#### **4.1.2 Knockout von TGF- $\beta$ reduziert die Motilität im GBM in-vitro**

Die Motilität, zu der Migration und Invasion zählen, ist ein zentraler Bestandteil im Ausbreitungsverhalten des GBMs (Armento et al., 2017). TGF- $\beta$  bildet dabei einen von vielen Schlüsselfaktoren, der die Migration und Invasion von GBM-Zellen vorantreibt (Joseph et al., 2014, Platten et al., 2001, Weller et al., 2001, Platten et al., 2000). Neueste wissenschaftliche Arbeiten zeigen, dass TGF- $\beta$  an der Ausbildung von „Tumor-Microtubes“ beteiligt ist, welche nicht nur das lokale Ausbreitungsverhalten vom GBM stützen, sondern auch als Erklärungsmodell für solitäre Satellitenherde dienen (Joseph et al., 2022).

In dieser Arbeit wurde mittels des Transwell-Migration-Assays (Abbildung 13 A) und des Wundheilungs-/Scratch-Assays (Abbildung 14 B) gezeigt, dass sowohl der Knockout von TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 als auch der Doppelknockout beider Zytokine zu einer signifikanten Reduktion der Zellmotilität führt. Hierbei konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen dem TGF- $\beta$ 1- und TGF- $\beta$ 2-KO festgestellt werden. Sowohl TGF- $\beta$ 1 als auch TGF- $\beta$ 2 sind an migratorischen Prozessen beteiligt, wobei eine Gewichtung der Zytokine und ihr jeweiliger Beitrag in der Literatur nicht differenziert wird. Beide Zytokine wirken promigratorisch, exemplarisch zum einen über die Hochregulation der  $\alpha$ v $\beta$ 3 Integrin-Expression (Platten et al., 2000), jedoch auch über weitere Signalkaskaden. Hierzu zählen für TGF- $\beta$ 1 beispielsweise die Expression-Induktion der MMPs ADAM17 und ADAMTS-1 (Lu et al., 2011) und für TGF- $\beta$ 2 die Aktivierung der Aktin-Polymerisation und des PI3K/Akt-Signalweges über die TGF- $\beta$ -Signaltransferproteine Smad 2 und 3 (Huang et al., 2021). Dies könnte der Grund dafür sein, dass TGF- $\beta$ -Doppel-KO Zellen einen additiven Effekt in der Reduktion der Migration aufweisen. Nichtsdestotrotz ist eine detaillierte Aufschlüsselung der jeweiligen Effekte, die zur Reduktion geführt haben, in dieser Arbeit nicht möglich. Hierzu bedarf es weiterer Forschung. Ein limitierender Faktor beider Migrationsassays ist möglicherweise deren mangelnde physiologische Aussagekraft. Beim Transwell-Migration Assay ist die fehlende Dreidimensionalität der Zellstruktur zu erwähnen, da ein Zell-Monolayer physiologisch eher untypisch ist und somit ein verändertes Migrationsverhalten aufweisen könnte. Ebenso können dynamische Veränderungen im Zellverhalten möglicherweise nicht vollständig erfasst werden. Im Vergleich dazu ist bei dem Wundheilungs-/Scratch-Assay anzuführen, dass eine variable Größe des Scratches, aber auch die Beeinträchtigung der Zell-Zell-Interaktion durch Schädigung des Zell-Monolayers zu unerwünschten Effekten führen kann.

Das Invasionsverhalten der TGF- $\beta$ 1-, TGF- $\beta$ 2- und TGF- $\beta$ -Doppel-KO-Zellen zeigt ein ähnliches Bild wie ihr Migrationsverhalten (Abbildung 15 A). Ein signifikanter Unterscheid zwischen TGF- $\beta$ 1- und TGF- $\beta$ 2-KO-Zellen wurde nicht nachgewiesen. Dennoch ist das Invasionsverhalten dieser KO-Zellen reduziert. Am deutlichsten bei TGF- $\beta$ -Doppel-KO-Zellen. Unsere Daten sind somit konform

zu Arbeiten der Arbeitsgruppe um (Joseph et al., 2022), bei der die Inhibition von TGF- $\beta$ 1 zu einer verminderten Invasion durch verminderte Bildung von „Tumor-Microtubes“ führte. Im Einklang mit diesen Ergebnissen ist auch eine Veröffentlichung von Corbet et al., bei der die Inhibition von TGF- $\beta$ 2 über eine verminderte Lipidtropfenbildung in einer Reduktion der Invasion resultierte (Corbet et al., 2020). Der exakte Mechanismus, der zur Reduktion der Invasion in unserer Arbeit geführt hat, besteht sicherlich aus mehreren Bausteinen, die hier nicht näher aufgeschlüsselt werden konnten. Hierzu bedarf es ebenso weiterer Experimente. Erwähnenswert ist, dass neue Arbeiten zum Invasionsverhalten des GBM der Interaktion von Neuronen und Tumorzellen einen entscheidenden Stellenwert beimessen (Venkataramani et al., 2022), die hier in unserem Versuchsaufbau nicht näher untersucht wurde. TGF- $\beta$  nimmt dabei nachweislich eine Schlüsselrolle in der Ausbildung von Neuriten ein und könnte somit maßgeblich an der Interaktion von Neuronen mit Tumorzellen beteiligt sein (Knoferle et al., 2010). Zu den Limitationen des hier verwendeten Invasionsassays zählen zum einen, dass die Interaktion von GBM-Zellen mit der ECM oder die Reaktion auf chemische Signale nicht erfasst werden, denn in vivo beruht Invasion grundsätzlich auf einem Zusammenspiel mehrerer Zelltypen und deren Interaktion untereinander. Somit lässt sich die physiologische Invasionsfähigkeit nicht genau abbilden, sondern nur annähernd bestimmen. Zum anderen könnte die begrenzte Beobachtungszeit, vor allem der TGF- $\beta$ -Doppel-KO Zellen, bei welchen eine stark reduzierte Invasion nachgewiesen wurde, durch nicht lineare Effekte auf die Invasion bedingt sein.

## **4.2 Der Knockout von TGF- $\beta$ beeinflusst die Zytokinexpression von GBM-Zellen**

### **4.2.1 In GBM-Zellen hat die TGF- $\beta$ -KO-vermittelte veränderte Zytokinexpression einen negativen Einfluss auf Zellproliferation**

Wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, weist TGF- $\beta$  eine zentrale Rolle in der Regulation der Proliferation auf. Insbesondere die Korrelation zwischen den TGF- $\beta$ -KOs und der Alteration der Zytokinsekretion verdeutlicht den Einfluss auf das Tumormikromilieu und die Modulation der Zytokinlandschaft.

Die beobachtete starke Verminderung der Sekretion von CTACK, CXCL16, Eotaxin, G-CSF, IL1-beta, IL6, IL13, Leptin und LIX in TGF- $\beta$ 1-KO-Zellen (bei einer Reduktion von über 50 % für CXCL16, Eotaxin, G-CSF, IL1-beta und IL6) zeigt, dass TGF- $\beta$ 1 als wichtiger Regulator dieser Zytokine fungiert (Abb. 16). Diese Ergebnisse stimmen überein mit Befunden von Liu (Liu et al., 2021) bei denen nachgewiesen wurde, dass IL-6 über nicht-kanonische Signalwege von TGF- $\beta$ 1 induziert wird und somit maßgeblich zur Proliferation in Gliomzellen beiträgt (Liu et al., 2010). Obwohl TGF- $\beta$ 1 in gesunden Zellen eine inhibitorische Wirkung auf die IL1-beta Ausschüttung hat, kommt es in bestimmten zellulären Kontexten, besonders im Tumormikromilieu, paradoxerweise zu einer Steigerung der IL1-beta Expression (Rustenhoven et al., 2016). Hier sehen wir ebenfalls eine Übereinstimmung bei vermindertem IL1-beta Nachweis in Gliomzellen (Abb.16.) Bezüglich des Zytokins CXCL-16 kann TGF- $\beta$ 1 je nach Kontext sowohl dessen Expression hemmen als auch fördern. Im Tumormikromilieu kann TGF- $\beta$ 1 jedoch, vor allem über nicht-kanonische Signalwege, die CXCL16-Produktion steigern, was in der Rekrutierung von Immunzellen und Steigerung der Proliferation resultiert (Lepore et al., 2018). Dies verdeutlicht die komplexe Rolle von TGF- $\beta$ 1 bei der Regulation von CXCL16 und der damit verbundenen Immunmodulation und Tumorprogression. Unsere Ergebnisse stehen somit im Einklang mit den Befunden anderer Forschungsgruppen. Bei GCSF besteht eine schlechte Datenlage bezüglich dessen Induktion durch TGF- $\beta$ 1. Jedoch bestätigen frühere Studien die proliferationsfördernde Wirkung von GCSF in

Gliomzellen (Wang et al., 2012). Unsere Arbeit zeigt in GBM-Zellen eine direkte Verbindung von TGF- $\beta$ 1 auf die Sekretion von G-CSF. Daraus resultierende Effekte bedürfen jedoch weitere funktionelle Experimente.

Die Analyse von TGF- $\beta$ 2-KO-Zellen hinsichtlich Zytokinsekretion zeigte ebenfalls eine Abnahme der Sekretion von G-CSF, IL1-beta, IL6, SDF-1-alpha und TNF-alpha hin (Abb.16). Die Tatsache, dass G-CSF und TNF-alpha in TGF- $\beta$ 2-KO-Zellen stärker reduziert sind als in TGF- $\beta$ 1-KO-Zellen, deutet auf eine differenzierte Funktion der beiden TGF- $\beta$ -Isoformen in der Zytokinregulation hin (Abb.16) TNF-alpha wird einerseits von TGF- $\beta$  induziert, induziert aber auch umgekehrt die Expression von TGF- $\beta$  (de Souza Dantas Oliveira et al., 2014). TGF- $\beta$ 2 scheint dabei einen deutlich größeren Einfluss zu haben. Die Arbeitsgruppe von Zhu (Zhu et al., 2022) zeigte, dass TNF-alpha deutlich zum proliferativen Verhalten in Gliomzellen beiträgt. Signifikanz wurde in unserer Arbeit jedoch erst in Zellen mit kombiniertem TGF- $\beta$ 1/2-KO nachgewiesen, wobei unsere Ergebnisse auf einen additiven Effekt hinweisen. Der Unterschied in den Zytokinexpressionsprofilen weist dabei auf unterschiedliche Signalwege oder spezifische zelluläre Kontexte hin, die durch TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 unterschiedlich moduliert werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Literatur, die TGF- $\beta$  als vielseitigen Mediator beschreibt, der durch seine Isoformen verschiedene Funktionen ausüben kann (Golan-Cancela and Caja, 2024).

Besonders hervorzuheben ist der beobachtete additive Effekt in TGF- $\beta$ 1/2-Doppel-KO-GL261-Zellen, der zu einer weiter verstärkerten Reduktion der Zytokinsekretion von IL6, Leptin, P-Selectin, SDF-1-alpha und TNF-alpha führt. Dies deutet darauf hin, dass beide Isoformen von TGF- $\beta$  gemeinsam an der Regulierung dieser Zytokine beteiligt sind, was die komplexen Wechselwirkungen zwischen TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 im Tumor-Mikromilieu unterstreicht.

Eine unerwartete Beobachtung war, dass die Zytokinsekretion von G-CSF und IL1-beta in den TGF- $\beta$ -Doppel-KO-Zellen weniger stark reduziert war als in den TGF- $\beta$ 1- oder TGF- $\beta$ 2-KO-Zellen. Dies steht im Widerspruch zu der Annahme eines additiven Effekts in TGF- $\beta$ -Doppel-KO-Zellen und könnte auf eine mögliche

kompensatorische Regulation durch andere Signalwege hinweisen, die bei der gleichzeitigen Inhibition beider Isoformen aktiviert werden. Alternativ könnte eine Feedback-Schleife innerhalb der Zytokin-Netzwerke vorliegen, die in den TGF- $\beta$ -Doppel-KO-Zellen zur teilweisen Aufrechterhaltung der Sekretion dieser Zytokine führt. Insgesamt unterstreichen diese Ergebnisse die Komplexität der TGF- $\beta$ -vermittelten Zytokinregulation und legen nahe, dass beide Isoformen in spezifischen und teilweise überschneidenden Signalwegen involviert sind. Die differenziellen Effekte zwischen den einzelnen TGF- $\beta$ -KO-Zellen heben die Notwendigkeit hervor, die spezifischen Rollen von TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 weiter zu untersuchen. Zukünftige Studien sollten sich darauf konzentrieren, die zugrunde liegenden Mechanismen dieser Kompensations- oder Feedback-Prozesse aufzuklären, um das Zusammenspiel der verschiedenen TGF- $\beta$ -abhängigen Signalwege besser zu verstehen.

#### ***4.2.2 In GBM-Zellen hat die TGF- $\beta$ -KO-vermittelte veränderte Zytokinexpression einen negativen Einfluss auf Zytokine, die die Gefäßarchitektur modulieren***

Weitere Resultate unserer Studie zeigen, dass TGF- $\beta$  eine zentrale Rolle in der Regulation der Gefäßstruktur im GBM aufweist (Merk et al., 2024). In der Angiogenese spielen angiogenese-modulierende Zytokine eine essentielle Rolle. Deren Dysregulation ist maßgeblich für die aberrante Gefäßarchitektur im GBM verantwortlich. In TGF- $\beta$ 1-KO-Zellen wurde eine signifikant verminderte Sekretion proangiogener Zytokine wie Eotaxin, IL1-beta, Leptin, LIX, MIP-3-alpha, V-CAM und VEGF-A beobachtet (Abb. 18). Diese Zytokine sind an der Förderung der Angiogenese beteiligt und tragen durch ihre Sekretion zur Ausbildung des charakteristischen vaskulären Phänotyps des GBM bei (Plate et al., 1994, Breier et al., 2002, Ferla et al., 2011, Tseng et al., 2011). Auffällig ist jedoch, dass bestimmte proangiogene Faktoren wie AXL und SDF-1-alpha in TGF- $\beta$ 1-KO-Zellen verstärkt sezerniert wurden (Abb. 18). Dies deutet darauf hin, dass die Hemmung von TGF- $\beta$ 1 möglicherweise kompensatorische Mechanismen aktiviert, um die Angiogenese im GBM aufrechtzuerhalten.

Ein ähnliches Muster wurde in TGF- $\beta$ 2-KO-Zellen beobachtet, insbesondere für IL1-beta, M-CSF, MIP-3-alpha, SDF-1-alpha und VEGF-A (Abb. 18). Bemerkenswert ist, dass VEGF-A in den TGF- $\beta$ 2-KO-Zellen im Vergleich zu TGF- $\beta$ 1-KO-Zellen signifikant stärker reduziert ist, was auf eine differenzierte Rolle der beiden TGF- $\beta$ -Isoformen in der Regulation von VEGF-A hindeutet. VEGF-A, ein Schlüsselzytokin der Angiogenese, spielt eine zentrale Rolle bei der Induktion der Gefäßneubildung im Tumorgewebe. Die starke Reduktion von VEGF-A in TGF- $\beta$ 2-KO-Zellen weist darauf hin, dass TGF- $\beta$ 2 eine besonders wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung der VEGF-A-Sekretion und damit der Tumorangio-genese einnimmt, wobei diese Ergebnisse mit den Befunden von Hardee (Hardee and Zagzag, 2012) und Marsden (Das and Marsden, 2013) übereinstimmen. Diese Autoren postulieren, dass sowohl TGF- $\beta$ 1 als auch TGF- $\beta$ 2 die Expression von VEGF-A in Gliomen fördern, wobei TGF- $\beta$ 2 in der Regel als stärkerer Regulator gilt, besonders in hochgradigen Tumoren. Dies würde auch die Unterschiede in der Zytokinexpression in den TGF- $\beta$ -Doppel-KO-Zellen erklären.

