

# **Therapieabhängige Veränderung von Ferroptosemarkern in Glioblastomen nach Temozolomid-Behandlung**

Helena Agathe Christa Lydia Kram

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health  
der Technischen Universität München zur Erlangung einer

Doktorin der Medizin (Dr. med.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: apl. Prof. Dr. Ute Reuning

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Jürgen Schlegel
2. apl. Prof. Dr. Friederike Schmidt-Graf
3. apl. Prof. Dr. Rüdiger Ilg

Die Dissertation wurde am 10.07.2024 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die TUM School of Medicine and Health am 30.04.2025  
angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

|                                                                  |           |
|------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Problemstellung.....</b>                                   | <b>1</b>  |
| <b>2. Zielsetzung.....</b>                                       | <b>1</b>  |
| <b>3. Einleitung.....</b>                                        | <b>2</b>  |
| 3.1 <i>Das Glioblastoma multiforme</i> .....                     | 2         |
| 3.1.1    Epidemiologie .....                                     | 2         |
| 3.1.2    Risikofaktoren .....                                    | 3         |
| 3.1.3    Die ZNS-WHO-Klassifikation.....                         | 4         |
| 3.1.4    Makroskopie und Histologie .....                        | 6         |
| 3.1.5    Molekulare Marker .....                                 | 6         |
| 3.1.6    ALDH1A3 und GBM-Stammzellen .....                       | 9         |
| 3.1.7    Diagnostik .....                                        | 10        |
| 3.1.8    Klinik.....                                             | 11        |
| 3.1.9    Therapie .....                                          | 11        |
| 3.1.10    Neue Therapie-Ansätze.....                             | 14        |
| 3.2 <i>Ferroptose</i> .....                                      | 15        |
| 3.2.1    Abgrenzung gegenüber anderen Formen des Zelltodes ..... | 15        |
| 3.2.2    Historischer Überblick.....                             | 16        |
| 3.2.3    Molekulare Mechanismen und Regulatoren .....            | 17        |
| 3.2.4    Ferroptosemarker .....                                  | 22        |
| 3.2.5    Therapiemöglichkeiten .....                             | 22        |
| 3.2.6    Ansatz in Bezug auf GBM und TMZ.....                    | 25        |
| <b>4. Material und Methodik.....</b>                             | <b>27</b> |
| 4.1 <i>Material</i> .....                                        | 27        |
| 4.1.1    Patientenkollektiv .....                                | 27        |
| 4.2 <i>Methoden</i> .....                                        | 29        |
| 4.2.1    Fertigen der Schnitte .....                             | 29        |
| 4.2.2    Immunhistochemie .....                                  | 29        |
| 4.2.3    Immunfluoreszenz .....                                  | 30        |
| 4.3 <i>Statistische Auswertung</i> .....                         | 33        |
| <b>5. Ergebnisse.....</b>                                        | <b>34</b> |

|       |                                                                                      |            |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.1   | <i>Immunhistochemischer Nachweis der Proteine GPX4, ACSL4, FSP1 und ALDH1A3.....</i> | 34         |
| 5.1.1 | GPX4-Expression sinkt im Rezidiv .....                                               | 36         |
| 5.1.2 | ACSL4-Expression steigt im Rezidiv.....                                              | 37         |
| 5.1.3 | FSP1.....                                                                            | 38         |
|       | ALDH1A3-Expression steigt im Rezidiv .....                                           | 40         |
| 5.2   | <i>TCGA Daten Analyse .....</i>                                                      | 41         |
| 5.3   | <i>Ko-Expressionsanalyse mit Doppelimmunfluoreszenz .....</i>                        | 42         |
| 5.3.1 | Anteil der Ferroptose-assoziierten Proteine an den Zellmarkern.....                  | 44         |
| 5.3.2 | Anteil der Zellmarker an den Ferroptose-assoziierten Markern .....                   | 45         |
| 5.4   | <i>ACSL4 und GPX4 Doppelimmunfluoreszenz .....</i>                                   | 47         |
| 5.5   | <i>Einfluss auf das Gesamtüberleben.....</i>                                         | 49         |
| 5.6   | <i>Korrelation .....</i>                                                             | 51         |
| 6.    | <b>Diskussion.....</b>                                                               | <b>52</b>  |
| 7.    | <b>Zusammenfassung .....</b>                                                         | <b>58</b>  |
| 8.    | <b>Reagenzien- und Geräte-Verzeichnis.....</b>                                       | <b>61</b>  |
| 8.1.1 | Chemikalien und Reagenzien .....                                                     | 61         |
| 8.1.2 | Kits .....                                                                           | 62         |
| 8.1.3 | Geräte und Verbrauchsmaterialien .....                                               | 63         |
| 8.1.4 | Pufferlösungen.....                                                                  | 64         |
| 9.    | <b>Tabellenverzeichnis .....</b>                                                     | <b>65</b>  |
| 10.   | <b>Abbildungsverzeichnis .....</b>                                                   | <b>66</b>  |
| 11.   | <b>Literaturverzeichnis .....</b>                                                    | <b>68</b>  |
| 12.   | <b>Publikation .....</b>                                                             | <b>84</b>  |
| 13.   | <b>Abkürzungen .....</b>                                                             | <b>98</b>  |
| 14.   | <b>Danksagung .....</b>                                                              | <b>102</b> |

*Meinen Eltern und meinen Schwestern*

Die Resultate der vorliegenden Arbeit wurden vorab in dem „peer-reviewed“, pubmed-gelisteten Fachjournal „Frontiers in Oncology“ publiziert:

Kram, H., Prokop, G., Haller, B., Gempt, J., Wu, Y., Schmidt-Graf, F., Schlegel, J., Conrad, M., & Liesche-Starnecker, F. (2022a). Glioblastoma Relapses Show Increased Markers of Vulnerability to Ferroptosis. *Frontiers in Oncology*, 12, 841418. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.841418>

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation entsprechen den Analysen in der oben genannten Publikation, die im Rahmen dieser Arbeit entstanden ist. Die in der Publikation verwendeten Grafiken wurden unter „CC BY“-Bedingungen publiziert. Somit ist eine Re-Publikation im Rahmen dieser Arbeit erlaubt und ein Verweis liegt in der jeweiligen Bildunterschrift vor. Die Publikation befindet sich am Ende der Arbeit.

# 1. Problemstellung

Glioblastome gehören zu den häufigsten malignen Hirntumoren weltweit. Trotz intensiver wissenschaftlicher Forschung zu verbesserten Therapie-Ansätzen über die letzten Jahre ist die Prognose sehr schlecht. Deswegen beschäftigt sich diese Dissertation mit dem neu beschriebenen Zelltod Ferroptose und dessen Zusammenhang mit Glioblastomen, um einen neuen Therapieansatz zu untersuchen.

# 2. Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, festzustellen, ob Ferroptose in Glioblastomen unter Radiochemotherapie stattfindet und damit neue Ansätze in der Therapie von Glioblastomen bieten könnte. Dafür wurde das Expressionsverhalten der Ferroptosemarker Glutathionperoxidase 4 (GPX4) und Acyl-CoA-Synthetase 4 (ACSL4) zwischen Primär- und Rezidivtumor nach stattgefundener Radiochemotherapie untersucht.

Für den Ferroptose-Nachweis in Glioblastomen wurden Paraffin-fixierte Schnitte von primären Glioblastomen und Rezidiven der entsprechenden Patienten und Patientinnen mit Ferroptose-Markern immunhistochemisch getestet, um Unterschiede vor und nach der Therapie zu analysieren. Die verwendeten Ferroptose-Marker waren Antikörper der Proteine ACSL4 und GPX4. Um eine Zelldifferenzierung zu ermöglichen und eine Aussage treffen zu können, in welchen Zellen Ferroptose stattfindet, wurde als weitere Methode die Doppel-Immunfluoreszenz hinzugezogen. Die verwendeten Zellmarker waren das gliale fibrilläre saure Protein (GFAP), das von Tumorzellen und Astrozyten exprimiert wird, und das ionisierte Calcium-bindende Adapter-Molekül 1 (Iba1), das von Mikroglia-Zellen exprimiert wird (Goyal et al., 2015; Korzhevskii & Kirik, 2016). Zusätzlich wurde die Entwicklung der Proteine FSP1 und ALDH1A3 zwischen Primärtumor und Rezidiv immunhistochemisch explorativ untersucht.

Hypothesen mit entsprechenden Nullhypothesen bezüglich des Expressionsverhalten der Proteine wurden formuliert.

## 3. Einleitung

### 3.1 Das Glioblastoma multiforme

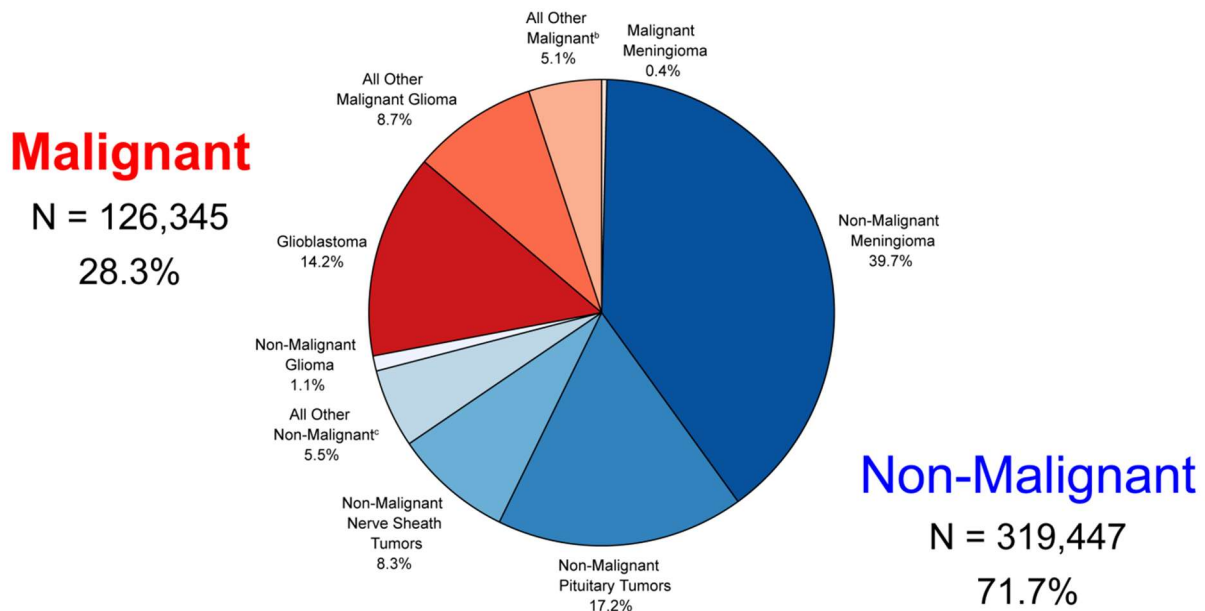
Der Begriff „Gliome“ wurde von Rudolf Virchow in seinen Vorlesungen „Die Krankhaften Geschwülste“ das erste Mal 1862 erwähnt und der beschriebene Tumor auf Gliazellen zurückgeführt (Virchow, 1862-1863). Etwa 60 Jahre später, wurde der Begriff „Glioblastoma multiforme“ (GBM) im Jahr 1926 das erste Mal von Percival Bailey und Harvey Cushing benutzt und klassifiziert (Bailey & Cushing, 1926). Das GBM unterscheidet sich von den anderen Gliomen vor allem durch Infiltration des benachbarten Gewebes, hohe Proliferationsrate und Heterogenität (Liesche-Starnecker et al., 2020; Urbańska et al., 2014). Auf diese Charakteristika können das reduzierte Gesamtüberleben und die Therapieresistenz zurückgeführt werden (Chang et al., 2007; Lee et al., 2017; Liesche-Starnecker et al., 2020; Urbańska et al., 2014). Das GBM entwickelt sich bei 25% der Patienten und Patientinnen im Frontal-, 20% im Temporal-, 13% im Parietal- und 3% im Okzipitallappen (Davis, 2016).

#### 3.1.1 Epidemiologie

Mit 14,3% aller primären Tumoren des zentralen Nervensystems (ZNS) und 49,1% aller primären malignen Hirntumoren ist das Glioblastom der häufigste maligne und der dritt häufigste Hirntumor insgesamt in den USA (**Abbildung 1**) (Ostrom et al., 2022). Die Alters-angepasste Inzidenz für GBM liegt pro Jahr bei 3,23 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner (Ostrom et al., 2022). Da vor allem ältere Menschen zwischen 65 und 75 betroffen sind, ist das Alter ein signifikanter prognostischer Faktor (Colopi et al., 2023). Männer haben mit einem Verhältnis von 1,6:1 ein höheres Risiko als Frauen, ein GBM zu bekommen. Des Weiteren ist die kaukasische Bevölkerung fast doppelt so häufig wie die schwarze und asiatische Bevölkerung betroffen (Ostrom et al., 2022). Das mediane Überleben liegt bei acht Monaten, die mittlere Überlebenszeit nach kombinierter Radiochemotherapie beträgt 12,1 bis 14,6 Monate und das Fünf-Jahres Überleben liegt bei 6,8% (Ostrom et al., 2022; Poon et al., 2020; Thakkar et al., 2014).

### Abbildung 1 Die Verteilung der Tumore des zentralen Nervensystems

Die Verteilung der primären Hirntumore und anderer Tumore des zentralen Nervensystems laut einer statistischen Analyse der zentralen Hirntumor Registers der Vereinigten Staaten von 2014 bis 2018 (CBTRUS) (N = 431.773) (aus: Ostrom et al., 2022, S.v20).



### 3.1.2 Risikofaktoren

Eine kausale Ursache für die Entstehung des Tumors ist bisher nicht bekannt. Während ionisierende Strahlung, zum Beispiel im Rahmen einer Bestrahlung, einen Risikofaktor für ZNS-Tumore darstellt, wurde kein eindeutiger Zusammenhang zwischen nicht-ionisierender Strahlung, wie zum Beispiel Handystrahlung, und Gliomen nachgewiesen (Braganza et al., 2012; Ostrom et al., 2014; Yamanaka et al., 2018). Potenziell gefährliche Chemikalien, die in Zusammenhang mit Gliomen stehen, sind Pestizide, polyzyklische Aromate und Lösungsmittel (Urbańska et al., 2014).

Zudem wird ein vermehrtes Auftreten von Gliomen in Zusammenhang mit seltenen genetischen Syndromen, wie dem Li-Fraumeni-Syndrom, dem Turcot-Syndrom und der Neurofibromatose 1 und 2 beobachtet (Farrell & Plotkin, 2007; Urbańska et al., 2014). Dahingegen werden bei Patienten und Patientinnen, die an Atopien oder Allergien leiden, seltener Gliome diagnostiziert (Amirian et al., 2016; Linos et al., 2007). Sie haben ein 20 bis 40% geringeres Risiko Gliome zu entwickeln (Amirian et al., 2016).

### 3.1.3 Die ZNS-WHO-Klassifikation

Hirntumore wurden bis 2016 vor allem anhand ihrer Histopathologie und klinischen Parametern unterschieden. Da die Molekulargenetik eine immer größere Rolle in der Diagnostik einnimmt, legte das Konsortiums zur Informierung über molekulare und praktische Herangehensweisen über ZNS-Tumore (cIMPACT NOW) einen Vorschlag für eine neue Klassifizierung im Januar 2022 vor (Brat et al., 2020). Auf dessen Basis erneuerte die Welt-Gesundheits-Organisation (WHO) 2021 unter Berücksichtigung dieser die Klassifikation der Hirntumore (Louis et al., 2016; Louis et al., 2021).

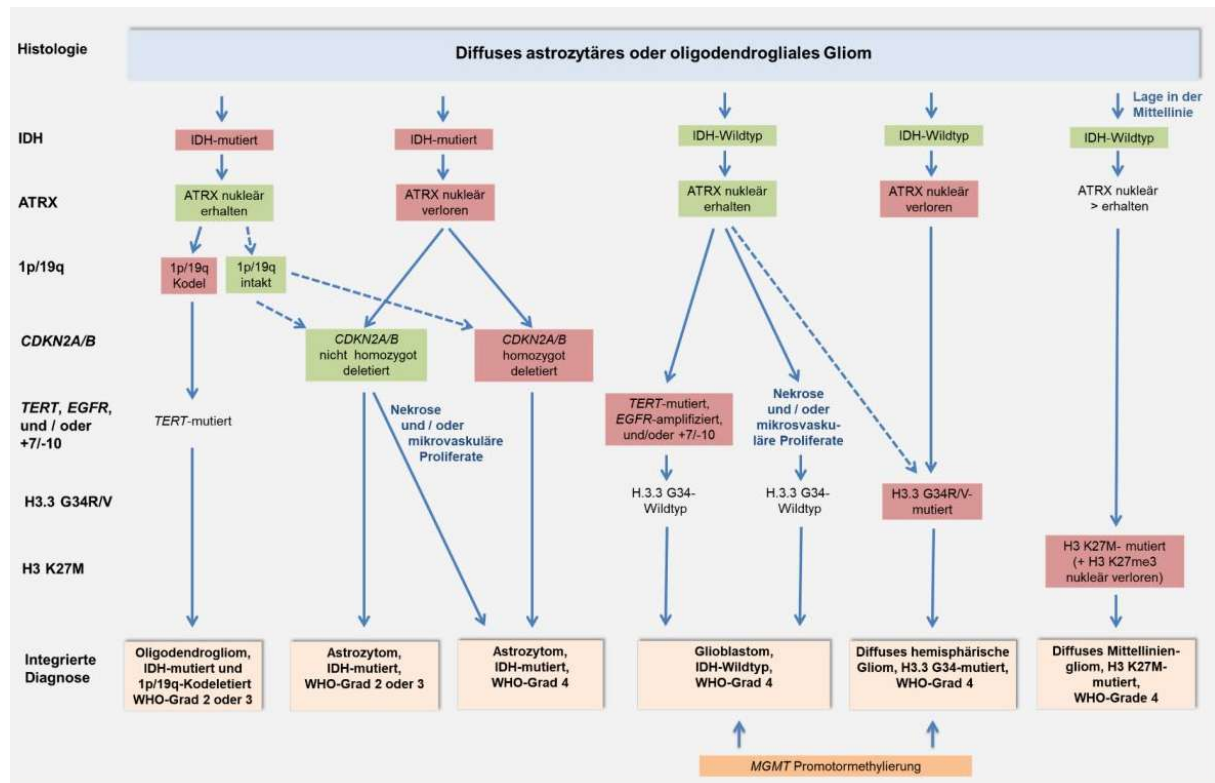
Dabei werden die Hirntumore in sechs Kategorien unterteilt: diffuse Gliome typisch für Erwachsene, diffuse niedrig- und hochgradige Gliome typisch für Kinder, zirkumskripte astrozytische Gliome, glioneuronale und neuronale Tumore sowie ependymale Tumore (Louis et al., 2021).

Die zugehörigen Tumore in den einzelnen Kategorien lassen sich zudem je nach Differenzierung des Tumors in Grade untergliedern: ZNS-WHO-Grad 1 beschreibt differenzierte und nicht aggressiv-wachsende Tumore mit einer Prognose von über fünf Jahren sowie der Möglichkeit auf Heilung; ZNS-WHO-Grad 2 Tumore sind wenig entdifferenziert mit einer Überlebenswahrscheinlichkeit von drei bis fünf Jahren; ZNS-WHO-Grad 3 Tumoren sind entdifferenziert und aggressiv wachsend, mit einer Überlebenswahrscheinlichkeit von zwei bis drei Jahren und ZNS-WHO-Grad 4 Tumore gelten als hochgradig entdifferenziert und hochgradig aggressiv mit einer Überlebenswahrscheinlichkeit von etwa einem Jahr (Louis et al., 2007; "Tumor Grade, National Cancer Institute," 2022; Zülch, 1980).

Bis 2021 wurden die Gliome in Astrozytome, mit und ohne Isocitratdehydrogenase (IDH) - Mutation, Oligoastrozytome, Oligodendrogliome und Glioblastome mit und ohne IDH-Mutation unterteilt. Wenn der Phänotyp eines GBM in Kombination mit einer IDH-Mutation vorkam, sprach man von einem sekundären Glioblastom, da es sich aus einem IDH-mutierten Astrozytom (diffuses Astrozytom ZNS-WHO-Grad 2, anaplastisches Astrozytom ZNS-WHO-Grad 3) entwickelte (Louis et al., 2016; Ohgaki & Kleihues, 2013). Seit Juni 2021 wird nur noch zwischen dem IDH-Wildtyp Glioblastom (ZNS-WHO Grad 4), IDH-mutierten Astrozytom (ZNS-WHO-Grad 2-4) und IDH-mutierten Oligodendrogliom mit einer nicht balancierten Translokation t(1;19), bei der es zum Verlust des kurzen Arms von Chromosom eins und des langen Arm von Chromosom 19 kommt (1p/19q-kodeletiert) (ZNS-WHO-Grad 2-3), unterschieden. Diese Tumore bilden die Gruppe der für Erwachsenen typischen Gliome (**Abbildung 2**) (Louis et al., 2021).

**Abbildung 2** Integrierte histomolekulare Klassifikation der Gliome im Erwachsenenalter

Die integrierte histomolekulare Klassifikation der häufigsten diffusen astrozytären und oligodendroglialen Gliome im Erwachsenenalter gemäß ZNS-WHO-Klassifikation 2016 und nachfolgender cIMPACT-NOW-Empfehlungen (aus: Wick et al., 2021, S.22).



Des Weiteren reagierte cIMPACT-NOW auch auf Entwicklungen in der molekularen Diagnostik und folglich wurden die Richtlinien der *European Association of Neuro-Oncology* (EANO) sowie die Leitlinien für Diagnostik und Therapie von Gliomen der Deutschen Gesellschaft für Neurologie aktualisiert (Brat et al., 2020; Weller et al., 2022; Wick et al., 2021). Neben der IDH-Mutation, spielen nun der Mutationsstatus des Chromosom-X-verbundenen  $\alpha$ -Thalassämie-Retardations-Syndrom (ATRX) -Gens, des Telomerase-Reverse-Transkriptase (TERT) -Promoters, des Histon-H3, die Aktivität der Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren 2A und 2B (CDKN2A/B) und eine eventuell vorliegende Amplifikation des Gens des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) eine Rolle bei der Diagnosestellung (**Abbildung 2**) (Wick et al., 2021). Liegt ein amplifizierter EGFR, ein mutierter TERT-Promoter oder ein Gewinn von Chromosom 7 bei gleichzeitigem Verlust von Chromosom 10 (+7/-10) einzeln oder in Kombination vor, so ist ein histologischer Nachweis von Nekrosen und mikrovaskulären Proliferaten nicht mehr nötig für die Diagnose eines IDH-Wildtyp Glioblastom, ZNS-WHO-Grad 4 (Louis et al., 2020; Tesileanu et al., 2020; Wick et al., 2021).

### 3.1.4 Makroskopie und Histologie

Makroskopisch erscheint ein GBM als heterogenes Gewebe mit gelblichen Nekrose- sowie hämorrhagischen, zystischen und gelatine-ähnlichen Arealen (Hanif et al., 2017).

Mikroskopisch werden in der Hämatoxylin-Eosin (HE) -Färbung polymorphe Tumorzellen im Tumorzentrum sichtbar, die eine erhöhte Kern-Plasma-Relation und teilweise intranukleäre Einschlüsse aufweisen (Urbańska et al., 2014). Im umliegenden Gewebe befinden sich girlandenförmige Gefäßproliferate, frische Einblutungen, Zellatypien und zelluläre Pleomorphismen (Ohgaki & Kleihues, 2007; Urbańska et al., 2014). Charakteristisch für das Glioblastom ist das infiltrative Wachstum, welches eine Abgrenzung und somit komplette Resektion erschwert. Durch das schnelle Wachstum und den typischen vaskulären Phänotyp des Tumors können sich große zentrale Nekrosen sowie kleinere Nekrosen in den Randarealen, die dicht von Zellen eingeschlossen sind, sogenannte Pseudopalisaden, bilden (Urbańska et al., 2014).

Glioblastome können anhand von typischen genetischen Expressionsmustern unterschiedlich eingeteilt werden: proneural, neural, klassisch und mesenchymal (Verhaak et al., 2010). Dabei spricht man von intertumoraler Heterogenität. Des Weiteren können mehrere Subtypen in einem Tumor auftreten. Diese intratumorale Heterogenität ist oft mitverantwortlich für die Therapieresistenz und schlechte Prognose (Liesche-Starnecker et al., 2020; Parker et al., 2016). Neben den molekularen Kriterien sind wichtige histologischen Gesichtspunkte für eine Diagnosestellung das Vorliegen von mikrovaskulären Proliferationen oder Nekrosen (Weller et al., 2022).

### 3.1.5 Molekulare Marker

Die Pathogenese des GBM im Detail ist bis heute unklar. Letztendlich führen sequenzielle Akkumulationen genetischer Alterationen und Deregulierungen der Signalwege von Wachstumsfaktoren zu einer malignen Transformation (Alifieris & Trafalis, 2015). Die verantwortlichen genetischen Alterationen werden in Form von molekularen Markern zur Diagnostik hinzugezogen (Weller et al., 2022).

#### IDH

Im physiologischen Stoffwechsel wandelt das Enzym Isocitratdehydrogenase das Molekül Isocitrat in  $\alpha$ -Ketoglutarat um (Horbinski, 2013). Liegt eine Mutation vor, handelt es sich bei über 90% um eine IDH1R132H-Mutation, wodurch  $\alpha$ -Ketoglutarat weiter zu 2-Hydroxyglutarat umgewandelt wird (Balss et al., 2008; Duncan et al., 2012; Ohgaki & Kleihues, 2013). Laut neuer ZNS-WHO-Klassifikation ist eine IDH-Mutation in Oligodendrogliomen und Astrozytomen

vorzufinden (Louis et al., 2021). Bei Glioblastomen liegt laut Definition keine Mutation vor, sondern der Wildtyp (Louis et al., 2021).

### **MGMT-Promoter**

Die O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) ist ein Reparatur-Suizid-Protein das Alkyl-Gruppen von der O<sup>6</sup>-Position von Guanin entfernt (Christmann et al., 2011; Pegg & Byers, 1992; Weller et al., 2010). Das Chemotherapeutikum Temozolomid (TMZ) entfaltet seine Wirkung unter anderem durch Alkylierung von Guanin-Basen (Hegi et al., 2005; Minniti et al., 2009). Das Enzym MGMT entfernt nun diese Alkyl-Gruppen und verhindert somit die gewünschte Wirkung von TMZ (Hegi et al., 2005; Tabatabai et al., 2012). Ist der Promoter von MGMT jedoch methyliert, kann das Enzym nicht transkribiert werden und TMZ somit besser wirken (Horbinski, 2013); je niedriger die Aktivität von MGMT ist, desto besser wirkt TMZ (Mekala et al., 2023; Yu et al., 2019). Folglich zeigen Patienten und Patientinnen mit einem positiven MGMT-Promoter-Methylierungsstatus eine bessere Prognose, besonders bei einer TMZ-Therapie (Hegi et al., 2004; Hegi et al., 2005; Mekala et al., 2023; Olson et al., 2011; Yu et al., 2019). Der Methylierungsstatus korreliert signifikant mit dem Gesamtüberleben (OS), jedoch nicht mit dem Progressionsfreies Überleben (PFS) (Binabaj et al., 2018). Deswegen bleibt der Methylierungsstatus des MGMT-Promoters einer der einzigen prädiktiven Biomarker für eine gute Prognose bei TMZ-Therapie (Weller et al., 2022). Ein positiver/ methylierter MGMT-Promotor-Status liegt in 30 bis 50% der Fälle vor (Ohka et al., 2011; Preusser et al., 2008).

Laut der aktuellen Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie kann eine Therapie mit Lomustin, einem Medikament, das durch Unterbrechung der translationalen und post-transskriptionalen Prozesse agiert, bei methyliertem MGMT-Promoter zusätzlich zu einer Radiochemotherapie mit TMZ diskutiert werden (Herrlinger et al., 2019; Wick et al., 2021).

### **ATRX**

Um ihr Überleben zu gewährleisten, verfügen bestimmte Tumorzellen über eine Telomerase oder nutzen alternative Mechanismen zur Verlängerung von Telomeren, wie die alternative Verlängerung von Telomeren (ALT). Damit können die schwindenden DNA-Enden unendlich oft verlängert werden. Das  $\alpha$ -Thalassämie-Retardations-Syndrom Chromosom-X-verbundene (ATRX) Gen, ein Chromatin modellierendes Protein, funktioniert als eine Art Suppressor des ALT-Mechanismus (Brosnan-Cashman et al., 2018).

In einigen Tumoren wird folglich beobachtet, dass durch den Verlust oder Mutation des ATRX-Gens, die Suppression des ALT-Mechanismus aufgehoben und die zelluläre Langlebigkeit gefördert wird (Wick et al., 2021). In Gliomen wird über eine Assoziation zwischen dem Auftreten einer IDH-Mutation und einer ATRX-Mutation berichtet (Weller et al., 2022). Jedoch besteht

kein Zusammenhang zwischen einer 1p/19q-Kodeletion und einem ATRX-Verlust. Da Oligodendrogliome und Astrozytome anhand dieser Kriterien diagnostiziert werden, eignet sich ATRX als diagnostischer Marker, um Astrozytome von Oligodendrogliomen zu differenzieren (Nandakumar et al., 2017). Während in Glioblastomen eine geringe Konzentration an ATRX und folglich höhere ALT-Frequenzen registriert wird, wird in Astrozytomen Grad 4 mit IDH-Mutation („sekundären“ GBM bis Juni 2021) ein Verlust des Gens festgestellt (Brosnan-Cashman et al., 2018; Nandakumar et al., 2017). Infolgedessen könnte sich ATRX als Malignitätsmarker eignen (Nandakumar et al., 2017).

## **EGFR**

Die Zell-Proliferation wird von Wachstumsfaktoren und ihren Rezeptoren reguliert (Padfield, Ellis, and Kurian 2015). Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) gehört zur Familie der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (Patel and Leung 2012). Durch Liganden-Bindung am EGFR wird eine Kaskade über Rezeptor-Phosphorylierung aktiviert, die in Zell-Proliferation, Invasion, Angiogenese und Apoptose-Resistenz endet (Chakravarti et al., 2004; Combs et al., 2016; Padfield et al., 2015; Parsons et al., 2008; Patel & Leung, 2012; Weller et al., 2022). Typisch für das Glioblastom ist eine Amplifikation des Gens, die in 40 bis 60% der Fälle vorliegt, und eine Überexpression des EGFR. Die häufigste Mutation bei vorliegenden amplifizierten Genen ist dabei die EGFRVIII-Variante des Proteins als Resultat einer Deletion der Exons zwei bis sieben im betreffenden Gen (Padfield et al., 2015; Wong et al., 1992).

Der EGFR-Status nimmt auch Einfluss auf die Prognose. Demnach soll eine Überexpression mit kürzerem Überleben assoziiert sein (Tabatabai et al., 2012). Deswegen beschäftigen sich einige Studien mit EGFR als Angriffspunkt für Immuntherapien, wie beispielsweise mit dem auf EGFR-zielenden Impfstoff Rindopepimut (Weller et al., 2017; Weller et al., 2022).

## **TERT**

Die Telomerase reverse Transkriptase (TERT) ist ein Enzym, das eine zentrale Rolle für die Erhaltung von Telomeren und folglich beim Zellwachstum spielt (Thakkar et al., 2014).

Bei 70% der Glioblastom-Patienten und -Patientinnen liegt eine Mutation des TERT-Promoters vor, die zu einer Erhöhung der TERT-Expression, Stabilisierung von Telomeren, Förderung der Proliferation und Verhinderung der Seneszenzen führt (Weller et al., 2022; Wick et al., 2021). Es besteht eine positive Assoziation zwischen dem TERT-Promoter-Mutationsstatus, dem Alter und ZNS-WHO-Grad sowie eine negative Assoziation zwischen TERT-Promoter-Mutationsstatus und ATRX-Mutationen in Gliomen (Liu et al., 2019).

## **TP53**

Das Tumorsuppressor 53 (TP53) Gen kodiert das Protein p53, das eine wichtige Rolle bei der Regulierung von Zellproliferation und -überleben sowie Genom-Integrität spielt (Kastenhuber & Lowe, 2017). Durch Initiierung eines Zellzyklus-Arrests und Unterstützung der Zellalterung bis hin zur Apoptose, verhindert TP53, dass sich geschädigte Zellen vermehren (Kastenhuber & Lowe, 2017; Zhang et al., 2018). Folglich zeigen Tumorzellen mit TP53-Funktionsverlust kontinuierliches Wachstum von abnormalen Zellen. Astrozytome mit IDH-Mutation ZNS-WHO-Grad 4, früher als „sekundäre Glioblastome“ bezeichnet, werden stark mit TP53-Mutationen assoziiert, während diese bei „primären“ Glioblastomen weniger häufig sind (Levidou et al., 2010). Des Weiteren ist eine Mutation oft bei Patienten und Patientinnen mit IDH-Mutation zu finden (Parsons et al., 2008; Weller et al., 2022).

## **Histon H3.3**

Während das diffuse Mittelliniengliom anhand einer Mutation im Codon 27 (K27M) des Histons H3 charakterisiert wird, wird das diffuse hemisphärische Gliom, ZNS-WHO-Grad 4, über eine Missense-Mutation im Codon 34 des Histons H3.3 (H3.3-G34) definiert. In der alten ZNS-WHO-Klassifikation gehörten diese Gliome noch zu den Glioblastomen. Seit der neuen Klassifikation sind sie nun Anhand ihrer Histon H3.3-G34- und K27M Histon H3-Mutation vom Glioblastom, IDH-Wildtyp, ZNS-WHO-Grad 4 abzugrenzen, bei dem der Histon H3.3-Wildtyp vorliegt (Louis et al., 2020; Wick et al., 2021).

## **+7/-10-Genotyp**

Der Verlust des Chromosom 10 mit 60% bis 80% und eine Polysomie des Chromosom 7 mit etwa 50%, oft in Form einer Trisomie, gehören zu den häufigsten genetischen Alterationen in GBM (Koshiyama et al., 2017; Ohgaki, 2005). Oft treten beide Alterationen auch zusammen auf. Dabei kann es zu einer Aktivierung und erhöhten Expression von tumorfördernden Genen auf Chromosom 7 und zu einer Inaktivierung und verminderte Expression von tumorsupprimierenden Genen auf Chromosom 10 kommen. Folglich wird die Kombination aus Gewinn von Chromosom 7 und Verlust von Chromosom 10 als diagnostischer Marker für GBM genutzt (Wick et al., 2021).

### **3.1.6 ALDH1A3 und GBM-Stammzellen**

Da Aldehyde Dehydrogenase 1 (ALDH1) als Stammzell-Marker in GBM diskutiert wird, wurde dessen Veränderung zwischen Primärtumor und Rezidiv in dieser Arbeit inkludiert (Combs et al., 2016; Li et al., 2018; Rasper et al., 2010). ALDH Isoenzyme entgiften Aldehyde, die während Medikamententherapien und damit einhergehender Überproduktion von freien Radikalen (ROS) anfallen (Zinovieva et al., 2019). Durch eine hohe ALDH1-Konzentration behalten

Tumorzellen ihren undifferenzierten, Stammzell-ähnlichen Zustand (Rasper et al., 2010). Die bestimmte Isoform ALDH1A3 scheint die aktivste in GBM zu sein und wird mit einer mesenchymalen Differenzierung assoziiert. Zudem gilt sie als ein Prädiktor der Überlebenswahrscheinlichkeit (Li et al., 2018).

Des Weiteren wird ein Zusammenhang zwischen der Temozolomid-Therapie und ALDH1A3-Expression vermutet. TMZ führt zu einer Entstehung von ROS und der Induktion von Autophagie. Die Expression von ALDH1A3 versucht die Zellen vor der Wirkung von TMZ zu schützen. Des Weiteren wurde in rezidivierenden GBM eine erhöhte ALDH1A3-Expression festgestellt. Dies legt einen Zusammenhang zwischen ALDH1A3 und TMZ-Therapie-Resistenz nahe (Wu et al., 2020). Außerdem zeigte eine in vitro Studie, dass ALDH-knockout Zellen sensibler gegenüber der TMZ-Therapie sind als Wildtyp-Zellen (Wu et al., 2018).

Überdies wird ein möglicher Zusammenhang zwischen ALDH1A3 und der Expression des x-System erwogen. Eine erhöhte ALDH-Expression könnte die Wirksamkeit therapeutischer Maßnahmen am x-System beeinträchtigen und somit zu einer Therapieresistenz führen (Okazaki et al., 2018).

### **3.1.7 Diagnostik**

Die Methode der Wahl zur Diagnostik eines Glioblastoms stellt die Magnetresonanztomographie (MRT) dar. Hierbei erfolgt eine MRT-Untersuchung mit und eine ohne Kontrastmittelgabe. Dabei kann es zum Phänomen der Pseudoprogression kommen, bei dem es zu einer scheinbaren Vergrößerung des Tumors durch Aufnahme von Kontrastmittel kommt. Vor allem bei einer Kontrolluntersuchung ist dies differentialdiagnostisch zu beachten (Wick et al., 2016).

Eine klinisch-internistische Untersuchung dient dem Ausschluss von Differenzialdiagnosen und der Beurteilung der Operationsfähigkeit. Zudem kann eine sorgfältige neurologische Untersuchung mit Hilfe der Skala für neurologisches Assessment in Neuroonkologie erhoben werden. Diese Untersuchungen, einschließlich dem „Mini Mental State Test“ und dem Karnofsky Performance Status, dienen dazu, den aktuellen Zustand fest zu halten, um eine mögliche Tumorprogression oder Therapiefolgen besser beurteilen zu können (Wick et al., 2021).

Eine weitere Möglichkeit bietet die Liquordiagnostik: im Plasma und im Liquor von Gliom-Patienten und -Patientinnen konnte zellfreie Tumor-DNA nachgewiesen werden (Miller et al., 2019; Nassiri et al., 2020). Eine allgemeine Empfehlung zur Liquordiagnostik besteht derzeit dennoch nicht, da die Bestimmung dieser DNA bislang für die Früherkennung, das Screening oder die präoperative Diagnostik nicht von Nutzen ist. Der nächste Schritt in der Diagnostik ist eine Biopsie-Entnahme, um die Diagnose histologisch zu sichern (Wick et al., 2021).

### 3.1.8 Klinik

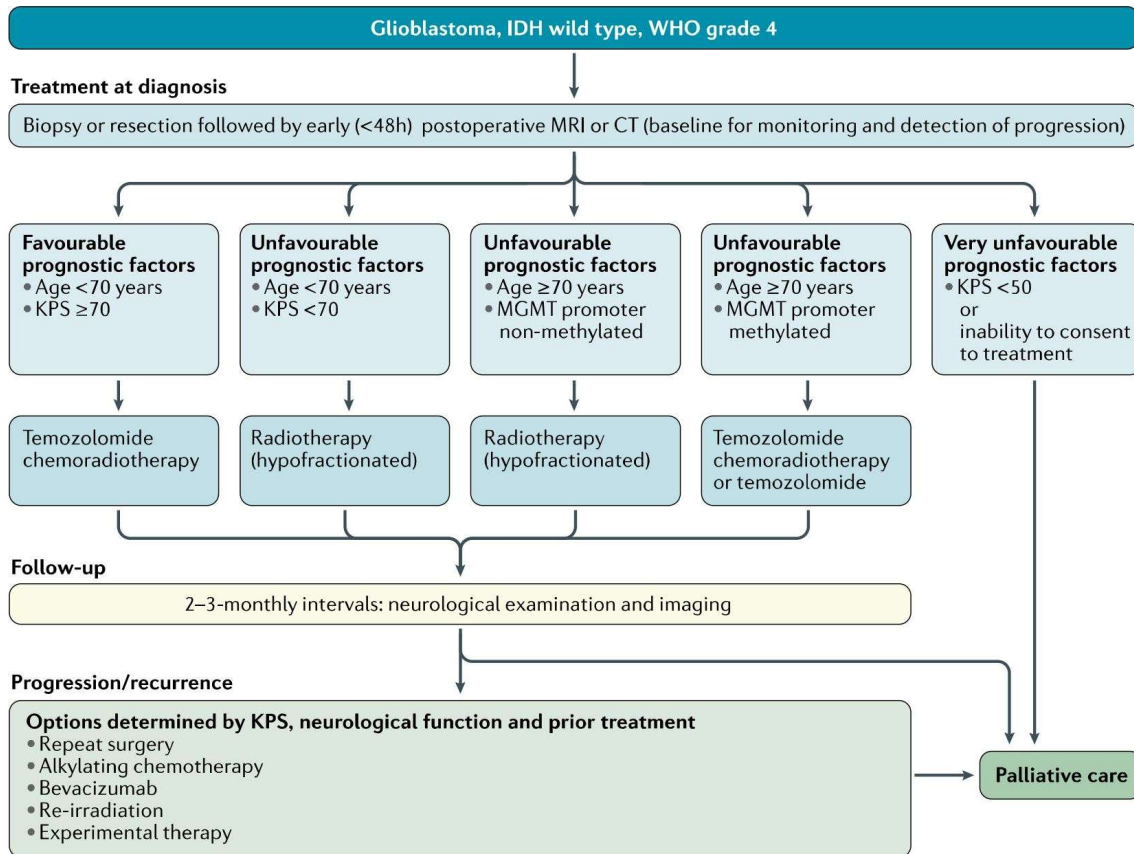
Neu aufgetretene fokale oder generalisierte epileptische Krampfanfälle, Persönlichkeitsveränderungen, neurologische Herdsymptome und allgemeine Zeichen erhöhten Hirndrucks wie Übelkeit, Erbrechen, Kopfschmerz oder Bewusstseinsstrübung können Zeichen einer intrakraniellen Raumforderung sein (Wick et al., 2021). Während epileptische Anfälle, Kopfschmerzen, Ataxie und Schwindel auftreten können, sind manche Fälle mit rapider Entstehung ähnlich einer Schlaganfall-Symptomatik beschrieben worden. In circa 50% kommt es zu Kopfschmerzen und in 20 bis 40% zu Schlaganfällen als klinische Manifestation. Fokale Symptomaten, wie beispielsweise Hemiparesen, Visus-Ausfälle oder Verlust der Sensorik können die Lokalisation des Tumors widerspiegeln (Omuro & DeAngelis, 2013).

### 3.1.9 Therapie

Die Standardtherapie des Glioblastoms besteht aus einer möglichst vollständigen Resektion, einer anschließenden Radiotherapie der erweiterten Tumorregion und einer begleitenden sowie nachfolgend erhaltenden Chemotherapie mit TMZ (**Abbildung 3**) (Wick et al., 2021). Die Einführung der adjuvanten Radiochemotherapie nach Stupp erzielte eine deutliche Verbesserung der Prognose im Gegensatz zur alleinigen Radio- oder Chemotherapie (Stupp et al., 2005). Nach neurochirurgischer Resektion wird die erweiterte Tumorregion mit 60 Gy Zielvolumendosis (30 Tage je 2 Gy) bestrahlt. Währenddessen wird TMZ anfangs sechs Wochen täglich ( $75 \text{ mg/m}^2 \text{ p.o.}$ ) und im Anschluss alle vier Wochen für fünf Tage über sechs Zyklen ( $150\text{-}200 \text{ mg/m}^2 \text{ p.o.}$ ) eingenommen. Das mediane progressionsfreie Überleben unter adjuvanter fraktionierter Strahlentherapie lag bei 5,0 Monaten und konnte mit Hilfe von TMZ auf 6,9 Monate verlängert werden. Insgesamt hob die zusätzliche Gabe von TMZ das mediane Überleben von 12,1 unter alleiniger Strahlentherapie auf 14,6 Monate unter kombinierter Radiochemotherapie an (Stupp et al., 2005). Bei Patienten und Patientinnen unter 70 Jahren mit einem Karnofsky-Performance Status unter 70 sowie bei Patienten und Patientinnen ab einem Alter von 70 Jahren und unmethyliertem MGMT-Promoter wird eine alleinige Radiotherapie empfohlen. Gleichzeitig wird bei einem Alter von über 70 Jahren und methyliertem MGMT-Promoter eine alleinige TMZ-Gabe oder TMZ in Kombination mit einer Bestrahlung empfohlen (**Abbildung 3**) (Weller et al., 2022).

**Abbildung 3 Therapie-Optionen für Glioblastom-Patienten und -Patientinnen**

Unterschiedliche Therapie-Möglichkeiten für Glioblastom-Patienten und -Patientinnen, abhängig von Alter, MGMT-Promotermethylierungsstatus und Karnofsky Performance Status (KPS) (aus: Weller et al., 2022, S.181).



