Aus der Abteilung für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie (Prof. Dr. med. C. M. Kramm) der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Untersuchung der therapeutischen Wirkmechanismen von Kurkumin in diffus intrinsischen Ponsgliomen in Abhängigkeit vom Mutationsstatus im *H3F3A*-Histongen (H3.3K27M-Mutation)

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Johanna Zastrow ^{aus}

Wernigerode, Deutschland

Göttingen 2021

DI	1
	znn.
IJU	vall.

Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer:	Prof. Dr. med. C. M. Kramm
Ko-Betreuerin:	Prof. Dr. med. E. Heßmann

Prüfungskommission

Referent:	Prof. Dr. med. Christof M. Kramm
Ko-Referentin:	Prof. Dr. med. Elisabeth Heßmann
Promotor:	Prof. Dr. med. Ralf Dressel

Datum der mündlichen Prüfung: 18.10.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Untersuchung der therapeutischen Wirkmechanismen von Kurkumin in diffus intrinsischen Ponsgliomen in Abhängigkeit vom Mutationsstatus im *H3F3A*-Histongen (H3.3K27M-Mutation)" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 23.12.2021

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

A	bbil	dungsverzeichnis	4
T	abel	lenverzeichnis	5
A	bküı	rzungsverzeichnis	6
1	E	Einleitung	1
	1.1	Pädiatrische hochgradige Gliome	1
	1.2	Epigenetische Regulationsmechanismen	5
		1.2.1Histonmodifikationen	5
		1.2.2H3.3K27M-Mutation und deren Relevanz in DIPG	7
	1.3	Kurkumin als therapeutisches Adjuvans	9
	1.4	Ziel der Studie	
2	N	Aaterial und Methoden	13
	2.1	Material	13
		2.1.1Zelllinien und Kulturmedien	13
		2.1.2Instrumente und Geräte	15
		2.1.3Verbrauchsgegenstände	16
		2.1.4Chemikalien und Reagenzien	16
	,	2.1.5Enzyme und Antikörper	
		2.1.6Kommerzielle Kits	21
		2.1.7Software	
	2.2	Methoden	
	,	2.2.1Zellkultur und Kurkuminbehandlung	
		2.2.23-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid	(MTT)-
	,	Zellviabilitätsanalyse	
		2.2.3Sphärenformations-Analyse	23
		2.2.4Kolonieformations-Analyse	

	2.2.5Propidiumiodid-Durchflusszytometrie (PI-FACS)	
	2.2.6Proteinisolation und Bestimmung der Proteinkonzentrationen	25
	2.2.7Western-Blot-Analysen	
	2.2.8RNA-Isolation und Sequenzierung	
	2.2.9Statistische Analyse	
3	Ergebnisse	30
	3.1 Kurkumin induziert Zytotoxizität unabhängig vom H3.3-Mutationsstatus.	
	3.2 Kurkumin induziert unterschiedliche Effekte auf die Genexpression in i H3WT- und -H3.3K27M-Zellen	soUGO-2- 32
	3.3 Kurkumin erhöht die H3K27-Trimethylierungslevel in isoUGO-H3.3K2 und reduziert die H3K27-Acetylierungslevel in isoUGO-Zellen unabhängig v Mutationsstatus	27M-Zellen 70m H3.3- 37
	3.4 Kurkumin reduziert das Selbsterneuerungspotential und die Prolifer isoUGO-Zellen weitestgehend unabhängig vom H3.3-Mutationsstatus	ation von 41
	3.5 Kurkumin induziert Zellzyklusarrest und programmierte Zelltodmecha isoUGO-Zellen	nismen in
	3.5.1Kurkumin induziert Apoptose und inhibiert die Zellzyklusprogression isoUGO-H3WT-Zellen	verstärkt in 44
	3.5.2Kurkumin induziert Autophagie in isoUGO-Zellen	
	3.6 Kurkumin reguliert die Expression Wnt-Signalweg-assoziierter Gene in i H3.3K27M-Zellen	soUGO-2-
	3.7 Kurkumin reduziert die <i>MYC</i> -Expression in isoUGO-2-Zellen	53
	3.8 Kurkumin induziert die Expression antiinflammatorischer und red Expression proinflammatorischer Gene verstärkt in isoUGO-2-H3.3K27M-Zelle	uziert die n54
4	Diskussion	56
	4.1 Kurkumin stellt die verminderten H3K27me3-Level in isoUGO-H3.3K2 wieder her und reduziert die H3K27ac-Level in isoUGO-Zellen unabhängig Mutationsstatus	?7M-Zellen vom H3.3- 58
	4.2 Kurkumin reduziert das Selbsterneuerungs- und Proliferationspotential von Zellen unabhängig vom H3.3-Mutationsstatus	1 isoUGO- 60

6	Lit	teraturverzeichnis	77
5	Zu	isammenfassung	75
	4.6	Vor- und Nachteile des Einsatzes von Kurkumin als Therapieadjuvans	73
	4.5	Limitierungen des Einsatzes von Kurkumin als therapeutisches Adjuvans	70
	4.4	Kurkumin induziert immunmodulatorische Effekte in isoUGO-Zellen	69
	Abhä	ngigkeit vom H3.3-Mutationsstatus	65
	4.3	Kurkumin induziert Zellzyklusarrest und Zelltodmechanismen in isoUGO-Zellen	in

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 : H3-Mutationsstatus-assoziierte Prognose von DIPG-Patient:innen
Abbildung 2 : Magnetresonanztomografische Bilder eines DIPG4
Abbildung 3 : Einfluss der H3.3K27M-Mutation auf epigenetische Genregulationsmechanismen8
Abbildung 4 : Strukturformel von Kurkumin
Abbildung 5 : In dieser Arbeit verwendete isogene Zelllinien zeigen typische Abhängigkeiten der
H3K27me3- und H3K27ac-Level vom H3.3-Mutationsstatus
Abbildung 6 : Kurkumin induziert vergleichbare Zytotoxizität in isoUGO-Zellen unabhängig vom H3.3-
Mutationsstatus
Abbildung 7 : Analyse der globalen Genexpression nach Kurkuminbehandlung in isoUGO-2-H3WT-
und -H3.3K27M-Zellen
Abbildung 8 : Kurkumin induziert unterschiedliche Gensignaturen in isoUGO-2-H3WT- und isoUGO-
2-H3.3K27M-Zellen
Abbildung 9 : Kurkumin reguliert unterschiedliche Prozesse in isoUGO-2-H3WT- bzw. isoUGO-2-
H3.3K27M-Zellen
Abbildung 10: Kurkumin stellt die H3K27-Trimethylierung isoUGO-H3.3K27M-Zellen wieder her und
reduziert die H3K27-Acetylierungslevel in isoUGO-Zellen unabhängig vom H3.3-Mutationsstatus 38
Abbildung 11 : Kurkumin wirkt unabhängig vom H3.3-Mutationsstatus möglicherweise über
Inhibierung der CBP-HAT-Aktivität in isoUGO-2-Zellen
Abbildung 12: 70% der durch Kurkumin unabhängig vom H3.3-Mutationsstatus inhibierten Gene
werden auch durch CBP-HAT-Inhibition vermindert exprimiert
Abbildung 13 : Kurkumin vermindert das Selbsterneuerungspotential und die Proliferation von
isoUGO-Zellen weitestgehend unabhängig vom H3.3-Mutationsstatus
Abbildung 14 : Kurkumin induziert Apoptose – verstärkt in isoUGO-H3WT-Zellen
Abbildung 15 : Kurkumin induziert Apoptose in isoUGO-Zellen in Abhängigkeit vom H3.3-
Mutationsstatus unterschiedlich stark
Abbildung 16 : Kurkumin reguliert Zellzyklus- und Apoptose-assoziierte Gene in isoUGO-2-H3WT-
Zellen herunter
Abbildung 17 : Kurkumin inhibiert die Expression antiapoptotischer und verstärkt die Expression
proapoptotischer Gene in isoUGO-2-Zellen
Abbildung 18 : Kurkumin induziert Autophagie in isoUGO-Zellen
Abbildung 19: Kombinationsbehandlung aus Kurkumin und dem Autophagieinhibitor Chloroquin
All ill 20 K let iligitat in isoUGO-2-Zellen
Abbildung 20 : Kurkumin innibiert mit dem Wht-Signalweg assoziierte Gene in isoUGO-2-H5.5K2/M-
Abbildung 21. Kurdungin gegulient die Europeanien von mit dem kang nigehen Wet Signalwag augerlienten
Cono vornobelich in isoLICO 2 H3 2V27M Zollon
Abbildung 22 : Kurkumin reduziort signifikant die Expression von MVC in isoUCO 2 Zellen
unabhängig vom H3 3-Mutationsstatus
Abbildung 23 : Kurkumin induziert die Expression antünflammatorischer Gene und reduziert die
Expression proinflammatorischer Gene verstärkt in iso $UGO_2-H3.3K27M_7$ ellen 55

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete isogene Zelllinien, Herkunftszelllinie, Klonnummer	r und deren
H3.3-Mutationsstatus	
Tabelle 2 : Zellnährmedien und ihre Zusammensetzung	
Tabelle 3 : Geräte und Hersteller	
Tabelle 4 : Verbrauchsgegenstände und Hersteller	
Tabelle 5 : Chemikalien, Reagenzien und Hersteller	
Tabelle 6 : Hergestellte Lösungen und Puffer	19
Tabelle 7 : Mediumszusätze	
Tabelle 8 : Genutzte Enzyme	
Tabelle 9 : Genutzte primäre Antikörper für Western-Blot-Analysen	
Tabelle 10 : Genutzte sekundäre Antikörper für Western-Blot-Analysen	
Tabelle 11 : Verwendete kommerzielle Kits	
Tabelle 12 : Verwendete Software	
Tabelle 13 : Übersicht über Zellkulturplattenformate	
Tabelle 14 : Zusammensetzung der Polyacrylamidgele für SDS-PAGE	
Tabelle 15 : Genutzte Programme zur Analyse der mRNA-Sequenzierung	
Tabelle 16 : Übersicht über die Wirkmechanismen von Kurkumin in Abhängigkeit	vom H3.3-
Mutationsstatus in isoUGO-Zellen.	

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat	
BCA	bicinchoninic acid assay, Bicinchoninsäure-Versuch	
BRD	Bromodomäne	
BSA	Bovines Serumalbumin	
CBP	CREB-bindendes Protein	
CDK	cycline-dependent kinase, cyclinabhängige Kinase	
CE	cytoplasmatic extract, zytoplasmatischer Extrakt	
CF	cytoplasmatic fraction, zytoplasmatische Fraktion	
COX	Cyclooxygenase 2	
CQ	Chloroquin	
Cur	curcumin, Kurkumin	
СҮР	Cytochrom P	
dH2O	Destilliertes Wasser	
DIPG	Diffus intrinsisches Ponsgliom	
DMEM	Dulbecco modified eagle medium, Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium	
DMG	Diffuses Mittelliniengliom	
DMSO	Dimethylsulfoxid	
DNA	desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure	
ECL	enhanced chemiluminescence, verstärkte Chemilumineszenz	
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	
EGF	epidermal growth factor, epidermaler Wachstumsfaktor	
EMT	Epithelial zu mesenchymale Transformation	
EZH2	enhancer of zeste homolog 2, Histon-Lysin N-Methyltransferaseenzym	
FACS	fluorescence activated cell sorting, Durchflusszytometrie	
FC	fold change, x-fache Änderung	
FCS	fetal calf serum, fetales Kälberserum	
FDR	false discovery rate, Falsch-positiv-/ -negativrate	
FGF	fibroblast growth factor, Fibroblastenwachstumsfaktor	
Н3	Histon 3	
H3.1	Histon 3.1	
H3.3	Histon 3.3	
H3.3K27M	Mutation in Lysin 27 des Histons 3.3	
H3K27ac	H3K27-Acetylierung	
H3K27me3	H3K27-Trimethylierung	
H3WT	Histon H3-Wildtyp	
HAT	Histonacetyltransferase	
HDAC	Histondeacetylase	
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure	
HGG	high-grade glioma, hochgradiges Gliom	

HMT	Histonmethyltransferasen
HRP	horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase
IL	Interleukin
isoUGO-1	CRISPR/Cas-Klone der pädHGG-Zelllinie UGO-1
isoUGO-2	CRISPR/Cas-Klone der pädHGG-Zelllinie UGO-2
LC3B	light chain protein 3B, essenzielles Leichtkettenprotein 3B
LPP	Laemmli-Probenpuffer
LT	Trennpuffer
MEM NEAA	Minimum essenzielle medium nichtessenzielle Aminosäuren
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
NF	Nukleäre Fraktion
NF- ¤ B	nuclear factor kappa light-chain enhancer of activated B-cells, nukleärer Faktor kappa
	Leichtketten-Verstärker aktivierter B-Zellen
NE	Nukleärer Extrakt
NIG	NGS-Integrative Genomics Core Unit, NGS-Serviceeinrichtung für Integrative Genomik
	des Instituts für Humangenetik der Universitätsmedizin Göttingen
p300	E1A-assoziiertes Protein p300
pädHGG	Pädiatrische hochgradige Gliome
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	phosphate-buffered saline, Phosphatgepufferte Salzlösung
PCA	principal component analysis, Hauptkomponentenanalyse
PCR2	polycomb-repressiver Komplex 2
PDGF-AA / BB	platelet-derived growth factor-AA / BB, thrombozytärer Wachstumsfaktor-AA / BB
PI	Propidiumiodid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPAR-y	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor y
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
STR	short tandem repeat, Short-Tandem-Repeat
TBS-T	tris-buffered saline with Tween20, Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20
TEMED	N,N,N'N'-Tetramethylethylendiamin
TMZ	Temozolomid
TSM	Tumorstammmedium
UGO	unidentified growth origin, unbekannter Wachstumsursprung, Tumorzelllinien nicht
	zurückzuführenden Zellursprungs
UT	Sammelpuffer
WHO	World Health Organisation, Weltgesundheitsorganisation
WΤ	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Pädiatrische hochgradige Gliome

Pädiatrische Tumore des Zentralen Nervensystems (ZNS) machen mit etwa 20 - 25% die zweithäufigsten Malignome und die größte Gruppe solider Tumore im Kindesalter aus (Von Bueren et al. 2017). 10 - 15% aller ZNS-Tumore sind durch aggressives, invasiv in Nachbarstrukturen infiltrierendes Wachstum gekennzeichnet und werden als pädiatrische hochgradige Gliome (pädHGG) bezeichnet (Hargrave et al. 2006; Stupp et al. 2014).

PädHGG kommen nicht häufig vor – in Deutschland erkranken jährlich etwa 70 Kinder und Jugendliche daran (Von Bueren et al. 2017) –, gehen jedoch durch aggressives, invasives Wachstum und der Fähigkeit im ZNS zu migrieren (Warren 2012) mit einer verheerenden Prognose einher. Diese ungünstige Prognose der pädHGG ist unter anderem durch einen Mangel an effektiven Therapieoptionen zu begründen. Die Standardtherapie in Deutschland besteht bis heute aus einer Kombination aus fokaler Radiotherapie (54 – 60 Gy, fraktioniert über sechs Wochen (Morales La Madrid et al. 2015; Panditharatna et al. 2015)) und dem Chemotherapeutikum Temozolomid (TMZ), einem oralen Alkylanz (Tolcher et al. 2003; Sturm et al. 2014; Messaoudi et al. 2015).

Auch birgt die molekulargenetische Heterogenität der unter pädHGG zusammengefassten Tumore ein hohes Potential einer Resistenzentwicklung gegenüber verschiedenen Therapien (Jones und Baker 2014): Mechanismen wie Efflux-Transporter der Tumorzellen, die Fähigkeit zur DNA-Reparatur (durch das Reparaturenzym O6-Methylguanin DNA-Methyltransferase (MGMT)), *TP53*-Mutationen und der Erwerb von Stammzellcharakteristika im Verlauf der Tumorgenese führen zu Resistenzen gegenüber Radio- und / oder Chemotherapien (Satoru und Van Meir 2017; Messaoudi et al. 2015). Aus der oftmals hypoxischen Umgebung der Tumorareale resultiert außerdem ein ungenügender Transport der Medikamente zum Wirkort (Haar et al. 2012; Messaoudi et al. 2015). Zudem stellt die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke bei der Behandlung von im ZNS lokalisierten Tumoren eine Limitierung der Therapieoptionen dar.

Die Entstehung dieser Tumore durch Entartung glialer Zellen unterscheidet sich im Kindesalter weitestgehend von den Mechanismen der Tumorgenese bei Erwachsenen: Während adulte hochgradige Gliome (HGG) sowohl *de novo* als auch aus niedriggradigen ZNS-Tumoren entstehen können (Sturm et al. 2014), kommen pädHGG ohne jegliche klinische oder histologische Zeichen einer vorangegangenen malignen Transformation bzw. einer niedriggradigen Vorläuferläsion vor, sondern entstehen de novo (Jones und Baker 2014). Auch bei molekulargenetischen Aberrationen existieren wesentliche Unterschiede zwischen den Tumoren der beiden Altersgruppen (Rickert et al. 2001; Sturm et al. 2014; Panditharatna et al. 2015; Harutyunyan et al. 2019): Adulte HGG sind häufig durch eine Mutation der Isocitratdehydrogenase 1 (IDH-1) charakterisiert (Stupp et al. 2014). Bei pädHGG hingegen stehen andere Mutationen im Vordergrund. Ein Drittel davon sind in einer Histon 3-Variante lokalisiert: H3F3A (H3-3A), welches für H3.3 kodiert, und HIST1H3A/C (H3C1/3). welche für H3.1 kodieren (Wu et al. 2012; Schwartzentruber et al. 2012; Lewis et al. 2013). Diese Unterschiede implizieren bereits, dass die für die adulte HGG-Behandlung als Goldstandard dienende Kombinationstherapie aus dem Chemotherapeutikum TMZ und Radiatio bei pädHGG nicht die gleichen Effekte erzielt. Aufgrund mangelnder Alternativen und dem erwiesenen geringen Nebenwirkungsprofil sowie der Möglichkeit der oralen Einnahme von TMZ gilt jedoch auch bei pädHGG jene Kombination bis heute in Deutschland als Standardtherapie (Von Bueren et al. 2017).

Etwa ein Drittel aller pädHGG sind Hirnstammgliome. 80% davon sind im Pons lokalisiert (Hargrave et al. 2006) und bilden die Unterentität der diffus intrinsischen Ponsgliome (DIPG), die laut Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation, WHO)-Klassifikation der Gruppe der H3K27M-mutierten diffusen Mittelliniengliome (DMG) zuzuordnen sind bzw., sofern sie keine H3K27M-Mutation tragen, in der WHO-Klassifikation von 2016 nicht näher beschrieben werden, jedoch immer noch eine valide neuroradiologische Diagnose darstellen (Louis et al. 2016; Komori 2017; Karremann et al. 2018; Von Bueren et al. 2018). DIPG kommen ausschließlich im Kindes- und Jugendalter vor – Patient:innen im Alter von fünf bis sieben Jahren sind am häufigsten betroffen (Hashizume 2017; Vanan und Eisenstat 2015; Jones und Baker 2014; Monje et al. 2011). Die Prognose dieser Patient:innen beträgt durchschnittlich Weniger als zwölf Monate nach Diagnosestellung (Hoffman et al. 2018). Das durchschnittliche Gesamtüberleben der DIPG-Patient:innen beläuft sich auf elf Monate; die Zwei-Jahres-Überlebensrate auf weniger als 10% und nach fünf Jahren leben lediglich 1 – 2% der Patient:innen noch (Hoffman et al. 2018, Abbildung 1). Somit gelten DIPG als die aggressivste Hirntumorentität im Kindesalter (Ostrom et al. 2015; Hashizume 2017).



Abbildung 1 : H3-Mutationsstatus-assoziierte Prognose von DIPG-Patient:innen. Kaplan-Meier-Kurve, die das auf dem Histon H3-Mutationsstatus basierte Gesamtüberleben bei DIPG-Patient:innen repräsentiert (Basierend auf Hoffman et al. (2018). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Autor:innen und der ©*American Society of Clinical Oncology*).

Diese fatale Prognose hat unterschiedliche Gründe: Einerseits mangelt es an effektiven Therapien. Durch die Lokalisation des Tumors im Pons erreichen die meisten Wirkstoffe das Zielgewebe nicht in ausreichend hohen Konzentrationen (Warren 2012). Andererseits sind DIPG durch aggressives, diffus in essenzielle vitale Hirnareale und Nervenstrukturen des Hirnstamms infiltrierendes Wachstum charakterisiert. Auch sympathische und parasympathische Afferenzen und Efferenzen und Nuklei der motorischen und sensorischen Bahnen sind betroffen. Dies macht eine chirurgische Tumorresektion nahezu unmöglich (Khuong-Quang et al. 2012; Sturm et al. 2014; Vanan und Eisenstat 2015; Hashizume 2017). Auch von diagnostischen Biopsien wird daher weitestgehend abgesehen. Die Diagnosestellung erfolgt meist basierend auf der Bildgebung mittels Magnetresonanztomographie (Von Bueren et al. 2017, Abbildung 2).



Abbildung 2 : Magnetresonanztomografische Bilder eines DIPG. Links: Transversalebene (Basierend auf Hargrave et al. (2006). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Elsevier). Rechts: Sagittalebene (basierend auf Komori (2017), CC BY-NC-ND 4.0).

Als Ursache der DIPG-Entstehung wird eine Dysregulation postnataler neurologischer Entwicklungsprozesse diskutiert (Panditharatna et al. 2015). Der Entstehungsort von DIPG, der ventrale Anteil des Pons, scheint in einem bestimmten Zeitfenster durch eine entwicklungsbedingt veränderte Genexpression besonders vulnerabel für Mutationen zu sein. Als Ursprung von DIPG werden zum einen frühe oligodendrogliale Vorläuferzellen vermutet (Sturm et al. 2012; Panditharatna et al. 2015; Nagaraja et al. 2017), die die neuronale Zellproliferation und -differenzierung (Gupta et al. 2005) sowie die Myelinisierung von Axonen sowohl während der Embryonalentwicklung als auch im Vor- und Grundschulalter regulieren (Yakovlev und Lecours 1967). Zum anderen werden neurale pontine Vorläuferzellen als DIPG-Ursprung diskutiert (Monje et al. 2011), die während des mittleren Kindesalters verstärkt exprimiert werden (Warren 2012).

Wie außerdem Abbildung 1 zu entnehmen ist, existieren kaum Unterschiede zwischen dem Gesamtüberleben von DIPG-Patient:innen mit H3WT und H3.3K27M-Mutation (H3.3K27M).

Castel et al. (2018) stellen die Hypothese auf, dass nicht die H3.3K27M-Mutation allein, sondern eventuell auch noch zusätzlich die Kombination mit der Lokalisierung des Tumors prognosebestimmend ist. So haben kortikale Tumore mit demselben Mutationsstatus eine bessere Prognose als jene, die in der Mittellinie lokalisiert sind. *H3F3*.4-Mutationen führen in kortikalen Gliomen eher zu einer Aminosäuresubstitution an der Position 34 (G34R/V) (Sturm et al. 2014; Bender et al. 2013) – im Pons hingegen eher an der Position 27 (K27M). Auch der Altersgipfel der erkrankten Patient:innen ist verschieden: Während die H3.3K27M-Mutation charakteristisch für das mittlere Kindesalter ist, kommt die G34R/V-Mutation eher bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen vor (Williams et al. 2017). Diese klare anatomische und funktionelle Segregation der Mutation legt einen gewissen Selektionsdruck während der ZNS-Entwicklung nahe und verstärkt die Hypothese, die das beschränkte zeitliche Fenster der Tumorentstehung bei DIPG mit einem zelllinienabhängigen spezifischen Entwicklungsstadium des ZNS in Verbindung bringt, in dem die Zellen des ventralen Pons möglicherweise anfälliger für Mutationen sind (Jones und Baker 2014).

Die H3.3K27M-Mutation führt zu einer im weiteren Verlauf der Einleitung genauer beschriebenen Aminosäuresubstitution und induziert veränderte epigenetische Regulationsmechanismen.

1.2 Epigenetische Regulationsmechanismen

Epigenetik beschreibt reversible genregulatorische Prozesse, die keinen Einfluss auf die DNA-Sequenz an sich haben (Berger 2007).

Solche Veränderungen umfassen DNA-Methylierungen, Histonmodifikationen und mikroRNA-Interferenzen (Hassan et al. 2019). Diese posttranslationalen Modifikationen beeinflussen die nichtkovalenten Interaktionen innerhalb von Nukleosomen und somit die Chromatinstruktur. Auch wird dadurch ein komplexes Zusammenspiel spezialisierter Proteine, die für die Erkennung bestimmter Chromatinveränderungen sowie deren Modifikation verantwortlich gemacht werden, in Gang gesetzt (Dawson und Kouzarides 2012). Werden diese Regulationsmechanismen verändert, führt dies zu einer epigenetischen Imbalance. Daraus können maligne Entartungen und somit die Initiation und Progression von Krebs resultieren (Frühwald und Witt 2008; Iacobuzio-Donahue 2009; Dawson und Kouzarides 2012; Zhang et al. 2015).

1.2.1 Histonmodifikationen

Als Nukleosom wird der Komplex aus einem Histonproteinoktamer und darum gewundenem Chromatin bezeichnet. Durch diese komprimierte Struktur wird die Regulation von Genexpression und DNA-Replikation gewährleistet, die DNA verpackt und verdichtet und somit Schaden am Erbgut verhindert (Dawson und Kouzarides 2012; Tessarz und Kouzarides 2014). Histonoktamere bestehen aus je zwei Paaren der Histonvarianten H2A, H2B, H3 und H4. Säugetierzellen exprimieren drei Histon 3 (H3)-Genvarianten: *HIST1H3A* (H3C1) und *HIST1H3C* (H3C3) kodieren für H3.1, *HIST1H3B* (H3C2) kodiert für H3.2 und H3F3A (H3-3A) kodiert für H3.3. Histone bestehen jeweils aus einem globulären Kern und einem Aminosäureschwanz, wobei die meisten Modifikationen am Histonschwanz erfolgen. Diese Veränderungen – abhängig von der Art der Modifikation und der modifizierten Aminosäure – beeinflussen die Dichte des Nukleosoms und somit die Chromatinzugänglichkeit (Goldberg et al. 2010). Chromatin kann in zwei Zuständen vorliegen: Aufgelockert und in somit transkriptionell aktiver Form als Euchromatin, oder verdichtet als Heterochromatin (Dawson und Kouzarides 2012). Die Balance dieser beiden Zustandsformen garantiert die Aufrechterhaltung von Genexpressionsmustern (Bird 2002).

Die Gensequenzen der Histonproteine sind hochkonserviert und unterscheiden sich innerhalb der Subtypen lediglich in einigen wenigen Aminosäuren (Goldberg et al. 2010). Dennoch ist H3.3 im Vergleich zu den übrigen H3-Subtypen an transkriptionell aktiven Genloki, regulatorischen Elementen und Telomeren signifikant verdichtet (Ahmad und Henikoff 2002; Goldberg et al. 2010; Schwartzentruber et al. 2012) und wird mit der Modulation von sowohl Chromatinstrukturen als auch Genexpressionsmustern in Verbindung gebracht (Williams et al. 2017). H3.3 wird als der Histonsubtyp, der am stärksten während der Hirnentwicklung mit Chromatin interferiert, beschrieben (Khuong-Quang et al. 2012). Diese Erkenntnisse könnten unter Umständen die schlechtere Prognose in H3.3K27M-mutierten DIPG im Vergleich zu H3.1K27M-mutierten DIPG erklären (Abbildung 1) (Morales La Madrid et al. 2015).

Die Aktivierung bzw. Repression der Transkription ist häufig durch die Kombination multipler posttranslationaler Histonmodifikationen charakterisiert (Zhang et al. 2015). Diese beinhalten – in Abhängigkeit von der zu modifizierenden Aminosäure – neben Acetylierung und Methylierung auch Phosphorylierung, Ubiquitinierung, Sumoylierung und Citrullinierung (Berger 2007; Zhang et al. 2015; Hashizume 2017) und sind mit der Kontrolle der Genexpression von unter anderem Stammzellpotential und Zelldifferenzierung assoziiert (Jones und Baker 2014).