TGF- $\beta$ 1/2-Doppel-KO-Zellen zeigten hinsichtlich der Expression angiogener Zytokine einen additiven Effekt, resultierend in einer weiter verstärkten Herabregulation der Sekretion von IL1-beta, Leptin, M-CSF, MIP-3-alpha, SCF, SDF-1-alpha, V-CAM und VEGF-A. Besonders eindrucksvoll ist die fast neunfache Reduktion von VEGF-A. Dies unterstreicht die Bedeutung beider TGF- $\beta$ -Isoformen für die Angiogenese im GBM (Abb. 18).

Interessanterweise ist im Gegensatz zu den anderen Zytokinen die Konzentration des sTNF R1 in TGF- $\beta$ 1/2-Doppel-KO-Zellen signifikant erhöht. Dies könnte auf einen kompensatorischen Mechanismus hindeuten, der durch die Hemmung der TGF- $\beta$ -Signalwege aktiviert wird, um proinflammatorische und möglicherweise proangiogene Effekte über den TNF-Signalweg zu verstärken. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen zeigt eine Arbeit von Ahluwalia (Ahluwalia et al., 2017) eine erhöhte Konzentration von sTNF R1 in Gliomrezidiven. Dabei ist es möglich, dass methodische Unterschiede zu den abweichenden Ergebnissen geführt haben, da in deren Arbeit keine TGF- $\beta$  Quantifizierung stattgefunden hat.

Insgesamt zeigen unsere Ergebnisse die komplexe Rolle von TGF- $\beta$  bei der Regulation der Angiogenese im GBM und verdeutlichen indirekt, dass sowohl TGF- $\beta$ 1 als auch TGF- $\beta$ 2 gemeinsam zu angio-pathologischen Prozessen beitragen. In der 2024 publizierten Arbeit sahen wir hierbei einen klaren Zusammenhang zwischen dem KO von TGF- $\beta$  und einer partiellen Wiederherstellung der aberranten Gefäßarchitektur im experimentellen GBM (Merk et al., 2024). Dies deutet darauf hin, dass die TGF- $\beta$ -KO-vermittelte, in dieser Arbeit beschriebene negative Beeinflussung von proangiogenen Zytokinen von zentraler Bedeutung ist.

#### **4.2.3 Die veränderte Zytokinexpression reduziert die Motilität in GBM-Zellen**

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Motilität von GL-261-Zellen maßgeblich durch einen KO von TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 beeinflusst wird (Abb. 13, Abb. 14, Abb. 15). Die in Abbildung 17 dargestellten Zytokinexpressionsprofile unterstreichen hierbei die Schlüsselrolle von TGF- $\beta$  in der Regulation Motilitäts-hemmender und -fördernder Zytokine und identifizieren zusätzlich Zytokine, die Zellmigration und -invasion modulieren.

In TGF- $\beta$ 1-KO-Zellen war die Sekretion der Zytokine CTACK, Eotaxin, G-CSF, IL6, Leptin, LIX und RANTES signifikant reduziert. Diese Zytokine sind für ihre motilitäts- und invasionsfördernden Eigenschaften bekannt (Kast et al., 2017, Liu et al., 2010, Korbecki et al., 2020, Ferla et al., 2011). Beispielsweise tragen IL-6 und G-CSF in verschiedenen Tumormodellen zur Erhöhung der Zellmotilität und Invasion bei, insbesondere durch Induktion von EMT-Prozessen und einer Rekrutierung von Tumor-assoziierten Immunzellen, die die Tumorzellmigration unterstützen (Kast et al., 2017, Singh et al., 2022). Die beobachtete Reduktion dieser Zytokine in TGF- $\beta$ 1-KO-Zellen deutet darauf hin, dass TGF- $\beta$ 1 als zentraler Regulator dieser pro-invasiven Faktoren fungiert. Die Ausschaltung von TGF- $\beta$ 1 reduziert somit die Invasivität von Tumorzellen. Interessanterweise zeigte sich keine signifikante Steigerung der Sekretion von

motilitätshemmenden Zytokinen, was auf eine unidirektionale Rolle von TGF- $\beta$ 1 in der Förderung der Zellbewegung hinweist.

In TGF- $\beta$ 2-KO-Zellen zeigte sich signifikante Reduktion der G-CSF- und IL-6-Sekretion, was auf eine ähnliche Rolle von TGF- $\beta$ 2 wie TGF- $\beta$ 1 hinweist (Abb. 17). Gleichzeitig wurde jedoch eine erhöhte Sekretion von IGFBP-6 und TIMP-1 beobachtet, die als Motilitätsinhibitoren gelten und den Zellbewegungs- und Invasionsprozess hemmen (Bei et al., 2017, Ries, 2014). Neueste Studien von Xu (Xu et al., 2024) zeigen jedoch, dass z.B. TIMP-1 in Gliomen eine vermehrte Migration und Invasion bedingen könnte. Dies deckt sich mit unseren Ergebnissen, wobei die dedizierte Wirkung von TIMP-1 in zukünftigen Experimenten näher untersucht werden sollte. Unsere Resultate deuten darauf hin, dass TGF- $\beta$ 2 möglicherweise eine spezifischere Rolle in der Modulation der Migration und Invasion hat als TGF- $\beta$ 1, indem es die Expression oder Sekretion sowohl motilitätsfördernder als auch -hemmender Zytokine reguliert. Die erhöhte Sekretion von CXCL16, Eotaxin, LIX und RANTES in TGF- $\beta$ 2-KO-Zellen, trotz deren bekannter pro-invasiver Eigenschaften, ist bemerkenswert und könnte auf kompensatorische Mechanismen hindeuten, durch die die Zellen versuchen, den Verlust von TGF- $\beta$ 2 auszugleichen.

Ein additiver Effekt wurde in den TGF- $\beta$ 1/2-Doppel-KO-Zellen für IL6, IGFBP-6 und TIMP-1 beobachtet, was eine verstärkte Hemmung der Migration und Invasion impliziert (Abb.17). Die signifikante Reduktion von Leptin, IL6 und TNF-alpha in den Doppel-KO-Zellen unterstreicht die komplementäre Funktion von TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 in der Regulation der Zytokinexpression oder -sekretion, insbesondere im Hinblick auf die Förderung von Zellmotilität und -invasion. Interessanterweise war die Sekretion von RANTES in TGF- $\beta$ 2-KO-Zellen signifikant erhöht, während sie in TGF- $\beta$ 1-KO-Zellen stark vermindert war (Abb.17). RANTES ist bekannt für seine Rolle in der Rekrutierung von Immunzellen in das Tumormikromilieu und kann proinflammatorische als auch proinvasive Effekte fördern (Novak et al., 2020, Kranjc et al., 2019). Unsere Ergebnisse deuten auf eine differenzierte Regulation hin, bei der TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 unterschiedliche, möglicherweise sogar gegensätzliche Wirkungen auf die Modulation von Zytokinen wie RANTES haben. Diese Beobachtung deutet

auf eine spezifische Funktion von TGF- $\beta$ 2 in der Steuerung der Tumorinvasion durch proinflammatorische Zytokine hin, während TGF- $\beta$ 1 möglicherweise eine hemmende Wirkung auf RANTES in diesem Zellmodell ausübt.

Der paradoxe Anstieg der G-CSF-Sekretion in den TGF- $\beta$ 1/2-Doppel-Knockout-Zellen im Vergleich zu den Einzel-KOs weist auf komplexe Feedback-Mechanismen hin, die die Zellen aktivieren, um den Verlust beider TGF- $\beta$ -Isoformen zu kompensieren. Die genaue Entschlüsselung dieser Mechanismen erfordert jedoch weitere Untersuchungen, um die zugrunde liegenden molekularen Prozesse besser zu verstehen. Studien zu einem KO beider TGF- $\beta$ -Isoformen sind in der Literatur kaum vorhanden, wodurch die hier vorliegende Arbeit einen Ansatz für weitere Untersuchungen im Bereich der GBM-Forschung bietet.

#### **4.2.4 In GBM -Zellen reduziert der KO von TGF- $\beta$ die Sekretion inflammatorischer und immunevasiver Zytokine**

Unsere Ergebnisse zeigen, dass der KO von TGF- $\beta$  in GL-261-Zellen die Sekretion von Zytokinen, die das inflammatorische Geschehen und das Immunsystem beeinflussen, stark moduliert. In den TGF- $\beta$ 1-KO-Zellen ist die Sekretion der meisten proinflammatorischen Zytokine signifikant reduziert (Abb. 19). CD30, CD40, G-CSF, IL1-beta, IL6 und INF-gamma, die im Tumormikromilieu eine wichtige Rolle bei der Regulation der Immunzellantwort spielen (Yeo et al., 2021, Codrici et al., 2022), zeigen in diesen Zellen eine Abnahme bis hin zur vollständigen Abwesenheit und verdeutlichen, dass TGF- $\beta$ 1 ein zentraler Regulator anti-inflammatorischer Signalwege in Tumorzellen ist. Die stark reduzierte Sekretion von IL6, IL1-beta und INF-gamma, welche kontextabhängig zur Hemmung von Immunzellen beitragen (Scheller et al., 2011, Jorgovanovic et al., 2020, Kiss et al., 2021), deutet auf eine verstärkte Immunantwort im Tumormikromilieu hin. Dies muss jedoch in weiteren funktionellen Experimenten validiert werden.

Interessanterweise war die Sekretion einiger Zytokine wie Eotaxin, Fas-Ligand und SDF-1-alpha, in TGF- $\beta$ 1-KO-Zellen erhöht (Abb. 19). Diese Zytokine sind

teilweise für die Zellmigration und das Überleben von Tumorzellen von Bedeutung (Di Nunno et al., 2023, Korbecki et al., 2020, Tian et al., 2016) was darauf hinweisen könnte, dass Tumorzellen kompensatorische Mechanismen aktivieren, um trotz des KOs von TGF- $\beta$ 1 ihre Aggressivität aufrechtzuerhalten. Besonders der Fas-Ligand spielt eine Rolle bei der Apoptose-induzierten Immunmodulation (Zhang et al., 2022), was darauf hindeuten könnte, dass diese Zellen Apoptose-resistente Eigenschaften fördern.

TGF- $\beta$ 2-KO-Zellen zeigten ebenfalls eine signifikante Reduktion der Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie G-CSF, IL6, INF-gamma und M-CSF (Abb. 19). Dies spiegelt die Effekte des TGF- $\beta$ 1-KOs wider; somit spielt TGF- $\beta$ 2 eine ähnliche Rolle bei der Regulation proinflammatorischer Zytokine wie TGF- $\beta$ 1. Eine besondere Bedeutung erhält die Beobachtung, dass in den TGF- $\beta$ 2-KO-Zellen auch anti-inflammatorische Zytokine wie Fas-Ligand und SDF-1-alpha reduziert sind, was darauf hinweist, dass TGF- $\beta$ 2 ebenfalls eine Rolle bei der Modulation von immunhemmenden Mechanismen spielt.

Ein entscheidender Befund ist der beobachtete additive Effekt in TGF- $\beta$ 1/2-Doppel-KO-Zellen. Hier zeigte sich eine nahezu vollständige Reduktion der Sekretion insbesondere für INF-gamma, IL6, MIP-1-alpha und TNF-alpha, was auf eine komplementäre Funktion von TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 in der Regulation von Entzündungsreaktionen hindeutet. Diese Doppelregulation verdeutlicht, dass TGF- $\beta$  als ein Mediator der Tumor-Immunevasion fungiert, wobei die entzündliche Reaktion gedämpft wird und zur Immunevasion beiträgt (Golan-Cancela and Caja, 2024)

Für anti-inflammatorische Zytokine ist das Bild weniger klar. Es zeigt sich keine kohärente Änderung in deren Sekretion, was darauf hindeutet, dass TGF- $\beta$  möglicherweise eine stärkere Rolle bei der Regulation proinflammatorischer als anti-inflammatorischer Zytokine spielt. In TGF- $\beta$ 1/2-KO-Zellen wurden jedoch signifikante Änderungen bei Zytokinen mit gemischt pro- und anti-inflammatorischen Funktionen beobachtet, wie eine erhöhte Sekretion von IL4 und TARC, während IL12-p70 und MCP-1 reduziert waren. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass TGF- $\beta$  über verschiedene Signalwege differenzierte

Effekte auf Zytokine mit gemischten Funktionen ausübt. Diese Beobachtung reflektiert die Übersichtsarbeiten von Goran Cancela und Seoane (Golan-Cancela and Caja, 2024, Seoane and Gomis, 2017)

Insgesamt verdeutlichen diese Ergebnisse die komplexe Rolle von TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 in der Regulierung des inflammatorischen Geschehens und der Immunmodulation in GBM-Zellen. TGF- $\beta$  wird somit eine Schlüsselrolle in der Balance pro- und anti-inflammatorischer Zytokine zugewiesen. Wir konnten zeigen, dass im GBM der KO von TGF- $\beta$  die Zytokinlandschaft in deutlichem Maße hin zu einer anti-tumoralen Umgebung verändert. Ob dann schlussendlich Immunevasion und Inflammation im selben Maße moduliert werden, müssen weitere Arbeiten in diesem Bereich zeigen.

#### **4.2.5 Limitationen der Zytokinarrays**

Zytokinarrays sind ein wertvolles Instrument zur Analyse des Zytokinexpressionsprofils, unterliegen jedoch mehreren Einschränkungen, die sowohl technischer als auch biologischer Natur sind und die Interpretation der Ergebnisse beeinflussen können. Eine der Hauptlimitationen liegt in der begrenzten Sensitivität des Verfahrens, insbesondere bei Zytokinen, die in geringen Konzentrationen exprimiert werden. Zytokine, die unterhalb der Nachweisgrenze des Arrays liegen, können dadurch möglicherweise nicht detektiert werden, was zu einer Unterschätzung oder einem vollständigen Übersehen ihrer biologischen Relevanz führt. Zudem liefern Zytokinarrays lediglich quantitative Informationen über die Proteinmenge und bieten keine Erkenntnisse über die biologisch aktive Form der Zytokine. Da viele Zytokine posttranslationalen Modifikationen unterliegen, die ihre Funktion maßgeblich beeinflussen, bleiben diese Modifikationen durch die Array-Technologie unberücksichtigt.

Auch wenn Zytokinarrays Veränderungen in der Proteinexpression aufzeigen, ermöglichen sie keine kausalen Rückschlüsse darauf, ob ein bestimmtes Zytokin für die Modulation von Prozessen wie Proliferation, Migration, Invasion, Immunevasion oder Inflammation verantwortlich ist. Um solche funktionellen

Zusammenhänge zu validieren, sind ergänzende funktionelle Experimente erforderlich. Insbesondere bei komplexen zellulären Prozessen wie Migration, Invasion und Inflammation bleibt die Untersuchung von Zell-Zell-Interaktionen unberücksichtigt, obwohl diese in der Tumorumgebung eine wesentliche Rolle spielen. Die pleiotrope Natur vieler Zytokine, die mehrere biologische Prozesse gleichzeitig beeinflussen können, erschwert zusätzlich die Zuweisung eines spezifischen Effekts zu einzelnen Zytokinen, auch wenn gewisse Trends erkennbar sein können.

Ein weiteres technisches Manko der Zytokinarray-Technologie ist die mangelnde Fähigkeit, zeitliche Dynamiken in der Zytokinsekretion abzubilden. Dies führt dazu, dass kritische, zeitabhängige Veränderungen in der Zytokinproduktion, die für die Regulation inflammatorischer und immunologischer Prozesse entscheidend sind, möglicherweise übersehen werden. Darüber hinaus finden viele inflammatorische Regulationsmechanismen auf der Ebene von Zytokinrezeptoren und Signaltransduktionswegen statt oder werden durch andere Mediatoren wie Lipidmediatoren und Chemokine beeinflusst, welche durch Zytokinarrays nicht erfasst werden.

Auch im Kontext der Immunevasion bleibt die Zytokinexpression nur ein indirekter Marker. Die Detektion eines immunsuppressiven Zytokins allein lässt keine eindeutigen Rückschlüsse auf die Effektivität der Immunevasion durch Tumorzellen zu, da diese Zytokine zwar vorhanden sein können, aber nicht zwangsläufig mit einer funktionellen Aktivierung immunsuppressiver Zellen, wie z.B. regulatorischer T-Zellen (Tregs), korrelieren. Schließlich bieten Zytokinarrays keine Informationen über die räumliche Verteilung der Zytokine im Tumorareal, obwohl diese Verteilung entscheidend sein kann, beispielsweise bei der Entstehung von Tumor-Nischen, der Infiltration von Immunzellen und der Interaktion mit der Mikroumgebung.