## Operative Therapie

Die chirurgische Resektion gilt als Standardtherapie. Sie ist insoweit auch ein prognostischer Faktor, da das Gesamtüberleben mit dem Resektionsausmaß korreliert (Bette et al., 2018; Lacroix et al., 2001). Aufgrund des infiltrativen Wachstums ist eine R0-Resektion praktisch nicht möglich. Dennoch sollte immer eine größtmögliche Resektion angestrebt werden. Ist dies aufgrund des Zustands des Patienten oder der Patientin oder der Infiltration umliegender funktioneller Strukturen nicht möglich, sollte nichtsdestotrotz eine subtotal Resektion durchgeführt werden. Die Patienten und Patientinnen zeigten bei diesem Vorgehen eine bessere Prognose als bei einer alleinigen Biopsie (Brown et al., 2016). Aufgrund der diffusen Infiltration des benachbarten Hirngewebes ist eine radikale Operation nicht immer möglich (Osswald et al., 2015; Sahm et al., 2016; Wick et al., 2021). Bei Fällen, die nicht kurativ resezierbar sind, sollte deswegen mit Hilfe von intraoperativen neurophysiologischen Stimulations- und Überwachungsverfahren das umliegende funktionell-relevante Hirngewebe geschont und somit permanente postoperative neurologische Defizite vermieden werden (De Witt Hamer et al., 2012; Wick et al., 2021). Weitere Methoden, um intraoperativ den Tumor besser lokalisieren zu

können, sind Neuronavigation, Ultraschalldiagnostik, intraoperative MRT-Aufnahmen und die fluoreszenzgestützte Resektion mit 5-Aminolävulinsäure (Senft et al., 2011; Stummer et al., 2006; Wick et al., 2021). Darüber hinaus entdeckten Bloch et al. (2012), dass ein erneuter Eingriff zur Entfernung eines rezidivierenden GBM von Vorteil ist, weil es die Symptome und Prognose der Patienten und Patientinnen verbesserte.

## **Strahlentherapie**

Die Strahlentherapie nach vollständiger Resektion, falls möglich, gehört wie bereits erwähnt zur Standardtherapie des Glioblastoms. Neuste Techniken der fokussierten Strahlentherapie, wie die Radiochirurgie, intensitätsmodulierten Radiotherapie oder bildgeführten Strahlentherapie, führen zu einer gezielteren Tumorbestrahlung und Schonung des umliegenden Gewebes. Um das Zielvolumen noch besser zu definieren, beschäftigen sich neue Ansätze mit dem Einsatz von Positronen-Emissions-Tomographie-Methoden (Wick et al., 2021).

## **Pharmakotherapie**

TMZ ist aufgrund der guten Verträglichkeit und oralen Einnahme das Mittel der Wahl. Es verlängert das mediane Überleben auf 15 Monate und erhöht das Zwei-Jahres-Überleben auf 26% (Stupp et al., 2005). Näher betrachtet ist TMZ ein Derivat der zweiten Generation der Imidazotetrazine, die ihre zytotoxische Wirkung durch DNA-Methylierung entfalten. Vor allem die Methylierung der O<sup>6</sup>-Position der Guanin-Basen der DNA spielt eine zentrale Rolle, da die MGMT dem Chemotherapeutikum entgegenwirkt. Folgend kann TMZ bei Patienten und Patientinnen mit einer durch Methylierung des Genpromoters gehemmten MGMT besser wirken (Minniti et al., 2009).

Ein weiteres Medikament ist Lomustin, das neben DNA-Alkylierung zu Carbamoylation von Amino-Säuren führt und dadurch transkriptionale, translationale sowie posttranskriptionale Prozesse stört (Herrlinger et al., 2019; Wheeler et al., 1975). Bei Anwendung nach einer Radiochemotherapie mit TMZ bei methyliertem MGMT-Promoter wird ein verlängertes Überleben diskutiert (Herrlinger et al., 2019; Wick et al., 2021). Die Kombination aus Bevacizumab und Lomustin könnte bei Patienten und Patientinnen mit einem GBM-Rezidiv das PFS verlängern (Wick et al., 2021; Wick et al., 2017).

Andere Angriffspunkte für die Chemotherapie bieten Wachstumsfaktoren, die zu Gunsten der Tumorentstehung überexprimiert, amplifiziert oder mutiert vorliegen. Einer dieser Wachstumsfaktoren ist EGFR. Mithilfe von monoklonalen Antikörpern wie Cetuximab und Tyrosin-Kinase-Hemmern wie Gefitinib, Erlotinib oder Canertinib, wird der Rezeptor blockiert, und dessen onkogene Wirkung unterdrückt. Allerdings konnten mehrere Studien nur ein minimalen oder keinen Vorteil feststellen (Minniti et al., 2009).

Ein weiterer Ansatz untersuchte die Inhibition des Wachstumsfaktor-Rezeptors aus Thrombozyten (PDGFR), vor allem des Subtypen PDGFR $\alpha$ , der in einem Drittel aller primären GBM überexprimiert sein soll (Joensuu et al., 2005). Durch Liganden-Bindung wird er aktiviert und dimerisiert und anschließend weitere Kinasen aktiviert. Diesen Vorgang verhindert das Chemotherapeutikum Imatinib (Minniti et al., 2009).

Ein anderer wichtiger Ansatz ist die Inhibition des vaskulär-endothelialen Wachstumsfaktor-Rezeptors (VEGFR). Das rasche Wachstum des GBM kann zu einer Hypoxie und Azidose im Inneren des Tumors führen, da dieses nicht mehr ausreichend mit Blut versorgt ist. Dadurch wird VEGFR stimuliert und stellt die Blutversorgung des Tumors durch Anregung der Bildung neuer Blutgefäße sicher (Minniti et al., 2009; Plate et al., 1992). Um dies zu verhindern, wurde der monoklonale Antikörper Bevacizumab (Avastin) entwickelt, der den VEGFR blockiert und die für GBM typische Angiogenese unterbinden soll (Minniti et al., 2009). In den USA erfolgte die Zulassung des Medikaments im Jahr 2009 und wird teils in Kombination mit Irinotecan bei Patienten und Patientinnen mit GBM-Rezidiv eingesetzt (Davis, 2016). Die Medikamenten-Kombination führt zu einer Besserung der ein Jahr-Überlebensrate von GBM-Rezidiv-Patienten und -Patientinnen mit 37% statt 21% unter TMZ-Therapie (Vredenburgh et al., 2007).

Abschließend lässt sich sagen, dass TMZ immer noch als Therapeutikum der ersten Wahl gilt.

### **3.1.10 Neue Therapie-Ansätze**

Das Zusammenfassen der molekularen Profile von Glioblastomen durch den *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) bietet viele pharmakologische Eingriffspunkte. Zusätzlich legt dieser eine personalisierte Therapie nahe, die auf dem individuellen molekularen Tumor-Profil basiert (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008; Lau et al., 2014).

Eine Studie von Verhaak et al. (2010) klassifizierte 2010 auf Grundlage des TCGA vier molekulare Subtypen in GBM: proneural, neural, klassisch und mesenchymal. Je nach Vorliegen dieser Eigenschaften, unterscheidet sich die Antwort auf die Therapie. Liesche-Starnecker et al. (2020) beschrieben das Auftreten mehrere Subtypen in einem GBM, die intratumorale Heterogenität, die zur der Therapie-Resistenz und der Entstehung von Rezidiven beiträgt. Diese Erkenntnisse über Therapie-Resistenz erlauben möglicherweise neue Ansätze für individuelle Therapien in Abhängigkeit der Tumor-Zusammensetzung.

## 3.2 Ferroptose

Der Begriff „Ferroptose“ wurde im Mai 2012 zum ersten Mal erwähnt und beschreibt eine Eisen-abhängige Art des Zelltods (Dixon et al., 2012). Die drei „Hallmarks of Ferroptosis“ sind definiert als Verlust des Lipidperoxid-Regenerationssystems, einem Anstieg von redox-aktivem Eisen und mehrfach ungesättigten oxidierten Fettsäuren im Zellinneren (Dixon & Stockwell, 2019).

### 3.2.1 Abgrenzung gegenüber anderen Formen des Zelltodes

Um Ferroptose zu definieren, lohnt es sich die genauen Mechanismen von schon bekannten Formen des Zelltods abzugrenzen. Das Nomenklatur-Komitee für Zelltode differenzierte 2018 histologisch drei Formen (Galluzzi et al., 2018):

Die 1. Art von Zelltod beschreibt die Apoptose. Über Aktivierung mehrerer Caspasen (Zystein-Aspartat-spezifische Protease) kommt es zu spezifischen morphologischen Veränderungen. Charakteristisch sind mitunter ein Zerfall des Zellkerns und die Kondensation von Chromatin, auch nukleare Pyknose genannt (Galluzzi et al., 2007; Galluzzi et al., 2018). Die 2. Art von Zelltod, auch Autophagie genannt, wird durch die Sequestration von Zellorganellen in Vakuolen, den Autophagosomen, charakterisiert, die mit einem Lysosom zu einem Autolysosom fusionieren. Anschließend wird dessen Inhalt mit Hilfe von lysosomalen Hydrolasen abgebaut (Galluzzi et al., 2018; Kroemer et al., 2009). Die Nekrose, die 3. Art von Zelltod, beschreibt im Gegensatz zur Apoptose keinen physiologisch induzierten Vorgang. Auf nicht-physiologischen Stress folgt das Anschwellen der Zelle mit Zerstörung ihrer Organellen. Letztendlich platzt die Zellmembran und das nekrotische Gewebe wird abgebaut (Galluzzi et al., 2007; Galluzzi et al., 2018; Kroemer et al., 2009; Schweichel & Merker, 1973).

Eine andere Einteilung, die sich an den molekularen Mechanismen orientiert, unterscheidet zwischen akzidentiellem Zelltod (ACD) und reguliertem Zelltod (RCD) (Galluzzi et al., 2016; Galluzzi et al., 2015). Der ACD ist eine unkontrollierte und unaufhaltsame Form des Zelltodes, als Folge einer Exposition auf extreme physische, chemische oder mechanische Reize. Der RCD hingegen basiert auf speziellen molekularen Vorgängen, die durch pharmakologische und genetische Eingriffe manipuliert werden können. Die unterschiedlichen RCDs können anhand von zwei Mechanismen unterschieden werden. Einerseits tritt ein RCD als programmierter Zelltod physiologisch ohne äußere Umweltfaktoren auf. Andererseits kann es zum RCD durch äußeren Stress, Störungen des Mikroumfeldes und folgender Unfähigkeit der Wiederherstellung der Homöostase kommen (Galluzzi et al., 2016). Ferroptose stellt seit 2018 offiziell eine weitere Form von RCD dar (Galluzzi et al., 2018; Hirschhorn & Stockwell, 2019).

Auch morphologisch ist Ferroptose von den anderen Arten des Zelltods abzugrenzen. Es kann eine Schrumpfung der Mitochondrien begleitet von Kondensierung und Verdickung der äußeren Membran beobachtet werden. Zudem kommt es zu einem Verschwinden der Cristae in den Mitochondrien (Latunde-Dada, 2017; Wan et al., 2023; Xie et al., 2016; Yu et al., 2017).

Im Gegensatz zur Apoptose bleibt das Zellkern-Volumen unverändert und auch die Chromatin-Kondensation bleibt aus (Xie et al., 2016). Ferner tritt weniger „Blebbing“ der Plasmamembran auf, bei dem es zu irregulären Ausstülpungen der Membran kommt, die typisch für Apoptose sind (Fackler & Grosse, 2008; Latunde-Dada, 2017; Xie et al., 2016).

### **3.2.2 Historischer Überblick**

Obwohl der Begriff „Ferroptose“ 2012 das erste Mal erwähnt wurde, wurden die drei wesentlichen Aspekte des Ferroptose-Prozesses bereits viel früher beschrieben (Dixon et al., 2012; Hirschhorn & Stockwell, 2019).

Schon im Jahr 1955 wurde Cystein, das eine wichtige Rolle im Lipidperoxid-Regenerationssystem von Ferroptose spielt, als eine essenzielle Aminosäure für das Wachstum von menschlichen Karzinom-Zellen beschrieben (Eagle, 1955). Cystin ist die instabile reduzierte Form von Cystein und wird nach Aufnahme in die Zelle durch einen Cystin-Glutamat-Austauscher zu Cystein reduziert und anschließend zur Synthese des Antioxidans Glutathion (GSH) verwendet (Ratan & Baraban, 1995). Des Weiteren wurde 1973 erwähnt, dass eine hepatische Nekrose, heute bekannt als Ferroptose, in Mäusen mit Gabe von Glutathion und Cystein behandelt werden konnte (Hirschhorn & Stockwell, 2019; Mitchell et al., 1973). In den kommenden Jahren gewann die überlebenswichtige Rolle von Cystein an Bedeutung. Laut Murphy et al. (1989) kam die von Glutamat hervorgerufene Zyto- und Neurotoxizität durch die Hemmung der Cystein-Importer zustande. Diese Inhibition resultierte wiederum in Glutathion-Mangel, oxidativem Stress und Zelltod (Murphy et al., 1989; Murphy et al., 1990). Ratan und Baraban (1995) untersuchten den Einfluss von GSH genauer und stellten fest, dass oxidativer Stress, Cystein- und GSH-Mangel zum Zelltod führen. Außerdem beobachteten sie, dass eine Erhaltung der GSH-Homöostase essenziell gegen durch Cystein-Mangel hervorgerufenen oxidativen Stress und das Zell-Überleben von unreifen embryonalen kortikalen Neuronen ist (Ratan et al., 1994). Zudem stellte sich 1996 heraus, dass der durch bewussten Zystein-Entzug und Glutathion-Mangel hervorgerufene Zelltod in Oligodendroglia durch Eisen-Chelatoren und Antioxidantien aufgehalten werden konnte (Yonezawa et al., 1996).

Darüber hinaus wurde der Aspekt der Lipid-Peroxidation, bei der mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA) oxidiert werden, bereits 1955 beschrieben (Hayaishi et al., 1955; Hirschhorn & Stockwell, 2019; Mason et al., 1955). Die Auswirkungen der Lipid-Peroxidation in Form von

oxidativem Stress mit Schädigung der Zellmembran und anderer Strukturen sowie die Freisetzung lysosomaler Enzyme, wurden in den 1980er genauer untersucht (Girotti, 1985; Kappus, 1985). Dass oxidativer Stress, in Form von Sauerstoff Radikalen, eine wichtige Rolle bei Reaktionen mit Metallen im Körper, insbesondere Eisen, spielen und folglich auch zur Entwicklung von Krebs und Krankheiten beitragen kann, wurde von Halliwell und Gutteridge (1984) näher erläutert.

Der Zusammenhang zwischen Eisen und Lipid-Peroxidation wurde ebenfalls schon früher erwähnt. Nach Injektion von Eisen in Form von Eisen-Dextran, konnten erhöhte Mengen an Lipid-Peroxiden gemessen werden (Golberg et al., 1962). Ein Enzym, das mitunter diese Reaktion verursacht heißt Lipid-Oxygenase (LOX). In Versuchen stellte sich heraus, dass die 12/15-LOX zum oxidativen Stress in Mäuse-Hirnen und ein Anstieg in der ischämischen und periinfarzierten Region nach Infarkt registriert werden konnte (van Leyen et al., 2006). Des Weiteren konnte eine erhöhte 12/15-LOX-Konzentration in Neuronen und Endothel-Zellen nach einem fokalen Infarkt gemessen werden, die wesentlich zu der oft tödlichen Ödem-Entwicklung post-Infarkt beitragen könnte (Jin et al., 2008).

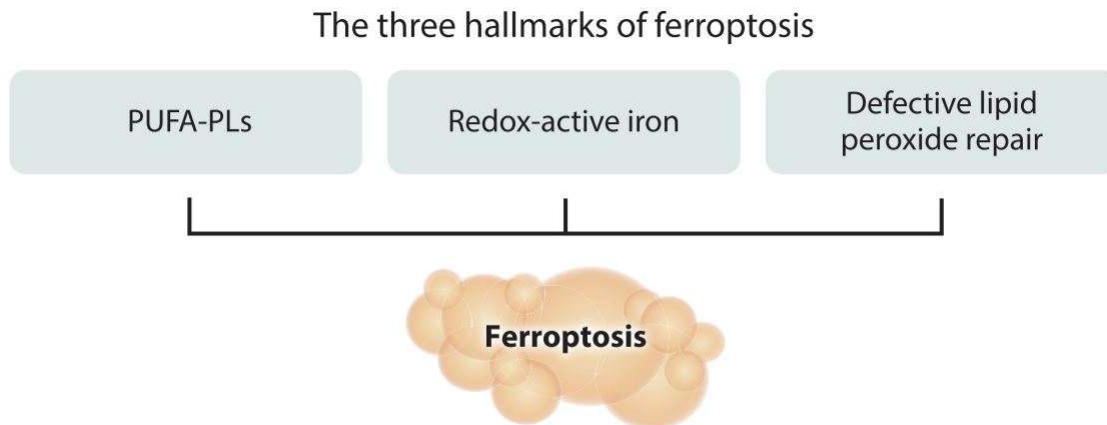
Zuletzt wurde vor allem ein Enzym in der Kette der Ferroptose hervorgehoben: Die Glutathionperoxidase 4 (GPX4). Damals noch als Peroxidations-inhibierendes Protein mit Glutathionperoxidase-Aktivität beschrieben, wurde das Enzym 1982 aus einer Schweine Leber extrahiert und aufgereinigt (Ursini et al., 1982). Das Protein schützte in Anwesenheit von Glutathion Liposomen und Biomembranen vor peroxidativer Degradation (Hirschhorn & Stockwell, 2019; Ursini et al., 1982). Auf diese Weise konnte GPX auch den durch Hyperoxide eingeleiteten Zelltod in lymphoiden Leukämiezellen verhindern (Geiger et al., 1991; Hirschhorn & Stockwell, 2019). Des Weiteren wurde eine erhöhte Resistenz gegenüber Lipid-Peroxid- und oxidativen-Stress- vermittelten Zytotoxizität und Apoptose bei Überexpression von GPX, vor allem mitochondrial, registriert (Hirschhorn & Stockwell, 2019; Hurst et al., 2001; Imai et al., 1996; Nomura et al., 1999; Ran et al., 2004; Yagi et al., 1996).

### **3.2.3 Molekulare Mechanismen und Regulatoren**

Auf die von Dixon und Stockwell (2019) definierten „Hallmarks“/ Kennzeichen von Ferroptose wird im Folgenden näher eingegangen (**Abbildung 4**):

#### Abbildung 4 Die drei Kennzeichen von Ferroptose

Die drei Kennzeichen von Ferroptose inkludieren die ausreichende Verfügbarkeit von langkettigen Fettsäuren gebunden an Phospholipide (PUFA-PLs), redox-aktiven Eisen und einem defekten Reparatur-System für Lipidperoxide (aus: Dixon & Stockwell, 2019, S.37).



Das erste Kennzeichen ist die ausreichende Verfügbarkeit von PUFAs gekoppelt an Phospholipide (PL) (PUFA-PLs), um Radikale herzustellen, die den speziellen Zelltod auslösen. Diese Herstellung kann enzymatisch und nicht-enzymatisch erfolgen (Galluzzi et al., 2018). Die Zellmembranen von Säugetieren sind reich an Phospholipiden, die an Fettsäuren gekoppelt sind. Vor allem die ungesättigten Fettsäuren sind hierbei anfällig für freie Radikale oder Oxidationen durch Enzyme (Dixon & Stockwell, 2019). PUFAs aus der Membran oder auch Zytosol werden durch die Acyl-CoA-Synthetase 4 (ACSL4) mit Acyl-CoA verbunden und somit aktiviert (**Abbildung 5**). Im Anschluss wird von dem Enzym Lysophosphatidylcholin-Acyltransferase 3 (LPCAT3) ein PL angehängt und das Produkt mit Hilfe der LOX unter Eisenbindung oxidiert (Abeyasinghe et al., 1996; Jiang et al., 2021). LOX können PUFAs auch direkt in der Membran oxygenieren und könnten deswegen einen Initiator der Reaktion darstellen (Jiang et al., 2021). Dabei trägt vor allem die LOX 15 zur Lipid-Peroxydation bei, die zum anschließenden Zelltod führt (Yang et al., 2016). Generell kann die Lipid-Peroxydation von PUFA-PLs in drei Phasen unterteilt werden: Die Initiierung, Propagation und Termination. Die nicht-enzymatische Lipid-Peroxydation startet mit einem Radikal, das ein Wasserstoff-Atom aus dem PUFA-PL entfernt und zur Entstehung eines Phospholipid-Radikals (PL●) führt (Jiang et al., 2021). Dieses reagiert während der Propagation mit molekularem Sauerstoff zu einem Phospholipid-Peroxyradikal (PLOO●) und entfernt ein Wasserstoff-Atom von der nächsten PUFA-PL. Dabei entstehen Phospholipid-Hydroperoxide (PLOOHs) (Conrad & Pratt, 2019; Jiang et al., 2021). Folglich können die entstandenen PUFA-PLs, PLOOHs sowie Radikale (PL●, PLOO●) zu einer Verdünnung, Verformung bis hin zur Formation von Poren und Auflösung der Zellmembran führen (Agmon et al., 2018; Jiang et al., 2021). Das initiierende Radikal, dass die Reaktion startet, kann als Hydroxyl-Radikal ( $\text{OH}^\bullet$ ) aus der Fenton-Reaktion stammen, bei der Hydrogenperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) unter der Verwendung von Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ) um ein Elektron reduziert wird und ein

Hydroxyl-Radikal entsteht (Conrad & Pratt, 2019; Winterbourn, 1995, 2013). Diese Reaktion generiert immer mehr PLOOHs, außer es kommt zur dritten und letzten Phase, der Termination, bei der zwei Peroxylradikale zu Alkohol, Sauerstoff und einer Carbonylverbindung reagieren (Conrad & Pratt, 2019).

Das zweite Merkmal ist die Eisenabhängigkeit. Freies Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ), für die Fenton-Reaktion verwendetes Eisen und Eisen-enthaltende LOX sind verantwortlich für die Oxidation der PU-FAs und die Entstehung von Phospholipid-Hydroperoxiden, die zur ROS-Entstehung beitragen (Abeyasinghe et al., 1996; Galluzzi et al., 2018; Jiang et al., 2021). Das Eisen gelangt als Eisen-Transferrin-Komplex mit Hilfe des Transferrin-1-Rezeptors (TfR1) ins Zellinnere und wird anschließend im Lysosom aus dem Komplex gelöst, bevor es ins Zytosol entlassen wird. Dort wird es als Ferritin in sogenannten „Nanocages“ gelagert (Dixon & Stockwell, 2019). Aus diesen gelangt es bei Induktion der Ferroptose mit Hilfe der Aktivierung von Autophagie. Hierbei kommt es durch den nukleären Rezeptor Ko-Aktivator 4 (NCOA4) zur Autophagie und Degradation des Ferritins. Diese NCOA4-vermittelte Autophagie wird auch Ferritinophagie genannt und reguliert die intrazelluläre Eisen-Homöostase und damit ROS-Generierung (**Abbildung 5**) (Gao et al., 2016; Hou et al., 2016; Mancias et al., 2014). Diese Autophagie ist essenziell für Ferroptose, denn eine pharmakologische und genetische Inhibition von Autophagie, inhibierte auch die Ferroptose-assoziierte lipide ROS-Akkumulation signifikant (Gao et al., 2016). Der NCOA4-Rezeptor spielt ebenfalls eine wichtige Rolle, wie in mehreren Versuchen dargestellt werden konnte: NCOA4-knockout Zellen zeigten eine limitierte durch Erastin-eingeleitete Zell-tod-Rate/ Ferroptose, erniedrigte Eisen-Konzentrationen und erhöhte GSH-Konzentrationen. Dahingegen zeigten NCOA4-überexprimierende Zellen eine erhöhte durch Erastin-eingeleitete Zell-tod-Rate/ Ferroptose, erhöhte Eisen-Konzentrationen und erniedrigte GSH-Konzentration. Diese Ergebnisse weisen wiederum auf den Zusammenhang von Eisen und GSH sowie deren Beitrag zur ROS-Generierung hin (Hou et al., 2016).

Das dritte „Hallmark“ beschreibt den Verlust des Eliminationssystems von Hydroperoxiden. Es fängt an mit dem bereits beschriebenen Import von Cystin durch den Cystin-Glutamat Transporter, der aus den Untereinheiten SLC7A11 und SLC3A2 besteht und auch  $x_c^-$ -System genannt wird (Huang et al., 2005). Nach Umwandlung durch die Thioredoxin-Reduktase 1 (TXNRD1) wird das entstandene Cystein für die Herstellung von GSH verwendet (Jiang et al., 2021; Ratan & Baraban, 1995). Dieses fungiert wiederum als Kofaktor für GPX4 bei der Reduktion von PLOOHs zu den entsprechenden Alkoholen (PLOHs). Eine Inhibition von GPX4 löst in vielen Zelltypen Ferroptose aus (Jiang et al., 2021). Einige Tumorzellen zeigen jedoch keine Ferroptose nach GPX4-Inhibition. Der Grund könnte eine Kompensation durch Aktivierung alternativer antioxidativer Wege sein. Einer dieser Wege beinhaltet das Flavoprotein Apoptose-induzierender Faktor Mitochondrium-assoziiert 2 (AIFM2), das zuvor als pro-

apoptotisch betrachtet wurde, jedoch eine anti-apoptotische Wirkung aufweist (Doll et al., 2019). Aufgrund der schützenden Wirkung einer Überexpression des Proteins gegenüber pharmakologisch und genetisch induzierter Ferroptose erfolgte die Umbenennung von AIFM2 in Ferroptose-Suppressor-Protein 1 (FSP1) (Bersuker et al., 2019; Doll et al., 2019). Durch die Reduktion von Ubiquinon zu Ubiquinol und die Reduktion von dem  $\alpha$ -Tocopheryl-Radikal (Vitamin E) zu  $\alpha$ -Tocopheryl, generiert FSP1 zwei starke Antioxidantien, die Lipid-Radikale reduzieren oder die Lipid-Auto-Oxidation direkt stoppen können (Jiang et al., 2021).

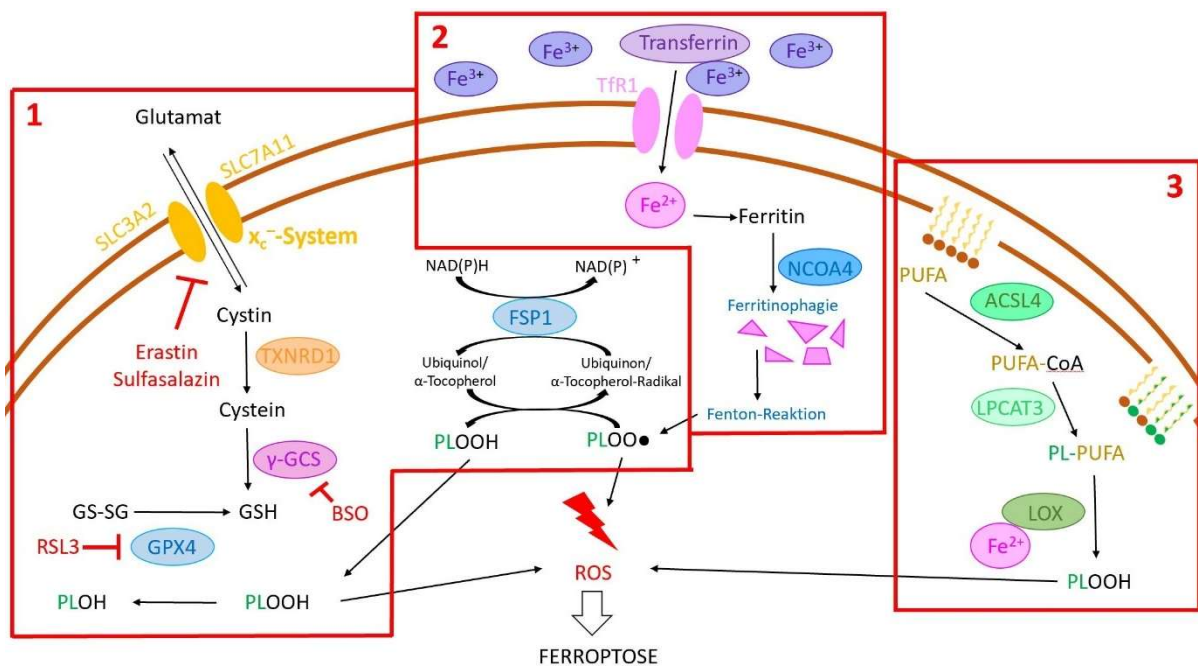
Zwei Ferroptose-Induktoren, auf die genauer eingegangen wird, greifen in das vorherige erwähnte Hyperoxid-Eliminationssystem ein: Erastin ist ein potenter Inhibitor des Cystin-Import durch das  $x_c^-$ -System. Durch den folgenden Cystein-Mangel kann kein GSH mehr hergestellt werden und es fehlt der Ko-Faktor für GPX4 (Dixon et al., 2012; Dixon et al., 2014; Dixon & Stockwell, 2019). Ein anderer Ferroptose-Induktor ist RAS-selektiv Letal 3 (RSL3) (Yang et al., 2016). Dieser hemmt GPX4 direkt und verhindert somit die Reduktion der PLOOHs (Yang et al., 2014).

### Abbildung 5 Ferroptose-Mechanismen

Die drei „Hallmarks“ der Ferroptose näher erläutert. **1:** Das erste Merkmal involviert die Glutathionperoxidase 4 (GPX4) und ihre antioxidative Wirkung, durch die Phospholipid-Hydroperoxide (PLOOH) zu ungefährlichen Phospholipid-Alkoholen (PLOH) mit der Hilfe von Glutathion (GSH) reduziert werden. Das Ferroptose-Suppressor-Protein 1 (FSP1) generiert durch die Reduktion von Ubiquinol zu Ubiquinol und die Reduktion von dem  $\alpha$ -Tocopheryl-Radikal (Vitamin E) zu  $\alpha$ -Tocopheryl zwei Antioxidantien, die Radikale, wie das Phospholipid-Peroxyradikal (PLOO $\bullet$ ), reduzieren können. **2:** Das zweite Merkmal beschreibt die Aktivierung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) durch Acyl-CoA-Synthetase 4 (ACSL4) und die Bindung and Phospholipide durch die Lysophosphatidylcholin-Acyltransferase (LPCAT3), gefolgt von einer Oxidation zu PLOOH durch die Lipid-Oxygenase (LOX) unter Eisen-Konsum. Das Produkt wird von ACSL4 entweder wieder direkt in die Membran eingebaut, was zu Membran-Verdünnung und -Verformung führen kann oder für die Generierung von reaktiven oxygenen Spezies (ROS) genutzt wird. **3:** Das dritte „Hallmark“ hängt mit einer höheren Verfügbarkeit von intrazellulärem Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ) zusammen, die durch die Hochregulation von Transferrin-1-Rezeptors (TfR1) oder erhöhter Ferritinophagie, welche durch nukleären Rezeptor Ko-Aktivator 4 (NCOA4) eingeleitet wird, erreicht werden kann.

Direkte Ferroptose-Induktoren sind Erastin und Sulfasalazin, die das  $\text{x}_c^-$ -System inhibieren. Buthionin Sulfoximin (BSO) verhindert die GSH-Produktion durch Blockierung der  $\gamma$ -Glutamylcysteine Synthetase ( $\gamma$ -GCS) und inhibiert GPX4 somit indirekt. Ein direkter Inhibitor der GPX4 ist 1S,3R-RSL3 (RSL3).

Weitere Abkürzungen: Thioredoxin-Reduktase 1 (TXNRD1).



### **3.2.4 Ferroptosemarker**

Bis jetzt wurden noch keine spezifischen Ferroptosemarker beschrieben. Lediglich bedeutende Onko-Proteine und Tumorsuppressoren, die Ferroptose regulieren, konnten identifiziert werden (Jiang et al., 2021). Auf zwei wird im Folgenden näher eingegangen. Jedoch sind diese nicht exklusiv für den Ferroptose-Prozess und wirken in zahlreichen weiteren Signalkaskaden mit.

#### **GPX4**

GPX4 wird oft als das Schlüsselenzym der Ferroptose beschrieben (Jiang et al., 2021). Der Effekt des Selenoproteins wurde bereits 1982 entdeckt (Thomas et al., 1990; Ursini et al., 1982). Bei Inhibition oder Funktionsverlust von GPX4 kommt es zur Akkumulation von ROS und dadurch Einleitung des Zelltods. Insbesondere Tumorzellen exprimieren GPX4 als Schutzmechanismus gegen oxidativen Stress, was ihnen ermöglicht zu überleben (Hangauer et al., 2017). Deswegen könnte dieses Protein als aussichtsreicher Ansatz dienen, um gezielt Tumorzellen zu eliminieren und somit Rezidive zu verhindern (Hangauer et al., 2017). Aufgrund der essenziellen Rolle für das antioxidative System, wurde GPX4 als erster Ferroptosemarker ausgewählt.

#### **ACSL4**

Der zweite ausgewählte „Ferroptosemarker“ ist ACSL4. Als Aktivator von PUFAs trägt ACSL4 zur Generation von PLOOHs, die den Ferroptose-Zelltod einleiten, erheblich bei (Jiang et al., 2021). Des Weiteren wurde ACSL4 als wichtiger Vorhersagefaktor für Ferroptose-Sensitivität beschrieben. Im Gegensatz zum GSH-Level,  $x_c^-$ -System- und GPX4-Aktivität, korrelierte nur die ACSL4-Expression mit der Ferroptose-Sensitivität in Brustkrebs-Zelllinien (Doll et al., 2017). Infolgedessen wurde ACSL4 als zweiter Ferroptosemarker ausgewählt.

### **3.2.5 Therapiemöglichkeiten**

Dass Eisen-Akkumulation bei neurodegenerativen Erkrankungen auftritt, ist bereits seit längerem bekannt (Magtanong & Dixon, 2018; Masaldan et al., 2019; Rouault, 2013). Seit Ferroptose als eigenständige Art von Zelltod gilt, stellt sich die Frage, ob diese in Krankheiten wie Alzheimer, Parkinson oder Huntington eine Rolle spielt. Versuche mit GPX4-knockout Mäusen und Vitamin E-ärmer Ernährung, zeigten erhöhte hippokampale Neurodegeneration (Hambricht et al., 2017). Die Neuronen-spezifische Ablation der Expression von Selenoproteinen (mitunter GPX4) führte zu neurodegenerativen Prozessen im Kortex und Hippocampus. Deswegen wird der veränderte Redox-Stoffwechsel als Grund für Entstehung mehrerer neurodegenerativer Erkrankungen diskutiert (Wirth et al., 2010). Eventuell könnte die

Verhinderung von Ferroptose bei neurodegenerativen Erkrankungen eine neue Therapiemöglichkeiten bieten, welcher den neuronalen Zelluntergang mit Ferroptose-Inhibitoren verhindert (Jiang et al., 2021).

Bei Parkinson-Patienten und -Patientinnen wurde neben der Degeneration der dopaminergen Neurone in der Substantia nigra, eine Eisen-Akkumulation und ein GSH-Verlust in den Autopsien festgestellt; vor allem in den Makrophagen, Astrozyten und reaktiven Mikroglia (Jellinger et al., 1990; Sian et al., 1994). Sogar in präsymptomatischen Stadien konnte eine erhöhte Eisen-Konzentration mithilfe MRT-Relaxometrie erkannt werden (Pyatigorskaya et al., 2015). Des Weiteren fällt durch die Verstoffwechselung von Dopamin, dessen Produktion bei Parkinson-Patienten und -Patientinnen vermindert ist, ROS an. Die Eisen-Akkumulation, der GSH-Verlust und die ROS-Produktion würden die Mitwirkung von Ferroptose andeuten (Lewerenz et al., 2018). Eisen-Chelatoren könnten deswegen einen neuen therapeutischen Effekt bei Parkinson bieten (Devos et al., 2014).

Ebenso zeigte sich die Eisen-Konzentration sowohl in hochauflösenden 7 Tesla T2-gewichteten MRT-Bildern des Kortex von Alzheimer-Patienten und -Patientinnen als auch ex vivo in immunhistochemischen Färbungen erhöht (Bulk et al., 2018; van Rooden et al., 2015). Die Eisen-Akkumulation bei frühmanifestem Alzheimer war zudem höher als bei spätmanifestem, was auf den Amyloid-Stoffwechsel zurückgeführt werden kann (van Rooden et al., 2015). Zudem steht bei der Alzheimer-Krankheit der oxidative Stress im Vordergrund, der lange vor den Symptomen beginnt und für einen großen Teil des Zelluntergangs verantwortlich ist (Bonda et al., 2010; Ran et al., 2004). Das anfallende ROS könnte auf eine stattfindende Ferroptose hindeuten.

Darüber hinaus bieten die Mechanismen der Ferroptose zahlreiche neue Therapieansätze gegen Krebserkrankungen. Dixon und Stockwell (2019) verfolgen die Strategie, Ferroptose gezielt in Tumorzellen zu induzieren, um in möglichst vielen dieser Zellen den programmierten Zelltod herbeizuführen. Dieser Ansatz basiert auf der oft beschriebenen Eigenschaft von Krebszellen, in einem bereits eisenreichen Umfeld zu existieren. Dafür ist es erforderlich, ein Ungleichgewicht zwischen der Detoxifizierung von Lipid-Hydroperoxiden und der eisenabhängigen Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) herzustellen (Dixon & Stockwell, 2019).

Eine Möglichkeit dies zu erreichen, ist die Erhöhung der intrazellulären Eisen-Konzentration. Dafür kann in manchen Zellen eine Exposition an erhöhtem Eisen extrazellulär ausreichen, welches in die Zelle gelangt und die ROS-Entstehung unterstützt (Dixon & Stockwell, 2019).

Ein anderer Weg beschreibt die Inhibition der GPX4-Expression durch Manipulation der Synthese des Enzyms oder direkte Hemmung. Für die Synthese des Selenoproteins wird Selenocystein benötigt, das während des Prozesses an eine tRNA geheftet wird. Dieser Komplex

verwendet Isopentenyl-Pyrophosphat aus dem Mevalonat-„Pathway“, um korrekt übersetzt zu werden (Dixon & Stockwell, 2019). Die Statine Fluvastatin, Lovastatin und Simvastatin, hemmen das Enzym 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-Koenzym A Reduktase (HMGCR) dieses „Pathways“. Dies würde erklären, warum es in einigen mesenchymalen Tumorzellen, die mit Statinen behandelt wurde, zu dem Verlust von GPX4 und einer erhöhten Ferroptose-Sensitivität kommt. Im Gegensatz zu dem direkten GPX4-Inhibitor RSL3, konnten die Zellen durch lipophile Antioxidantien jedoch nicht gerettet werden (Viswanathan et al., 2017).

Altretamin ist ein weiterer GPX4-Inhibitor, der als Tumor-Therapeutikum bereits zugelassen ist. Ähnlich zu Sulfasalazin (SSZ), welches das  $x_c^-$ -System und damit über den Zystin-Import die GSH-Synthese hemmt, führt Altretamin zu einer ROS-Akkumulation (Woo et al., 2015). Der Mechanismus wird hier aber auf eventuelle antineoplastische Aktivität zurückgeführt, da die GSH-Level nach Gabe nicht fielen (Woo et al., 2015).

Bei der dritten Möglichkeit Ferroptose-Sensitivität herbeizuführen, wird die GPX4-Aktivität inhibiert (Dixon & Stockwell, 2019). Die GPX4 wandelt mithilfe des Verbrauchs von GSH als Kofaktor PUFA-PLs in unschädliche Alkohole um.

Durch Inhibition der GSH-Synthese kann somit Ferroptose induziert werden. Buthionin Sulfoximin (BSO) kann durch Hemmung der  $\gamma$ -Glutamat-Cystein-Ligase ( $\gamma$ -GCS), die Entstehung von GSH verhindern und führt in vivo zu Verlust von GSH, mit dem niedrigsten Level an GSH 60h nach Gabe (Bailey et al., 1994).

Eine Verringerung der Cystein-Konzentration durch Inhibition des Imports bietet eine weitere Option die GPX4 indirekt zu hemmen. Das Cystein wird über das  $x_c^-$ -System, den Cystein-Glutamat-Antiporter, in die Zelle geschleust und zur Synthese von GSH verwendet. Die Aktivität und Transkription des Antiporters ist in einigen Krebsformen, unter anderem in gastrointestinalen und Brusttumoren, hochreguliert (Ishimoto et al., 2011; Timmerman et al., 2013). Des Weiteren zeigen Brustkrebs-Zellen nach  $x_c^-$ -System-Inhibierung durch SSZ, weniger Wachstum (Timmerman et al., 2013).

Auf Empfehlung des Nationalen Krebs-Instituts für therapeutische Entwicklungen aus Amerika (US National Cancer Institute Developmental Therapeutics Program) wurden Krebs-Zelllinien aus acht unterschiedliche Gewebe-Arten auf ihre Ferroptose-Empfindlichkeit untersucht (Mou et al., 2019).

Besonders anfällig auf Erastin-induzierte Ferroptose waren diffuse großzellige B-Zell Lymphome und Nierenzell-Karzinome (Yang et al., 2014). Die hohe Anfälligkeit der diffus großzelligen B-Zell Lymphome könnte mit dem hohen extrazellulären Cystin erklärt werden, das für das Zellüberleben nötig ist und nach Gabe von Ferroptose-Induktoren angegriffen wird (Mou et al., 2019). Des Weiteren zeigten Lymphom-Patienten und -Patientinnen, die GPX4

exprimierten, was in 35,5% der Fälle zutraf, eine schlechtere Prognose (Kinowaki et al., 2018). Dies deutet daraufhin, dass GPX4 den ROS-vermittelten Zelltod, Ferroptose, in diesen Lymphomen verhindert und somit ein guter Angriffspunkt in der Therapie des diffus großzelligen B-Zell-Lymphom wäre (Kinowaki et al., 2018). Neben kolorektalen und gastralen Krebs-Zelllinien, war Ferroptose auch in Ovar Krebszellen auslösbar (Basuli et al., 2017; Hao et al., 2017; Xie et al., 2017). Eine Erklärung dafür könnten die Tumor-initiierenden Zellen in Ovarialkrebs sein, die eine exzessive Eisen-Ansammlung mit überexprimierten TfR1 und erniedrigten Konzentration an Eisen-Efflux Pumpen zeigen (Basuli et al., 2017; Mou et al., 2019).

Folglich wurden unterschiedliche Medikamente auf ihre Fähigkeit Ferroptose auszulösen untersucht (Mou et al., 2019). Eines der untersuchten Chemotherapeutika ist SSZ, welches das  $x^+$ -System inhibiert. Die Expression des Systems unterliegt einem zirkadianen Rhythmus. Infolgedessen zeigte die SSZ-Gabe während des Zeitraums, in dem die Expression des  $x^+$ -Systems hochreguliert war (zwischen 17.00 und 21.00 Uhr), eine verstärkte Wirkung (Okazaki et al., 2017).

Ein weiteres Medikament ist Artesunat, welches normalerweise gegen Malaria eingesetzt wird. Es induziert selektiv in Kopf- und Halstumor-Zellen Ferroptose über ROS-Akkumulation. In Cisplatin-resistenten Kopf-Hals-Tumoren zeigt Artesunat jedoch nur geringe Wirkung. Dies kann auf die Aktivierung des Nrf2-Antioxidans Antwort-Element-Signalübertragungs-Weg zurückgeführt werden, der die Produktion von Ferroptose-resistente Zellen anregt. Eine Ausschaltung des Nrf2-Gens in Kombination mit Artesunat, führt zu einer Vernichtung der resistenten Kopf-Hals-Tumor-Zellen in vitro und in vivo (Roh et al., 2017).

Das Chemotherapeutikum Cisplatin löst ebenfalls Ferroptose in zwei Zelllinien aus. Der induzierte Zelltod kann mit den Ferroptose-Inhibitoren Deferoxamin und Ferrostatin-1 teils rückgängig gemacht werden. Cisplatin hemmt Glutathionperoxidasen (GPXs) und bindet an GSH, welches damit unbrauchbar wird (Guo et al., 2018).

### **3.2.6    Ansatz in Bezug auf GBM und TMZ**

Das bereits erwähnte Chemotherapeutikum TMZ, das vor allem bei Gliomen zum Einsatz kommt, könnte in Zusammenhang mit Ferroptose stehen, beziehungsweise diese eventuell sogar auslösen. Die genauen Mechanismen, die bei TMZ-Gabe zu ROS-Akkumulation und zu einer Art Autophagie-induzierten Zelltod führen, eventuell Ferroptose, sind bis heute im Detail unbekannt (Chen et al., 2015).

TMZ führt über unterschiedliche Mechanismen zu einer Steigerung an ROS. Diese sollen DNA-vermittelt sein (Zhang et al., 2010). Lin *et al.* beschrieben die Autophagie, die nach TMZ-Gabe durch die Akkumulation von ROS und die Aktivierung der extrazellulären Signal-

regulierten Kinase hervorgerufen wird (Lin et al., 2012). Diese Autophagie kann jedoch protektiv für das Zellüberleben oder zytotoxisch bis zum Zelltod verlaufen. Welche Voraussetzungen bestimmen, welche Art von Autophagie eingeschlagen wird, ist bis jetzt unklar (Xie et al., 2023; Yan et al., 2016). Eine kurze, niedrig-dosierte TMZ-Therapie soll zu protektiver Autophagie zum Überleben und eine langzeitige, hoch-dosierte TMZ-Therapie eher zu einer Autophagie, die den Zelltod einleitet, führen (Yan et al., 2016).