Die Histonacetylierung erfolgt durch Histonacetyltransferasen (HAT) und kann die Zugänglichkeit von Chromatinstrukturen durch Umstrukturierung des Erbgutes direkt beeinflussen (Zhang et al 2015). Veränderte elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der negativ geladenen DNA und den Aminosäuren im Histon führen zu einer verbesserten Zugänglichkeit des Chromatins für die Bindung von Transkriptionsfaktoren (Dawson und Kouzarides 2012; Hashizume 2017). In aktiv transkribierenden Genen liegen Histonproteine in acetylierter Form vor (Frühwald und Witt 2008). Eine Ausschaltung der Gene (gene silencing) findet durch eine Deacetylierung der Histonproteine durch Histondeacetylasen (HDAC) statt. Dadurch wird das Chromatin verdichtet (Heterochromatin), was zu einer Inhibition der Transkription führt. Durch Histonmethylierung kommt es zu veränderten Bindungsstellen für verschiedene hochspezifische Enzyme (Histonmethyltransferasen (HMT)), wodurch deren Rekrutierung beeinflusst wird (Dawson und Kouzarides 2012; Hashizume 2017).

Die molekularen Wirkmechanismen sind nicht statisch und wirken oftmals abhängig vom Zellkontext aktivierend oder inhibierend (Dawson und Kouzarides 2012). Dieses Phänomen wird als Histon-*Crosstalk* bezeichnet. Aberrante Histonmodifikationen werden oft mit Tumorgenese assoziiert und stellen somit Angriffspunkte für die Entwicklung neuer, auf epigenetischen Regulationsmechanismen basierender Tumortherapien dar (Fraga et al. 2005; Hassan et al. 2019).

1.2.2 H3.3K27M-Mutation und deren Relevanz in DIPG

Bis zu 85% aller DIPG sind durch eine heterozygote Mutation im *H3F3A*- bzw. in den *HIST1H3A/B/C*-Genen charakterisiert, die das Lysin 27 im N-terminalen Histonschwanz des Histons H3.3 bzw. H3.1 (H3.3K27M bzw. H3.1K27M) beeinflussen (Hoffman et al. 2018). H3.3K27M ist eine somatische Punktmutation, die in einer Aminosäuresubstitution von Lysin (K) zu Methionin (M) an der Position 27 resultiert (Schwartzentruber et al. 2012; Khuong-Quang et al. 2012; Piunti et al. 2018; Nagaraja et al. 2017; Creasy 2017; Harutyunyan et al. 2019). Mutationen im *H3F3A*-Gen werden als spezifisch für pädHGG beschrieben (Williams et al. 2017).

Die Histon-Lysin N-Methyltransferase EZH2 (enhancer of zeste homolog 2) fungiert als katalytisches Zentrum des polycomb repressive complex 2 (PCR2). Dieser ist für die Vermittlung der H3K27-Trimethylierung (H3K27me3) zuständig und hemmt dadurch die Expression einzelner Gene (Creasy 2017; Hashizume 2017). Die H3.3K27M-Mutation und die daraus resultierende Aminosäuresubstitution beeinflussen die Bindungsaffinität und Funktion von EZH2 und führen somit zu einem globalen Verlust der Trimethylierung und einer Verstärkung der Acetylierung an H3K27 (Abbildung 3). Daraus resultiert eine transkriptionelle Dysregulation und es kommt zur Aktivierung sonst supprimierter Gene, was mit maligner Zelltransformation assoziiert sein kann (Schwartzentruber et al. 2012; Khuong-Quang et al. 2012; Lewis et al. 2013; Zhang 2015; Nagaraja et al. 2017). Harutyunyan et al. (2019) beschrieben, dass die H3K27-Trimethyllierung, die durch die Mutation im H3F3.A-Gen reduziert wird, essenziell für eine physiologische Zelldifferenzierung zu sein scheint.



Abbildung 3 : Einfluss der H3.3K27M-Mutation auf epigenetische Genregulationsmechanismen. (A) Die gestörte Funktion von EZH2 führt zu globaler H3K27-Hypotrimethylierung und H3K27-Hyperacetylierung in DIPG-H3.3K27M-Zellen (basierend auf Wiese et al., unpubliziert; mit freundlicher Genehmigung der Autorin). (B) Immunhistochemie für H3K27me3 (Basierend auf Bender et al. (2013). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Elsevier) und Western-Blot-Analyse zum Nachweis von H3.3K27M, H3K27me3 und H3K27ac in H3-Wildtyp und H3K27M-mutierten DIPG-Zellen (unpubliziert, mit freundlicher Genehmigung zur Verfügung gestellt von Klaudia Kubiak).

Somit wird der Verlust der H3K27me3 als auslösendes Ereignis im Zuge der Onkogenese bei DIPG diskutiert (Lewis et al. 2013; Bender et al. 2013; Herz et al. 2014; Sturm et al. 2014; Morales La Madrid et al. 2015; Justin et al. 2016; Nagaraja et al. 2017; Karremann et al. 2018; Harutyunyan et al. 2019). Auch in anderen Tumorentitäten wie Mamma-, Ovarial- und Pankreaskarzinomen ist eine reduzierte H3K27-Trimethylierung mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Greer und Shi 2012).

Zhang et al. (2015) beschrieben in DIPG das Phänomen des Histon-*Crosstalks*: So geht der Verlust von H3K27me3 mit einer Erhöhung der H3K27ac einher, da es durch die H3.3K27Mmutationsbedingte Hypotrimethylierung zu einem Ungleichgewicht der Funktionen der Acetylierung vermittelnden HAT und der trimethylierenden HMT kommt (Piunti et al. 2018).

Zu den für die H3K27-Position relevanten HAT zählen unter anderem das E1A-assoziierte Protein p300 (p300) und das CREB-bindende Protein (CBP), die H3K27 acetylieren und somit die Genexpression aktivieren (Hassan et al. 2019; Wiese et al. 2020). CBP besteht aus einer HAT-Domäne und einer Bromodomäne, die acetyliertes Lysin erkennt, und fungiert durch die Bereitstellung von Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren als Koaktivator der Transkription. Die Proteine, die eine Bromodomäne enthalten (*bromodomain-containing proteins*), z. B. BRD2, BRD3 und BRD4 interagieren mit acetylierten Histonen und Transkriptionsfaktoren. Durch Interaktion mit der RNA-Polymerase II kommt es zu einer Aktivierung der Transkription (Creasy 2017; Nagaraja et al. 2017; Hashizume 2017; Piunti et al. 2018).

HDAC deacetylieren Histone. Die Dysregulation von HDAC wird in pädiatrischen Tumoren mit Tumorgenese und -progression assoziiert, wie beispielsweise Oehme et al. (2009) in Neuroblastomen nachweisen konnten. HDAC sind in fundamentale biologische Prozesse wie Zellzykluskontrolle, Zelldifferenzierung und Zelltod involviert (Oehme et al. 2009). Eine Überexpression dieser Enzyme führt zu Tumorprogression, eine HDAC-Inhibition hingegen reduziert diese, wie Grasso et al. (2015) in DIPG zeigen konnten.

1.3 Kurkumin als therapeutisches Adjuvans

Im Vergleich zu vielen anderen Tumoren haben die vergangenen Jahrzehnte DIPG-Forschung mit mehr als 250 klinischen Studien (Morales La Madrid et al. 2015; Hashizume 2017) keine wesentlichen Fortschritte hinsichtlich der Prognose der Patient:innen erzielen können (Creasy 2017; Nagaraja et al. 2017). Die Standardtherapie - die Kombination aus Radiotherapie und dem Chemotherapeutikum TMZ - birgt lediglich einen palliativen Ansatz (MacDonald et al. 2011; Ramaswamy et al. 2014). Radiotherapie verlängert das Überleben um etwa drei bis vier Monate (Warren 2012; Vanan und Eisenstat 2015; Hoffman et al. 2018) und führt nur vorübergehend zu Symptomlinderung (Morales La Madrid et al. 2015; Creasy 2017). Durch die Kombination mit TMZ konnten in unterschiedlichen Studien geringfügige Verbesserungen im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung erreicht werden (Vanan und Eisenstat 2015; Kumirova et al. 2019). Wegen der geringen Toxizität und der Möglichkeit der oralen Applikation, die eine ambulante Chemotherapie ermöglicht, wird TMZ dennoch häufig eingesetzt. Oft werden DIPG-Patient:innen wegen mangelnder effektiver Standardtherapien in klinische Studien eingebunden, um Alternativen zu bisherigen Therapiekonzepten zu analysieren. Aufgrund dessen greifen Eltern betroffener Patient:innen auch auf komplementärmedizinische zurück. Begleitmedikationen bisher als alternative Therapieadjuvanzien Einer unveröffentlichten Auswertung sozialer Medien für DIPG-Patient:innen und deren Angehörige zufolge wird unter anderem Kurkumin (Diferuloylmethan) – der primäre Wirkstoff aus Curcuma longa aus der Familie der Ingwergewächse (Zingiberaceae) - zur Symptomlinderung verabreicht (El-Khouly et al. 2021). Diese Wurzel findet sowohl in der traditionellen chinesischen und ayurvedischen Medizin als auch als Gewürz und Färbemittel vor allem im asiatischen Raum Anwendung (Shishodia et al. 2005; Shen et al. 2016; Rainey et al. 2019). Schraufstatter und Bernt beschrieben 1949 erstmals in der westlichen Medizin die Wirkungen dieses hydrophoben Polyphenols (Theppawong et al. 2019, Abbildung 4).



Abbildung 4 : Strukturformel von Kurkumin

Die Anwendung von Kurkumin als therapeutisches Adjuvans ist aufgrund der sehr geringen, in der Regel gut tolerierbaren Nebenwirkungen auch in höheren Dosen unbedenklich (Ammon und Wahl 1991; Cheng et al. 2001). Studien zeigten, dass eine tägliche orale Kurkuminapplikation von 12 g pro Tag über drei Monate sicher, nichttoxisch und nahezu nebenwirkungsfrei sei (Lao et al. 2006; Anand et al. 2007). In den letzten Jahren wurde Kurkumin im Rahmen onkologischer Forschung als vielversprechender Wirkstoff bei verschiedensten Tumorerkrankungen identifiziert. Demnach verfügt Kurkumin unter anderem über antioxidative, antiangiogenetische, antiproliferative und anti-mikrobielle Eigenschaften (Ammon und Wahl 1991; Anand et al. 2007; Aggarwal und Sung 2009; Prasad et al. 2014; Shen et al. 2016; Schwarz et al. 2020). Kurkumin hemmt die Onkogenese, das Fortschreiten und die Metastasierung von Tumoren. Die Antitumorwirkung Kurkumins begründet sich aus dem Zusammenspiel vielfältiger Interferenzen des Wirkstoffes mit multiplen Signalwegen, die eine Rolle in der Tumorgenese und -progression spielen (Aggarwal et al. 2003). So wirkt Kurkumin beispielsweise unter anderem als Inhibitor des Wnt/ß-Catenin-Signalwegs (Ryu et al 2008). In präklinischen und klinischen Studien konnte beobachtet werden, dass der zytotoxische Effekt von Kurkumin nur auf die Krebszellen begrenzt ist und Kurkumin auf gesunde Zellen protektiv wirkt (Syng-Ai et al. 2004; Bisht et al. 2010).

Kurkumin wirkt zudem inhibitorisch auf Zellwachstum und -proliferation, indem programmierte Zelltodmechanismen reguliert werden: Kurkumin induziert direkt und indirekt Apoptose (Park et al. 2013; Araveti und Srivastava 2019) und Autophagie (Gupta et al. 2013a; Moustapha et al. 2015; Shakeri et al. 2018). Autophagie ist ein lysosomaler Degradationsprozess, bei dem ubiquitinierte Proteine und geschädigte Zellorganellen im Autophagosom abgebaut werden (Araveti und Srivastava 2019). Das während dieses Prozesses akkumulierende essenzielle Leichtkettenprotein 3B (*light chain protein 3B*, LC3B) dient dem Nachweis der

Autophagie (Tanida et al. 2008; Seo et al. 2018; Rainey et al. 2019). Auch in Gliomzellen wurde die durch Kurkumin induzierte Autophagie bereits beschrieben (Aoki et al. 2007). Autophagie wird jedoch ambivalent diskutiert: So wird dieser Mechanismus als Art des programmierten Zelltods bezeichnet, häufig jedoch auch als Schutzmechanismus der Zellen vor äußeren Einflüssen, wie beispielsweise Nahrungskarenz oder – im Fall von Tumoren – therapeutischen Behandlungen wie Radio- und / oder Chemotherapie, verstanden. Dass Kurkumin Autophagie induziert, scheint in dieser Hinsicht den Antitumoreffekt der Substanz abzuschwächen. Wie bereits von Zanotto-Filho et al. (2015) beschrieben wurde, kann der Zusatz eines Autophagieinhibitors zu der Kombinationsbehandlung aus TMZ und Kurkumin in Glioblastomen die Therapieeffizienz erhöhen.

Zusätzlich inhibiert Kurkumin die Telomeraseaktivität (Khaw et al. 2013) und hat einen positiven Effekt auf die Expression des Tumorsuppressorgens *TP53* (Liu et al. 2007; Park et al. 2013; Hassan et al. 2019). Ebenso konnte die entzündungshemmende Wirkung dieses Phytotherapeutikums gezeigt werden (Aggarwal et al. 2003; Kunnumakkara et al. 2017). Die Expression verschiedener Zytokine wird durch Kurkumin reprimiert (Hassan et al. 2019). Die antiinflammatorischen Eigenschaften tragen zu einer Verminderung der Entzündungsreaktion rund um die Tumorumgebung bei (Wungki et al. 2013).

Auch in ZNS-Tumoren konnte die Antitumorwirkung von Kurkumin bereits nachgewiesen werden: So wurden die Induktion von Apoptose und Zellzyklusarrest, die Inhibition der Telomeraseaktivität und der antiproliferative Effekt in Glioblastom- und Medulloblastomzellen durch Kurkumin beschrieben (Liu et al. 2007; Perry et al. 2010; Lee et al. 2011; Khaw et al. 2013; Du et al. 2013; Wang L et al. 2015). Zanotto-Filho et al. (2015) gelang es, in Glioblastomzellen nachzuweisen, dass die durch Kurkumin induzierte Zytotoxizität selektiv auf maligne transformierte Gliazellen begrenzt war und differenzierte Astrozyten davon unbeeinflusst blieben.

Auf epigenetischer Ebene konnten ebenfalls bereits Wirkmechanismen von Kurkumin identifiziert werden: Durch die Interferenz mit nichtkodierenden Abschnitten des humanen Genoms werden durch das Phytotherapeutikum selektiv onkogene mikroRNA herunter- und tumorsupprimierende mikroRNA hochreguliert (Sun et al. 2008; Shishodia 2012; Gupta et al. 2013a; Park et al. 2013; Hassan et al. 2019). Lange nichtkodierende RNA (*long non-coding* RNA) scheinen auch durch Kurkumin beeinflusst zu werden (Wang et al. 2014; Kunnumakkara et al. 2017). Kurkumin reguliert Histonmodifikationen, indem die Aktivität von sowohl HDAC als auch HAT moduliert wird (Gupta et al. 2013a; Hassan et al. 2013a; Kurkumin reguliert Histonmodifikationen, indem die Aktivität von sowohl HDAC als auch HAT moduliert wird (Gupta et al. 2013a; Hassan et al. 2019). Die Inhibition von HDAC durch Kurkumin konnte bereits in Medulloblastomen gezeigt werden (Chen et al. 2007;

Lee et al. 2011; Wang SH et al. 2015). Auch die Funktion von Kurkumin als HDAC- und CBP/p300-Inhibitor wurde bereits beschrieben (Balasubramanyam et al. 2004).

1.4 Ziel der Studie

DIPG sind im Hirnstamm lokalisierte pädHGG, die durch eine fatale Prognose und in 85% durch eine H3-Mutation, welche zu einer epigenetischen Dysregulation führt, charakterisiert sind. Aufgrund mangelnder effektiver konventioneller Therapieoptionen soll das Ziel dieser Studie sein, den H3.3K27M-mutationsabhängigen Wirkmechanismus von Kurkumin in DIPG zu analysieren und somit dessen möglichen Einsatz als Therapieadjuvans zu untersuchen. Dazu wurden isogene Zelllinien mit identischem genetischem Ursprung genutzt, die sich lediglich in ihrem *H3F3*.

Zunächst wurden, um den konzentrations- und H3.3K27M-mutationsabhängigen Effekt von Kurkumin zu untersuchen, MTT-Zellviabilitätsversuche durchgeführt. Um die genaueren Wirkmechanismen auch auf transkriptioneller Ebene zu definieren, wurde die globale mRNA-Expression mittels Sequenzierung des gesamten Transkriptoms (*whole genome sequencing*) nach Behandlung der isogenen Tumorzelllinien mit Kurkumin analysiert.

Da zum einen die Funktion von Kurkumin als HDAC- und CBP/p300-Inhibitor beschrieben wurde (Balasubramanyam et al. 2004; Chen et al. 2007; Lee et al. 2011; Wang SH et al. 2015) und zum anderen der Einsatz von epigenetischen Therapieoptionen auch in DIPG analysiert wurde (Piunti et al. 2018; Wiese et al. 2020), sollte auch in der vorliegenden Studie der Effekt Kurkumins auf epigenetischer Ebene untersucht werden: Um die Effekte auf H3K27-Acetylierung und -Trimethylierung zu identifizieren, wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Auch sollte der Effekt von Kurkumin auf Zelltodmechanismen (Apoptose und Autophagie) analysiert werden. Kurkumin inhibiert das Selbsterneuerungspotential verschiedener Tumorentitäten und reduziert deren Fähigkeit, Sphären und Kolonien zu formieren (Gupta et al. 2013a). Um diesen Effekt auch in DIPG zu untersuchen, wurden Sphären- und Kolonieformationsanalysen durchgeführt.

Zusammenfassend zielt die vorliegende Studie darauf ab, die H3.3K27M-abhängigen Effekte der Kurkuminbehandlung in isogenen Tumorzelllinien zu identifizieren, um hierdurch eventuell dem Einsatz von effektiveren Therapieoptionen mit einem möglichst geringen Nebenwirkungsspektrum für DIPG-Patient:innen näher zu kommen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien und Kulturmedien

Für diese Studie wurden isogene Zelllinien verwendet, die mittels CRISPR/Cas9 generiert worden sind (Masterarbeit Kubiak 2019). Bei den ursprünglichen primären DIPG-Zellen, die hierfür verwendet wurden, handelte es sich um HSJD-DIPG-007 (H3.3K27M-mutiert), die von Dr. Angel Montero Carcaboso (Sant-Joan-de-Deu-Krankenhaus, Barcelona, Spanien) bereitgestellt wurden, und VUMC-DIPG-010 (H3WT), die von Dr. Esther Hulleman (VU University Medical Center, Amsterdam, Niederlande) bezogen worden sind. Aus H3.3K37M-mutierten HSJD-DIPG-007-Zellen wurde diese Mutation mittels CRISPR/Cas9 entfernt – in H3WT-VUMC-DIPG-010-Zellen wurde die H3.3K27M-Mutation eingeführt. Nachdem die Zellen für einige Passagen in Kultur gehalten worden sind, wurden zur Überprüfung die S*hort-tandem-repeat* (STR)-Profile der Zelllinien durch die Firma Eurofins (Ebersberg, Deutschland) bestimmt.

Wie sich herausstellte, entstammten die in der vorliegenden Studie verwendeten, ursprünglich von vermeintlich primären pädiatrischen DIPG-Zellen abgeleiteten isogenen Zellen Tumorzelllinien eines retrospektiv nicht mehr zweifelsfrei nachvollziehbaren zellulären Ursprungs. STR-Analysen konnten die Herkunft von den angenommenen Ursprungszelllinien nach Abgleich mit den STR-Daten der Originalzelllinien aus den beiden Ursprungslabors in Barcelona, Spanien, und Amsterdam, Niederlande, nicht mehr zweifelsfrei nachweisen, wiesen aber auch keine Übereinstimmungen mit anderen Zelllinien aus einer STR-Tumorzellliniendatenbank auf.

Die Zellen wurden entsprechend umbenannt, wie Tabelle 1 zu entnehmen ist, und werden im weiteren Verlauf als isoUGO-2 bzw. isoUGO-1 bezeichnet (*unidentified growth origin*, UGO) (Tabelle 1).

Zelllinie	Ursprungszelllinie	H3.3K27M	H3-Wildtyp
isoUGO-1	HSJD-DIPG-007	#63; #64; #65	#2; #22; #23
isoUGO-2	VUMC-DIPG-010	#8; #9; #10	#24; #25; #26

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete isogene Zelllinien, Herkunftszelllinie, Klonnummer und deren H3.3-Mutationsstatus

Wie bereits für H3.3K27M-mutierte DIPG beschrieben worden ist, sind auch isoUGO-H3.3K27M-Zellen im Vergleich zu isoUGO-H3WT-Zellen durch verstärkte H3K27-Acetylierungs- und verminderte H3K27-Trimethylierungslevel charakterisiert (Abbildung 5).

Die gezeigten, bisher unveröffentlichten Western-Blot-Analysen wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Klaudia Kubiak, die diese im Rahmen ihrer Promotionsarbeit anfertigte.



Abbildung 5 : In dieser Arbeit verwendete isogene Zelllinien zeigen typische Abhängigkeiten der H3K27me3- und H3K27ac-Level vom H3.3-Mutationsstatus. Western-Blot-Analysen zur Bestimmung des H3.3-Mutationsstatus, der H3K27-Acetylierung (H3K27ac) und H3K27-Trimethylierung (H3K27me3) der in der vorliegenden Studie verwendeten Einzelklone isogener UGO-2- und UGO-1-H3WT- und -H3.3K27M-Zellen (unpubliziert, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Klaudia Kubiak im Rahmen ihrer Promotionsarbeit).

Die Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien wird in Tabelle 2 aufgeführt.

Medium	Zusammensetzung	
Tumorstamm(TSM)-	1:1 Neurobasal®-A Medium: DMEM (Dulbecco modified eagle medium)/	
Basismedium	F-12, 1% 2-(4-(2-Hydroxyethyl)1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure (HEPES)-	
	Puffer; 1 mM Natriumpyruvat, 1 x MEM NEAA (Minimum essenzielle medium	
	nichtessenzielle Aminosäuren), 1 x GlutaMAX, 1% Penicillin-Streptomycin	
TSM-Arbeitsmedium	TSM-Basismedium, 0,5x B27®-Zusatz, 20 ng/ml EGF (epidermal growth factor),	
	20 ng/ml FGF (fibroblast growth factor), 10 ng/ml PDGF-AA	
	(platelet-derived growth factor-AA), 10 ng/ml PDGF-BB (platelet-derived growth factor-	
	AA), 2 μg/ml Heparin	

Tabelle 2 : Zellnährmedien und ihre Zusammensetzung

2.1.2 Instrumente und Geräte

Geräte, die in der vorliegenden Studie Verwendung fanden, sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Gerät	Hersteller	Herkunftsort
BioDoc-Analyzer	Biometra	Göttingen, Deutschland
Blotting-System	Biometra	Göttingen, Deutschland
Elektrophorese-Stromversorgung	Peqlab	Erlangen, Deutschland
Elektrophoresesystem für Agarosegele	Peqlab	Erlangen, Deutschland
LSRII FACS-Gerät	Becton Dickinson	Heidelberg, Deutschland
Luminescent image analyzer LAS-4000 mini	Fujifilm	Düsseldorf, Deutschland
Mini-PROTEAN-Tetra-Cell-	Bio-Rad	Feldkirchen, Deutschland
Elektrophoresesystem		
Neubauer-Zellzählkammer	Brand GmbH	Wertheim, Deutschland
Spectrophotometer-NanoDrop® ND-1000	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Ultraschallprozessor UP100H	Hielscher Ultrasonics	Teltow, Deutschland
	GmbH	
Schüttler MTS 4	IKA	Staufen, Deutschland
SynergyMx-Microplate-Reader	BioTek	Bad Friedrichshall,
		Deutschland
Thermomixer 5436	Eppendorf TM	Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5415R	Eppendorf TM	Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5810R	Eppendorf TM	Hamburg, Deutschland

2.1.3 Verbrauchsgegenstände

Verbrauchsgegenstände, die in der vorliegenden Studie verwendet wurden, sind in Tabelle 4 angeführt.

Verbrauchsgegenstand	Hersteller	Herkunftsort
Combitips	Eppendorf™	Hamburg, Deutschland
Falcon-Röhrchen (15 ml)	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Falcon-Röhrchen (50 ml)	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflaschen (T75 und T175)	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Nunclon Delta-beschichtete Zellkulturplatten	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
(6-Well, 12-Well and 96-Well)		
Nunclon Delta-beschichtete Zellkulturschalen	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
(10 ml)		
Pasteurpipetten	Brand GmbH	Wertheim, Deutschland
PCR-Röhrchen (0,2 ml)	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Filterpipettenspitzen (10; 200; 1000 µl)	Starlab	Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen (10; 200; 1000 µl)	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
PVDF-Membran Immobilon-P	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, Deutschland
(Porengröße 0,45 µM)		
Mikroreaktionsgefäß (1,5 ml und 2 ml)	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten (5; 10; 25 ml)	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Whatman-Filterpapier	Sartorius	Göttingen, Deutschland

Tabelle 4 : Verbrauchsgegenstände und Hersteller

2.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien, die in der vorliegenden Studie genutzt wurden, sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Chemikalie/Reagenz	Hersteller	Herkunftsort
6 x DNA-Loading-Dye	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
10 x DNAse I-Puffer	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
ß-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, Deutschland
Albumin Standard	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Ameisensäure 98 – 100%	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
BC-Assay-Reagenz A	Interchim	Mannheim, Deutschland
BC-Assay-Reagenz B	Interchim	Mannheim, Deutschland
BlueStar Prestained Proteinmarker	NIPPON Genetics	Düren, Deutschland
Bovines Serumalbumin Fraktion V	SERVA Electrophoresis	Heidelberg, Deutschland
(BSA)	GmbH	
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, Deutschland
Coomassie Brilliantblau	Bio-Rad	Feldkirchen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
(Na ₂ HPO ₄)		
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, Deutschland
Eisessig	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, Deutschland
Formaldehyd (mind. 37%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Luminol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, Deutschland
Kristallviolett-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, Deutschland
Kurkumin	Selleckchem	München, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Chemsolute®	Hambur, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
N,N,N'N'-Tetramethylethylendiamin	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
(TEMED)		
NaCl	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, Deutschland
Natriumdodecylsulfat, ultrapur	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Nonidet-P40 (NP40)	Honeywell Fluka TM	Seelze, Deutschland
p-Cumarsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, Deutschland

Tabelle 5 : Chemikalien, Reagenzien und Hersteller

Chemikalie/Reagenz	Hersteller	Herkunftsort
Phosphatgepufferte Salzlösung-	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Tabletten (phosphate-buffered saline, PBS)	Gibco® by Thermo Fisher	Waltham, USA
Propidiumiodid (PI)	Scientific	
	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, Deutschland
Proteaseinhibitor-Tabletten	Roche	Mannheim, Deutschland
Quick Load Purple kB DNA-Ladder	New England BioLabs	Frankfurt am Main,
		Deutschland
Roti®-Stock 20% SDS	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese®-Gel 40 (29:1)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
SeaKem® LE Agarose	Biozym	Hessisch Oldendorf,
		Deutschland
Thiazolylblau-Tetrazoliumbromid (MTT)	Alfa Aesar	Kandel, Deutschland
Tris	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau (0,4%)	Gibco® by Thermo Fisher	Waltham, USA
	Scientific	
Trypsin-EDTA (10x)	Gibco® by Thermo Fisher	Waltham, USA
	Scientific	
Triton X-100	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H2O2)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, Deutschland

Selbst hergestellte Lösungen und Puffer sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Bezeichnung	Zusammensetzung	
10 x Kristallviolett-Anfärbelösung	5% Kristallviolett-Lösung, 27% Formaldehyd (mind. 37%),	
	10% Methanol, 10x PBS, 48% H2O	
4 x Laemmli-Probenpuffer	240 mM Tris-HCl (pH 6,8), 40% Glycin, 8% SDS, 20% ß-	
	Mercaptoethanol, 0,04% Bromphenolblau	
4 x Trennpuffer (LT) (pH 8,8)	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,4% SDS	
4 x Sammelpuffer (UT) (pH 6,8)	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,4% SDS	
Lösung zum Blocken der Membran	5% Milchpulver bzw. BSA in TBS-T	
Blot-Puffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 10% Methanol	
Zytoplasmatischer-Extrakt-Puffer (CE)	10 mM HEPES, 60 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT,	
	1 mM PMSF, 0,075% NP40, 1x Proteaseinhibitor, pH 7,6	
Coomassie-Entfärbungslösung	40% Ethanol, 10% Eisessig	
Coomassie-Färbelösung	0,2% Coomassie Brilliantblau, 30% Isopropanol, 10%	
	Essigsäure	
Enhanced-Chemiluminescence (ECL)-	2,5 mM Luminol, 0,36 mM p-Cumarsäure, 0,1 M Tris-HCl	
Lösung A	(pH 8,5)	
ECL-Lösung B	0,0182% H2O2, 0,1 M Tris-HCl, (pH 8,5)	
Fluorchrom-Lösung (hypoton)	50 µg/ml Propidiumiodid, 0,1% Natriumcitrat, 0,1%	
	Triton X-100	
Laemmli-Laufpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,01% SDS	
MTT-Lösung	5 mg/ml MTT in PBS	
MTT Lysepuffer	33% DMSO, 5% Ameisensäure, 62% Isopropanol	
Nukleärer-Extrakt-Puffer (NE)	20 mM Tris-HCl, 420 mM NaCl, 1,5 mM MgCl2, 0,2 mM	
	EDTA, 1 mM PMSF, 25% Glycerol, 1x Proteaseinhibitor,	
	рН 8,0	
TBS-T (pH 7,4)	20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,1% Tween	

Tabelle 6 : Hergestellte Lösungen und Puffer

Die Inhaltsstoffe für die in der Zellkultur verwendeten ergänzenden Mediumszusätze sind in Tabelle 7 aufgeführt. Tabelle 7 : Mediumszusätze

Zusätze	Hersteller	Herkunftsort
DMEM/F-12 (1:1) (1 x)	Gibco® by Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Neurobasal-R-A-Medium (1 x)	Gibco® by Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
OptiMEM® I	Gibco® by Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
B27®-Zusatz (50 x)	Gibco® by Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Fetales Kälberserum (fetal calf serum, FCS)	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
GlutaMAX TM -I (100 x)	Gibco® by Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Heparin-Natriumsalz aus porciner intestinaler	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen,
Mucosa		Deutschland
HEPES-Puffer	Gibco® by Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
MEM NEAA (100 x)	Gibco® by Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Natriumpyruvat 100 mM (100 x)	Gibco® by Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
PDGF-AA	PeproTech	Hamburg, Deutschland
PDGF-BB	PeproTech	Hamburg, Deutschland
Rekombinantes humanes EGF	PeproTech	Hamburg, Deutschland
Rekombinantes humanes FGF	PeproTech	Hamburg, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	Gibco® by Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA

2.1.5 Enzyme und Antikörper

Die Enzyme, mit denen in dieser Studie gearbeitet wurde, sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8 : Genutzte Enzyme

Enzym	Produktnummer	Hersteller	Herkunftsort
DNAse I (RNAse-frei)	L/N 1211028	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA

Primäre Antikörper, deren Verdünnungen und Hersteller, die für Western-Blot-Analysen verwendet wurden, sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Primärer	Ursprung	Verdünnung	REF-	Hersteller	Herkunftsort
Antikörper			Nummer		
ß-Aktin HRP	Maus	1:5000	A3854	Sigma-Aldrich	Taufkirchen,
(horseradish				Chemie GmbH	Deutschland
peroxidase)	Kaninchen	1:1000	EP16602	Abcam	Berlin,
Acetyl-Histon H3					Deutschland
(Lys27)					
Cleaved PARP	Kaninchen	1:500	9541	Cell Signaling	Danvers, USA
				Technology	
LC3B	Kaninchen	1:1000	27758	Cell Signaling	Danvers, USA
				Technology	
PARP	Kaninchen	1:500	9542	Cell Signaling	Danvers, USA
				Technology	
Trimethyl-Histon H3	Kaninchen	1:1000	4909	Cell Signaling	Danvers, USA
(Lys27)				Technology	

Tabelle 9 : Genutzte primäre Antikörper für Western-Blot-Analysen

Sekundäre Antikörper, mit denen für Western-Blot-Analysen gearbeitet wurde, sind in Tabelle 10 aufgelistet.