### **4.3 Klinische Relevanz für zukünftige Therapieansätze**

Trotz der in den vorigen Abschnitten genannten Limitationen geben unsere Ergebnisse Hinweise dafür, dass ein CRISPR-Cas9 induzierter KO von TGF- $\beta$ 1

als auch TGF- $\beta$ 2 und vor allem der TGF- $\beta$ -Doppel-KO zu einer signifikanten Reduktion des malignen Verhaltens von GBM-Zellen führt, zumindest in der in dieser Arbeit untersuchten Maus-GBM-Zelllinie GL-261. Ebenso zeigt in TGF- $\beta$ -KO-Zellen das Zytokinexpressionsprofil einen Shift hin zu einem weniger tumorfördernden Phänotyp mit verminderter Expression proliferations- und motilitätsfördernder sowie immunsuppressiver und proangiogener Zytokine. Da ein dysregulierter TGF- $\beta$ -Signalweg nicht nur beim GBM eine essenzielle Rolle im Rahmen der Pathogenese spielt, sondern auch bei anderen Tumorerkrankungen wie dem Kolon-, Prostata-, Lungen-, Brust- und dem Leberzellkarzinom (Baba et al., 2022, Hao et al., 2019, Villalba et al., 2017, Sheen et al., 2013), kommt TGF- $\beta$  als potenzieller therapeutischer Angriffspunkt dieser verschiedenen Tumorentitäten in Betracht. Dabei kamen sowohl in klinischen als auch präklinischen Studien bereits TGF- $\beta$  neutralisierende Therapien zum Einsatz, welche ebenfalls Gliomzellen beeinflussen.

Bezogen auf die oben genannten Tumorentitäten und das GBM scheint ein wesentliches Problem dieser Studien der richtige Zeitpunkt der therapeutischen Intervention zu sein. Da TGF- $\beta$  im frühen Krankheitsverlauf als Tumorsuppressor aktiv ist und im Progress tumorfördernd wirkt, ist die Applikation verschiedener Therapeutika hinsichtlich der Interventionsphase zu evaluieren (Baba et al., 2022). Ebenso ist fraglich, ob es ein therapeutisches Fenster gibt, welches, wenn es überschritten ist, dazu führt, dass besagte therapeutische Ansätze keinen hinreichenden Effekt mehr aufweisen. Im GBM wurden verschiedene Therapeutika getestet. Zu diesen zählen das Antisense-Oligonukleotid (AS-OGN) Trabedersen, welches vor allem gegen TGF- $\beta$ 2 gerichtet ist (Jaschinski et al., 2011, Bogdahn et al., 2011, Hau et al., 2009), der Tyrosin-Kinase Inhibitor (TKI) Galunisertib, welcher gegen den TGF- $\beta$  RI wirkt (Wick et al., 2020) und Fresolimumab, ein Antikörper gegen TGF- $\beta$ 1, 2 und 3 (Akhurst, 2017). Dabei konnte keiner der genannten Wirkstoffe im GBM eine ausreichende Wirkung zeigen, sodass es zukünftiger Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet bedarf. Begründet liegt dies höchstwahrscheinlich in der Heterogenität des GBM. Da selbst innerhalb eines einzelnen Tumors mehrere Zellpopulationen existieren, die auf die Blockade von TGF- $\beta$  unterschiedlich reagieren (Zhang et al., 2017) und

das Tumor-Mikromilieu, das aus verschiedenen Zelltypen besteht, dementsprechend beeinflusst wird, kann dies als Erklärungsansatz für die noch nicht ausreichende Wirkung der Blockade des TGF- $\beta$ -Signalwegs gewertet werden. Die Zukunft der pharmakologischen Gliomtherapie liegt dementsprechend in einer Kombinationstherapie mehrerer Therapeutika, bei der die Blockade von TGF- $\beta$ , Gefäßnormalisierung, Immuncheckpoint-Inhibition, OVT und Tumorstimmungsimpfung eine entscheidende Rolle spielen werden (Czarnywojtek et al., 2023).

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation wurde die Bedeutung eines CRISPR/Cas9-induzierten Knockouts von TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 in murinen GL261-Gliomzellen untersucht. Ziel der Arbeit war es, die Auswirkungen dieser Knockouts auf das Tumorverhalten, insbesondere auf Zellproliferation, Migration, Invasion sowie die Produktion von Zytokinen und Chemokinen, zu analysieren.

Die Methodik umfasste die Anwendung von CRISPR/Cas9, um spezifische Knockouts der TGF- $\beta$ 1- und TGF- $\beta$ 2-Gene in den Gliomzellen zu erzeugen. Diese Knockout-Zellen wurden durch PCR und Sanger-Sequenzierung validiert. Anschließend wurden *in vitro* Assays zur Zellproliferation, Migration und Invasion durchgeführt. Darüber hinaus wurde die Zytokin- und Chemokinproduktion mittels eines Zytokin-Arrays untersucht. Die Knockout-Zellen wurden ferner durch lentivirales Labeling mit mCherry fluoreszenzmarkiert, um sie in weiteren Experimenten nutzen zu können.

Unsere Arbeit zeigte, dass der Knockout von TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 signifikante Auswirkungen auf das Verhalten der Gliomzellen hatte. Sowohl die Proliferation als auch die Motilität und Invasivität der Knockout-Zellen waren im Vergleich zu den Kontrollzellen reduziert. Dabei traten deutliche Unterschiede zwischen den Einzel- und Doppel-Knockouts auf. Interessanterweise führte der Knockout auch zu einer veränderten Zytokinproduktion, insbesondere zu einer Reduktion proinflammatorischer und angiogener Zytokine, was darauf hindeutet, dass TGF- $\beta$  eine zentrale Rolle bei der Regulation des Tumormikromilieus spielt.

Der Knockout von TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 in murinen Gliomzellen führte zu einer signifikanten Reduktion der malignen Eigenschaften dieser Zellen. Sowohl die Proliferation als auch die Motilität und Invasionsfähigkeit der Knockout-Zellen waren im Vergleich zu den Kontrollzellen deutlich reduziert, wobei der Doppel-Knockout den größten Effekt zeigte. Dies unterstreicht die Bedeutung von TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 in der Tumorprogression und bietet einen potenziellen Ansatzpunkt für therapeutische Strategien, die auf die Inhibition dieser Zytokine

abzielen. Die veränderte Zytokinproduktion in den Knockout-Zellen legt zudem nahe, dass TGF- $\beta$  auch eine zentrale Rolle bei der Tumor-Immunevasion und der Tumorangiogenese spielt.

Zukünftige Studien könnten untersuchen, inwieweit eine pharmakologische Hemmung von TGF- $\beta$  in Kombination mit anderen Therapieansätzen, wie Immuncheckpoint-Inhibitoren oder anti-angiogenen Medikamenten, die Behandlung von Gliomen verbessern könnte. Die vorliegende Arbeit liefert wichtige Grundlagen für weitere Forschungsarbeiten, die das Potenzial von TGF- $\beta$ -Inhibitoren in der Krebstherapie untersuchen.

## 6 Literaturverzeichnis

- ACOSTA, S., FIORE, L., CAROTA, I. A. & OLIVER, G. 2018. Use of two gRNAs for CRISPR/Cas9 improves bi-allelic homologous recombination efficiency in mouse embryonic stem cells. *Genesis*, 56, e23212.
- ADLI, M. 2018. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat Commun*, 9, 1911.
- AGNIHOTRI, S., BURRELL, K. E., WOLF, A., JALALI, S., HAWKINS, C., RUTKA, J. T. & ZADEH, G. 2013. Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 61, 25-41.
- AHLUWALIA, M. S., BOU-ANAK, S., BURGETT, M. E., SARMEY, N., KHOSLA, D., DAHIYA, S., WEIL, R. J., BAE, E., HUANG, P., MCGRAW, M., GROVE, L. M., OLMAN, M. A., PRAYSON, R. A., SUH, J. H., GILLESPIE, G. Y., BARNHOLTZ-SLOAN, J., NOWACKI, A. S., BARNETT, G. H. & GLADSON, C. L. 2017. Correlation of higher levels of soluble TNF-R1 with a shorter survival, independent of age, in recurrent glioblastoma. *J Neurooncol*, 131, 449-458.
- AKHURST, R. J. 2017. Targeting TGF-beta Signaling for Therapeutic Gain. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 9.
- AMERATUNGA, M., PAVLAKIS, N., WHEELER, H., GRANT, R., SIMES, J. & KHASRAW, M. 2018. Anti-angiogenic therapy for high-grade glioma. *Cochrane Database Syst Rev*, 11, CD008218.
- ARMENTO, A., EHLERS, J., SCHOTTERL, S. & NAUMANN, U. 2017. Molecular Mechanisms of Glioma Cell Motility. In: DE VLEESCHOUWER, S. (ed.) *Glioblastoma*. Brisbane (AU).
- BABA, A. B., RAH, B., BHAT, G. R., MUSHTAQ, I., PARVEEN, S., HASSAN, R., HAMEED ZARGAR, M. & AFROZE, D. 2022. Transforming Growth Factor-Beta (TGF-beta) Signaling in Cancer-A Betrayal Within. *Front Pharmacol*, 13, 791272.
- BAKIN, A. V., TOMLINSON, A. K., BHOWMICK, N. A., MOSES, H. L. & ARTEAGA, C. L. 2000. Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J Biol Chem*, 275, 36803-10.
- BARTH, R. F., MI, P. & YANG, W. 2018. Boron delivery agents for neutron capture therapy of cancer. *Cancer Commun (Lond)*, 38, 35.
- BARTLETT, D. L., LIU, Z., SATHAIAH, M., RAVINDRANATHAN, R., GUO, Z., HE, Y. & GUO, Z. S. 2013. Oncolytic viruses as therapeutic cancer vaccines. *Mol Cancer*, 12, 103.
- BEI, Y., HUANG, Q., SHEN, J., SHI, J., SHEN, C., XU, P., CHANG, H., XIA, X., XU, L., JI, B. & CHEN, J. 2017. IGFBP6 Regulates Cell Apoptosis and Migration in Glioma. *Cell Mol Neurobiol*, 37, 889-898.
- BOGDAHN, U., HAU, P., STOCKHAMMER, G., VENKATARAMANA, N. K., MAHAPATRA, A. K., SURI, A., BALASUBRAMANIAM, A., NAIR, S., OLIUSHINE, V., PARFENOV, V., POVERENNOVA, I., ZAARROOR, M., JACHIMCZAK, P., LUDWIG, S., SCHMAUS, S., HEINRICHS, H., SCHLINGENSIEPEN, K. H. & TRABEDERSEN GLIOMA STUDY, G. 2011. Targeted therapy for high-grade glioma with the TGF-beta2

- inhibitor trabedersen: results of a randomized and controlled phase IIb study. *Neuro Oncol*, 13, 132-42.
- BRAT, D. J., ALDAPE, K., COLMAN, H., FIGRARELLA-BRANGER, D., FULLER, G. N., GIANNINI, C., HOLLAND, E. C., JENKINS, R. B., KLEINSCHMIDT-DEMASTERS, B., KOMORI, T., KROS, J. M., LOUIS, D. N., MCLEAN, C., PERRY, A., REIFENBERGER, G., SARKAR, C., STUPP, R., VAN DEN BENT, M. J., VON DEIMLING, A. & WELLER, M. 2020. cIMPACT-NOW update 5: recommended grading criteria and terminologies for IDH-mutant astrocytomas. *Acta Neuropathol*, 139, 603-608.
- BRAT, D. J., ALDAPE, K., COLMAN, H., HOLLAND, E. C., LOUIS, D. N., JENKINS, R. B., KLEINSCHMIDT-DEMASTERS, B. K., PERRY, A., REIFENBERGER, G., STUPP, R., VON DEIMLING, A. & WELLER, M. 2018. cIMPACT-NOW update 3: recommended diagnostic criteria for "Diffuse astrocytic glioma, IDH-wildtype, with molecular features of glioblastoma, WHO grade IV". *Acta Neuropathol*, 136, 805-810.
- BREIER, G., BLUM, S., PELI, J., GROOT, M., WILD, C., RISAU, W. & REICHMANN, E. 2002. Transforming growth factor-beta and Ras regulate the VEGF/VEGF-receptor system during tumor angiogenesis. *Int J Cancer*, 97, 142-8.
- BRUNA, A., DARKEN, R. S., ROJO, F., OCANA, A., PENUELAS, S., ARIAS, A., PARIS, R., TORTOSA, A., MORA, J., BASELGA, J. & SEOANE, J. 2007. High TGFbeta-Smad activity confers poor prognosis in glioma patients and promotes cell proliferation depending on the methylation of the PDGF-B gene. *Cancer Cell*, 11, 147-60.
- CAPPER, D., JONES, D. T. W., SILL, M., HOVESTADT, V., SCHRIMPF, D., STURM, D., KOELSCHE, C., SAHM, F., CHAVEZ, L., REUSS, D. E., KRATZ, A., WEFERS, A. K., HUANG, K., PAJTLER, K. W., SCHWEIZER, L., STICHEL, D., OLAR, A., ENGEL, N. W., LINDENBERG, K., HARTER, P. N., BRACZYNSKI, A. K., PLATE, K. H., DOHMEN, H., GARVALOV, B. K., CORAS, R., HOLSKEN, A., HEWER, E., BEWERUNGE-HUDLER, M., SCHICK, M., FISCHER, R., BESCHORNER, R., SCHITTENHELM, J., STASZEWSKI, O., WANI, K., VARLET, P., PAGES, M., TEMMING, P., LOHMANN, D., SELT, F., WITT, H., MILDE, T., WITT, O., ARONICA, E., GIANGASPERO, F., RUSHING, E., SCHEURLLEN, W., GEISENBERGER, C., RODRIGUEZ, F. J., BECKER, A., PREUSSER, M., HABERLER, C., BJERKVIG, R., CRYAN, J., FARRELL, M., DECKERT, M., HENCH, J., FRANK, S., SERRANO, J., KANNAN, K., TSIRIGOS, A., BRUCK, W., HOFER, S., BREHMER, S., SEIZ-ROSENHAGEN, M., HANGGI, D., HANS, V., ROZSNOKI, S., HANSFORD, J. R., KOHLHOF, P., KRISTENSEN, B. W., LECHNER, M., LOPES, B., MAWRIN, C., KETTER, R., KULOZIK, A., KHATIB, Z., HEPPNER, F., KOCH, A., JOUVET, A., KEOHANE, C., MUHLEISEN, H., MUELLER, W., POHL, U., PRINZ, M., BENNER, A., ZAPATKA, M., GOTTARDO, N. G., DRIEVER, P. H., KRAMM, C. M., MULLER, H. L., RUTKOWSKI, S., VON HOFF, K., FRUHWALD, M. C., GNEKOW, A., FLEISCHHACK, G., TIPPELT, S., CALAMINUS, G., MONORANU, C. M., PERRY, A., JONES, C., et al. 2018. DNA