Des Weiteren soll TMZ das  $x_c^-$ -System in Gliom-Zellen induzieren und damit zu erhöhter GSH-Konzentration führen (Chen et al., 2015). Deswegen führte die Gabe von BSO, die die GSH-Synthese hemmt, zu einer Aufhebung der Therapie-Resistenz in GBMs (Chen et al., 2015). In einigen Gliom und GBM-Patienten und -Patientinnen ist das SLC7A11-Gen hochreguliert und mit einer negativen Prognose verbunden (Robert et al., 2015; Wan et al., 2023). Eine Kombination aus TMZ und Erastin, welches das induzierte  $x_c^-$ -System inhibiert, wäre folglich eine vielversprechende Therapie für Glioblastom-Patienten und -Patientinnen (Chen et al., 2015).

In GBMs sowie in anderen Tumoren wird ein abnormaler Eisenstoffwechsel registriert, der unter anderem für das hypermetabolische Wachstum verantwortlich ist (Park et al., 2009; Wan et al., 2023). Zudem sind Ferroptose-resistente Gene, beispielsweise GPX4, hochreguliert und verhindern damit den ferroptotischen Zelltod. Ferroptose-Induktoren könnten diesen Prozess eventuell reversibel machen. Deswegen könnte die bereits erwähnte Kombination aus Ferroptose-Induktoren und Chemotherapie-Medikamenten ein vielversprechender Ansatz sein (Wan et al., 2023). Die Ferroptose-induzierenden Verbindungen werden in drei Klassen eingeteilt: 1.  $x_c^-$ -System / SLC7A11-Inhibitoren (Erastin), 2. GPX4-Inhibitoren (RSL3) und 3. Verbindungen, die den Eisen-Transport und das frei verfügbare labile Eisen beeinflussen (Gaschler et al., 2018; Huang et al., 2022; Wan et al., 2023).

## 4. Material und Methodik

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Patientenkollektiv

Aus der Datenbank des Instituts für Pathologie der Technischen Universität München wurde eine Zufallsauswahl an Gehirntumor-Proben von 24 Patienten und Patientinnen aus den Jahren 2003 bis 2017 getroffen. Die Einschlusskriterien waren, wie folgt:

1. Diagnose eines Glioblastom ZNS-WHO-Grad 4 (IDH-Wildtyp) durch einen Facharzt oder eine Fachärztin für Neuropathologie, entsprechend den aktuellen diagnostischen Kriterien der ZNS-WHO 2021 erneut überprüft (Louis et al., 2021).
2. Diagnose eines rezidivierenden Glioblastom ZNS-WHO-Grad 4, IDH-Wildtyp durch einen Facharzt für Neuropathologie.
3. Therapie mit dem Chemotherapeutikum TMZ zwischen Erstdiagnose und Rezidiv.

Das Patienten und Patientinnen-Kollektiv umfasste 24 Patienten und Patientinnen, von denen 7 weiblich (29%) und 17 männlich (71%) waren. Das Alter bei Erstdiagnose lag im Median bei 58 Jahren mit einer Bandbreite von 27 bis 78 Jahren (Tabelle 1). Alle Patienten und Patientinnen erhielten eine Therapie nach Stupp-Schema, die aus sechs Wochen kombinierte Radiochemotherapie, gefolgt von bis zu sechs Zyklen alleiniger TMZ-Therapie bestand (Stupp et al., 2005). Die Diagnosen wurden anhand der Kriterien der ZNS-WHO gestellt (Louis et al., 2021). Des Weiteren wurden die klinischen Informationen über das Krankenhaus Informationssystem und der MGMT-Promoter-Status über das Informationssystem des Pathologischen Instituts gesammelt. Der MGMT-Promoter-Status wurde mit Hilfe der Methylierung-Quantifikation der Endonuklease-resistenter DNA (MethyQUESD) -Methode bestimmt (Bettstetter et al., 2008).

Aufgrund der Verfügbarkeit von Material wurden 24 Pärchen für die IHC-Färbungen von ACSL4, GPX4 und ALDH1A3 sowie für die Doppelimmunfluoreszenz mit GFAP und Iba1 verwendet. Für die Untersuchung der FSP1-Expression wurden 13 Pärchen analysiert. Zudem wurden fünf Pärchen für die Doppelimmunfluoreszenz von GPX4 und ACSL4 untersucht.

Darüber hinaus wurden die Gen-Expressions-Veränderungen von ACSL4 und GPX4 zwischen Primär- und Rezidiv-GBM Patienten und Patientinnen mit Hilfe einer Transkriptom-Profil-Datenanalyse untersucht. Die Datensätze und klinischen Informationen wurden von der offiziellen Seite des Krebs Genom Atlas (TCGA= The Cancer Genome Atlas) übernommen (<https://portal.gdc.cancer.gov>). Insgesamt waren sechs Primär- und Rezidiv-GBM Paare verfügbar (TCGA-06-0210, TCGA-06-0190, TCGA-19-4065, TCGA-14-1034, TCGA-06-0125, TCGA-06-0211). Für jeden dieser Patienten und Patientinnen waren sechs bis neun Transkriptom-

Profile, inklusive der Gen-Quantifikation-Expression, vorhanden. Folgend wurde die Gen-Expression von ACSL4 und GPX4 der Primär-Tumore mit dem passenden Rezidiv-Tumor verglichen und mit Hilfe des natürlichen Logarithmus der Gen-Quantifikation-Expression ( $\ln(\text{expression value})$ ) dargestellt.

Diese retrospektive Studie wurde vom lokalen Ethik-Komitee der Technischen Universität München (Antragsnummer 164/19 S-SR) zugelassen und entspricht den ethischen Standards der Deklaration von Helsinki von 1964 und allen späteren Änderungen.

**Tabelle 1** Übersicht über Patienten und Patientinnen sowie Tumoren Charakteristika

24 Patienten und Patientinnen wurden inkludiert. J = Jahr, M = Monat, MGMT = O-6-Methylguanin-DNA Methyltransferase.

|                                                                       |                  |         |
|-----------------------------------------------------------------------|------------------|---------|
| Geschlecht                                                            | Männlich         | 17      |
|                                                                       | Weiblich         | 7       |
| Alter bei Erstdiagnose                                                | Median           | 65 J    |
|                                                                       | Bandbreite       | 27-78 J |
| PFS/ Rezidiv-freies Intervall                                         | Median           | 9 M     |
|                                                                       | Bandbreite       | 3-53 M  |
| OS/ Gesamtüberleben                                                   | Median           | 18 M    |
|                                                                       | Bandbreite       | 9-71 M  |
| Zeit zwischen Rezidiv und Tod                                         | Median           | 11 M    |
|                                                                       | Bandbreite       | 3-56 M  |
| MGMT-Promoter-Status<br>(verfügbar von 22 Patienten und Patientinnen) | methyliert       | 5       |
|                                                                       | Nicht methyliert | 17      |

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Fertigen der Schnitte

Die ausgewählten, in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten (FFPE= Formalin-Fixed Paraffin-Embedded) Blöcke wurden nach kurzer Kühlung in ein Mikrotom eingespannt und in 2 µm dicke Scheiben geschnitten. Anschließend wurde der Schnitt mit Hilfe eines Pinsels in ein 45°C warmes Wasserbad überführt und glatt auf einen Objektträger aufgezogen.

### 4.2.2 Immunhistochemie

Es wurde die indirekte Methode der Immunhistochemie (IHC), mit Hilfe des Avidin-Biotin-Komplexes (ABC), angewandt. Hierbei wurde das nachzuweisende Antigen zuerst mit einem Primärantikörper detektiert, an den sich anschließend ein biotinylierter Sekundärantikörper anheftete. Das tetramere Glykoprotein Avidin band einmal an den biotinylierten Sekundärantikörper sowie mit den restlichen drei freien Bindungsstellen an eine Biotin-markierte Peroxidase. Die unter dem Mikroskop sichtbaren braunen Punkte entstanden durch Hinzugabe des Substrates der Peroxidase, dem Chromogen 3,3-Diaminobenzidin (DAB) und repräsentierten die Stellen, an denen sich das gesuchte Protein befand.

Zuerst wurden die Schnitte in Xylol deparaffinisiert (3x 5min), bevor sie die absteigende Alkoholreihe (2x 5min 96%, 1x 5min 70%) durchliefen. Anschließend konnten die Schnitte in destilliertem Wasser (Aqua dest.) rehydrieren (5min). Die Demaskierung der Epitope erfolgte in Citratpuffer bei pH 6,0, in dem die Schnitte 30 bis 40 Minuten im Dampfgarer gekocht wurden. Nach kurzem Abkühlen in Aqua dest. (5-10min) und Markieren des Gewebes auf dem Objektträger mit einem Fat-Pen, wurde die endogene Peroxidase mit 1,5% Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) (verdünnt in Aqua dest.) geblockt (10min). Um unspezifische Proteinbindungen zu vermeiden, inkubierten die Schnitte nach dem Waschen (5x 3min Aqua dest.) in einem Gemisch aus Blocking Puffer und Avidin (2 Tropfen Avidin/ 2ml Blocking Buffer) (30min). Danach wurden die Schnitte ein erstes Mal in der Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS) gewaschen (2x). Nun wurde der erste Antikörper, verdünnt in Blocking Buffer und Biotin (1 Tropfen Biotin/ 1ml Blocking Buffer), auf die Schnitte aufgetragen und bei 4°C über Nacht zum Inkubieren in den Kühlschrank gestellt. Nach erneutem Waschen in PBS (2x), inkubierte der zweite Antikörper in einer Verdünnung von 1:400 mit Blocking Puffer (30min) (**Tabelle 2**). In dieser Zeit wurde das ABC-Kit vorbereitet, das im Anschluss nach PBS (3x) auf die Schnitte gegeben wurde (30min). Die an den Avidin-Biotin-Komplex gebundene Peroxidase wurde anschließend durch das Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) sichtbar gemacht. Dabei wurde jeder Schnitt einzeln mit DAB bedeckt und direkt im Anschluss unter dem

Mikroskop begutachtet. Sobald einzelne positive braune Punkte ausgemacht werden konnten, wurde die Reaktion in Aqua dest. abgestoppt. Es folgte erneutes Waschen (3x 3min Aqua dest.) und die Gegenfärbung der Zellkerne und des Gewebehintergrunds mit Hämatoxylin (5min). Für das Abwaschen wurde Leitungswasser verwendet. Zur Dehydrierung durchliefen die Schnitte die Alkoholreihe nun aufsteigend (1x 3min 70%, 2x 3min 96%). Abschließend wurden die Schnitte nach fünf Minuten in Xylol, mit Pertex-Eindeckmedium eingedeckelt.

### **Auswertung**

Die zytoplasmatische Färbung wurde mit Hilfe des Immunreaktiven Scores von Remmele und Stegner analysiert (Remmele & Stegner, 1987). Der Score ist das Produkt aus dem Prozentsatz an positiven Zellen (0 = 0%, 1 = <10%, 2 = 10-50%, 3 = 51-80%, 4 ≥ 80%) und der Färbungs-Intensität (0 = keine Anfärbung, 1 = schwach, 2 = moderat, 3 = stark positiv). Drei zufällig gewählte Tumor-enthaltende Sichtfelder wurden in einer 600x Mikroskop Vergrößerung (Okular 10x, Objektiv 60x) begutachtet und der Mittelwert des Scores berechnet. Als Positivkontrollen wurden menschliches Leber- (für ACSL4, ALDH1A3 und FSP1) und Nieren- (für GPX4) Gewebe verwendet.

### **4.2.3 Immunfluoreszenz**

Auch bei der Immunfluoreszenz (IF) wurde die indirekte Methode über einen Sekundärantikörper angewandt, der gegen den ersten Antikörper gerichtet war und an den Fluorescein gekoppelt wurde.

Zuerst wurden die Schnitte in Xylol deparaffinisiert (3x 5min), bevor sie die absteigende Alkoholreihe (2x 5min 96%, 1x 5min 70%) durchliefen. Anschließend konnten die Schnitte in Aqua dest. rehydrieren (5min). Die Demaskierung der Epitope erfolgte wieder in Citratpuffer bei pH 6,0 für 30 bis 40 Minuten im Dampfgerar. Nach kurzem Abkühlen in Aqua dest. (5-10min) wurde das Gewebe auf dem Objektträger mit einem Fat-Pen markiert. Um unspezifische Proteinbindungen zu vermeiden, inkubierten die Schnitte nach dem Waschen (5x 3min Aqua dest.) 30 Minuten lang in Blocking Puffer. Danach wurden die Schnitte in PBS gewaschen (2x), der erste Antikörper, verdünnt in Blocking Puffer, auf die Schnitte aufgetragen und bei 4°C über Nacht zum Inkubieren in den Kühlschrank gestellt. Nach erneutem Waschen in PBS (2x) inkubierte der zweite Antikörper in einer Verdünnung von 1:2.000 mit Blocking Buffer für 45 Minuten bei Raumtemperatur (Tabelle 2). Folgend wurde das Vector® TrueVIEW™ Autofluorescence Quenching Kit verwendet, um die Autoimmunfluoreszenz zu reduzieren. Dafür wurden Reagenzien A, B und C in gleichem Verhältnis zueinander (1:1:1) gemischt, auf die Schnitte aufgetragen und inkubierten in Dunkelheit (2-4min). Anschließend

wurden die Schnitte wieder in PBS gereinigt und mit dem im Kit beigelegten speziellen Kleber, der 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) enthält, eingedeckelt.

Dasselbe Prozedere wurde bei der Doppelimmunfluoreszenz von ACSL4 mit GPX4 angewandt. Nur die Inkubationszeit wurde auf zwei Stunden reduziert, um unspezifische Hintergrundfärbung zu vermeiden.

## Auswertung

Die Ferroptose-spezifischen Enzyme wurden in grün-fluoreszierender Farbe markiert, die mit Hilfe des Fluoreszin Isothiocyanat (FITC) Filters bei 488nm detektierbar war. Die Zellmarker wurden mit rot-fluoreszierender Farbe gekennzeichnet, die bei einer Licht-Absorption von 568nm mit dem Rhodon-Filter sichtbar wurde. Die blau-fluoreszierenden Zellkerne wurden mit dem DAPI-Filter sichtbar gemacht.

Folgende Kombinationen an Doppelimmunfluoreszenzen wurden durchgeführt:

ACSL4 und GFAP

ACSL4 und Iba1

GPX4 und GFAP

GPX4 und Iba1

ACSL4 und GPX4

Bei der Auswertung wurde die Anzahl der Zellkerne, die grün-gefärbten Zellen (ACSL4 oder GPX4), rot-gefärbten Zellen (GFAP oder Iba1) sowie koexprimierende Zellen (ACSL4 oder GPX4 mit GFAP oder Iba1 und ACSL4 mit GPX4) gezählt. Drei zufällig gewählte Tumor-enthaltende Sichtfelder wurden in einer 630x Mikroskop Vergrößerung (Okular 10x, Objektiv 63x) begutachtet und der Mittelwert berechnet. Damit wurden folgende Werte erhoben: Die Anzahl der ACSL4- und GFAP-koexprimierenden Zellen geteilt durch die Anzahl GFAP-positiver Zellen ( $ACSL4^+/GFAP^+$ ),  $ACSL4^+/Iba1^+$ ,  $GPX4^+/GFAP^+$  und  $GPX4^+/Iba1^+$ . Des Weiteren wurde der Anteil der Zelltyp-spezifischen Zellen an den Ferroptose-assoziierten Zellen berechnet. Es ergaben sich folgende Anteile: Die Anzahl der ACSL4- und GFAP-koexprimierenden Zellen geteilt durch die Anzahl ACSL-positiver Zellen ( $GFAP^+/ACSL4^+$ ),  $Iba1^+/ACSL4^+$ ,  $GFAP^+/GPX4^+$  und  $Iba1^+/GPX4^+$ .

**Tabelle 2 Verwendete Antikörper**

IF = Immunfluoreszenz, IHC = Immunhistochemie

| <b>Antikörper</b>                 | <b>Hersteller</b>                         | <b>Klonalität</b>                                                                 | <b>Spezies</b> | <b>Verdünnung</b>         |
|-----------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------|---------------------------|
| Anti-ACSL4                        | Santa Cruz, USA                           | Monoklonal, Klon IgG <sub>2b</sub>                                                | Maus           | IHC: 1/100<br>IF: 1/20    |
| Anti-GPX4                         | Abcam, UK                                 | Monoklonal, Klon EPN-CIR144                                                       | Kaninchen      | IHC: 1/3000<br>IF: 1/1000 |
| Anti-ALDH1A3                      | Thermo Fisher Scientific, USA             | Polyklonal                                                                        | Kaninchen      | IHC: 1/1000               |
| Anti-FSP1                         | Hergestellt im Haus                       | IgG2 monoklonaler Antikörper gegen das N-terminale Peptid von hXCT, Klon 3A12-1-1 | Ratte          | IHC: unverdünnt           |
| Anti-GFAP                         | Dako, USA                                 | Monoklonal                                                                        | Maus           | IF: 1/50                  |
| Anti-GFAP                         | Dako, USA                                 | Polyklonal                                                                        | Kaninchen      | IF: 1/500                 |
| Anti-Iba1                         | Abcam, UK                                 | Monoklonal                                                                        | Maus           | IF: 1/500                 |
| Anti-Iba1                         | Wako, USA                                 | Polyklonal                                                                        | Kaninchen      | IF: 1/500                 |
| 2. Antikörper, Anti-Hase          | Vector Laboratories, USA                  | IgG                                                                               | Kaninchen      | IHC: 1/400                |
| 2. Antikörper, Anti-Maus          | Vector Laboratories, USA                  | IgG                                                                               | Maus           | IHC: 1/400                |
| 2. Antikörper, Anti-Ratte         | Vector Laboratories, USA                  | IgG                                                                               | Ratte          | IHC: 1/400                |
| 2. Antikörper, Anti-Maus, IF      | Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific, USA | Polyklonal, (Alexa Fluor 568/ 488)                                                | Maus           | IF: 1/2000                |
| 2. Antikörper, Anti-Kaninchen, IF | Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific, USA | Polyklonal, (Alexa Fluor 568/ 488)                                                | Kaninchen      | IF: 1/2000                |

### 4.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit R Studio (Version 3.6.1) (R Core Team, 2019). Da in dieser Arbeit Primärtumor und Rezidiv des jeweils gleichen Patienten / der gleichen Patientin verglichen wurden, handelt es sich um verbundene Variablen. Da eine Normalverteilung nicht immer gegeben war, wurde der Wilcoxon-Test verwendet, um die Signifikanz der unterschiedlichen Expressions-Veränderungen zu untersuchen. Die TCGA-Daten waren ebenfalls nicht normalverteilt. Deswegen wurde hier nochmals der Wilcoxon-Test angewandt. Korrelationen wurden mit Hilfe des Sperman'schen Rangkorrelationskoeffizienten analysiert. Um die Zusammenhänge der IHC-Ergebnisse mit dem klinischen Überleben zu untersuchen, wurde ein Cut-Off-Wert mit dem ‚coin‘-Paket ermittelt (Hothorn et al., 2008).. Dabei wurde die Unabhängigkeit der Expressions-Veränderung der Antikörper und das Gesamtüberleben gegenüber unterschiedlichen Werten getestet. Anhand dieser Cut-off-Werte wurden die Patienten und Patientinnen in Gruppen eingeteilt und die Ergebnisse in Kaplan-Meier-Kurven dargestellt. Die zugehörigen p-Werte wurden mit der „maxstat“-Funktion des „coin“-Pakets berechnet (Hothorn et al., 2008). Statistische Signifikanz wurde mit einem p-Wert unter 0,05 definiert. Der Z-Wert beschreibt wie viele Standardabweichungen der Wert vom Mittelwert entfernt ist (Khare et al., 2023).

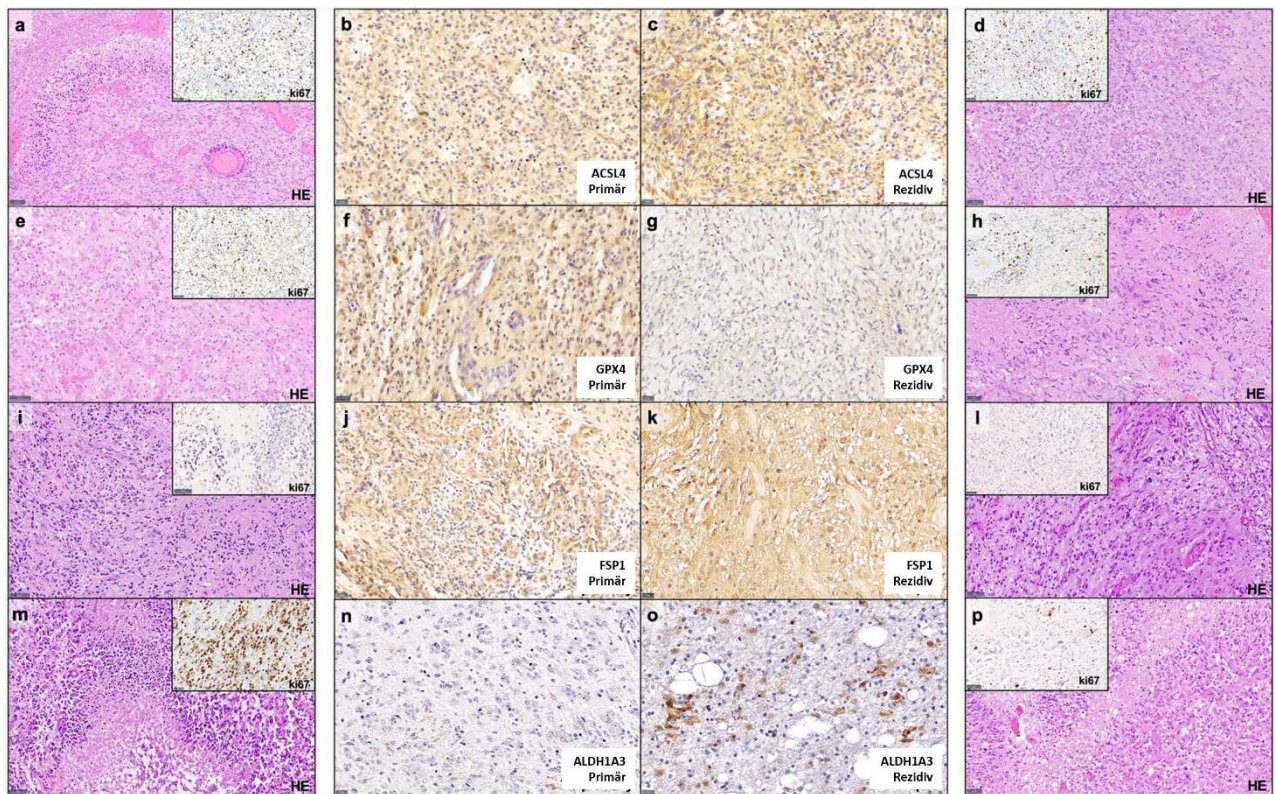
## 5. Ergebnisse

### 5.1 Immunhistochemischer Nachweis der Proteine GPX4, ACSL4, FSP1 und ALDH1A3

Im Folgenden werden die Ergebnisse der IHC mit den Proteinen ACSL4, GPX4, FSP1 und ALDH1A3 präsentiert (**Abbildung 6 und 7, Tabelle 3**) (Kram et al., 2022).

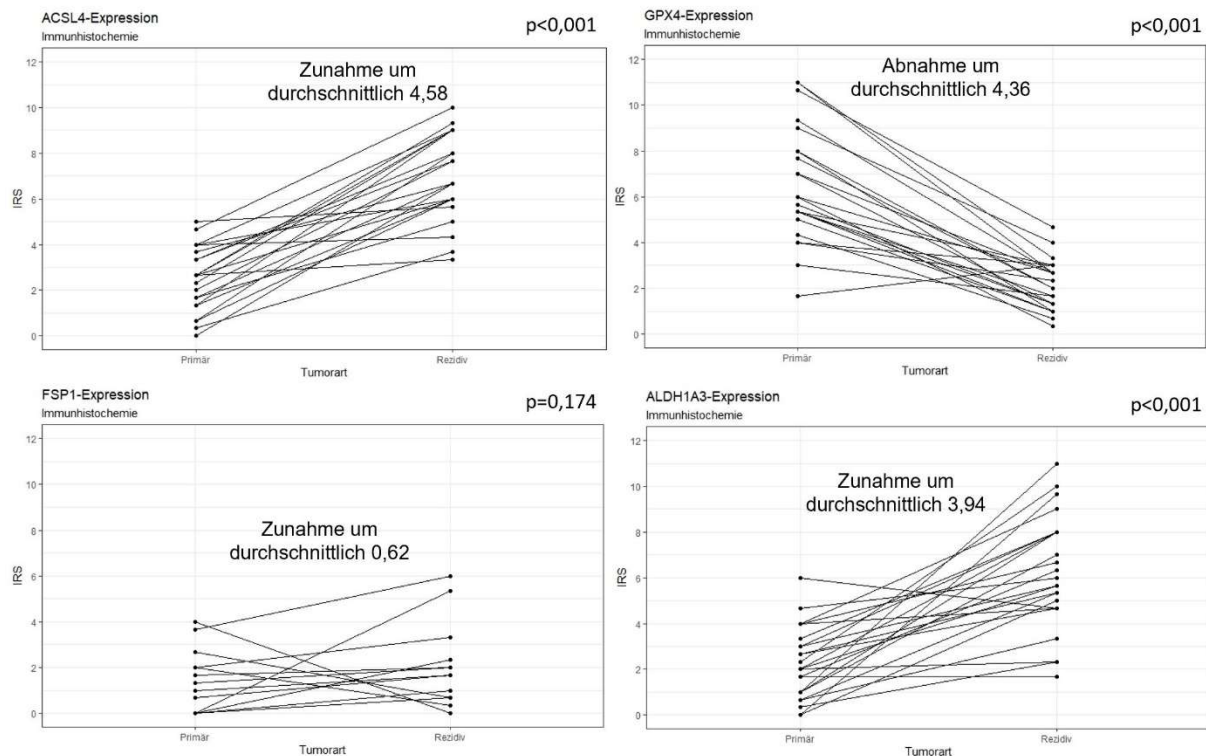
#### **Abbildung 6** Beispiele der IHC-Färbungen anhand von GBM Primär- und Rezidiv-Tumor-Pärchen

**Beschreibung:** Für jedes Beispiel stehen die HE-Färbung sowie die Färbung mit dem Proliferationsmarker Ki-67 (ki67) zur Verfügung (**a, d, e, h, i, l, m, p**). Die Expression von ACSL4 und ALDH1A3 ist in den Rezidiven (**c, o**) stärker als in den Primärtumoren (**b, n**). Dahingegen zeigen GPX4 und FSP1 eine stärkere Expression in den Primärtumoren (**f, j**) als in den Rezidiven (**g, k**). Der Maßstab für die ACSL4-, GPX4-, FSP1- und ALDH1A3-IHC ist 20mm; der Maßstab für die HE- und ki67-IHC beträgt 50mm (aus: Kram et al., 2022, S.5).



### Abbildung 7 Protein-Expression in GBM Primär- und Rezidiv-Tumoren

**Beschreibung:** Eine Linie repräsentiert die Veränderung je eines Patienten/ einer Patientin. Die Punkte markieren den jeweiligen Immunreaktiven Scores (IRS) im Primär- versus Rezidiv-Tumor. Eine Expressionszunahme von ACSL4 (a), FSP1 (c) und ALDH1A3 (d) kann beobachtet werden. Die Expression von GPX4 nahm bei 23 von 24 Patienten und Patientinnen signifikant ab (b) (aus: Kram et al., 2022, S.6).



**Tabelle 3 Zusammenfassung der IHC-Ergebnisse**

M = Mittelwert, Md = Median; IRS = Immunreaktiver Score, SD = Standardabweichung.

| Protein | IRS insgesamt |            | IRS Primär |      | IRS Rezidiv |      | Δ Primärtumor-Rezidiv |       |      |        |        |
|---------|---------------|------------|------------|------|-------------|------|-----------------------|-------|------|--------|--------|
|         | M             | Bandbreite | M          | Md   | M           | Md   | M                     | Md    | SD   | p-Wert | Z-Wert |
| ACSL4   | 4,69          | 0,00-10,00 | 2,40       | 2,50 | 6,99        | 6,67 | +4,58                 | +5,00 | 2,12 | <0,001 | -7,181 |
| GPX4    | 4,35          | 0,33-11,00 | 6,53       | 6,00 | 2,17        | 2,17 | -4,36                 | -4,33 | 2,25 | <0,001 | -7,047 |
| FSP1    | 1,77          | 0,00-6,00  | 1,46       | 1,33 | 2,08        | 1,67 | +0,62                 | +0,67 | 2,28 | 0,174  | -1,360 |
| ALDH1A3 | 4,21          | 0,00-11,00 | 2,24       | 2,00 | 6,18        | 5,83 | +3,94                 | 4,17  | 2,91 | <0,001 | -6,672 |

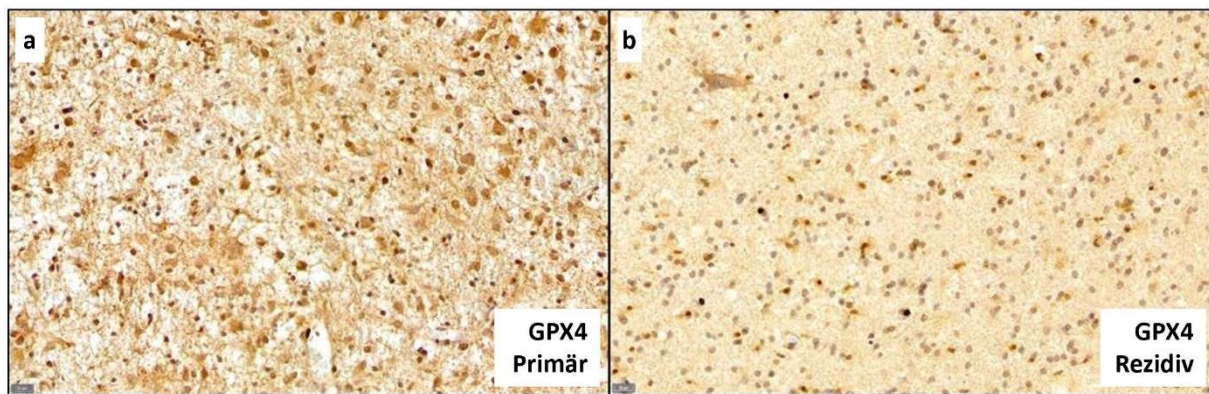
### 5.1.1 GPX4-Expression sinkt im Rezidiv

Die GPX4-Expression nimmt im Rezidiv durchschnittlich um 4,36 IRS-Punkte ab mit einer Standardabweichung von 2,25 (**Abbildung 10 und 11**). Insgesamt wird eine höchst signifikante Abnahme der GPX4-Expression von 6,53 im Primärtumor zu 2,17 IRS-Punkten im Rezidiv erfasst ( $p < 0.001$ ). Der IRS der positiven Zellen in den Primärtumoren liegt im Schnitt bei 6,53 und der IRS der Rezidive bei 2,17 (**Tabelle 5**) (Kram et al., 2022).

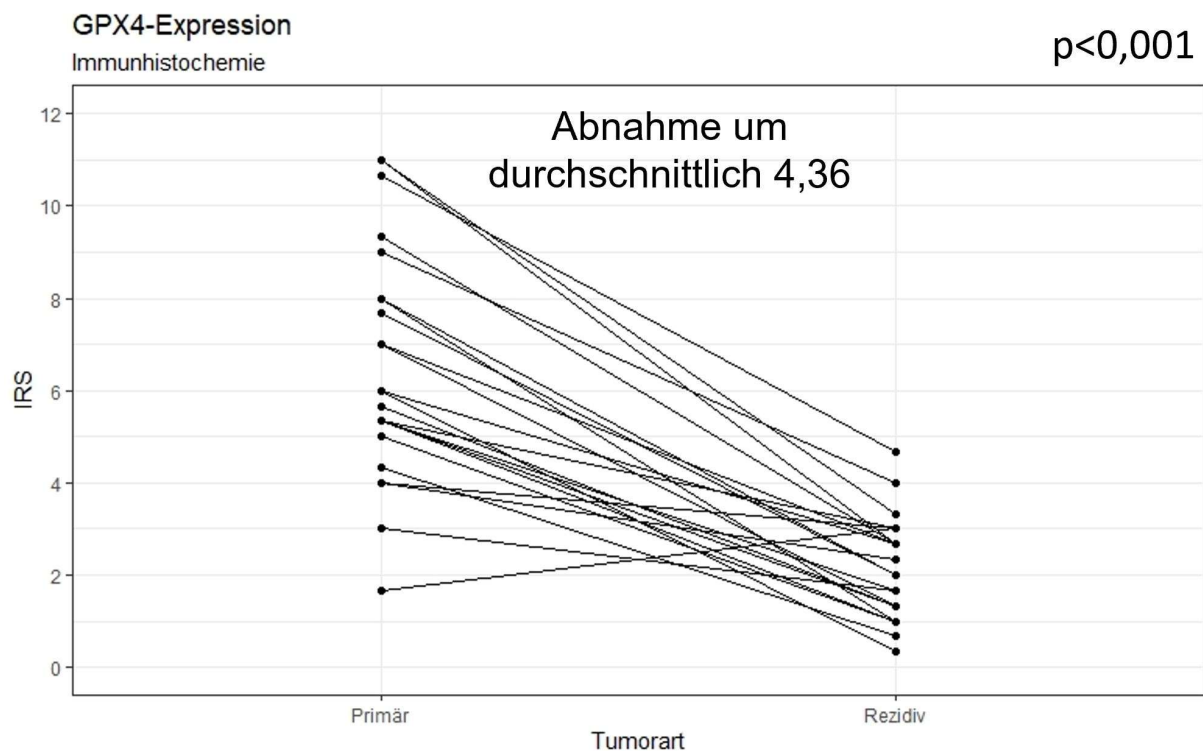
Das negative Vorzeichen steht für eine Expressionsabnahme Im Rezidiv.

**Abbildung 10** GPX4-IHC-Färbungen eines GBM Primär- und Rezidiv-Tumor-Pärchen

Eine Abnahme der Anzahl an positiven Zellen im Rezidiv (b) im Gegensatz zum Primärtumor (a) kann beobachtet werden (aus: Kram et al., 2022, S.5).



**Abbildung 11** GPX4-Expression in GBM Primär- und Rezidiv-Tumoren Eine signifikante Abnahme der Expression um durchschnittlich 4,36 IRS-Punkte liegt vor (aus: Kram et al., 2022, S.6).



**Tabelle 5 Zusammenfassung der GPX4-IHC-Ergebnisse**

M = Mittelwert, Md = Median; IRS = Immunreaktiver Score, SD = Standardabweichung.

| Protein | IRS insgesamt |            | IRS Primär |      | IRS Rezidiv |      | $\Delta$ Primärtumor-Rezidiv |       |      |        |        |
|---------|---------------|------------|------------|------|-------------|------|------------------------------|-------|------|--------|--------|
|         | M             | Bandbreite | M          | Md   | M           | Md   | M                            | Md    | SD   | p-Wert | Z-Wert |
| GPX4    | 4,35          | 0,33-11,00 | 6,53       | 6,00 | 2,17        | 2,17 | -4,36                        | -4,33 | 2,25 | <0,001 | -7,047 |

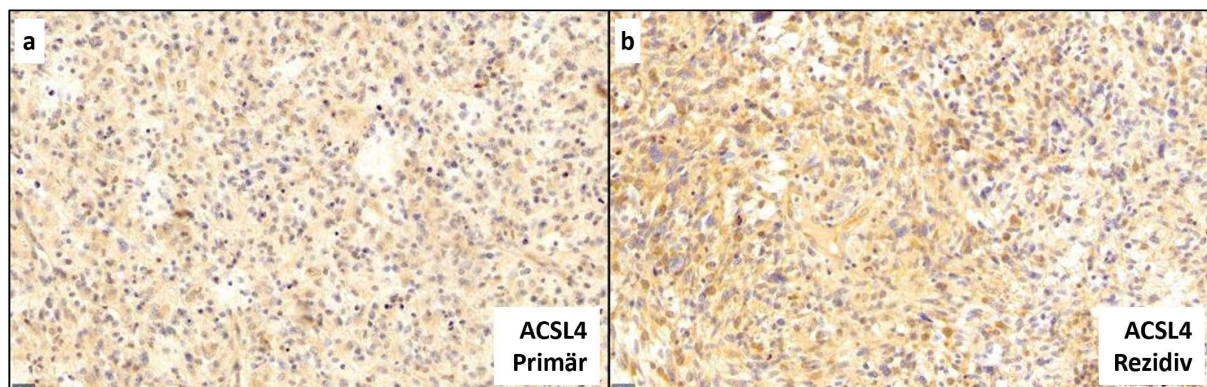
### 5.1.2 ACSL4-Expression steigt im Rezidiv

Bei allen (24/24) Patienten und Patientinnen stieg die ACSL4-Expression im Rezidiv um durchschnittlich 4,58 IRS-Punkte mit einer Standardabweichung von 2,12 (**Abbildung 8 und 9**). Der IRS in den Primärtumoren liegt im Schnitt bei 2,40 und in den Rezidiven bei 6,99.

Obwohl bei drei Patienten und Patientinnen nur eine leichte Zunahme festzustellen war, ist die Expressionszunahme mit einem  $p < 0,01$  höchst signifikant (**Tabelle 4**) (Kram et al., 2022).

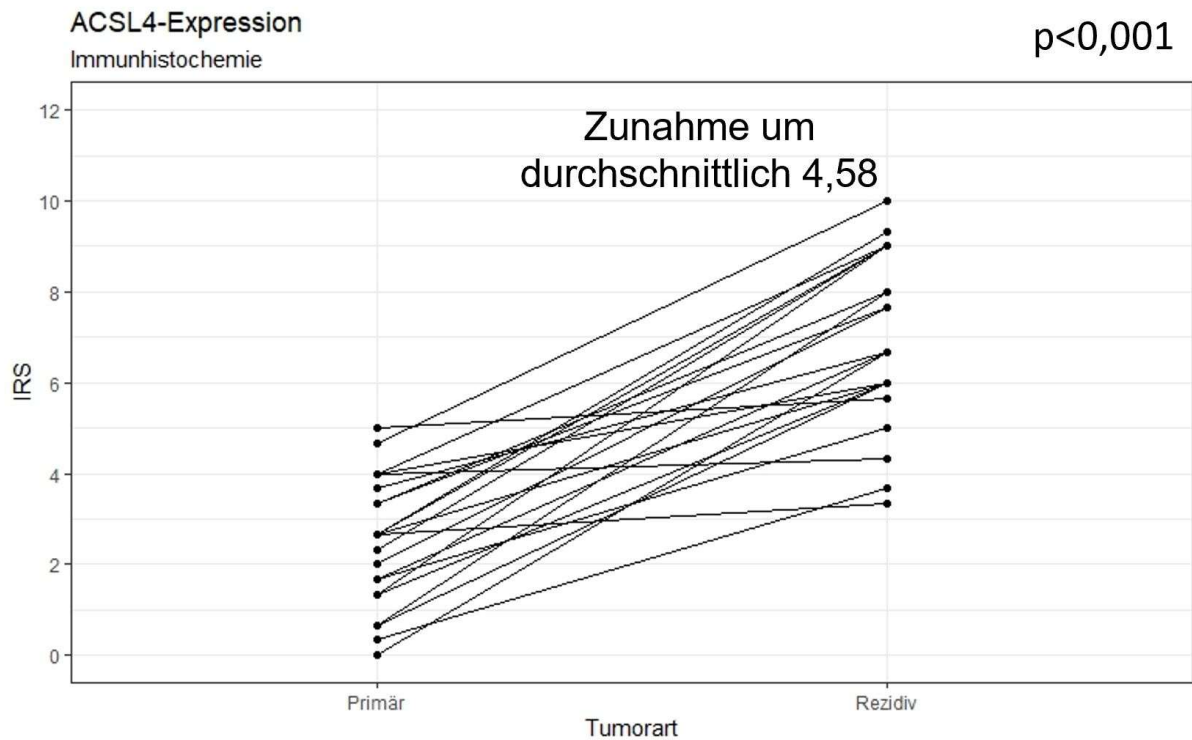
**Abbildung 8 ACSL4-IHC-Färbungen eines GBM Primär- und Rezidiv-Tumor-Pärchen**

Eine Intensivierung der Färbung im Rezidiv (**b**) im Gegensatz zum Primärtumor (**a**) kann beobachtet werden (aus: Kram et al., 2022, S.5).



**Abbildung 9 ACSL4-Expression in GBM Primär- und Rezidiv-Tumoren**

Eine signifikante Zunahme der Expression um durchschnittlich 4,58 IRS-Punkte liegt vor (aus: Kram et al., 2022, S.6).



**Tabelle 4** Zusammenfassung der ACSL4-IHC-Ergebnisse

M = Mittelwert, Md = Median; IRS = Immunreaktiver Score, SD = Standardabweichung.

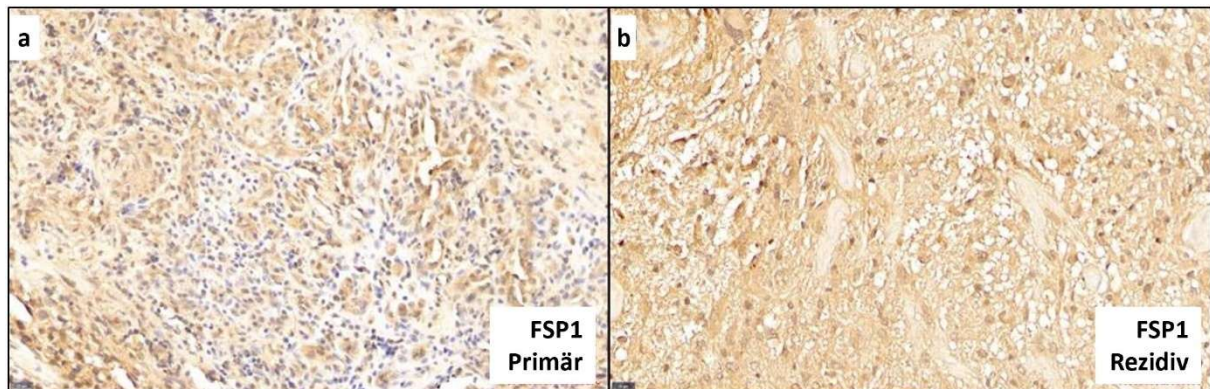
| Protein | IRS insgesamt |            | IRS Primär |      | IRS Rezidiv |      | Δ Primärtumor-Rezidiv |       |      |        |        |
|---------|---------------|------------|------------|------|-------------|------|-----------------------|-------|------|--------|--------|
|         | M             | Bandbreite | M          | Md   | M           | Md   | M                     | Md    | SD   | p-Wert | Z-Wert |
| ACSL4   | 4,69          | 0,00-10,00 | 2,40       | 2,50 | 6,99        | 6,67 | +4,58                 | +5,00 | 2,12 | <0,001 | -7,181 |

### 5.1.3 FSP1

Die FSP1-Expression nahm von einem IRS von 1,46 in den Primärtumoren zu einem IRS von 2,08 in den Rezidiven, um durchschnittlich 0,62 IRS-Punkte zu (**Abbildung 12 und 13**). Die Expressions-Veränderung war jedoch nicht signifikant (p=0.174) (**Tabelle 6**) (Kram et al., 2022).

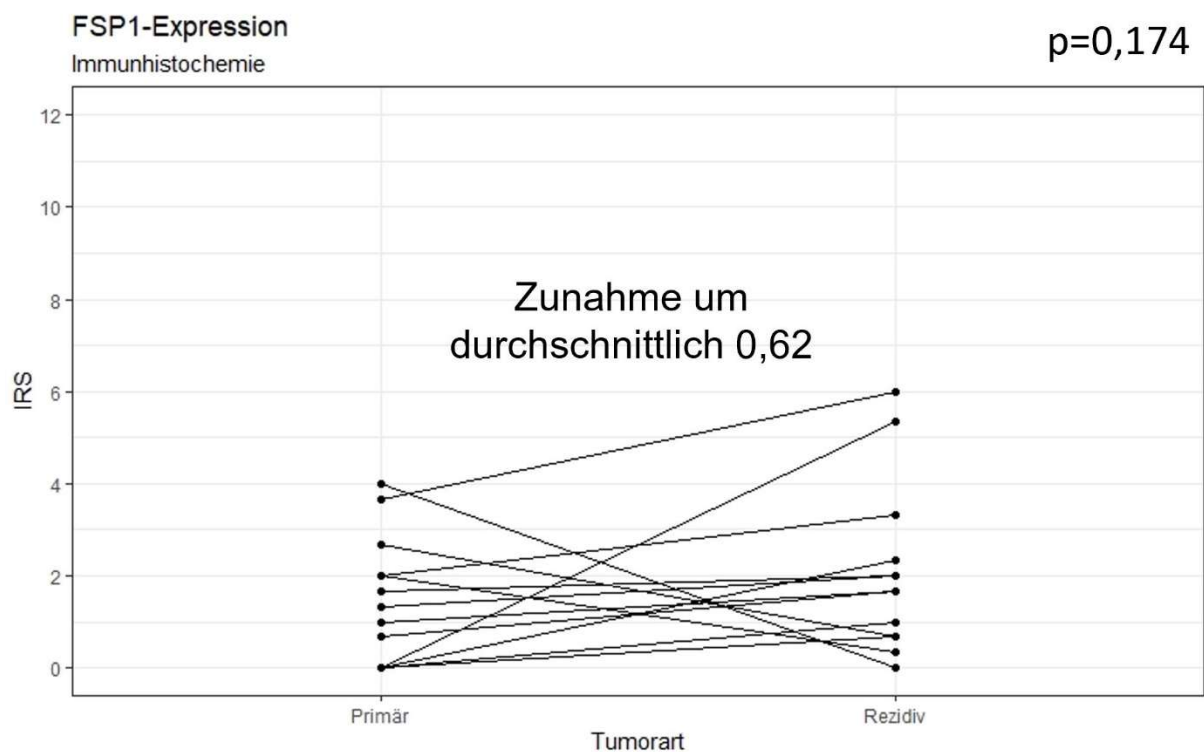
**Abbildung 12** FSP1-IHC-Färbungen eines GBM Primär- und Rezidiv-Tumor-Pärchen

Eine Zunahme der Anzahl an positiven Zellen im Rezidiv (b) im Gegensatz zum Primärtumor (a) kann beobachtet werden (aus: Kram et al., 2022, S.5).