Tabelle 10 : Genutzte sekundäre Antikörper für Western-Blot-Analysen

Sekundärer	Verdünnung	REF-Nummer	Hersteller	Herkunftsort
Antikörper				
Anti-Kaninchen IgG,	1:10000	7074	Cell Signaling	Danvers, USA
HRP-gekoppelt			Technology	

2.1.6 Kommerzielle Kits

Kommerzielle Kits, mit denen in der vorliegenden Studie gearbeitet wurde, sind in Tabelle 11 aufgelistet.

Tabelle 11 : Verwendete kommerzielle Kits

Kit	REF-Nummer	Hersteller	Herkunftsort
ReliaPrep [™] RNA-Cell-Miniprep-	Z6012	Promega	Madison, USA
System			
SignalFire™ Elite-ECL-Reagenz	127578	Cell Signaling	Danvers, USA
		Technology	

2.1.7 Software

Software, mit der im Zuge dieser Studie gearbeitet wurde, ist in Tabelle 12 aufgelistet.

Software	Unternehmen	Herkunftsort
FlowJo TM	FlowJo LLC by Becton, Dickinson	Ashland, USA
	and Company	
Image J 1.48	National Institutes of Health	Bethesda, USA
Microsoft Office 2013	Microsoft	Redmond, USA

Tabelle 12 : Verwendete Software

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur und Kurkuminbehandlung

Die isogenen Zelllinien, mit denen in der vorliegenden Studie gearbeitet wurde, wurden als in Suspension gehaltene Gliomasphären in TSM-Arbeitsmedium kultiviert.

Das TSM-Arbeitsmedium wurde unmittelbar vor Gebrauch mit den in Tabelle 7 beschriebenen Zusätzen versehen: epidermale (EGF) und Fibroblasten (FGF)-Wachstumsfaktoren, Protein B27, thrombozytäre Wachstumsfaktoren AA und BB (PDGF-AA/BB) und Heparin. Alle Zellen wurden im Inkubator bei einer Temperatur von 37°C und einer Luftfeuchtigkeit von 5% CO₂ gehalten.

Zum Passagieren und Aussäen der Zellen wurden diese bei 1494 x g fünf Minuten lang zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5810R, Hamburg, Deutschland). Die Zellpellets wurden mit 1 x Trypsin-EDTA verdaut, um die Zellen zu vereinzeln, mit 1 x PBS gewaschen und in TSM-Basismedium resuspendiert. 100 µl der Zellsuspension wurden mit Trypanblau versetzt und

unter Zuhilfenahme einer Neubauer-Zählkammer (Brand GmbH, Wertheim, Deutschland) gezählt. Die zum Aussäen gewünschte Anzahl an Zellen wurde im korrespondierenden Medium suspendiert und dem geplanten Experiment entsprechend ausplattiert (Tabelle 13) – die verbleibenden Zellen wurden zum Erhalt der Zelllinie in TSM-Arbeitsmedium weiter kultiviert.

Zellkulturplatte	Versuch	Volumen pro Vertiefung	Konzentration
		[µl] / pro Platte [ml]	[Zellen/ml]
10 cm	Proteine, PI-FACS	10 ml	50.000
sechs Vertiefungen (6-Well)	RNA	2000 µl	50.000
zwölf Vertiefungen (12-Well)	Formationsanalysen	1000 µl	5.000
96 Vertiefungen (96-Well)	MTT	100 µl	50.000

Tabelle 13 : Übersicht über Zellkulturplattenformate

Kurkumin (Selleckchem, München, Deutschland) wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)) gelöst in einer Stoffmengenkonzentration von 50 mM bei -80°C gelagert und für die Versuche entsprechend verdünnt. Als Kontrollreferenz wurde immer DMSO genutzt.

2.2.2 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Zellviabilitätsanalyse

Um die Zellviabilität nach Kurkuminbehandlung zu analysieren, wurden 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Versuche durchgeführt. Dafür wurden 100 µl einer Zellsuspension mit 50000 Zellen/ml (isoUGO-2- und isoUGO-1-Zellen) in 96-*Well*-Zellkulturplatten ausgesät (vergleiche Tabelle 13), mit Kurkumin in aufsteigenden Konzentrationen behandelt und bei 37°C inkubiert. Nach 72 h wurden 10 µl MTT-Lösung (Tabelle 6) hinzugegeben und die Zellen abermals vier Stunden bei 37°C inkubiert. Das Medium wurde nachfolgend abgesaugt, und zu den verbliebenen Zellen wurde je 200 µl MTT-Lysepuffer (Tabelle 6) hinzugegeben. Nach fünfminütigem Schütteln auf dem Schüttler MTS 4 (IKA, Staufen, Deutschland) wurde die Absorption mit dem BioTek SynergyMx-*Microplate-Reader* (BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 560 nm gemessen.

Die Experimente wurden mindestens drei Mal mit drei verschiedenen Zellklonen repliziert und jeweils in technischen Triplikaten durchgeführt.

2.2.3 Sphärenformations-Analyse

Um den Effekt von Kurkumin auf das Selbsterneuerungspotential der isoUGO-Zellen zu untersuchen, wurden isoUGO-2- und isoUGO-1-Zellen in einer Konzentration von 5000 Zellen/ml in TSM-Arbeitsmedium in 12-*Well*-Zellkulturplatten ausgesät (vergleiche Tabelle 13) und mit 5 µM bzw. 10 µM Kurkumin bzw. mit DMSO als Kontrollreferenz behandelt. Nach sieben Tagen wurden die Sphären durch Zugabe von 10% fetalem

Kälberserum (FCS) für weitere 8 h bei 37°C adhäriert. Anschließend wurde das Medium aspiriert und zu den am Boden der Vertiefungen verbliebenen Zellen 500 µl 10x Kristallviolett-Färbelösung (Tabelle 6) hinzugefügt. Nachdem sich die Zellen mit Hilfe der Kristallviolettlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur durch sanftes Schütteln (Schüttler MTS 4, IKA, Staufen, Deutschland) anfärbten und fixiert wurden, wurden die Zellkulturplatten unter fließendem Wasser gewaschen und im Inkubator über Nacht bei 37°C getrocknet.

Die eingescannten Platten wurden mit dem ImageJ-Werkzeug "Particle Analyzer" (Tabelle 12) ausgewertet.

Die Experimente wurden jeweils in Duplikaten durchgeführt und mit drei verschiedenen Zellklonen wiederholt.

2.2.4 Kolonieformations-Analyse

Um den Effekt von Kurkuminbehandlung auf die Proliferations- und Differenzierungskapazitäten der isoUGO-Zellen zu untersuchen, wurden isoUGO-2- und isoUGO-1-Zellen mit 10% FCS in einer Konzentration von 5000 Zellen/ml auf 12-*Well*-Zellkulturplatten ausgesät

(Tabelle 13) und mit 5 µM bzw. 10 µM Kurkumin bzw. DMSO als Kontrollreferenz behandelt. Nach vier Tagen Inkubationszeit bei 37°C wurde das Medium aspiriert und die Zellen nach Zugabe von 500 µl 10x Kristallviolett-Färbelösung (Tabelle 6) unter sanftem Schütteln (Schüttler MTS 4, IKA, Staufen, Deutschland) eine Stunde lang angefärbt und fixiert. Im Anschluss wurden die Zellkulturplatten mit Wasser ausgewaschen und die angefärbten Zellen über Nacht im Inkubator bei 37°C getrocknet.

Die eingescannten Platten wurden mit dem ImageJ-Werkzeug "ColonyArea" (Tabelle 12) ausgewertet (Guzmán et al. 2014).

2.2.5 Propidiumiodid-Durchflusszytometrie (PI-FACS)

Um den Einfluss der Kurkuminbehandlung auf Apoptose und Zellzyklusarrest in isoUGO-Zellen zu analysieren, wurden isoUGO-2- und isoUGO-1-Zellen mit einer Dichte von 50000 Zellen/ml in TSM-Arbeitsmedium und Zusatz von einer höheren Menge B27 (1000 µl in 50 ml) in 10 cm-Zellkulturplatten ausgesät (vergleiche Tabelle 13), mit 10 µM Kurkumin bzw. DMSO behandelt, bei 37°C inkubiert und nach 48 h zentrifugiert (siehe Tabelle 3). Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellpellets mit 1 x PBS gewaschen und dann entweder zunächst bei -80°C aufbewahrt oder sofort weiterbearbeitet. Am Vortag der Messung wurden die Zellpellets in je 1,5 ml hypotoner Fluorchrom-Lösung resuspendiert (Tabelle 6) und bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Durchflusszytometrie wurde in freundlicher Kooperation mit Dr. Niklas Engels (Immunologie, Universitätsmedizin Göttingen) unter Verwendung des LSR II-Durchflusszytometers (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt und mit Hilfe von FlowJoTM (Tabelle 12) ausgewertet.

2.2.6 Proteinisolation und Bestimmung der Proteinkonzentrationen

Für die Gewinnung von Zellpellets zur Proteinisolation wurden isoUGO-2- und isoUGO-1-Zellen mit einer Dichte von 50000 Zellen/ml in TSM-Arbeitsmedium in 10 ml-Zellkulturplatten ausgesät (vergleiche Tabelle 13) und mit 5 µM Kurkumin bzw. DMSO behandelt, bei 37°C inkubiert und nach 72 h zentrifugiert (siehe Tabelle 3). Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellpellets wurden mit 1 x PBS gewaschen und dann entweder zunächst bei -80°C aufbewahrt oder sofort weiterbearbeitet.

Zur Proteinisolation wurden die Zellpellets in Zytoplasmatischem Extrakt (CE)-Puffer (Tabelle 6) mit dem Zusatz von 100 x Roche Protease Inhibitor Cocktail (1:100) (Roche, Mannheim, Deutschland) resuspendiert. Die Zellen wurden bei 4°C für 5 min bei 1494 x g zentrifugiert (siehe Tabelle 3). Das Zellpellet wurde in Nukleärem Extrakt (NE)-Puffer (Tabelle 6), ebenfalls mit dem Zusatz von 100 x Roche Protease Inhibitor Cocktail (1:100), resuspendiert. Die Salzkonzentration wurde durch Zugabe von 50 µl 5 M NaCl auf final 400 mM angepasst und der Extrakt für 15 s unter Verwendung eines Ultraschallprozessors (Ultraschallprozessor UP100H, Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Deutschland) sonifiziert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis wurde der Extrakt erneut für 10 min bei maximaler Geschwindigkeit (20913 x g) zentrifugiert (siehe Tabelle 3). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und entweder vorübergehend bei -80°C aufbewahrt oder die Proteinkonzentration sofort durch Bicinchoninsäure-Analysen (*bicinchoninic acid assay*, BCA, Interchim, Mannheim, Deutschland) gemessen.

Dafür wurden 1 µl bzw. 3 µl für die erste Messung, 2 µl für die gegebenenfalls notwendige zweite bzw. dritte Messung der Proteinextrakte mit destilliertem Wasser (dH₂O) auf ein Endvolumen von 25 µl verdünnt und in Duplikaten auf 96-*Well*-Platten aufgetragen. 200 µl BCA-*Working*-Reagenz (1:50 Reagenz A und Reagenz B) wurden in jede Vertiefung der Platte gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm im BioTek SynergyMx-*Microplate-Reader* (BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland, Tabelle 3) gemessen. Um die Proteinkonzentrationen der jeweiligen Proben zu bestimmen, wurde eine Standardverdünnungsreihe mit Bovinem Serumalbumin (BSA, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) zwischen 0 µg und 30 µg als Referenz genutzt.

Die entsprechende Menge der Proteinprobe wurde – je nach Ursprung – in NE- bzw. CE-Puffer und 4x Laemmli-Probenpuffer (Tabelle 6) verdünnt, um eine finale Proteinkonzentration von 1 μ g/ μ l zu erzielen. Die Proben wurden im Anschluss durch fünfminütiges Erhitzen auf 95°C (Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg, Deutschland, siehe Tabelle 3) denaturiert und dann bei -20°C aufbewahrt oder sofort für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) genutzt.

2.2.7 Western-Blot-Analysen

Um den Effekt der Kurkuminbehandlung auf Histonmodifikationen und Zelltodmechanismen in isoUGO-Zelllinien zu untersuchen, wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt.

Abhängig von der Größe des zu untersuchenden Proteins wurden je 20 µg der Proteinprobe auf unterschiedlich konzentrierte SDS-Polyacrylamidgele in Laemmli-Laufpuffer (Tabelle 6) geladen: Für kleinere Proteine unter 65 kDa wurden 12,5- bzw. 15-prozentige Gele gewählt, während für größere Proteine ab 65 kDa mit zehnprozentigen Gelen gearbeitet wurde (siehe Tabelle 14). Die molekulare Masse der aufgetrennten Proteine wurde anhand eines vorgefärbten Proteinmarkers (BlueStar *Prestained*-Proteinmarker, NIPPON Genetics, Düren, Deutschland) bestimmt.

Für die Gelelektrophorese wurde eine Spannung von anfänglich 80 V und dann im Verlauf des Versuchs nach etwa einer Stunde 120 V angelegt (Elektrophoresesystem, Peqlab, Erlangen, Deutschland).

SDS-Polyacrylamidgel	Prozentsatz	Zusammensetzung
	des Gels	
Sammelgel		12,5% RotiphoreseR Gel 40 (29:1), 1 x Sammelpuffer
		(UT), 0,1% APS, 0,1% TEMED, dH2O
Trenngel	15%	37,5% RotiphoreseR Gel 40 (29:1), 1 x Trennpuffer (LT),
		0,1% APS, 0,1% TEMED, dH ₂ O
	12,5%	31% RotiphoreseR Gel 40 (29:1), 1 x Trennpuffer (LT),
		0,1% APS, 0,1% TEMED, dH2O
	10%	25% RotiphoreseR Gel 40 (29:1), 1 x Trennpuffer (LT),
		0,1% APS, 0,1% TEMED, dH2O

Tabelle 14 : Zusammensetzung der Polyacrylamidgele für SDS-PAGE
Die entsprechend ihrer Größe aufgetrennten Proteine wurden mittels *Wet-Blotting* von den Polyacrylamidgelen auf eine Nitrocellulosemembran (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) übertragen, welche zuvor für 30 s in Methanol aktiviert und danach in Blot-Puffer (Tabelle 6) getränkt worden war. Der Prozess des Blottens wurde für 45 min mit einer Stromstärke von 500 mA durchgeführt (*Blotting*-System, Biometra, Göttingen, Deutschland).

Danach wurden die Gele in der Coomassie-Färbelösung (Tabelle 6) über Nacht angefärbt und anschließend mit Coomassie-Entfärbelösung (Tabelle 6) entfärbt – mit dem Ziel, den Proteintransfer im Nachhinein visuell darstellen und somit bestätigen zu können. Die Membranen

wurden eine Stunde lang bei Raumtemperatur in der dem primären Antikörper entsprechenden Lösung mit 5% Milchpulver bzw. 5% BSA in Tris-gepufferter Salzlösung mit 0,1% Tween20 (TBS-T) geblockt (Tabelle 6), um das unspezifische Binden der Antikörper zu vermeiden. Im Anschluss wurden die Membranen über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert (Tabelle 9). Am Folgetag wurden die Membranen zunächst drei Mal für jeweils 10 min in TBS-T gewaschen, dann mit dem korrespondierenden, HRP-gekoppelten sekundären Antikörper (Anti-Kaninchen IgG, Tabelle 10), der in 5% BSA in TBS-T bzw. 5% Milchpulver – abhängig von dem Medium, das für den jeweiligen primären Antikörper Verwendung fand – gelöst wurde, für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, und abschließend erneut drei Mal für jeweils 10 min mit TBS-T gewaschen.

Um die spezifischen Proteine zu detektieren, wurde für eine Minute eine HRP-verstärkte Chemilumineszenzlösung (ECL, Cell Signaling Technology, Danvers, USA) auf die Membranen gegeben und die Proteinbanden mit Hilfe des Fujifilm-Luminescent-*Image-Analyzers* LAS-4000 mini (Fujifilm, Düsseldorf, Deutschland) visualisiert.

2.2.8 RNA-Isolation und Sequenzierung

Für die Gewinnung von Zellpellets für die RNA-Isolation wurden isoUGO-2-Zellen mit einer Dichte von 50000 Zellen/ml in TSM-Arbeitsmedium mit 1000 μ l B27 (in 50 ml) in 6-*Well*-Zellkulturplatten ausgesät (Tabelle 13), mit 10 μ M Kurkumin bzw. DMSO behandelt, bei 37°C inkubiert und nach 48 h zentrifugiert (Tabelle 3). Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellpellets mit 1 x PBS gewaschen und dann entweder zunächst bei -80°C aufbewahrt oder sofort weiterbearbeitet. Die RNA-Isolation wurde mit Hilfe des ReliaPrep[™] MiniPrep-Systems (Promega, Madison, USA, Tabelle 11) bis auf den Arbeitsschritt des Verdaus mit DNAse, der auf 30 Minuten verlängert wurde, gemäß der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die RNA-Konzentrationen wurden unter Verwendung des NanoDrop-Spektrophotometers (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) gemessen. 200 ng der isolierten RNA wurde mittels Gelelektrophorese visualisiert und analysiert, um mögliche Degradation während des Isolationsprozesses auszuschließen.

Jeweils 2 µg isolierter RNA wurde zur mRNA-Sequenzierung der NGS-Serviceeinrichtung für Integrative Genomik des Instituts für Humangenetik der Universitätsmedizin Göttingen (NGS-*Integrative Genomics Core Unit* (NIG)) übergeben. Die Erstellung der Genbibliothek sowie die statistische Auswertung der Sequenzierungsergebnisse wurde entsprechend Babelova et al. (2015) in Kooperation mit Dr. Gabriela Salinas-Riester und Dr. Maren Sitte (NIG) durchgeführt. Die Grenzwerte für die Relevanz der entsprechenden Gene wurden wie folgt festgelegt: für den relativen Unterschied der Genexpressionshöhe (*fold change*, FC) wurden FC $\leq 0,75$ und FC $\geq 1,5$ und ein *False-Discovery-Rate* (FDR)-korrigierter p-Wert von $\leq 0,05$ determiniert.

Die funktionelle Auswertung der Sequenzierung wurde unter Zuhilfenahme der in Tabelle 15 aufgelisteten Programme vorgenommen:

Name des Programms	Internetseite	Referenz
Kyoto Enzyklopädie für Gene und	genome.jp/kegg/kegg2.html	Kanehisa und Goto 2000
Genom (KEGG)		
ShinyGO Genontologie v0.61	bioinformatics.sdstate.edu/ go/	Ge et al. 2020
Venny 2.1	bioinfogp.cnb.csic.es/tools/	Oliveros J.C. 2007-2015
	venny/index.html	
R2: Genomanalyse- und	r2.amc.nl	Abteilung für Onkogenom-
-visualisierungsplattform		forschung, Amsterdam (AMC)

Tabelle 15 : Genutzte Programme zur Analyse der mRNA-Sequenzierung

Mittels R2-Analysen wurde die Expression spezifischer Gene in verschiedenen Geweben, die *post mortem* entnommen und deren RNA sequenziert wurde, verglichen. Als Kontrollreferenz diente Kortexgewebe von Patient:innen zwischen null und neunundvierzig Jahren (n=44) (Harris et al. 2009). Das Tumorgewebe stammte in der pädHGG-Kohorte von Patient:innen, die jünger als 23 Jahre alt waren (n=53) (Paugh et al. 2010) und in der DIPG-Kohorte von Patient:innen zwischen 3,6 und 15,7 Jahren (n=37) (Paugh et al. 2011).

2.2.9 Statistische Analyse

Alle Daten der vorliegenden Studie wurden unter Zuhifenahme von Microsoft Excel 2013 (Tabelle 12) ausgewertet.

Sofern nicht anderweitig beschrieben, wurden alle Experimente in biologischen Triplikaten durchgeführt, welche den jeweiligen Klonen der isogenen Zelllinien (siehe Tabelle 1) entsprechen. Alle Graphen zeigen Mittelwerte der Replikate, normalisiert zur jeweiligen Kontrolle mit entsprechender Standardabweichung.

Die Signifikanz wurde mithilfe des T-Tests bestimmt und definiert mit einem p-Wert $\leq 0,05$.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Studie wurde mit isogenen Zelllinien gearbeitet, die sich bei gleichem genetischem Hintergrund lediglich in ihrem H3.3-Mutationsstatus unterscheiden, um somit die möglichen H3.3K27M-mutationsabhängigen Effekte von Kurkumin in isoUGO-Zellen untersuchen zu können.

3.1 Kurkumin induziert Zytotoxizität unabhängig vom H3.3-Mutationsstatus

Da bis zu 85% aller DIPG eine H3K27M-Mutation tragen (Hoffman et al. 2018) und diese den aggressiven Phänotyp von DIPG mitbedingt (Castel et al. 2018; Wiese et al. 2020), sollte in der vorliegenden Studie zunächst der H3.3K27M-abhängige Effekt von Kurkumin auf isogene UGO-Zellen untersucht werden.

Für die zu diesem Zweck durchgeführten MTT-Zellviabilitätsanalysen wurden isoUGO-1- und isoUGO-2-Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen Kurkumin behandelt.

Es konnten jedoch keine signifikanten H3.3K27M-mutationsabhängigen Effekte einer Kurkuminbehandlung auf die Viabilität von pädHGG-Zellen nachgewiesen werden. Weder das Einfügen der H3.3K27M-Mutation in UGO-2-Zellen noch das Entfernen der Mutation aus UGO-1-Zellen führte zu einer veränderten Reaktion der Zellen auf Kurkumin bezüglich ihrer Zellviabilität, welche mit steigenden Kurkuminkonzentrationen stärker reduziert wurde.

Allerdings konnten zelllinienabhängige Effekte beobachtet werden: IsoUGO-1-Zellen reagierten stärker auf Kurkumin mit einem IC50-Wert von $< 10 \,\mu$ M, wohingegen isoUGO-2-Zellen erst bei Behandlung mit $> 10 \,\mu$ M Kurkumin eine fünfzigprozentige Viabilitätsreduktion zeigten (Abbildung 6).



Abbildung 6 : Kurkumin induziert vergleichbare Zytotoxizität in isoUGO-Zellen unabhängig vom H3.3-Mutationsstatus. MTT-Analysen zur Bestimmung der Zellviabilität von (A) isoUGO-1-H3WTund -H3.3K27M-Zellen und (B) isoUGO-2-H3WT- und -H3.3K27M-Zellen nach Behandlung mit Kurkumin für 72 h. Gezeigt wird der Mittelwert von drei unabhängigen biologischen Replikaten mit entsprechender Standardabweichung.

Der zytotoxische Effekt von Kurkumin in isoUGO-Zelllinien war somit unabhängig von der H3.3K27M-Mutation und wies keine signifikanten Unterschiede zwischen H3WT- und H3.3K27M-mutierten Zellen auf.

3.2 Kurkumin induziert unterschiedliche Effekte auf die Genexpression in isoUGO-2-H3WT- und -H3.3K27M-Zellen

Um die durch Kurkumin induzierten Gensignaturen zu detektieren, wurden mRNA-Sequenzierungen des gesamten Transkriptoms in isoUGO-2-H3WT- und isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen durchgeführt.

Das Dendrogramm (Abbildung 7A) und die Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis*, PCA) (Abbildung 7B) stellen die globalen Unterschiede zwischen der Genexpression in isoUGO-2-H3.3K27M- bzw. isoUGO-2-H3WT-Zellen nach Kurkuminbehandlung im Vergleich zur Kontrollbehandlung dar. Die genexpressionelle Distanz zwischen den isoUGO-2-Zellen zeigte sich in Abhängigkeit von der H3.3K27M-Mutation größer als der durch Kurkumin induzierte Unterschied. In isoUGO-2-H3WT-Zellen war der Effekt der Kurkuminbehandlung auf die Veränderung der Genexpression stärker als in isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen (Abbildung 7).

Mittels der *Heatmap*-Analyse wurde die Expression der 50 am stärksten durch Kurkumin hochbzw. herunterregulierten Gene in isoUGO-2-H3WT- bzw. isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen durch eine Farbkodierung grafisch dargestellt. Wie schon durch Dendrogramm und PCA angedeutet, konnte auch hier eine stärkere differenzielle Genexpression der Top50-Gene in isoUGO-2-H3WT-Zellen im Vergleich zu isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen beobachtet werden (Abbildung 7C).