- methylation-based classification of central nervous system tumours. *Nature*, 555, 469-474.
- CHEN, C. R., KANG, Y., SIEGEL, P. M. & MASSAGUE, J. 2002. E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGFbeta receptor to c-myc repression. *Cell*, 110, 19-32.
- CHICOINE, M. R. & SILBERGELD, D. L. 1995. Invading C6 glioma cells maintaining tumorigenicity. *Journal of neurosurgery*, 83, 665-671.
- CHÉDOTAL, A., KERJAN, G. & MOREAU-FAUVARQUE, C. 2005. The brain within the tumor: new roles for axon guidance molecules in cancers. *Cell death and differentiation*, 12, 1044-1056.
- CLOUGHESY, T. F., MOCHIZUKI, A. Y., ORPILLA, J. R., HUGO, W., LEE, A. H., DAVIDSON, T. B., WANG, A. C., ELLINGSON, B. M., RYTLEWSKI, J. A., SANDERS, C. M., KAWAGUCHI, E. S., DU, L., LI, G., YONG, W. H., GAFFEY, S. C., COHEN, A. L., MELLINGHOFF, I. K., LEE, E. Q., REARDON, D. A., O'BRIEN, B. J., BUTOWSKI, N. A., NGHIEMPHU, P. L., CLARKE, J. L., ARRILLAGA-ROMANY, I. C., COLMAN, H., KALEY, T. J., DE GROOT, J. F., LIAU, L. M., WEN, P. Y. & PRINS, R. M. 2019. Neoadjuvant anti-PD-1 immunotherapy promotes a survival benefit with intratumoral and systemic immune responses in recurrent glioblastoma. *Nat Med*, 25, 477-486.
- CODRICI, E., POPESCU, I. D., TANASE, C. & ENCIU, A. M. 2022. Friends with Benefits: Chemokines, Glioblastoma-Associated Microglia/Macrophages, and Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci*, 23.
- CORBET, C., BASTIEN, E., SANTIAGO DE JESUS, J. P., DIERGE, E., MARTHERUS, R., VANDER LINDEN, C., DOIX, B., DEGAVRE, C., GUILBAUD, C., PETIT, L., MICHIELS, C., DESSY, C., LARONDELLE, Y. & FERON, O. 2020. TGFbeta2-induced formation of lipid droplets supports acidosis-driven EMT and the metastatic spreading of cancer cells. *Nat Commun*, 11, 454.
- CUDDAPAH, V. A., ROBEL, S., WATKINS, S. & SONTHEIMER, H. 2014. A neurocentric perspective on glioma invasion. *Nature reviews. Neuroscience*, 15, 455-465.
- CZARNYWOJTEK, A., BOROWSKA, M., DYRKA, K., VAN GOOL, S., SAWICKA-GUTAJ, N., MOSKAL, J., KOSCINSKI, J., GRACZYK, P., HALAS, T., LEWANDOWSKA, A. M., CZEPCZYNSKI, R. & RUCHALA, M. 2023. Glioblastoma Multiforme: The Latest Diagnostics and Treatment Techniques. *Pharmacology*, 108, 423-431.
- DAS, S. & MARSDEN, P. A. 2013. Angiogenesis in glioblastoma. *N Engl J Med*, 369, 1561-3.
- DAVID, C. J. & MASSAGUE, J. 2018. Contextual determinants of TGFbeta action in development, immunity and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19, 419-435.
- DE SOUZA DANTAS OLIVEIRA, S. H., DE SOUZA AARAO, T. L., DA SILVA BARBOSA, L., SOUZA LISBOA, P. G., TAVARES DUTRA, C. D., MARGALHO SOUSA, L., SIMOES QUARESMA, J. A. & FEIO LIBONATI, R. M. 2014. Immunohistochemical analysis of the expression of TNF-alpha, TGF-beta, and caspase-3 in subcutaneous tissue of patients with HIV lipodystrophy syndrome. *Microb Pathog*, 67-68, 41-7.

- DEHAIRS, J., TALEBI, A., CHERIFI, Y. & SWINNEN, J. V. 2016. CRISP-ID: decoding CRISPR mediated indels by Sanger sequencing. *Sci Rep*, 6, 28973.
- DEMUTH, T. & BERENS, M. E. 2004. Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. *Journal of neuro-oncology*, 70, 217-228.
- DERYNCK, R., JARRETT, J. A., CHEN, E. Y., EATON, D. H., BELL, J. R., ASSOIAN, R. K., ROBERTS, A. B., SPORN, M. B. & GOEDEL, D. V. 1985. Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature*, 316, 701-5.
- DESJARDINS, A., GROMEIER, M., HERNDON, J. E., 2ND, BEAUBIER, N., BOLOGNESI, D. P., FRIEDMAN, A. H., FRIEDMAN, H. S., MCSHERRY, F., MUSCAT, A. M., NAIR, S., PETERS, K. B., RANDAZZO, D., SAMPSON, J. H., VLAHOVIC, G., HARRISON, W. T., MCLENDON, R. E., ASHLEY, D. & BIGNER, D. D. 2018. Recurrent Glioblastoma Treated with Recombinant Poliovirus. *N Engl J Med*, 379, 150-161.
- DI NUNNO, V., APRILE, M., GATTO, L., TOSONI, A., RANIERI, L., BARTOLINI, S. & FRANCESCHI, E. 2023. Tumor Microenvironment in Gliomas: A Treatment Hurdle or an Opportunity to Grab? *Cancers (Basel)*, 15.
- DONKOR, M. K., SARKAR, A. & LI, M. O. 2012. Tgf-beta1 produced by activated CD4(+) T Cells Antagonizes T Cell Surveillance of Tumor Development. *Oncoimmunology*, 1, 162-171.
- DONKOR, M. K., SARKAR, A., SAVAGE, P. A., FRANKLIN, R. A., JOHNSON, L. K., JUNGBLUTH, A. A., ALLISON, J. P. & LI, M. O. 2011. T cell surveillance of oncogene-induced prostate cancer is impeded by T cell-derived TGF-beta1 cytokine. *Immunity*, 35, 123-34.
- DOUDNA, J. A. & CHARPENTIER, E. 2014. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346, 1258096.
- DUAN, J., LU, G., HONG, Y., HU, Q., MAI, X., GUO, J., SI, X., WANG, F. & ZHANG, Y. 2018. Live imaging and tracking of genome regions in CRISPR/dCas9 knock-in mice. *Genome Biol*, 19, 192.
- EDLUND, S., LANDSTROM, M., HELDIN, C. H. & ASPENSTROM, P. 2002. Transforming growth factor-beta-induced mobilization of actin cytoskeleton requires signaling by small GTPases Cdc42 and RhoA. *Mol Biol Cell*, 13, 902-14.
- FABIAN, C., HAN, M., BJERKVIG, R. & NICLOU, S. P. 2021. Novel facets of glioma invasion. *Int Rev Cell Mol Biol*, 360, 33-64.
- FERLA, R., BONOMI, M., OTVOS, L., JR. & SURMACZ, E. 2011. Glioblastoma-derived leptin induces tube formation and growth of endothelial cells: comparison with VEGF effects. *BMC Cancer*, 11, 303.
- FERRER, V. P., MOURA NETO, V. & MENTLEIN, R. 2018. Glioma infiltration and extracellular matrix: key players and modulators. *Glia*, 66, 1542-1565.
- FORTIN ENSIGN, S. P., JENKINS, R. B., GIANNINI, C., SARKARIA, J. N., GALANIS, E. & KIZILBASH, S. H. 2023. Translational significance of CDKN2A/B homozygous deletion in isocitrate dehydrogenase-mutant astrocytoma. *Neuro Oncol*, 25, 28-36.

- FRIESE, M. A., PLATTEN, M., LUTZ, S. Z., NAUMANN, U., AULWURM, S., BISCHOF, F., BUHRING, H. J., DICHGANS, J., RAMMENSEE, H. G., STEINLE, A. & WELLER, M. 2003. MICA/NKG2D-mediated immunogene therapy of experimental gliomas. *Cancer Res*, 63, 8996-9006.
- FRIESE, M. A., WISCHHUSEN, J., WICK, W., WEILER, M., EISELE, G., STEINLE, A. & WELLER, M. 2004. RNA interference targeting transforming growth factor-beta enhances NKG2D-mediated antiglioma immune response, inhibits glioma cell migration and invasiveness, and abrogates tumorigenicity in vivo. *Cancer Res*, 64, 7596-603.
- FUJIWARA, Y., NOKIHARA, H., YAMADA, Y., YAMAMOTO, N., SUNAMI, K., UTSUMI, H., ASOU, H., TAKAHASHI, I. O., OGASAWARA, K., GUEORGUIEVA, I. & TAMURA, T. 2015. Phase 1 study of galunisertib, a TGF-beta receptor I kinase inhibitor, in Japanese patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*, 76, 1143-52.
- FUKUHARA, H., INO, Y. & TODO, T. 2016. Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn. *Cancer Sci*, 107, 1373-1379.
- GAN, H. K., REARDON, D. A., LASSMAN, A. B., MERRELL, R., VAN DEN BENT, M., BUTOWSKI, N., LWIN, Z., WHEELER, H., FICHTEL, L., SCOTT, A. M., GOMEZ, E. J., FISCHER, J., MANDICH, H., XIONG, H., LEE, H. J., MUNASINGHE, W. P., ROBERTS-RAPP, L. A., ANSELL, P. J., HOLEN, K. D. & KUMTHEKAR, P. 2018. Safety, pharmacokinetics, and antitumor response of depatuxizumab mafodotin as monotherapy or in combination with temozolomide in patients with glioblastoma. *Neuro Oncol*, 20, 838-847.
- GARRISON, K., HAHN, T., LEE, W. C., LING, L. E., WEINBERG, A. D. & AKPORIAYE, E. T. 2012. The small molecule TGF-beta signaling inhibitor SM16 synergizes with agonistic OX40 antibody to suppress established mammary tumors and reduce spontaneous metastasis. *Cancer Immunol Immunother*, 61, 511-21.
- GELETNEKY, K., HAJDA, J., ANGELOVA, A. L., LEUCHS, B., CAPPER, D., BARTSCH, A. J., NEUMANN, J. O., SCHONING, T., HUSING, J., BEELTE, B., KIPRIANOVA, I., ROSCHER, M., BHAT, R., VON DEIMLING, A., BRUCK, W., JUST, A., FREHTMAN, V., LOBHARD, S., TERLETSKAIA-LADWIG, E., FRY, J., JOCHIMS, K., DANIEL, V., KREBS, O., DAHM, M., HUBER, B., UNTERBERG, A. & ROMMELAERE, J. 2017. Oncolytic H-1 Parvovirus Shows Safety and Signs of Immunogenic Activity in a First Phase I/IIa Glioblastoma Trial. *Mol Ther*, 25, 2620-2634.
- GILADI, M., SCHNEIDERMAN, R. S., VOLOSHIN, T., PORAT, Y., MUNSTER, M., BLAT, R., SHERBO, S., BOMZON, Z., URMAN, N., ITZHAKI, A., CAHAL, S., SHTEINGAUZ, A., CHAUDHRY, A., KIRSON, E. D., WEINBERG, U. & PALT, Y. 2015. Mitotic Spindle Disruption by Alternating Electric Fields Leads to Improper Chromosome Segregation and Mitotic Catastrophe in Cancer Cells. *Sci Rep*, 5, 18046.
- GILBERT, L. A., HORLBECK, M. A., ADAMSON, B., VILLALTA, J. E., CHEN, Y., WHITEHEAD, E. H., GUIMARAES, C., PANNING, B., PLOEGH, H. L., BASSIK, M. C., QI, L. S., KAMPMANN, M. & WEISSMAN, J. S.

- 2014a. Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation. *Cell*, 159, 647-61.
- GILBERT, M. R., DIGNAM, J. J., ARMSTRONG, T. S., WEFEL, J. S., BLUMENTHAL, D. T., VOGELBAUM, M. A., COLMAN, H., CHAKRAVARTI, A., PUGH, S., WON, M., JERAJ, R., BROWN, P. D., JAECKLE, K. A., SCHIFF, D., STIEBER, V. W., BRACHMAN, D. G., WERNER-WASIK, M., TREMONT-LUKATS, I. W., SULMAN, E. P., ALDAPE, K. D., CURRAN, W. J., JR. & MEHTA, M. P. 2014b. A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med*, 370, 699-708.
- GILBERT, R. W. D., VICKARYOUS, M. K. & VILORIA-PETIT, A. M. 2016. Signalling by Transforming Growth Factor Beta Isoforms in Wound Healing and Tissue Regeneration. *J Dev Biol*, 4.
- GOLAN-CANCELA, I. & CAJA, L. 2024. The TGF-beta Family in Glioblastoma. *Int J Mol Sci*, 25.
- GORELIK, L. & FLAVELL, R. A. 2001. Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nat Med*, 7, 1118-22.
- GOUMANS, M. J., VALDIMARSDOTTIR, G., ITOH, S., ROSENDAHL, A., SIDERAS, P. & TEN DIJKE, P. 2002. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J*, 21, 1743-53.
- GUJAR, S. A. & LEE, P. W. 2014. Oncolytic virus-mediated reversal of impaired tumor antigen presentation. *Front Oncol*, 4, 77.
- HAHN, A., BODE, J., KRUEWEL, T., SOLECKI, G., HEILAND, S., BENDSZUS, M., TEWS, B., WINKLER, F., BRECKWOLDT, M. O. & KURZ, F. T. 2019. Glioblastoma multiforme restructures the topological connectivity of cerebrovascular networks. *Sci Rep*, 9, 11757.
- HAN, J., ALVAREZ-BRECKENRIDGE, C. A., WANG, Q. E. & YU, J. 2015. TGF-beta signaling and its targeting for glioma treatment. *Am J Cancer Res*, 5, 945-55.
- HAN, S., LIU, Y., CAI, S. J., QIAN, M., DING, J., LARION, M., GILBERT, M. R. & YANG, C. 2020. IDH mutation in glioma: molecular mechanisms and potential therapeutic targets. *Br J Cancer*, 122, 1580-1589.
- HAO, Y., BAKER, D. & TEN DIJKE, P. 2019. TGF-beta-Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. *Int J Mol Sci*, 20.
- HARDCASTLE, J., MILLS, L., MALO, C. S., JIN, F., KUOKAWA, C., GEEKIYANAGE, H., SCHROEDER, M., SARKARIA, J., JOHNSON, A. J. & GALANIS, E. 2017. Immunovirotherapy with measles virus strains in combination with anti-PD-1 antibody blockade enhances antitumor activity in glioblastoma treatment. *Neuro Oncol*, 19, 493-502.
- HARDEE, M. E. & ZAGZAG, D. 2012. Mechanisms of glioma-associated neovascularization. *Am J Pathol*, 181, 1126-41.
- HARRINGTON, K., FREEMAN, D. J., KELLY, B., HARPER, J. & SORIA, J. C. 2019. Optimizing oncolytic virotherapy in cancer treatment. *Nat Rev Drug Discov*, 18, 689-706.

- HATOUM, A., MOHAMMED, R. & ZAKIEH, O. 2019. The unique invasiveness of glioblastoma and possible drug targets on extracellular matrix. *Cancer Manag Res*, 11, 1843-1855.
- HATZIKIROU, H., BASANTA, D., SIMON, M., SCHALLER, K. & DEUTSCH, A. 2012. 'Go or grow': the key to the emergence of invasion in tumour progression? *Mathematical medicine and biology : a journal of the IMA*, 29, 49-65.
- HAU, P., JACHIMCZAK, P. & BOGDAHN, U. 2009. Treatment of malignant gliomas with TGF-beta2 antisense oligonucleotides. *Expert Rev Anticancer Ther*, 9, 1663-74.
- HEGI, M. E., DISERENS, A. C., GORLIA, T., HAMOU, M. F., DE TRIBOLET, N., WELLER, M., KROS, J. M., HAINFELLNER, J. A., MASON, W., MARIANI, L., BROMBERG, J. E., HAU, P., MIRIMANOFF, R. O., CAIRNCROSS, J. G., JANZER, R. C. & STUPP, R. 2005. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*, 352, 997-1003.
- HELDIN, C. H. & MOUSTAKAS, A. 2016. Signaling Receptors for TGF-beta Family Members. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8.
- HILL, C. S. 2016. Transcriptional Control by the SMADs. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8.
- HUANG, J., LIU, F., LIU, Z., TANG, H., WU, H., GONG, Q. & CHEN, J. 2017. Immune Checkpoint in Glioblastoma: Promising and Challenging. *Front Pharmacol*, 8, 242.
- HUANG, W., DING, X., YE, H., WANG, J., SHAO, J. & HUANG, T. 2018. Hypoxia enhances the migration and invasion of human glioblastoma U87 cells through PI3K/Akt/mTOR/HIF-1alpha pathway. *Neuroreport*, 29, 1578-1585.
- HUANG, Y. B., LIU, P. P., ZHENG, H., YANG, X. X., YANG, C. C., LIU, Y. & LIU, Y. 2021. Inhibition of TGF-beta2-induced migration and epithelial-mesenchymal transition in ARPE-19 by sulforaphane. *Int J Ophthalmol*, 14, 973-980.
- IAVARONE, A. & MASSAGUE, J. 1997. Repression of the CDK activator Cdc25A and cell-cycle arrest by cytokine TGF-beta in cells lacking the CDK inhibitor p15. *Nature*, 387, 417-22.
- IMAI, K., MINAMIYA, Y., KOYOTA, S., ITO, M., SAITO, H., SATO, Y., MOTOYAMA, S., SUGIYAMA, T. & OGAWA, J. 2012. Inhibition of dendritic cell migration by transforming growth factor-beta1 increases tumor-draining lymph node metastasis. *J Exp Clin Cancer Res*, 31, 3.
- IWADATE, Y. 2016. Epithelial-mesenchymal transition in glioblastoma progression. *Oncology letters*, 11, 1615-1620.
- JASCHINSKI, F., ROTHHAMMER, T., JACHIMCZAK, P., SEITZ, C., SCHNEIDER, A. & SCHLINGENSIEPEN, K. H. 2011. The antisense oligonucleotide trabedersen (AP 12009) for the targeted inhibition of TGF-beta2. *Curr Pharm Biotechnol*, 12, 2203-13.
- JORGOVANOVIC, D., SONG, M., WANG, L. & ZHANG, Y. 2020. Roles of IFN-gamma in tumor progression and regression: a review. *Biomark Res*, 8, 49.