**Abbildung 13** FSP1-Expression in GBM Primär- und Rezidiv-Tumoren

Eine insignifikante Zunahme der Expression um durchschnittlich 0,62 IRS-Punkte liegt vor (aus: Kram et al., 2022, S.6).



**Tabelle 6 Zusammenfassung der FSP1-IHC-Ergebnisse**

M = Mittelwert, Md = Median; IRS = Immunreaktiver Score, SD = Standardabweichung.

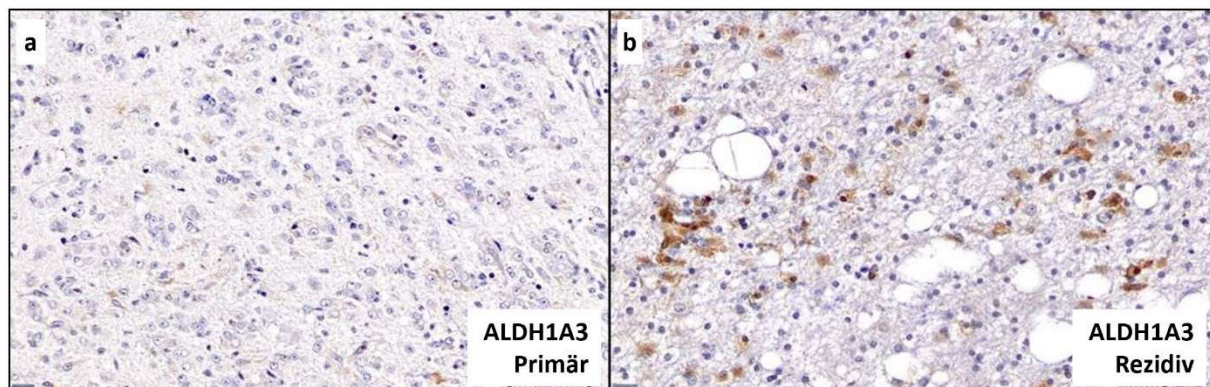
| Protein | IRS insgesamt |            | IRS Primär |      | IRS Rezidiv |      | $\Delta$ Primärtumor-Rezidiv |       |      |        |        |
|---------|---------------|------------|------------|------|-------------|------|------------------------------|-------|------|--------|--------|
|         | M             | Bandbreite | M          | Md   | M           | Md   | M                            | Md    | SD   | p-Wert | Z-Wert |
| FSP1    | 1,77          | 0,00-6,00  | 1,46       | 1,33 | 2,08        | 1,67 | +0,62                        | +0,67 | 2,28 | 0,174  | -1,360 |

## ALDH1A3-Expression steigt im Rezidiv

Bei insgesamt 23 der 24 Patienten und Patientinnen konnte eine Zunahme der ALDH1A3-Expression festgestellt werden (**Abbildung 14 und 15**). Der IRS der positiven Zellen in den Primärtumoren liegt im Schnitt bei 2,24 und in den Rezidiven bei 6,18. Die Expressionszunahme um 3,94 IRS-Punkte mit einer Standardabweichung von 2,91 war folglich höchst signifikant ( $p < 0.001$ ) (**Tabelle 7**) (Kram et al., 2022).

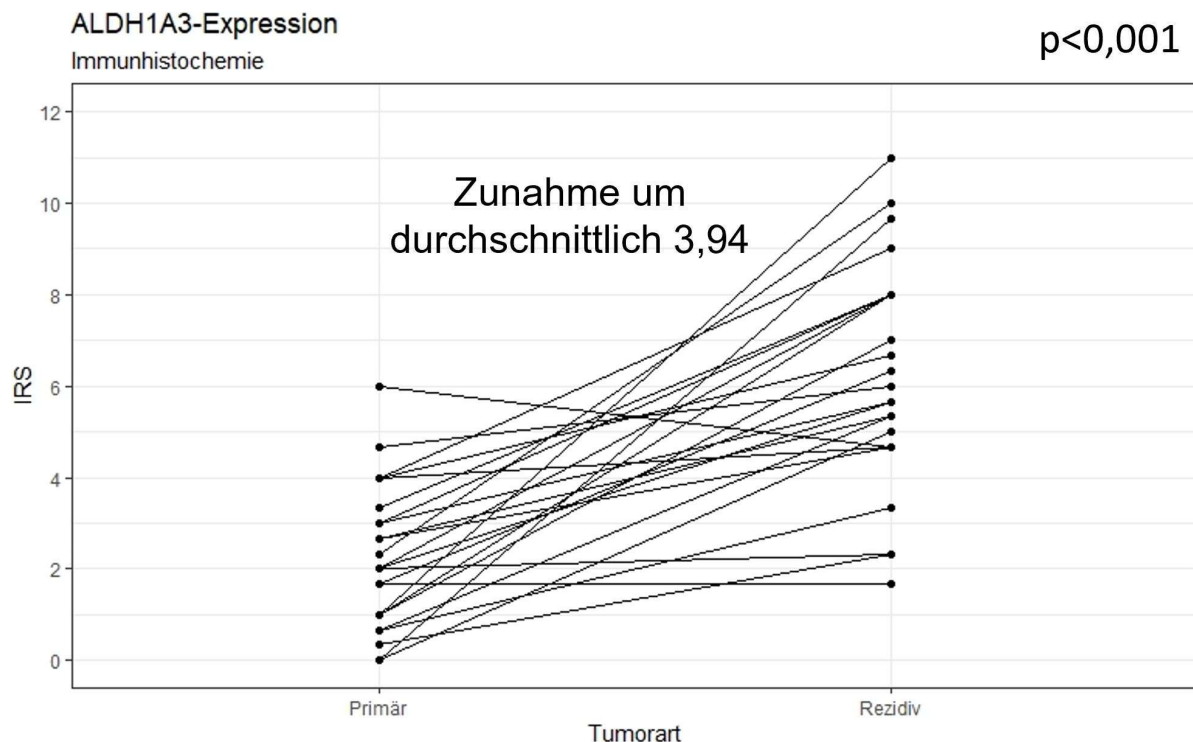
**Abbildung 14 ALDH1A3-IHC-Färbungen eines GBM Primär- und Rezidiv-Tumor-Pärchen**

Eine Zunahme der Expression vom Primärtumor (**a**) zum Rezidiv (**b**) kann beobachtet werden (aus: Kram et al., 2022, S.5).



**Abbildung 15** ALDH1A3-Expression in GBM Primär- und Rezidiv-Tumoren

Eine signifikante Zunahme der Expression um durchschnittlich 3,94 IRS-Punkte liegt vor (aus: Kram et al., 2022, S.6).



**Tabelle 7** Zusammenfassung der ALDH1A3-IHC-Ergebnisse

M = Mittelwert, Md = Median; IRS = Immunreaktiver Score, SD = Standardabweichung.

| Protein | IRS insgesamt |            | IRS Primär |      | IRS Rezidiv |      | Δ Primärtumor-Rezidiv |      |      |        |        |
|---------|---------------|------------|------------|------|-------------|------|-----------------------|------|------|--------|--------|
|         | M             | Bandbreite | M          | Md   | M           | Md   | M                     | Md   | SD   | p-Wert | Z-Wert |
| ALDH1A3 | 4,21          | 0,00-11,00 | 2,24       | 2,00 | 6,18        | 5,83 | +3,94                 | 4,17 | 2,91 | <0,001 | -6,672 |

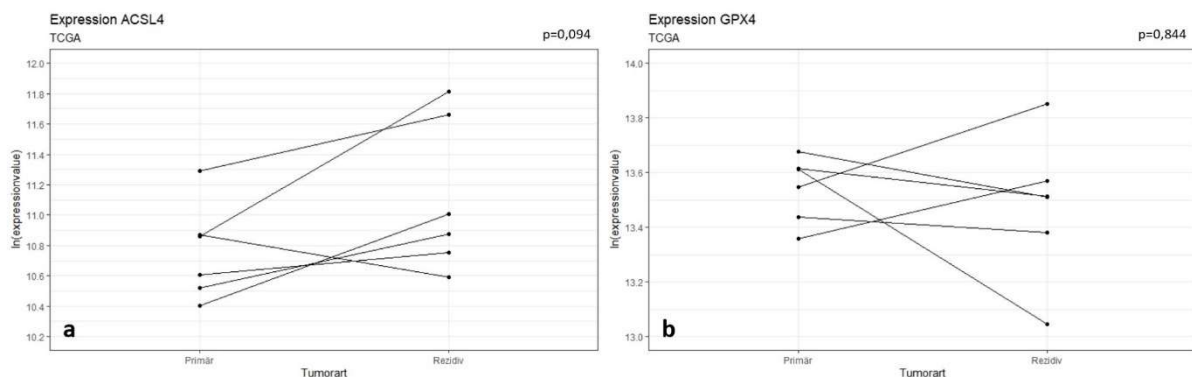
## 5.2 TCGA Daten Analyse

Die TCGA-Datenanalyse wurde zur Verifizierung der erhobenen Ergebnisse durchgeführt. Die Gen-Expression wird mit Hilfe von Fragmenten pro Kilobasis des Transkripts pro Millionen abgebildeter Erfassungen (FPKM = Fragment pro Kilobasis of Transcript pro Million mapped reads) angegeben. Durch Nutzung des natürlichen Logarithmus ( $\ln(\text{expression value})$ ) der Gen-quantifizierten Expression können die ACSL4- und GPX4-Expression der GBM Primär- und Rezidiv-Tumor-Pärchen verglichen werden. Obwohl die Veränderung nicht signifikant ist ( $p=0.094$ ), nimmt die ACSL4 Gen-Expression bei fünf der sechs Patienten und Patientinnen (TCGA-06-0210, TCGA-06-0190, TCGA-19-4065, TCGA-06-0125, TCGA-06-0211) um durchschnittlich 0,36 zu. Des Weiteren nimmt die GPX4 Gen-Expression in vier der sechs Patienten und Patientinnen um durchschnittlich 0,06 ab (TCGA-06-0210, TCGA-06-0190, TCGA-19-4065, TCGA-14-1034) (**Abbildung 16**). Die Abnahme ist wiederum nicht signifikant ( $p=0.844$ )

(Tabelle 8). Dabei können die insignifikanten Ergebnisse der geringen Anzahl an Patienten und Patientinnen geschuldet sein. Die Ergebnisse der TCGA-Daten-Analyse sind in **Tabelle 8** zusammengefasst (Kram et al., 2022).

**Abbildung 16** Entwicklung der ACSL4- und GPX4-Expression in GBM Primär- und Rezidiv-Tumor-Pärchen aus dem TCGA

Eine signifikante Zunahme der ACSL4-Expression um durchschnittlich 0,36 und eine insignifikante Abnahme der GPX4-Expression um 0,06 kann beobachtet werden (aus: Kram et al., 2022, S.6).



**Tabelle 8** Zusammenfassung der TCGA-Daten-Analyse

M = Mittelwert, Md = Median, SD = Standardabweichung.

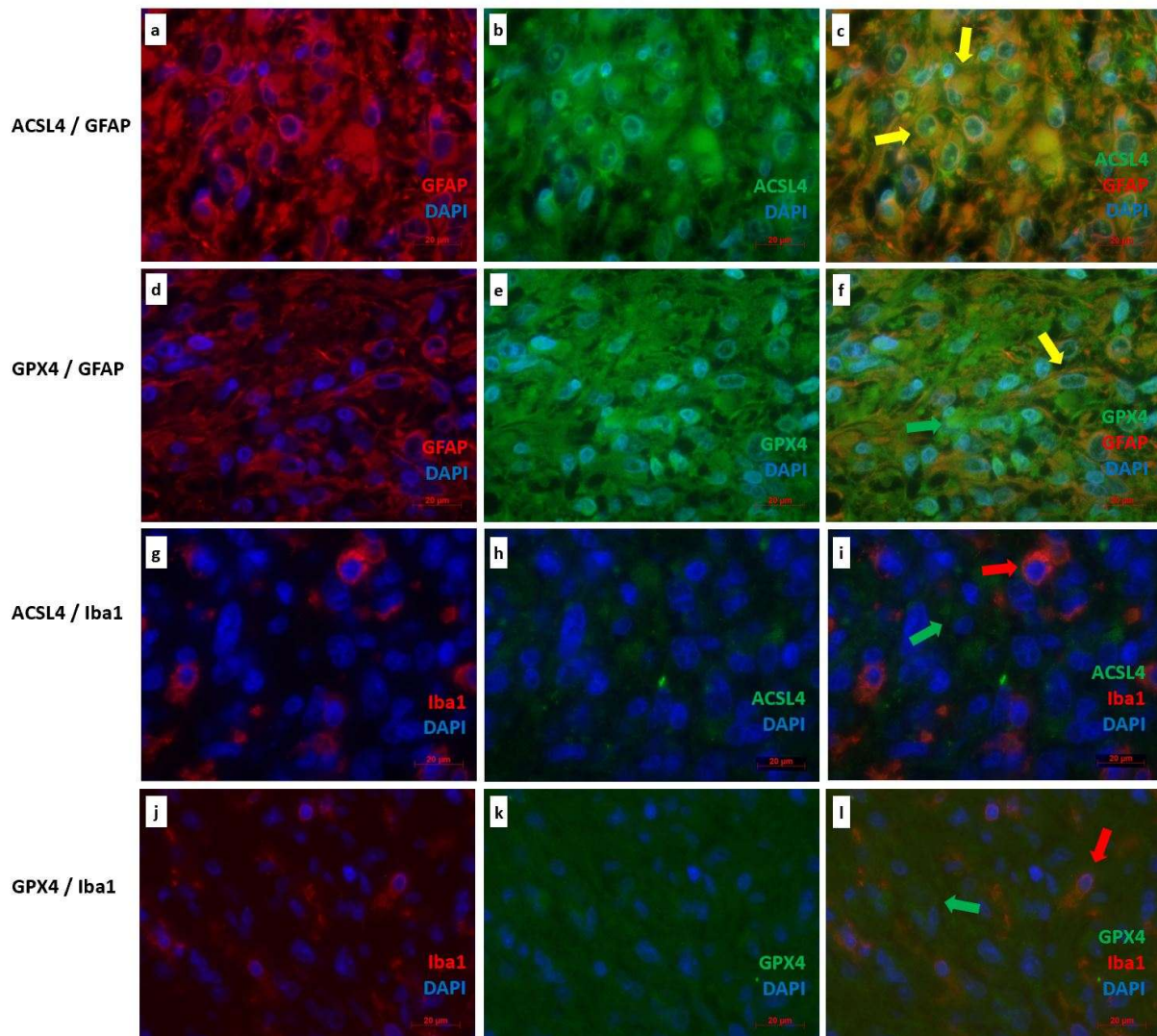
| Protein | Ln(expression-value) total |            | Ln(expression-value) Primär |      | Ln(expression-value) Rezidiv |      | $\Delta$ Primär-Rezidiv |       |      |        |        |
|---------|----------------------------|------------|-----------------------------|------|------------------------------|------|-------------------------|-------|------|--------|--------|
|         | M                          | Bandbreite | Mittelwert                  | Md   | M                            | Md   | M                       | Md    | SD   | p-Wert | Z-Wert |
| ACSL4   | 7,22                       | 1,42-12,90 | 7,07                        | 7,47 | 7,40                         | 7,70 | +0,36                   | +0,36 | 0,42 | 0,094  | -1,676 |
| GPX4    | 9,45                       | 4,06-14,95 | 9,51                        | 9,25 | 9,38                         | 9,07 | -0,06                   | -0,08 | 0,31 | 0,844  | -0,197 |

### 5.3 Ko-Expressionsanalyse mit Doppelimmunfluoreszenz

Die Koexpressions-Analyse der Ferroptose-Marker ACSL4 und GPX4 in Kombination mit den Zell-Markern GFAP und Iba1 wurde durchgeführt, um den Zelltyp, in dem Ferroptose stattfindet, näher bestimmen zu können. Viele der GFAP-positiven (+) Zellen exprimieren auch die Ferroptose-assoziierten Marker. Dahingegen zeigen nur wenige der Iba1<sup>+</sup> Zellen ein klares gelbes Signal, das auf eine Ko-Expression mit ACSL4 und GPX4 hinweisen würde (**Abbildung 17**). Insgesamt weisen 70 bis 80% der ACSL4<sup>+</sup> und GPX4<sup>+</sup> Zellen eine Koexpression mit GFAP auf (**Tabelle 9**) (Kram et al., 2022).

### Abbildung 17 Beispiele der Doppel-IF-Färbungen

Die Doppel-IF mit ACSL4 und GFAP in einem Primärtumor zeigt einige Zellen mit Ko-Expression (gelbe Pfeile) (**a-c**). Die Doppel-IF mit GPX4 und GFAP zeigt ebenfalls viele ko-exprimierende Zellen in dem GBM-Primärtumor (gelber Pfeil). Zudem ist eine Zelle, die nur GPX4 exprimiert, markiert (grüner Pfeil) (**d-f**). Die Doppel-IF mit ACSL4 und Iba1 in einem GBM-Primärtumor zeigt einige Iba1<sup>+</sup>-Zellen, die aber kein ACSL4 exprimieren (roter Pfeil: Iba1<sup>+</sup>-Zelle ohne ACSL4-Expression, grüner Pfeil: ACSL4<sup>+</sup>-Zelle) (**g-i**). Die Doppel-IF mit GPX4 und Iba1 in einem GBM-Rezidiv. Die meisten Zellen exprimieren entweder GPX4 (grüner Pfeil) oder Iba1 (roter Pfeil) (**j-l**) (aus: Kram et al., 2022, S.7). Der Maßstab beträgt 20 µm.



**Tabelle 9 Zusammenfassung der Doppelimmunfluoreszenz-Ergebnisse**

M = Mittelwert, Md = Median, IRS = Immunreaktiver Score, SD = Standardabweichung.

| Protein                                  |                      | Primär |       | Rezidiv |       | Δ Primär-Rezidiv |        |       |        |        |
|------------------------------------------|----------------------|--------|-------|---------|-------|------------------|--------|-------|--------|--------|
|                                          |                      | M      | Md    | M       | Md    | M                | Md     | SD    | p-Wert | Z-Wert |
| ACSL4 <sup>+</sup> an                    | GFAP <sup>+</sup>    | 47,1%  | 44,4% | 76,5%   | 79,3% | +29,3%           | +30,8% | 18,6% | <0,001 | -6,647 |
|                                          | Iba1 <sup>+</sup>    | 24,6%  | 19,1% | 28,7%   | 28,6% | +4,2%            | 10,4%  | 19,3% | 0,027  | -2,209 |
| GPX4 <sup>+</sup> an                     | GFAP <sup>+</sup>    | 78,4%  | 79,6% | 40,3%   | 39,4% | -38,0%           | -40,4% | 18,1% | <0,001 | -7,124 |
|                                          | Iba1 <sup>+</sup>    | 34,5%  | 32,5% | 25,3%   | 23,4% | -9,2%            | -9,7%  | 20,0% | 0,001  | -3,192 |
| GFAP <sup>+</sup> an                     | ACSL4 <sup>+</sup>   | 76,1%  | 76,9% | 70,3%   | 72,6% | -5,8%            | -4,4%  | 14,7% | 0,026  | -2,223 |
|                                          | Iba1 <sup>+</sup> an | 22,2%  | 20,0% | 16,1%   | 17,4% | -6,1%            | -0,1%  | 16,0% | 0,026  | -2,232 |
| GFAP <sup>+</sup> an                     | GPX4 <sup>+</sup>    | 79,1%  | 82,9% | 72,1%   | 76,3% | -6,9%            | -6,6%  | 17,1% | 0,006  | -2,747 |
|                                          | Iba1 <sup>+</sup> an | 13,6%  | 12,5% | 20,2%   | 15,5% | +6,6%            | +4,9   | 15,1% | 0,024  | -2,255 |
| ACSL4 <sup>+</sup> und GPX4 <sup>+</sup> |                      | 18,9%  | 15,7% | 16,2%   | 17,1% | -2,7%            | -3,4%  | 7,5%  | 0,625  | -7,181 |

### 5.3.1 Anteil der Ferroptose-assoziierten Proteine an den Zellmarkern

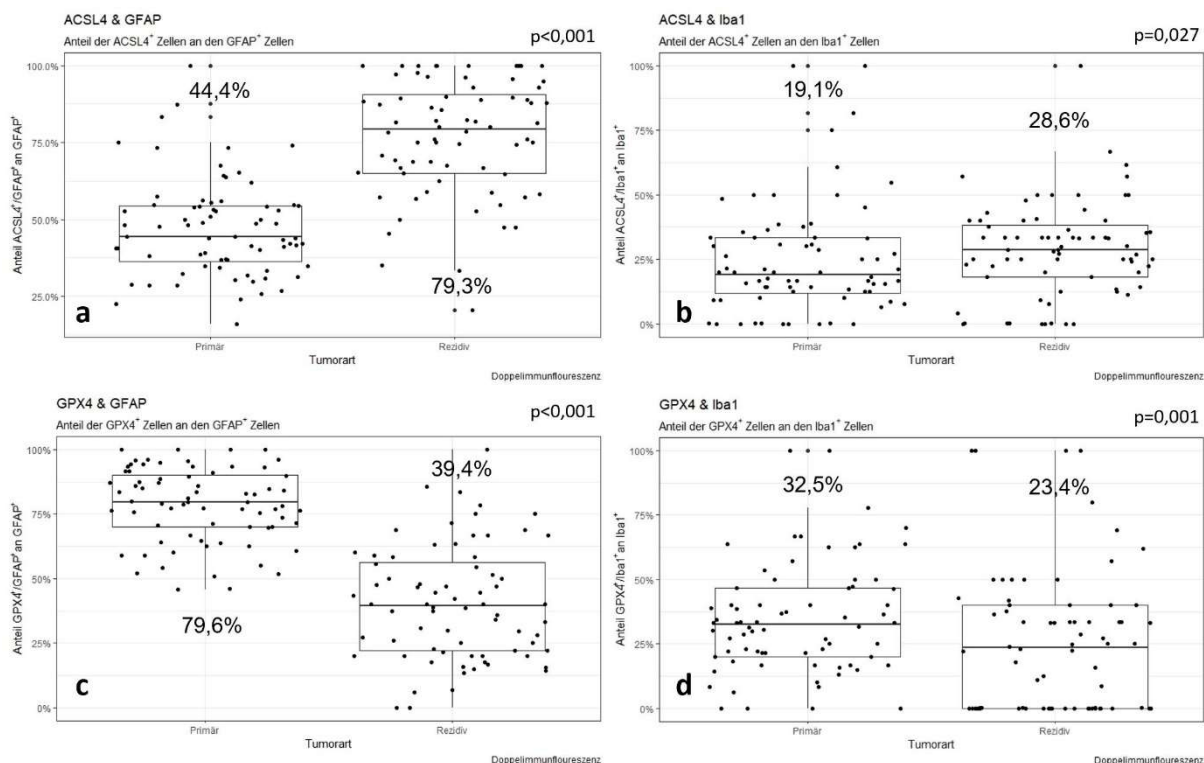
Bei der Berechnung des Anteiles der ACSL4<sup>+</sup> Zellen an den GFAP<sup>+</sup> und Iba1<sup>+</sup> -Zellen ist die gleiche Entwicklung der ACSL4-Expression wie in den vorherigen IHC-Versuchen zu sehen. Da in den IHC-Versuchen die Proben der gleichen Patienten und Patientinnen benutzt wurden, dient die Berechnung dieses Anteiles gleichzeitig als Kontrolle. Der Anteil der ACSL4<sup>+</sup> Zellen an GFAP<sup>+</sup> Zellen (ACSL4<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup>) nimmt signifikant um durchschnittlich 29.3% in den Rezidiven zu ( $p < 0,001$ ); der Anteil der ACSL4<sup>+</sup> Zellen an Iba1<sup>+</sup> Zellen (ACSL4<sup>+</sup>/Iba1<sup>+</sup>) um 4,2% ( $p = 0,027$ ) (**Abbildung 18**). Der Anteil ACSL4<sup>+</sup> Zellen an Iba1<sup>+</sup> Zellen (Mittelwert von 24,6% in den Primärtumoren, sowie Mittelwert von 28,7% in den Rezidiven) ist deutlich geringer als der Anteil ACSL4<sup>+</sup> Zellen der GFAP<sup>+</sup> Zellen (Mittelwert von 47,1% in den Primärtumoren, sowie Mittelwert von 76,5% in den Rezidiven) (**Tabelle 10**) (Kram et al., 2022).

Wie die **Abbildung 18** zeigt, nimmt der Anteil an GPX4<sup>+</sup> in beide Kombinationen signifikant ab. Während der Anteil GPX4<sup>+</sup> Zellen an GFAP<sup>+</sup> Zellen (GPX4<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup>) um durchschnittlich 38,0% abnimmt ( $p < 0,001$ ), sinkt der Anteil GPX4<sup>+</sup> Zellen an Iba1<sup>+</sup> Zellen (GPX4<sup>+</sup>/Iba1<sup>+</sup>) um durchschnittlich 9,2% ( $p = 0,001$ ) nach der Therapie (**Tabelle 10**). Auch hier konnte dieselbe Abnahme der GPX4-Expression wie in den IHC-Versuchen erfasst werden. Der Anteil GPX4<sup>+</sup> Zellen an den GFAP<sup>+</sup> Zellen (Mittelwert von 78,4% in den Primärtumoren, sowie Mittelwert von 40,3% in den Rezidiven) war fast doppelt so hoch wie der Anteil GPX4<sup>+</sup> Zellen an Iba1<sup>+</sup> Zellen

(Mittelwert von 34,5% in den Primärtumoren, sowie Mittelwert von 25,3% in den Rezidiven)  
(Kram et al., 2022).

#### Abbildung 18 Anteil der Ferroptose-assoziierten Proteinen an den Zellmarkern

Die angegebenen Zahlen beschreiben den Anteil der ACSL4<sup>+</sup>- und GPX4<sup>+</sup>-Zellen an den GFAP<sup>+</sup>- und Iba1<sup>+</sup>-Zellen. Der Anteil der ACSL4<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup>-Zellen nimmt signifikant zu in den Rezidiv-Tumoren (a). Der Anteil der ACSL4<sup>+</sup>/Iba1<sup>+</sup>-Zellen nimmt ebenfalls signifikant zu in den Rezidiven (b). Der Anteil der GPX4<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup>-Zellen (c) sowie der Anteil der GPX4<sup>+</sup>/Iba1<sup>+</sup>-Zellen (d) nehmen signifikant ab in den Rezidiv-Tumoren (aus: Kram et al., 2022, S.8).



**Tabelle 10** Zusammenfassung der Doppelimmunfluoreszenz-Ergebnisse mit Berechnung der Anteile der Ferroptose-assoziierten Proteinen an den Zellmarkern

M = Mittelwert, Md = Median, SD = Standardabweichung.

| Protein               |                   | Primär |       | Rezidiv |       | Δ Primär-Rezidiv |        |       |        |        |
|-----------------------|-------------------|--------|-------|---------|-------|------------------|--------|-------|--------|--------|
|                       |                   | M      | Md    | M       | Md    | M                | Md     | SD    | p-Wert | Z-Wert |
| ACSL4 <sup>+</sup> an | GFAP <sup>+</sup> | 47,1%  | 44,4% | 76,5%   | 79,3% | +29,3%           | +30,8% | 18,6% | <0,001 | -6,647 |
|                       | Iba1 <sup>+</sup> | 24,6%  | 19,1% | 28,7%   | 28,6% | +4,2%            | 10,4%  | 19,3% | 0,027  | -2,209 |
| GPX4 <sup>+</sup> an  | GFAP <sup>+</sup> | 78,4%  | 79,6% | 40,3%   | 39,4% | -38,0%           | -40,4% | 18,1% | <0,001 | -7,124 |
|                       | Iba1 <sup>+</sup> | 34,5%  | 32,5% | 25,3%   | 23,4% | -9,2%            | -9,7%  | 20,0% | 0,001  | -3,192 |

### 5.3.2 Anteil der Zellmarker an den Ferroptose-assoziierten Markern

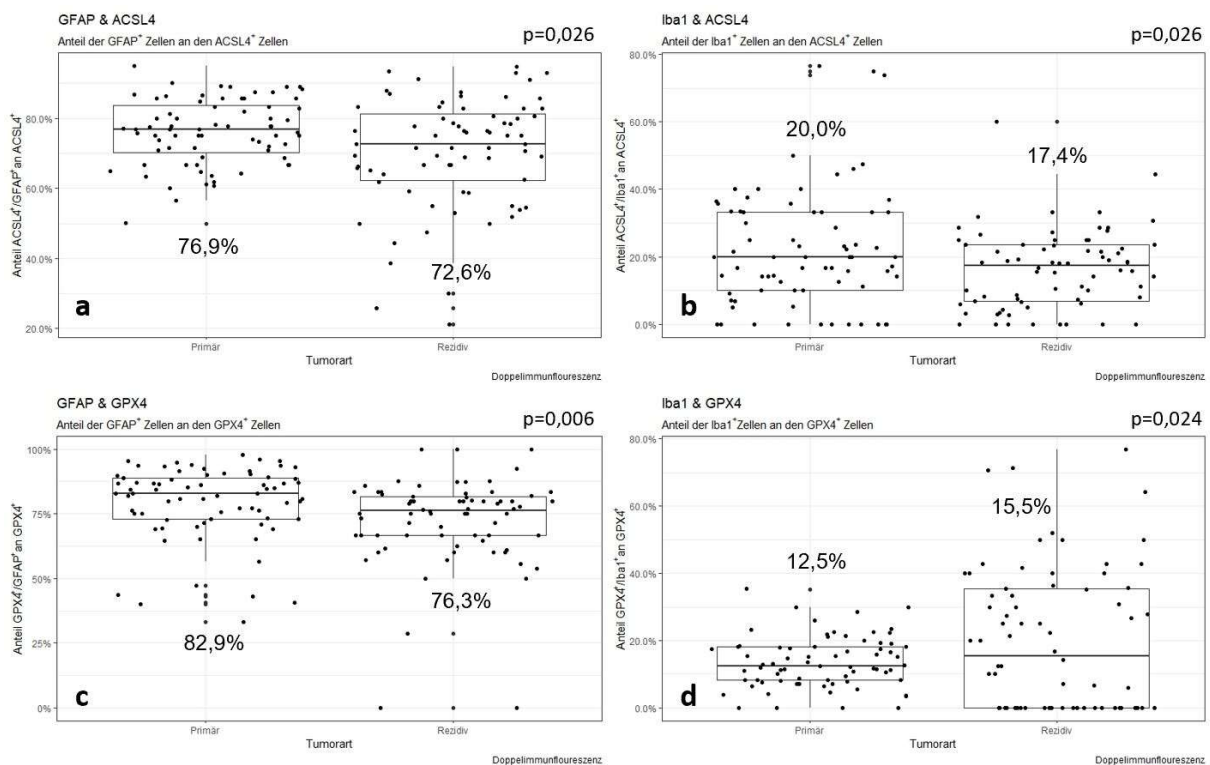
Der Anteil der GFAP<sup>+</sup>-Zellen an den ACSL4<sup>+</sup>-Zellen (GFAP<sup>+</sup>/ACSL4<sup>+</sup>) nahm von einem Mittelwert von 76,1% in den Primärtumoren zu einem Mittelwert von 70,3% in den Rezidiven

um durchschnittlich 5,8% signifikant ab ( $p=0,026$ ). Dahingegen war der Anteil Iba1<sup>+</sup>-Zellen an den ACSL4<sup>+</sup>-Zellen (Iba1<sup>+</sup>/ACSL4<sup>+</sup>) drei- bis viermal niedriger (**Abbildung 19**). Er nahm im Durchschnitt um 6,1% von einem Mittelwert von 22,2% in den Primärtumoren zu einem Mittelwert von 16,1% in den Rezidiven signifikant ab ( $p=0,026$ ) (**Tabelle 11**) (Kram et al., 2022).

Eine ähnliche Beobachtung zu den Anteilen an ACSL4<sup>+</sup>-Zellen konnte bei den Anteilen der GFAP<sup>+</sup> und Iba1<sup>+</sup>-Zellen an GPX4<sup>+</sup>-Zellen gemacht werden. Der Anteil der GFAP<sup>+</sup>-Zellen an GPX4<sup>+</sup>-Zellen (GFAP<sup>+</sup>/GPX4<sup>+</sup>) war wiederum drei- bis viermal so hoch wie der Anteil der Iba1<sup>+</sup>-Zellen an GPX4<sup>+</sup>-Zellen (Iba1<sup>+</sup>/GPX4<sup>+</sup>) (**Abbildung 19**). Mit einem Mittelwert von 79,1% in den Primärtumoren, sowie Mittelwert von 72,1% in den Rezidiven, nahm der Anteil der GFAP<sup>+</sup>-Zellen an GPX4<sup>+</sup>-Zellen um durchschnittlich 6,9% signifikant ab ( $p=0,006$ ). Darüber hinaus nahm der Anteil Iba1<sup>+</sup>-Zellen an GPX4<sup>+</sup>-Zellen von einem Mittelwert von 13,6% in den Primärtumoren zu einem Mittelwert von 20,2% in den Rezidiven, um durchschnittlich 6,6% signifikant zu ( $p=0,024$ ) (**Tabelle 11**) (Kram et al., 2022).

#### **Abbildung 19** Anteil der Zellmarker an den Ferroptose-assoziierten Proteinen

Die angegebenen Zahlen beschreiben den Anteil der GFAP<sup>+</sup>- und Iba1<sup>+</sup>-Zellen an den ACSL4<sup>+</sup>- und GPX4<sup>+</sup>-Zellen. Der Anteil der GFAP<sup>+</sup>/ACSL4<sup>+</sup>-Zellen nimmt signifikant ab in den Rezidiv-Tumoren (**a**). Der Anteil der Iba1<sup>+</sup>/ACSL4<sup>+</sup>-Zellen nimmt ebenfalls signifikant ab in den Rezidiven (**b**). Der Anteil der GFAP<sup>+</sup>/GPX4<sup>+</sup>-Zellen nimmt signifikant ab in den Rezidiv-Tumoren (**c**), während der Anteil der Iba1<sup>+</sup>/GPX4<sup>+</sup>-Zellen signifikant zunimmt (**d**) (aus: Kram et al., 2022, S.8).



**Tabelle 11** Zusammenfassung der Doppelimmunfluoreszenz-Ergebnisse mit Berechnung der Anteile der Zellmarker an den Ferroptose-assoziierten Proteinen

M = Mittelwert, Md = Median, SD = Standardabweichung.

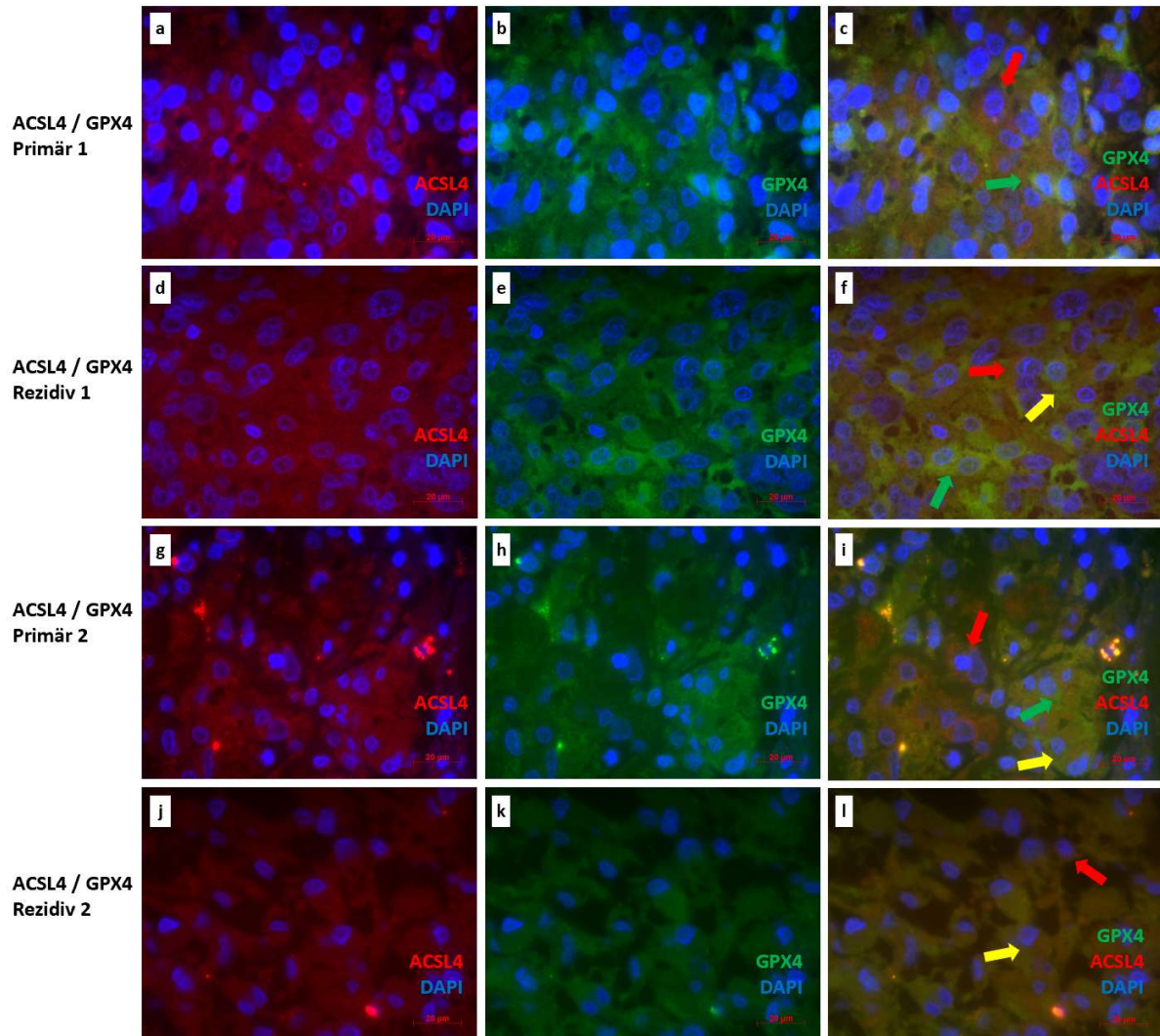
| Protein              |                    | Primär |       | Rezidiv |       | Δ Primär-Rezidiv |       |       |        |        |
|----------------------|--------------------|--------|-------|---------|-------|------------------|-------|-------|--------|--------|
|                      |                    | M      | Md    | M       | Md    | M                | Md    | SD    | p-Wert | Z-Wert |
| GFAP <sup>+</sup> an | ACSL4 <sup>+</sup> | 76,1%  | 76,9% | 70,3%   | 72,6% | -5,8%            | -4,4% | 14,7% | 0,026  | -2,223 |
| Iba1 <sup>+</sup> an |                    | 22,2%  | 20,0% | 16,1%   | 17,4% | -6,1%            | -0,1% | 16,0% | 0,026  | -2,232 |
| GFAP <sup>+</sup> an | GPX4 <sup>+</sup>  | 79,1%  | 82,9% | 72,1%   | 76,3% | -6,9%            | -6,6% | 17,1% | 0,006  | -2,747 |
| Iba1 <sup>+</sup> an |                    | 13,6%  | 12,5% | 20,2%   | 15,5% | +6,6%            | +4,9  | 15,1% | 0,024  | -2,255 |

## 5.4 ACSL4 und GPX4 Doppelimmunfluoreszenz

Da die Expressions-Veränderungen von ACSL4 und GPX4 zwischen Primärtumor und Rezidiv schon quantitativ in der IHC analysiert wurde, wurde eine Doppelimmunfluoreszenz der zwei Proteine durchgeführt, um mögliche parallele Expressionen und Interaktionen darzustellen. Mit einem Mittelwert von 18,9% in den Primärtumoren und einem Mittelwert von 16,2% in den Rezidiven, zeigen einige Zellen eine Koexpression (**Abbildung 20**). Jedoch ist die leichte Abnahme nicht signifikant ( $p=0.625$ ) (**Tabelle 12**). Während GPX4 in den Primärtumoren dominanter ist, wird ACSL4 mehr in den Rezidiven exprimiert. Dies bekräftigt wiederum die IHC-Ergebnisse (Kram et al., 2022).

# **Abbildung 20 Beispiele der Doppel-IF-Färbungen mit ACSL4 und GPX4**

Die Doppel-IF mit ACSL4 und GPX4 in einem Primärtumor (Fall 1) zeigt Zellen die entweder ACSL4 (roter Pfeil) oder GPX4 (grüner Pfeil) exprimieren (**a-c**). Der Rezidiv-Tumor desselben Falles (Fall 1) zeigt einige ko-exprimierende Zellen (gelber Pfeil) sowie nur ACSL4- (roter Pfeil) oder GPX4-exprimierende Zellen (grüner Pfeil) (**d-f**). Die Doppel-IF mit ACSL4 und GPX4 im Primärtumor (Fall 2) zeigt ACSL4+-Zellen (roter Pfeil) und GPX4+-Zellen (grüner Pfeil). Ein paar Zellen exprimieren beide Proteine (gelber Pfeil) (**g-i**). Das dazugehörige GBM-Rezidiv (Fall 2) weist einige ko-exprimierende Zellen auf (gelber Pfeil) und eine ACSL4-exprimierende Zelle (roter Pfeil) (**j-l**) (aus: Kram et al., 2022, S.9). Der Maßstab beträgt 20 µm.



**Tabelle 12** Zusammenfassung der Doppelimmunfluoreszenz-Ergebnisse mit ACSL4 und GPX4

M = Mittelwert, Md = Median, SD = Standardabweichung.

| Protein                                  | Primär |       | Rezidiv |       | $\Delta$ Primär-Rezidiv |       |      |        |        |
|------------------------------------------|--------|-------|---------|-------|-------------------------|-------|------|--------|--------|
|                                          | M      | Md    | M       | Md    | M                       | Md    | SD   | p-Wert | Z-Wert |
| ACSL4 <sup>+</sup> und GPX4 <sup>+</sup> | 18,9%  | 15,7% | 16,2%   | 17,1% | -2,7%                   | -3,4% | 7,5% | 0,625  | -7,181 |

## 5.5 Einfluss auf das Gesamtüberleben

Um einen möglichen Einfluss der Änderung der ACSL4-, GPX4-, FSP1- und ALDH1A3-Expression auf das Überleben zu detektieren, wird der IRS zwischen Primärtumor und Rezidiv jedes Patienten/ jeder Patientin verglichen und die Differenz gebildet. Da ein Kriterium zur Auswahl des Kollektivs war, dass die Patienten und Patientinnen ein Rezidiv eines Glioblastom diagnostiziert haben müssen, ist die ausgewählte Stichprobe insoweit vorselektiert, da die Patienten und Patientinnen mit Rezidiv nach Diagnose länger gelebt haben müssen, um überhaupt ein Rezidiv zu entwickeln. Um dieser Vorselektion gerecht zu werden, wird in der Kaplan-Meier-Kurve die Überlebenswahrscheinlichkeit ab der Diagnose des Rezidivs dargestellt (Kaplan & Meier, 1958).