Abbildung 7 : Analyse der globalen Genexpression nach Kurkuminbehandlung in isoUGO-2-H3WT- und -H3.3K27M-Zellen. (A) Dendrogramm und (B) Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis*, PCA) zur Analyse der globalen Genexpression in isoUGO-2-H3WT- und -H3.3K27M-Zellen nach 48stündiger DMSO- bzw. 10 µM Kurkuminbehandlung und zur Darstellung der Distanz der einzelnen Replikate der isoUGO-2-H3WT- und -H3.3K27M-Zellen untereinander. Der Anteil der erfassten Varianz wird sowohl für die erste als auch für die zweite Hauptkomponente (Komponente 1 und 2) als Prozentsatz angegeben. (C) *Heatmap*-Analyse zur farbkodierten Darstellung der Expressionsstärke der Top50-regulierten Gene und deren Veränderung nach Kurkuminbehandlung im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Gezeigt werden drei, in isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen zwei unabhängige technische Replikate (bestehend aus verschiedenen Zellklonen).

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass Kurkumin sowohl in H3.3K27Mmutierten als auch in H3WT-tragenden isoUGO-Zellen einen starken Effekt auf die Genexpression ausübte, diese Effekte jedoch in Abhängigkeit vom H3.3-Mutationsstatus unterschiedlich stark zu sein schienen.

Insgesamt wurden sowohl in isoUGO-2-H3WT- als auch in isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen durch Kurkuminbehandlung mehr Gene in ihrer Expression reduziert als aktiviert (Abbildung 8).

Von den 216 Genen, deren Expression durch Kurkuminbehandlung in isoUGO-2-H3WT-Zellen aktiviert wurde, und den 265 Genen, die durch Kurkuminbehandlung in isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen aktiviert wurden, überschnitten sich lediglich 7% (31 Gene). Von den 452 Genen, die durch Kurkuminbehandlung in isoUGO-2-H3WT-Zellen vermindert exprimiert wurden, und den 397 Genen, deren Expression durch Kurkuminbehandlung in isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen reduziert wurde, wurden nur 3,5% (29 Gene) in beiden Zelllinien durch Kurkumin herunterreguliert.

Der Großteil der Gene, deren Expression durch Kurkumin differenziell reguliert wurde, unterschied sich zwischen isoUGO-2-H3.3K27M- und isoUGO-2-H3WT-Zellen. 52% aller durch Kurkuminbehandlung stärker exprimierten Gene wurden spezifisch in isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen reguliert, 41% der durch Kurkumin hochregulierten Gene nur in isoUGO-2-H3WT-Zellen. 45% aller durch Kurkuminbehandlung schwächer exprimierten Gene wurden spezifisch in isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen, 51,5% ausschließlich in isoUGO-2-H3WT-Zellen durch Kurkumin beeinflusst (Abbildung 8).



Abbildung 8 : Kurkumin induziert unterschiedliche Gensignaturen in isoUGO-2-H3WT- und isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen. Venn-Diagramm-Analysen zur Identifikation der H3.3K27M-mutationsabhängigen Unterschiede der Kurkuminwirkung auf die Genexpression in isoUGO-2-H3WT- und H3.3K27M-Zellen nach Behandlung mit 10 μ M Kurkumin für 48 h. Venn-Diagramme zur Darstellung der Überschneidung der Gene, die durch Kurkuminbehandlung in isoUGO-2-Zellen 1,5-fach hoch- bzw. 0,75-fach herunterreguliert wurden, justierter p-Wert \leq 0,05.

Diese deutlichen Unterschiede in der Gensignatur zwischen H3WT- und H3.3K27M-mutierten isoUGO-Zellen deuten darauf hin, dass Kurkumin in Abhängigkeit vom *H3F3A*-Mutationsstatus über unterschiedliche Mechanismen zu wirken scheint.

Um herauszufinden, welche biologischen Prozesse die Kurkuminbehandlung in isoUGO-2-H3WT- bzw. isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen am stärksten beeinflusste, wurden genontologische Expressionsanalysen (GO) mithilfe von KEGG (Kanehisa Laboratories, Bioinformatics Center, Institute for Chemical Research, Kyoto University, Japan und Human Genome Center, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Japan) und ShinyGO (Department of Mathematics and Statistics, Brookings, USA und Biomedical Research Center, Yonsei University, Seoul, Südkorea) durchgeführt (Tabelle 15).

Die durch Kurkuminbehandlung in isoUGO-2-H3WT-Zellen am stärksten hochregulierten Gene waren besonders mit der Aktivierung und Regulation von Zelltodmechanismen assoziiert, herunterregulierte Gene hingegen mit Vorgängen wie Zellzyklusprogression und -regulation (Abbildung 9A). In isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen wurden vor allem Gene, die mit Vorgängen der Zelldifferenzierung assoziiert waren, durch Kurkuminbehandlung stärker exprimiert. Die Gene, deren Expression durch Kurkumin in isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen am stärksten reduziert wurde, waren mit Vorgängen wie Signaltransduktion, Regulation der Zelllokalisation und intra- und interzellulären Transportprozessen assoziiert (Abbildung 9B).

Anhand der Höhe der *False-Discovery-Rate* (FDR) zeigte sich abermals, dass der Effekt von Kurkuminbehandlung auf isoUGO-2-H3WT-Zellen vor allem auf die reduziert exprimierten Gene stärker war als auf isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen (Abbildung 9).



Abbildung 9 : Kurkumin reguliert unterschiedliche Prozesse in isoUGO-2-H3WT- bzw. isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen. Genontologische Expressionsanalyse zur Identifikation der in (A) isoUGO-2-H3WT- und (B) isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen durch Kurkumin am stärksten regulierten biologischen Prozesse. Auswertung der mRNA-Sequenzierungsergebnisse mithilfe von ShinyGO mit Anwendung der *False-Discovery-Rate* (FDR) zur Identifikation der H3.3K27M-mutationsabhängigen Unterschiede der Kurkuminwirkung in für 48 h mit 10 μ M Kurkumin behandelten isoUGO-2-Zellen. Angewendete Grenzwerte: log2FC \leq 0,75 und \geq 1,5, justierter p-Wert \leq 0,05.

Zusammenfassend schien Kurkumin in H3WT-isoUGO-Zellen über andere Prozesse als in H3.3K27M-mutierten isoUGO-Zellen zu wirken. Jedoch führte die Regulation unterschiedlicher Vorgänge durch Kurkumin in H3WT- und H3.3K27M-mutierten isoUGO-Zellen insgesamt zu einer vergleichbaren Toxizität.

3.3 Kurkumin erhöht die H3K27-Trimethylierungslevel in isoUGO-H3.3K27M-Zellen und reduziert die H3K27-Acetylierungslevel in isoUGO-Zellen unabhängig vom H3.3-Mutationsstatus

DIPG tragen zu 85% eine Mutation im *H3F3A*-Gen, die über eine Aminosäurensubsitution zu einem epigenetischen Ungleichgewicht führt und in verminderten H3K27-Trimethylierungs-(H3K27me3) und erhöhten H3K27-Acetylierungsleveln (H3K27ac) resultiert. Die epigenetische Aktivität von Kurkumin wurde unter anderem von Hassan et al. (2019) bereits beschrieben. Daher wurde in der vorliegenden Studie der Effekt von Kurkumin in isoUGO-Zellen auf epigenetischer Ebene untersucht: Um mögliche durch Kurkumin verursachte Histonmodifikationen zu identifizieren, wurden Western-Blot-Analysen mit kurkuminbehandelten isoUGO-1- und isoUGO-2-Zellen durchgeführt.

Wie erwartet zeichneten sich isoUGO-H3.3K27M-Zellen im Vergleich zu isoUGO-H3WT-Zellen durch erhöhte H3K27ac- und reduzierte H3K27me3-Level aus (Abbildung 10). In isoUGO-1- und isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen induzierte Kurkumin eine signifikante Erhöhung bis hin zur Normalisierung der H3K27me3-Level auf das Niveau von isoUGO-H3WT-Zellen. In isoUGO-H3WT-Zelllinien konnte kein Einfluss von Kurkumin auf die Trimethylierung an H3K27 festgestellt werden (Abbildung 10). Durch die Behandlung mit Kurkumin konnte sowohl in isoUGO-2-H3WT- und -H3.3K27M-Zellen als auch in isoUGO-1-H3.3K27M-Zellen eine signifikante Reduktion der H3K27ac-Level induziert werden. Auch in isoUGO-1-H3WT-Zellen zeigte sich eine starke, wenngleich nicht signifikante Reduktion von H3K27ac durch Kurkuminbehandlung (Abbildung 10).



Abbildung 10 : Kurkumin stellt die H3K27-Trimethylierung isoUGO-H3.3K27M-Zellen wieder her und reduziert die H3K27-Acetylierungslevel in isoUGO-Zellen unabhängig vom H3.3-Mutationsstatus. (A) Western-Blot-Analysen zur Bestimmung und (B) Densitometrie-Analyse zur Quantifizierung der H3K27-Acetylierung (H3K27ac) und H3K27-Trimethylierung (H3K27me3) nach Behandlung isogener UGO-1- und UGO-2-H3WT- und -H3.3K27M-Zellen mit 5 μ M Kurkumin für 72 h. ß-Aktin diente jeweils als Ladekontrolle und zur Normalisierung. Gezeigt werden bei der H3K27ac-Analyse drei; bei der H3K27me3-Analyse fünf unabhängige biologische Replikate (je bestehend aus zwei technischen Replikaten: Klonen der isogenen Zelllinien) mit entsprechender Standardabweichung, *p \leq 0,05 im Vergleich zur entsprechenden unbehandelten DMSO-Kontrolle, $\Delta p \leq$ 0,05 im Vergleich zwischen H3WT- und H3.3K27M-mutierten isoUGO-1- und isoUGO-2-Zellen.

Zusammenfassend hatte Kurkumin in H3.3K27M-mutierten isoUGO-Zellen einen stärkeren epigenetischen Effekt an H3K27 als in H3WT-tragenden isoUGO-Zellen. In H3.3K27M-isoUGO-Zellen konnte die H3K27me3 durch Kurkuminbehandlung wiederhergestellt werden.

Vorangegangene Studien der Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass die Acetylierung in H3.3K27Mmutierten pädHGG-Zellen stark von der Histonacetyltransferase CBP abhängt. Da Kurkumin die H3K27ac-Level sowohl in isoUGO-H3.3K27M- als auch in isoUGO-H3WT-Zellen reduzierte, wurden in der vorliegenden Studie anschließend die durch Kurkumin regulierten Gene mit denen verglichen, die durch CBP-Inhibition ebenfalls in isoUGO-Zellen reguliert wurden (unveröffentlichte mRNA-Sequenzierungsdaten freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Klaudia Kubiak, die sie im Rahmen ihrer Promotionsarbeit erhob). Um zu untersuchen, ob eher die HAT- oder die DNA-Bindungsaktivität von CBP eine Rolle spielen, wurden die identifizierten regulierten Gene aus der vorliegenden Studie mit den Sequenzierungsdaten von isoUGO-2-Zellen verglichen, die zuvor mit CBP-Inhibitoren behandelt wurden, die spezifisch die CBP-HAT-Aktivität (A485) bzw. die CBP-DNA-Bindungsaffinität (CBP30) hemmen.

Sowohl in isoUGO-2-H3WT- als auch in isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen kam es zu starken Überschneidungen der Gene, die sowohl durch Kurkumin als auch durch Inhibition der CBP-HAT-Aktivität (A485) vermindert exprimiert wurden: In isoUGO-H3WT-Zellen wurden von den insgesamt 452 Genen, deren Expression durch Kurkuminbehandlung reduziert wurde, 199 Gene (44%) auch durch CBP-HAT-Inhibition (A485) herunterreguliert. Lediglich 22 der Kurkumin-Zielgene (4,8%) wurden auch durch Inhibition der CBP-DNA-Bindungsfähigkeit (CBP30) affektiert. In isoUGO-H3.3K27M-Zellen wurden von den insgesamt 379 Genen, deren Expression durch Kurkuminbehandlung reduziert wurde, 201 Gene (50%) auch durch CBP-HAT-Inhibition (A485) herunterreguliert. Nur 20 der Kurkumin-Zielgene (5%) wurden auch durch Inhibition der CBP-DNA-Bindungsfähigkeit (CBP30) vermindert exprimiert (Abbildung 11).

Ein ähnlicher, wenn auch weniger starker Effekt konnte auch bei den durch Kurkumin aktivierten Gene identifiziert werden: Während in isoUGO-H3WT-Zellen 39 der insgesamt 216 durch Kurkuminbehandlung regulierten Gene (18%) auch durch CBP-HAT-Inhibition (A485) verstärkt exprimiert wurden, überschnitten sich die Kurkumin-Zielgene zu lediglich 2,3% (fünf Genen) mit denen, die auch durch Inhibition der CBP-DNA-Bindungsfähigkeit (CBP30) beeinflusst wurden. In isoUGO-H3.3K27M-Zellen wurden von den insgesamt 78 durch Kurkumin aktivierten Genen 37 (47,4%) auch durch CBP-HAT-Inhibition (A485) verstärkt exprimiert, durch Inhibition der CBP-DNA-Bindungsfähigkeit (CBP30) kam es lediglich zu einer Überschneidung von 3,8% (drei Genen) (Abbildung 11).

Abbildung 11 : Kurkumin wirkt unabhängig vom H3.3-Mutationsstatus möglicherweise über Inhibierung der CBP-HAT-Aktivität in isoUGO-2-Zellen. Venn-Diagramm-Analysen zur Identifikation des H3.3K27M-mutationsabhängigen Effektes von Kurkumin auf die Inhibition der CBP-HATbzw. CBP-DNA-Bindungsaktivität in isoUGO-2-H3WT- und -H3.3K27M-Zellen nach Behandlung mit 10 μ M Kurkumin bzw. 50 nM A485 (Inhibition der CBP-HAT-Aktivität) bzw. 1 μ M CBP30 (Inhibition der CBP-DNA-Bindungsaktivität) für 48 h. Es werden Gene gezeigt, die durch Kurkumin-, A485- bzw. CBP30-Behandlung in isoUGO-2-Zellen 1,5-fach hoch- bzw. 0,75-fach herunterreguliert wurden, justierter p-Wert \leq 0,05.

Vergleicht man die Gene, die jeweils sowohl in isoUGO-H3WT- als auch in isoUGO-H3.3K27M-Zellen durch Kurkumin- bzw. A485-Behandlung reguliert wurden, so zeigt sich vor allem in den durch Inhibitorbehandlung vermindert exprimierten Gene, dass sich von den insgesamt 29 durch Kurkumin in isoUGO-H3WT- und -H3.3K27M-Zellen gemeinsam herunterregulierten Genen 17 Gene (70%) mit den durch A485-Behandlung unabhängig vom H3.3-Mutationsstatus herunterregulierten Genen überschnitten (Abbildung 12). Bei den 31 durch Kurkuminbehandlung in isoUGO-H3WT- und auch in -H3.3K27M-Zellen verstärkt exprimierten Genen kam es lediglich zu einer Überschneidung von 9% (drei Genen) (Abbildung 12).

Abbildung 12 : 70% der durch Kurkumin unabhängig vom H3.3-Mutationsstatus inhibierten Gene werden auch durch CBP-HAT-Inhibition vermindert exprimiert. Venn-Diagramme zur Identifikation der unterschiedlich bzw. gleichermaßen regulierten Gene nach 10 μ M Kurkuminbehandlung und Inhibition der CBP-HAT-Aktivität (50 nM A485) in isoUGO-2-H3WT- und -H3.3K27M-Zellen nach 48 h. Es werden Gene gezeigt, die durch Kurkumin- bzw. A485-Behandlung sowohl in isoUGO-2-H3WT- als auch in isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen 1,5-fach hoch- bzw. 0,75-fach herunterreguliert wurden, angepasster p-Wert \leq 0,05.

Zusammenfassend führte Kurkuminbehandlung vermutlich unabhängig vom H3.3-Mutationsstatus über Inhibition der CBP-HAT-Aktivität zu einer Reduktion der H3K27ac-Level in isoUGO-Zellen.

3.4 Kurkumin reduziert das Selbsterneuerungspotential und die Proliferation von isoUGO-Zellen weitestgehend unabhängig vom H3.3-Mutationsstatus

Vorangegangene Studien deuten darauf hin, dass die fatale Prognose der DIPG einerseits durch den Mangel effektiver Therapieoptionen begründet ist. Andererseits spielt jedoch auch eine Resistenzentwicklung der Tumorzellen gegenüber der Standardtherapie – beispielsweise durch den Erwerb von Stammzellcharakteristika, die das Selbsterneuerungspotential der Zellen begünstigen – eine tragende Rolle (Haar et al 2012). Kurkumin inhibiert das Selbsterneuerungspotential verschiedener Tumorentitäten und reduziert deren Fähigkeit Sphären und Kolonien zu formieren, indem es selektiv die Tumorstammzellen moduliert – die differenzierteren gesunden Zellen jedoch nicht (Gupta et al 2013a). Diese durch Kurkumin reduzierten Eigenschaften korrelieren mit der Aggressivität und der Metastasierungstendenz von Tumoren.

In der vorliegenden Studie wurden Sphären- und Kolonieformationsversuche durchgeführt, um den Einfluss von Kurkumin auf das Selbsterneuerungspotential und die Proliferationskapazitäten in isoUGO-Zellen zu untersuchen (Abbildung 13). Hierzu wurden isoUGO-2- und isoUGO-1-Zelllinien mit 5 µM bzw. 10 µM Kurkumin behandelt und deren Fähigkeit Kolonien bzw. Sphären zu bilden analysiert. Für die Sphärenformationsanalyse wurden die gebildeten Tumorzellsphären gemäß ihrer Größe ausgezählt. Die Anzahl der Sphären gibt Informationen über das Selbsterneuerungspotential, die Größe der Sphären über die Proliferationskapazitäten der Zellen. Auch über die relative kolonialisierte Fläche können Aussagen über die Proliferationskapazität der Tumorzellen getroffen werden.

Durch Kurkuminbehandlung sank die Fähigkeit der isoUGO-Zellen Kolonien und Sphären zu bilden im Vergleich zur Kontrollkondition unabhängig vom H3.3-Mutationsstatus signifikant (Abbildung 13). Insbesondere reduzierte die Behandlung von isoUGO-H3WT-Zellen mit 5 μ M Kurkumin deren Fähigkeit zur Formation großer Sphären (Abbildung 13A). Es zeigte sich durch Kurkuminbehandlung mit 5 μ M in isoUGO-1-H3.3K27M-Zellen eine vierzigprozentige; in isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen eine neunundzwanzigprozentige Reduktion der kleinen Sphären, während es in isoUGO-H3WT-Zellen zu keiner Reduktion der kleinen Sphären kam. Bei Behandlung der isoUGO-Zellen mit 10 μ M Kurkumin zeigten sich keine H3.3K27M-mutationsabhängigen Unterschiede. Die Reduktion der Formation großer Sphären zeigte sich bereits bei Behandlung mit geringeren Kurkuminkonzentrationen sowohl in isoUGO-H3WT-als auch in isoUGO-H3.3K27M-Zellen, wobei vor allem in isoUGO-1-H3.3K27M-Zellen eine deutlich stärkere Reduktion der Anzahl großer Sphären erkennbar war. Insgesamt reagierten isoUGO-H3.3K27M-Zellen deutlich stärker mit einer signifikanten Reduktion der Sphärengröße und -anzahl auf geringere Kurkuminkonzentrationen von 5 μ M im Vergleich zu isoUGO-H3WT-Zellen (Abbildung 13A).

In der Kolonieformationsanalyse war der Effekt der Kurkuminbehandlung in allen Zellen unabhängig vom H3.3-Mutationsstatus weitestgehend gleich stark. IsoUGO-2-H3.3K27M-Zellen reagierten auf 5 µM Kurkuminbehandlung signifikant stärker als isoUGO-2-H3WT-Zellen. Bereits die Behandlung mit geringen Kurkuminkonzentrationen von 5 µM bewirkte eine signifikante Reduktion der Fähigkeit zur Koloniebildung von allen isoUGO-Zellen um etwa zwei Drittel im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 13B).

Abbildung 13 : Kurkumin vermindert das Selbsterneuerungspotential und die Proliferation von isoUGO-Zellen weitestgehend unabhängig vom H3.3-Mutationsstatus. (A) Sphärenformationsanalyse zur Bestimmung der Sphärengröße und -anzahl nach Behandlung von isoUGO-1- und isoUGO-2-H3WT- und -H3.3K27M-Zellen mit 5 μ M bzw. 10 μ M Kurkumin für sieben Tage. Standardabweichung *p \leq 0,05 für große, $\Delta p \leq$ 0,05 für kleine Sphären im Vergleich zur entsprechenden unbehandelten DMSO-Kontrolle. (B) Kolonieformationsanalyse zur Bestimmung der kolonisierten Fläche nach 96 h nach Behandlung von isoUGO-1- und isoUGO-2-Zellen mit 5 μ M bzw. 10 μ M Kurkumin. Gezeigt werden drei unabhängige biologische Replikate mit entsprechender Standardabweichung, *p \leq 0,05 im Vergleich zur entsprechenden UMSO-Kontrolle, $\circ p \leq$ 0,05 zum Vergleich von H3WT und H3.3K27M in isoUGO-1- und isoUGO-2-Zellen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass durch Kurkuminbehandlung die Fähigkeit von isoUGO, Kolonien und Sphären zu bilden weitestgehend unabhängig vom H3.3-Mutationsstatus signifikant reduziert wurde.

3.5 Kurkumin induziert Zellzyklusarrest und programmierte Zelltodmechanismen in isoUGO-Zellen

Der Antitumoreffekt von Kurkumin begründet sich unter anderem durch die Vermittlung von Zellzyklusarrest (Liu et al. 2007) und Zelltodmechanismen: Kurkumin gilt als Induktor von sowohl Apoptose (Park et al. 2013; Araveti und Srivastara 2019) als auch Autophagie (Gupta et al. 2013a; Shakeri et al. 2018).

3.5.1 Kurkumin induziert Apoptose und inhibiert die Zellzyklusprogression verstärkt in isoUGO-H3WT-Zellen

Dass Kurkumin Apoptose induziert, konnte in unterschiedlichen Studien in verschiedenen Tumorentitäten und auch von der AG Kramm (im Rahmen der Promotionsarbeit von Bente Pohlmeier, in Vorbereitung, mit freundlicher Genehmigung der Verfasserin) in DIPG-Zellen bereits nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Studie sollte nun der H3.3K27M-mutationsabhängige Effekt von Kurkumin auf Apoptose und den Zellzyklus mittels Propidiumiodid (PI)-Durchflusszytometrie untersucht werden. Außerdem wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Zur Detektion von Apoptose wurde hier *Cleaved*-Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) als Markerprotein verwendet, welches im Zuge der Apoptose aus der proteolytischen Spaltung des DNA-Reparaturenzyms PARP entsteht.

Kurkumin induzierte in allen isogenen UGO-Zelllinien Apoptose – die *Cleaved*-PARP-Level wurden durch Kurkuminbehandlung signifikant erhöht (Abbildung 14). In isoUGO-H3WT-Zellen konnte ein wenngleich nicht signifikanter, aber dennoch stärkerer Effekt von Kurkumin auf die Aktivierung von Apoptose gezeigt werden als in isoUGO-H3.3K27M-Zellen (Abbildung 14). In isoUGO-2-Zellen waren die *Cleaved*-PARP-Level vor und nach Kurkuminbehandlung wesentlich höher als in isoUGO-1-Zellen (Abbildung 14).

Abbildung 14: Kurkumin induziert Apoptose – verstärkt in isoUGO-H3WT-Zellen. (A) Western-Blot-Analyse zur Bestimmung und (B) Densitometrie-Analyse zur Quantifizierung der Expression von *Cleaved* PARP zur Analyse der Apoptoseinduktion in isoUGO-1- und isoUGO-2-H3WT- und -H3.3K27M-Zellen nach Behandlung mit 5 μ M Kurkumin für 72 h. ß-Aktin diente jeweils als Ladekontrolle und zur Normalisierung. Gezeigt werden je zwei unabhängige biologische Replikate (bestehend aus je zwei Klonen der isogenen Zelllinien) mit entsprechender Standardabweichung, *p \leq 0,05 im Vergleich zur entsprechenden unbehandelten DMSO-Kontrolle.

Auch PI-FACS-Analysen bestätigten, dass durch Kurkuminbehandlung in isoUGO-Zellen Apoptose induziert wurde. In allen isogenen isoUGO-Zelllinien war nach Kurkuminbehandlung der "Apoptose-*Peak*" in der subG1-Phase zu erkennen (Abbildung 15B). Die durch Kurkumin induzierte Erhöhung des Anteils von isoUGO-Zellen in der subG1-Phase war im Vergleich zur unbehandelten DMSO-Kontrolle in allen Zelllinien signifikant (Abbildung 15A).

Die G2- und M-Phase wurden jeweils als subG1-Phase des Zellzyklus zusammengefasst. In isoUGO-2-Zellen wurde durch Kurkuminbehandlung der Anteil der H3WT-Zellen in der subG1-Phase signifikant stärker erhöht als in H3.3K27M-Zellen. In isoUGO-1-Zellen war keine H3.3K27M-mutationsabhängige Verringerung der Zellen in der subG1-Phase durch Kurkumin zu beobachten (Abbildung 15).

Auch kam es – außer in isoUGO-1-H3WT-Zellen (hier war der Effekt nicht signifikant, aber dennoch sichtbar) – durch Kurkuminbehandlung zu einem signifikant verringerten Anteil an Zellen in der G1-Phase (Abbildung 15).

Kurkumin reduzierte den Anteil an isoUGO-Zellen in der S-Phase sowohl in isoUGO-2- als auch in isoUGO-1-Zellen signifikant stärker in H3WT- als in H3.3K27M-mutierten Zellen (Abbildung 15). In isoUGO-1-H3WT- und -H3.3K27M-Zellen bewirkte Kurkumin eine signifikante Verringerung der Zellanzahl in der S-Phase. Dies konnte in isoUGO-2-Zellen nicht gezeigt werden (Abbildung 15).

Abbildung 15 : Kurkumin induziert Apoptose in isoUGO-Zellen in Abhängigkeit vom H3.3-Mutationsstatus unterschiedlich stark. (A) Quantifizierung und (B) repräsentative Bilder der PI-Durchflusszytometrie zur Zellzyklusanalyse nach Behandlung von isoUGO-1- und isoUGO-2-H3WT- und -H3.3K27M-Zellen mit 10 μ M Kurkumin für 48 h. Gezeigt werden drei unabhängige biologische Replikate mit entsprechender Standardabweichung, *p≤ 0,05 für subG1-, $\Diamond p \le 0,05$ für G1-, $\Delta p \le 0,05$ für S-Phase jeweils zum Vergleich der Kurkuminbehandlung zur entsprechenden unbehandelten DMSO-Kontrolle, **p≤ 0,05 für subG1-, $\circ p \le 0,05$ für S-Phase zum Vergleich von H3WT und H3.3K27M in isoUGO-1- und isoUGO-2-Zellen.

Der starke inhibierende Effekt von Kurkumin auf die Zelltodregulation konnte durch die Ergebnisse der mRNA-Sequenzierung bestätigt werden. Zusätzlich zeigte sich, dass Kurkuminbehandlung vor allem in isoUGO-H3WT-Zellen Einfluss auf die Zellzyklusregulation hatte. In isoUGO-2-H3WT-Zellen konnte eine starke Induktion von Zelltodmechanismen sowie Zellzyklusarrest durch Kurkumin nachgewiesen werden. Verschiedene apoptoseinduzierende Gene wurden durch Kurkuminbehandlung verstärkt exprimiert, während apoptoseinhibierende Gene in ihrer Expression herunterreguliert wurden (Abbildung 16). Gene, die zu Zellzyklusprogression führen, wurden durch Kurkumin in isoUGO-2-H3WT-Zellen herunterreguliert – hierbei zeigte sich kein spezifischer Effekt auf eine bestimmte Zellzyklusphase

(Abbildung 16).

Abbildung 16 : Kurkumin reguliert Zellzyklus- und Apoptose-assoziierte Gene in isoUGO-2-H3WT-Zellen herunter. Darstellung der durch Kurkumin hoch- (grün) und herunter- (rot) regulierten zellzyklus- und apoptoseassoziierten Gene in isoUGO-2-H3WT-Zellen – adaptiert von KEGG (Kanehisa und Goto 2000). Angewendete Grenzwerte: $log2FC \le 0.75$ und ≥ 1.5 , angepasster p-Wert ≤ 0.05 .

In isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen wurden mit Zelltodmechanismen assoziierte Gene durch Kurkumin weniger stark reguliert. Jedoch zeigt Abbildung 17, dass durch Kurkuminbehandlung sowohl in isoUGO-2-H3WT- als auch in isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen die Expression des antiapoptotischen Gens *BCL2* signifikant herunter- und die Expression der proapoptotischen Gene *MDM2* und *BAX* signifikant hochreguliert wurde. Die Expression von *BCL2* und *BAX* wurde jeweils in isoUGO-H3WT-Zellen im Vergleich zu isoUGO-H3.3K27M-Zellen signifikant stärker durch Kurkumin reguliert (Abbildung 17).

Abbildung 17 : Kurkumin inhibiert die Expression antiapoptotischer und verstärkt die Expression proapoptotischer Gene in isoUGO-2-Zellen. Vergleich des Effekts von Kurkuminbehandlung auf die Expression verschiedener mit Apoptose assoziierter Gene (*BCL2* als antiapoptotisches; *MDM2* und *BAX* als proapoptotische Gene) in 48 h mit 10 μ M Kurkumin behandelten isoUGO-2-H3WT- und -H3.3K27M-Zellen. Gezeigt werden je drei unabhängige technische Replikate (Klone der isogenen Zelllinien) mit entsprechend angepasster Standardabweichung, *p≤ 0,05 im Vergleich der Kurkuminbehandlung zur unbehandelten DMSO-Kontrolle; \circ p≤ 0,05 zum Vergleich von H3WT und H3.3K27M in isoUGO-2-Zellen.

Zusammenfassend verursachte Kurkuminbehandlung Zellzyklusarrest und induzierte Apoptose verstärkt, aber nicht aussschließlich in H3WT-tragenden isoUGO-Zellen.

3.5.2 Kurkumin induziert Autophagie in isoUGO-Zellen

Autophagie ist ein lysosomaler Degradationsprozess, der eine Art des programmierten Zelltods darstellt, häufig jedoch auch als Schutzmechanismus der Zellen verstanden wird. Da Kurkumin als Autophagieinduktor gilt (Gupta et al. 2013a; Shakeri et al. 2018), sollte in der vorliegenden Studie durch den Nachweis von LC3B, einem Leichtkettenprotein, das im Zuge der Autophagie akkumuliert, mittels Western-Blot-Analysen der Effekt von Kurkumin auf isoUGO-Zellen untersucht werden.

Kurkuminbehandlung induzierte Autophagie besonders stark in isoUGO-H3.3K27M-Zellen – in beiden isoUGO-Zelllinien bewirkte Kurkumin einen signifikanten Anstieg der LC3B-Expression. Aber auch in isoUGO-H3WT-Zellen war eine kurkuminabängige Induktion der Autophagie erkennbar (Abbildung 18). In isoUGO-2-Zellen zeigte sich ein deutlicher H3.3K27M-mutationsabhängiger Unterschied in der Kurkuminwirkung: In H3.3K27Mmutierten isoUGO-2-Zellen induzierte Kurkumin Autophagie stärker als in H3WT-tragenden Zellen (Abbildung 18).

Abbildung 18 : Kurkumin induziert Autophagie in isoUGO-Zellen. (A) Western-Blot-Analyse zur Bestimmung und (B) Densitometrie-Analyse zur Quantifizierung der Expression von LC3B zur Analyse der Autophagieinduktion nach Behandlung von isoUGO-1- und isoUGO-2-H3WT- und -H3.3K27M-Zellen mit 5 μ M Kurkumin für 72 h. ß-Aktin diente jeweils als Ladekontrolle und zur Normalisierung. Gezeigt werden je zwei unabhängige biologische Replikate (je bestehend aus zwei technischen Replikaten: Klonen der isogenen Zelllinien) mit entsprechender Standardabweichung, *p \leq 0,05 im Vergleich zur entsprechenden unbehandelten DMSO-Kontrolle.

Da Autophagie auch als Schutzmechanismus von Zellen verstanden wird, wurden in der vorliegenden Studie isoUGO-2-Zellen mit einer Kombination aus Kurkumin und dem Autophagieinhibitor Chloroquin (CQ) behandelt.

Nach Behandlung der isoUGO-2-Zellen mit 5 µM Kurkumin, 10 µM Chloroquin und einer Kombinationstherapie aus den Wirkstoffen wurden MTT-Zellviabilitätsversuche durchgeführt, um den zytotoxischen Effekt einer Einzelbehandlung im Vergleich zu einer Kombination beider Substanzen auf isoUGO-Zellen zu untersuchen (Abbildung 19).

Sowohl Einzelbehandlung mit Kurkumin und Chloroquin als auch eine Kombination beider Substanzen induzierten in isoUGO-2-Zellen eine signifikante Reduktion der Zellviabilität (Abbildung 19).

Allerdings führte die Kombination von Kurkumin und Chloroquin lediglich zu additiven Effekten im Vergleich zur Einzelbehandlung.

Abbildung 19 : Kombinationsbehandlung aus Kurkumin und dem Autophagieinhibitor Chloroquin verstärkt die Zytotoxizität in isoUGO-2-Zellen. MTT-Analyse zur Bestimmung der Zytotoxizität nach Behandlung von isoUGO-2-H3WT- und -H3.3K27M-Zellen mit 10 μ M Chloroquin, 5 μ M Kurkumin bzw. einer Kombination aus beiden Wirkstoffen für 72 h. Gezeigt werden vier unabhängige biologische Replikate mit entsprechender Standardabweichung, *p \leq 0,05 im Vergleich der Kurkumin- bzw. Chloroquinbehandlung zur entsprechenden unbehandelten DMSO-Kontrolle.

Kurkumin induzierte zusammenfassend Autophagie verstärkt in H3.3K27M-mutierten isoUGO-Zellen.

3.6 Kurkumin reguliert die Expression Wnt-Signalweg-assoziierter Gene in isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen

Der Wnt-Signalweg ist unter anderem mit einer verstärkten Proliferation von Zellen, der Ausprägung von Stammzellcharakteristika und mit der Onkogenese verschiedener Tumorentitäten assoziiert (Ryu et al. 2008). Die inhibierende Wirkung Kurkumins auf die Wnt/ß-Catenin-

Signalkaskade wurde beispielsweise für Kolonkarzinomzellen bereits beschrieben (Ryu et al. 2008) und sollte in der vorliegenden Studie in isoUGO-Zellen ebenfalls untersucht werden.

Durch Kurkuminbehandlung wurden vor allem in den kanonischen Wnt-Signalweg involvierte Gene in isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen herunterreguliert (Abbildung 20 und Abbildung 21).

Abbildung 20 : Kurkumin inhibiert mit dem Wnt-Signalweg assoziierte Gene in isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen. Darstellung der durch Kurkumin hoch- (grün) und herunter- (rot) regulierten Wnt-Signalweg-assoziierten Gene in isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen – adaptiert von KEGG (Kanehisa und Goto 2000). Angewendete Grenzwerte: $log2FC \le 0.75$ und ≥ 1.5 , angepasster p-Wert ≤ 0.05 .

Abbildung 21 zeigt, dass auch in isoUGO-2-H3WT-Zellen mit der Wnt-Signalkaskade assoziierte Gene exprimiert wurden – deren Expression wurde jedoch durch Kurkuminbehandlung kaum beeinflusst. Lediglich *WISP1* wurde durch Kurkumin in isoUGO-2-H3WT-Zellen signifikant vermindert exprimiert. Im Vergleich dazu bewirkte Kurkumin in isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen eine signifikant verminderte Expression der ausgewählten, vornehmlich den kanonischen Wnt-Signalweg aktivierenden Gene – mit Ausnahme der Expression von *WNT10*, das durch Kurkuminbehandlung wenngleich nicht signifikant, so doch auch stark inhibiert wurde (Abbildung 21).

Außerdem bewirkte Kurkuminbehandlung eine signifikant verstärkte Expression von *DKK1* (Abbildung 21) sowohl in isoUGO-2-H3WT- als auch isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen – ein Gen, das als einer der stärksten Inhibitoren des Wnt-Signalweges gilt (Wang et al. 2013).

 \mathbf{s}

Abbildung 21 : Kurkumin reguliert die Expression von mit dem kanonischen Wnt-Signalweg assoziierten Gene vornehmlich in isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen. Darstellung der absoluten Expression ausgewählter Gene des kanonischen Wnt-Signalweges in isoUGO-2-H3WT- und -H3.3K27M-Zellen nach 10 μ M Kurkuminbehandlung für 48 h. Gezeigt werden drei unabhängige technische Replikate (Klone der isogenen Zelllinien) mit entsprechend angepasster Standardabweichung, *p \leq 0,05 im Vergleich zur unbehandelten DMSO-Kontrolle. Angewendete Grenzwerte: log2FC \leq 0,75 und \geq 1,5.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Kurkumin vornehmlich in H3.3K27M-mutierten isoUGO-Zellen den kanonischen Wnt-Signalweg zu inhibieren scheint.

3.7 Kurkumin reduziert die *MYC*-Expression in isoUGO-2-Zellen

Wie bereits für Gliom- (Aoki et al. 2007) und Medulloblastomzellen (Lee et al. 2011) beschrieben wurde, reduziert Kurkumin die Expression des Protoonkogens *MYC*.

Auch in isoUGO-2-Zellen scheint die durch Kurkuminbehandlung reduzierte Expression von *MYC* ein anderer Aspekt des Antitumoreffektes des Phytotherapeutikums zu sein: Die *MYC*-Expression war sowohl in isoUGO-2-H3WT- als auch in isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen nach Kurkuminbehandlung im Vergleich zur Kontrollreferenz (DMSO) signifikant erniedrigt (Abbildung 22A). Somit gehört *MYC* zu den wenigen Genen, die H3.3K27M-mutationsunabhängig durch Kurkuminbehandlung in isoUGO-2-Zellen reduziert exprimiert wurden. Die weitere Analyse dieser sich durch Kurkuminbehandlung in isoUGO-H3.3K27M-Zellen überlappenden reduziert exprimierten Gene ergab keinen Anhalt für die Regulation spezifischer biologischer Funktionen oder Signalwege (Daten daher nicht gezeigt).

Der Transkriptionsfaktor c-myc, für den *MYC* kodiert, ist mit Zellproliferation in verschiedenen Tumorentitäten assoziiert. Auch in den in Abbildung 22B dargestellten pädiatrischen ZNS-Tumorentitäten ist *MYC* im Vergleich zu gesundem Kortexgewebe stark überexprimiert.

Abbildung 22 : Kurkumin reduziert signifikant die Expression von *MYC* in isoUGO-2-Zellen unabhängig vom H3.3-Mutationsstatus. (A) Vergleich der Expression von *MYC* in isoUGO-2-H3WT- und -H3.3K27M-Zellen nach Behandlung mit 10 μ M Kurkumin für 48 h. Gezeigt werden drei unabhängige technische Replikate (Klone der isogenen Zelllinien) mit entsprechend angepasster Standardabweichung, *p \leq 0,05 im Vergleich der Kurkuminbehandlung zur unbehandelten DMSO-Kontrolle. Angewendete Grenzwerte: log2FC \leq 0,75 und \geq 1,5. (B) Darstellung der im Vergleich zur Kontrolle (gesundes Gehirn (Harris et al. 2009)) stark erhöhten *MYC*-Expression in pädiatrischen Hirntumorproben (pädHGG (Paugh et al. 2010) und DIPG (Paugh et al. 2011)) – adaptiert nach R2 (r2.amc.nl).

Die verminderte Expression von MYC scheint sowohl in H3WT- als auch in H3.3K27Mmutierten isoUGO-Zellen zum Antitumoreffekt von Kurkumin beizutragen.

3.8 Kurkumin induziert die Expression antiinflammatorischer und reduziert die Expression proinflammatorischer Gene verstärkt in isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen

Da die antiinflammatorischen Eigenschaften Kurkumins bereits beschrieben wurden (Schwarz et al. 2020), sollte dieser Effekt in der vorliegenden Studie auch in isoUGO-2-Zellen untersucht werden.

Aus den Ergebnissen der mRNA-Sequenzierung ging hervor, dass Kurkumin in isoUGO-2-Zellen immunmodulatorisch zu wirken schien, indem antiinflammatorische Gene durch Kurkuminbehandlung verstärkt und proinflammatorische Gene vermindert exprimiert wurden 23). In isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen wurde die Expression der (Abbildung proinflammatorischen Interleukine (IL) IL-18 und IL-21 durch Kurkuminbehandlung signifikant reduziert, während die Expression des antiinflammatorisch wirkenden Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors y (PPAR-y) und des antiinflammatorisch wirkenden IL-15 nach Kurkuminbehandlung signifikant verstärkt wurde (Abbildung 23). In isoUGO-2-H3WT-Zellen wurde ebenfalls die IL-21-Expression durch Kurkuminbehandlung signifikant herunterreguliert - die Expression von IL-18 hingegen signifikant verstärkt. Die Expression von PPAR-y wurde durch Kurkumin – wenngleich nicht signifikant – herunterreguliert, und IL-15 blieb in isoUGO-2-H3WT-Zellen durch Kurkumin weitestgehend unbeeinflusst (Abbildung 23).

Abbildung 23 : Kurkumin induziert die Expression antiinflammatorischer Gene und reduziert die Expression proinflammatorischer Gene verstärkt in isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen. Vergleich des Effekts von Kurkumin auf die Expression verschiedener Interleukine (*IL*) in isoUGO-2-H3WT- und -H3.3K27M-Zellen nach 10 μ M Kurkuminbehandlung für 48 h. Gezeigt werden je drei unabhängige technische Replikate (Klone der isogenen Zelllinien) mit entsprechend angepasster Standardabweichung, *p \leq 0,05 im Vergleich zur unbehandelten DMSO-Kontrolle. Angewendete Grenzwerte: log2FC \leq 0,75 und \geq 1,5.

Zusammenfassend schien Kurkumin sowohl in H3WT- als auch in H3.3K27M-mutierten isoUGO-Zellen immunmodulatorisch zu wirken und überwiegend antiinflammatorische Effekte zu vermitteln. Die Regulation der Expression pro- und antiinflammatorischer Gene durch Kurkumin war jedoch in H3.3K27M-mutierten isoUGOZellen stärker ausgeprägt als in isoUGO-H3WT-Zellen.

4 Diskussion

DIPG sind im Pons des Hirnstamms lokalisierte pädHGG, die durch eine fatale Prognose und eine spezifische Histonmutation charakterisiert sind. Aufgrund mangelnder effektiver konventioneller Therapieoptionen greifen Betroffene oft zusätzlich auf Phytotherapeutika wie Kurkumin zurück.

Um das Potential von Kurkumin als Therapieadjuvans in DIPG zu prüfen, sollten in der vorliegenden Studie die H3.3K27M-abhängigen und -unabhängigen Effekte von Kurkumin in isoUGO-Zellen untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Studie bestätigen, was für viele andere Tumorentitäten bereits bekannt ist: Der Antitumoreffekt Kurkumins begründet sich in der Interaktion mit unterschiedlichen Signalwegen. Dies konnte auch in isoUGO-Zellen nachgewiesen und einzelne Effekte in Abhängigkeit vom H3.3-Mutationsstatus gezeigt werden.

Die in der vorliegenden Studie verwendeten isogenen UGO-Zelllinien wurden ursprünglich von primären pädiatrischen DIPG-Zellen abgeleitet – retrospektiv kann ihr Ursprung jedoch nicht mehr zweifelsfrei nachvollzogen werden. Auch ob und wie eine mögliche Verwechslung mit anderen Zelllinien stattfand, die in dem Labor, in welchem die vorliegende Promotionsarbeit durchgeführt wurde, ausschließlich Zelllinien hochgradiger Gliome darstellen würden, konnte nicht rekonstruiert werden.

Die H3.3K27M-Mutation konnte per Sequenzierung in den als H3K27M-mutierten isogenen Zelllinien nachgewiesen werden (unveröffentlichte Daten freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Klaudia Kubiak im Rahmen ihrer eigenen Promotionsarbeit, Abbildung 5) und tritt nach heutigem Wissensstand natürlicherweise nur in glialen Tumoren der Mittellinie, bevorzugt bei Kindern und speziell auch in DIPG auf (Bechet et al. 2014). Dies ist sicherlich ein deutlicher Hinweis dafür, dass zumindest die H3.3K27M-tragende Ausgangszelllinie UGO einem pädiatrischen HGG und speziell einem DIPG und/oder Diffusem Mittelliniengliom entsprechen muss. Auch zeigten die isogenen UGO-Zelllinien generell eine für DIPG typische aggressive Tumorbiologie und entsprechende epigenetische Veränderungen, die bei einer H3K27M-Mutation zu erwarten sind – insbesondere die typischen Veränderungen bezüglich der H3K27-Acetylierung und -Trimethylierung.

Somit können die für isoUGO-Zellen vorliegenden Ergebnisse sehr wahrscheinlich auf DIPG angewendet werden, auch wenn eine Reevaluierung der gefundenen Ergebnisse in zweifelsfrei von DIPG- und pädiatrischen Glioblastom-Zellen abgeleiteten isogenen Modellen unabdingbar bleibt. Kurkumin bewirkte in isoUGO-Zellen Veränderungen auf epigenetischer Ebene und führte zu einer Verminderung von Zellviabilität, Proliferation und dem Selbsterneuerungspotenzial sowie zur Induktion von Apoptose und Autophagie *in vitro*. Eine Übersicht über die teilweise H3.3K27M-mutationsabhängig unterschiedlich stark ausgeprägten Effekte von Kurkumin in isoUGO-Zellen, auf die nachfolgend genauer eingegangen werden soll, gibt Tabelle 16.

Effekt von Kurkumin	H3WT	H3.3K27M
Zellviabilität	\downarrow	\downarrow
Proliferation	\downarrow	\downarrow
Selbsterneuerungspotential / Stammzellcharakteristika	\downarrow	\downarrow
Differenzierung	\uparrow	$\uparrow \uparrow$
H3K27me3	-	\uparrow
H3K27ac	\downarrow	\downarrow
Zellzyklusarrest	$\uparrow \uparrow$	\uparrow
Apoptose	$\uparrow \uparrow$	\uparrow
Autophagie	↑	$\uparrow \uparrow$
Antiinflammatorischer Effekt	\uparrow	$\uparrow \uparrow$
Wnt-Signalweg-Inhibition	-	1

Tabelle 16 : Übersicht über die Wirkmechanismen von Kurkumin in Abhängigkeit vom H3.3-Mutationsstatus in isoUGO-Zellen.

4.1 Kurkumin stellt die verminderten H3K27me3-Level in isoUGO-H3.3K27M-Zellen wieder her und reduziert die H3K27ac-Level in isoUGO-Zellen unabhängig vom H3.3-Mutationsstatus

Die in DIPG häufig auftretende H3.3K27M-Mutation resultiert in einer epigenetischen Dysbalance, die eine Hypotrimethylierung und Hyperacetylierung an H3K27 umfasst (Piunti et al. 2018) und gilt als ein Schlüsselmoment der Onkogenese (Lewis et al. 2013).

Kurkumin stellte in H3.3K27M-mutierten isoUGO-Zellen die H3K27me3-Level, die denen des Ausgangsniveaus in isoUGO-H3WT-Zellen entsprechen, wieder her: Die H3K27me3-Level wurden in beiden H3.3K27M-mutierten isoUGO-Zelllinien durch Kurkuminbehandlung signifikant erhöht, während die H3K27me3-Level in isoUGO-H3WT-Zellen durch Kurkuminbehandlung kaum beeinflusst wurden. Somit konnte bestätigt werden, dass epigenetische Modifikationen stets reversibel sind und Kurkumin das durch die H3.3K27M-Mutation veränderte epigenetische Gleichgewicht in DIPG wiederherzustellen vermag.

Der Ansatz, die mutationsbedingt reduzierte Trimethylierung zu erhöhen und gleichzeitig die Hyperacetylierung zu vermindern, um somit den tumortreibenden Effekt der assoziierten Genregulationsvorgänge zu reduzieren, scheint erfolgsversprechend zu sein. Beispielsweise konnten Hashizume et al. (2014) die Antitumorwirkung eines solchen Mechanismus durch Behandlung mit dem Demethylaseinhibitor GSKJ4 *in vitro* und *in vivo* in H3K27M-mutierten pädiatrischen Hirnstammgliomen nachweisen.

Vergleicht man die Gene, deren Expression durch Kurkuminbehandlung sowohl in isoUGO-2-H3WT- als auch in isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen vermindert wurde, so wurden diese zu etwa 70% auch durch CBP-HAT-Inhibitor-Behandlung (A485) reguliert. Schlussfolgernd könnte die Funktion von Kurkumin auf epigenetischer Ebene über die Inhibition der intrinsischen HAT-Aktivität von CBP/p300 vermittelt werden. Diese Ergebnisse legen die bereits beschriebene Wirkung Kurkumins als CBP/p300-Inhibitor sehr nahe (Balasubramanyam et al. 2004; Chen et al. 2007; Lee et al. 2011).

Diese Hypothese korreliert sehr gut mit den signifikant verringerten H3K27ac-Leveln in mit Kurkumin behandelten isoUGO-1- und isoUGO-2-Zellen in den vorliegenden Western-Blot-Analysen. Dass die durch Kurkuminbehandlung reduzierte H3K27-Acetylierung sowohl in H3WT- als auch in H3.3K27M-mutierten isoUGO-Zellen beobachtet werden konnte, deutet darauf hin, dass die Inhibition der CBP/p300-HAT-Aktivität durch Kurkumin unabhängig vom H3.3-Mutationsstatus zu sein scheint. Auch die Ergebnisse der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten RNA-Sequenzierung unterstützen diese Annahme.

Um aber den Zusammenhang zwischen den Zielgenen von Kurkumin und CBP zu validieren, sollten in Weiterführung der hier vorgelegten Arbeit noch Chromatin-Immunopräzipitations-DNA-Sequenzierungsversuche (ChIP-Seq) durchgeführt werden.

Eine Dysfunktion von HAT ist oftmals mit der Manifestation unterschiedlichster Erkrankungen assoziiert. Kang et al. (2006) beschrieben bereits, dass Kurkumin eine Hypoacetylierung an H3 durch die Inhibierung von HAT in Glioblastomzellen induzieren kann. Die Inhibierung der HAT-Aktivität geht auch mit einer Redifferenzierung der Zellen, Apoptoseinduktion und Zellzyklusarrest einher (Kang et al. 2006). Auf diese Effekte Kurkumins, die auch in der vorliegenden Studie für isoUGO-Zellen gezeigt werden konnten, soll im Verlauf näher eingegangen werden.

Zhang et al. (2015) beschrieben in DIPG das Phänomen des Histon-*Crosstalks*: So geht der Verlust von H3K27me3 mit einer Erhöhung von H3K27ac einher, da es durch die H3.3K27Mmutationsbedingte Hypotrimethylierung zu einem Ungleichgewicht der Funktionen der Acetylierung vermittelnden HAT und der trimethylierenden HMT kommt (Piunti et al. 2018). Somit könnte womöglich die Hochregulierung von H3K27me3 durch Kurkumin auch kompensatorisch in Folge der Reduktion der H3K27ac erfolgen.

Die beschriebenen, durch die H3.3K27M-Mutation verursachten epigenetischen Veränderungen tragen zu einem aggressiveren Wachstum von H3.3K27M-mutierten im Vergleich zu H3WT-DIPG-Zellen *in vitro* bei (Wiese et al. 2020), scheinen jedoch nicht das alleinige Schlüsselmoment in der Tumorentstehung von DIPG zu sein. Da H3WT-DIPG durch eine ähnlich fatale Prognose gekennzeichnet sind, wird klar, dass wahrscheinlich auch noch andere Mechanismen in der Onkogenese eine Rolle spielen müssen.

Die deutlichen Unterschiede in der Gensignatur zwischen isoUGO-2-H3WT- und isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen ohne Kurkuminbehandlung implizieren, dass in isoUGO-Zellen in Abhängigkeit vom H3.3K27M-Mutationsstatus verschiedene Mechanismen der Tumorgenese eine Rolle spielen und somit auch Kurkumin H3.3K27M-mutationsabhängig über unterschiedliche Mechanismen wirken könnte.

Aus dem Effekt von Kurkumin auf epigenetischer Ebene resultieren vermutlich die unterschiedlichen Effekte dieses Phytotherapeutikums auf funktionelle Charakteristika der untersuchten isoUGO-Zellen, auf die nachfolgend näher eingegangen werden soll.

4.2 Kurkumin reduziert das Selbsterneuerungs- und Proliferationspotential von isoUGO-Zellen unabhängig vom H3.3-Mutationsstatus

Kurkumin inhibiert das Selbsterneuerungs- und Proliferationspotential von verschiedenen Tumorentitäten, darunter auch Glioblastomen (Lim et al. 2011), indem die Fähigkeit der Tumorzellen Sphären und Kolonien zu formieren reduziert wird (Gupta et al 2013a).

Die MTT-Zellviabilitätsversuche zeigten, dass durch Kurkuminbehandlung in beiden isogenen UGO-Zelllinien die Proliferation weitestgehend unabhängig vom H3.3-Mutationsstatus konzentrationsabhängig reduziert wurde. Es zeigten sich weder in isoUGO-1- noch in isoUGO-2-Zellen starke H3.3K27M-mutationsabhängige Unterschiede in der zytotoxischen Wirkung Kurkumins. Dies deutet darauf hin, dass der Gesamteffekt von Kurkumin auf die Viabilität der isoUGO-Zellen unabhängig vom H3.3-Mutationsstatus gleich stark zu sein scheint.

Dieses Ergebnis wurde durch die Sphären- und Kolonieformationsanalysen teilweise bestätigt: Keine signifikanten Unterschiede zwischen der Sphären- bzw. Koloniebildung von H3WT- und H3.3K27M-mutierten isoUGO-Zellen konnten nach Behandlung mit höheren Dosen Kurkumin detektiert werden.

Die Ergebnisse der Kolonieformationsanalyse lassen auf das Proliferationspotential der Zellen schließen. Der Effekt der Kurkuminbehandlung war in H3WT- und H3.3K27M-mutierten isoUGO-Zellen weitestgehend gleich stark. Jedoch reagierten bei geringeren Kurkuminkonzentrationen (5 µM) isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen signifikant stärker als isoUGO-2-H3WT-Zellen. In isoUGO-1-Zellen war dieser Effekt weniger stark ausgeprägt, aber dennoch sichtbar.

Auch die Sphärenformationsanalysen lassen über die Größe der Tumorzellsphären Rückschlüsse auf die Proliferationskapazitäten der Zellen zu. H3.3K27M-mutierte isoUGO-Zellen reagierten hier ebenfalls bei geringeren Kurkuminkonzentrationen (5 μ M) mit einer stärkeren Reduktion der Anzahl der großen Sphären als isoUGO-H3WT-Zellen. Somit zeigen die Ergebnisse der Sphären- und Kolonieformationsanalyse übereinstimmend, dass Kurkumin in geringeren Konzentrationen bereits einen stärkeren Effekt auf das Proliferationspotential von H3.3K27M-mutierten isoUGO-Zellen zu haben scheint.

Die Auswertung der mRNA-Sequenzierungsdaten zeigte, dass Gene des kanonischen Wnt-Signalweges sowohl in H3WT- als auch in H3.3K27M-mutierten isoUGO-Zellen exprimiert wurden. Vor allem in isoUGO-H3.3K27M-Zellen wurde durch Kurkuminbehandlung die Expression dieser Gene signifikant reduziert. Der Wnt-Signalweg ist unter anderem mit einer verstärkten Zellproliferation und der Ausbildung von Stammzellcharakteristika sowie der Onkogenese vieler verschiedener Tumoren - auch mit der Entstehung von adulten Glioblastomen (Wang et al. 2013) - assoziiert. Die Inhibition der kanonischen Wnt-Signalkaskade könnte daher besonders in H3.3K27M-mutierten isoUGO-Zellen zu einer reduzierten Proliferation geführt haben. Jedoch verstärkte Kurkumin sowohl in isoUGO-2-H3WT- als auch in isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen die Expression von DKK1, einem spezifischen Antagonisten der Wnt/ß-Catenin-Signalkaskade, Die signifikant. Wiederherstellung der Funktion von DKK1 geht mit einer verminderten Proliferation und Invasion von Gliomzellen einher (Wang et al. 2013) – es ist zu vermuten, dass dies auch in DIPG der Fall ist. Dieser Aspekt könnte eine Erklärung dafür sein, warum der Effekt von Kurkumin auf die Proliferation von isoUGO-Zellen in Kolonieund Sphärenformationsanalysen weitestgehend unabhängig vom H3.3-Mutationsstatus war. Dass sich Behandlung mit niedrigeren Kurkuminkonzentrationen ein durch stärkerer proliferationshemmender Effekt in H3.3K27M-mutierten isoUGO-Zellen zeigte, mag dadurch zu begründen sein, dass diese in vitro durch ein schnelleres und stärkeres Wachstum gekennzeichnet sind (Masterarbeit Kubiak 2019; Wiese et al. 2020) und somit vermutlich anfälliger auf die Inhibition des Wnt-Signalweges durch Kurkumin reagieren könnten.