- JOSEPH, J. V., CONROY, S., TOMAR, T., EGGENS-MEIJER, E., BHAT, K., COPRAY, S., WALENKAMP, A. M., BODDEKE, E., BALASUBRAMANYIAN, V., WAGEMAKERS, M., DEN DUNNEN, W. F. & KRUYT, F. A. 2014. TGF-beta is an inducer of ZEB1-dependent mesenchymal transdifferentiation in glioblastoma that is associated with tumor invasion. *Cell Death Dis*, 5, e1443.
- JOSEPH, J. V., MAGAUT, C. R., STOREVIK, S., GERALDO, L. H., MATHIVET, T., LATIF, M. A., RUDEWICZ, J., GUYON, J., GAMBARETTI, M., HAUKAS, F., TRONES, A., ROMO YSTAAS, L. A., HOSSAIN, J. A., NINZIMA, S., CUVELLIER, S., ZHOU, W., TOMAR, T., KLINK, B., RANE, L., IRVING, B. K., MARRISON, J., O'TOOLE, P., WURDAK, H., WANG, J., DI, Z., BIRKELAND, E., BERVEN, F. S., WINKLER, F., KRUYT, F. A. E., BIKFALVI, A., BJERKVIG, R., DAUBON, T. & MILETIC, H. 2022. TGF-beta promotes microtubule formation in glioblastoma through thrombospondin 1. *Neuro Oncol*, 24, 541-553.
- KAMINSKA, B. & CYRANOWSKI, S. 2020. Recent Advances in Understanding Mechanisms of TGF Beta Signaling and Its Role in Glioma Pathogenesis. *Adv Exp Med Biol*, 1202, 179-201.
- KAST, R. E., HILL, Q. A., WION, D., MELLSTEDT, H., FOCOSI, D., KARPELMASSLER, G., HEILAND, T. & HALATSCH, M. E. 2017. Glioblastoma-synthesized G-CSF and GM-CSF contribute to growth and immunosuppression: Potential therapeutic benefit from dapsone, fenofibrate, and ribavirin. *Tumour Biol*, 39, 1010428317699797.
- KAWABATA, S., MIYATAKE, S., NONOGUCHI, N., HIRAMATSU, R., IIDA, K., MIYATA, S., YOKOYAMA, K., DOI, A., KURODA, Y., KUROIWA, T., MICHIEUE, H., KUMADA, H., KIRIHATA, M., IMAHORI, Y., MARUHASHI, A., SAKURAI, Y., SUZUKI, M., MASUNAGA, S. & ONO, K. 2009. Survival benefit from boron neutron capture therapy for the newly diagnosed glioblastoma patients. *Appl Radiat Isot*, 67, S15-8.
- KIRSON, E. D., DBALY, V., TOVARYS, F., VYMAZAL, J., SOUSTIEL, J. F., ITZHAKI, A., MORDECHOVICH, D., STEINBERG-SHAPIRA, S., GURVICH, Z., SCHNEIDERMAN, R., WASSERMAN, Y., SALZBERG, M., RYFFEL, B., GOLDSHER, D., DEKEL, E. & PALT, Y. 2007. Alternating electric fields arrest cell proliferation in animal tumor models and human brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 10152-7.
- KISS, M., VANDE WALLE, L., SAAVEDRA, P. H. V., LEBEGGE, E., VAN DAMME, H., MURGASKI, A., QIAN, J., EHLING, M., PRETTO, S., BOLLI, E., KEIRSSE, J., BARDET, P. M. R., ARNOUK, S. M., ELKRIM, Y., SCHMOETTEN, M., BRUGHMANS, J., DEBRAEKELEER, A., FOSSOUL, A., BOON, L., RAES, G., VAN LOO, G., LAMBRECHTS, D., MAZZONE, M., BESCHIN, A., WULLAERT, A., LAMKANFI, M., VAN GINDERACHTER, J. A. & LAOUI, D. 2021. IL1beta Promotes Immune Suppression in the Tumor Microenvironment Independent of the Inflammasome and Gasdermin D. *Cancer Immunol Res*, 9, 309-323.
- KNOFERLE, J., RAMLJAK, S., KOCH, J. C., TONGES, L., ASIF, A. R., MICHEL, U., WOUTERS, F. S., HEERMANN, S., KRIEGLSTEIN, K., ZERR, I., BAHR, M. & LINGOR, P. 2010. TGF-beta 1 enhances neurite

- outgrowth via regulation of proteasome function and EFABP. *Neurobiol Dis*, 38, 395-404.
- KORBECKI, J., KOJDER, K., SIMINSKA, D., BOHATYREWICZ, R., GUTOWSKA, I., CHLUBEK, D. & BARANOWSKA-BOSIACKA, I. 2020. CC Chemokines in a Tumor: A Review of Pro-Cancer and Anti-Cancer Properties of the Ligands of Receptors CCR1, CCR2, CCR3, and CCR4. *Int J Mol Sci*, 21.
- KORKUT, A., ZAIDI, S., KANCHI, R. S., RAO, S., GOUGH, N. R., SCHULTZ, A., LI, X., LORENZI, P. L., BERGER, A. C., ROBERTSON, G., KWONG, L. N., DATTO, M., ROSZIK, J., LING, S., RAVIKUMAR, V., MANYAM, G., RAO, A., SHELLEY, S., LIU, Y., JU, Z., HANSEL, D., DE VELASCO, G., PENNATHUR, A., ANDERSEN, J. B., O'ROURKE, C. J., OHSHIRO, K., JOGUNOORI, W., NGUYEN, B. N., LI, S., OSMANBEYOGLU, H. U., AJANI, J. A., MANI, S. A., HOUSEMAN, A., WIZNEROWICZ, M., CHEN, J., GU, S., MA, W., ZHANG, J., TONG, P., CHERNIACK, A. D., DENG, C., RESAR, L., CANCER GENOME ATLAS RESEARCH, N., WEINSTEIN, J. N., MISHRA, L. & AKBANI, R. 2018. A Pan-Cancer Analysis Reveals High-Frequency Genetic Alterations in Mediators of Signaling by the TGF-beta Superfamily. *Cell Syst*, 7, 422-437 e7.
- KRANJC, M. K., NOVAK, M., PESTELL, R. G. & LAH, T. T. 2019. Cytokine CCL5 and receptor CCR5 axis in glioblastoma multiforme. *Radiol Oncol*, 53, 397-406.
- LAMOUILLE, S., XU, J. & DERYNCK, R. 2014. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15, 178-96.
- LASSMAN, A. B., VAN DEN BENT, M. J., GAN, H. K., REARDON, D. A., KUMTHEKAR, P., BUTOWSKI, N., LWIN, Z., MIKKELSEN, T., NABORS, L. B., PAPADOPOULOS, K. P., PENAS-PRADO, M., SIMES, J., WHEELER, H., WALBERT, T., SCOTT, A. M., GOMEZ, E., LEE, H. J., ROBERTS-RAPP, L., XIONG, H., ANSELL, P. J., BAIN, E., HOLEN, K. D., MAAG, D. & MERRELL, R. 2019. Safety and efficacy of depatuxizumab mafodotin + temozolomide in patients with EGFR-amplified, recurrent glioblastoma: results from an international phase I multicenter trial. *Neuro Oncol*, 21, 106-114.
- LAVERTY, H. G., WAKEFIELD, L. M., OCCLESTON, N. L., O'KANE, S. & FERGUSON, M. W. 2009. TGF-beta3 and cancer: a review. *Cytokine Growth Factor Rev*, 20, 305-17.
- LAW, I., ALBERT, N. L., ARBIZU, J., BOELLAARD, R., DRZEZGA, A., GALLDIKS, N., LA FOUGERE, C., LANGEN, K. J., LOPCI, E., LOWE, V., MCCONATHY, J., QUICK, H. H., SATTTLER, B., SCHUSTER, D. M., TONN, J. C. & WELLER, M. 2019. Joint EANM/EANO/RANO practice guidelines/SNMMI procedure standards for imaging of gliomas using PET with radiolabelled amino acids and [(18)F]FDG: version 1.0. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 46, 540-557.
- LEPORE, F., D'ALESSANDRO, G., ANTONANGELI, F., SANTORO, A., ESPOSITO, V., LIMATOLA, C. & TRETTEL, F. 2018. CXCL16/CXCR6 Axis Drives Microglia/Macrophages Phenotype in Physiological Conditions and Plays a Crucial Role in Glioma. *Front Immunol*, 9, 2750.

- LIU, Q., LI, G., LI, R., SHEN, J., HE, Q., DENG, L., ZHANG, C. & ZHANG, J. 2010. IL-6 promotion of glioblastoma cell invasion and angiogenesis in U251 and T98G cell lines. *J Neurooncol*, 100, 165-76.
- LIU, S., ZHANG, C., WANG, B., ZHANG, H., QIN, G., LI, C., CAO, L., GAO, Q., PING, Y., ZHANG, K., LIAN, J., ZHAO, Q., WANG, D., ZHANG, Z., ZHAO, X., YANG, L., HUANG, L., YANG, B. & ZHANG, Y. 2021. Regulatory T cells promote glioma cell stemness through TGF-beta-NF-kappaB-IL6-STAT3 signaling. *Cancer Immunol Immunother*, 70, 2601-2616.
- LO, C. M., WANG, H. B., DEMBO, M. & WANG, Y. L. 2000. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophysical journal*, 79, 144-152.
- LOUIS, D. N., PERRY, A., WESSELING, P., BRAT, D. J., CREE, I. A., FIGARELLA-BRANGER, D., HAWKINS, C., NG, H. K., PFISTER, S. M., REIFENBERGER, G., SOFFIETTI, R., VON DEIMLING, A. & ELLISON, D. W. 2021. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol*, 23, 1231-1251.
- LU, P., WEAVER, V. M. & WERB, Z. 2012. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *The Journal of cell biology*, 196, 395-406.
- LU, Y., JIANG, F., ZHENG, X., KATAKOWSKI, M., BULLER, B., TO, S. S. & CHOPP, M. 2011. TGF-beta1 promotes motility and invasiveness of glioma cells through activation of ADAM17. *Oncol Rep*, 25, 1329-35.
- LYONS, S. A., CHUNG, W. J., WEAVER, A. K., OGUNRINU, T. & SONTHEIMER, H. 2007. Autocrine glutamate signaling promotes glioma cell invasion. *Cancer research*, 67, 9463-9471.
- MAHESPARAN, R., READ, T.-A., LUND-JOHANSEN, M., SKAFTNESMO, K. O., BJERKVIG, R. & ENGBRAATEN, O. 2003. Expression of extracellular matrix components in a highly infiltrative in vivo glioma model. *Acta neuropathologica*, 105, 49-57.
- MAHMOUD, A. B., AJINA, R., AREF, S., DARWISH, M., ALSAYB, M., TAHER, M., ALSHARIF, S. A., HASHEM, A. M. & ALKAYYAL, A. A. 2022. Advances in immunotherapy for glioblastoma multiforme. *Front Immunol*, 13, 944452.
- MARTIN, K. C., MA, C. & YIP, S. 2023. From Theory to Practice: Implementing the WHO 2021 Classification of Adult Diffuse Gliomas in Neuropathology Diagnosis. *Brain Sci*, 13.
- MASSAGUE, J. 2008. TGFbeta in Cancer. *Cell*, 134, 215-30.
- MASSAGUE, J., SEOANE, J. & WOTTON, D. 2005. Smad transcription factors. *Genes Dev*, 19, 2783-810.
- MASSAGUE, J. & WOTTON, D. 2000. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J*, 19, 1745-54.
- MERK, L., REGEL, K., ECKHARDT, H., EVERS, M., EL-AYOUBI, A., MITTELBRONN, M., KRUGER, M., GERARDY, J. J., MACK, A. F. & NAUMANN, U. 2024. Blocking TGF-beta- and Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT)-mediated activation of vessel-associated mural cells in glioblastoma impacts tumor angiogenesis. *Free Neuropathol*, 5.
- MILLER, A. M., SHAH, R. H., PENTSOVA, E. I., POURMALEKI, M., BRIGGS, S., DISTEFANO, N., ZHENG, Y., SKAKODUB, A., MEHTA, S. A., CAMPOS, C., HSIEH, W. Y., SELCUKLU, S. D., LING, L., MENG, F.,

- JING, X., SAMOILA, A., BALE, T. A., TSUI, D. W. Y., GROMMES, C., VIALE, A., SOUWEIDANE, M. M., TABAR, V., BRENNAN, C. W., REINER, A. S., ROSENBLUM, M., PANAGEAS, K. S., DEANGELIS, L. M., YOUNG, R. J., BERGER, M. F. & MELLINGHOFF, I. K. 2019. Tracking tumour evolution in glioma through liquid biopsies of cerebrospinal fluid. *Nature*, 565, 654-658.
- MITRA, S. K., HANSON, D. A. & SCHLAEPFER, D. D. 2005. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6, 56-68.
- MIURA, S., TAKESHITA, T., ASAO, H., KIMURA, Y., MURATA, K., SASAKI, Y., HANAI, J. I., BEPPU, H., TSUKAZAKI, T., WRANA, J. L., MIYAZONO, K. & SUGAMURA, K. 2000. Hgs (Hrs), a FYVE domain protein, is involved in Smad signaling through cooperation with SARA. *Mol Cell Biol*, 20, 9346-55.
- MIYAI, M., IWAMA, T., HARA, A. & TOMITA, H. 2023. Exploring the Vital Link Between Glioma, Neuron, and Neural Activity in the Context of Invasion. *Am J Pathol*, 193, 669-679.
- MIYAZAWA, K. & MIYAZONO, K. 2017. Regulation of TGF-beta Family Signaling by Inhibitory Smads. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 9.
- MONTANA, V. & SONTHEIMER, H. 2011. Bradykinin promotes the chemotactic invasion of primary brain tumors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 31, 4858-4867.
- MOUSTAKAS, A. & HELDIN, C.-H. 2007. Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer science*, 98, 1512-1520.
- MURALIDHARAN, K., YEKULA, A., SMALL, J. L., ROSH, Z. S., KANG, K. M., WANG, L., LAU, S., ZHANG, H., LEE, H., BETTEGOWDA, C., CHICOINE, M. R., KALKANIS, S. N., SHANKAR, G. M., NAHED, B. V., CURRY, W. T., JONES, P. S., CAHILL, D. P., BALAJ, L. & CARTER, B. S. 2021. TERT Promoter Mutation Analysis for Blood-Based Diagnosis and Monitoring of Gliomas. *Clin Cancer Res*, 27, 169-178.
- MÄDER, L., BLANK, A. E., CAPPER, D., JANSONG, J., BAUMGARTEN, P., WIRSIK, N. M., ZACHSKORN, C., EHLERS, J., SEIFERT, M., KLINK, B., LIEBNER, S., NICLOU, S., NAUMANN, U., HARTEP, P. N. & MITTELBRONN, M. 2018. Pericytes/vessel-associated mural cells (VAMCs) are the major source of key epithelial-mesenchymal transition (EMT) factors SLUG and TWIST in human glioma. *Oncotarget*, 9, 24041-24053.
- NDUOM, E. K., WELLER, M. & HEIMBERGER, A. B. 2015. Immunosuppressive mechanisms in glioblastoma. *Neuro Oncol*, 17 Suppl 7, vii9-vii14.
- NEFTEL, C., LAFFY, J., FILBIN, M. G., HARA, T., SHORE, M. E., RAHME, G. J., RICHMAN, A. R., SILVERBUSH, D., SHAW, M. L., HEBERT, C. M., DEWITT, J., GRITSCH, S., PEREZ, E. M., GONZALEZ CASTRO, L. N., LAN, X., DRUCK, N., RODMAN, C., DIONNE, D., KAPLAN, A., BERTALAN, M. S., SMALL, J., PELTON, K., BECKER, S., BONAL, D., NGUYEN, Q.-D., SERVIS, R. L., FUNG, J. M., MYLVAGANAM, R., MAYR, L., GOJO, J., HABERLER, C., GEYEREGGER, R., CZECH, T.,