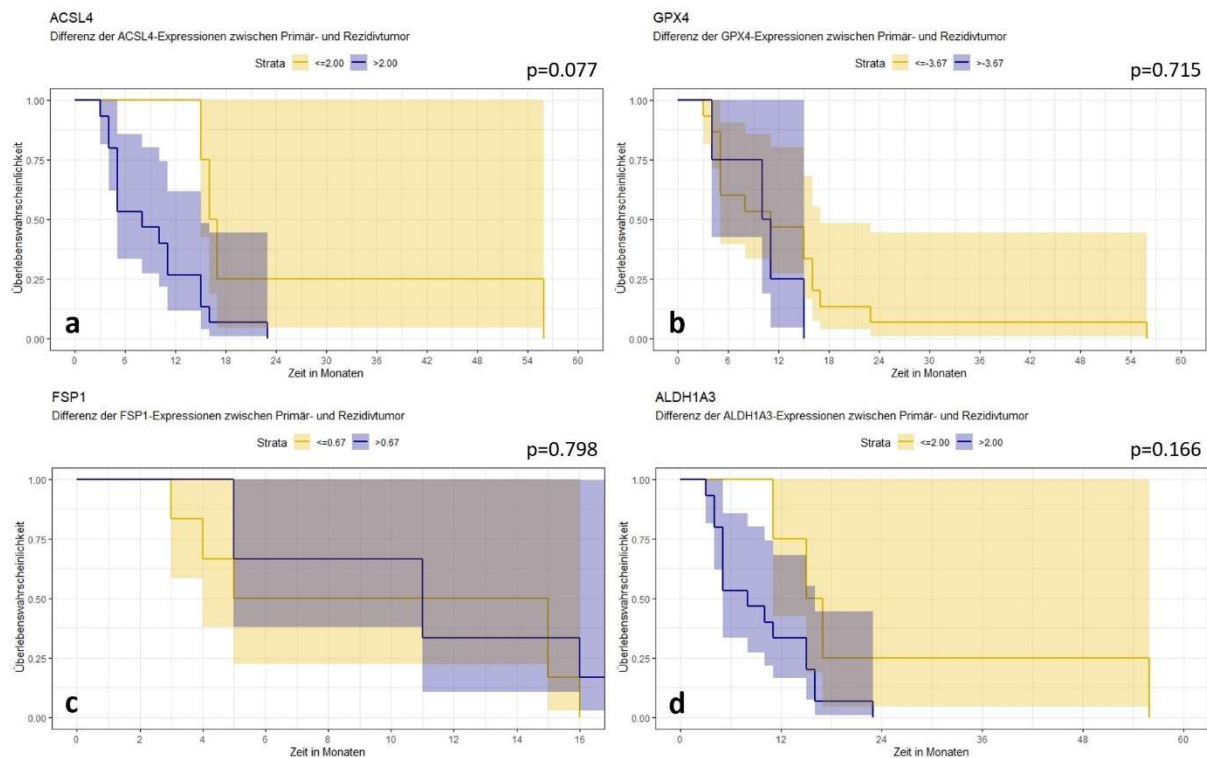
Anschließend wurde für jeden einzelnen Antikörper mit dem „coin“-Paket von RStudio ein Cut-off-Wert ermittelt. Patienten und Patientinnen mit einer stärkeren Zunahme als 2,00 in ihrer ACSL4-Expression (**Abbildung 21a**, blaue Kurve) zeigen mit einem Median von 8,0 Monaten ein gering schlechteres Überleben als Patienten und Patientinnen mit weniger Zunahme mit einem Median von 16,5 Monaten. Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant ( $p=0,077$ ) (**Tabelle 13**). Da die GPX4-Expression bei fast allen Patienten und Patientinnen sinkt, liegt der errechnete Cut-Off Wert bei -3,67 (**Abbildung 21b**). Patienten und Patientinnen, die eine stärkere Abnahme ( $\leq -3,67$ , **Abbildung 21b**, gelbe Kurve) aufweisen, zeigen ein besseres Überleben mit einem Median von 11,0 Monaten im Vergleich zu Patienten und Patientinnen mit einer geringeren Abnahme in ihrer GPX4-Expression mit einem Median von 10,5 Monaten. Jedoch liegt ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang zwischen Expression und Überleben vor ( $p=0,715$ ) (**Tabelle 13**) (Kram et al., 2022).

Der Cut-off-Wert von FSP1 liegt bei 0,67. Patienten und Patientinnen mit einer stärkeren Expressionszunahme weisen ein medianes Überleben von 11,0 Monaten auf; Patienten und Patientinnen mit einer geringeren Zunahme ein medianes Überleben von 10,0 Monaten (**Abbildung 21c**). Es liegt kein signifikanter Zusammenhang zwischen der FSP1-Expression und dem Überleben vor ( $p=0,798$ ) (**Tabelle 13**). Der festgestellte Cut-off Wert der ALDH1A3-Expression ist 2,00. Patienten und Patientinnen mit einer schwerwiegenden Zunahme (blaue Kurve) zeigen ein schlechteres Überleben mit einem Median von 8,0 Monaten im Vergleich zu

Patienten und Patientinnen mit einer geringeren Zunahme mit einem Median von 16,0 Monaten, gleichfalls nicht signifikant ( $p=0,166$ ) (**Abbildung 21d, Tabelle 13**) (Kram et al., 2022).

**Abbildung 21** Analyse des Einflusses der Ferroptose-Marker, ALDH1A3 und FSP1 auf das Gesamtüberleben

Kaplan-Meier-Kurven, die den Einfluss der Expressionsänderung der Proteine ACSL4, GPX4, ALDH1A3 und FSP1 auf das Gesamtüberleben zeigen. Der p-Wert beschreibt den Zusammenhang der Protein-Expressions-Änderung und dem OS (=Gesamtüberleben). Patienten und Patientinnen, deren ACSL4-Expression mehr als 2.00 IRS-Punkte zunimmt, haben ein schlechteres OS. Dieser Zusammenhang ist jedoch nicht signifikant ( $p=0,077$ ) (**a**). Der GPX4-Cutoff-Wert liegt bei -3,67. Patienten und Patientinnen mit mehr Abnahme in GPX4-Expression zeigen ein besseres OS, wenn auch nicht signifikant ( $p=0,715$ ) (**b**). Der FSP1-Cutoff-Wert liegt bei 0,67 und es besteht kein signifikanter Zusammenhang zum OS ( $p=0,798$ ) (**c**). Der ALDH1A3-Cutoff-Wert ist 2,00. Patienten und Patientinnen mit mehr Zunahme in Expression, zeigten ein schlechteres OS ( $p=0,166$ ) (**d**) (aus: Kram et al., 2022, S.10).



**Tabelle 13 Zusammenfassung der Analyse des Einflusses auf das Gesamtüberleben**

Keine der Expressionsänderungen hat einen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben.

| Protein | Cut-off-Wert | Zeit zwischen Rezidiv-Diagnose und Tod |        | p-Wert |
|---------|--------------|----------------------------------------|--------|--------|
|         |              | Mittelwert                             | Median |        |
| ACSL4   | ≤2,00        | 26,0                                   | 16,5   | 0,077  |
|         | >2,00        | 9,3                                    | 8,0    |        |
| GPX4    | ≤-3,67       | 13,6                                   | 11,0   | 0,715  |
|         | >-3,67       | 10,0                                   | 10,5   |        |
| FSP1    | ≤0,67        | 9,7                                    | 10,0   | 0,798  |
|         | >0,67        | 10,8                                   | 11,0   |        |
| ALDH1A3 | ≤2,00        | 24,8                                   | 16,0   | 0,166  |
|         | >2,00        | 9,7                                    | 8,0    |        |

## 5.6 Korrelation

Des Weiteren wird eine Korrelation zwischen MGMT-Promoter-Methylierungsstatus und dem Expressionsunterschied zwischen Primärtumor und Rezidiv der Antikörper ACSL4, GPX4, FSP1 und ALDH1A3 überprüft. Es besteht kein Zusammenhang zu den Expressionsunterschieden der Antikörper ACSL4 ( $\rho=-0,146$ ,  $p=0,518$ ), GPX4 ( $\rho=0,205$ ,  $p=0,359$ ), FSP1 ( $\rho=0,336$ ,  $p=0,336$ ) und ALDH1A3 ( $\rho=0,146$ ,  $p=0,518$ ) (Kram et al., 2022).

## 6. Diskussion

Da trotz intensiver wissenschaftlicher Forschung, die Prognose des GBM weiterhin fatal ist, wurde Ferroptose als möglicher neuer Therapie-Ansatz in dieser Arbeit genauer untersucht. Das Ziel dieser Studie war es zu ermitteln, ob die neu beschriebene Art von Zelltod in GBM stattfindet. Dann könnte Ferroptose eine neue Therapie bieten, indem sie selektiv in GBM-Zellen induziert sowie verstärkt wird und zum Zelltod führt. Entsprechende Expressions-Veränderungen der Ferroptosemarker GPX4 und ACSL4 wurden hierfür prä- und posttherapeutisch analysiert.

Die Ergebnisse dieser Dissertation zeigen eine signifikante Abnahme der GPX4-Expression und signifikante Zunahme der ACSL4-Expression in GBM-Rezidiven. Beide Veränderungen stehen für einen Anstieg des oxidativen Stresses in den Zellen und suggerieren, dass Ferroptose stattfindet. Ähnliche Tendenzen konnten bei den GBM-Primär-Rezidiv-Paaren des TCGA festgestellt werden. Die Expressionszunahme von ALDH1A3 steht in Einklang mit der mesenchymalen Differenzierung. Keine der beobachteten Veränderungen in der Expression hat einen signifikanten Einfluss auf das OS.

Die Doppelimmunfluoreszenz-Resultate legen nahe, dass Ferroptose eher in GFAP<sup>+</sup> Zellen als Iba1<sup>+</sup> Zellen erfolgt und somit in GBM-Tumorzellen und nicht den umgebenden Mikroglia stattfindet.

Darüber hinaus konnte anhand dieser Ergebnisse nicht festgestellt werden, ob TMZ zum Ferroptose-Prozess beiträgt oder ob eine alleinige TMZ-Therapie Ferroptose induzieren kann.

### Limitationen

Der geringe Stichprobenumfang der vorliegenden Arbeit ist sicherlich kritisch zu sehen. Obwohl das GBM der häufigste maligne Hirntumor bei Erwachsenen ist, der Anteil der Patienten und Patientinnen, die bei Auftreten eines Rezidivs noch in einem klinischen Zustand sind, der eine Rezidiv-Operation erlaubt, sehr begrenzt (Louis et al., 2007; Ostrom et al., 2014). Deswegen war die Größe der Kohorte so gering. Eine andere Limitation kommt durch das Fehlen einer Kontrollgruppe zustande. Es kann keine definitive Aussage hinsichtlich TMZ als Ferroptose-Auslöser getroffen werden. Da TMZ heutzutage das Standardmedikament ist, ist es jedoch aus ethischen Gründen, schwierig eine Kontrollgruppe zu rechtfertigen. Es existieren kaum alternative Therapieoptionen und keine ist so etabliert wie TMZ (Stupp et al., 2005). Die Methoden der IHC und IF wurden für diese Arbeit ausgewählt, da humanes Material analysiert werden sollte. Aufgrund spezifischer Formationen, die in den IHC-Resultaten mit GPX4 und ACSL4 erfasst wurden, wurden nur zwei Zellmarker ausgesucht. Die Formierung von positiven Zellen um Blutgefäße herum, wies auf Mikroglia hin und die weite Ausbreitung durch

Tumoreareale auf Tumorzellen. Deswegen wurde diese zwei Marker näher untersucht. Um zu konkludieren, dass Ferroptose in Tumorzellen stattfindet, müssen weitere Marker getestet werden.

### **Ferroptose-Marker**

Zwei ausgewählte Ferroptose-Marker wurden näher untersucht: GPX4 und ACSL4. Dies wurde auf Basis von Resultaten früherer Forschungsarbeiten entschieden, die die Wichtigkeit der zwei Marker für den Ferroptose-Verlauf verifizieren (Dixon & Stockwell, 2019; Doll et al., 2017; Jiang et al., 2021; Yang et al., 2014; Yuan et al., 2016).

Das gewählte Enzym GPX4 spielt eine besondere regulatorische Rolle im Ferroptose-Prozess (Yang et al., 2014). Der Funktionsverlust oder die Inhibition von GPX4 führen durch die Akkumulation von ROS letztendlich zur Einleitung des Zelltods durch Ferroptose (Dixon & Stockwell, 2019; Jiang et al., 2021).

Neben der Generation von PLOOHs und somit ROS durch ACSL4, korreliert die Expression des Enzyms mit der Ferroptose-Sensitivität in Brustkrebs-Zelllinien. Zudem kann Ferroptose durch die Inhibition von ACSL4 verhindert werden (Doll et al., 2017). Aufgrund der fundamentalen Rolle im Lipid-Stoffwechsel von Ferroptose, wird ACSL4 auch als potenzieller Biomarker beschrieben (Yuan et al., 2016).

Deswegen schienen GPX4 und ACSL4, aufgrund ihrer fundamentalen Rollen, vielversprechende Marker im ferroptotischen Prozess zu sein.

Nichtsdestotrotz wurden in den letzten Jahren weitere Ferroptose-Marker diskutiert: Zum einen wurde die Prostaglandin-Synthase 2 (PTGS2/ COX2= Cyclooxygenase-2), die Arachnoid-Säure in Prostaglandine umwandelt, als Ferroptose-Marker beschrieben (Chen et al., 2021; Yang et al., 2014). Das PTGS2-Gen war nach Erastin-Gabe und Einleitung von Ferroptose am meisten hochreguliert (Yang et al., 2014). Eine Hochregulierung von PTGS2 kann aber auch im Rahmen von Ischämien, Heilung oder oxidativen Reizen beobachtet werden und ist somit nicht spezifisch für Ferroptose (FitzGerald, 2003; Xuan et al., 2003).

Ein weiterer diskutierter Ferroptose-Marker ist die ChaC Glutathion-spezifische  $\gamma$ -Glutamyl-Zyctotransferase 1 (CHAC1) (Chen et al., 2021). Cystein-Mangel durch Inhibition des  $x_c^-$ -Systems führt zu einer Hochregulierung des aktivierenden Transkriptions-Faktors 4 (ATF4), der wiederum eine Hochregulierung von CHAC1 bewirkt (Chen et al., 2017; Chen et al., 2021; Dixon et al., 2014). CHAC1 baut das GSH in der Zelle ab und unterstützt so die Ferroptose (Chen et al., 2021; Dixon et al., 2014). Deswegen könnte die Hochregulierung der CHAC1-Genexpression einen selektiven pharmakodynamischen Marker für Ferroptose, die durch Inhibition des  $x_c^-$ -Systems herbeigeführt wurde, darstellen (Chen et al., 2021). Zudem konnte eine Korrelation der ATF4-Expression mit der Resistenz gegen TMZ festgestellt werden, die

durch eine ATF4-vermittelte Überexpression des  $x_c^-$ -Systems zustande kommen soll (Chen et al., 2017).

Ein anderer potenzieller Ferroptose-Marker ist TfR1 (Rochette et al., 2022). Der Rezeptor agiert als Hauptregulator der Eisenaufnahme in die Zelle. Nach RSL3-Gabe konnte eine vermehrte Akkumulation im Zellplasma beobachtet werden. Als neuer Ferroptose-Marker könnte TfR1 neue Informationen zu den Mechanismen der Eisenaufnahme und -mobilisation während Ferroptose liefern (Feng et al., 2020).

FSP1 wird als weiterer Marker der Ferroptose-Inhibition beschrieben (Viktorinova, 2023). Die Expression von FSP1 korreliert mit der Resistenz zu GPX4-Inhibitoren und ist damit ein Biomarker für Ferroptose-Resistenz in vielen Krebs-Arten (Bersuker et al., 2019).

Die meisten Ferroptose-Marker sind auch bei anderen Formen von RCD zu finden und somit nicht spezifisch für Ferroptose. Eine Kombination mehrerer Marker könnte Ferroptose gezielter detektieren (Chen et al., 2021).

## **Ferroptose und GBM**

Die Ergebnisse, dieser Studie weisen auf Ferroptose in GBM hin. Während die GPX4-Expression im Rezidiv sinkt, steigt die ACSL4-Expression. Diese Ergebnisse konnten durch die TCGA-Daten-Analyse verifiziert werden (Kram et al., 2022).

Die folgende Lipidperoxidation führt zur ROS-Produktion, was in oxidativem Stress und schließlich Ferroptose resultiert (Dixon & Stockwell, 2019; Doll et al., 2017). Des Weiteren, unterstützt ACSL4 die PUFA-OOHs Generierung und anschließende Reinkorporation letzteren zurück in die Membran. Die möglichen Folgen sind eine Verformung der Membran, Ausdünnung und Poren-Entstehung (Agmon et al., 2018). Die Kombination aus Abnahme der GPX4-Expression und Zunahme der ACSL4-Expression könnte den oxidativen Stress in der Zelle repräsentieren. Die IHC-Ergebnisse konnten durch die TCGA-Daten-Analyse verifiziert werden (Kram et al., 2022). Obwohl diese Veränderungen nicht zwangsläufig für Ferroptose sprechen, stehen genau diese Enzym-Expressions-Veränderungen für zwei der definierten „Hallmarks“ (Dixon & Stockwell, 2019).

Weiterführend wurde im Rahmen dieser Arbeit evaluiert, ob Ferroptose in Tumorzellen oder Mikroglia-Zellen stattfindet. Der Anteil der ACSL4<sup>+</sup> und GPX4<sup>+</sup> Zellen an den GFAP<sup>+</sup> Zellen war mehr als doppelt so hoch, verglichen mit dem Anteil an Iba1<sup>+</sup> Zellen (Kram et al., 2022). Dies bedeutet, dass GFAP<sup>+</sup> Zellen häufiger ferroptotische Marker exprimieren als Iba1<sup>+</sup> Zellen.

Wie bereits erwähnt, veränderte sich der GFAP-Anteil in Übereinstimmung mit den IHC-Ergebnissen: Die Anzahl an GPX4<sup>+</sup> Zellen, die auch GFAP exprimieren, nahm im Rezidiv signifikant ab, während die Anzahl an ACSL4<sup>+</sup> Zellen signifikant zunahm (Kram et al., 2022).

Gleichzeitig war der Anteil der GFAP<sup>+</sup> Zellen an den GPX4<sup>+</sup> und ACSL4<sup>+</sup> Zellen sowohl im Primärtumor als auch Rezidiv drei- bis viermal so hoch wie der Anteil der Iba1<sup>+</sup> Zellen an den GPX4<sup>+</sup> und ACSL4<sup>+</sup> Zellen. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass 70 bis 80% der Zellen, die die Ferroptose-Marker GPX4 und ACSL4 exprimieren, auch GFAP exprimieren (Kram et al., 2022).

Diese Resultate deuten darauf hin, dass Ferroptose eher in GFAP<sup>+</sup> Zellen als Iba1<sup>+</sup> Zellen erfolgt. Das wiederum impliziert, dass Ferroptose wahrscheinlich in GBM-Tumorzellen und nicht den umgebenden Mikroglia geschieht. Der Anteil der GPX4<sup>+</sup> und ACSL4<sup>+</sup> Zellen an den Iba1<sup>+</sup> Zellen könnte durch den oxidativen Stress in den Mikroglia erklärbar sein.

Dennoch wird eine Eisen-Akkumulation auch in Mikroglia registriert. Vor allem im Kortex kommt es zu Ablagerungen (Liu et al., 2022; Puy et al., 2018). Mikroglia gehören zum angeborenen Immunsystem des ZNS und spielen eine wichtige Rolle bei der Phagozytose und Elimination von Protein-Aggregaten, toten Zellen und anderen pathologischen Partikeln (Colonna & Butovsky, 2017; Liu et al., 2022; Orihuela et al., 2016). Vor allem bei Parkinson konnte eine Assoziation zwischen der Intensität der Mikrogliose und Eisen-Akkumulation detektiert werden. Des Weiteren bieten Mikroglia durch ihre Eisen-Anreicherung bei Multipler Sklerose und Alzheimer Patienten und Patientinnen neue Bildgebungsmöglichkeiten (Gillen et al., 2018; Liu et al., 2022; van Duijn et al., 2017).

Falls Ferroptose exklusiv in GBM-Tumorzellen stattfindet, könnte der Tumor mit einem spezifischen ferroptotischen Ansatz therapiert werden. Jedoch wurden in dieser Arbeit nur zwei Marker Zellmarker getestet. Um auszuschließen, dass Ferroptose in anderen Zellen erfolgt, müssen weitere Marker überprüft werden (Kram et al., 2022).

## **FSP1**

Da FSP1 bei vorliegender GPX4-Deletion oder Inhibition Zellen vor Ferroptose schützt (Bersuker et al., 2019; Doll et al., 2019), wurde spekuliert, dass die Expression im Falle einer abnehmenden GPX4-Expression ansteigen könnte. Auch wenn die IHC-Ergebnisse nicht signifikant waren, kann eine solche Expressions-Zunahme von FSP1 beobachtet werden (Kram et al., 2022). Anders als die GPX4-GSH-Achse, bei der Lipid-Hydroperoxide direkt reduziert werden, regeneriert die Oxidoreduktase FSP1 extramitochondriales Ubiquinon zu Ubiquinol, das wiederum über Vitamin E die Lipid-Peroxidation durch Reduktion von Lipid-Radikalen aufhält (Jiang et al., 2021; Kram et al., 2022). Eine Inhibition des Enzyms führt folglich zu einer Ansammlung von Lipid-Peroxiden und Einleitung der Ferroptose. Dieser Mechanismus der Ferroptose-Induktion könnte auch in der Krebstherapie zum Einsatz kommen. Dabei wurden iFSP1, als kompetitiver Inhibitor, und icFSP1, als ein Inhibitor, der zu einer subzellulären Relokalisation von der Membran und einer Kondensation von FSP1 führt, beschrieben

(Nakamura et al., 2023). Nichtsdestotrotz werden weitere Studien benötigt, die eine Imbalance zwischen der antioxidativen, inklusive FSP1 und GPX4, und oxidativen Achse, die zur Ansammlung von Radikalen sowie PUFA-Anreicherung in den Membranen führen, belegen (Dixon & Stockwell, 2019).

### **Ferroptose und ALDH1A3**

Da bisher wenig bis keine Studien, den Zusammenhang zwischen ALDH1A3 und Ferroptose untersucht haben, war dieser Teil der Arbeit rein explorativ. In den IHC-Versuchen konnte eine signifikante Zunahme der ALDH1A3-Expression im GBM-Rezidiv erfasst werden. ALDH1A3 ist assoziiert mit mesenchymaler Differenzierung in GBM. Zudem behalten Tumorzellen durch das Protein einen undifferenzierten, Stammzell-ähnlichen Zustand, der zu einer Therapie-Resistenz führen kann (Combs et al., 2016; Li et al., 2018; Rasper et al., 2010). Deshalb könnte die Zunahme die mesenchymale Differenzierung oder einfach den wachsenden Anteil überlebender Stammzellen widerspiegeln. Zudem wurde eine positive Korrelation zwischen der ALDH1A3-Expression und der Ferroptose-Sensitivität beschrieben (Wu et al., 2022). Nur in Zellen mit hoher ALDH1A3-Expression, konnte Ferroptose durch RSL3 induziert werden. Dies würde bedeuten, dass ALDH1 als Regulator sowie Sensor für Autophagie, die für den ferroptotischen Prozess nötig ist, fungieren könnte. Bereits zuvor wurde beschrieben, dass Aldehyde, wie beispielsweise 4-Hydroxy-Trans-2-Nonenal, Autophagie fördern können (Haberzettl & Hill, 2013). Des Weiteren könnte Ferroptose vor allem für die rezidivierenden GBM, die ALDH1 hoch exprimieren, eine Therapieoption darstellen (Wu et al., 2022). Aufgrund der Tatsache, dass ALDH1A3 die Entgiftung von Aldehyden unterstützt, die durch Lipid-Oxidation entstehen, könnte eine Expressionszunahme eine erhöhte Lipid-Oxidation anzeigen, die während Ferroptose stattfindet. ALDH1A3 könnte die Abnahme an GPX4 und die folgende Akkumulation an ROS und PUFA-OOHs kompensieren. Um diese Vermutung zu bestätigen sind weitere Untersuchungen nötig.

### **TMZ und Ferroptose**

Überdies konnte auf Basis dieser Ergebnisse nicht festgestellt werden, ob TMZ zum Ferroptose-Prozess beiträgt oder eine alleinige TMZ-Therapie Ferroptose auslösen kann.

Eine kurze, niedrig-dosierte TMZ-Therapie soll zu einer protektiven Autophagie führen, die das Zellüberleben sichern soll. Andererseits soll eine langzeitige, hoch-dosierte TMZ-Therapie zu einer Autophagie führen, die den Zelltod einleitet (Yan et al., 2016). Auf welche Weise TMZ zur Ansammlung von ROS und Autophagie führt, ist noch nicht gänzlich klar. Ein Zusammenhang mit ALDH1A3, das auch Autophagie einleiten kann, wird diskutiert (Chen et al., 2015; Wu et al., 2020). Zudem wurde eine Runterregulation von ALDH1A3 bei TMZ-Resistenz festgestellt sowie eine anschließende Hochregulation nach TMZ-Stopp. Danach waren die Zellen

wieder sensitiv auf Ferroptose-Induktion durch RSL3 (Wu et al., 2023). Des Weiteren, waren ALDH1A3-knockout Zellen sensibler gegenüber TMZ (Wu et al., 2020). Da TMZ auf unbekannte Weise zu Autophagie führt, könnte ALDH1A3 in diesem Prozess mitabgebaut werden und sich nach Einnahme-Stopp wieder regenerieren (Wu et al., 2018; Wu et al., 2020). Diese Beobachtungen lassen auf ein komplexes Zusammenspiel zwischen der ALDH1A3-Expression, TMZ-Resistenz in GBM und dem Lipidstoffwechsel schließen (Wu et al., 2020; Wu et al., 2023).

Bisher wurde Ferroptose nicht als natürlicher Prozess in GBM erfasst. Dennoch wurde auf der Suche nach Therapie-Optionen, Ferroptose-Induktion in vitro und ex vivo untersucht. Diese Studien konnten nach Induktion ein besseres Ansprechen auf die Therapie feststellen (Buccarelli et al., 2018; Dixon & Stockwell, 2019; Stockwell et al., 2017).

In einer Studie von Buccarelli et al. (2018) wurde eine erhöhte Anfälligkeit der Glioblastom-Stammzellähnlichen Zellen (GSC) für TMZ in vitro beobachtet. Dabei wurde eine Autophagie in eine Eisen-abhängige Form von Zelltod moduliert, die durch eine Akkumulation von Lipidperoxiden charakterisiert ist. Infolgedessen war TMZ durch die Induktion von Ferroptose effektiver (Buccarelli et al., 2018). Sehm et al. (2016) konnten ähnliche Prozesse registrieren: TMZ führte zu einem erhöhten Einbau des  $\gamma$ -Glu-Cyst-Di-Pep-System und damit erhöhten GSH-Konzentrationen. Damit nahm die Konzentration an ROS ab. Die zusätzliche Gabe von Erastin ließ die GSH-Konzentration nun sinken und steigerte die Zytotoxizität von TMZ (Sehm et al., 2016).

Da alle Patienten und Patientinnen in diesem Projekt eine TMZ-Therapie erhalten haben, könnte das Medikament als ein möglicher Auslöser fungieren. Um diesen Effekt besser einschätzen zu können, sind allerdings weitere Studien nötig, die eine aktive TMZ-Therapie Gruppe mit einer Kontrollgruppe vergleichen, welche keine TMS-Therapie enthält.

## **Ferroptose und OS**

Das Gesamtüberleben (OS) wurde durch die Änderung der Expression der Ferroptose-Marker nicht signifikant beeinflusst. Dennoch konnten geringe Unterschiede festgestellt werden. Patienten und Patientinnen deren GPX4-Expression mehr als 5 IRS-Punkte ( $\leq -5$ ) abnahm, zeigten ein schlechteres Gesamtüberleben. Dies suggeriert, dass der Verlust des entgiftenden Systems mit dem Gesamtüberleben zusammenhängen könnte. Eine ähnliche Beobachtung konnte bei der ACSL4-Expression gemacht werden: Patienten und Patientinnen mit einer stärkeren Zunahme der ACSL4-Expression als 3,33 IRS-Punkte, hatten ein schlechteres OS als Patienten und Patientinnen mit schwächerer Zunahme (Kram et al., 2022).

Ebenso wie GPX4 und ACSL4, beeinflusst ALDH1A3 das OS nicht signifikant. Jedoch konnten leichte Unterschiede zwischen den Gruppen registriert werden. Patienten und Patientinnen mit einer stärkeren Zunahme als 2 IRS-Punkten im Rezidiv zeigten schlechteres OS. Dies könnte

zur Annahme führen, dass Patienten und Patientinnen mit einer stärkeren Abnahme der GPX4-Expression, eine höhere ALDH1A3-Aktivität benötigen, um die akkumulierenden PUFA-OOHs unschädlich zu machen und die Zelle zu entgiften. Dies spricht dafür, dass Patienten und Patientinnen mit mehr PUFA-OOHs-Generierung ein schlechteres OS haben. Die nicht-signifikanten Ergebnisse könnten der kleinen Fallzahl und den dadurch größeren Konfidenzintervallen zugeschrieben werden (Kram et al., 2022).

Liu et al. haben mithilfe von Genom Datenbanken, TCGA eingeschlossen, 19 Ferroptose-assoziierte Gene in Gliomen identifiziert. Auf Basis dieser bildeten sie einen Risiko-Score. Der Risiko-Score zeigte eine positive Korrelation zur Malignität und Migrations- sowie Invasionsverhalten der Gliome. Des Weiteren war ein hoher Risiko-Score mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Da sechs von den 19 Ferroptose-assoziierten Genen in der GPX4-Regulation involviert sind, könnte GPX4 und Ferroptose eine essenzielle Rolle in der Prognose von Gliom-Patienten und -Patientinnen spielen (Kram et al., 2022; Liu et al., 2020).

### **Zukunftsausblick**

Die Zusammenhänge zwischen Ferroptose, GBM, TMZ und ALDH1A3 sind komplex aber bieten viele neue Therapieansätze in Bezug auf GBM. Eine GBM-Therapie, bei der mit Hilfe von Ferroptose-Induktoren gezielt Ferroptose in Tumorzellen ausgelöst wird, würde die Prognose von GBM erheblich verbessern und gleichzeitig das umliegende Gewebe schonen. Diese Herangehensweise wird bereits wie erwähnt, bei anderen Tumorentitäten verfolgt und könnte die Krebstherapie in den kommenden Jahren revolutionieren. Deswegen lohnt es sich diesen Ansatz in der Zukunft weiter zu verfolgen und zu erforschen.

## **7. Zusammenfassung**

Obwohl das GBM ein verbreitetes Forschungsthema ist und zahlreiche Therapie-Optionen vorhanden sind, bleibt die Prognose aufgrund von Therapie-Resistenz, genetischer Heterogenität und diffusem, infiltrativem Wachstum verheerend. Der kürzlich beschriebene nicht-apoptotische Zelltod „Ferroptose“ könnte neue Therapie-Ansätze bieten: Mithilfe von Ferroptose-Induktoren in Kombination mit Chemotherapeutika könnte der Zelltod von Tumorzellen induziert werden.

Da Ferroptose im Zusammenhang mit GBM nicht ausreichend untersucht wurde, beschäftigte sich die vorliegende Arbeit näher mit der Rolle von Ferroptose in humanem, adultem Hirngewebe von GBM-Patienten und -Patientinnen. Die Änderung der Expression der ausgewählten Ferroptose-Marker GPX4 und ACSL4 zwischen Primärtumor und Rezidiv wurde immunhistochemisch und in der Doppelimmunfluoreszenz mit den Zellmarkern GFAP und Iba1 beurteilt.

Zusätzlich wurde die Veränderung von FSP1 und ALDH1A3 immunhistochemisch erfasst. Die Patienten und Patientinnen erhielten alle eine Radiochemotherapie mit TMZ.

Es wurde Gehirnmaterial von 24 Patienten und Patientinnen (7 weiblich, 17 männlich) ausgewählt. Inklusionskriterien waren ein diagnostiziertes GBM vom IDH-Wildtyp, die Entwicklung eines Rezidivs und eine TMZ-Therapie nach der Erstdiagnose.

Die IHC wurde mit Hilfe des IRS am Lichtmikroskop analysiert. Die Auswertung der Doppelimmunfluoreszenz am Fluoreszenzmikroskop erfolgte semiquantitativ. Die ausgewählte Stichprobe war vorselektiert, da ausschließlich Patienten und Patientinnen mit GBM-Rezidiv eingeschlossen wurden. Deswegen wurden mögliche Einflüsse der Änderung der GPX4-, ACSL4-, FSP1- und ALDH1A3-Expression auf das Überleben mit der Überlebenszeit ab Rezidiv-Diagnose untersucht.

Es konnte eine signifikante Abnahme der GPX4-Expression und signifikante Zunahme der ACSL4-Expression im Rezidiv beobachtet werden. Während die GPX4-Expression um durchschnittlich 4,36 IRS-Punkte abnahm, stieg die ACSL4-Expression um durchschnittlich 4,58 IRS-Punkte. Beide Veränderungen stehen für einen Anstieg des oxidativen Stresses in den Zellen und suggerieren, dass Ferroptose stattfindet. Ähnliche Tendenzen konnten bei den GBM-Primär-Rezidiv-Paaren des TCGA festgestellt werden. Die ACSL4-Expression nahm um durchschnittlich 0,36 des natürlichen Logarithmus der FPKM zu, während die GPX4-Expression um 0,06 abnahm. Die FSP1-Expression nahm um durchschnittlich 0,62 IRS-Punkte zu, während die ALDH1A3 um 3,94 IRS-Punkte stieg. Diese Entwicklung steht in Einklang mit der mesenchymalen Differenzierung. Auch hier bestand kein signifikanter Zusammenhang zum OS.

Bei den Doppelimmunfluoreszenz konnten dieselben Veränderungen, die in der IHC registriert wurden, erfasst werden.

Der Anteil der ACSL4<sup>+</sup> Zellen an den GFAP<sup>+</sup> Zellen nahm um durchschnittlich 29,3% signifikant zu. Der Anteil der ACSL4<sup>+</sup> Zellen an den Iba1<sup>+</sup> Zellen stieg im Schnitt um 4,2% signifikant an. Überdies konnte eine signifikante Abnahme des Anteils der GPX4<sup>+</sup> Zellen an den GFAP<sup>+</sup> Zellen um durchschnittlich 38,0%, der an den an Iba1<sup>+</sup> Zellen um 9,2% dokumentiert werden. Bei Berechnung des Anteils der GFAP<sup>+</sup> Zellen an den ACSL4<sup>+</sup> und GPX4<sup>+</sup> Zellen, waren die Durchschnitte an ACSL4<sup>+</sup> Zellen mit 76,1% im Primärtumor und 70,3% im Rezidiv sowie an GPX4<sup>+</sup> Zellen mit 79,1% und 72,1% drei- bis viermal höher als der Anteil der Iba1<sup>+</sup> Zellen. Denn der Anteil der Iba1<sup>+</sup> Zellen an den ACSL4<sup>+</sup> Zellen betrug durchschnittlich 22,2% im Primärtumor und 16,1% im Rezidiv und der Anteil der Iba1<sup>+</sup> Zellen an den GPX4<sup>+</sup> Zellen lag bei 13,6% und 20,2%.

Eine signifikante Einflussnahme der Expressionsänderungen auf das OS konnte nicht detektiert werden. Zudem besteht kein Zusammenhang zwischen MGMT-Methylierungsstatus und den Expressionsunterschieden der Antikörper.

Die Ergebnisse, dieser Studie weisen auf Ferroptose in GBM hin. Zusätzlich sprechen die Doppelimmunfluoreszenz-Resultate dafür, dass Ferroptose eher in GFAP<sup>+</sup> Zellen als Iba1<sup>+</sup> Zellen erfolgt und somit wahrscheinlich in GBM-Tumorzellen und nicht den umgebenden Mikroglia stattfindet. Die Zunahme der ALDH1A3-Expression, möglicherweise im Rahmen von Ferroptose, und das komplexe Zusammenspiel zwischen ALDH1A3, TMZ, Lipidperoxidation und Ferroptose gilt es in weiteren Experimenten näher zu untersuchen. Überdies konnte auf Basis dieser Ergebnisse nicht festgestellt werden, ob TMZ zum Ferroptose-Prozess beiträgt oder eine alleinige TMZ-Therapie Ferroptose auslösen kann.

## 8. Reagenzien- und Geräte-Verzeichnis

### 8.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 14 Verwendete Chemikalien und Reagenzien

| Substanz                                                 | Firma                                             |
|----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Albumin Fraktion V (BSA)                                 | Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| Aqua Poly Mount/ Eindeckelmedium                         | Polysciences, Inc., Warrington, USA               |
| Bovines Serumalbumin                                     | Biochrom AG, Berlin, Deutschland                  |
| Citronensäure-Monohydrat                                 | Merck KG, Darmstadt, Deutschland                  |
| DAB                                                      | Vector Laboratories, Burlingame, USA              |
| Di-Natriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) | Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| Dulbeccos's Phosphate-Buffered Saline (DPBS (1x))        | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA            |
| Eselserum                                                | Sigma Aldrich, St. Louis, USA                     |
| Ethanol 70%                                              | Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| Ethanol 96%                                              | Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| Gelatine von Kaltwasserfischhaut                         | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA                     |
| Hämalaunlösung nach Mayer                                | Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| Kaliumchlorid (KCL)                                      | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )    | Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| Leitungswasser                                           |                                                   |
| Natriumchlorid (NaCl)                                    | Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| Natriumhydroxid (NaOH)                                   | Merck KG, Darmstadt, Deutschland, Deutschland     |
| Normales Pferde Serum (NHS)                              | Vector Laboratories, Burlingame                   |
| Organo/Limonene Mount™                                   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |

|                                                                      |                                                   |
|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Pertex                                                               | Histolab Products AB, Göteborg, Deutschland       |
| Salzsäure 37% (HCl)                                                  | Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| Sodium Phosphat Dibasic Dihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Triton X 100                                                         | Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) 30%              | Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| Xylol                                                                | Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |

## 8.1.2 Kits

**Tabelle 15** *Verwendete Kits*

| Name                                                                                                                          | Katalog-Nummer                    | Firma                                |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|
| Avidin/Biotin Blocking Kit                                                                                                    | SP-2001                           | Vector Laboratories, Burlingame, USA |
| ImmPACT™ DAB, Peroxidase Substrate Kit<br>ImmPACT™ DAB Chromogen (Solution 1)<br>ImmPACT™ DAB Diluent (Solution 2)            | SK-4105                           | Vector Laboratories, Burlingame, USA |
| VECTASTAIN® Elite® ABC Kit, Peroxidase (Standard)<br>Reagent A (Avidin, ABC Elite)<br>Reagent B (Biotinylated HRP, ABC Elite) | PK-6100<br><br>30005<br><br>30006 | Vector Laboratories, Burlingame, USA |
| Vector® TrueVIEW™ Auto-fluorescence Quenching Kit with DAPI                                                                   | SP-8500                           | Vector Laboratories, Burlingame, USA |

### 8.1.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 16** *Verwendete Geräte*

| Gerät                | Modell              | Firma                                                        |
|----------------------|---------------------|--------------------------------------------------------------|
| Dampfkocher          | TEFAL Steam cuisine | Groupe SEB Deutschland, GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland |
| Fluoreszenzmikroskop | HBO 100             | Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland                       |
| Kamera               | AxiCam MRc5         | Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland                       |
| Magnetrührer         | RCT basic           | IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland                |
| Mikroskop            | BX40                | Olympus, Tokio, Japan                                        |
| Mikrotom             | HM355               | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA                  |
| pH-Meter             | EL-30               | Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland                     |

**Tabelle 17** *Verwendete Verbrauchsmaterialien*

| Verbrauchsmaterial                         | Firma                                                        |
|--------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| Mikrotomklingen                            | Feather, Osaka, Japan                                        |
| Objektträger-Menzel-Gläser Superfrost Plus | Süsse Labortechnik GmbH & Co. KG, Guldensburg, Deutschland   |
| Pipetten                                   | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland                           |
| Pipettenspitzen                            | Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich |

## 8.1.4 Pufferlösungen

**Tabelle 18** *Verwendete Pufferlösungen*

Die Pufferlösungen wurden selbst hergestellt.

| Blocking-Puffer (Immunhistochemie) |                 |
|------------------------------------|-----------------|
| PBS-Puffer                         | 1 x             |
| Normales Pferdeserum               | 2,5 %           |
| Bovines Serumalbumin               | 1 %             |
| Gelatine von Kaltwasserfischhaut   | 0,2 %           |
| Triton X 100                       | 0,1 %           |
| Blocking Puffer (Immunfluoreszenz) |                 |
| PBS-Puffer                         | 1 x             |
| Esenserum                          | 2,5 %           |
| Bovines Serumalbumin               | 1 %             |
| Gelatine von Kaltwasserfischhaut   | 0,2 %           |
| Triton X 100                       | 0,1 %           |
| Citrat-Puffer                      |                 |
| Citronensäure-Monohydrat           | 1,05 g          |
| Aqua dest.                         | 0,5 l           |
| NaOH                               | pH 6 einstellen |
| PBS-Puffer 10x                     |                 |
| NaCl                               | 140 mM          |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>   | 10 mM           |
| KCl                                | 2,7 mM          |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>    | 1,8 mM          |

## 9. Tabellenverzeichnis

|             |                                                                                                                                           |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Tabelle 1:  | Übersicht über Patienten und Patientinnen sowie Tumoren Charakteristika                                                                   |
| Tabelle 2:  | Verwendete Antikörper                                                                                                                     |
| Tabelle 3:  | Zusammenfassung der IHC-Ergebnisse                                                                                                        |
| Tabelle 4:  | Zusammenfassung der ACSL4-IHC-Ergebnisse                                                                                                  |
| Tabelle 5:  | Zusammenfassung der GPX4-IHC-Ergebnisse                                                                                                   |
| Tabelle 6:  | Zusammenfassung der FSP1-IHC-Ergebnisse                                                                                                   |
| Tabelle 7:  | Zusammenfassung der ALDH1A3-IHC-Ergebnisse                                                                                                |
| Tabelle 8:  | Zusammenfassung der TCGA-Daten-Analyse                                                                                                    |
| Tabelle 9:  | Zusammenfassung der Doppelimmunfluoreszenz-Ergebnisse                                                                                     |
| Tabelle 10: | Zusammenfassung der Doppelimmunfluoreszenz-Ergebnisse mit Berechnung der Anteile der Ferroptose-assoziierten Proteinen an den Zellmarkern |
| Tabelle 11: | Zusammenfassung der Doppelimmunfluoreszenz-Ergebnisse mit Berechnung der Anteile der Zellmarker an den Ferroptose-assoziierten Proteinen  |
| Tabelle 12: | Zusammenfassung der Doppelimmunfluoreszenz-Ergebnisse mit ACSL4 und GPX4                                                                  |
| Tabelle 13: | Zusammenfassung der Analyse des Einflusses auf das Gesamtüberleben                                                                        |
| Tabelle 14: | Verwendete Chemikalien und Reagenzien                                                                                                     |
| Tabelle 15: | Verwendete Kits                                                                                                                           |
| Tabelle 16: | Verwendete Geräte                                                                                                                         |
| Tabelle 17: | Verwendete Verbrauchsmaterialien                                                                                                          |
| Tabelle 18: | Verwendete Pufferlösungen                                                                                                                 |

## 10. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Die Verteilung der Tumoren des zentralen Nervensystems (aus: Ostrom et al., 2022, S.v20)
- Abbildung 2: Integrierte histomolekulare Klassifikation der Gliome im Erwachsenenalter (aus: Wick et al., 2021, S.22)
- Abbildung 3: Therapie-Optionen für Glioblastom-Patienten und -Patientinnen (aus: Weller et al., 2022, S.181)
- Abbildung 4: Die drei Kennzeichen von Ferroptose (aus: Dixon & Stockwell, 2019, S.37)
- Abbildung 5: Ferroptose Mechanismen
- Abbildung 6: Beispiele der IHC-Färbungen anhand von GBM Primär- und Rezidiv-Tumor-Pärchen (aus: Kram et al., 2022, S.5)
- Abbildung 7: Protein-Expression in GBM Primär- und Rezidiv-Tumoren (aus: Kram et al., 2022, S.6)
- Abbildung 8: ACSL4-IHC-Färbungen eines GBM Primär- und Rezidiv-Tumor-Pärchen (aus: Kram et al., 2022, S.5)
- Abbildung 9: ACSL4-Expression in GBM Primär- und Rezidiv-Tumoren (aus: Kram et al., 2022, S.6)
- Abbildung 10: GPX4-IHC-Färbungen eines GBM Primär- und Rezidiv-Tumor-Pärchen (aus: Kram et al., 2022, S.5)
- Abbildung 11: GPX4-Expression in GBM Primär- und Rezidiv-Tumoren (aus: Kram et al., 2022, S.6)
- Abbildung 12: FSP1-IHC-Färbungen eines GBM Primär- und Rezidiv-Tumor-Pärchen (aus: Kram et al., 2022, S.5)
- Abbildung 13: FSP1-Expression in GBM Primär- und Rezidiv-Tumoren (aus: Kram et al., 2022, S.6)
- Abbildung 14: ALDH1A3-IHC-Färbungen eines GBM Primär- und Rezidiv-Tumor-Pärchen (aus: Kram et al., 2022, S.5)
- Abbildung 15: ALDH1A3-Expression in GBM Primär- und Rezidiv-Tumoren (aus: Kram et al., 2022, S.6)
- Abbildung 16: Entwicklung der ACSL4- und GPX4-Expression in GBM Primär- und Rezidiv-Tumor-Pärchen aus dem TCGA (aus: Kram et al., 2022, S.6)
- Abbildung 17: Beispiele der Doppel-IF-Färbungen (aus: Kram et al., 2022, S.7)
- Abbildung 18: Anteil der Ferroptose-assoziierten Proteinen an den Zellmarkern (aus: Kram et al., 2022, S.8)
- Abbildung 19: Anteil der Zellmarker an den Ferroptose-assoziierten Proteinen (aus: Kram et al., 2022, S.8)