Auch die genontologische Analyse zeigte, dass sowohl in isoUGO-2-H3WT- als auch in isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen die Regulation der Zellproliferation einer der am stärksten durch Kurkumin regulierten Vorgänge war, in H3.3K27M-mutierten isoUGO-Zellen die Regulation der mit Zellproliferation assoziierten Gene durch Kurkuminbehandlung jedoch im Vergleich zu isoUGO-H3WT-Zellen eine stärkere Rolle zu spielen schien.

Aus den MTT-Zellviabilitätsversuchen war dieser H3.3K27M-mutationsabhängige Effekt von Kurkumin auf die Zellproliferation jedoch, wie beschrieben, nicht ersichtlich. Dies mag damit zusammenhängen, dass die Zellen für die Kolonieformationsanalysen 96 h und für die Sphärenformationsanalysen 168 h (sieben Tage) inkubiert wurden, für die MTT-Zellviabilitätsversuche jedoch nur 72 h. Diese womöglich nur durch die längere Inkubationszeit sichtbaren Effekte könnten darauf zurückzuführen sein, dass es erst nach einer ausreichend langen Behandlungszeit zu durch Kurkumin induzierten Sekundäreffekten kommt. Womöglich bewirkt Kurkumin über die Veränderungen auf epigenetischer Ebene sekundär die Inhibierung des Wnt-Signalweges – CBP und p300, deren HAT-Aktivität durch Kurkuminbehandlung in isoUGO-Zellen inhibiert werden konnte, sind auch wichtige Transkriptionsfaktoren des Wnt-Signalweges (Ryu et al. 2008) – und dadurch reduzierte Proliferationskapazitäten in isoUGO-

Zellen. Eventuell wäre somit durch längere Inkubationszeit der Zellen mit Kurkumin ein möglicher H3.3K27M-mutationsabhängiger Effekt auf die Zellproliferation deutlicher erkennbar. Dafür sollten die Versuche mit jeweils längeren Inkubationszeiten wiederholt werden. Außerdem könnten Bromdesoxyuridin-Versuche (BrdU) durchgeführt werden, um den Effekt von Kurkumin auf die Proliferation der isoUGO-Zellen zu validieren.

Bei den Sphärenformationsanalysen lässt die Anzahl der Tumorzellsphären Rückschlüsse auf die Klonogenität und das Selbsterneuerungspotential der Zellen zu. Es war ersichtlich, dass die Anzahl der Sphären durch Kurkuminbehandlung sowohl in H3WT- als auch in H3.3K27Mmutierten isoUGO-Zellen bereits nach der Behandlung mit geringeren Konzentrationen Kurkumin (5 µM) signifikant reduziert wurde. Dieser Effekt zeigte sich – wenngleich nicht signifikant – stärker in isoUGO-H3.3K27M- als in isoUGO-H3WT-Zellen. Dies deutet darauf hin, dass das Selbsterneuerungspotential in H3.3K27M-mutierten isoUGO-Zellen durch Kurkuminbehandlung stärker verändert sein könnte. H3.3K27M-mutierte DIPG-Zellen sind durch ein stärkeres Stammzellpotential als H3WT-tragende DIPG-Zellen gekennzeichnet (Masterarbeit Kubiak 2019; Wiese et al. 2020). Somit könnten isoUGO-H3.3K27M-Zellen durch hier nach längerer Inkubationszeit der isoUGO-Zellen mit Kurkumin ein stärkerer H3.3K27M-mutationsabhängiger Effekt auf das Selbsterneuerungspotential sichtbar.

Das Selbsterneuerungspotential von Zellen wird auch durch den Wnt-Signalweg beeinflusst (Kalani et al. 2008). Über die Inhibition dieses Signalwegs durch die H3.3K27M-mutationsunabhängig verstärkte Expression von *DKK1* durch Kurkumin könnte somit womöglich die Klonogenität und das Selbsterneuerungspotential der isoUGO-Zellen vermindert werden. Da jedoch die Ergebnisse der vorliegenden Studie darauf hindeuten, dass die Inhibition des Wnt-Signalweges in H3.3K27M-mutierten isoUGO-Zellen eine stärkere Rolle zu spielen scheint, wäre dann bei dieser Annahme auch ein stärkerer H3.3K27M-mutationsabhängiger Unterschied in der Sphärenformationsanalyse zu erwarten gewesen – womöglich könnten, wie bereits beschrieben, längere Inkubationszeiten einen solchen Effekt aufzeigen.

Durch die durch Kurkumin induzierte Inhibition der Wnt-Signalkaskade könnte möglicherweise auch die epitheliale zu mesenchymaler Transformation (EMT) reduziert werden. Dieser Vorgang wird in DIPG mit Tumorproliferation, -invasion und -metastasierung assoziiert (Kluiver et al. 2020) und geht in pädHGG mit einer verstärkten Resistenz der Tumorzellen gegenüber Radio- und Chemotherapie einher (Meel et al. 2018). Aus der *Heatmap*-Analyse ist ersichtlich, dass in isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen *TWIST1* zu den Top50-Genen, deren Expression durch Kurkuminbehandlung am stärksten reduziert wurde, gehört – ein Gen,
welches die EMT fördert und in allen adulten und auch pädiatrischen Tumorproben stark überexprimiert ist (r2.amc.nl, abgerufen am 15.06.2020, Daten nicht gezeigt). Auch geht aus den Analysen der RNA-Sequenzierung hervor, dass mit den in H3.3K27M-mutierten isoUGO-Zellen durch Kurkuminbehandlung am stärksten exprimierten Genen unter anderem Vorgänge der Regulation der Zellmigration, -motilität, -migration und Transportvorgänge assoziiert sind. Dies könnte im Zusammenhang mit der Wnt-abhängigen Beeinflussung der EMT durch Kurkumin stehen. Dadurch könnte Kurkumin womöglich die Ausbreitung und Invasion von DIPG in umliegendes Gewebe verhindern. Ähnliche Effekte konnten beispielsweise bereits in Mamma-, Prostata- und Blasenkarzinomzellen gezeigt werden (Holy 2004; Kim et al. 2008; Zhang et al. 2018). Um diesen Einfluss auf die Zellmotilität der Tumorzellen zu bestätigen, sollten Migrations- und Invasionsversuche mit isoUGO-Zellen durchgeführt werden.

Wiese et al. (2017) beschrieben, dass in unterschiedlichen pädHGG-Zelllinien der kanonische Wnt-Signalweg keine Rolle zu spielen scheint – jedoch wurden in dieser Studie keine H3.3K27M-mutierten Zellen untersucht. Der Wnt-Signalweg könnte also im Zusammenhang mit der H3.3K27M-Mutation stehen. Um die Aktivität des kanonischen Wnt-Signalweges in isoUGO-Zellen zu messen, sollten weiterführend TOP/FOP-Luciferase-Versuche zur Analyse der kanonischen Wnt-Aktivität und Western-Blot-Analysen zur Detektion des nuklearen ß-Catenin-Levels durchgeführt werden. Auch könnte ein Vergleich der Sequenzierungsdaten von mit Kurkumin bzw. beispielsweise mit ICG-001, einem ß-Catenin/CBP-Antagonisten, behandelten isoUGO-Zellen durchgeführt, oder *small interfering* RNA (siRNA) gegen ß-Catenin eingesetzt werden, um eine eindeutigere Aussage zu den Wirkmechanismen von Kurkumin auf transkriptioneller Ebene in Bezug auf den kanonischen Wnt-Signalweg treffen zu können.

Aus der Analyse der RNA-Sequenzierung geht auch hervor, dass Kurkumin H3.3K27Mmutationsunabhängig eine Reduktion der Expression von *MYC* induzierte, welches die Zellproliferation stimuliert (Vervoorts et al. 2003). Durch die Inhibierung dieses Protoonkogens wurden somit vermutlich auch die Proliferationskapazitäten der isoUGO-Zellen reduziert. Dies stimmt mit den Ergebnissen der funktionellen Versuche überein. Zudem gilt *MYC* als eines der wichtigsten Target-Gene des Wnt-Signalweges – die durch Kurkuminbehandlung induzierte verminderte *MYC*-Expression in isoUGO-Zellen könnte also auch über die Inhibierung des Wnt-Signalweges durch das Phytotherapeutikum zu erklären sein.

Ebenso scheint die durch PCR2 vermittelte Trimethylierung an H3K27, die durch die H3K27M-Mutation reduziert wird, essenziell für das Selbsterneuerungspotential von Zellen und eine physiologische Zelldifferenzierung zu sein (Margueron und Reinberg 2011, Harutyunyan et al. 2019; Kasper und Baker 2020). H3.3K27M-mutierte Zellen wären demnach geringer

differenziert als H3WT-Zellen. Die mRNA-Sequenzierung zeigte, dass in isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen besonders stark die Expression solcher Gene durch Kurkuminbehandlung aktiviert wurde, die mit Vorgängen der Zelldifferenzierung assoziiert sind.

Auch die Inhibierung der HAT-Aktivität geht unter anderem mit einer Redifferenzierung der Zellen einher (Kang et al. 2006). Kurkumin könnte in isoUGO-Zellen über die Inhibierung der CBP/p300-HAT-Aktivität womöglich zu einer verstärkten Differenzierung der Zellen beitragen. Generell gilt: Je differenzierter die Zelle, desto geringer das maligne Potential – ein weiterer Ansatz zur Erklärung des sich aus multiplen Wirkmechanismen zusammensetzenden Antitumoreffektes von Kurkumin.

Zusammenfassend können die in den Sphären- und Kolonieformationsanalysen untersuchten Eigenschaften als Selbsterneuerungs- und Proliferationspotential beschrieben werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass Kurkumin in isoUGO-Zellen die Ausprägung von Stammzellcharakteristika inhibiert. Somit wird bestätigt, was bereits für unterschiedliche Tumorentitäten gezeigt werden konnte (Lim et al. 2011; Gupta et al. 2013a).

Da DIPG vermutlich aus transformierten glialen oder pontinen Vorläuferzellen des ventralen Anteils des Pons hervorgehen (Monje et al. 2011; Nagaraja et al. 2017), könnte eine Kurkuminbehandlung bereits am Ursprung der Entstehung dieses Tumors angreifen und das neoplastische Potential dieser Vorläuferzellen stark reduzieren.

Zudem wird die Entstehung von Resistenzmechanismen gegenüber Tumortherapien – die auch in DIPG mit zu der fatalen Prognose beitragen (Satoru und Van Meir 2017) – oftmals mit einer Verstärkung von Stammzellcharakteristika in Tumorzellen assoziiert (Sordillo et al. 2015). Eine Behandlung mit Kurkumin könnte somit zu einer Sensibilisierung der Tumorzellen gegenüber Radio- bzw. Chemotherapie führen. So beschrieben Kunnumakkara et al. (2017), dass Kurkumin verschiedene Tumorzellen für eine chemo- und radiotherapeutische Behandlung sensitiviert.

In DIPG sollten daher weiterführend Versuche zur Untersuchung der Effekte der Kombinationsbehandlung von Kurkumin mit TMZ, dem bis heute standardmäßig zum Einsatz kommenden Chemotherapeutikum, angestrebt werden. An dieser Stelle soll darauf aufmerksam gemacht werden, dass Bagherian et al. (2020) mit einer Kombinationsbehandlung aus TMZ und in Nanomizellen eingebettetem Kurkumin einen erhöhten zytotoxischen Effekt in Glioblastomzellen nachweisen konnten.

Das Modell der multifaktoriellen Tumorentstehung ist in der Wissenschaft mittlerweile etabliert und eine Therapie, deren Substrat lediglich an einem Signalweg angreift (*mono-targeted therapy*), ist

in vielen Fällen nicht ausreichend. Die Tumorheterogenität pädiatrischer hochgradiger Gliome impliziert, dass solche Therapien lediglich für eine Minorität der Patient:innen mit spezifischen Mutationen in Frage kommen. Der Fokus in der Behandlung des komplexen Prozesses der Tumorgenese sollte vielmehr hin zu synergistisch wirkenden Therapiekombinationen verlagert werden. In diesem Zusammenhang sollte auch die Anwendung von Kurkumin als mögliches therapeutisches Adjuvans künftig mehr diskutiert werden.

4.3 Kurkumin induziert Zellzyklusarrest und Zelltodmechanismen in isoUGO-Zellen in Abhängigkeit vom H3.3-Mutationsstatus

Es konnte bereits in verschiedenen Tumorentitäten, darunter auch in Hirntumoren, gezeigt werden, dass Kurkumin Zellzyklusarrest und Zelltodmechanismen wie Apoptose und Autophagie induziert (Perry et al. 2010; Lee et al. 2011; Khaw et al. 2013; Du et al. 2013; Wang L et al. 2015; Moustapha et al. 2015; Shakeri et al. 2018).

Aus der PI-Durchflusszytometrie ging hervor, dass Kurkumin den Anteil an isoUGO-Zellen in der subG1-Phase signifikant erhöhte und den in der G1-Phase signifikant verringerte, wobei die G2- und M-Phase jeweils als subG1-Phase des Zellzyklus zusammengefasst wurden. Kurkumin reduzierte den Anteil an Zellen in der S-Phase in beiden isogenen UGO-Zelllinien jedoch signifikant stärker in H3WT- als in H3.3K27M-mutierten Zellen. In isoUGO-2-H3WT-Zellen wurde durch Kurkuminbehandlung der Anteil an Zellen in der subG1-Phase signifikant stärker erhöht als in isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen - in isoUGO-2-Zellen zeigte sich dieser H3.3K27M-mutationsabhängige Effekt jedoch nicht. Dies könnte dennoch darauf hindeuten, dass besonders in isoUGO-H3WT-Zellen durch Kurkuminbehandlung womöglich ein G2/M-Zellzyklusarrest induziert wurde. Vorangegangene Studien bestätigen diese Beobachtungen: Wie bereits für Gliom- (Aoki et al. 2007) und Medulloblastomzellen (Lee et al. 2011) beschrieben wurde, bewirkt Kurkuminbehandlung durch die reduzierte Expression regulatorischer Zellzyklusproteine, beispielsweise verschiedener Cycline und c-myc (welches von MYC kodiert wird), einen Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase (Aggarwal und Sung 2009). In der vorliegenden Studie zeigte die genontologische Analyse der RNA-Sequenzierungsergebnisse die durch Kurkumin induzierte Reduktion der MYC-Expression wie bereits beschrieben keinen signifikanten Unterschied zwischen H3.3K27M-mutierten und H3WT-tragenden isoUGO-Zellen. In der Heatmap-Analyse befanden sich unter den Top50-Genen, deren Expression in isoUGO-H3WT-Zellen durch Kurkuminbehandlung am stärksten herunterreguliert wurde, unter anderem CCNB2, welches für das Zellzyklusregulatorprotein Cyclin B kodiert, und CDK1, welches für die cyclinabhängige Kinase 1 (cycline-dependent kinase 1 (CDK1)) kodiert. Cyclin B1

und *CDK1* interagieren miteinander und triggern somit den Übergang von der G2- in die M-Phase des Zellzyklus (Canela et al. 2003). Durch die Herunterregulation dieser Gene durch Kurkuminbehandlung könnte also ein G2/M-Zellzyklusarrest in isoUGO-Zellen induziert werden. In isoUGO-H3.3K27M-Zellen hingegen zeigte die *Heatmap*-Analyse, dass *CDK6*, welches für die cyclinabhängige Kinase 6 kodiert und somit auch zu den Zellzyklusregulatorproteinen gehört, zu den durch Kurkumin am stärksten aktivierten Genen gehörte.

Zusammenfassend scheint Kurkumin sowohl in H3.3K27M-mutierten als auch in H3WTtragenden isoUGO-Zellen Zellzyklusarrest – vermutlich am G2/M-Übergang – zu induzieren. Die Ergebnisse der PI-Durchflusszytometrie sowie der genontologischen Analyse der RNA-Sequenzierung deuten darauf hin, dass der inhibierende Effekt Kurkumins auf den Zellzyklus in isoUGO-H3WT-Zellen eine größere Rolle zu spielen scheint als in H3.3K27M-mutierten isoUGO-Zellen.

In der G2/M-Phase sind die Zellen besonders empfindlich ionisierenden Strahlen gegenüber. Auch dieser Effekt wird als eine der Ursachen für die erhöhte Sensibilisierung gegenüber Bestrahlung nach Kurkuminbehandlung diskutiert (Chendil et al. 2004; Schwarz et al. 2020). Daher sollte eine Kombinationsbehandlung mit Kurkumin und Radiotherapie in isoUGO-Zellen beispielsweise mit Hilfe von MTT-Zellviabilitätsanalysen weiter analysiert werden.

Doch auch über zelltodaktivierende Mechanismen wirkt Kurkumin womöglich als Strahlungssensibilisator in neoplastischen Zellen (Kunnumakkara et al. 2017). Kurkumin induziert direkt über die Aktivierung proapoptotischer Proteine sowohl der intrinsischen als auch der extrinsischen Signalkaskade und indirekt über die Inhibierung antiapoptotischer Proteine Apoptose (Park et al. 2013; Araveti und Srivastava 2019).

Die PI-Durchflusszytometrie zeigte in allen isogenen UGO-Zelllinien nach Kurkuminbehandlung einen erkennbaren "Apoptose-*Peak*" in der subG1-Phase, welcher daraufhin deutet, dass durch Kurkuminbehandlung in isoUGO-Zellen Apoptose induziert wurde. Die Western-Blot-Analysen bestätigten die Apoptoseinduktion durch Kurkuminbehandlung, die jedoch in isoUGO-H3WT-Zellen im Vergleich zu H3.3K27M-mutierten isoUGO-Zellen stärker ausgeprägt war.

Aus der genontologischen Analyse der durch Kurkumin signifikant regulierten Gene in isoUGO-2-Zellen ging hervor, dass die Antitumorwirkung von Kurkumin in isoUGO-H3WT-Zellen vornehmlich über die Inhibierung von Zellzyklusvorgängen und die Induktion von Apoptose vermittelt zu werden schien – in diese Vorgänge waren die durch Kurkuminbehandlung am stärksten regulierten Gene vornehmlich involviert. Sowohl in isoUGO-2-H3WT- als auch in isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen wurde die Expression des antiapoptotisch wirksamen Gens *BCL-2* durch Kurkuminbehandlung signifikant herunter- und die Expression der proapoptotischen Gene *BAX* und *MDM2* durch Kurkumin signifikant hochreguliert. Dabei war der Effekt von Kurkumin bei der Regulation von *BCL-2* und *BAX* in isoUGO-H3WT-Zellen signifikant stärker als in isoUGO-H3.3K27M-Zellen.

Dies deutet darauf hin, dass auch in H3.3K27M-mutierten isoUGO-Zellen durch Kurkuminbehandlung Apoptose induziert wird, jedoch weniger stark als in isoUGO-H3WT-Zellen. Auch hier könnten Versuche mit einer längeren Inkubationszeit womöglich stärkere H3.3K27M-mutationsabhängige Effekte der Wirkmechanismen von Kurkumin aufzeigen und sollten angestrebt werden.

Die Inhibierung der HAT-Aktivität geht mit einer Apoptoseinduktion und Zellzyklusarrest in Glioblastomzellen einher (Kang et al. 2006). Dass Kurkumin in isoUGO-Zellen auch über die Inhibition der CBP/p300-HAT-Aktivität zu wirken scheint, könnte somit ein weiterer Erklärungsansatz für die Apoptoseinduktion sein.

Auch könnte die durch Kurkumin induzierte Apoptose in isoUGO-Zellen die Effizienz der Standardtherapie erhöhen, indem die Tumorzellen durch Einleitung programmierter Zelltodmechanismen für TMZ-Behandlung sensitiviert werden (Yin et al. 2014; Bagherian et al. 2020). Diese Hypothese bekräftigt abermals die Notwendigkeit weiterführender Experimente, in denen eine Kombinationsbehandlung aus TMZ und Kurkumin in isoUGO-Zellen getestet werden sollte.

Als ein weiterer Mechanismus des programmierten Zelltods wird neben Apoptose auch Autophagie angesehen. Moustapha et al. (2015) beschrieben das komplexe Wechselspiel der Induktion von Apoptose bzw. Autophagie durch Kurkumin: Demnach werde durch Stresssituationen zunächst Autophagie induziert und im Verlauf Apoptose (Moustapha et al. 2015). Diese These impliziert, dass Autophagie primär als Selbstschutzmechanismus der Tumorzellen fungiert und erst bei höheren Stressleveln über eine Apoptoseinduktion mit am Zelltod beteiligt ist.

In isogenen UGO-Zellen führte Kurkuminbehandlung zu einer vermehrten LC3B-Expression. Die Level von LC3B, einem Markerprotein zur Detektion von Autophagie, waren sowohl in isoUGO-1- als auch in isoUGO-2-Zellen unabhängig vom H3.3-Mutationsstatus erkennbar erhöht – jedoch nur in isoUGO-H3.3K27M-Zellen signifikant. Somit könnte die Autophagieinduktion durch Kurkumin in H3.3K27M-mutierten isoUGO-Zellen womöglich eine stärkere Rolle spielen als in isoUGO-H3WT-Zellen.

Die Induktion der Autophagie durch Kurkumin wirkt teilweise über die Interferenz mit der mTOR-Signalkaskade, die als negativer Regulator der Autophagie gilt (Seo et al. 2018). Durch den Wnt-Signalweg wird die mTOR-Kaskade positiv beeinflusst. Verstärkt in H3.3K27Mmutierten isoUGO-Zellen schien Kurkumin die mit dem kanonischen Wnt-Signalweg assoziierten Mechanismen zu inhibieren, was zu einer reduzierten Aktivität mTOR-assoziierter Vorgänge führen könnte. Dies wiederum könnte eine Ursache für die durch Kurkumin verstärkt in H3.3K27M-mutierten isoUGO-Zellen induzierte Autophagie sein.

Autophagie wird häufig - vor allem zu Beginn einer Stresssituation - auch als Schutzmechanismus der Zellen vor äußeren Einflüssen, wie beispielsweise Nahrungskarenz oder - im Fall von Tumoren - therapeutischen Behandlungen wie Radio- und / oder Chemotherapie, verstanden. Sollte Autophagie in isoUGO-Zellen eher als Selbstschutzmechanismus, z. B. bei der Behandlung der Zellen mit verschiedenen Therapeutika, fungieren, so könnte die Induktion von Autophagie den Antitumoreffekt von Kurkumin abschwächen. Wie bereits von Zanotto-Filho et al. (2015) beschrieben wurde, induziert die Kombinationsbehandlung aus TMZ und Kurkumin in Glioblastomzellen Autophagie. Die Therapieeffizienz konnte durch den Zusatz des Autophagieinhibitors Chloroquin erhöht werden (Zanotto-Filho et al. 2015). Chloroquin wurde im Zuge der HIT HGG-Studie 2013 unter anderem als Therapieadjuvans an Patient:innen mit DIPG getestet.

Die in der vorliegenden Studie getestete Kombinationsbehandlung aus Kurkumin und Chloroquin könnte darauf hindeuten, dass in isogenen UGO-Zellen die Induktion der Autophagie durch Kurkumin als Schutzmechanismus fungiert. Die Kombinationsbehandlung mit Kurkumin und Chloroquin resultierte in einer erhöhten Zytotoxizität. Wenn Autophagie ein durch Kurkumin ausgelöster und im Zuge der Tumortherapie wünschenswerter Zelltodmechanismus wäre, dann wäre durch den Zusatz des Autophagieinhibitors Chloroquin eher eine verminderte Zytotoxizität zu erwarten gewesen. Folglich deutet die erhöhte Zytotoxizität nach Kombinationsbehandlung mit Kurkumin und Chloroquin darauf hin, dass die durch Kurkumin induzierte Autophagie in isoUGO-Zellen eher als Selbstschutzmechanismus der Tumorzellen aufzufassen ist und nicht primär als ein Zelltodmechanismus verstanden werden kann, den es zu induzieren gilt, um die Tumorgenese zu inhibieren. Auch dieses Ergebnis bekräftigt die Notwendigkeit einer Kombinationstherapie aus unterschiedlichen Substanzen in der DIPG-Therapie.

Die Inhibition von Autophagie wird auch mit der verstärkten Wirkung von Radiotherapie assoziiert (Von Bueren et al. 2017). Daher sollten weiterführend Versuche, beispielsweise MTT-Zellviabilitätsanalysen, mit isoUGO-Zellen angestrebt werden, um den Effekt einer Kombinationsbehandlung aus Chloroquin, Kurkumin und Radiotherapie *in vitro* zu untersuchen.

4.4 Kurkumin induziert immunmodulatorische Effekte in isoUGO-Zellen

In verschiedenen Studien konnte die entzündungshemmende Wirkung Kurkumins durch die Regulation der Expression verschiedener Zytokine bereits bewiesen werden (Aggarwal et al. 2003; Kunnumakkara et al. 2017; Hassan et al. 2019).

Der in der vorliegenden Studie gezeigte immunmodulatorische Effekt Kurkumins schien in H3.3K27M-mutierten isoUGO-Zellen im Vergleich zu H3WT-tragenden isoUGO-Zellen verstärkt eine Rolle zu spielen: So wurde in isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen die Expression von PPAR-y durch Kurkuminbehandlung signifikant verstärkt, wohingegen in isoUGO-2-H3WT-Zellen PPAR-y durch Kurkuminbehandlung vermindert exprimiert wurde. PPAR-y fungiert neben seiner antiinflammatorischen Komponente auch als Inhibitor des Wnt-Signalweges (Vallée et al. 2018). Diese Erkenntnis stützt abermals die Hypothese, dass die Aktivierung des Wnt-Signalweges durch Kurkumin in H3.3K27M-mutierten isoUGO-Zellen eine größere Rolle zu spielen scheint. Auch durch die Interaktion mit anderen Zytokinen schien Kurkumin in Abhängigkeit vom H3.3-Mutationsstatus unterschiedlich isoUGO-Zellen in stark immunmodulierend zu wirken: Beispielsweise wurde in isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen IL-15 durch Kurkuminbehandlung verstärkt exprimiert, während in isoUGO-2-H3WT-Zellen kein Einfluss von Kurkumin auf die Expression von IL-15 gezeigt werden konnte. Eine Induktion von IL-15 wird mit einem verminderten Tumorwachstum bei Glioblastomen durch eine vermehrte Infiltration natürlicher Killerzellen in das Tumorgewebe assoziiert (Garofalo et al. 2015). Die signifikant reduzierte Expression des proinflammatorisch wirkenden IL-21 durch Kurkuminbehandlung konnte sowohl in isoUGO-2-H3WT- als auch in isoUGO-2-H3.3K27M-Zellen gezeigt werden, wobei die Expressionslevel von IL-21 in H3.3K27M-mutierten Zellen allgemein höher waren als in H3WT-Zellen.

Der immunmodulatorische Effekt von Kurkumin scheint zusammenfassend besonders in H3.3K27M-mutierten isoUGO-Zellen ausgeprägt zu sein, konnte jedoch auch in H3WTtragenden isoUGO-Zellen gezeigt werden. Letztendlich scheint der antineoplastische Gesamteffekt von Kurkumin weitestgehend H3.3K27M-mutationsunabhängig zu sein. Die genauen Wirkmechanismen unterscheiden sich in H3WT- und H3.3K27M-mutierten isoUGO-Zellen zum Teil jedoch durchaus. Dieser Unterschied unterstützt die Hypothese, dass es neben der H3.3K27M-Mutation noch andere Mechanismen geben muss, die für die Aggressivität von DIPG mit verantwortlich zu machen sind.