- SLAVC, I., NAHED, B. V., CURRY, W. T., CARTER, B. S., WAKIMOTO, H., BRASTIANOS, P. K., BATCHELOR, T. T., STEMMER-RACHAMIMOV, A., MARTINEZ-LAGE, M., FROSCHE, M. P., STAMENKOVIC, I., RIGGI, N., RHEINBAY, E., MONJE, M., ROZENBLATT-ROSEN, O., CAHILL, D. P., PATEL, A. P., HUNTER, T., VERMA, I. M., LIGON, K. L., LOUIS, D. N., REGEV, A., BERNSTEIN, B. E., TIROSH, I. & SUVÀ, M. L. 2019. An Integrative Model of Cellular States, Plasticity, and Genetics for Glioblastoma. *Cell*, 178, 835-849.e21.
- NORONHA, C., RIBEIRO, A. S., TAIPA, R., CASTRO, D. S., REIS, J., FARIA, C. & PAREDES, J. 2021. Cadherin Expression and EMT: A Focus on Gliomas. *Biomedicines*, 9.
- NOVAK, M., KOPRIVNIKAR KRAJNC, M., HRASTAR, B., BREZNIK, B., MAJC, B., MLINAR, M., ROTTER, A., PORCNIK, A., MLAKAR, J., STARE, K., PESTELL, R. G. & LAH TURNSEK, T. 2020. CCR5-Mediated Signaling Is Involved in Invasion of Glioblastoma Cells in Its Microenvironment. *Int J Mol Sci*, 21.
- O'ROURKE, D. M., NASRALLAH, M. P., DESAI, A., MELENHORST, J. J., MANSFIELD, K., MORRISSETTE, J. J. D., MARTINEZ-LAGE, M., BREM, S., MALONEY, E., SHEN, A., ISAACS, R., MOHAN, S., PLESA, G., LACEY, S. F., NAVENOT, J. M., ZHENG, Z., LEVINE, B. L., OKADA, H., JUNE, C. H., BROGDON, J. L. & MAUS, M. V. 2017. A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma. *Sci Transl Med*, 9.
- OHBA, S., KUWAHARA, K., YAMADA, S., ABE, M. & HIROSE, Y. 2020. Correlation between IDH, ATRX, and TERT promoter mutations in glioma. *Brain Tumor Pathol*, 37, 33-40.
- OKADA, H., WELLER, M., HUANG, R., FINOCCHIARO, G., GILBERT, M. R., WICK, W., ELLINGSON, B. M., HASHIMOTO, N., POLLACK, I. F., BRANDES, A. A., FRANCESCHI, E., HEROLD-MENDE, C., NAYAK, L., PANIGRAHY, A., POPE, W. B., PRINS, R., SAMPSON, J. H., WEN, P. Y. & REARDON, D. A. 2015. Immunotherapy response assessment in neuro-oncology: a report of the RANO working group. *Lancet Oncol*, 16, e534-e542.
- OPRITA, A., BALOI, S. C., STAICU, G. A., ALEXANDRU, O., TACHE, D. E., DANOIU, S., MICU, E. S. & SEVASTRE, A. S. 2021. Updated Insights on EGFR Signaling Pathways in Glioma. *Int J Mol Sci*, 22.
- OSSWALD, M., JUNG, E., SAHM, F., SOLECKI, G., VENKATARAMANI, V., BLAES, J., WEIL, S., HORSTMANN, H., WIESTLER, B., SYED, M., HUANG, L., RATLIFF, M., KARIMIAN JAZI, K., KURZ, F. T., SCHMENGER, T., LEMKE, D., GOMMEL, M., PAULI, M., LIAO, Y., HARING, P., PUSCH, S., HERL, V., STEINHAUSER, C., KRUNIC, D., JARAHIAN, M., MILETIC, H., BERGHOFF, A. S., GRIESBECK, O., KALAMAKIS, G., GARASCHUK, O., PREUSSER, M., WEISS, S., LIU, H., HEILAND, S., PLATTEN, M., HUBER, P. E., KUNER, T., VON DEIMLING, A., WICK, W. & WINKLER, F. 2015. Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network. *Nature*, 528, 93-8.

- OSTROM, Q. T., GITTLEMAN, H., FARAH, P., ONDRACEK, A., CHEN, Y., WOLINSKY, Y., STROUP, N. E., KRUCHKO, C. & BARNHOLTZ-SLOAN, J. S. 2013. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro Oncol*, 15 Suppl 2, ii1-56.
- OSTROM, Q. T., PRICE, M., NEFF, C., CIOFFI, G., WAITE, K. A., KRUCHKO, C. & BARNHOLTZ-SLOAN, J. S. 2022. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2015-2019. *Neuro Oncol*, 24, v1-v95.
- OZDAMAR, B., BOSE, R., BARRIOS-RODILES, M., WANG, H. R., ZHANG, Y. & WRANA, J. L. 2005. Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity. *Science*, 307, 1603-9.
- PACK, G. T. 1950. Note on the experimental use of rabies vaccine for melanomatosis. *AMA Arch Derm Syphilol*, 62, 694-5.
- PARSA, A. T., WALDRON, J. S., PANNER, A., CRANE, C. A., PARNEY, I. F., BARRY, J. J., CACHOLA, K. E., MURRAY, J. C., TIHAN, T., JENSEN, M. C., MISCHEL, P. S., STOKOE, D. & PIEPER, R. O. 2007. Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nature medicine*, 13, 84-88.
- PHILLIPS, A. C., BOGHAERT, E. R., VAIDYA, K. S., MITTEN, M. J., NORVELL, S., FALLS, H. D., DEVRIES, P. J., CHENG, D., MEULBROEK, J. A., BUCHANAN, F. G., MCKAY, L. M., GOODWIN, N. C. & REILLY, E. B. 2016. ABT-414, an Antibody-Drug Conjugate Targeting a Tumor-Selective EGFR Epitope. *Mol Cancer Ther*, 15, 661-9.
- PLATE, K. H., BREIER, G., WEICH, H. A., MENNEL, H. D. & RISAU, W. 1994. Vascular endothelial growth factor and glioma angiogenesis: coordinate induction of VEGF receptors, distribution of VEGF protein and possible in vivo regulatory mechanisms. *Int J Cancer*, 59, 520-9.
- PLATTEN, M., WICK, W. & WELLER, M. 2001. Malignant glioma biology: role for TGF-beta in growth, motility, angiogenesis, and immune escape. *Microsc Res Tech*, 52, 401-10.
- PLATTEN, M., WICK, W., WILD-BODE, C., AULWURM, S., DICHGANS, J. & WELLER, M. 2000. Transforming growth factors beta(1) (TGF-beta(1)) and TGF-beta(2) promote glioma cell migration via Up-regulation of alpha(V)beta(3) integrin expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 268, 607-11.
- QI, S., SONG, Y., PENG, Y., WANG, H., LONG, H., YU, X., LI, Z., FANG, L., WU, A., LUO, W., ZHEN, Y., ZHOU, Y., CHEN, Y., MAI, C., LIU, Z. & FANG, W. 2012. ZEB2 mediates multiple pathways regulating cell proliferation, migration, invasion, and apoptosis in glioma. *PLoS One*, 7, e38842.
- QUINTERO-FABIAN, S., ARREOLA, R., BECERRIL-VILLANUEVA, E., TORRES-ROMERO, J. C., ARANA-ARGAEZ, V., LARA-RIEGOS, J., RAMIREZ-CAMACHO, M. A. & ALVAREZ-SANCHEZ, M. E. 2019. Role of Matrix Metalloproteinases in Angiogenesis and Cancer. *Front Oncol*, 9, 1370.

- RAFII, S., KANDOUSI, S., GHOZLANI, A., NAJI, O., REDDY, K. P., ULLAH SADIQI, R. & BADOU, A. 2023. Deciphering immune microenvironment and cell evasion mechanisms in human gliomas. *Front Oncol*, 13, 1135430.
- RAN, F. A., HSU, P. D., LIN, C. Y., GOOTENBERG, J. S., KONERMANN, S., TREVINO, A. E., SCOTT, D. A., INOUE, A., MATOBA, S., ZHANG, Y. & ZHANG, F. 2013a. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 154, 1380-9.
- RAN, F. A., HSU, P. D., WRIGHT, J., AGARWALA, V., SCOTT, D. A. & ZHANG, F. 2013b. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*, 8, 2281-2308.
- RIDLEY, A. J., SCHWARTZ, M. A., BURRIDGE, K., FIRTEL, R. A., GINSBERG, M. H., BORISY, G., PARSONS, J. T. & HORWITZ, A. R. 2003. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, 302, 1704-9.
- RIES, C. 2014. Cytokine functions of TIMP-1. *Cell Mol Life Sci*, 71, 659-72.
- ROBERTS, A. B., KIM, S. J., NOMA, T., GLICK, A. B., LAFYATIS, R., LECHLEIDER, R., JAKOWLEW, S. B., GEISER, A., O'REILLY, M. A., DANIELPOUR, D. & ET AL. 1991. Multiple forms of TGF-beta: distinct promoters and differential expression. *Ciba Found Symp*, 157, 7-15; discussion 15-28.
- ROBERTSON, I. B., HORIGUCHI, M., ZILBERBERG, L., DABOVIC, B., HADJIOLOVA, K. & RIFKIN, D. B. 2015. Latent TGF-beta-binding proteins. *Matrix Biol*, 47, 44-53.
- ROY, L. O., POIRIER, M. B. & FORTIN, D. 2018. Differential Expression and Clinical Significance of Transforming Growth Factor-Beta Isoforms in GBM Tumors. *Int J Mol Sci*, 19.
- RUSTENHOVEN, J., AALDERINK, M., SCOTTER, E. L., OLDFIELD, R. L., BERGIN, P. S., MEE, E. W., GRAHAM, E. S., FAULL, R. L., CURTIS, M. A., PARK, T. I. & DRAGUNOW, M. 2016. TGF-beta1 regulates human brain pericyte inflammatory processes involved in neurovasculature function. *J Neuroinflammation*, 13, 37.
- SANCHEZ-ELSNER, T., BOTELLA, L. M., VELASCO, B., CORBI, A., ATTISANO, L. & BERNABEU, C. 2001. Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor-beta pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression. *J Biol Chem*, 276, 38527-35.
- SHELLER, J., CHALARIS, A., SCHMIDT-ARRAS, D. & ROSE-JOHN, S. 2011. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*, 1813, 878-88.
- SCRIBNER, E. & FATHALLAH-SHAYKH, H. M. 2017. Single Cell Mathematical Model Successfully Replicates Key Features of GBM: Go-Or-Grow Is Not Necessary. *PloS one*, 12, e0169434-e0169434.
- SEOANE, J. & GOMIS, R. R. 2017. TGF-beta Family Signaling in Tumor Suppression and Cancer Progression. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 9.
- SHEEN, Y. Y., KIM, M. J., PARK, S. A., PARK, S. Y. & NAM, J. S. 2013. Targeting the Transforming Growth Factor-beta Signaling in Cancer Therapy. *Biomol Ther (Seoul)*, 21, 323-31.

- SHI, M., ZHU, J., WANG, R., CHEN, X., MI, L., WALZ, T. & SPRINGER, T. A. 2011. Latent TGF-beta structure and activation. *Nature*, 474, 343-9.
- SINGH, M., RAGHAV, A. & GAUTAM, K. A. 2022. Role of the circulatory interleukin-6 in the pathogenesis of gliomas: A systematic review. *World J Methodol*, 12, 428-437.
- STEMMER, M., THUMBERGER, T., DEL SOL KEYER, M., WITTBRODT, J. & MATEO, J. L. 2015. CCTop: An Intuitive, Flexible and Reliable CRISPR/Cas9 Target Prediction Tool. *PLoS One*, 10, e0124633.
- STUPP, R., TAILLIBERT, S., KANNER, A., READ, W., STEINBERG, D., LHERMITTE, B., TOMS, S., IDBAIH, A., AHLUWALIA, M. S., FINK, K., DI MECO, F., LIEBERMAN, F., ZHU, J. J., STRAGLIOTTO, G., TRAN, D., BREM, S., HOTTINGER, A., KIRSON, E. D., LAVY-SHAHAF, G., WEINBERG, U., KIM, C. Y., PAEK, S. H., NICHOLAS, G., BRUNA, J., HIRTE, H., WELLER, M., PALTI, Y., HEGI, M. E. & RAM, Z. 2017. Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*, 318, 2306-2316.
- THAKKAR, J. P., DOLECEK, T. A., HORBINSKI, C., OSTROM, Q. T., LIGHTNER, D. D., BARNHOLTZ-SLOAN, J. S. & VILLANO, J. L. 2014. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 23, 1985-96.
- THANGADA, S., KHANNA, K. M., BLAHO, V. A., OO, M. L., IM, D.-S., GUO, C., LEFRANCOIS, L. & HLA, T. 2010. Cell-surface residence of sphingosine 1-phosphate receptor 1 on lymphocytes determines lymphocyte egress kinetics. *The Journal of experimental medicine*, 207, 1475-1483.
- THIERY, J. P. 2002. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 2, 442-54.
- THOMAS, D. A. & MASSAGUE, J. 2005. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell*, 8, 369-80.
- TIAN, M., CHEN, L., MA, L., WANG, D., SHAO, B., WU, J., WU, H. & JIN, Y. 2016. Expression and prognostic significance of CCL11/CCR3 in glioblastoma. *Oncotarget*, 7, 32617-27.
- TSENG, D., VASQUEZ-MEDRANO, D. A. & BROWN, J. M. 2011. Targeting SDF-1/CXCR4 to inhibit tumour vasculature for treatment of glioblastomas. *Br J Cancer*, 104, 1805-9.
- TZAVLAKI, K. & MOUSTAKAS, A. 2020. TGF-beta Signaling. *Biomolecules*, 10.
- VENKATARAMANI, V., YANG, Y., SCHUBERT, M. C., REYHAN, E., TETZLAFF, S. K., WISSMANN, N., BOTZ, M., SOYKA, S. J., BERETTA, C. A., PRAMATAROV, R. L., FANKHAUSER, L., GAROFANO, L., FREUDENBERG, A., WAGNER, J., TANEV, D. I., RATLIFF, M., XIE, R., KESSLER, T., HOFFMANN, D. C., HAI, L., DORFLINGER, Y., HOPPE, S., YABO, Y. A., GOLEBIEWSKA, A., NICLOU, S. P., SAHM, F., LASORELLA, A., SLOWIK, M., DORING, L., IAVARONE, A., WICK, W., KUNER, T. & WINKLER, F. 2022. Glioblastoma hijacks neuronal mechanisms for brain invasion. *Cell*, 185, 2899-2917 e31.
- VENKATESH, H. S., MORISHITA, W., GERAGHTY, A. C., SILVERBUSH, D., GILLESPIE, S. M., ARZT, M., TAM, L. T., ESPENEL, C.,