Abbildung 20: Beispiele der Doppel-IF-Färbungen mit ACSL4 und GPX4 (aus: Kram et al., 2022, S.9)

Abbildung 21: Analyse des Einflusses der Ferroptose-Marker, ALDH1A3 und FSP1 auf das Gesamtüberleben (aus: Kram et al., 2022, S.10)

## 11. Literaturverzeichnis

- Abeyasinghe, R. D., Roberts, P. J., Cooper, C. E., MacLean, K. H., Hider, R. C., & Porter, J. B. (1996). The environment of the lipoxygenase iron binding site explored with novel hydroxypyridinone iron chelators. *Journal of Biological Chemistry*, 271(14), 7965-7972. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.14.7965>
- Agmon, E., Solon, J., Bassereau, P., & Stockwell, B. R. (2018). Modeling the effects of lipid peroxidation during ferroptosis on membrane properties. *Scientific Reports*, 8(1), 5155. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23408-0>
- Alifieris, C., & Trafalis, D. T. (2015). Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacology & Therapeutics*, 152, 63-82. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.05.005>
- Amirian, E. S., Zhou, R., Wrensch, M. R., Olson, S. H., Scheurer, M. E., Il'yasova, D., Lachance, D., Armstrong, G. N., McCoy, L. S., Lau, C. C., Claus, E. B., Barnholtz-Sloan, J. S., Schildkraut, J., Ali-Osman, F., Sadetzki, S., Johansen, C., Houlston, R. S., Jenkins, R. B., Bernstein, J. L., . . . Bondy, M. L. (2016). Approaching a Scientific Consensus on the Association between Allergies and Glioma Risk: A Report from the Glioma International Case-Control Study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 25(2), 282-290. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.Epi-15-0847>
- Bailey, H. H., Mulcahy, R. T., Tutsch, K. D., Arzoomanian, R. Z., Alberti, D., Tombes, M. B., Wilding, G., Pomplun, M., & Spriggs, D. R. (1994). Phase I clinical trial of intravenous L-buthionine sulfoximine and melphalan: an attempt at modulation of glutathione. *Journal of Clinical Oncology*, 12(1), 194-205. <https://doi.org/10.1200/jco.1994.12.1.194>
- Bailey, P., & Cushing, H. (1926). *A classification of the tumors of the glioma group on a histogenetic basis : with a correlated study of prognosis*. Lippincott Philadelphia, PA.
- Balss, J., Meyer, J., Mueller, W., Korshunov, A., Hartmann, C., & von Deimling, A. (2008). Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathologica*, 116(6), 597-602. <https://doi.org/10.1007/s00401-008-0455-2>
- Basuli, D., Tesfay, L., Deng, Z., Paul, B., Yamamoto, Y., Ning, G., Xian, W., McKeon, F., Lynch, M., Crum, C. P., Hegde, P., Brewer, M., Wang, X., Miller, L. D., Dymant, N., Torti, F. M., & Torti, S. V. (2017). Iron addiction: a novel therapeutic target in ovarian cancer. *Oncogene*, 36(29), 4089-4099. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.11>
- Bersuker, K., Hendricks, J. M., Li, Z., Magtanong, L., Ford, B., Tang, P. H., Roberts, M. A., Tong, B., Maimone, T. J., Zoncu, R., Bassik, M. C., Nomura, D. K., Dixon, S. J., & Olzmann, J. A. (2019). The CoQ oxidoreductase FSP1 acts parallel to GPX4 to inhibit ferroptosis. *Nature*, 575(7784), 688-692. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1705-2>
- Bette, S., Barz, M., Huber, T., Straube, C., Schmidt-Graf, F., Combs, S. E., Delbridge, C., Gerhardt, J., Zimmer, C., Meyer, B., Kirschke, J. S., Boeckh-Behrens, T., Wiestler, B., & Gempt, J. (2018). Retrospective Analysis of Radiological Recurrence Patterns in Glioblastoma, Their Prognostic Value And Association to Postoperative Infarct Volume. *Scientific Reports*, 8(1), 4561. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22697-9>
- Bettstetter, M., Dechant, S., Ruemmele, P., Vogel, C., Kurz, K., Morak, M., Keller, G., Holinski-Feder, E., Hofstaedter, F., & Dietmaier, W. (2008). MethyQESD, a robust and fast method for quantitative methylation analyses in HNPCC diagnostics using formalin-fixed and paraffin-embedded tissue samples. *Laboratory Investigation*, 88(12), 1367-1375. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2008.100>
- Binabaj, M. M., Bahrami, A., ShahidSales, S., Joodi, M., Joudi Mashhad, M., Hassanian, S. M., Anvari, K., & Avan, A. (2018). The prognostic value of MGMT promoter methylation in glioblastoma: A meta-analysis of clinical trials. *Journal of Cellular Physiology*, 233(1), 378-386. <https://doi.org/10.1002/jcp.25896>
- Bloch, O., Han, S. J., Cha, S., Sun, M. Z., Aghi, M. K., McDermott, M. W., Berger, M. S., & Parsa, A. T. (2012). Impact of extent of resection for recurrent glioblastoma on overall survival: clinical article. *Journal of Neurosurgery* 117(6), 1032-1038. <https://doi.org/10.3171/2012.9.Jns12504>

- Bonda, D. J., Wang, X., Perry, G., Nunomura, A., Tabaton, M., Zhu, X., & Smith, M. A. (2010). Oxidative stress in Alzheimer disease: a possibility for prevention. *Neuropharmacology*, 59(4-5), 290-294. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.04.005>
- Braganza, M. Z., Kitahara, C. M., Berrington de González, A., Inskip, P. D., Johnson, K. J., & Rajaraman, P. (2012). Ionizing radiation and the risk of brain and central nervous system tumors: a systematic review. *Neuro Oncology*, 14(11), 1316-1324. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nos208>
- Brat, D. J., Aldape, K., Colman, H., Figarella-Branger, D., Fuller, G. N., Giannini, C., Holland, E. C., Jenkins, R. B., Kleinschmidt-DeMasters, B., Komori, T., Kros, J. M., Louis, D. N., McLean, C., Perry, A., Reifenberger, G., Sarkar, C., Stupp, R., van den Bent, M. J., von Deimling, A., & Weller, M. (2020). cIMPACT-NOW update 5: recommended grading criteria and terminologies for IDH-mutant astrocytomas. *Acta Neuropathologica*, 139(3), 603-608. <https://doi.org/10.1007/s00401-020-02127-9>
- Brosnan-Cashman, J. A., Yuan, M., Graham, M. K., Rizzo, A. J., Myers, K. M., Davis, C., Zhang, R., Esopi, D. M., Raabe, E. H., Eberhart, C. G., Heaphy, C. M., & Meeker, A. K. (2018). ATRX loss induces multiple hallmarks of the alternative lengthening of telomeres (ALT) phenotype in human glioma cell lines in a cell line-specific manner. *PLoS One*, 13(9), e0204159. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204159>
- Brown, T. J., Brennan, M. C., Li, M., Church, E. W., Brandmeir, N. J., Rakszawski, K. L., Patel, A. S., Rizk, E. B., Suki, D., Sawaya, R., & Glantz, M. (2016). Association of the Extent of Resection With Survival in Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncology*, 2(11), 1460-1469. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.1373>
- Buccarelli, M., Marconi, M., Pacioni, S., De Pascalis, I., D'Alessandris, Q. G., Martini, M., Ascione, B., Malorni, W., Larocca, L. M., Pallini, R., Ricci-Vitiani, L., & Matarrese, P. (2018). Inhibition of autophagy increases susceptibility of glioblastoma stem cells to temozolomide by igniting ferroptosis. *Cell Death and Disease* 9(8), 841. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0864-7>
- Bulk, M., Abdelmoula, W. M., Nabuurs, R. J. A., van der Graaf, L. M., Mulders, C. W. H., Mulder, A. A., Jost, C. R., Koster, A. J., van Buchem, M. A., Natte, R., Dijkstra, J., & van der Weerd, L. (2018). Postmortem MRI and histology demonstrate differential iron accumulation and cortical myelin organization in early- and late-onset Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 62, 231-242. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2017.10.017>
- Cancer Genome Atlas Research Network. (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*, 455(7216), 1061-1068. <https://doi.org/10.1038/nature07385>
- Chakravarti, A., Zhai, G., Suzuki, Y., Sarkesh, S., Black, P. M., Muzikansky, A., & Loeffler, J. S. (2004). The prognostic significance of phosphatidylinositol 3-kinase pathway activation in human gliomas. *Journal of Clinical Oncology* 22(10), 1926-1933. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.07.193>
- Chang, J. E., Khuntia, D., Robins, H. I., & Mehta, M. P. (2007). Radiotherapy and radiosensitizers in the treatment of glioblastoma multiforme. *Clinical Advances in Hematology & Oncology*, 5(11), 894-902, 907-815.
- Chen, D., Rauh, M., Buchfelder, M., Eyupoglu, I. Y., & Savaskan, N. (2017). The oxido-metabolic driver ATF4 enhances temozolomide chemo-resistance in human gliomas. *Oncotarget*, 8(31), 51164-51176. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17737>
- Chen, L., Li, X., Liu, L., Yu, B., Xue, Y., & Liu, Y. (2015). Erastin sensitizes glioblastoma cells to temozolomide by restraining xCT and cystathionine-γ-lyase function. *Oncology Reports*, 33(3), 1465-1474. <https://doi.org/10.3892/or.2015.3712>
- Chen, X., Comish, P. B., Tang, D., & Kang, R. (2021). Characteristics and Biomarkers of Ferroptosis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 637162. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.637162>
- Christmann, M., Verbeek, B., Roos, W. P., & Kaina, B. (2011). O(6)-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in normal tissues and tumors: enzyme activity, promoter

- methylation and immunohistochemistry. *Biochim Biophys Acta*, 1816(2), 179-190. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2011.06.002>
- Colonna, M., & Butovsky, O. (2017). Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annual Review of Immunology* 35, 441-468. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052358>
- Colopi, A., Fuda, S., Santi, S., Onorato, A., Cesarini, V., Salvati, M., Balistreri, C. R., Dolci, S., & Guida, E. (2023). Impact of age and gender on glioblastoma onset, progression, and management. *Mechanisms of Ageing and Development* 211, 111801. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2023.111801>
- Combs, S. E., Schmid, T. E., Vaupel, P., & Multhoff, G. (2016). Stress Response Leading to Resistance in Glioblastoma-The Need for Innovative Radiotherapy (iRT) Concepts. *Cancers* 8(1). <https://doi.org/10.3390/cancers8010015>
- Conrad, M., & Pratt, D. A. (2019). The chemical basis of ferroptosis. *Nature Chemical Biology*, 15(12), 1137-1147. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0408-1>
- Davis, M. E. (2016). Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clinical Journal of Oncology Nursing* 20(5 Suppl), S2-8. <https://doi.org/10.1188/16.Cjon.S1.2-8>
- De Witt Hamer, P. C., Robles, S. G., Zwinderman, A. H., Duffau, H., & Berger, M. S. (2012). Impact of intraoperative stimulation brain mapping on glioma surgery outcome: a meta-analysis. *Journal of Clinical Oncology* 30(20), 2559-2565. <https://doi.org/10.1200/jco.2011.38.4818>
- Devos, D., Moreau, C., Devedjian, J. C., Kluza, J., Petrault, M., Laloux, C., Jonneaux, A., Ryckewaert, G., Garçon, G., Rouaix, N., Duhamel, A., Jissendi, P., Dujardin, K., Auger, F., Ravasi, L., Hopes, L., Grolez, G., Firdaus, W., Sablonnière, B., . . . Bordet, R. (2014). Targeting chelatable iron as a therapeutic modality in Parkinson's disease. *Antioxidants and Redox Signaling*, 21(2), 195-210. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5593>
- Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., Patel, D. N., Bauer, A. J., Cantley, A. M., Yang, W. S., Morrison, B., 3rd, & Stockwell, B. R. (2012). Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, 149(5), 1060-1072. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042>
- Dixon, S. J., Patel, D. N., Welsch, M., Skouta, R., Lee, E. D., Hayano, M., Thomas, A. G., Gleason, C. E., Tatonetti, N. P., Slusher, B. S., & Stockwell, B. R. (2014). Pharmacological inhibition of cystine-glutamate exchange induces endoplasmic reticulum stress and ferroptosis. *eLife*, 3, e02523. <https://doi.org/10.7554/eLife.02523>
- Dixon, S. J., & Stockwell, B. R. (2019). The Hallmarks of Ferroptosis. *Annual Review of Cancer Biology*, 3(1), 35-54. <https://doi.org/10.1146/annurev-cancerbio-030518-055844>
- Doll, S., Freitas, F. P., Shah, R., Aldrovandi, M., da Silva, M. C., Ingold, I., Goya Grocin, A., Xavier da Silva, T. N., Panzilius, E., Scheel, C. H., Mourão, A., Buday, K., Sato, M., Wanninger, J., Vignane, T., Mohana, V., Rehberg, M., Flatley, A., Schepers, A., . . . Conrad, M. (2019). FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor. *Nature*, 575(7784), 693-698. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1707-0>
- Doll, S., Proneth, B., Tyurina, Y. Y., Panzilius, E., Kobayashi, S., Ingold, I., Irmeler, M., Beckers, J., Aichler, M., Walch, A., Prokisch, H., Trümbach, D., Mao, G., Qu, F., Bayir, H., Füllekrug, J., Scheel, C. H., Wurst, W., Schick, J. A., . . . Conrad, M. (2017). ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition. *Nature Chemical Biology*, 13(1), 91-98. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2239>
- Duncan, C. G., Barwick, B. G., Jin, G., Rago, C., Kapoor-Vazirani, P., Powell, D. R., Chi, J. T., Bigner, D. D., Vertino, P. M., & Yan, H. (2012). A heterozygous IDH1R132H/WT mutation induces genome-wide alterations in DNA methylation. *Genome Research* 22(12), 2339-2355. <https://doi.org/10.1101/gr.132738.111>
- Eagle, H. (1955). The specific amino acid requirements of a human carcinoma cell (Stain HeLa) in tissue culture. *The Journal of experimental medicine*, 102(1), 37-48. <https://doi.org/10.1084/jem.102.1.37>
- Fackler, O. T., & Grosse, R. (2008). Cell motility through plasma membrane blebbing. *Journal of Cell Biology* 181(6), 879-884. <https://doi.org/10.1083/jcb.200802081>

- Farrell, C. J., & Plotkin, S. R. (2007). Genetic causes of brain tumors: neurofibromatosis, tuberous sclerosis, von Hippel-Lindau, and other syndromes. *Neurologic Clinics*, 25(4), 925-946, viii. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2007.07.008>
- Feng, H., Schorpp, K., Jin, J., Yozwiak, C. E., Hoffstrom, B. G., Decker, A. M., Rajbhandari, P., Stokes, M. E., Bender, H. G., Csuka, J. M., Upadhyayula, P. S., Canoll, P., Uchida, K., Soni, R. K., Hadian, K., & Stockwell, B. R. (2020). Transferrin Receptor Is a Specific Ferroptosis Marker. *Cell Reports*, 30(10), 3411-3423.e3417. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.049>
- FitzGerald, G. A. (2003). COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(11), 879-890. <https://doi.org/10.1038/nrd1225>
- Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Kepp, O., & Kroemer, G. (2016). Regulated cell death and adaptive stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(11-12), 2405-2410. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2209-y>
- Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Alnemri, E. S., Altucci, L., Andrews, D., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Baehrecke, E. H., Bazan, N. G., Bertrand, M. J., Bianchi, K., Blagosklonny, M. V., Blomgren, K., Borner, C., Bredesen, D. E., Brenner, C., . . . Kroemer, G. (2015). Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death and Differentiation*, 22(1), 58-73. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.137>
- Galluzzi, L., Maiuri, M. C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2007). Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death and Differentiation*, 14(7), 1237-1243. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402148>
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. V., Arama, E., Baehrecke, E. H., Barlev, N. A., Bazan, N. G., Bernassola, F., Bertrand, M. J. M., Bianchi, K., . . . Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death and Differentiation*, 25(3), 486-541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>
- Gao, M., Monian, P., Pan, Q., Zhang, W., Xiang, J., & Jiang, X. (2016). Ferroptosis is an autophagic cell death process. *Cell Research*, 26(9), 1021-1032. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.95>
- Gaschler, M. M., Andia, A. A., Liu, H., Csuka, J. M., Hurlocker, B., Vaiana, C. A., Heindel, D. W., Zuckerman, D. S., Bos, P. H., Reznik, E., Ye, L. F., Tyurina, Y. Y., Lin, A. J., Shchepinov, M. S., Chan, A. Y., Peguero-Pereira, E., Fomich, M. A., Daniels, J. D., Bekish, A. V., . . . Stockwell, B. R. (2018). FINO(2) initiates ferroptosis through GPX4 inactivation and iron oxidation. *Nature Chemical Biology*, 14(5), 507-515. <https://doi.org/10.1038/s41589-018-0031-6>
- Geiger, P. G., Thomas, J. P., & Girotti, A. W. (1991). Lethal damage to murine L1210 cells by exogenous lipid hydroperoxides: protective role of glutathione-dependent selenoperoxidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 288(2), 671-680. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(91\)90250-m](https://doi.org/10.1016/0003-9861(91)90250-m)
- Gillen, K. M., Mubarak, M., Nguyen, T. D., & Pitt, D. (2018). Significance and In Vivo Detection of Iron-Laden Microglia in White Matter Multiple Sclerosis Lesions. *Frontiers in Immunology*, 9, 255. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00255>
- Girotti, A. W. (1985). Mechanisms of lipid peroxidation. *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine*, 1(2), 87-95. [https://doi.org/10.1016/0748-5514\(85\)90011-x](https://doi.org/10.1016/0748-5514(85)90011-x)
- Golberg, L., Martin, L. E., & Batchelor, A. (1962). Biochemical changes in the tissues of animals injected with iron. 3. Lipid peroxidation. *Biochemical Journal*, 83(2), 291-298. <https://doi.org/10.1042/bj0830291>
- Goyal, R., Mathur, S. K., Gupta, S., Goyal, R., Kumar, S., Batra, A., Hasija, S., & Sen, R. (2015). Immunohistochemical expression of glial fibrillary acidic protein and CAM5.2 in glial tumors and their role in differentiating glial tumors from metastatic tumors of central nervous system. *Journal of Neurosciences in Rural Practice* 6(4), 499-503. <https://doi.org/10.4103/0976-3147.168426>

- Guo, J., Xu, B., Han, Q., Zhou, H., Xia, Y., Gong, C., Dai, X., Li, Z., & Wu, G. (2018). Ferroptosis: A Novel Anti-tumor Action for Cisplatin. *Cancer Research and Treatment* 50(2), 445-460. <https://doi.org/10.4143/crt.2016.572>
- Haberzettl, P., & Hill, B. G. (2013). Oxidized lipids activate autophagy in a JNK-dependent manner by stimulating the endoplasmic reticulum stress response. *Redox Biology*, 1(1), 56-64. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2012.10.003>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, 219(1), 1-14. <https://doi.org/10.1042/bj2190001>
- Hambright, W. S., Fonseca, R. S., Chen, L., Na, R., & Ran, Q. (2017). Ablation of ferroptosis regulator glutathione peroxidase 4 in forebrain neurons promotes cognitive impairment and neurodegeneration. *Redox Biology*, 12, 8-17. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.01.021>
- Hangauer, M. J., Viswanathan, V. S., Ryan, M. J., Bole, D., Eaton, J. K., Matov, A., Galeas, J., Dhruv, H. D., Berens, M. E., Schreiber, S. L., McCormick, F., & McManus, M. T. (2017). Drug-tolerant persister cancer cells are vulnerable to GPX4 inhibition. *Nature*, 551(7679), 247-250. <https://doi.org/10.1038/nature24297>
- Hanif, F., Muzaffar, K., Perveen, K., Malhi, S. M., & Simjee Sh, U. (2017). Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 18(1), 3-9. <https://doi.org/10.22034/apjcp.2017.18.1.3>
- Hao, S., Yu, J., He, W., Huang, Q., Zhao, Y., Liang, B., Zhang, S., Wen, Z., Dong, S., Rao, J., Liao, W., & Shi, M. (2017). Cysteine Dioxygenase 1 Mediates Erastin-Induced Ferroptosis in Human Gastric Cancer Cells. *Neoplasia*, 19(12), 1022-1032. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2017.10.005>
- Hayaishi, O., Katagiri, M., & Rothberg, S. (1955). MECHANISM OF THE PYROCATECHASE REACTION. *Journal of the American Chemical Society*, 77(20), 5450-5451. <https://doi.org/10.1021/ja01625a095>
- Hegi, M. E., Diserens, A. C., Godard, S., Dietrich, P. Y., Regli, L., Ostermann, S., Otten, P., Van Melle, G., de Tribolet, N., & Stupp, R. (2004). Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. *Clinical Cancer Research*, 10(6), 1871-1874. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-03-0384>
- Hegi, M. E., Diserens, A. C., Gorlia, T., Hamou, M. F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J. M., Hainfellner, J. A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J. E., Hau, P., Mirimanoff, R. O., Cairncross, J. G., Janzer, R. C., & Stupp, R. (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *New England Journal of Medicine* 352(10), 997-1003. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043331>
- Herrlinger, U., Tzaridis, T., Mack, F., Steinbach, J. P., Schlegel, U., Sabel, M., Hau, P., Kortmann, R. D., Krex, D., Grauer, O., Goldbrunner, R., Schnell, O., Bähr, O., Uhl, M., Seidel, C., Tabatabai, G., Kowalski, T., Ringel, F., Schmidt-Graf, F., . . . Glas, M. (2019). Lomustine-temozolomide combination therapy versus standard temozolomide therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CeTeG/NOA-09): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*, 393(10172), 678-688. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(18\)31791-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(18)31791-4)
- Hirschhorn, T., & Stockwell, B. R. (2019). The development of the concept of ferroptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 133, 130-143. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.043>
- Horbinski, C. (2013). What do we know about IDH1/2 mutations so far, and how do we use it? *Acta Neuropathologica*, 125(5), 621-636. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1106-9>
- Hothorn, T., Hornik, K., van de Wiel, M. A., & Zeileis, A. (2008). Implementing a Class of Permutation Tests: The coin Package. *Journal of Statistical Software*, 28(8), 1 - 23. <https://doi.org/10.18637/jss.v028.i08>
- Hou, W., Xie, Y., Song, X., Sun, X., Lotze, M. T., Zeh, H. J., 3rd, Kang, R., & Tang, D. (2016). Autophagy promotes ferroptosis by degradation of ferritin. *Autophagy*, 12(8), 1425-1428. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1187366>

- Huang, R., Dong, R., Wang, N., He, Y., Zhu, P., Wang, C., Lan, B., Gao, Y., & Sun, L. (2022). Adaptive Changes Allow Targeting of Ferroptosis for Glioma Treatment. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 42(7), 2055-2074. <https://doi.org/10.1007/s10571-021-01092-5>
- Huang, Y., Dai, Z., Barbacioru, C., & Sadée, W. (2005). Cystine-glutamate transporter SLC7A11 in cancer chemosensitivity and chemoresistance. *Cancer Research* 65(16), 7446-7454. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-04-4267>
- Hurst, R., Korytowski, W., Kriska, T., Esworthy, R. S., Chu, F. F., & Girotti, A. W. (2001). Hyperresistance to cholesterol hydroperoxide-induced peroxidative injury and apoptotic death in a tumor cell line that overexpresses glutathione peroxidase isotype-4. *Free Radical Biology and Medicine* 31(9), 1051-1065. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(01\)00685-2](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(01)00685-2)
- Imai, H., Sumi, D., Sakamoto, H., Hanamoto, A., Arai, M., Chiba, N., & Nakagawa, Y. (1996). Overexpression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase suppressed cell death due to oxidative damage in rat basophile leukemia cells (RBL-2H3). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 222(2), 432-438. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0762>
- Ishimoto, T., Nagano, O., Yae, T., Tamada, M., Motohara, T., Oshima, H., Oshima, M., Ikeda, T., Asaba, R., Yagi, H., Masuko, T., Shimizu, T., Ishikawa, T., Kai, K., Takahashi, E., Imamura, Y., Baba, Y., Ohmura, M., Suematsu, M., . . . Saya, H. (2011). CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc(-) and thereby promotes tumor growth. *Cancer Cell*, 19(3), 387-400. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.01.038>
- Jellinger, K., Paulus, W., Grundke-Iqbal, I., Riederer, P., & Youdim, M. B. (1990). Brain iron and ferritin in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Journal of Neural Transmission - Parkinson's Disease and Dementia Section*, 2(4), 327-340. <https://doi.org/10.1007/bf02252926>
- Jiang, X., Stockwell, B. R., & Conrad, M. (2021). Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22(4), 266-282. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00324-8>
- Jin, G., Arai, K., Murata, Y., Wang, S., Stins, M. F., Lo, E. H., & van Leyen, K. (2008). Protecting against cerebrovascular injury: contributions of 12/15-lipoxygenase to edema formation after transient focal ischemia. *Stroke*, 39(9), 2538-2543. <https://doi.org/10.1161/strokeaha.108.514927>
- Joensuu, H., Pupa, M., Sihto, H., Tynnen, O., & Nupponen, N. N. (2005). Amplification of genes encoding KIT, PDGFRalpha and VEGFR2 receptor tyrosine kinases is frequent in glioblastoma multiforme. *The Journal of Pathology*, 207(2), 224-231. <https://doi.org/10.1002/path.1823>
- Kaplan, E. L., & Meier, P. (1958). Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *Journal of the American Statistical Association*, 53( 282 ), 457-481. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1080/01621459.1958.10501452>
- Kappus, H. (1985). 12 – Lipid Peroxidation: Mechanisms, Analysis, Enzymology and Biological Relevance. <https://doi.org/https://api.semanticscholar.org/CorpusID:262737670>
- Kasthuber, E. R., & Lowe, S. W. (2017). Putting p53 in Context. *Cell*, 170(6), 1062-1078. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.028>
- Khare, V., Khare, C., Nema, S., & Baredar, P. (2023). Chapter 2 - Data visualization and descriptive statistics of solar energy system. In V. Khare, C. Khare, S. Nema, & P. Baredar (Eds.), *Decision Science and Operations Management of Solar Energy Systems* (pp. 33-75). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85761-1.00002-0>
- Kinowaki, Y., Kurata, M., Ishibashi, S., Ikeda, M., Tatsuzawa, A., Yamamoto, M., Miura, O., Kitagawa, M., & Yamamoto, K. (2018). Glutathione peroxidase 4 overexpression inhibits ROS-induced cell death in diffuse large B-cell lymphoma. *Laboratory Investigation* 98(5), 609-619. <https://doi.org/10.1038/s41374-017-0008-1>

- Korzhevskii, D. E., & Kirik, O. V. (2016). Brain Microglia and Microglial Markers. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 46(3), 284-290. <https://doi.org/10.1007/s11055-016-0231-z>
- Koshiyama, D. B., Trevisan, P., Graziadio, C., Rosa, R. F. M., Cunegatto, B., Scholl, J., Provenzi, V. O., de Sá, A. P., Soares, F. P., Velho, M. C., de, A. P. F. N., Oliveira, C. A., & Zen, P. R. G. (2017). Frequency and clinical significance of chromosome 7 and 10 aneuploidies, amplification of the EGFR gene, deletion of PTEN and TP53 genes, and 1p/19q deficiency in a sample of adult patients diagnosed with glioblastoma from Southern Brazil. *Journal of Neuro-Oncology*, 135(3), 465-472. <https://doi.org/10.1007/s11060-017-2606-6>
- Kram, H., Prokop, G., Haller, B., Gempt, J., Wu, Y., Schmidt-Graf, F., Schlegel, J., Conrad, M., & Liesche-Starnecker, F. (2022). Glioblastoma Relapses Show Increased Markers of Vulnerability to Ferroptosis. *Frontiers in Oncology*, 12, 841418. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.841418>
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Green, D. R., Hengartner, M., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M. E., Tschopp, J., Yuan, J., . . . Melino, G. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation* 16(1), 3-11. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.150>
- Lacroix, M., Abi-Said, D., Fourney, D. R., Gokaslan, Z. L., Shi, W., DeMonte, F., Lang, F. F., McCutcheon, I. E., Hassenbusch, S. J., Holland, E., Hess, K., Michael, C., Miller, D., & Sawaya, R. (2001). A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *Journal of Neurosurgery* 95(2), 190-198. <https://doi.org/10.3171/jns.2001.95.2.0190>
- Latunde-Dada, G. O. (2017). Ferroptosis: Role of lipid peroxidation, iron and ferritinophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1861(8), 1893-1900. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.05.019>
- Lau, D., Magill, S. T., & Aghi, M. K. (2014). Molecularly targeted therapies for recurrent glioblastoma: current and future targets. *Neurosurgical Focus*, 37(6), E15. <https://doi.org/10.3171/2014.9.Focus14519>
- Lee, J. K., Wang, J., Sa, J. K., Ladewig, E., Lee, H. O., Lee, I. H., Kang, H. J., Rosenbloom, D. S., Camara, P. G., Liu, Z., van Nieuwenhuizen, P., Jung, S. W., Choi, S. W., Kim, J., Chen, A., Kim, K. T., Shin, S., Seo, Y. J., Oh, J. M., . . . Nam, D. H. (2017). Spatiotemporal genomic architecture informs precision oncology in glioblastoma. *Nature Genetics*, 49(4), 594-599. <https://doi.org/10.1038/ng.3806>
- Levidou, G., El-Habr, E., Saetta, A. A., Bamias, C., Katsouyanni, K., Patsouris, E., & Korkolopoulou, P. (2010). P53 immunoexpression as a prognostic marker for human astrocytomas: a meta-analysis and review of the literature. *Journal of Neuro-Oncology* 100(3), 363-371. <https://doi.org/10.1007/s11060-010-0204-y>
- Lewerenz, J., Ates, G., Methner, A., Conrad, M., & Maher, P. (2018). Oxytosis/Ferroptosis-(Re-) Emerging Roles for Oxidative Stress-Dependent Non-apoptotic Cell Death in Diseases of the Central Nervous System. *Frontiers in Neuroscience* 12, 214. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00214>
- Li, G., Li, Y., Liu, X., Zhang, C., Wu, F., Jiang, H., Zhang, W., Bao, Z.-S., Wang, Y., Cai, J.-Q., Zhao, L., Kahlert, U., Jiang, T., & Zhang, W. (2018). ALDH1A3 induces mesenchymal differentiation and serves as a predictor for survival in glioblastoma. *Cell Death and Disease*, 9(12), 1190. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1232-3>
- Liesche-Starnecker, F., Mayer, K., Kofler, F., Baur, S., Schmidt-Graf, F., Kempter, J., Prokop, G., Pfarr, N., Wei, W., Gempt, J., Combs, S. E., Zimmer, C., Meyer, B., Wiestler, B., & Schlegel, J. (2020). Immunohistochemically Characterized Intratumoral Heterogeneity Is a Prognostic Marker in Human Glioblastoma. *Cancers* 12(10). <https://doi.org/10.3390/cancers12102964>
- Lin, C.-J., Lee, C.-C., Shih, Y.-L., Lin, T.-Y., Wang, S.-H., Lin, Y.-F., & Shih, C.-M. (2012). Resveratrol enhances the therapeutic effect of temozolomide against malignant glioma in vitro and in vivo by inhibiting autophagy. *Free Radical Biology and*

- Medicine*, 52(2), 377-391.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.10.487>
- Linoss, E., Raine, T., Alonso, A., & Michaud, D. (2007). Atopy and risk of brain tumors: a meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute*, 99(20), 1544-1550.  
<https://doi.org/10.1093/jnci/djm170>
- Liu, H. J., Hu, H. M., Li, G. Z., Zhang, Y., Wu, F., Liu, X., Wang, K. Y., Zhang, C. B., & Jiang, T. (2020). Ferroptosis-Related Gene Signature Predicts Glioma Cell Death and Glioma Patient Progression. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 538.  
<https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00538>
- Liu, J., Zhang, X., Yan, X., Sun, M., Fan, Y., & Huang, Y. (2019). Significance of TERT and ATRX mutations in glioma. *Oncology Letters*, 17(1), 95-102.  
<https://doi.org/10.3892/ol.2018.9634>
- Liu, S., Gao, X., & Zhou, S. (2022). New Target for Prevention and Treatment of Neuroinflammation: Microglia Iron Accumulation and Ferroptosis. *ASN Neuro*, 14, 17590914221133236. <https://doi.org/10.1177/17590914221133236>
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvet, A., Scheithauer, B. W., & Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathologica*, 114(2), 97-109.  
<https://doi.org/10.1007/s00401-007-0243-4>
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., & Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*, 131(6), 803-820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
- Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H. K., Pfister, S. M., Reifenberger, G., Soffietti, R., von Deimling, A., & Ellison, D. W. (2021). The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncology*, 23(8), 1231-1251.  
<https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>
- Louis, D. N., Wesseling, P., Aldape, K., Brat, D. J., Capper, D., Cree, I. A., Eberhart, C., Figarella-Branger, D., Fouladi, M., Fuller, G. N., Giannini, C., Haberler, C., Hawkins, C., Komori, T., Kros, J. M., Ng, H. K., Orr, B. A., Park, S. H., Paulus, W., . . . Ellison, D. W. (2020). cIMPACT-NOW update 6: new entity and diagnostic principle recommendations of the cIMPACT-Utrecht meeting on future CNS tumor classification and grading. *Brain Pathology*, 30(4), 844-856.  
<https://doi.org/10.1111/bpa.12832>
- Magtanong, L., & Dixon, S. J. (2018). Ferroptosis and Brain Injury. *Developmental Neuroscience* 40(5-6), 382-395. <https://doi.org/10.1159/000496922>
- Mancias, J. D., Wang, X., Gygi, S. P., Harper, J. W., & Kimmelman, A. C. (2014). Quantitative proteomics identifies NCOA4 as the cargo receptor mediating ferritinophagy. *Nature*, 509(7498), 105-109. <https://doi.org/10.1038/nature13148>
- Masaldan, S., Bush, A. I., Devos, D., Rolland, A. S., & Moreau, C. (2019). Striking while the iron is hot: Iron metabolism and ferroptosis in neurodegeneration. *Free Radical Biology and Medicine*, 133, 221-233.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.033>
- Mason, H. S., Fowlks, W. L., & Peterson, E. (1955). OXYGEN TRANSFER AND ELECTRON TRANSPORT BY THE PHENOLASE COMPLEX1. *Journal of the American Chemical Society*, 77(10), 2914-2915. <https://doi.org/10.1021/ja01615a088>
- Mekala, J. R., Adusumilli, K., Chamrathy, S., & Angirekula, H. S. R. (2023). Novel sights on therapeutic, prognostic, and diagnostics aspects of non-coding RNAs in glioblastoma multiforme. *Metabolic Brain Disease*, 38(6), 1801-1829.  
<https://doi.org/10.1007/s11011-023-01234-2>
- Miller, A. M., Shah, R. H., Pentsova, E. I., Pourmaleki, M., Briggs, S., Distefano, N., Zheng, Y., Skakodub, A., Mehta, S. A., Campos, C., Hsieh, W. Y., Selcuklu, S. D., Ling, L., Meng, F., Jing, X., Samoila, A., Bale, T. A., Tsui, D. W. Y., Grommes, C., . . . Mellinghoff, I. K. (2019). Tracking tumour evolution in glioma through liquid biopsies

- of cerebrospinal fluid. *Nature*, 565(7741), 654-658. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0882-3>
- Minniti, G., Muni, R., Lanzetta, G., Marchetti, P., & Enrici, R. M. (2009). Chemotherapy for Glioblastoma: Current Treatment and Future Perspectives for Cytotoxic and Targeted Agents. *Anticancer Research*, 29(12), 5171. <https://doi.org/https://ar.iiajournals.org/content/anticancer/29/12/5171.full.pdf>
- Mitchell, J. R., Jollow, D. J., Potter, W. Z., Gillette, J. R., & Brodie, B. B. (1973). Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 187(1), 211-217.
- Mou, Y., Wang, J., Wu, J., He, D., Zhang, C., Duan, C., & Li, B. (2019). Ferroptosis, a new form of cell death: opportunities and challenges in cancer. *Journal of Hematology and Oncology*, 12(1), 34. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0720-y>
- Murphy, T. H., Miyamoto, M., Sastre, A., Schnaar, R. L., & Coyle, J. T. (1989). Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. *Neuron*, 2(6), 1547-1558. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90043-3](https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90043-3)
- Murphy, T. H., Schnaar, R. L., & Coyle, J. T. (1990). Immature cortical neurons are uniquely sensitive to glutamate toxicity by inhibition of cystine uptake. *The FASEB Journal* 4(6), 1624-1633.
- Nakamura, T., Hipp, C., Santos Dias Mourão, A., Borggräfe, J., Aldrovandi, M., Henkelmann, B., Wanninger, J., Mishima, E., Lytton, E., Emler, D., Proneth, B., Sattler, M., & Conrad, M. (2023). Phase separation of FSP1 promotes ferroptosis. *Nature*, 619(7969), 371-377. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06255-6>
- Nandakumar, P., Mansouri, A., & Das, S. (2017). The Role of ATRX in Glioma Biology. *Frontiers in Oncology*, 7, 236. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00236>
- Nassiri, F., Chakravarthy, A., Feng, S., Shen, S. Y., Nejad, R., Zuccato, J. A., Voisin, M. R., Patil, V., Horbinski, C., Aldape, K., Zadeh, G., & De Carvalho, D. D. (2020). Detection and discrimination of intracranial tumors using plasma cell-free DNA methylomes. *Nature Medicine*, 26(7), 1044-1047. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0932-2>
- Nomura, K., Imai, H., Koumura, T., Arai, M., & Nakagawa, Y. (1999). Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase suppresses apoptosis mediated by a mitochondrial death pathway. *Journal of Biological Chemistry* 274(41), 29294-29302. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.41.29294>
- Ohgaki, H. (2005). Genetic pathways to glioblastomas. *Neuropathology*, 25(1), 1-7. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1789.2004.00600.x>
- Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2007). Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *American Journal of Pathology*, 170(5), 1445-1453. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.070011>
- Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2013). The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clinical Cancer Research* 19(4), 764-772. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.Ccr-12-3002>
- Ohka, F., Natsume, A., Motomura, K., Kishida, Y., Kondo, Y., Abe, T., Nakasu, Y., Namba, H., Wakai, K., Fukui, T., Momota, H., Iwami, K., Kinjo, S., Ito, M., Fujii, M., & Wakabayashi, T. (2011). The global DNA methylation surrogate LINE-1 methylation is correlated with MGMT promoter methylation and is a better prognostic factor for glioma. *PLoS One*, 6(8), e23332. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023332>
- Okazaki, F., Matsunaga, N., Hamamura, K., Suzuki, K., Nakao, T., Okazaki, H., Kutsukake, M., Fukumori, S., Tsuji, Y., & To, H. (2017). Administering xCT Inhibitors Based on Circadian Clock Improves Antitumor Effects. *Cancer Research*, 77(23), 6603-6613. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-17-0720>
- Okazaki, S., Shintani, S., Hirata, Y., Suina, K., Semba, T., Yamasaki, J., Umene, K., Ishikawa, M., Saya, H., & Nagano, O. (2018). Synthetic lethality of the ALDH3A1 inhibitor dyclonine and xCT inhibitors in glutathione deficiency-resistant cancer cells. *Oncotarget*, 9(73), 33832-33843. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26112>
- Olson, R. A., Brastianos, P. K., & Palma, D. A. (2011). Prognostic and predictive value of epigenetic silencing of MGMT in patients with high grade gliomas: a systematic

- review and meta-analysis. *Journal of Neuro-Oncology*, 105(2), 325-335.  
<https://doi.org/10.1007/s11060-011-0594-5>
- Omuro, A., & DeAngelis, L. M. (2013). Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. *Jama*, 310(17), 1842-1850. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.280319>
- Orihuela, R., McPherson, C. A., & Harry, G. J. (2016). Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *British Journal of Pharmacology* 173(4), 649-665.  
<https://doi.org/10.1111/bph.13139>
- Osswald, M., Jung, E., Sahm, F., Solecki, G., Venkataramani, V., Blaes, J., Weil, S., Horstmann, H., Wiestler, B., Syed, M., Huang, L., Ratliff, M., Karimian Jazi, K., Kurz, F. T., Schmenger, T., Lemke, D., Gömmel, M., Pauli, M., Liao, Y., . . . Winkler, F. (2015). Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network. *Nature*, 528(7580), 93-98. <https://doi.org/10.1038/nature16071>
- Ostrom, Q. T., Bauchet, L., Davis, F. G., Deltour, I., Fisher, J. L., Langer, C. E., Pekmezci, M., Schwartzbaum, J. A., Turner, M. C., Walsh, K. M., Wrensch, M. R., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2014). The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. *Neuro-Oncology* 16(7), 896-913. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou087>
- Ostrom, Q. T., Price, M., Neff, C., Cioffi, G., Waite, K. A., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2022). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2015-2019. *Neuro-Oncology* 24(Suppl 5), v1-v95. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noac202>
- Padfield, E., Ellis, H. P., & Kurian, K. M. (2015). Current Therapeutic Advances Targeting EGFR and EGFRvIII in Glioblastoma. *Frontiers in Oncology*, 5, 5.  
<https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00005>
- Park, S., Yoon, S. Y., Kim, K. E., Lee, H. R., Hur, D. Y., Song, H., Kim, D., Bang, S. I., & Cho, D. H. (2009). Interleukin-18 induces transferrin expression in breast cancer cell line MCF-7. *Cancer Letters*, 286(2), 189-195.  
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.05.025>
- Parker, N. R., Hudson, A. L., Khong, P., Parkinson, J. F., Dwight, T., Ikin, R. J., Zhu, Y., Cheng, Z. J., Vafaee, F., Chen, J., Wheeler, H. R., & Howell, V. M. (2016). Intratumoral heterogeneity identified at the epigenetic, genetic and transcriptional level in glioblastoma. *Scientific Reports* 6, 22477. <https://doi.org/10.1038/srep22477>
- Parsons, D. W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J. C., Leary, R. J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I. M., Gallia, G. L., Olivi, A., McLendon, R., Rasheed, B. A., Keir, S., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Busam, D. A., Tekleab, H., Diaz, L. A., Jr., . . . Kinzler, K. W. (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*, 321(5897), 1807-1812. <https://doi.org/10.1126/science.1164382>
- Patel, R., & Leung, H. Y. (2012). Targeting the EGFR-family for therapy: biological challenges and clinical perspective. *Current Pharmaceutical Design*, 18(19), 2672-2679. <https://doi.org/10.2174/138161212800626148>
- Pegg, A. E., & Byers, T. L. (1992). Repair of DNA containing O6-alkylguanine. *The FASEB Journal*, 6(6), 2302-2310. <https://doi.org/10.1096/fasebj.6.6.1544541>
- Plate, K. H., Breier, G., Weich, H. A., & Risau, W. (1992). Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature*, 359(6398), 845-848. <https://doi.org/10.1038/359845a0>
- Poon, M. T. C., Sudlow, C. L. M., Figueroa, J. D., & Brennan, P. M. (2020). Longer-term (≥ 2 years) survival in patients with glioblastoma in population-based studies pre- and post-2005: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, 10(1), 11622. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68011-4>
- Preusser, M., Charles Janzer, R., Felsberg, J., Reifenberger, G., Hamou, M. F., Diserens, A. C., Stupp, R., Gorlia, T., Marosi, C., Heinzl, H., Hainfellner, J. A., & Hegi, M. (2008). Anti-O6-methylguanine-methyltransferase (MGMT) immunohistochemistry in glioblastoma multiforme: observer variability and lack of association with patient survival impede its use as clinical biomarker. *Brain Pathology* 18(4), 520-532.  
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2008.00153.x>
- Puy, V., Darwiche, W., Trudel, S., Gomila, C., Lony, C., Puy, L., Lefebvre, T., Vitry, S., Boullier, A., Karim, Z., & Ausseil, J. (2018). Predominant role of microglia in brain iron