4.5 Limitierungen des Einsatzes von Kurkumin als therapeutisches Adjuvans

Trotz der vielversprechenden, multifaktoriellen Effekte von Kurkumin ist die therapeutische Anwendung in der Praxis aufgrund der äußerst geringen Bioverfügbarkeit, die vor allem in der kristallinen Struktur der Substanz begründet ist, sehr limitiert (Aggarwal und Sung 2009; Shen et al. 2016; Theppawong et al. 2018a und b; Theppawong et al. 2019; Ubeyitogullari und Ciftci 2019). Durch die schlechte Wasserlöslichkeit Kurkumins (etwa 11 ng/ml (Zhang et al. 2012)) niedrigggradige intestinale Absorptionsrate können lediglich und dessen niedrige Serumkonzentrationen erreicht werden (Wahlström und Blennow 1978; Ireson et al. 2001; Anand et al. 2007; Shen et al. 2016). Auch bei intravenöser Injektion stellen zum einen die Lipophilität und somit die geringe Wasserlöslichkeit und zum anderen die durch die Instabilität Kurkumins und den hohen First-Pass-Effekt bedingte schnelle Metabolisierung und systemische Eliminierung von Kurkumin ein Problem dar (Anand et al. 2007; Shen et al. 2016; Liu et al. 2016). Nach anfänglich erhöhten Plasmakonzentrationen fällt der Kurkuminspiegel nach Minuten ab, da der Wirkstoff rasch glucuronidiert oder sulfatiert wird. Die wasserlöslichen Metabolite werden im Anschluss biliär verstoffwechselt (Wahlström und Blennow 1978; Ireson et al. 2001; Aggarwal und Sung 2009; Liu et al. 2016). Bedingt durch die geringe Absorptionsrate von Kurkumin sind die gastrointestinalen Epithelzellen am stärksten dem noch nicht metabolisierten Kurkumin ausgesetzt. Die Kolonkarzinomprävalenz in einigen asiatischen Ländern ist signifikant geringer als der europäische Durchschnitt, was an der in diesen Regionen weit verbreiteten Verwendung von Kurkumin als Gewürz liegen könnte (Aggarwal et al. 2003).

Somit würde sich Kurkumin bei den derzeitig gängigen Möglichkeiten der Applikation vor allem in ZNS-Tumoren nur unzureichend im Zielgewebe des Tumors anreichern. Medikamente und Adjuvanzien zur Behandlung von ZNS-Tumoren müssen zudem noch ein weiteres Anforderungskriterium erfüllen: Eine große Herausforderung stellt die Überquerung der Blut-Hirn-Schranke dar. Zur Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit von Kurkumin gibt es kontroverse Auffassungen. Zwar ist es aufgrund der Lipophilität dieses Phytotherapeutikums gut möglich, dass diese Barriere penetriert werden kann, und Perry et al. (2010) und Lee et al. (2011) berichteten beispielsweise, dass im *in-vitro*-Modell und auch im Tierversuch die Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit von Kurkumin nachgewiesen werden konnte. Um eine grobe Übersicht über die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften von Kurkumin zu erlangen, wurde mit Hilfe der Website swissadme.ch (abgerufen am 13.04.2020), die zur Vorhersage von physikochemischen Eigenschaften und der Pharmakokinetik von Wirkstoffen anhand derer Strukturformel und somit dem potenziellen Gebrauch derjenigen in der Praxis dient (Daina et al. 2017), gearbeitet. Kurkumin ist laut SwissADME nicht bluthirnschrankengängig. Der Einsatz dieser Internetseite dient jedoch nur der Orientierung und sollte durch Versuche zur Analyse der Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit von Kurkumin validiert werden, um der Anwendung von Kurkumin als Therapieadjuvans in DIPG einen weiteren Schritt näher zu kommen.

Es existieren unterschiedliche Ansätze, um die Bioverfügbarkeit von Kurkumin und dessen Verteilung im Zielgewebe zu verbessern: Durch Inhibition der raschen Metabolisierung durch die Verabreichung von Kurkumin in Kombination mit Piperin, eines der Alkaloide aus schwarzem Pfeffer (*Piper nigrum L.*), das die intraenterozytäre Glucuronidierung Kurkumins inhibiert, verzögert sich der biliäre Abbauprozess. Die Bioverfügbarkeit Kurkumins wird dadurch um etwa 2000% erhöht (Shoba et al. 1998; Anand et al. 2007; Prasad et al. 2014; Liu et al. 2016; Kaur et al. 2018). Eine kombinierte orale Applikation von Kurkumin und Piperin über zwölf Wochen wurde von Patient:innen nachgewiesenermaßen gut toleriert (Kunnumakkara et al. 2017). Des Weiteren zeigte der Einsatz synthetisierter struktureller Analoga, die potenter und unter physiologischen Konditionen stabiler als Kurkumin selbst sein sollen, eine ähnliche antineoplastische Wirkung wie Kurkumin selbst *in vivo* (Yang et al. 2016).

Die Einkapselung in Liposomen (Huang et al. 2019) oder Phospholipidkomplexe (Anand et al. 2007), oder die Einbettung in Mikroemulsionen und Mizellen (Liu et al. 2016) zeigte ebenfalls vielversprechende Effekte, um die Lipophilität des Kurkumins auszunutzen und durch den Einsatz solcher Trägersubstanzen die Bioverfügbarkeit der Substanz zu erhöhen. Die Einbettung von Kurkumin in Nanopartikel (Bisht et al. 2010; Ubeyitogullari und Ciftci 2019; Minafra et al. 2019) ist ein weiterer Ansatz, um die Struktur der Substanz sowie daraus folgend die Bioverfügbarkeit weitestgehend zu verbessern, eine intravenöse Applikation zu ermöglichen (Prasad et al. 2014) und den Metabolismus von Kurkumin zu verzögern, damit länger höhere Wirkkonzentrationen erreicht werden können (Cheng et al. 2012). Auch Hydrogele fanden für den Transport von Kurkumin im Organismus bereits Anwendung. Solche Substanzen werden zum einen zum Transport von hydrophoben Substanzen in Flüssigkeiten und zum anderen zur

Überwindung von natürlichen Barrieren wie der Blut-Hirn-Schranke verwendet. Sowohl in Mikroemulsionen (Shinde und Devarajan 2017) als auch in Nanopartikel (Cheng et al. 2012) oder Hydrogele (Altunbas et al. 2011) eingebettetes Kurkumin konnte die Blut-Hirn-Schranke überqueren und in verschiedenen Regionen des ZNS auch nach 24 Stunden noch in ausreichend hohen Wirkstoffkonzentrationen nachgewiesen werden. Altunbas et al. (2011) konnten zeigen, dass bei der Behandlung von Medulloblastomen die Einbettung von Kurkumin in Hydrogele keine verminderten Effekte auf die biologischen Wirkmechanismen des Phytotherapeutikums hatte. Diese Transportsubstanzen stellen zudem eine minimalinvasive Transportstrategie dar und dürften mit einem geringen Nebenwirkungsspektrum einhergehen. Daher sind diesbezügliche Experimente in DIPG zu überlegen, um der klinischen Anwendung von Kurkumin näher zu kommen.

Auch über intranasale Applikation von Wirkstoffen sollte bei der Behandlung von ZNS-Tumoren weiter nachgegangen werden, da durch die verbesserte Aufnahme über die Schleimhaut im Vergleich zu intravenöser Applikation höhere Konzentrationen innerhalb des ZNS nachgewiesen werden konnten (Wang et al. 2012) und, genau wie bei intravenöser Applikation, der *First-Pass*-Effekt umgangen werden kann. Mit diesem Ansatz konnten auch bei Kurkumin bereits vielversprechende Wirkungen gezeigt werden: Durch Einbettung dieses Phytotherapeutikums in Hydrogele (Chen et al. 2013) bzw. Mikroemulsionen (Wang et al. 2012) konnten durch intranasale Applikation im Tierversuch hohe Konzentrationen in verschiedenen Regionen des ZNS dokumentiert werden.

Studien belegen auch. dass die Abbauprodukte von Kurkumin, beispielsweise Tetrahydrokurkumin und Hexahydrokurkumin, noch wesentlich länger und in höheren Konzentrationen als ihre Ursprungssubstanz im menschlichen Organismus nachgewiesen werden können (Shen et al. 2016). Sandur et al. (2007) zeigten zwar, dass diese Metabolite weniger biologisch aktiv seien als Kurkumin selbst, jedoch wiesen diese laut Prasad et al. (2014) in verschiedenen Studien vom Original-Kurkumin variierende, aber dennoch antioxidative und antiinflammatorische Eigenschaften auf. Dies ist auch in DIPG ein durchaus interessanter Ansatz, dem im Rahmen der Versuche, die auf den Einsatz von Kurkumin als mögliches therapeutisches Adjuvans abzielen, weiter nachgegangen werden könnte. Diesbezügliche Experimente, die den Effekt von Tetra- bzw. Hexakurkumin auf isoUGO-Zellen analysieren, sollten in Betracht gezogen werden.

Zusammenfassend ist die auch in hohen Dosen schlechte Bioverfügbarkeit Kurkumins *in vivo* der limitierende Faktor für die Anwendung dieses Phytotherapeutikums in der Praxis. Die pharmakologisch vielversprechenden Effekte von Kurkumin wurden jedoch in verschiedensten

Studien – so auch in der vorliegenden – bewiesen. Somit ist die Suche nach einer effektiven Methode, Kurkumin in höchstmöglichen Konzentrationen zu den Zielstrukturen zu transportieren, nach wie vor unumgänglich.

4.6 Vor- und Nachteile des Einsatzes von Kurkumin als Therapieadjuvans

Abschließend sollen mögliche Vor- und Nachteile, die beim Einsatz von Kurkumin als Therapieadjuvans in DIPG von Relevanz sein könnten, aufgezeigt und diskutiert werden.

So wurden von Interaktionen von Kurkumin mit medikamentenverstoffwechselnden Enzymen wie Cytochrom P450 (CYP450) *in vitro* und *in vivo* in Tierversuchen berichtet (Thapliyal und Maru 2001). Auch laut SwissADME (abgerufen am 13.04.2020) besteht die Möglichkeit zu Interaktionen durch Kurkumin mit Enzymen der CYP450-Familie. Dies sollte unbedingt überprüft werden. Auch Medikamente, die bei Tumorpatient:innen häufig Anwendug finden – beispielsweise Morphin – werden durch CYP-Enzyme verstoffwechselt. Dies birgt die Gefahr einer erhöhten Toxizität der Medikamente durch unerwünschte Arzneimittelinteraktionen und der Akkumulation bestimmter Wirkstoffe.

Auch der bivalente Effekt von Kurkumin auf Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) birgt Vor- und Nachteile. Zum einen kann darüber die antioxidative Wirkung von Kurkumin mit erklärt werden, die mit einer Sensitivierung für chemotherapeutische Behandlung assoziiert wird (Yin et al. 2014). Andererseits werden ROS ambivalente Wirkmechanismen zugeschrieben, die auch mit Tumorgenese assoziiert sind (Gupta et al. 2012; Wungki et al. 2013).

Epigenetisch wirksame Therapien stellen seit einiger Zeit einen neuen Ansatz in der DIPG-Behandlung dar – der Therapieerfolg beruht hier eher auf dem biologischen Effekt und weniger auf der Dosisabhängigkeit. Somit wird angenommen, dass die unerwünschten Nebenwirkungen geringer sind als bei den herkömmlichen Therapieverfahren (Azad et al. 2013). Auch wirken epigenetische Therapien oft spezifisch auf Tumorzellen, die bestimmte Mutationen tragen, auf die die epigenetischen Therapeutika abzielen. Dadurch bleiben gesunde, nichtmaligne transformierte Zellen unbeeinträchtigt, was zusätzlich zu einem reduzierten Nebenwirkungsspektrum beitragen könnte. Jedoch gibt es auch einige Nachteile, die bei Verwendung epigenetischer Ansätze bedacht werden müssen: So sind diese Therapien nicht schnell wirksam, sondern benötigen einige Zeit, um transkriptionelle Vorgänge zu modulieren (Azad et al. 2013). Dies könnte aufgrund der schlechten Prognose und dem sehr kurzen Gesamtüberleben nach Diagnosestellung bei DIPG-Patient:innen eine Limitierung des Einsatzes epigenetischer Therapien darstellen. Auch sind diese Therapien oft sehr spezifisch

und setzen Kenntnisse über das Genom der jeweiligen Patient:innen voraus. Dies führt dazu, dass diese Therapien teuer sind und lediglich in reicheren Staaten Anwendung finden können und somit einem Großteil der Weltbevölkerung nicht zur Verfügung stehen.

Kurkumin wirkt auch auf epigenetischer Ebene, kommt auf natürliche Weise in der *Curcumalonga*-Wurzel vor und ist im Vergleich zu vielen anderen Medikamenten der Krebstherapie sehr kostengünstig. Somit könnte der Einsatz von Kurkumin die Möglichkeit eröffnen, für die Mehrheit der Weltbevölkerung auch in Ländern mit einer weniger entwickelten medizinischen Infrastruktur in Zukunft Tumortherapien bezahlbarer und somit zugänglicher zu machen.

Doch nicht nur aufgrund der geringen Kosten bietet Kurkumin Vorteile gegenüber jenen beschriebenen Therapieansätzen: Im Gegensatz zu den erprobten epigenetischen Modulatoren wirkt dieses Phytotherapeutikum in gleichem Maße über pleiotrope Effekte auch auf die H3-Wildtypzellen zytotoxisch.

Auch die Tatsache, dass Kurkumin auch in hohen Dosen nichttoxisch ist, machen die Substanz im Vergleich zu vielen anderen etablierten Tumortherapieoptionen, die oftmals multiple, starke Nebenwirkungen nach sich ziehen, als alternative Standardtherapie oder zumindest als Therapieadjuvans zusätzlich attraktiv. Durch seine antioxidativen und antiinflammatorischen Eigenschaften mindert Kurkumin die Nebenwirkungen von Radio- und Chemotherapie (Thresiamma et al. 1996; Thresiamma et al. 1998; Minafra et al. 2019; Schwarz et al. 2020) und kann überdies durch seine chemopräventive Wirkung zu einer verbesserten Lebensqualität der Tumorpatient:innen beitragen (Panahi et al. 2014).

Die Zuhilfenahme natürlichvorkommender dietätischer Wirkstoffe bietet sich jedoch nicht nur in der Anwendung als therapeutische Adjuvanzien in der Tumortherapie an: Auch bei vielen chronischen, metabolischen, kardiovaskulären und neurologischen Erkrankungen (Aggarwal und Sung 2009, Gupta et al. 2013b) sollte der Einsatz von Kurkumin als Phytotherapeutikum zu prophylaktischen Zwecken überdacht werden.

In den vergangenen Jahrzehnten medizinischer Forschung wurden bereits multiple präklinische, experimentelle und klinische Studien zum Einsatz von Kurkumin als Therapeutikum bzw. therapeutisches Adjuvans durchgeführt. Für DIPG standen diese bislang weitestgehend noch aus. Aufgrund der vielversprechenden Effekte des Wirkstoffes *in vitro* ist es sinnvoll, Tierversuche und im nächsten Schritt auch klinische Studien in Erwägung zu ziehen, um die Effekte von Kurkumin auch in dieser Tumorentität *in vivo* zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

DIPG sind im Hirnstamm lokalisierte pädHGG, die mit einer fatalen Prognose einhergehen. 85% aller DIPG tragen eine H3K27M-Mutation, welche zu einer epigenetischen Dysregulation mit resultierender Hypotrimethylierung und Hyperacetylierung an H3K27 führt. Aufgrund mangelnder effektiver konventioneller Therapieoptionen greifen Eltern betroffener Patient:innen oft zusätzlich auf Phytotherapeutika wie Kurkumin zurück. Daher sollte in der vorliegenden Studie der Einsatz von Kurkumin als therapeutisches Adjuvans in DIPG analysiert werden.

Dazu wurde mit isogenen UGO-Zelllinien (ursprünglich von primären pädiatrischen DIPG-Zellen abgeleitete Tumorzelllinien mit nun retrospektiv nicht mehr zweifelsfrei nachweisbarem zellulärem Ursprung) gearbeitet, die sich lediglich in ihrem H3.3-Mutationsstatus unterschieden.

Um den H3.3K27M-mutationsabhängigen Effekt von Kurkumin zu untersuchen, wurden zunächst MTT-Zellviabilitätsversuche durchgeführt. Für die Detektion der genaueren Wirkmechanismen auf genomischer Ebene wurde die globale mRNA-Expression in isogenen H3WT- bzw. H3.3K27M-mutierten isoUGO-Zellen mittels Sequenzierung analysiert. Western-Blot-, Sphären- und Kolonieformations- und PI-FACS-Analysen wurden durchgeführt, um den Effekt von Kurkumin auf programmierte Zelltodmechanismen, das Selbsterneuerungspotential, die Proliferationskapazitäten und spezifische Histonmodifikationen zu identifizieren.

Auf epigenetischer Ebene bewirkte Kurkuminbehandlung in H3.3K27M-mutierten isoUGO-Zellen eine Wiederherstellung der H3K27-Trimethylierung. Auch führte Kurkumin vermutlich durch die Inhibierung der CBP/p300-HAT-Aktivität unabhängig vom H3.3-Mutationsstatus zu einer verminderten H3K27-Acetylierung. Somit konnten die durch die H3.3K27M-Mutation hervorgerufenen Veränderungen in isoUGO-Zellen teilweise durch Kurkuminbehandlung rückgängig gemacht werden – nicht nur auf epigenetischer Ebene durch Histonmodifikationen, sondern auch nachfolgend auf funktionelle Wirkmechanismen bezogen:

Das Selbsterneuerungspotential sowie die Proliferations- und Differenzierungskapazitäten der isoUGO-Zellen wurden im Wesentlichen unabhängig vom H3.3-Mutationsstatus durch Kurkumin verringert. Jedoch deutet die in isoUGO-H3.3K27M-Zellen verstärkte Inhibition des kanonischen Wnt-Signalweges durch Kurkuminbehandlung darauf hin, dass Kurkumin in H3.3K27M-mutierten isoUGO-Zellen vielleicht doch eine deutlich andere Rolle als in isogenen H3WT-tragenden Zellen spielen könnte. Kurkumin induzierte Apoptose und Zellzyklusarrest vermehrt in isoUGO-H3WT-Zellen, Autophagie hingegen stärker in isoUGO-H3.3K27M-Zellen. In H3.3K27M-mutierten isoUGO-Zellen schien Kurkumin zudem einen stärkeren immunmodulatorischen Effekt zu bewirken als in H3WT-tragenden isoUGO-Zellen.

Umso interessanter ist es, dass das Zusammenspiel dieser verschiedenen durch Kurkumin in unterschiedlichem Ausmaß modulierten Vorgänge und somit die gesamtzytotoxische Wirkung auf isoUGO-Zellen unabhängig vom H3.3K27M-Mutationsstatus nahezu gleich ist.

Durch die multifaktoriellen Wirkmechanismen stellt Kurkumin zusammenfassend eine sehr interessante Substanz für die weitere onkologische und pharmakologische Forschung – nicht nur in DIPG – dar.

Der entscheidende limitierende Faktor in der therapeutischen Anwendung dieses antineoplastischen Agens *in vivo* ist die geringe Bioverfügbarkeit von Kurkumin. Dadurch werden Absorption und Metabolisierung im menschlichen Organismus stark eingeschränkt. Die Umgehung dieser limitierenden Eigenschaften, beispielsweise durch Einbettung in Trägersubstanzen, ist ein unabdingbar weiterzuverfolgender Ansatz, um dem Einsatz von Kurkumin als therapeutisches Adjuvans in DIPG näherzukommen.

Und so sei abschließend die bereits von Hippokrates um etwa 400 vor Christus formulierte Aufforderung zitiert:

"Lass Nahrung deine Medizin sein und Medizin deine Nahrung."

6 Literaturverzeichnis

- Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC (2003): Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. Anticancer Res <u>23</u>, 363-398
- Aggarwal BB, Sung B (2009): Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. Trends Pharmacol Sci <u>30</u>, 85–94
- Ahmad K, Henikoff S (2002): The histone variant H3.3 marks active chromatin by replicationindependent nucleosome assembly. Mol Cell <u>9</u>, 1191–1200
- Altunbas A, Lee SJ, Rajasekaran SA, Schneider JP, Pochan DJ (2011): Encapsulation of curcumin in self-assembling peptide hydrogels as injectable drug delivery vehicles. Biomaterials <u>32</u>, 5906-5914
- Ammon HPT, Wahl MA (1991): Pharmacology of Curcuma longa. Planta Med 57, 1-7
- Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB (2007): Bioavailibility of curcumin: problems and promises. Mol Pharm <u>4</u>, 807-818
- Aoki H, Takada Y, Kondo S, Sawaya R, Aggarwal BB, Kondo Y (2007): Evidence that curcumin suppresses the growth of malignant gliomas in vitro and in vivo through induction of autophagy: role of Akt and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. Mol Pharmacol <u>72</u>, 29–39
- Araveti PB, Srivastava A (2019): Curcumin induced oxidative stress causes autophagy and apoptosis in bovine leucocytes transformed by *Theileria annulata*. Cell Death Discov <u>5</u>, 100
- Azad N, Zahnow CA, Rudin CM, Baylin SB (2013): The future of epigenetic therapy in solid tumours: lessons from the past. Nat Rev Clin Oncol <u>10</u>, 256-266
- Bagherian A, Mardani R, Roudi B, Taghizadeh M, Banfshe HR, Ghaderi A, Davoodvandi A, Shamollaghamsari S, Hamblin MR, Mirzaei H (2020): Combination therapy with nanomicellar curcumin and temozolomide for in vitro therapy of glioblastoma multiforme via Wnt signaling pathways. J MolNeurosci <u>70</u>, 1471-1483
- Balasubramanyam K, Varier RA, Altaf M, Swaminathan V, Siddappa NB, Ranga U (2004): Curcumin, a novel p300/CREB binding protein-specific inhibitor of acetyltransferase, represses the acetylation of histone/nonhistone proteins and histone acetyltransferase-dependent chromatin transcription. J Biol Chem <u>279</u>, 51163–51171
- Babelova A, Burckhardt BC, Salinas-Riester G, Pommerenke C, Burckhardt G, Henjakovic M (2015): Next generation sequencing of sex-specific genes in the livers of obese ZSF1 rats. Genomics <u>106</u>, 204-213
- Bechet D, Gielen GGH, Korshunov A, Pfister SM, Rousso C, Faury D, Fiset PO, Benlimane N, Lewis PW, Lu C et al. (2014): Specific detection of methionine 27 mutation in histone 3 variants (H3K27M) in fixed tissue from high-grade astrocytomas. Acta Neuropathol <u>128</u>, 733-741

- Bender S, Tang Y, Lindroth AM, Hovestadt V, Jones DTW, Kool M, Zapatka M, Northcott PA, Sturm D, Wang W et al. (2013): Reduced H3.3K27me3 and DNA hypomethylation are major drivers of gene expression in K27M mutant pediatric high-grade gliomas. Cancer Cell <u>24</u>, 660-672
- Berger SL (2007): The complex language of chromatin regulation during transcription. Nature <u>447</u>, 407–412
- Bird A (2002): DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes Dev 16, 6-21
- Bisht S, Mizuma M, Feldmann G, Ottenhof NA, Hong SM, Pramanik D, Chenna V, Karikari C, Sharma R, Goggins MG (2010): Systemic administration of polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin (NanoCurc) blocks tumor growth and metastases in preclinical models of pancreatic cancer. Mol Cancer Ther <u>9</u>, 2255-2264
- Canela N, Rodriguez-Vilarrupla A, Estanyól JM, Díaz C, Pujol MJ, Agell N, Bachs O (2003): The SET protein regulates G₂/M transition by modulating cyclin B-cyclin-dependent kinase 1 activity. J Biol Chem <u>278</u>, 1158-1164
- Castel D, Philippe C, Kergrohen T, Sill M, Merlevede J, Barret E, Puget S, Sainte-Rose C, Kramm CM, Jones C et al. (2018): Transcriptomic and epigenetic profiling of 'diffuse midline gliomas, H3 K27M-mutant' discriminate two subgroups based on the type of histone H3 mutated and not supratentorial or infratentorial location. Acta Neuropathol <u>139</u>, 1109-1113
- Chen X, Zhi F, Jia X, Zhang X, Ambardekar R, Meng Z, Paradkar AR, Hu Y, Yang Y (2013): Enhanced brain targeting of curcumin by intranasal administration of a thermosensitive poloxamer hydrogel. J Pharm Pharmacol <u>65</u>, 807-816
- Chen Y, Shu W, Chen W, Wu Q, Liu H, Cui G (2007): Curcumin, both histone deacetylase and p300/CBP-specific inhibitor, represses the activity of Nuclear Factor Kappa B and Notch 1 in Raji cells. Basic Clin Pharmacol Toxicol <u>101</u>, 427-433
- Chendil D, Ranga RS, Meigooni D, Sathishkumar S, Ahmed MM (2004): Curcumin confers radiosensitizing effect in prostate cancer cell line PC-3. Oncogene <u>23</u>, 1599-1607
- Cheng AL, Hsu CH, Lin JK, Hsu MM, Ho YF, Shen TS, Ko JY, Lin JT, Lin BR, Ming-Shiang W et al. (2001): Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. Anticancer Res <u>21</u>, 2895-2900
- Cheng KK, Yeung CF, Ho SW, Chow SF, Chow AHL, Baum L (2012): Highly stabilized curcumin nanoparticles tested in an *in vitro* blood-brain barrier model and in Alzheimer's disease Tg2576 mice. AAPS J <u>15</u>, 324-336
- Creasy CL (2017): Untangling the role of mutant histone H3 in diffuse intrinsic pontine glioma. Nat Med 23, 413-414

- Daina A, Michielin O, Zoete V (2017): SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeliness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. Sci Rep 7, 42717
- Dawson MA, Kouzarides T (2012): Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. Cell 150, 12-27
- Du WZ, Feng Y, Wang XF, Piao XY, Cui YQ, Chen LC, Lei XH, Sun X, Liu X, Wang HB et al. (2013): Curcumin suppresses malignant glioma cell growth and induces apoptosis by inhibition of SHH/GLI1 signaling pathway *in vitro* and *vivo*. CNS Neurosci Ther <u>19</u>, 926-936
- El-Khouly FE, Adil SM, Wiese M, Hulleman E, Hendrikse NH, Kaspers GJL, Kramm CM,
 Veldhuijzen van Zanten SEM, Van Vuurden DG, SIOPE DIPG Network (2021):
 Complementary and alternative medicine in children with diffuse intrinsic pontine glioma a
 SIOPE DIPG network and registry study. Pediatr Blood Cancer <u>4</u>, e29061
- Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Ropero S, Petrie K et al. (2005): Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. Nat Genet <u>37</u>, 391-400
- Frühwald MC, Witt O (2008): The epigenetics of cancer in children. Klin Padiatr 220, 333-341
- Garofalo S, D'Alessandro G, Chece G, Brau F, Maggi L, Rosa A, Porzia A, Mainiero F, Esposito V, Lauro C et al. (2015): Enriched environment reduces glioma growth through immune and nonimmune mechanisms in mice. Nat Commun <u>6</u>, 6623
- Ge SX, Jung D, Yao R (2020): ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. Bioinformatics <u>36</u>, 2628-2629
- Goldberg AD, Banaszynski LA, Noh KM, Lewis PW, Elsaesser SJ, Stadler S, Dewell S, Law M, Guo X, Li X et al. (2010): Distinct factors control histone variant H3.3 localization at specific genomic regions. Cell <u>140</u>, 678-691
- Grasso C, Tang Y, Truffaux N, Berlow NE, Liu L, Debily MA, Quist MJ, Davis LE, Huang EC, Woo PJ et al. (2015): Functionally defined therapeutic targets in diffuse intrinsic pontine glioma. Nat Med <u>21</u>, 555–559
- Greer EL, Shi Y (2012): Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. Nat Rev Genet <u>13</u>, 343-357
- Gupta M, Djalilvand A, Brat DJ (2005): Clarifying the diffuse gliomas: an update on the morphologic features and markers that discriminate oligodendroglioma from astrocytoma. Am J Clin Pathol <u>124</u>,755-768
- Gupta SC, Heva D, Patchva S, Park B, Koh W, Aggarwal BB (2012): Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer: the roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy. Antioxid Redox Signal <u>16</u>, 1295–1322