- PONNUSWAMI, A., NI, L., WOO, P. J., TAYLOR, K. R., AGARWAL, A., REGEV, A., BRANG, D., VOGEL, H., HERVEY-JUMPER, S., BERGLES, D. E., SUVA, M. L., MALENKA, R. C. & MONJE, M. 2019. Electrical and synaptic integration of glioma into neural circuits. *Nature*, 573, 539-545.
- VERHAAK, R. G., HOADLEY, K. A., PURDOM, E., WANG, V., QI, Y., WILKERSON, M. D., MILLER, C. R., DING, L., GOLUB, T., MESIROV, J. P., ALEXE, G., LAWRENCE, M., O'KELLY, M., TAMAYO, P., WEIR, B. A., GABRIEL, S., WINCKLER, W., GUPTA, S., JAKKULA, L., FEILER, H. S., HODGSON, J. G., JAMES, C. D., SARKARIA, J. N., BRENNAN, C., KAHN, A., SPELLMAN, P. T., WILSON, R. K., SPEED, T. P., GRAY, J. W., MEYERSON, M., GETZ, G., PEROU, C. M., HAYES, D. N. & CANCER GENOME ATLAS RESEARCH, N. 2010. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*, 17, 98-110.
- VILLALBA, M., EVANS, S. R., VIDAL-VANACLOCHA, F. & CALVO, A. 2017. Role of TGF-beta in metastatic colon cancer: it is finally time for targeted therapy. *Cell Tissue Res*, 370, 29-39.
- WANG, J., YAO, L., ZHAO, S., ZHANG, X., YIN, J., ZHANG, Y., CHEN, X., GAO, M., LING, E. A., HAO, A. & LI, G. 2012. Granulocyte-colony stimulating factor promotes proliferation, migration and invasion in glioma cells. *Cancer Biol Ther*, 13, 389-400.
- WATKINS, S. & SONTHEIMER, H. 2011. Hydrodynamic cellular volume changes enable glioma cell invasion. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 31, 17250-17259.
- WELLER, M., VAN DEN BENT, M., PREUSSER, M., LE RHUN, E., TONN, J. C., MINNITI, G., BENDSZUS, M., BALANA, C., CHINOT, O., DIRVEN, L., FRENCH, P., HEGI, M. E., JAKOLA, A. S., PLATTEN, M., ROTH, P., RUDA, R., SHORT, S., SMITS, M., TAPHOORN, M. J. B., VON DEIMLING, A., WESTPHAL, M., SOFFIETTI, R., REIFENBERGER, G. & WICK, W. 2021. EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nat Rev Clin Oncol*, 18, 170-186.
- WELLER, M., WICK, W. & PLATTEN, M. 2001. Role of TGF-beta in oncogenesis. *Microsc Res Tech*, 52, 353.
- WESSELING, P., VAN DEN BENT, M. & PERRY, A. 2015. Oligodendroglioma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol*, 129, 809-27.
- WICK, A., DESJARDINS, A., SUAREZ, C., FORSYTH, P., GUEORGUIEVA, I., BURKHOLDER, T., CLEVERLY, A. L., ESTREM, S. T., WANG, S., LAHN, M. M., GUBA, S. C., CAPPER, D. & RODON, J. 2020. Phase 1b/2a study of galunisertib, a small molecule inhibitor of transforming growth factor-beta receptor I, in combination with standard temozolomide-based radiochemotherapy in patients with newly diagnosed malignant glioma. *Invest New Drugs*, 38, 1570-1579.
- WICK, W., BENDSZUS, M. & GOLDBRUNNER, R. 2021. Gliome, S2k-Leitlinie. *Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie*. Online: [www.dgn.org/leitlinien](http://www.dgn.org/leitlinien) (abgerufen am 14.06.2023).

- WICK, W., PLATTEN, M. & WELLER, M. 2001. Glioma cell invasion: regulation of metalloproteinase activity by TGF-beta. *J Neurooncol*, 53, 177-85.
- WINKLER, F., OSSWALD, M. & WICK, W. 2018. Anti-Angiogenics: Their Role in the Treatment of Glioblastoma. *Oncol Res Treat*, 41, 181-186.
- WIRSCHING, H. G., GALANIS, E. & WELLER, M. 2016. Glioblastoma. *Handb Clin Neurol*, 134, 381-97.
- WORKENHE, S. T. & MOSSMAN, K. L. 2014. Oncolytic virotherapy and immunogenic cancer cell death: sharpening the sword for improved cancer treatment strategies. *Mol Ther*, 22, 251-256.
- WORONIECKA, K., CHONGSATHIDKIET, P., RHODIN, K., KEMENY, H., DECHANT, C., FARBER, S. H., ELSAMADICY, A. A., CUI, X., KOYAMA, S., JACKSON, C., HANSEN, L. J., JOHANNIS, T. M., SANCHEZ-PEREZ, L., CHANDRAMOHAN, V., YU, Y.-R. A., BIGNER, D. D., GILES, A., HEALY, P., DRANOFF, G., WEINHOLD, K. J., DUNN, G. P. & FECCI, P. E. 2018. T-Cell Exhaustion Signatures Vary with Tumor Type and Are Severe in Glioblastoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 24, 4175-4186.
- WRANA, J. L. 2013. Signaling by the TGFbeta superfamily. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5, a011197.
- XU, J., WEI, C., WANG, C., LI, F., WANG, Z., XIONG, J., ZHOU, Y., LI, S., LIU, X., YANG, G., HAN, L., ZHANG, J. & ZHANG, S. 2024. TIMP1/CHI3L1 facilitates glioma progression and immunosuppression via NF-kappaB activation. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1870, 167041.
- YAMAGUCHI, H. & CONDEELIS, J. 2007. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochimica et biophysica acta*, 1773, 642-652.
- YANG, K., WU, Z., ZHANG, H., ZHANG, N., WU, W., WANG, Z., DAI, Z., ZHANG, X., ZHANG, L., PENG, Y., YE, W., ZENG, W., LIU, Z. & CHENG, Q. 2022. Glioma targeted therapy: insight into future of molecular approaches. *Mol Cancer*, 21, 39.
- YEO, E. C. F., BROWN, M. P., GARGETT, T. & EBERT, L. M. 2021. The Role of Cytokines and Chemokines in Shaping the Immune Microenvironment of Glioblastoma: Implications for Immunotherapy. *Cells*, 10.
- YUILE, P., DENT, O., COOK, R., BIGGS, M. & LITTLE, N. 2006. Survival of glioblastoma patients related to presenting symptoms, brain site and treatment variables. *J Clin Neurosci*, 13, 747-51.
- ZACHER, A., KAULICH, K., STEPANOW, S., WOLTER, M., KOHRER, K., FELSBURG, J., MALZKORN, B. & REIFENBERGER, G. 2017. Molecular Diagnostics of Gliomas Using Next Generation Sequencing of a Glioma-Tailored Gene Panel. *Brain Pathol*, 27, 146-159.
- ZAGZAG, D., SALNIKOW, K., CHIRIBOGA, L., YEE, H., LAN, L., ALI, M. A., GARCIA, R., DEMARIA, S. & NEWCOMB, E. W. 2005. Downregulation of major histocompatibility complex antigens in invading glioma cells: stealth invasion of the brain. *Lab Invest*, 85, 328-41.
- ZAPPA, C. & MOUSA, S. A. 2016. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Transl Lung Cancer Res*, 5, 288-300.
- ZENG, J., SEE, A. P., PHALLEN, J., JACKSON, C. M., BELCAID, Z., RUZEVICK, J., DURHAM, N., MEYER, C., HARRIS, T. J., ALBESIANO,

- E., PRADILLA, G., FORD, E., WONG, J., HAMMERS, H. J., MATHIOS, D., TYLER, B., BREM, H., TRAN, P. T., PARDOLL, D., DRAKE, C. G. & LIM, M. 2013. Anti-PD-1 blockade and stereotactic radiation produce long-term survival in mice with intracranial gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 86, 343-9.
- ZHANG, F. 2019. Development of CRISPR-Cas systems for genome editing and beyond. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 52.
- ZHANG, L., SATO, E., AMAGASAKI, K., NAKAO, A. & NAGANUMA, H. 2006. Participation of an abnormality in the transforming growth factor-beta signaling pathway in resistance of malignant glioma cells to growth inhibition induced by that factor. *J Neurosurg*, 105, 119-28.
- ZHANG, Q., GUO, W., DI, C., LOU, M., LI, H. & ZHAO, Y. 2017. Effects of transforming growth factor-beta inhibitor on the proliferation of glioma stem/progenitor cell. *Pol J Pathol*, 68, 312-317.
- ZHANG, Y., JIN, T., DOU, Z., WEI, B., ZHANG, B. & SUN, C. 2022. The dual role of the CD95 and CD95L signaling pathway in glioblastoma. *Front Immunol*, 13, 1029737.
- ZHANG, Y., XU, L., LI, A. & HAN, X. 2019. The roles of ZEB1 in tumorigenic progression and epigenetic modifications. *Biomed Pharmacother*, 110, 400-408.
- ZHANG, Y. E. 2017. Non-Smad Signaling Pathways of the TGF-beta Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 9.
- ZHU, X., SHI, G., LU, J., QIAN, X. & WANG, D. 2022. Potential regulatory mechanism of TNF-alpha/TNFR1/ANXA1 in glioma cells and its role in glioma cell proliferation. *Open Life Sci*, 17, 208-220.



## **7 Erklärung zum Eigenanteil**

Die Arbeit wurde am Hertie-Institut für Klinische Hirnforschung unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. Ulrike Naumann durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Frau Prof. Dr. Ulrike Naumann.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Frau Prof. Dr. Ulrike Naumann und Dr. rer. nat. Nikhil Ranjan eigenständig von mir durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte ebenfalls eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig unter der Korrektur von Frau Prof. Dr. Naumann verfasst zu haben und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 17.10.2024

## 8 Veröffentlichungen

1. Merk, L., Regel, K., Eckhardt, H., Evers, M., El-Ayoubi, A., Mittelbronn, M., Krüger, M., Gérardy, J.-J., Mack, A. F., & Naumann, U. (2024). Blocking TGF- $\beta$ - and Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT)-mediated activation of brain pericytes in glioblastoma impacts tumor angiogenesis. *Free Neuropathology*, 5, 4.  
<https://doi.org/10.17879/freeneuropathology-2024-5188>

# 9 Anhang

A

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N		
Each antibody is spotted in duplicate vertically	1	POS	POS	NEG	NEG	BLANK	Ax1	BLC (CXCL13)	CD30 Ligand (TNFSF8)	CD30 (TNFRSF8)	CD40 (TNFRSF5)	CRG-2	CTACK (CCL27)	CXCL16	Eotaxin-1 (CCL11)	
	3	Eotaxin-2 (CCL24)	Fas Ligand (TNFSF6)	Fractalkine (CXCL1)	G-CSF	GM-CSF	IFN-gamma	IGFBP-3	IGFBP-5	IGFBP-6	IL-1 alpha (IL-1 F1)	IL-1 beta (IL-1 F2)	IL-2	IL-3	IL-3 R beta	
	5	IL-4	IL-5	IL-6	IL-9	IL-10	IL-12 p40/p70	IL-12 p70	IL-13	IL-17A	KC (CXCL1)	Leptin R	Leptin	LIX	L-Selectin (CD62L)	
	7	Itn (XCL1)	MCP-1 (CCL2)	MCP-5	M-CSF	MIG (CXCL9)	MIP-1 alpha (CCL3)	MIP-1 gamma	MIP-2	MIP-3 beta (CCL19)	MIP-3 alpha (CCL20)	PF-4 (CXCL4)	P-Selectin	RAHES (CCL5)	SCF	
	9	SDF-1 alpha	TARC (CCL17)	I-309 (TCA-3/CCL1)	TECK (CCL25)	TIMP-1	TNF alpha	TNF RI (TNFRSF1A)	TNF RII (TNFRSF1B)	TPO	VCAM-1 (CD106)	VEGF-A	BLANK	BLANK	POS	
	10															

B

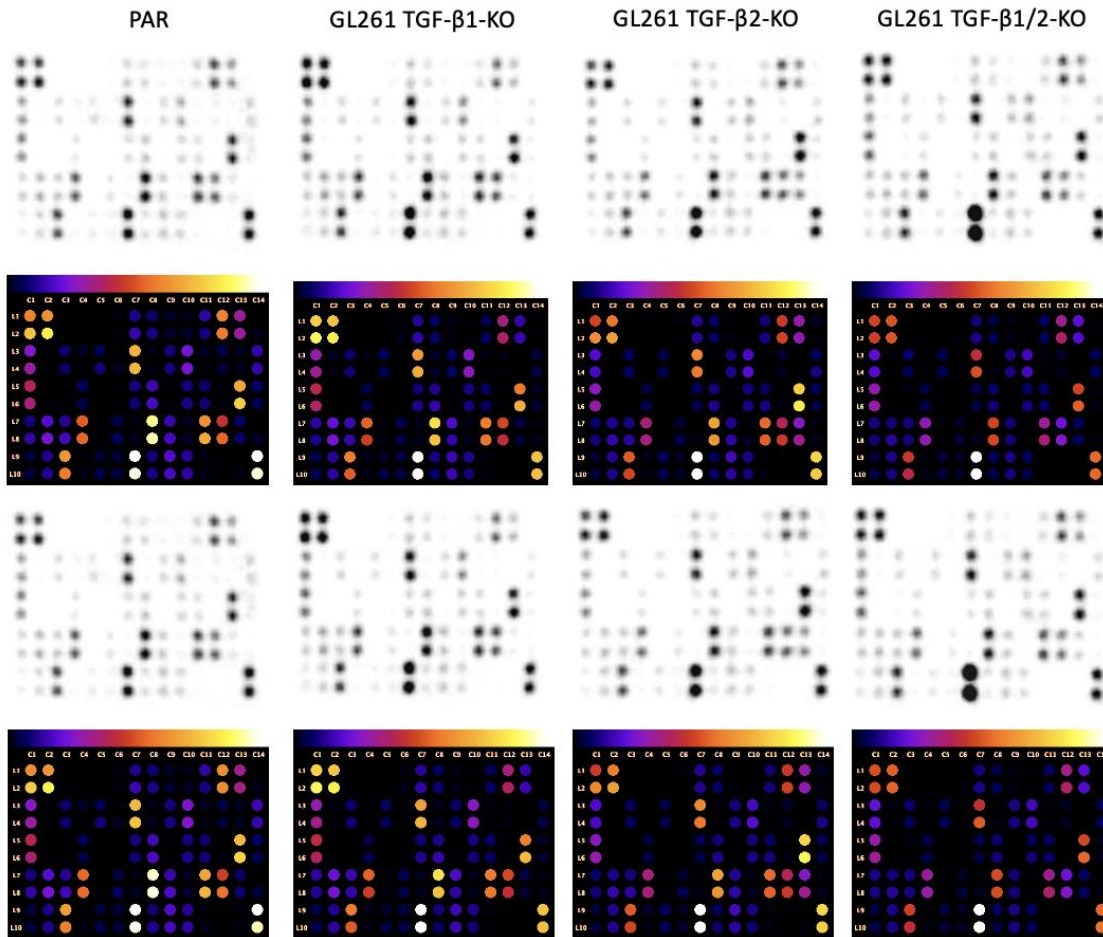


Abbildung 21: Zytokin-Array

A: Array-Karte B: Array-Aufnahmen und darunter Densitometriedaten erstellt mit ImageJ (n=4)