- retention in Sanfilippo syndrome, a pediatric neurodegenerative disease. *Glia*, 66(8), 1709-1723. <https://doi.org/10.1002/glia.23335>
- Pyatigorskaya, N., Sharman, M., Corvol, J. C., Valabregue, R., Yahia-Cherif, L., Poupon, F., Cormier-Dequaire, F., Siebner, H., Klebe, S., Vidailhet, M., Brice, A., & Lehericy, S. (2015). High nigral iron deposition in LRRK2 and Parkin mutation carriers using R2\* relaxometry. *Movement Disorders*, 30(8), 1077-1084. <https://doi.org/10.1002/mds.26218>
- R Core Team. (2019). R: A Language and Environment for Statistical Computing. <https://doi.org/https://www.r-project.org/>
- Ran, Q., Liang, H., Gu, M., Qi, W., Walter, C. A., Roberts, L. J., 2nd, Herman, B., Richardson, A., & Van Remmen, H. (2004). Transgenic mice overexpressing glutathione peroxidase 4 are protected against oxidative stress-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 279(53), 55137-55146. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410387200>
- Rasper, M., Schäfer, A., Piontek, G., Teufel, J., Brockhoff, G., Ringel, F., Heindl, S., Zimmer, C., & Schlegel, J. (2010). Aldehyde dehydrogenase 1 positive glioblastoma cells show brain tumor stem cell capacity. *Neuro-Oncology*, 12(10), 1024-1033. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noq070>
- Ratan, R. R., & Baraban, J. M. (1995). Apoptotic death in an in vitro model of neuronal oxidative stress. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 22(4), 309-310. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.1995.tb02006.x>
- Ratan, R. R., Murphy, T. H., & Baraban, J. M. (1994). Macromolecular synthesis inhibitors prevent oxidative stress-induced apoptosis in embryonic cortical neurons by shunting cysteine from protein synthesis to glutathione. *Journal of Neuroscience*, 14(7), 4385-4392. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.14-07-04385.1994>
- Remmele, W., & Stegner, H. E. (1987). Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Der Pathologe*, 8(3), 138-140. (Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe.)
- Robert, S. M., Buckingham, S. C., Campbell, S. L., Robel, S., Holt, K. T., Ogunrinu-Babarinde, T., Warren, P. P., White, D. M., Reid, M. A., Eschbacher, J. M., Berens, M. E., Lahti, A. C., Nabors, L. B., & Sontheimer, H. (2015). SLC7A11 expression is associated with seizures and predicts poor survival in patients with malignant glioma. *Science Translational Medicine* 7(289), 289ra286. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa8103>
- Rochette, L., Dogon, G., Rigal, E., Zeller, M., Cottin, Y., & Vergely, C. (2022). Lipid Peroxidation and Iron Metabolism: Two Corner Stones in the Homeostasis Control of Ferroptosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1). <https://doi.org/10.3390/ijms24010449>
- Roh, J. L., Kim, E. H., Jang, H., & Shin, D. (2017). Nrf2 inhibition reverses the resistance of cisplatin-resistant head and neck cancer cells to artesunate-induced ferroptosis. *Redox Biology*, 11, 254-262. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.010>
- Rouault, T. A. (2013). Iron metabolism in the CNS: implications for neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(8), 551-564. <https://doi.org/10.1038/nrn3453>
- Sahm, F., Schimpf, D., Jones, D. T., Meyer, J., Kratz, A., Reuss, D., Capper, D., Koelsche, C., Korshunov, A., Wiestler, B., Buchhalter, I., Milde, T., Selt, F., Sturm, D., Kool, M., Hummel, M., Bewerunge-Hudler, M., Mawrin, C., Schüller, U., . . . von Deimling, A. (2016). Next-generation sequencing in routine brain tumor diagnostics enables an integrated diagnosis and identifies actionable targets. *Acta Neuropathologica*, 131(6), 903-910. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1519-8>
- Schweichel, J. U., & Merker, H. J. (1973). The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology*, 7(3), 253-266. <https://doi.org/10.1002/tera.1420070306>

- Sehm, T., Rauh, M., Wiendieck, K., Buchfelder, M., Eyüpoglu, I. Y., & Savaskan, N. E. (2016). Temozolomide toxicity operates in a xCT/SLC7a11 dependent manner and is fostered by ferroptosis. *Oncotarget*, 7(46), 74630-74647. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11858>
- Senft, C., Bink, A., Franz, K., Vatter, H., Gasser, T., & Seifert, V. (2011). Intraoperative MRI guidance and extent of resection in glioma surgery: a randomised, controlled trial. *The Lancet. Oncology*, 12(11), 997-1003. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(11\)70196-6](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(11)70196-6)
- Sian, J., Dexter, D. T., Lees, A. J., Daniel, S., Agid, Y., Javoy-Agid, F., Jenner, P., & Marsden, C. D. (1994). Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Annals of Neurology*, 36(3), 348-355. <https://doi.org/10.1002/ana.410360305>
- Stockwell, B. R., Friedmann Angeli, J. P., Bayir, H., Bush, A. I., Conrad, M., Dixon, S. J., Fulda, S., Gascón, S., Hatzios, S. K., Kagan, V. E., Noel, K., Jiang, X., Linkermann, A., Murphy, M. E., Overholtzer, M., Oyagi, A., Pagnussat, G. C., Park, J., Ran, Q., . . . Zhang, D. D. (2017). Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. *Cell*, 171(2), 273-285. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.021>
- Stummer, W., Pichlmeier, U., Meinel, T., Wiestler, O. D., Zanella, F., & Reulen, H. J. (2006). Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *The Lancet Oncology* 7(5), 392-401. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(06\)70665-9](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(06)70665-9)
- Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E., & Mirimanoff, R. O. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 352(10), 987-996. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>
- Tabatabai, G., Hegi, M., Stupp, R., & Weller, M. (2012). Clinical implications of molecular neuropathology and biomarkers for malignant glioma. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 12(3), 302-307. <https://doi.org/10.1007/s11910-012-0263-x>
- Tesileanu, C. M. S., Dirven, L., Wijnenga, M. M. J., Koekkoek, J. A. F., Vincent, A., Dubbink, H. J., Atmodimedjo, P. N., Kros, J. M., van Duinen, S. G., Smits, M., Taphoorn, M. J. B., French, P. J., & van den Bent, M. J. (2020). Survival of diffuse astrocytic glioma, IDH1/2 wildtype, with molecular features of glioblastoma, WHO grade IV: a confirmation of the cIMPACT-NOW criteria. *Neuro-Oncology*, 22(4), 515-523. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noz200>
- Thakkar, J. P., Dolecek, T. A., Horbinski, C., Ostrom, Q. T., Lightner, D. D., Barnholtz-Sloan, J. S., & Villano, J. L. (2014). Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 23(10), 1985-1996. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.Epi-14-0275>
- Thomas, J. P., Geiger, P. G., Maiorino, M., Ursini, F., & Girotti, A. W. (1990). Enzymatic reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides in artificial bilayers and lipoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism*, 1045(3), 252-260. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(90\)90128-k](https://doi.org/10.1016/0005-2760(90)90128-k)
- Timmerman, L. A., Holton, T., Yuneva, M., Louie, R. J., Padró, M., Daemen, A., Hu, M., Chan, D. A., Ethier, S. P., van 't Veer, L. J., Polyak, K., McCormick, F., & Gray, J. W. (2013). Glutamine sensitivity analysis identifies the xCT antiporter as a common triple-negative breast tumor therapeutic target. *Cancer Cell*, 24(4), 450-465. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.08.020>
- Tumor Grade, National Cancer Institute. (2022). <https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/diagnosis/tumor-grade>
- Urbańska, K., Sokołowska, J., Szmidt, M., & Sysa, P. (2014). Glioblastoma multiforme - an overview. *Contemporary Oncology (Poznan, Poland)*, 18(5), 307-312. <https://doi.org/10.5114/wo.2014.40559>

- Ursini, F., Maiorino, M., Valente, M., Ferri, L., & Gregolin, C. (1982). Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism*, 710(2), 197-211. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(82\)90150-3](https://doi.org/10.1016/0005-2760(82)90150-3)
- van Duijn, S., Bulk, M., van Duinen, S. G., Nabuurs, R. J. A., van Buchem, M. A., van der Weerd, L., & Natté, R. (2017). Cortical Iron Reflects Severity of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 60(4), 1533-1545. <https://doi.org/10.3233/jad-161143>
- van Leyen, K., Kim, H. Y., Lee, S. R., Jin, G., Arai, K., & Lo, E. H. (2006). Baicalein and 12/15-lipoxygenase in the ischemic brain. *Stroke*, 37(12), 3014-3018. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000249004.25444.a5>
- van Rooden, S., Doan, N. T., Versluis, M. J., Goos, J. D., Webb, A. G., Oleksik, A. M., van der Flier, W. M., Scheltens, P., Barkhof, F., Weverling-Rynsburger, A. W., Blauw, G. J., Reiber, J. H., van Buchem, M. A., Milles, J., & van der Grond, J. (2015). 7T T<sub>2</sub>\*-weighted magnetic resonance imaging reveals cortical phase differences between early- and late-onset Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 36(1), 20-26. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.07.006>
- Verhaak, R. G., Hoadley, K. A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M. D., Miller, C. R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J. P., Alexe, G., Lawrence, M., O'Kelly, M., Tamayo, P., Weir, B. A., Gabriel, S., Winckler, W., Gupta, S., Jakkula, L., . . . Hayes, D. N. (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*, 17(1), 98-110. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.020>
- Viktorinova, A. (2023). Future Perspectives of Oxytosis/Ferroptosis Research in Neurodegeneration Diseases. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 43(6), 2761-2768. <https://doi.org/10.1007/s10571-023-01353-5>
- Virchow, R. (1862-1863). *Die krankhaften Geschwülste: dreissig Vorlesungen, gehalten während des Wintersemesters 1862-1863 an der Universität zu Berlin* 3 volumes). -. Berlin : Verlag von August Hirschwald.
- Viswanathan, V. S., Ryan, M. J., Dhruv, H. D., Gill, S., Eichhoff, O. M., Seashore-Ludlow, B., Kaffenberger, S. D., Eaton, J. K., Shimada, K., Aguirre, A. J., Viswanathan, S. R., Chattopadhyay, S., Tamayo, P., Yang, W. S., Rees, M. G., Chen, S., Boskovic, Z. V., Javaid, S., Huang, C., . . . Schreiber, S. L. (2017). Dependency of a therapy-resistant state of cancer cells on a lipid peroxidase pathway. *Nature*, 547(7664), 453-457. <https://doi.org/10.1038/nature23007>
- Vredenburgh, J. J., Desjardins, A., Herndon, J. E., 2nd, Marcello, J., Reardon, D. A., Quinn, J. A., Rich, J. N., Sathornsumetee, S., Gururangan, S., Sampson, J., Wagner, M., Bailey, L., Bigner, D. D., Friedman, A. H., & Friedman, H. S. (2007). Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. *Journal of Clinical Oncology*, 25(30), 4722-4729. <https://doi.org/10.1200/jco.2007.12.2440>
- Wan, S., Zhang, G., Liu, R., Abbas, M. N., & Cui, H. (2023). Pyroptosis, ferroptosis, and autophagy cross-talk in glioblastoma opens up new avenues for glioblastoma treatment. *Cell Communication and Signaling* 21(1), 115. <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01108-1>
- Weller, M., Butowski, N., Tran, D. D., Recht, L. D., Lim, M., Hirte, H., Ashby, L., Mechtler, L., Goldlust, S. A., Iwamoto, F., Drappatz, J., O'Rourke, D. M., Wong, M., Hamilton, M. G., Finocchiaro, G., Perry, J., Wick, W., Green, J., He, Y., . . . Sampson, J. H. (2017). Rindopepimut with temozolomide for patients with newly diagnosed, EGFRvIII-expressing glioblastoma (ACT IV): a randomised, double-blind, international phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*, 18(10), 1373-1385. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(17\)30517-x](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(17)30517-x)
- Weller, M., Stupp, R., Reifenberger, G., Brandes, A. A., van den Bent, M. J., Wick, W., & Hegi, M. E. (2010). MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nature Reviews Neurology*, 6(1), 39-51. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2009.197>

- Weller, M., van den Bent, M., Preusser, M., Le Rhun, E., Tonn, J. C., Minniti, G., Bendszus, M., Balana, C., Chinot, O., Dirven, L., French, P., Hegi, M. E., Jakola, A. S., Platten, M., Roth, P., Rudà, R., Short, S., Smits, M., Taphoorn, M. J. B., . . . Wick, W. (2022). Author Correction: EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 19(5), 357-358. <https://doi.org/10.1038/s41571-022-00623-3>
- Wheeler, G. P., Bowdon, B. J., & Struck, R. F. (1975). Carbamoylation of amino acid, peptides, and proteins by nitrosoureas. *Cancer Research*, 35(11 Pt 1), 2974-2984.
- Wick, W., Chinot, O. L., Bendszus, M., Mason, W., Henriksson, R., Saran, F., Nishikawa, R., Revil, C., Kerloeguen, Y., & Cloughesy, T. (2016). Evaluation of pseudoprogression rates and tumor progression patterns in a phase III trial of bevacizumab plus radiotherapy/temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *Neuro-Oncology* 18(10), 1434-1441. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now091>
- Wick, W., Goldbrunner, R., Grosu, A.-L., Hattungen, E., Hau, P., Herrlinger, U., Kessler, T., Platten, M., Pukrop, T., Reifenberger, G., Sahm, F., Schaaf, S., Schlegel, U., Steinbach, J., Stockhammer, G., Stummer, W., Tabatabai, G., Tonn, J. C., & Weller, M. (2021). Gliome, S2k-Leitlinie. *Deutsche Gesellschaft für Neurologie, Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie*. [www.dgn.org/leitlinien](http://www.dgn.org/leitlinien)
- Wick, W., Gorlia, T., Bendszus, M., Taphoorn, M., Sahm, F., Harting, I., Brandes, A. A., Taal, W., Domont, J., Idbaih, A., Campone, M., Clement, P. M., Stupp, R., Fabbro, M., Le Rhun, E., Dubois, F., Weller, M., von Deimling, A., Golfopoulos, V., . . . van den Bent, M. J. (2017). Lomustine and Bevacizumab in Progressive Glioblastoma. *New England Journal of Medicine* 377(20), 1954-1963. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1707358>
- Winterbourn, C. C. (1995). Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol Letters*, 82-83, 969-974. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(95\)03532-x](https://doi.org/10.1016/0378-4274(95)03532-x)
- Winterbourn, C. C. (2013). The biological chemistry of hydrogen peroxide. *Methods in Enzymology*, 528, 3-25. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-405881-1.00001-x>
- Wirth, E. K., Conrad, M., Winterer, J., Wozny, C., Carlson, B. A., Roth, S., Schmitz, D., Bornkamm, G. W., Coppola, V., Tessarollo, L., Schomburg, L., Köhrle, J., Hatfield, D. L., & Schweizer, U. (2010). Neuronal selenoprotein expression is required for interneuron development and prevents seizures and neurodegeneration. *The FASEB Journal* 24(3), 844-852. <https://doi.org/10.1096/fj.09-143974>
- Wong, A. J., Ruppert, J. M., Bigner, S. H., Grzeschik, C. H., Humphrey, P. A., Bigner, D. S., & Vogelstein, B. (1992). Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(7), 2965-2969. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.7.2965>
- Woo, J. H., Shimon, Y., Yang, W. S., Subramaniam, P., Iyer, A., Nicoletti, P., Rodríguez Martínez, M., López, G., Mattioli, M., Realubit, R., Karan, C., Stockwell, B. R., Bansal, M., & Califano, A. (2015). Elucidating Compound Mechanism of Action by Network Perturbation Analysis. *Cell*, 162(2), 441-451. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.056>
- Wu, W., Schecker, J., Würstle, S., Schneider, F., Schönfelder, M., & Schlegel, J. (2018). Aldehyde dehydrogenase 1A3 (ALDH1A3) is regulated by autophagy in human glioblastoma cells. *Cancer Letters*, 417, 112-123. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.12.036>
- Wu, W., Wu, Y., Mayer, K., von Rosenstiel, C., Schecker, J., Baur, S., Würstle, S., Liesche-Starnecker, F., Gempt, J., & Schlegel, J. (2020). Lipid Peroxidation Plays an Important Role in Chemotherapeutic Effects of Temozolomide and the Development of Therapy Resistance in Human Glioblastoma. *Translational Oncology* 13(3), 100748. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100748>
- Wu, Y., Franzmeier, S., Liesche-Starnecker, F., & Schlegel, J. (2023). Enhanced Sensitivity to ALDH1A3-Dependent Ferroptosis in TMZ-Resistant Glioblastoma Cells. *Cells*, 12(21). <https://doi.org/10.3390/cells12212522>

- Wu, Y., Kram, H., Gempt, J., Liesche-Starnecker, F., Wu, W., & Schlegel, J. (2022). ALDH1-Mediated Autophagy Sensitizes Glioblastoma Cells to Ferroptosis. *Cells*, 11(24). <https://doi.org/10.3390/cells11244015>
- Xie, Y., Hou, T., Liu, J., Zhang, H., Liu, X., Kang, R., & Tang, D. (2023). Autophagy-dependent ferroptosis as a potential treatment for glioblastoma. *Frontiers in Oncology*, 13, 1091118. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1091118>
- Xie, Y., Hou, W., Song, X., Yu, Y., Huang, J., Sun, X., Kang, R., & Tang, D. (2016). Ferroptosis: process and function. *Cell Death and Differentiation*, 23(3), 369-379. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.158>
- Xie, Y., Zhu, S., Song, X., Sun, X., Fan, Y., Liu, J., Zhong, M., Yuan, H., Zhang, L., Billiar, T. R., Lotze, M. T., Zeh, H. J., 3rd, Kang, R., Kroemer, G., & Tang, D. (2017). The Tumor Suppressor p53 Limits Ferroptosis by Blocking DPP4 Activity. *Cell Reports* 20(7), 1692-1704. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.07.055>
- Xuan, Y. T., Guo, Y., Zhu, Y., Han, H., Langenbach, R., Dawn, B., & Bolli, R. (2003). Mechanism of cyclooxygenase-2 upregulation in late preconditioning. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 35(5), 525-537. [https://doi.org/10.1016/s0022-2828\(03\)00076-2](https://doi.org/10.1016/s0022-2828(03)00076-2)
- Yagi, K., Komura, S., Kojima, H., Sun, Q., Nagata, N., Ohishi, N., & Nishikimi, M. (1996). Expression of human phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene for protection of host cells from lipid hydroperoxide-mediated injury. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 219(2), 486-491. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0260>
- Yamanaka, R., Hayano, A., & Kanayama, T. (2018). Radiation-induced gliomas: a comprehensive review and meta-analysis. *Neurosurgical Review*, 41(3), 719-731. <https://doi.org/10.1007/s10143-016-0786-8>
- Yan, Y., Xu, Z., Dai, S., Qian, L., Sun, L., & Gong, Z. (2016). Targeting autophagy to sensitive glioma to temozolomide treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 35, 23. <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0303-5>
- Yang, W. S., Kim, K. J., Gaschler, M. M., Patel, M., Shchepinov, M. S., & Stockwell, B. R. (2016). Peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases drives ferroptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(34), E4966-4975. <https://doi.org/10.1073/pnas.1603244113>
- Yang, W. S., SriRamaratnam, R., Welsch, M. E., Shimada, K., Skouta, R., Viswanathan, V. S., Cheah, J. H., Clemons, P. A., Shamji, A. F., Clish, C. B., Brown, L. M., Girotti, A. W., Cornish, V. W., Schreiber, S. L., & Stockwell, B. R. (2014). Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell*, 156(1-2), 317-331. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.010>
- Yonezawa, M., Back, S. A., Gan, X., Rosenberg, P. A., & Volpe, J. J. (1996). Cystine deprivation induces oligodendroglial death: rescue by free radical scavengers and by a diffusible glial factor. *Journal of Neurochemistry* 67(2), 566-573. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.67020566.x>
- Yu, H., Guo, P., Xie, X., Wang, Y., & Chen, G. (2017). Ferroptosis, a new form of cell death, and its relationships with tumorous diseases. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 21(4), 648-657. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13008>
- Yu, W., Zhang, L., Wei, Q., & Shao, A. (2019). O(6)-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT): Challenges and New Opportunities in Glioma Chemotherapy. *Frontiers in Oncology*, 9, 1547. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01547>
- Yuan, H., Li, X., Zhang, X., Kang, R., & Tang, D. (2016). Identification of ACSL4 as a biomarker and contributor of ferroptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 478(3), 1338-1343. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.08.124>
- Zhang, W. B., Wang, Z., Shu, F., Jin, Y. H., Liu, H. Y., Wang, Q. J., & Yang, Y. (2010). Activation of AMP-activated protein kinase by temozolomide contributes to apoptosis in glioblastoma cells via p53 activation and mTORC1 inhibition. *Journal of Biological Chemistry* 285(52), 40461-40471. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.164046>
- Zhang, Y., Dube, C., Gibert, M., Jr., Cruickshanks, N., Wang, B., Coughlan, M., Yang, Y., Setiady, I., Deveau, C., Saoud, K., Grello, C., Oxford, M., Yuan, F., & Abounader, R.

- (2018). The p53 Pathway in Glioblastoma. *Cancers*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/cancers10090297>
- Zinovieva, O. L., Grineva, E. N., Krasnov, G. S., Karpov, D. S., Zheltukhin, A. O., Snezhkina, A. V., Kudryavtseva, A. V., Mashkova, T. D., & Lisitsyn, N. A. (2019). Treatment of cancer cells with chemotherapeutic drugs results in profound changes in expression of genes encoding aldehyde-metabolizing enzymes. *Journal of Cancer*, 10(18), 4256-4263. <https://doi.org/10.7150/jca.32608>
- Zülch, K. J. (1980). Principles of the new World Health Organization (WHO) classification of brain tumors. *Neuroradiology*, 19(2), 59-66. <https://doi.org/10.1007/bf00342596>

## 12. Publikation



# Glioblastoma Relapses Show Increased Markers of Vulnerability to Ferroptosis

Helena Kram<sup>1</sup>, Georg Prokop<sup>1</sup>, Bernhard Haller<sup>2</sup>, Jens Gempt<sup>3</sup>, Yang Wu<sup>1</sup>,  
Friederike Schmidt-Graf<sup>4</sup>, Jürgen Schlegel<sup>1</sup>, Marcus Conrad<sup>5,6</sup>  
and Friederike Liesche-Starnecker<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Neuropathology, Institute of Pathology, School of Medicine, Technical University of Munich, Munich, Germany, <sup>2</sup> Institute of AI and Informatics in Medicine, School of Medicine, Technical University of Munich, Munich, Germany, <sup>3</sup> Department of Neurosurgery, School of Medicine, Technical University of Munich, Munich, Germany, <sup>4</sup> Department of Neurology, School of Medicine, Technical University of Munich, Munich, Germany, <sup>5</sup> Institute of Metabolism and Cell Death, Helmholtz Zentrum München, Neuherberg, Germany, <sup>6</sup> Laboratory of Experimental Oncology, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Eduard Yakubov,  
Paracelsus Medical Private  
University, Germany

### Reviewed by:

Daishi Chen,  
Jinan University, China  
Shiao-Pei Weathers,  
University of Texas MD Anderson  
Cancer Center, United States

### \*Correspondence:

Friederike Liesche-Starnecker  
Friederike.liesche@tum.de

### Specialty section:

This article was submitted to  
Neuro-Oncology and  
Neurosurgical Oncology,  
a section of the journal  
Frontiers in Oncology

Received: 22 December 2021

Accepted: 22 March 2022

Published: 21 April 2022

### Citation:

Kram H, Prokop G, Haller B, Gempt J,  
Wu Y, Schmidt-Graf F, Schlegel J,  
Conrad M and Liesche-Starnecker F  
(2022) Glioblastoma Relapses  
Show Increased Markers of  
Vulnerability to Ferroptosis.  
Front. Oncol. 12:841418.  
doi: 10.3389/fonc.2022.841418

**Background:** Despite the availability of various therapy options and being a widely focused research area, the prognosis of glioblastoma (GBM) still remains very poor due to therapy resistance, genetic heterogeneity and a diffuse infiltration pattern. The recently described non-apoptotic form of cell death ferroptosis may, however, offer novel opportunities for targeted therapies. Hence, the aim of this study was to investigate the potential role of ferroptosis in GBM, including the impact of treatment on the expression of the two ferroptosis-associated players glutathione-peroxidase 4 (GPX4) and acyl-CoA-synthetase long-chain family number 4 (ACSL4). Furthermore, the change in expression of the recently identified ferroptosis suppressor protein 1 (FSP1) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) 1A3 was investigated.

**Methods:** Immunohistochemistry was performed on sample pairs of primary and relapse GBM of 24 patients who had received standard adjuvant treatment with radiochemotherapy. To identify cell types generally prone to undergo ferroptosis, co-stainings of ferroptosis susceptibility genes in combination with cell-type specific markers including glial fibrillary acidic protein (GFAP) for tumor cells and astrocytes, as well as the ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1) for microglial cells were performed, supplemented by double stains combining GPX4 and ACSL4.

**Results:** While the expression of GPX4 decreased significantly during tumor relapse, ACSL4 showed a significant increase. These results were confirmed by analyses of data sets of the Cancer Genome Atlas. These profound changes indicate an increased susceptibility of relapsed tumors towards oxidative stress and associated ferroptosis, a cell death modality characterized by unrestrained lipid peroxidation. Moreover, ALDH1A3 and FSP1 expression also increased in the relapses with significant results for ALDH1A3, whereas for FSP1, statistical significance was not reached. Results

obtained from double staining imply that ferroptosis occurs more likely in GBM tumor cells than in microglial cells.

**Conclusion:** Our study implies that ferroptosis takes place in GBM tumor cells. Moreover, we show that recurrent tumors have a higher vulnerability to ferroptosis. These results affirm that utilizing ferroptosis processes might be a possible novel therapy option, especially in the situation of recurrent GBM.

**Keywords:** ferroptosis, glioblastoma, glioma, immunohistochemistry, protein expression, cell death, therapy resistance, relapse

## INTRODUCTION

The poor overall survival (OS) of glioblastoma (GBM) patients, even after extensive therapy including neurosurgical resection followed by combined adjuvant radiation therapy and chemotherapy with temozolomide (TMZ), is attributed to its genetic heterogeneity, diffusely infiltrating growth pattern, high proliferation rate and therapy resistance (1–3). Whilst the exact mechanisms underlying the resistance to treatment remain unknown, it seems to involve radiation-resistant tumor stem cells (4–6). Until today, the methylation status of the O-6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter remains one of the most significant prognostic markers (7). Current research aims at finding new therapeutic targets to improve the patients' prognosis. In the course of this, it was shown that the activation of the iron-dependent cell death ferroptosis can drive cancer therapy by inducing cell death, which led to the hypothesis that ferroptosis may offer new therapeutic targets for difficult-to-treat entities, including GBM (8).

The induction of ferroptosis might amplify the effect of certain chemotherapeutics (9). For instance, diffuse large B cell lymphomas and renal cell carcinomas show a high susceptibility to the ferroptosis inducer erastin (10, 11). Similar promising effects were seen for the combination of erastin with TMZ in glioma and GBM cells (12, 13).

The process of ferroptosis defines an iron-dependent oxidative destruction of lipid bilayers leading to rupturing of cellular membranes and cell death (14, 15). In 2018, ferroptosis was classified as a regulated cell death modality sensitive to lipophilic antioxidant agents (16). One way to achieve this is to perturb lipid hydroperoxide detoxification systems and to trigger iron-dependent reactive oxygen species (ROS) generation (17).

The three hallmarks of ferroptosis include the loss of the lipid peroxide regeneration system, an increase of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and an increase of redox active iron (17). The key enzyme in ferroptosis is glutathione-peroxidase 4 (GPX4). When GPX4 is either inhibited or has lost its function, ROS accumulate and cause cell death (17). Especially tumor cells rely on enzymes like GPX4 to prevent oxidative stress and assure their survival by therapy resistance. A loss of GPX4 might offer a way to selectively kill therapy-resistant tumor cells and prevent relapse (18). Because of its importance in the process, GPX4 was chosen as one marker of ferroptosis in this study.

PUFAs define the second hallmark of ferroptosis because they are more susceptible for radicals or oxidation and hence, for generating ROS. They get activated and oxidized by enzymes like acyl-CoA-synthetase 4 (ACSL4) and lipid-oxygenase. Because of its important regulatory role in the ferroptotic cell death process (19) and its sensitizing effects on (tumor) cells towards ferroptosis (20), ACSL4 was also chosen as marker for ferroptosis in this study. Moreover, an ACSL4 depletion showed inhibiting effects on GBM tumor cell growth (20). The ferroptosis suppressor protein 1 (FSP1) was recently identified to be the second mainstay in ferroptosis control and therefore included (21).

In addition to these canonical ferroptosis players, the enzyme aldehyde dehydrogenase 1A3 (ALDH1A3) was analyzed, which has been discussed as a stem cell marker in GBM (22–25). The isoform ALDH1A3 appears to be the most active one in GBM (23). Interestingly, an *in-vitro* study showed that ALDH knock-out cells were more sensitive to therapy with TMZ compared to the wildtype cells (26).

The mechanisms through which TMZ induces ROS production (13, 27) and some type of autophagic cell death – possibly ferroptosis – are still unknown (28, 29). We hypothesize that they might involve accumulating aldehydes and complex interactions between aldehyde dehydrogenase (ALDH) (26, 30), key ferroptosis player GPX4 (13, 31), and cystine/cysteine (32). A combination of TMZ and ferroptosis inducing agents thus might be a promising approach in GBM patients (12).

The aim of the present study was to analyze the expression of ferroptosis-associated proteins in GBM. To address the expression evolvement, we compared the change of GPX4, ACSL4, FSP1 and ALDH1A3 expression in corresponding pairs of primary and recurrent GBM. Our study

**Abbreviations:** + = positive; ACSL4, acyl-CoA-synthetase long chain family member 4; ALDH, aldehyde dehydrogenase; DAB, 3,3'-diaminobenzidine; DAPI, 4',6-Diamidino-2-phenylindol; FITC, fluorescein isothiocyanate; FPKM, fragments per kilobase of transcript per million mapped reads; FSP1, ferroptosis suppressor protein 1; GBM: glioblastoma; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GPX4, glutathione peroxidase 4; HE, hematoxylin and eosin; Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1; IDH, isocitrate dehydrogenase; IHC, immunohistochemistry; IF, immunofluorescence; IRS, immunoreactive score; OS, overall survival; PFS, progression free survival; PUFAs, polyunsaturated fatty acids; ROS, reactive oxygen species; TCGA, the Cancer Genome Atlas; TMZ, temozolomide; y, years.

thus reveals new insights into ferroptosis in context of GBM, particularly during the course of patient treatment.

## MATERIAL AND METHODS

### Material

24 pairs of primary and recurrent GBM (all isocitrate dehydrogenase (IDH) wildtype; median age 58 years, range 27–78 years; 17 male, 7 female) were retrieved from the archive of the Institute of Pathology of the Technical University Munich (Table 1). All patients had received surgery at the Department of Neurosurgery of the Klinikum rechts der Isar between 2003 and 2017. Diagnoses were confirmed and reevaluated for this study by experienced neuropathologists according to the classification of brain tumors by the World Health Organization, 2016 (33). Clinical information was gathered by searching the hospital information system. Specification of the MGMT promotor status was obtained by searching the information system of the Institute of Pathology. The MGMT promotor status had been determined by the methylation quantification of endonuclease-resistant DNA (MethyQESD) method (34).

All patients had been treated following the standard Stupp scheme (6 weeks concomitant radiochemotherapy with TMZ, followed by up to six cycles of TMZ alone (2)), and availability of tissue samples of primary and recurrent tumor was given. For GPX4, ACSL4 and ALDH1A3, 24 pairs of primary and recurrent tumors were included for immunohistochemistry (IHC) and double immunofluorescence (IF) with cell-type specific markers. The expression of FSP1 was analyzed in 13 pairs. Double immunofluorescence for GPX4 plus ACSL4 was performed for 5 pairs of primary and corresponding recurrent tumors.

A data analysis with transcriptome profiling datasets from the Cancer Genome Atlas (TCGA) regarding a change of ACSL4 and GPX4 gene expression in pairs of primary and recurrent GBM was performed to verify our results. The dataset and associated clinical information were acquired from the TCGA official website (<https://portal.gdc.cancer.gov>). Six corresponding pairs of primary and recurrent GBM were available (TCGA-06-0210,

TCGA-06-0190, TCGA-19-4065, TCGA-14-1034, TCGA-06-0125, TCGA-06-0211). For each patient, six to nine transcriptome profiling datasets including the gene quantification expression were accessible. The ACSL4 and GPX4 gene expression from each primary GBM was compared to the corresponding recurrent GBM using the natural logarithm of the gene quantification expression ( $\ln(\text{expression value})$ ).

This retrospective study was approved by the local Ethics Committee of the Technical University Munich (vote number 164/19 S-SR) and conducted in accordance with the ethical standards of the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments.

### Immunohistochemistry

Formalin-fixed, paraffin-embedded samples were cut in 2  $\mu\text{m}$ -thin sections and deparaffinized followed by epitope unmasking in pH 6.0 citrate buffer at 95°C for 30 minutes. After incubating with endogenous peroxidase, the slides were quenched with 1.5%  $\text{H}_2\text{O}_2$  and blocked in a mixture of blocking buffer (1x phosphate buffered saline (Thermo Fisher Scientific, USA), 1% bovine serum albumin (Biochrom AG, Germany), 0.2% gelatin of cold-water fish skin (SIGMA-ALDRICH®, St. Louis), 0.1% triton X 100 (Carl Roth GmbH+Co. KG, Germany)) with 2.5% normal horse serum (Vector Laboratories, UK) before avidin (Vector Laboratories, USA) was added. Afterwards, incubation was performed with primary antibodies against ACSL4, GPX4, ALDH1A3 and FSP1 overnight at 4°C. The used antibodies with corresponding dilution are listed in Table 2. The antibody diluent consisted of blocking buffer and biotin. On the next day, biotinylated secondary anti-rabbit IgG, anti-rat IgG or anti-mouse IgG antibodies, were diluted at the rate of 1:400 and incubated for 30 minutes. Afterwards, the ABC-reagent (Vector Laboratories, USA) was applied and incubated for 30 minutes. Antibody complexes were detected with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) reagent (Vector Laboratories, USA). Finally, counterstaining with haematoxylin was performed. Positive controls (human liver tissue for ACSL4, ALDH1A3 and FSP1; human kidney tissue for GPX4) served as quality assurance.

The cytoplasmatic staining was analyzed using the immunoreactive score (IRS) established by Remmele and

TABLE 1 | Patient data.

| Sex                                             | Male         | Female | 17       | 7 | n = 24 |
|-------------------------------------------------|--------------|--------|----------|---|--------|
| Age at first diagnosis                          | median       |        | 58 y     |   | n = 24 |
|                                                 | range        |        | 27–78 y  |   |        |
| PFS/time between primary tumor and relapse      | median       |        | 9 mth    |   | n = 19 |
|                                                 | range        |        | 3–53 mth |   |        |
| OS/time between first diagnosis and death/today | median       |        | 18 mth   |   | n = 19 |
|                                                 | range        |        | 9–71 mth |   |        |
| Time between relapse diagnosis and death/today  | median       |        | 11 mth   |   | n = 19 |
|                                                 | range        |        | 3–56 mth |   |        |
| MGMT promotor status                            | methyalted   |        | 5        |   | n = 22 |
|                                                 | unmethyalted |        | 17       |   |        |

24 patients have been included, of which 5 were still alive at the time of this study. y, years; mth, months. PFS, progression free survival; OS, overall survival; MGMT, O-6-methylguanine-DNA methyltransferase. The MGMT promotor status of 22 patients was available. Survival data was accessible for 19 patients.

**TABLE 2 |** Used antibodies.

| Antibody                              | Company                                  | Clone                                                                                | Host species | Dilution                  |
|---------------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------|---------------------------|
| Anti-ACSL4                            | Santa Cruz, USA                          | Monoclonal, clone IgG <sub>2b</sub>                                                  | mouse        | IHC: 1/100<br>IF: 1/20    |
| Anti-GPX4                             | Abcam, UK                                | Monoclonal, clone EPNCIR144                                                          | rabbit       | IHC: 1/3000<br>IF: 1/1000 |
| Anti-ALDH1A3                          | Thermo Fisher Scientific, USA            | polyclonal                                                                           | rabbit       | IHC: 1/1000               |
| Anti-FSP1                             | developed in house                       | IgG2 monoclonal antibody raised against a N-terminal peptide of hXCT, clone 3A12-1-1 | rat          | IHC: undiluted            |
| 2 <sup>nd</sup> antibody, anti-rabbit | Vector Laboratories, USA                 | IgG                                                                                  | rabbit       | IHC: 1/400                |
| 2 <sup>nd</sup> antibody, anti-mouse  | Vector Laboratories, USA                 | IgG                                                                                  | mouse        | IHC: 1/400                |
| 2 <sup>nd</sup> antibody, anti-rat    | Vector Laboratories, USA                 | IgG                                                                                  | rat          | IHC: 1/400                |
| anti-GFAP                             | Dako, USA                                | monoclonal                                                                           | mouse        | IF: 1/50                  |
| anti-GFAP                             | Dako, USA                                | polyclonal                                                                           | rabbit       | IF: 1/500                 |
| anti-Iba1                             | Abcam, UK                                | monoclonal                                                                           | mouse        | IF: 1/500                 |
| anti-Iba1                             | Wako, USA                                | polyclonal                                                                           | rabbit       | IF: 1/500                 |
| 2 <sup>nd</sup> antibody              | Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, USA | Polyclonal, (Alexa Fluor 568/488)                                                    | mouse        | IF: 1/2000                |
| 2 <sup>nd</sup> antibody              | Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, USA | Polyclonal, (Alexa Fluor 568/488)                                                    | rabbit       | IF: 1/2000                |

Stegner (35). The score is a product of the percentage of positive cells (0 = 0%, 1 = <10%, 2 = 10–50%, 3 = 51–80%, 4 = >80%) and staining intensity (0 = no staining, 1 = weak, 2 = moderate, 3 = strong positivity) allowing total values from 0 to 12. Three randomly chosen high power fields (600-fold magnification; ocular 10-fold, objective 60-fold) containing tumor core were examined and the mean was calculated.

### Immunofluorescence

To further investigate in which cells ferroptosis in principle may occur, double immunofluorescence staining with cell markers including glial fibrillary acidic protein (GFAP), which is expressed in tumor cells and astrocytes, along with ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1) for detecting microglia cells was performed (36, 37). Like for IHC, the samples were deparaffinized, unmasked, quenched and blocked. Afterwards, anti-ACSL4 and anti-GPX4, respectively, antibodies each in combination with anti-GFAP or Iba1 antibody (all diluted in blocking buffer (1x phosphate buffered saline, 2.5% donkey serum, 1% bovine serum albumin, 0.2% gelatin of cold-water fish skin, 0.1% triton X 100) were incubated overnight at 4°C, followed by the second antibody, which incubated for 45 minutes. The used antibodies with corresponding dilution are listed in **Table 2**. Autofluorescence Quenching Kit including 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) (Vector Laboratories, USA) was used to reduce autofluorescence and to counterstain the nuclei. While the ferroptosis-related enzymes were stained in a green-fluorescent dye with excitation at 488 nm detectable with the fluorescein isothiocyanate (FITC) filter, the cell type-specific markers were colored in a red-fluorescent dye with absorption at 568 nm and detected with the rhodan filter. The blue-fluorescent nuclei were detected with the DAPI filter.

The same procedure was applied to the ACSL4 and GPX4 double immunofluorescence. Only the incubation time of the

first antibodies was shortened to two hours to reduce background straining.

For quantification, the amount of nuclei was counted. Afterwards, a percentage of GPX4-positive (\*) and ACSL4\* cells, as well as GFAP\* and Iba1\* cells was estimated. Furthermore, the number of co-expressing cells (GPX4 or ACSL4 plus GFAP or Iba1 and ACSL4 plus GPX4) was counted. Again, three high power fields (630-fold magnification; ocular 10-fold, objective 63-fold) containing tumor core were examined and the mean calculated. Following amounts were calculated: the ACSL4- and GFAP-co-stained cells divided by the amount of GFAP-positive cells (ACSL4\*/GFAP\*), ACSL4\*/Iba1\*, GPX4\*/GFAP\* and GPX4\*/Iba1\*, as well as GFAP\*/ACSL4\*, Iba1\*/ACSL4\*, GFAP\*/GPX4\* and Iba1\*/GPX4\*.

### Statistical Analysis

Statistical analyses were performed with R Version 3.6.1. Since pairs of samples from the same patient had to be compared and a normal distribution was not always given, all significance was tested using the Wilcoxon signed-rank tests were used for comparisons of primary and recurrent tumors and Spearman's rank correlation coefficients with corresponding tests for assessment of associations between quantitative data. Since the TCGA-dataset was also not coherently normally distributed, the Wilcoxon signed-rank test was applied once more. For correlating the IHC results with clinical outcome, a test on association was performed and a cut-off score was estimated using the 'coin' package which calculated the best threshold to discriminate patients with regard to OS (38). Kaplan-Meier survival curves are shown for the corresponding groups. Moreover, the p-value was also estimated by the "maxstat"-function from the "coin"-package. For all tests, statistical significance was defined as  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### Dynamic Changes in Ferroptosis-Related Enzymes in Primary and Recurrent GBM

By immunohistochemistry, a significant increase of ACSL4 and ALDH1A3 expression and a significant decrease of GPX4 expression was observed when comparing primary and corresponding recurrent tumor. FSP1 expression increased slightly, not significantly, though.

Following, the results are demonstrated in detail. The IRS allows values from 0 to 12. Inconsistencies between absolute values and difference ( $\Delta$ ) are due to rounding.

The average of ACSL4 expression increased from IRS 2.40 in the primary tumors to IRS 4.99 in the recurrent tumors (Figures 1B, C, 2A). This change of 4.58 IRS points was highly significant ( $p < 0.001$ ).

Expression of GPX4 decreased from IRS 6.53 in the primary to IRS 2.17 in the recurrent tumors ( $\Delta$  4.36 IRS points, Figures 1F, G, 2B). The decrease could be detected in 23 out of 24 patients and was highly significant ( $p < 0.001$ ).

FSP1 expression increased slightly from IRS 1.46 to 2.08 ( $\Delta$  0.62 IRS points). This change was not significant ( $p = 0.174$ , Figures 1J, K, 2C).

ALDH1A3 expression increased in 22 out of 24 patients (Figures 1N, O, 2D). The increase from IRS 2.24 in the

primary to IRS 6.18 in the recurrent tumors ( $\Delta$  3.94 IRS points) was highly significant ( $p < 0.001$ ).

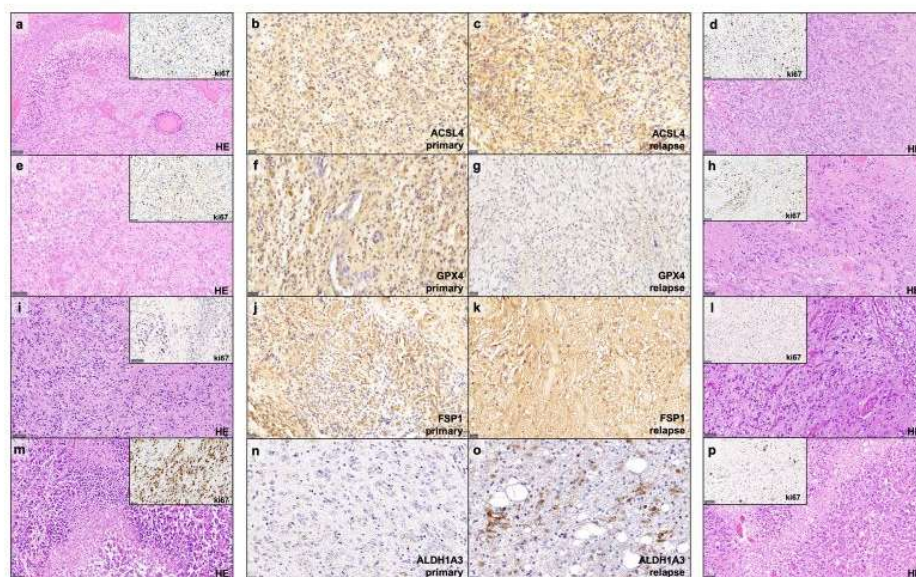
The complete results of immunohistochemistry are summarized in Table 3.

A TCGA data analysis was performed to verify our results. The gene expression level was normalized using fragments per kilobase of transcript per million mapped reads (FPKM). Although insignificant ( $p = 0.094$ ), the ACSL4 gene expression increased in five out of six patients (TCGA-06-0210, TCGA-06-0190, TCGA-19-4065, TCGA-06-0125, TCGA-06-0211) by an average of 0.36 (Figure 2E). Moreover, the GPX4 gene expression decreased in four out of six patients (TCGA-06-0210, TCGA-06-0190, TCGA-19-4065, TCGA-14-1034) by an average of 0.06 (Figure 2F), again, not significantly, though ( $p = 0.844$ ). The insignificant results may be alleageable by the small sample size.

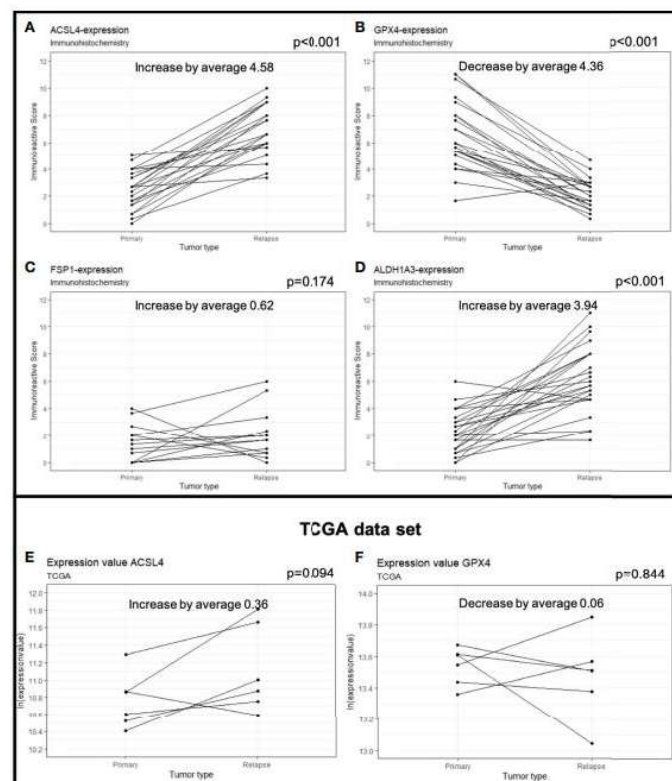
The results of the TCGA data analysis are summarized in Table 4. Figure 1 also includes hematoxylin and eosin stain, as well as ki67 immunohistochemistry as proliferation marker for all examples of primary and recurrent GBM.