- Gupta SC, Kismali G, Aggarwal BB (2013): Curcumin, a component of turmeric: from farm to pharmacy. Biofactors <u>39</u>, 2-13
- Gupta SC, Patchva S, Aggarwal BB (2013): Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials. AAPS J <u>15</u>, 195-218
- Guzmán C, Bagga M, Kaur A, Westermarck J, Abankwa D (2014): ColonyArea: An ImageJ plugin to automatically quantify colony formation in clonogenic assays. PLoS One <u>9</u>, e92444
- Haar CP, Hebbar P, Wallace GC, Das A, Vandergrift A, Smith JA, Giglio P, Patel S, Ray SK, Banik NL (2012): Drug resistance in glioblastoma: a mini review. Neurochem Res <u>37</u>, 1192-1200
- Hargrave D; Bartels U; Bouffet E (2006): Diffuse brainstem glioma in children: critical review of clinical trials. Lancet Oncol <u>7</u>, 241-248
- Harris LW, Lockstone HE, Khaitovich P, Shannon Weickert C, Webster MJ, Bahn S (2009): Gene expression in the prefrontal cortex during adolescence: implications for the onset of schizophrenia. BMC Med Genomics <u>2</u>, 28
- Harutyunyan AS, Krug B, Chen H, Papillon-Cavanagh S, Zeinieh M, De Jay N, Deshmukh S, Chen CCL, Belle J, Mikael LG et al. (2019): H3.3K27M induces defective chromatin spread of PRC2mediated repressive H3.3K27me2/me3 and is essential for glioma tumorigenesis. Nat Commun <u>10</u>, 1262
- Hashizume R (2017): Epigenetic targeted therapy for diffuse intrinsic pontine glioma. Neurol Med Chir (Tokyo) <u>57</u>, 331-342
- Hashizume R, Andor N, Ihara Y, Lerner R, Gan H, Chen X, Fang D, Huang X, Tom MW, Ngo V et al. (2014): Pharmacologic inhibition of histone demethylation as a therapy for pediatric brainstem glioma. Nat Med <u>20</u>, 1394–1396
- Hassan F, Rehman MS, Khan MS, Ali MA, Javed A, Nawaz A, Yang C (2019): Curcumin as an alternative epigenetic modulator: mechanism of action and potential effects. Front Genet <u>10</u>, 514
- Herz HM, Morgan M, Gao X, Jackson J, Rickels R, Swanson SK, Florens L, Washbrun MP, Eissenberg JC, Shilatifard A (2014): Histone H3 lysine-to-methionine mutants as a paradigm to study chromatin signaling. Science <u>345</u>, 1065–1070
- Hoffman LM, Veldhuijzen van Zanten SEM, Colditz N, Baugh J, Chaney B, Hoffmann M, Lane A, Fuller C, Miles L, Hawkins C et al. (2018): Clinical, radiologic, pathologic and molecular characteristics of long-term survivors of diffuse intrinsic pontine glioma (DIPG): a collaborative report from the International and European Society for Pediatric Oncology DIPG registries. J Clin Oncol <u>36</u>, 1963-1972

- Holy J (2004): Curcumin inhibits cell motility and alters microfilament organization and function in prostate cancer cells. Cytoskeleton (Hoboken) <u>58</u>, 253-268
- Huang M, Liang C, Tan C, Huang S, Ying R, Wang Y, Wang Z, Zhang Y (2019): Liposome coencapsulation as a strategy for the delivery of curcumin and resveratrol. Food Funct <u>10</u>, 6447-6458
- Iacobuzio-Donahue CA (2009): Epigenetic changes in cancer. Annu Rev Pathol 4, 229-249
- Ireson C, Orr S, Jones DJL, Verschoyle R, Lim CK, Luo JL, Howells L, Plummer S, Jukes R, Williams M et al. (2001): Characterization of metabolites of the chemopreventive agent curcumin in human and rat hepatocytes and in the rat *in vivo*, and evaluation of their ability to inhibit phorbol esterinduced prostaglandin E₂ production. Cancer Res <u>61</u>, 1058-1064
- Jones C, Baker SJ (2014): Unique genetic and epigenetic mechanisms driving pediatric diffuse highgrade glioma. Nat Rev Cancer <u>14</u>, 651-661
- Justin N, Zhang Y, Tarricone C, Martin SR, Chen S, Underwood E, De Marco V, Haire LF, Walker PA, Reinberg D et al. (2016): Structural basis of oncogenic histone H3.3K27M inhibition of human polycomb repressive complex 2. Nat Commun <u>7</u>, 11316
- Kalani MYS, Cheshier SH, Cord BJ, Babebeygy SR, Vogel H, Weissman IL, Palmer TD, Nusse Roel (2008): Wnt-mediated self-renewal of neural stem/progenitor cells. Proc Natl Acad Sci U S A <u>105</u>, 16970-16975
- Kanehisa M, Goto S (2000): KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. Nucleic Acids Res <u>28</u>, 27-30
- Kang SK, Cha SH, Jeon HG (2006): Curcumin-induced histone hypoacetylation enhances caspase-3dependent glioma cell death and neurogenesis of neural progenitor cells. Stem Cells Dev <u>15</u>, 165-174
- Karremann M, Gielen G, Hoffmann M, Wiese M, Colditz N, Warmuth-Metz M, Bison B, Claviez A, Van Vuurden DG, Von Bueren AO et al. (2018): Diffuse high-grade gliomas with H3 K27M mutations carry a dismal prognosis independent of tumor location. Neuro Oncol <u>20</u>, 123-131
- Kasper LH, Baker SJ (2020): Invited review: emerging functions of histone H3 mutations in paediatric diffuse high-grade gliomas. Neuropathol Appl Neurobiol <u>46</u>, 73-85
- Kaur H, He B, Zhang C, Rodriguez E, Hage DS, Moreau R (2018): Piperine potentiates curcuminmediated repression of mTORC1 signaling in human intestinal epithelial cells: implications for the inhibition of protein synthesis and TNFα signaling. J Nutr Biochem <u>57</u>, 276-286
- Khaw AK, Hande MP, Kalthur G, Hande MP (2013): Curcumin inhibits telomerase and induces telomere shortening and apoptosis in brain tumor cells. J Cell Biochem <u>114</u>, 1257-1270

- Khuong-Quang DA; Buczkowicz, P; Rakopoulos, P; Liu XY; Fontebasso AM.; Bouffet E., Bartels U, Albrecht S, Schwartzentruber J, Letourneau L et al. (2012): K27M mutation in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. Acta Neuropathol <u>124</u>, 439–447
- Kim HI, Huang H, Cheepala S, Huang S, Chung J (2008): Curcumin inhibition of Integrin ($\alpha_6\beta_4$)dependent breast cancer cell motility and invasion. <u>1</u>, 385-391
- Kluiver TA, Alieva M, van Vuurden DG, Wehrens EJ, Rios AC (2020): Invaders exposed: understanding and targeting tumor cell invasion in diffuse intrinsic pontine glioma. Front Oncol <u>10</u>, 92
- Komori T (2017): The 2016 WHO classification of tumours of the central nervous system: the major points of revision. Neurol Med Chir (Tokyo) <u>57</u>, 301-311
- Kubiak K (2019): Identification of the genetic mechanisms linked to the occurence of H3.3K27M mutation in pediatric diffuse intrinsic pontine glioma. Masterarbeit, Biologische und Psychologische Fakultät, Georg-August Universität Göttingen 2019
- Kubiak K: Characterisation of the biological and gene-regulatory effects of Histone 3.3K27Mmutation in DIPG. Biolog. Promotionsarbeit an der Universitätsmedizin Göttingen (in Vorbereitung, Publikation voraussichtlich 2023, mit freundlicher Genehmigung der Verfasserin)
- Kumirova E, Emtsova V, Ozerov S, Tereschenko G, Artemov A, Nechesnyuk A, Mushindkaya M, Nikonova O, Minkina L, Gerbek I et al. (2019): DIPG-20. Diffuse intrinsic pontine glioma in children. Results of analyses in the multicenter retrospective study. Neuro Oncol <u>21</u>, 72-73
- Kunnumakkara AB, Bordoloi D, Harsha C, Banik K, Gupta SC, Aggarwal BB (2017): Curcumin mediates anticancer effects by modulating multiple cell signaling pathways. Clin Sci (Lond) <u>131</u>, 1781-1799
- Lao CD, Ruffin IV MT, Normolle D, Heath DD, Murray SI, Bailey JM, Boggs ME, Crowell J, Rock CL, Brenner DE (2006): Dose escalation of a curcuminoid formulation. BMC Complement Altern Med <u>6</u>, 10
- Lee SJ, Krauthauser C, Maduskuie V, Fawcett PT, Olson JM, Rajasekaran SA (2011): Curcumininduced HDAC-inhibition and attenuation of medulloblastoma growth in vitro and in vivo. BMC Cancer <u>11</u>, 144
- Lewis PW, Müller MM, Koletsky MS, Cordero F, Lin S, Banaszynski LA, Garcia BA, Muir TW, Becher OJ und David Allis C (2013): Inhibition of PRC2 activity by a gain-of-function H3 mutation found in pediatric glioblastoma. Science <u>340</u>, 857-861
- Lim KJ, Bisht S, Bar EE, Maitra A, Eberhart CG (2011): A polymeric nanoparticle formulation of curcumin inhibits growth, clonogenicity and stem-like fraction in malignant brain tumors. Cancer Biol Ther <u>11</u>, 464-473

- Liu E, Wu J, Cao W, Zhang J, Liu W, Jiang X, Zhang X (2007): Curcumin induces G2/M cell cycle arrest in a p53-dependent manner and upregulates ING4 expression in human glioma. J Neurooncol <u>85</u>, 263-270
- Liu W, Zhai Y, Heng X, Che FY, Chen W, Sun D, Zhai G (2016): Oral bioavailability of curcumin: problems and advancements. J Drug Target <u>24</u>, 694–702
- Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler O, Kleihues P, Ellison DW (2016): The 2016 World Health Organisation classification of tumors of the central nervous system: a summary. Acta Neuropathol <u>131</u>, 803-820
- MacDonald TJ, Aguilera D, Kramm CM (2011): Treatment of high-grade glioma in children and adolescents. Neuro Oncol <u>13</u>, 1049-1058
- Margueron R, Reinberg D (2011): The polycomb complex PRC2 and its mark in life. Nature <u>469</u>, 343– 349
- Meel MH, Schaper SA, Kaspers GJL, Hulleman E (2018): Signaling pathways and mesenchymal transition in pediatric high-grade glioma. Cell Mol Life Sci <u>75</u>, 871-887
- Messaoudi K; Clavreul A, Lagarce F (2015): Toward an effective strategy in glioblastoma treatment. Part I: resistance mechanisms and strategies to overcome resistance of glioblastoma to temozolomide. Drug Discov Today <u>20</u>, 899-905
- Minafra L, Porcino N, Bravatà V, Gaglio D, Bonanomi M, Amore E, Cammarata FP, Russo G, Militello C, Savoca G (2019): Radiosensitizing effect of curcumin-loaded nanoparticles in breast cancer cells. Sci Rep <u>9</u>, 11134
- Monje M, Mitra SS, Freret ME, Raveh TB, Kim J, Masek M, Attema JL, Li G, Haddix T, Edwards MSB et al. (2011): Hedgehog-responsive candidate cell of origin for diffuse intrinsic pontine glioma. Proc Natl Acas Sci U S A <u>108</u>, 4453-4458
- Morales La Madrid A, Hashizume R, Kieran MW (2015): Future clinical trials in DIPG: bringing epigenetics to the clinic. Front Oncol <u>5</u>, 148
- Moustapha A, Pérétout PA, Rainey NE, Sureau F, Geze M, Petit JM, Dewailly E, Slomianny C, Petit PX (2015): Curcumin induces crosstalk between autophagy and apoptosis mediated by calcium release from the endoplasmic reticulum, lysosomal destabilization and mitochondrial events. Cell Death Discov <u>1</u>, 15017
- Nagaraja S, Vitanza NA, Woo PJ, Taylor KR, Liu F, Zhang L, Li M, Meng W, Ponnuswami A, Sun W et al. (2017): Transcriptional dependencies in diffuse intrinsic pontine glioma. Cancer Cell <u>31</u>, 635-652

- Oehme I, Deubzer HE, Wegener D, Pickert D, Linke JP, Hero B, Kopp-Schneider A, Westermann F, Ulrich SM, von Deimling A et al. (2009): Histone deacetylase 8 in neuroblastoma tumorigenesis. Clin Cancer Res <u>15</u>, 91-99
- Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, Liu M, Blanda R, Kromer C, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS (2015): CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2008-2012, Neuro Oncol <u>17</u>, 1-62
- Panahi Y, Sadaat A, Beiraghdar F, Sahebkar A (2014): Adjuvant therapy with bioavailibility-boosted curcuminoids suppresses systemic inflammation and improves quality of life in patients with solid tumors: a randomized double-blind placebo-controlled trial. Phytother Res <u>28</u>, 1461-1467
- Panditharatna E, Yeager K, Kilburn LB, Packer RJ, Nazarian J (2015): Clinicopathology of diffuse intrinsic pontine glioma and its redefined genomic and epigenomic landscape. Cancer Genet <u>208</u>, 367-373
- Park W, Amin ARMR, Chen ZG, Shin DM (2013): New perspectives of curcumin in cancer prevention. Cancer Prev Res <u>6</u>, 387-400
- Paugh BS, Qu C, Jones C, Liu Z, Adamovicz-Brice M, Zhang J, Bax DA, Coyle B, Barrow J, Hargrave D et al. (2010): Integrated molecular genetic profiling of pediatric high-grade gliomas reveals key differences with the adult disease. J Clin Oncol <u>28</u>, 3061-3068
- Paugh BS, Broniscer A, Qu C, Miller CP, Zhang J, Tatevossian RG, Olson JM, Geyer JR, Chi SN, Da Silva NS et al. (2011): Genome-wide analyses identify recurrent amplifications of receptor tyrosine kinases and cell-cycle regulatory genes in diffuse intrinsic pontine glioma. J Clin Oncol <u>29</u>, 3999-4006
- Perry MC, Demeule M, Régina A, Moumdjian R, Béliveau R (2010): Curcumin inhibits tumor growth and angiogenesis in glioblastoma xenografts. Mol Nutr Food Res <u>54</u>, 192-201
- Piunti. A, Hashizume R, Morgan MA, Bartom ET, Horbinski CM, Marshall SA, Rendleman EJ, Ma Q, Takahashi YH, Woodfin AR et al. (2018): Therapeutic targeting of polycomb and BET bromodomain proteins in diffuse intrinsic pontine gliomas. Nat Med <u>23</u>, 493–500
- Pohlmeier B: Complementary medicine treatment options for children with diffuse intrinsic pontine glioma. Med. Diss. Göttingen (in Vorbereitung, mit freundlicher Genehmigung der Verfasserin)
- Prasad S, Tyagi AK, Aggarwal BB (2014): Recent developments in delivery, bioavailibility, absorption and metabolism of curcumin: the golden pigment from golden spice. Cancer Res Treat <u>46</u>, 2-18
- Rainey NE, Moustapha A, Saric A, Nicolas G, Sureau F, Petit PX (2019): Iron chelation by curcumin suppresses both curcumin-induced autophagy and cell death together with iron overload neoplastic transformation. Cell Death Discov <u>5</u>, 150

- Ramaswamy V, Remke M; Taylor M (2014): An epigenetic therapy for diffuse intrinsic pontine gliomas. Nat Med <u>20</u>, 1378–1379
- Rickert CH, Sträter R, Kaatsch P, Wassmann H, Jürgens H, Dockhorn-Dworniczak B, Paulus W (2001): Pediatric high-grade astrocytomas show chromosomal imbalances distinct from adult cases. Am J Pathol <u>158</u>, 1525-1532
- Ryu MJ, Cho M, Song JY, Yun YS, Choi IW, Kim DE, Park BS, Oh S (2008): Natural derivatives of curcumin attenuate the Wnt/β-catenin pathway through down-regulation of the transcriptional coactivator p300. Biochem Biophys Res Commun <u>377</u>, 1304-1308
- Sandur SK, Pandey MK, Sung B, Ahn KS, Murakami A, Sethi G, Limtrakul P, Badmaev V, Aggarwal BB (2007): Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin and turmerones differentially regulate anti-inflammatory and anti-proliferative responses through a ROS-independent mechanism. Carcinogenesis <u>28</u>, 1765–1773
- Satoru O, Van Meir EG (2017): Overcoming therapeutic resistance in glioblastoma: the way forward. J Clin Invest <u>127</u>, 415-426
- Schraufstatter E, Bernt H (1949): Antibacterial action of curcumin and related compounds. Nature <u>164</u>, 456
- Schwartzentruber J, Korshunov A, Liu XY, Jones DT, Pfaff E, Jacob K, Sturm D, Fontebasso AM, Khuong-Quang DA, Tönjes M et al. (2012): Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in pediatric glioblastoma. Nature <u>482</u>, 226-231
- Schwarz K, Dobiasch S, Nguyen L, Schilling D, Combs SE (2020): Modification of radiosensitivity by curcumin in human pancreatic cancer cell lines. Sci Rep <u>10</u>, 3815
- Seo SU, Woo SM, Lee HS, Kim SH, Min KJ, Kwon TK (2018): mTORC1/2 inhibitor and curcumin induce apoptosis through lysosomal membrane permeabilization-mediated autophagy. Oncogene <u>37</u>, 5205-5220
- Shakeri A, Cicero AFG, Panahi Y, Mohajeri M, Sahebkar A (2018): Curcumin: a naturally occuring autophagy modulator. J Cell Physiol <u>234</u>, 5643-5654
- Shen L, Liu CC, An CY, Ji HF (2016): How does curcumin work with poor bioavailability? Clues from experimental and theoretical studies. Sci Rep <u>6</u>, 20872
- Shinde RL, Devarajan PV (2017): Docosahexaenoic acid-mediated, targeted and sustained brain delivery of curcumin microemulsion. Drug Deliv <u>24</u>, 152-161
- Shishodia S (2012): Molecular mechanisms of curcumin action: gene expression. Biofactors 39, 37-55
- Shishodia S, Sethi G, Aggarwal BB (2005): Curcumin: getting back to the roots. Ann N Y Acad Sci <u>1056</u>, 206-217

- Shoba G, Joy D, Joseph T, Majeed M, Rajendran R, Srinivas PS (1998): Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. Planta Med <u>64</u>, 353-356
- Sordillo LA, Sordillo PP, Helson L (2015): Curcumin for the treatment of glioblastoma. Anticancer Res <u>35</u>, 6373-6378
- Stupp R, Brada M, van den Bent MJ, Tonn JC (2014): High-grade glioma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol <u>352</u>, 93–101
- Sturm D, Witt H, Hovestadt V, Khuong-Quang DA, Jones DTW, Konermann C, Pfaff E, Tönjes M, Sill M, Bender S et al. (2012): Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. Cancer Cell <u>22</u>, 425–437
- Sturm D, Bender S, Jones DTW, Lichter P, Grill J, Becher O, Hawkins C, Majewski J, Jones C, Costello JF et al. (2014): Paediatric and adult glioblastoma: multiform (epi)genomic culprits emerge. Nat Rev Cancer <u>14</u>, 92–107
- Sun M, Estrov Z, Ji Y, Coombes KR, Harris DH, Kurzrock R (2008): Curcumin (diferuloylmethane) alters the expression profiles of microRNAs in human pancreatic cancer cells. Mol Cancer Ther <u>7</u>, 464–473
- Syng-Ai, C, Kumari AL, Khar A (2004): Effect of curcumin on normal and tumor cells: role of glutathione and bcl-2. Mol Cancer Ther <u>3</u>, 1101–1108
- Tanida I, Ueno T, Kominami E (2008): LC3 and autophagy. Methods Mol Biol 445, 77-88
- Tessarz P, Kouzarides T (2014): Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. Nat Rev Mol Cell Biol <u>15</u>, 703–708
- Thapliyal R, Maru GB (2001): Inhibition of cytochrome P450 isozymes by curcumins in vitro and in vivo. Food Chem Toxicol <u>39</u>, 541-547
- Theppawong A, Van de Walle T, Grootaert C, Van Hecke K, Catry N, Desmet T, Van Camp J, D'Hooghe M (2018): Synthesis of non-symmetrical nitrogen-containing curcuminoids in the pursuit of new anticancer candidates. ChemistryOpen <u>8</u>, 236-247
- Theppawong A, Van de Walle T, Grootaert C, Bultinck M, Desmet T, Van Camp J, D'Hooghe M (2018): Synthesis of novel aza-aromatic curcuminoids with improved biological activities towards various cancer cell lines. ChemistryOpen <u>7</u>, 381-392
- Theppawong A, Van de Walle T, Van Hecke K, Grootaert C, Van Camp J, D'Hooghe M (2019): Synthesis of 1,4-thiazepane-based curcuminoids with promising anticancer activity. Chemistry <u>25</u>, 12583-12600
- Thresiamma KC, George J, Kuttan R (1996): Protective effect of curcumin, ellagic acid and bixin on radiation induced toxicity. Indian J Exp Biol <u>34</u>, 845-847

- Thresiamma KC, George J, Kuttan R (1998): Protective effect of curcumin, ellagic acid and bixin on radiation induced genotoxicity. J Exp Clin Cancer Res <u>17</u>, 431-434
- Tolcher AW, Gerson SL, Denis L et al. (2003): Marked inactivation of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity with protracted temozolomide schedules. Br J Cancer <u>88</u>, 1004-1011
- Ubeyitogullari A, Ciftci ON (2019): A novel green nanoparticle formation approach to forming lowcrystallinity curcumin nanoparticles to improve curcumin's bioaccessibility. Sci Rep <u>9</u>, 19112
- Vallée A, Lecarpentier Y, Guillevin R, Vallée JN (2018): Opposite interplay between the canonical WNT/ß-catenin pathway and PPAR gamma: a potential therapeutic target in gliomas. Neurosci Bull <u>34</u>, 573-588
- Vanan MI, Eisenstat DD (2015): DIPG in children what can we learn from the past? Front Oncol <u>5</u>, 237
- Vervoorts J, Lüscher-Firzlaff JM, Rottmann S, Lilischkis R, Walsemann G, Dohmann K, Austen M, Lüscher B (2003): Stimulation of c-MYC transcriptional activity and acetylation by recruitment of the cofactor CBP. EMBO Rep <u>4</u>, 484-490
- Von Bueren AO; Wiese M; Gielen G; Kramm CM (2017): Maligne Gliome: Therapieoptionen bei Kindern und Jugendlichen. TumorDiagn u Ther <u>38</u>, 172–177
- Von Bueren AO, Karremann M, Gielen GH, Benesch M, Fouladi M, van Vuurden DG, Veldhuijzen van Zanten SEM, Hoffman LM, Kramm CM (2018): A suggestion to introduce the diagnosis of "diffuse midline glioma of the pons, H3 K27 wildtype (WHO grade IV)". Acta Neuropathol <u>136</u>, 171-173
- Wahlström BO, Blennow G (1978): A study on the fate of curcumin in the rat. Acta Pharmacol Toxicol (Copenh) <u>43</u>, 86-92
- Wang L, Ye X, Cai X, Su J, Ma R, Yin X, Zhou X, Li H, Wang Z (2015): Curcumin suppresses cell growth and invasion and induces apoptosis by down-regulation of Skp2 pathway in glioma cells. Oncotarget <u>6</u>, 18027-18037
- Wang Q, Fan H, Liu Y, Yin Z, Cai H, Liu J, Zhiyuan W, Shao M, Sun X, Diao J et al. (2014): Curcumin enhances the radiosensitivity in nasopharyngeal carcinoma cells involving the reversal of differentially expressed long non-coding RNAs. Int J Oncol <u>44</u>, 858–864
- Wang S, Chen P, Zhang L, Yang C, Zhai G (2012): Formulation and evaluation of microemulsionbased in situ ion-sensitive gelling systems for intranasal administration of curcumin. J Drug Target <u>20</u>, 831-840
- Wang SH, Lin PY, Chiu YC, Huang JS, Kuo YT, Wu J, Chen CC (2015): Curcumin-mediated HDAC inhibition suppresses the DNA damage response and contributes to increased DNA damage sensitivity. PLoS One <u>10</u>, e0134110

- Wang X, Wang K, Han L, Zhang A, Shi Z, Zhang K, Zhang H, Yang S, Pu P, Shen C et al. (2013): PRDM1 is directly targeted by miR-30a-5p and modulates the Wnt/ß-catenin pathway in a Dkk1dependent manner during glioma growth. Cancer Lett <u>331</u>, 211-219
- Warren KE (2012): Diffuse intrinsic pontine glioma: poised for progress. Front Oncol 2, 205
- Wiese M, Walther N, Diederichs C, Schill F, Monecke S, Salinas G, Sturm D, Pfister SM, Dressel R, Johnsen SA et al. (2017): The ß-catenin/CBP-antagonist ICG-001 inhibits pediatric glioma tumorigenicity in a Wnt-independent manner. Oncotarget <u>8</u>, 27300-27313
- Wiese M, Hamdan FH, Kubiak K, Diederichs C, Gielen GH, Nussbaumer G, Carcaboso AM, Hulleman E, Johnsen AJ, Kramm CM (2020): Combined treatment with CBP and BET inhibitors reverses inadvertent activation of detrimental super enhancer programs in DIPG cells. Cell Death Dis <u>11</u>, 673
- Williams MJ, Singleton WGB, Lowis SP, Malik K, Kurian KM (2017): Therapeutic targeting of histone modifications in adult and pediatric high-grade glioma. Front Oncol <u>7</u>, 45
- Wu G, Broniscer A, McEachron TA, Lu C, Paugh BS, Becksfort J, Qu C, Ding L, Huether R, Parker M et al. (2012): St. Jude Children's Research Hospital–Washington University pediatric cancer genome project. (2012): somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas. Nat Genet <u>44</u>, 251-253
- Wungki P, Amin ARMR, Chen ZG, Shin DM (2013): New perspectives of curcumin in cancer prevention. Cancer Prev Res (Phila) <u>6</u>, 387-400
- Yakovlev PI, Lecours AR: The myelogenetic cycles of regional maturation of the brain. In: Minkowsky A (Hrsg.): Regional development of the brain in early life. Blackwell Scientific Publications, Oxford 1967
- Yang H, Fan S, An Y, Wang X, Pan Y, Xiaokaiti Y, Duan J, Li X, Tie L, Ye M et al. (2016):
 Bisdemethoxycurcumin exerts pro-apoptotic effects in human pancreatic adenocarcinoma cells through mitochondrial dysfunction and a GRP78-dependent pathway. Oncotarget <u>7</u>, 83641-83656
- Yin H, Zhou Y, Wen C, Zhou C, Zhang W, Hu X, Wang L, You Y, Shao J (2014): Curcumin sensitizes glioblastoma to temozolomide by simultaneously generating ROS and disrupting AKT7mTOR signaling. Oncol Rep <u>32</u>, 1610-1616
- Zanotto-Filho A, Braganhol E, Klafke K, Figueiro F, Terra SR, Paludo FJ, Morrone M, Bristot IJ, Battastini AM, Forcelini CM et al. (2015): Autophagy inhibition improves the efficacy of curcumin/temozolomide combination therapy in glioblastoma. Cancer Lett <u>358</u>, 220-231
- Zhang L, Zhu W, Yang C (2012): A novel folate-modified self-microemulsifying drug delivery system of curcumin for colon targeting. Int J Nanomedicine <u>7</u>, 151-162

- Zhang L, Yang G, Zhang R, Dong L, Chen H, Bo J, Xue W, Huang Y (2018): Curcumin inhibits cell proliferation and motility via suppression of TROP2 in bladder cancer cells. Int J Oncol <u>53</u>, 515-526
- Zhang T; Cooper S; Brockdorff N (2015): The interplay of histone modifications writers that read. EMBO Rep <u>16</u>, 1467–1481

Danksagung

Mein Dank gilt allen voran Professor Dr. med. Kramm, der sich von meinem Interesse an seinem Fachgebiet überzeugen ließ und mich im Verlauf des Projekts stets als Ansprechpartner unterstützte.

Von Herzen danke ich der gesamten Arbeitsgruppe Kramm unter der Leitung von Dr. Maria Wiese, deren Tür bei jeglichen Problemen immer offenstand: Maria Wiese, Anke Herbst, Klaudia Kubiak und Lennart Diskowski – ich weiß nicht, was ich ohne euch und eure professionelle sowie mentale Unterstützung gemacht hätte.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. med. Elisabeth Heßmann, meiner Zweitbetreuerin, für ihre sympathische Art, die guten Ratschläge und die professionelle Unterstützung, die ich sehr zu schätzen weiß.

Auch unseren Kooperationspartnern gilt Dank: Dr. Niklas Engels aus der Abteilung Immunologie der Universitätsmedizin Göttingen für die Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der PI-FACS-Analysen sowie Dr. Gabriela Salinas-Riester und ihrem Team der NGS-Serviceeinrichtung für Integrative Genomik der Universitätsmedizin Göttingen für die Unterstützung bei der Durchführung und Analyse der mRNA-Sequenzierung.