Tabelle 1: Übersicht über die Funktionen der untersuchten Zytokine

Zytokin	Weitere Informationen / Funktionen	Anti-/ Proinflamma tion	Immun- modulation	Anti-/Pro- Angiogen	Proliferation, Migration, Invasion
Axl	- Hochreguliert im GBM - fördert EMT - spielt eine wichtige Rolle in der Therapieresistenz des GBM - TGF- $\beta$ reguliert AXL hoch	Anti	Verminderte angeborene Immunantwort	Pro	P+, M+, I+
BLC (CXCL13)	- fördert Chemotaxis, Differenzierung zu Plasmazellen und B-Gedächtniszellen - Mediator von TAM-Immunität im GBM	Pro	Aktiviert das Immunsystem	-	P+, M+, I+
CD30 Ligand (TNFSF8)	- Herabregulation von CD30(L) in vivo führt zu vermehrtem Tumorwachstum und Akkumulation von TAMs	Pro	Aktiviert das Immunsystem	-	-
CD30 (TNFRSF8)	- Herabregulation von CD30(L) in vivo führt zu vermehrtem Tumorwachstum und Akkumulation von TAMs	Pro	Aktiviert das Immunsystem	-	-
CD40 (TNFRSF5)	- Kostimulator von B-Zellen, Dendritischen Zellen und soliden Tumorzellen	Pro	Verstärkte Immunantwort	-	-
CRG-2 (CXCL10)	- getriggert durch Gamma-Interferon - wirkt als Chemokin im adaptiven Immunsystem - im GBM hochreguliert	Pro	Verstärkte Immunantwort	-	-
CTACK (CCL27)	- wirkt chemotaktisch auf T-Gedächtniszellen - über die CCL27-CCR10-Achse wird p-Akt im GBM aktiviert	Pro	Verstärkte Immunantwort	-	P+, I+
CXCL16	- Im GBM überexprimiert - Chemokin zur Wanderung und Mobilisierung von T-Lymphozyten über den Rezeptor CXCR6	Anti	Abgeschwächte Immunantwort durch Aktivierung von TAMs	-	P+/-, M+, I+
Eotaxin-1 (CCL11)	- Chemokin für Eosinophile, Aktiviert Mikrogliazellen - bindet an CCR2, CCR3 und CCR5	Pro	Verstärkte Immunantwort	Pro	P+, M+, I+
Eotaxin-2 (MPIF-2/CCL24)	- Chemokin für Eosinophile - bindet an CCR3	Pro	Verstärkte Immunantwort	-	-

Zytokin	Weitere Informationen / Funktionen	Anti-/ Proinflamma- tion	Immun- modulation	Anti-/Pro- Angiogen	Proliferation, Migration, Invasion
	- im GBM nicht überexprimiert				
Fas Ligand (TNFSF6)	- Apoptoseinduktion - im GBM überexprimiert	Pro	-	-	-
Fractalkine (CX3CL1)	- Chemokin für T-Zellen und Monozyten, Mikrogliazellen - wird von TGF- $\beta$ 1 moduliert - beeinflusst negativ die Invasion von GBM-Zellen	Pro	Verstärkte Immunantwort	-	I-
G-CSF	- regt die Bildung von Granulozyten an -wirkt chemotaktisch auf reife neutrophile Granulozyten - Shift der Lymphopoese zur Granulopoese -> Immunsuppression - im GBM überexprimiert	Pro	Abgeschwächte Immunantwort	-	P+, M+, I+
GM-CSF	- dient der Differenzierung von Makrophagen und Granulozyten - wird vom GBM überexprimiert zur Immunsuppression - Shift der Lymphopoese zur Granulopoese	Pro	Abgeschwächte Immunantwort	-	-
IFN- $\gamma$	- Antivirale Aktivität - Immunregulierende Funktionen - Aktiviert Makrophagen - induziert die Expression von PD- L1 auf GL261-Zellen in vitro	Pro	Verstärkte Immunantwort	-	-
IGFBP-3	- Transportprotein für den Wachstumsfaktor IGF - induziert PD-L1 Expression auf GBM-Zellen - wird durch TGF- $\beta$ hochreguliert in einem positiven Feedbackloop	-	Abgeschwächte Immunantwort	-	P+, M+, I+
IGFBP-5	- Transportprotein für den Wachstumsfaktor IGF - wirkt positiv auf Invasion und negativ auf Proliferation über EMT-	-	-	-	P-, I+

Zytokin	Weitere Informationen / Funktionen	Anti-/ Proinflammation	Immuno- modulation	Anti-/Pro- Angiogen	Proliferation, Migration, Invasion
	Prozesse und Akt-Pathway-Aktivierung				
IGFBP-6	- Transportprotein für den Wachstumsfaktor IGF-1 - bei Überexpression verminderte Migration von GBM-Zellen	-	-	-	M-
IL-1 alpha (IL-1 F1)	- induziert Apoptose - involviert in verschiedene Vorgänge der Immunantwort, Entzündung und Hämatopoese	Pro	Verstärkte Immunantwort	-	-
IL-1 beta (IL-1 F2)	- Induziert Entzündungsantwort - beteiligt an verschiedenen zellulären Aktivitäten (Differenzierung, Apoptose, Angiogenese, Proliferation) - starker Induktor der Expression von VEGF und MMPs	Pro	- Einstrom und Aktivierung von Neutrophilen - Induziert T- und B- Zell Aktivierung	Pro	P+
IL-2	- reguliert die Proliferation von T- und B-Lymphozyten - stimuliert B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen und GBM-Zellen	Pro	Verstärkte Immunantwort	-	-
IL-3 / IL-3 (R)	- wachstumsfördernd, involviert in Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose	Pro	Verstärkte Immunantwort	-	-
IL-4	- weitreichende immunmodulatorische Funktionen - wird nicht von GL261-Zellen exprimiert	Pro/Anti	Variable Immunantwort	-	-
IL-5	- Wachstums- und Differenzierungsfaktor für B-Zellen und Eosinophile - wird nicht von GL261-Zellen exprimiert	Pro	Verstärkte Immunantwort	-	-
IL-6	- Induktor der Akute-Phase Reaktion - B-Zell-Reifung	Pro	Verstärkte / Abgeschwächte Immunantwort	-	P+, M+, I+

Zytokin	Weitere Informationen / Funktionen	Anti-/ Proinflammation	Immun- modulation	Anti-/Pro- Angiogen	Proliferation, Migration, Invasion
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- weitreichende Prozesse der Immunität, Metabolismus und Regeneration</li> <li>- spielt eine wichtige Rolle in der Immunsuppression im GBM</li> </ul>				
IL-9	<ul style="list-style-type: none"> <li>- reguliert die Hämatopoese</li> <li>- vor allem wird es von CD4+-Zellen exprimiert</li> <li>- keine Expression in GL261-Zellen</li> </ul>	Pro	Verstärkte Immunantwort	-	P+
IL-10	<ul style="list-style-type: none"> <li>- B-Zell Proliferation, Überleben, Antikörper-Produktion</li> <li>- GBM-Zellen exprimieren IL-10R auf ihrer Oberfläche</li> </ul>	Pro/Anti	Verstärkte / Abgeschwächte Immunantwort	-	P+, M+, I+
IL-12 p40/p70	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Wachstumsfaktor für aktivierte T- und NK-Zellen</li> <li>- induziert die Bildung von Th1-Zellen</li> </ul>	Pro/Anti	Verstärkte / Abgeschwächte Immunantwort	-	-
IL-12 p70	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Wachstumsfaktor für aktivierte T- und NK-Zellen</li> <li>- induziert die Bildung von Th1-Zellen</li> </ul>	Pro/Anti	Verstärkte / Abgeschwächte Immunantwort	-	-
IL-13	<ul style="list-style-type: none"> <li>- B-Zell-Reifung und Differenzierung</li> <li>- Runterregulation der Makrophagenaktivität</li> <li>- Inhibiert die Produktion inflammatorischer Zytokine</li> <li>- in Anwesenheit von EGFRvIII fördert IL-13 die Proliferation</li> </ul>	Anti	Abgeschwächte Immunantwort	-	P+
IL-17A	<ul style="list-style-type: none"> <li>- weitreichende immunologische Funktionen proinflammatorischer Art</li> <li>- aktiviert Pi3K/Akt -Pathway</li> </ul>	Pro	Verstärkte Immunantwort	-	M+, I+
KC (CXCL-1)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Chemokin für Neutrophile</li> <li>- Aberrante Expression ist assoziiert mit Wachstum und Progression von Tumoren</li> <li>- dient der Immunevasion im GBM</li> <li>- induziert EMT-Prozesse im GBM</li> </ul>	Pro	Abgeschwächte Immunantwort im Tumor	Pro	P+, M+, I+
Leptin	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Regulation des Energiehaushalts</li> <li>- hemmt NK-Zellen</li> </ul>	Pro	Verstärkte Immunantwort	Pro	P+, M+, I+

Zytokin	Weitere Informationen / Funktionen	Anti-/ Proinflamma- tion	Immun- modulation	Anti-/Pro- Angiogen	Proliferation, Migration, Invasion
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- aktiviert T-Zellen und Monozyten</li> <li>- stimuliert B-Zellen Produktion und Zytokinausschüttung</li> <li>- Leptin-R überexprimiert auf GBM-Zellen</li> </ul>				
LIX	<ul style="list-style-type: none"> <li>- beteiligt an der Immunantwort</li> <li>- wirkt chemotaktisch auf Neutrophile</li> </ul>	Pro	Abgeschwächte Immunantwort im Tumor	Pro	P+, M+, I+
L-Selectin (CD62L)	- Adhäsion von Lymphozyten bei einer Immunreaktion	Pro	Verstärkte Immunantwort	-	-
Lymphotactin (XCL1)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Chemokin für Lymphozyten</li> <li>- verstärkte Expression im GBM</li> </ul>	Pro	Verstärkte Immunantwort	-	-
MCP-1 (CCL2)	. Chemokin für Neutro- und Basophile	Pro/Anti	Immunevasion im GBM	-	-
MCP-5	-Chemokin für Neutrophile, Eosinophile und Lymphozyten	Pro	Verstärkte Immunantwort	-	-
M-CSF	<ul style="list-style-type: none"> <li>- kontrolliert die Produktion, Differenzierung und Funktion von Makrophagen</li> <li>- fördert die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine</li> <li>- fördert IGF-1 Freisetzung und somit Angiogenese im GBM</li> </ul>	Pro	Verstärkte Immunantwort	Pro	-
MIG (CXCL9)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Involviert in die zelluläre Transportsignalkaskade von T-Zellen</li> <li>- aktiviert T-Lymphozyten</li> <li>- Überexprimiert im GBM</li> </ul>	Pro/Anti	Verstärkte Immunantwort	-	P+, I+
MIP-1 alpha (CCL3)	- an Entzündungsprozessen beteiligt, bindet Leukozyten	Pro	Verstärkte Immunantwort	-	-
MIP-1 gamma	- an Entzündungsprozessen beteiligt	Pro	Verstärkte Immunantwort	-	-
MIP-3 beta (CCL19)	- an Entzündungsprozessen beteiligt	Pro	Verstärkte Immunantwort	-	-

Zytokin	Weitere Informationen / Funktionen	Anti-/ Proinflammation	Immun- modulation	Anti-/Pro- Angiogen	Proliferation, Migration, Invasion
	- Chemokin für T-Gedächtniszelle und Dendritische Zellen				
MIP-3 alpha (CCL20)	- an Entzündungsprozessen beteiligt - Chemokin für Lymphozyten und Neutrophile - im GBM hochreguliert - Reguliert HIF-1 alpha hoch über NF-kappa B	Pro	Verstärkte Immunantwort	Pro	-
PF4 (CXCL4)	- Beteiligt an der Immunantwort - Chemokin dient als zelluläres Warnsignal	Pro	Verstärkte Immunantwort	Anti	-
P-Selectin	- vermittelt Zelladhäsion von Leukozyten an Endothelzellen	-	-	-	P+, I+
RANTES (CCL-5)	- Chemokin für Monozyten, T-Helferzellen und Eosinophile - Histaminfreisetzung aus Basophilen	Pro	-	-	I+
SCF	- fördert Proliferation, Migration und Überleben von hämatopoetischen Vorläuferzellen	-	-	Pro	-
SDF-1 alpha (CXCL-12 alpha)	- Chemokin für Monozyten und T-Lymphozyten - Entzündungsreaktion - Tumorwachstum und Metastasierung	Pro	Verstärkte Immunantwort	Pro	P+
TNF RI (TNFRSF1A)	- beteiligt an der Apoptose und Entzündungsvorgängen - aktiviert Endothelzellen - nicht auf GL261-Zellen	-	-	Pro	-
TNF RII (TNFRSF1B)	- beteiligt an der Apoptose und Entzündungsvorgängen	-	-	-	-
TARC (CCL17)	- Chemokin für T-Lymphozyten - Beteiligt an der T-Zell-Reifung	Pro/Anti	Verstärkte Immunantwort	-	-
I-309 (TCA-3/CCL1)	- Chemokin für Monozyten	Pro	Verstärkte Immunantwort	-	-

Zytokin	Weitere Informationen / Funktionen	Anti-/ Proinflammation	Immun- modulation	Anti-/Pro- Angiogen	Proliferation, Migration, Invasion
TECK (CCL25)	- Chemokin für Thymozyten, Dendritische Zellen und Makrophagen - Beteiligt an der T-Zell-Reifung	Pro	Verstärkte Immunantwort	-	-
TIMP-1	- MMP-Hemmung	-	-	-	I-
TNF-alpha	- Regulation mehrerer biologischer Prozesse (Differenzierung, Apoptose, Lipidmetabolismus, Gerinnung)	Pro	-	-	P+
Thrombopoietin (TPO)	- Beeinflusst die Megakaryozyten- Reifung und Thrombopoese	-	-	-	-
VCAM-1 (CD106)	- hauptsächlich von Endothelzellen sezerniert - bedingt die Adhäsion von Lymphozyten, Monozyten und Eosinophilen an die Gefäßwand	-	-	Pro	-
VEGF-A	- induziert Endothelzellproliferation - hemmt Apoptose - induziert Permeabilisierung von Blutgefäßen - im GBM hochreguliert	-	-	Pro	M+

## 10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Erstellung dieser Dissertation in vielfältiger Weise unterstützt haben. Ohne ihre Hilfe, ihren Rat und ihre Ermutigung wäre dieses Projekt nicht möglich gewesen.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin und Doktormutter, Frau Prof. Dr. rer. nat. Ulrike Naumann, für ihre unermüdliche Unterstützung, ihre wertvollen Ratschläge und ihre Geduld während meiner Forschungsarbeit. Ihre wissenschaftliche Expertise und ihr beständiger Ansporn haben diese Arbeit maßgeblich geprägt. Ebenso danke ich Herrn Dr. rer. nat. Nikhil Ranjan für seine kontinuierliche Unterstützung, seine wertvollen wissenschaftlichen Anregungen und seine stets hilfreichen Ratschläge, die ebenfalls maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Auch bei meinen Kolleginnen und Kollegen im Labor möchte ich mich herzlich bedanken, insbesondere bei Moritz, Leonie, Ali, Luisa, Jakob, Marietheres und Jasmin, für die hervorragende Zusammenarbeit, den wertvollen Austausch und ihre tatkräftige Unterstützung während der Experimente.

Mein Dank gilt auch der Medizinischen Fakultät Tübingen, dem IZKF-Promotionskolleg sowie der Stiftung der Deutschen Wirtschaft für ihre finanzielle und ideelle Förderung, die diese Arbeit ermöglicht haben.

Besonders dankbar bin ich meiner Familie, die mich während der gesamten Zeit bedingungslos unterstützt hat. Ihre Liebe und ihr Zuspruch haben mir immer wieder neue Kraft gegeben. Ebenso danke ich meinen Freunden für ihr Verständnis und ihre Geduld in Zeiten, in denen ich nur wenig Zeit für sie hatte. Ein besonderer Dank geht an Lisa, die mir in schlaflosen Nächten und schwierigen Momenten Kraft und Unterstützung geschenkt und mit viel Verständnis die langen Arbeitsstunden mit mir durchgestanden hat.

Allen genannten und ungenannten Unterstützern danke ich von Herzen für ihren wertvollen Beitrag zum Erfolg dieser Arbeit.