### Co-Expression Analysis With Immunofluorescence

Co-expression of ferroptosis-related proteins ACSL4 and GPX4 with the cell type specific markers GFAP and Iba1 was analyzed



**FIGURE 1** | Examples of immunohistochemistry staining. Shown are paired GBM primary and relapse with stronger ACSL4 and ALDH1A3 expression in the relapse (C, O) compared to the primary tumor (B, N). In contrast, GPX4 and FSP1 display a stronger expression in the primary tumor (F, J) compared to their relapse (G, K). Furthermore, for each example of primary and recurrent GBM, a hematoxylin and eosin (HE) stains as well as a ki67 immunohistochemistry of representative areas are provided (A, D, E, H, I, L, M, P). Scale bars of ACSL4, GPX4, FSP and ALDH1A3 immunohistochemistry: all 20  $\mu$ m; Scale bars of HE and ki67 immunohistochemistry: all 50  $\mu$ m.



**FIGURE 2 |** Protein expression in primary and recurrent GBM. The dots mark the level of IRS in the primary and relapse tumor. Each line represents the change in expression of one patient, showing increase of expression for ACSL4 (A), FSP1 (C) and ALDH1A3 (D). GPX4 expression decreases significantly in 23 out of 24 patients (B). The results were verified by analyses of the TCGA data set showing an increase in ACSL4 expression (E) and a decrease in GPX4 expression (F).

to further investigate which cell types become vulnerable to ferroptosis. Many GFAP-positive (+) cells expressed the ferroptosis-associated markers labelled by a yellow signal (Figures 3A–F). In combination with Iba1, however, only a few cells showed a clear yellow signal indicating co-expression with ACSL4 and GPX4 (Figures 3G–I). To anticipate: the co-expression analysis shows that 70% to 80% of the cells expressing

the ferroptosis-associated marker genes ACSL4 or GPX4 do also express GFAP.

In detail and illustrated in Figures 4A, B, the overall amount of ACSL4<sup>+</sup> cells in both combinations increased significantly from primary to recurrent tumors. Moreover, a higher amount of GFAP<sup>+</sup> cells also expressed ACSL4 compared to Iba1<sup>+</sup> cells. The amount of ACSL4<sup>+</sup> cells of the GFAP<sup>+</sup> cells increased

**TABLE 3 |** Summary of results of immunohistochemistry.

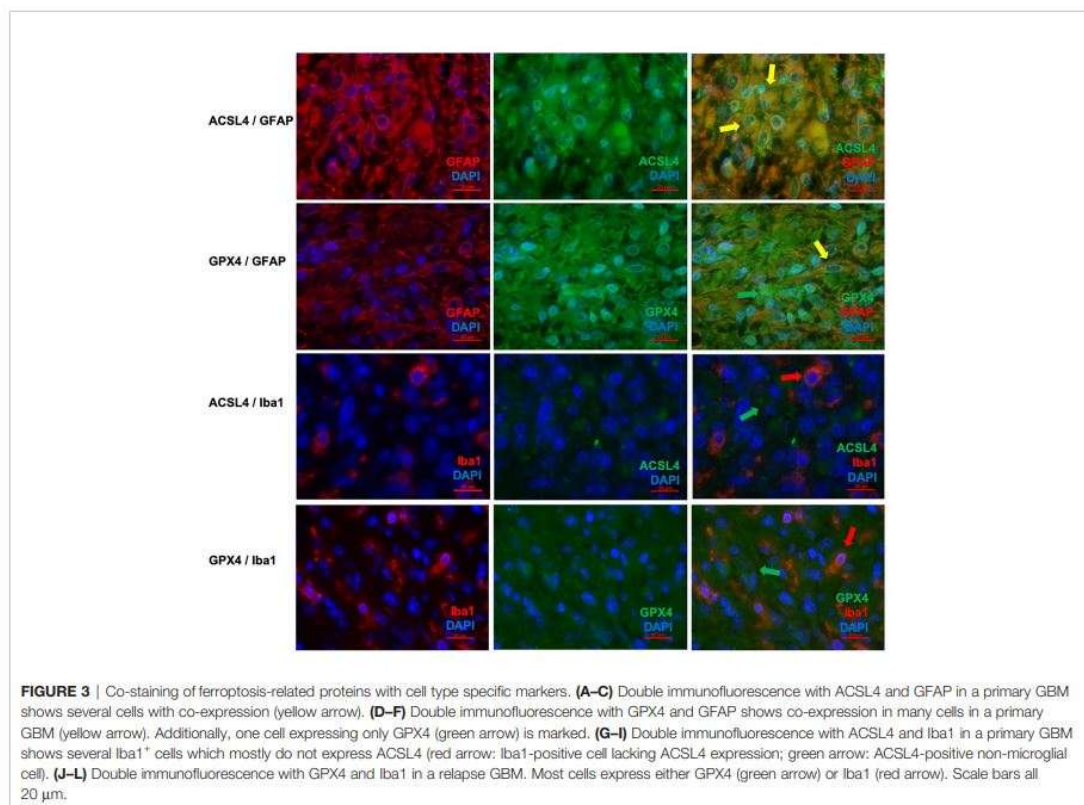
| Protein | IRS total |            | IRS primary |        | IRS recurrent |        | $\Delta$ primary-recurrent |        |      |         |         |
|---------|-----------|------------|-------------|--------|---------------|--------|----------------------------|--------|------|---------|---------|
|         | Mean      | Range      | Mean        | Median | Mean          | Median | Mean                       | Median | SD   | p-value | Z-score |
| ACSL4   | 4.69      | 0.00–10.00 | 2.40        | 2.50   | 6.99          | 6.67   | +4.58                      | +5.00  | 2.12 | <0.001  | -7.181  |
| GPX4    | 4.35      | 0.33–11.00 | 6.53        | 6.00   | 2.17          | 2.17   | -4.36                      | -4.33  | 2.25 | <0.001  | -7.047  |
| FSP1    | 1.77      | 0.00–6.00  | 1.46        | 1.33   | 2.08          | 1.67   | +0.62                      | +0.67  | 2.28 | 0.174   | -1.360  |
| ALDH1A3 | 4.21      | 0.00–11.00 | 2.24        | 2.00   | 6.18          | 5.83   | +3.94                      | 4.17   | 2.91 | <0.001  | -6.672  |

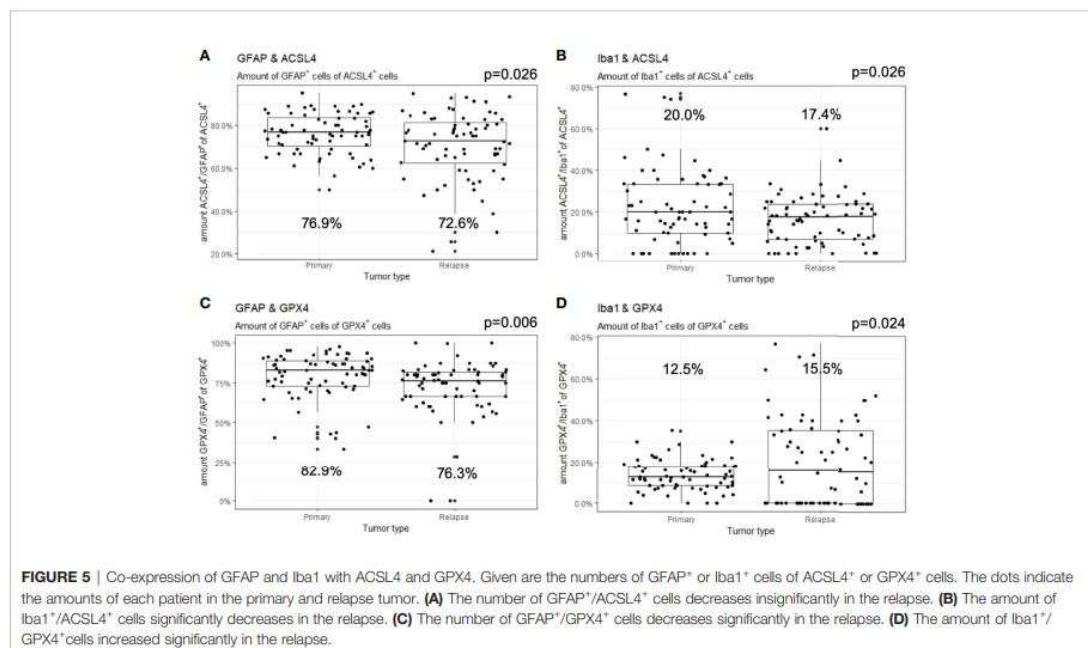
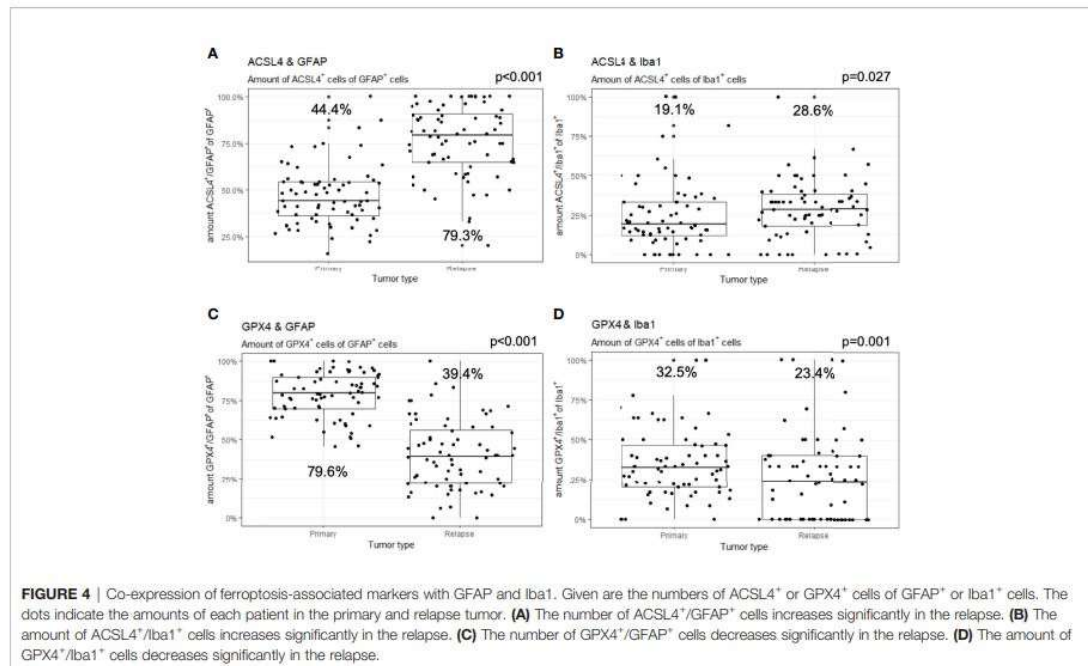
**TABLE 4** | Summary of the TCGA analysis.

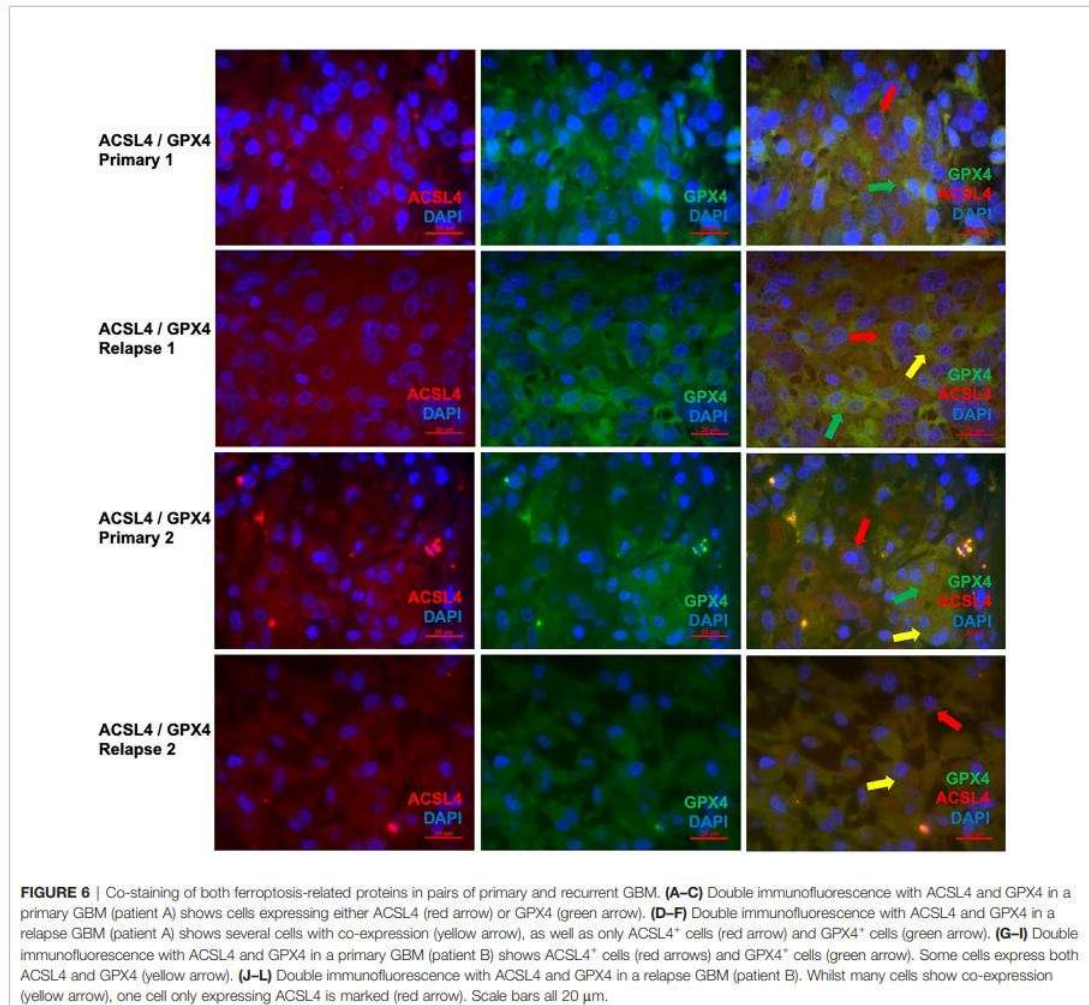
| Protein | Ln(expression-value) total |            | Ln(expression-value) primary |        | Ln(expression-value) recurrent |        | $\Delta$ primary-recurrent |        |      |         |         |
|---------|----------------------------|------------|------------------------------|--------|--------------------------------|--------|----------------------------|--------|------|---------|---------|
|         | Mean                       | Range      | Mean                         | Median | Mean                           | Median | Mean                       | Median | SD   | p-value | Z-score |
| ACSL4   | 7.22                       | 1.42-12.90 | 7.07                         | 7.47   | 7.40                           | 7.70   | +0.36                      | +0.36  | 0.42 | 0.094   | -1.676  |
| GPX4    | 9.45                       | 4.06-14.95 | 9.51                         | 9.25   | 9.38                           | 9.07   | -0.06                      | -0.08  | 0.31 | 0.844   | -0.197  |

**TABLE 5** | Summary of results of co-expression analysis by immunofluorescence.

| Proteins    |        | primary |        | recurrent |        | $\Delta$ primary-recurrent |        |       |         |         |
|-------------|--------|---------|--------|-----------|--------|----------------------------|--------|-------|---------|---------|
|             |        | Mean    | Median | Mean      | Median | Mean                       | Median | SD    | p-value | Z-score |
| ACSL4* in   | GFAP*  | 47.1%   | 44.4%  | 76.5%     | 79.3%  | +29.3%                     | +30.8% | 18.6% | <0.001  | -6.647  |
|             | Iba1*  | 24.6%   | 19.1%  | 28.7%     | 28.6%  | +4.2%                      | 10.4%  | 19.3% | 0.027   | -2.209  |
| GPX4* in    | GFAP*  | 78.4%   | 79.6%  | 40.3%     | 39.4%  | -38.0%                     | -40.4% | 18.1% | <0.001  | -7.124  |
|             | Iba1*  | 34.5%   | 32.5%  | 25.3%     | 23.4%  | -9.2%                      | -9.7%  | 20.0% | 0.001   | -3.192  |
| GFAP* in    | ACSL4* | 76.1%   | 76.9%  | 70.3%     | 72.6%  | -5.8%                      | -4.4%  | 14.7% | 0.026   | -2.223  |
| Iba1* in    |        | 22.2%   | 20.0%  | 16.1%     | 17.4%  | -6.1%                      | -0.1%  | 16.0% | 0.026   | -2.232  |
| GFAP* in    | GPX4*  | 79.1%   | 82.9%  | 72.1%     | 76.3%  | -6.9%                      | -6.6%  | 17.1% | 0.006   | -2.747  |
| Iba1* in    |        | 13.6%   | 12.5%  | 20.2%     | 15.5%  | +6.6%                      | +4.9%  | 15.1% | 0.024   | -2.255  |
| ACSL4* with | GPX4*  | 18.9%   | 15.7%  | 16.2%     | 17.1%  | -2.7%                      | -3.4%  | 7.5%  | 0.625   | -7.181  |







significantly by an average of 29.3% ( $p < 0.001$ ) between primary and relapsed tumor. The number of ACSL4<sup>+</sup> cells in the Iba1<sup>+</sup> cell population increased significantly by an average of 4.2% ( $p = 0.027$ ).

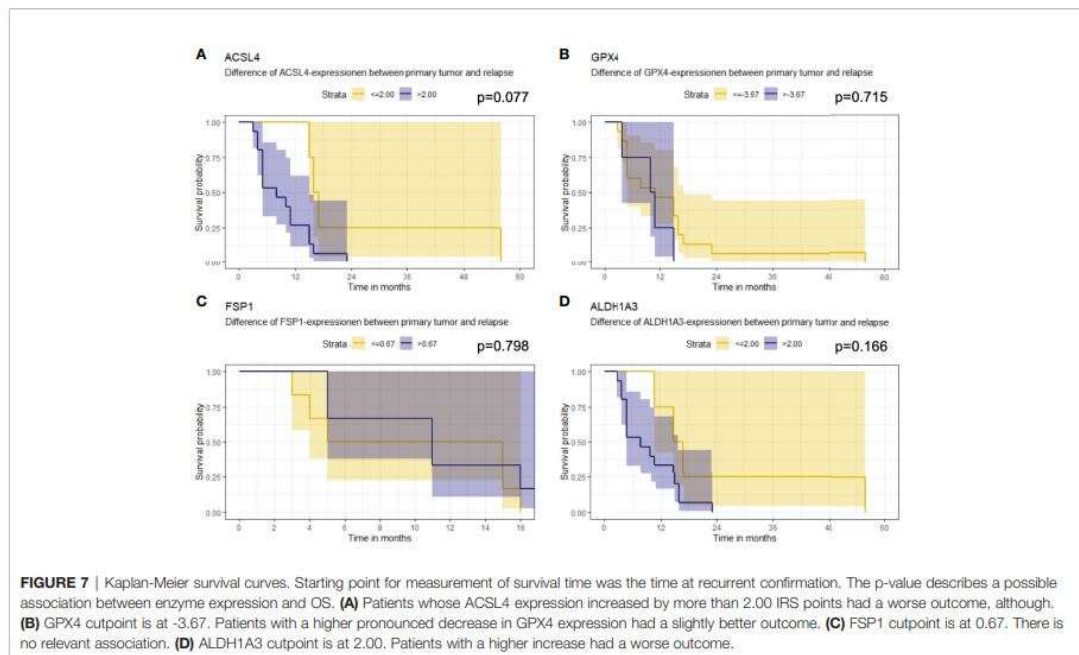
The count of GPX4<sup>+</sup> cells of GFAP<sup>+</sup> cells decreased significantly by an average of 38.0% between primary and recurrent tumors ( $p < 0.001$ ), while the amount of GPX4<sup>+</sup> cells of Iba1<sup>+</sup> cells decreased significantly by an average of 9.2% ( $p = 0.001$ ) in the relapse (**Figures 4C, D**).

The number of GFAP<sup>+</sup> of ACSL4<sup>+</sup> cells decreased insignificantly by an average of 5.8% in the recurrent tumors ( $p = 0.026$ , **Figure 5A**). Moreover, the amount of Iba1<sup>+</sup> cells of ACSL4<sup>+</sup> cells was three to four times lower in the primary tumor

and decreased significantly by an average of 6.1% in the recurrent tumor ( $p = 0.026$ ; **Figure 5B**).

A similar tendency can be observed in **Figure 5C** with the amount of GFAP<sup>+</sup> cells of GPX4<sup>+</sup> cells. This number decreased significantly by an average of 6.9% ( $p = 0.006$ ). On the other hand, the amount of Iba1<sup>+</sup> cells of the GPX4<sup>+</sup> cell population was three to four times lower (**Figure 5D**). It increased significantly by an average of 6.6% ( $p = 0.024$ ). The quantitative results of the described double immunofluorescences are summarized in **Table 5**.

Since the changes in expression of ACSL4 and GPX4 from primary to relapse GBM were already analyzed quantitatively in the IHC, double immunofluorescence of these two proteins was



performed to show parallel expression and possible interactions in a qualitatively way. With a mean of 18.9% in primary and a mean of 16.2% in relapse GBM, several cells show co-expression, although there is no significant difference ( $p=0.625$ ). Whilst GPX4 remained prominent in the primary tumors (Figures 6A–C, G–I), ACSL4 was expressed more in relapse GBM (Figures 6D–F, J–L), affirming the results of IHC.

### Association of Ferroptosis-Associated Markers With Overall Survival

Furthermore, the association of the expression dynamic of ACSL4, GPX4, FSP1 and ALDH1A3 with OS was evaluated. The IRS differences between primary and recurrent tumor were calculated for each marker and a threshold for every enzyme was estimated. Patients with a larger increase than 2.00 in their

ACSL4 expression (Figure 7A) showed a poorer overall survival with a median of 8 months compared to patients with an increase of up to 2.00 and with a median OS of 16.5 months. However, no significant association between ACSL4 expression and OS was observed ( $p=0.077$ ). Given that the GPX4 expression decreased in almost all patients, the calculated cutpoint amounts to -3.67 (Figure 7B). Patients with an even stronger decrease ( $\leq -3.67$ ) displayed a slightly better overall survival with a median of 11 months compared to patients with a smaller decrease with a median of 10.5 months, yet again no statistically significant association between expression and OS was found ( $p=0.715$ ).

The threshold for FSP1 was 0.67 (Figure 7C). Patients with a higher increase in expression had a median OS of 11.0 months, those with a lower change had a median OS of 10.0 months. There was no significant association between FSP1 expression

**TABLE 6** | Summary of results of survival analysis.

| Protein | Cutpoint     | Time between relapse diagnosis and death |        | p-value |
|---------|--------------|------------------------------------------|--------|---------|
|         |              | Mean                                     | Median |         |
| ACSL4   | $\leq 2.00$  | 26.0                                     | 16.5   | 0.077   |
|         | $> 2.00$     | 9.3                                      | 8.0    |         |
| GPX4    | $\leq -3.67$ | 13.6                                     | 11.0   | 0.715   |
|         | $> -3.67$    | 10.0                                     | 10.5   |         |
| FSP1    | $\leq 0.67$  | 9.7                                      | 10.0   | 0.798   |
|         | $> 0.67$     | 10.8                                     | 11.0   |         |
| ALDH1A3 | $\leq 2.00$  | 24.8                                     | 16.0   | 0.166   |

and OS ( $p=0.798$ ). For ALDH1A3 expression, a cut-off value of 2.00 was identified (Figure 7D). Patients with a stronger increase trended to have a poorer overall survival with a median of 8.0 months compared to the patients with less increase than 2.00 IRS points with a median OS of 16 months. Again, no significant association was observed ( $p=0.166$ ).

In addition, the change in expression of each enzyme was correlated with the methylation status of the MGMT promoter. No significant correlations between the difference of expression of ACSL4 ( $\rho=-0.146$ ,  $p=0.518$ ), GPX4 ( $\rho=0.205$ ,  $p=0.359$ ), ALDH1A3 ( $\rho=0.146$ ,  $p=0.518$ ) or FSP1 ( $\rho=0.336$ ,  $p=0.336$ ) and status of methylated MGMT promoter were detected.

The results of the survival analysis are summarized in Table 6.

## DISCUSSION

Despite extensive therapy, the prognosis of GBM remains very poor. Therefore, new therapeutic approaches are a key topic of many studies. Ferroptosis has been discussed as possible novel therapeutic target in cancer, particularly in light of a number of recent reports that suggested that therapy-resistant cancer cells and those undergoing epithelial-mesenchymal transition display a high vulnerability towards ferroptosis (8, 39). Thus, the objective of this study was to analyze whether ferroptosis is in principle activated in GBM and moreover, if there is a difference in vulnerability between primary and relapsed tumors. Various therapy options examined the effect of ferroptosis induction *in vitro* and *ex vivo* (17, 19, 40). All of these studies could in fact confirm an increased therapy response after the induction. Therefore, the following enzymes implicated in the process of ferroptosis were chosen (17): ACSL4, GPX4 and FSP1.

Our study shows that ACSL4 expression increases in GBM relapses compared to their primaries, whilst the GPX4 expression decreases. The results of the TCGA data analysis verified these results. An increased expression of ACSL4 is ultimately linked to an increased generation of activated PUFAs, which are used to produce oxidative stress and activate even more PUFAs by forming radicals in the presence of iron. Upon esterification into membranes they may become peroxidized thus rendering cells more sensitive to ferroptosis (19, 41, 42). Moreover, the decrease of GPX4 expression implies that the detoxifying capacity might be diminished. Both changes increase the propensity of cells to undergo lipid peroxidation (19, 43). This can also be caused by chemotherapeutics, radiation or simply burning energy (44–46).

Since FSP1 was recently shown to efficiently protect against ferroptosis caused by GPX4 deletion or inhibition (21, 47), it was hypothesized that its expression may increase in response to a loss of GPX4 expression. Accordingly, a slight, although not significant increase in expression could be detected. Unlike the glutathione/GPX4 axis that directly reduces lipid hydroperoxides in the membranes to its corresponding alcohols, the oxidoreductase FSP1 regenerates extra-mitochondrial ubiquinone to ubiquinol, that in turn either directly or

indirectly *via* vitamin E prevents the lipid peroxidation chain reaction by reducing peroxy radicals in phospholipid acyl chains (8). Furthermore, FSP1 was described as a protein prohibiting ferroptosis through the suppression of lipid peroxidation. Although two of the defined hallmarks can be detected in GBM relapse, additional studies are warranted to show that there is indeed increased lipid peroxidation in respective tissues as this would ultimately tell us that an imbalance in PUFA enrichment of membranes and a compromised protecting system sensitizes tumors to ferroptosis (17). The antibody against human FSP1 was reported in 2019 (21). Thus, its analysis was complemented retroactively with sufficient material from only 13 patients left.

This is the first study that investigated a potential relationship between ALDH1A3 and ferroptosis susceptibility. IHC demonstrated a significant increase of ALDH1A3 between GBM primary and relapse. This is in accordance with the mesenchymal transformation taking place during occurrence of recurrent tumors or a selection of GBM tumor stem cells surviving. ALDH1A3 has been associated with mesenchymal differentiation in GBM by keeping cells in an undifferentiated, stem-cell-like state which might also lead to therapy resistance (22–24). Since ALDH1A3 is involved in the detoxification of aldehydes generated as secondary products by lipid peroxidation, an increase in ALDH1A3 expression could present a cellular response towards more lipid peroxidation in GBM relapse.

Furthermore, since the quantitative changes of ACSL4 and GPX4 were already analyzed in the IHC results, the double immunofluorescence with ACSL4 and GPX4 was performed on only 5 pairs of primary and relapse GBM to demonstrate possible interactions. The detected co-expression, with GPX4 dominating in the primary and ACSL4 in the relapse GBM, indicates a complex equilibrium-like relation between the two ferroptosis-markers. Regarding this, Sha et al. examined the combined status of ACSL4 and GPX4 expression in breast cancer patients. They discovered that the combined status could predict pathological complete response to chemotherapy due to their balance-like interactions. Moreover, patients with a high ACSL4 and low GPX4 status showed higher sensitivity to chemotherapy leading to the assumption that a combination of ACSL4 inducer and GPX4 inhibitor could be beneficial for treatment efficacy (48).

In combination with the results of the double immunofluorescence with GFAP and Iba1, we furthermore provide intriguing evidence that ferroptosis is more likely to take place in GBM tumor cells and not in the surrounding microglia cells.

There was no significant association between the change of expression of ferroptosis-associated proteins and OS. Nevertheless, patients with a high increase of ACSL4 expression had a poorer OS than those with a low increase. This suggests that patients with a higher content of PUFAs in membranes have a poorer overall outcome. Liu et al. identified 19 ferroptosis-related genes in glioma using data from genome atlases including TCGA, upon which they evaluated a risk score (49). The risk score of those genes positively correlated with glioma malignancy, as well as migration and invasion.

While higher risk scores regarding the ferroptosis-related genes were associated with worse prognosis, the receiver operating characteristic curve generated by the risk score could predict patient OS. Since six signature genes of the 19 ferroptosis-related genes were involved in the GPX4 regulation, GPX4 and its role in ferroptosis might play a crucial role regarding survival of glioma patients. Furthermore, mesenchymal cancer cells associated with drug resistance proved to be selectively dependent on GPX4 (18). Therefore, GPX4 inhibitors were selectively lethal to these cells, offering yet another therapeutic option. Moreover, patients with a higher ALDH1A3 increase showed poorer OS. This might lead to the assumption that the detoxifying systems including GPX4 and ALDH1A3 can sense the oxidative stress level in the cell and therefore coordinate up- and downregulation accordingly. When there is more ROS accumulating due to the downregulation of one of the systems, the other one possibly increases.

The lack of significance may be attributable to the small sample size and, therefore, to the wider confidence intervals. Nevertheless, these results support the hypothesis that an increased generation of lipid hydroperoxides and increased vulnerability towards ferroptosis may occur during primary and relapse diagnosis. It remains, however, to be explored, whether TMZ in fact contributes to the sensitization of GBM towards the ferroptotic process. Sehm et al. combined several ferroptosis inducers like erastin and sorafenib with TMZ and showed that TMZ works in an xc-system expression dependent manner (12). Furthermore, Buccarelli *et al.* reported increased glioblastoma stem-like cells susceptibility to TMZ after induction of ferroptosis (40). TMZ treatment thus may act as a possible ferroptosis inducer but further experiments including a control group without the treatment remain necessary. Moreover, the amount of TMZ may have an effect on this process. If more TMZ, maybe in form of more TMZ cycles, influences, or even amplifies the ferroptosis induction, has yet to be investigated.

A shortcoming of this study is the small sample size, which can be explained by the poor prognosis of GBM, where death occurs often before relapse and in case of relapse situation, only a small portion of GBM patients receive re-resection. The high value of our cohort is demonstrated by considering the small number of 6 pairs of primary and recurrent GBM available at the TCGA data base. The heterogeneity of GBM was not fully respected in this study. By calculating a mean of three randomly chosen tumor containing areas, we tried to incorporate the heterogeneity, though. As the heterogeneity plays a key role for therapy resistance, following studies should address differences in intratumoral expression. Another limitation consists of a missing control group.

To conclude, this is the first study analyzing ferroptotic processes in GBM between the primary and relapse tumor. Based on our results, ferroptosis likely takes place in GBM tumor cells. Moreover, we showed that there is a dynamic in the expression of ferroptosis-associated between primary and recurrent GBM with a higher vulnerability to ferroptosis in the relapses. These results affirm that utilizing ferroptosis processes might be a possible novel therapy option especially in the

situation of recurrent GBM. Particularly relevant for GBM is the role of TMZ, although it remains to be determined whether it acts as a true ferroptosis trigger or a sensitizer. Nonetheless, prospective trials should be geared to examine a possible link between TMZ and ferroptosis and to validate its true clinical value.

## CONCLUSION

Our study implies that ferroptosis may take place in GBM tumor cells due to the profound changes in the expression of ACSL4 and GPX4. Moreover, we show that recurrent tumors have a higher vulnerability to ferroptosis. These results affirm that utilizing ferroptosis processes might be a possible novel therapy option especially in the situation of recurrent GBM.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

## ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Ethics committee of the Technical University Munich. Written informed consent for participation was not required for this study in accordance with the national legislation and the institutional requirements.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

HK, MC, JS, YW, and FL-S contributed to conception and design of the study. HK, JG, GP, and FS-G organized the database. HK and BH performed the statistical analysis. GP performed the TCGA analyses. HK wrote the first draft of the manuscript. MC, JS, and FL-S wrote sections of the manuscript. All authors contributed to manuscript revision, read, and approved the submitted version.

## FUNDING

Work in the Conrad lab is supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) CO 291/7-1, the DFG Priority Program 2306 (CO 297/9-1; CO 297/10-1), and the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (075-15-2019-1933). MC is further funded by the European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme (grant agreement No. GA 884754).

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank S. Baur, T. Matt and Ch. Schustetter for their excellent technical support. The results

shown here are in part based upon data generated by the TCGA Research Network: <https://www.cancer.gov/tcga>. We thank the research groups for their contribution to the TCGA data base.

## REFERENCES

- Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, Deltour I, Fisher JL, Langer CE, et al. The Epidemiology of Glioma in Adults: A "State of the Science" Review. *Neuro Oncol* (2014) 16(7):896–913. doi: 10.1093/neuonc/nou087
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy Plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med* (2005) 352(10):987–96. doi: 10.1056/NEJMoa043330
- Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Ostrom QT, Lightner DD, Barnholtz-Sloan JS, et al. Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* (2014) 23(10):1985–96. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-14-0275
- Chen J, Li Y, Yu TS, McKay RM, Burns DK, Kernie SG, et al. A Restricted Cell Population Propagates Glioblastoma Growth After Chemotherapy. *Nature* (2012) 488(7412):522–6. doi: 10.1038/nature11287
- Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, et al. Glioma Stem Cells Promote Radioresistance by Preferential Activation of the DNA Damage Response. *Nature* (2006) 444(7120):756–60. doi: 10.1038/nature05236
- Alves ALV, Gomes INF, Carloni AC, Rosa MN, da Silva LS, Evangelista AF, et al. Role of Glioblastoma Stem Cells in Cancer Therapeutic Resistance: A Perspective on Antineoplastic Agents From Natural Sources and Chemical Derivatives. *Stem Cell Res Ther* (2021) 12(1):206. doi: 10.1186/s13287-021-02231-x
- Weller M, Tabatabai G, Kastner B, Felsberg J, Steinbach JP, Wick A, et al. MGMT Promoter Methylation Is a Strong Prognostic Biomarker for Benefit From Dose-Intensified Temozolomide Rechallenge in Progressive Glioblastoma: The DIRECTOR Trial. *Clin Cancer Res* (2015) 21(9):2057–64. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2737
- Jiang X, Stockwell BR, Conrad M. Ferroptosis: Mechanisms, Biology and Role in Disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2021) 22(4):266–82. doi: 10.1038/s41580-020-00324-8
- Yu H, Guo P, Xie X, Wang Y, Chen G. Ferroptosis, a New Form of Cell Death, and its Relationships With Tumorous Diseases. *J Cell Mol Med* (2017) 21(4):648–57. doi: 10.1111/jcmm.13008
- Yu Y, Xie Y, Cao L, Yang L, Yang M, Lotze MT, et al. The Ferroptosis Inducer Erastin Enhances Sensitivity of Acute Myeloid Leukemia Cells to Chemotherapeutic Agents. *Mol Cell Oncol* (2015) 2(4):e1054549. doi: 10.1080/23723556.2015.1054549
- Yang WS, SriRamaratnam R, Welsch ME, Shimada K, Skouta R, Viswanathan VS, et al. Regulation of Ferroptotic Cancer Cell Death by GPX4. *Cell* (2014) 156(1–2):317–31. doi: 10.1016/j.cell.2013.12.010
- Sehm T, Rauh M, Wiendieck K, Buchfelder M, Eyupoglu IV, Savaskan NE. Temozolomide Toxicity Operates in a xCT/SLC7a11 Dependent Manner and is Fostered by Ferroptosis. *Oncotarget* (2016) 7(46):74630–47. doi: 10.18632/oncotarget.11858
- Chen L, Li X, Liu L, Yu B, Xue Y, Liu Y. Erastin Sensitizes Glioblastoma Cells to Temozolomide by Restraining xCT and Cystathionine-Gamma-Lyase Function. *Oncol Rep* (2015) 33(3):1465–74. doi: 10.3892/or.2015.3712
- Conrad M, Lorenz SM, Proneth B. Targeting Ferroptosis: New Hope for As-Yet-Incurable Diseases. *Trends Mol Med* (2021) 27(2):113–22. doi: 10.1016/j.molmed.2020.08.010
- Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, et al. Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. *Cell* (2012) 149(5):1060–72. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.042
- Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular Mechanisms of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* (2018) 25(3):486–541. doi: 10.1038/s41418-017-0012-4
- Dixon SJ, Stockwell BR. The Hallmarks of Ferroptosis. *Annu Rev Cancer Biol* (2019) 3(1):35–54. doi: 10.1146/annurev-cancerbio-030518-055844
- Hangauer MJ, Viswanathan VS, Ryan MJ, Bole D, Eaton JK, Matov A, et al. Drug-Tolerant Persister Cancer Cells are Vulnerable to GPX4 Inhibition. *Nature* (2017) 551(7679):247–50. doi: 10.1038/nature24297
- Doll S, Proneth B, Tyurin YY, Panzilius E, Kobayashi S, Ingold I, et al. ACSL4 Dictates Ferroptosis Sensitivity by Shaping Cellular Lipid Composition. *Nat Chem Biol* (2017) 13(1):91–8. doi: 10.1038/nchembio.2239
- Yee PP, Wei Y, Kim SY, Lu T, Chih SY, Lawson C, et al. Neutrophil-Induced Ferroptosis Promotes Tumor Necrosis in Glioblastoma Progression. *Nat Commun* (2020) 11(1):5424. doi: 10.1038/s41467-020-19193-y
- Doll S, Freitas FP, Shah R, Aldrovandi M, da Silva MC, Ingold I, et al. FSP1 is a Glutathione-Independent Ferroptosis Suppressor. *Nature* (2019) 575(7784):693–8. doi: 10.1038/s41586-019-1707-0
- Combs SE, Schmid TE, Vaupel P, Mülthoff G. Stress Response Leading to Resistance in Glioblastoma-The Need for Innovative Radiotherapy (iRT) Concepts. *Cancers (Basel)* (2016) 8(1):15. doi: 10.3390/cancers8010015
- Li G, Li Y, Liu X, Wang Z, Zhang C, Wu F, et al. ALDH1A3 Induces Mesenchymal Differentiation and Serves as a Predictor for Survival in Glioblastoma. *Cell Death Dis* (2018) 9(12):1190. doi: 10.1038/s41419-018-1232-3
- Rasper M, Schafer A, Piontek G, Teufel J, Brockhoff G, Ringel F, et al. Aldehyde Dehydrogenase 1 Positive Glioblastoma Cells Show Brain Tumor Stem Cell Capacity. *Neuro Oncol* (2010) 12(10):1024–33. doi: 10.1093/neuonc/noon070
- Zinovieva OL, Grineva EN, Krasnov GS, Karpov DS, Zheltukhin AO, Snezhkina AV, et al. Treatment of Cancer Cells With Chemotherapeutic Drugs Results in Profound Changes in Expression of Genes Encoding Aldehyde-Metabolizing Enzymes. *J Cancer* (2019) 10(18):4256–63. doi: 10.7150/jca.32608
- Wu W, Wu Y, Mayer K, von Rosenstiel C, Schecker J, Baur S, et al. Lipid Peroxidation Plays an Important Role in Chemotherapeutic Effects of Temozolomide and the Development of Therapy Resistance in Human Glioblastoma. *Transl Oncol* (2020) 13(3):100748. doi: 10.1016/j.tranon.2020.100748
- Lin CJ, Lee CC, Shih YL, Lin TY, Wang SH, Lin YF, et al. Resveratrol Enhances the Therapeutic Effect of Temozolomide Against Malignant Glioma *In Vitro* and *In Vivo* by Inhibiting Autophagy. *Free Radic Biol Med* (2012) 52(2):377–91. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.10.487
- Valtorta S, Lo Dico A, Raccagni I, Gaglio D, Belloli S, Politi LS, et al. Metformin and Temozolomide, a Synergic Option to Overcome Resistance in Glioblastoma Multiforme Models. *Oncotarget* (2017) 8(68):113090–104. doi: 10.18632/oncotarget.23028
- Zhang WB, Wang Z, Shu F, Jin YH, Liu HY, Wang QJ, et al. Activation of AMP-Activated Protein Kinase by Temozolomide Contributes to Apoptosis in Glioblastoma Cells via P53 Activation and Mtorc1 Inhibition. *J Biol Chem* (2010) 285(52):40461–71. doi: 10.1074/jbc.M110.164046
- Wu W, Schecker J, Wurster S, Schneider F, Schonfelder M, Schlegel J. Aldehyde Dehydrogenase 1A3 (ALDH1A3) is Regulated by Autophagy in Human Glioblastoma Cells. *Cancer Lett* (2018) 417:112–23. doi: 10.1016/j.canlet.2017.12.036
- Sui X, Zhang R, Liu S, Duan T, Zhai L, Zhang M, et al. RSL3 Drives Ferroptosis Through GPX4 Inactivation and ROS Production in Colorectal Cancer. *Front Pharmacol* (2018) 9:1371. doi: 10.3389/fphar.2018.01371
- Roh JL, Kim EH, Jang H, Shin D. Nrf2 Inhibition Reverses the Resistance of Cisplatin-Resistant Head and Neck Cancer Cells to Artesunate-Induced Ferroptosis. *Redox Biol* (2017) 11:254–62. doi: 10.1016/j.redox.2016.12.010
- Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of

- Tumors of the Central Nervous System: A Summary. *Acta Neuropathol* (2016) 131(6):803–20. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1
34. Bettstetter M, Dechant S, Ruemmele P, Vogel C, Kurz K, Morak M, et al. MethyQESD, a Robust and Fast Method for Quantitative Methylation Analyses in HNPCC Diagnostics Using Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissue Samples. *Lab Invest* (2008) 88(12):1367–75. doi: 10.1038/labinvest.2008.100
  35. Remmele W, Stegner HE. Recommendation for Uniform Definition of an Immunoreactive Score (IRS) for Immunohistochemical Estrogen Receptor Detection (ER-ICA) in Breast Cancer Tissue. *Pathologe* (1987) 8(3):138–40.
  36. Goyal R, Mathur SK, Gupta S, Goyal R, Kumar S, Batra A, et al. Immunohistochemical Expression of Glial Fibrillary Acidic Protein and CAM5.2 in Glial Tumors and Their Role in Differentiating Glial Tumors From Metastatic Tumors of Central Nervous System. *J Neurosci Rural Pract* (2015) 6(4):499–503.
  37. Korzhnevskii DE, Kirik OV. Brain Microglia and Microglial Markers. *Neurosci Behav Physiol* (2016) 46(3):284–90. doi: 10.1007/s11055-016-0231-z
  38. Hothorn T, Hornik K, van de Wiel MAV, Zeileis A. Implementing a Class of Permutation Tests: The Coin Package. *J Stat Softw* (2008) 28(8):1–23.
  39. Friedmann Angeli JP, Krysko DV, Conrad M. Ferroptosis at the Crossroads of Cancer-Acquired Drug Resistance and Immune Evasion. *Nat Rev Cancer* (2019) 19(7):405–14. doi: 10.1038/s41568-019-0149-1
  40. Buccarelli M, Marconi M, Pacioni S, De Pasqualis I, D'Alessandris QG, Martini M, et al. Inhibition of Autophagy Increases Susceptibility of Glioblastoma Stem Cells to Temozolomide by Igniting Ferroptosis. *Cell Death Dis* (2018) 9:841. doi: 10.1038/s41419-018-0864-7
  41. Agmon E, Solon J, Bassereau P, Stockwell BR. Modeling the Effects of Lipid Peroxidation During Ferroptosis on Membrane Properties. *Sci Rep* (2018) 8(1):5155. doi: 10.1038/s41598-018-23408-0
  42. Kagan VE, Mao G, Qu F, Angeli JP, Doll S, Croix CS, et al. Oxidized Arachidonic and Adrenic PEs Navigate Cells to Ferroptosis. *Nat Chem Biol* (2017) 13(1):81–90. doi: 10.1038/nchembio.2238
  43. Alborzinia N, Ignashkova TI, Dejure FR, Gendarme M, Theobald J, Wolfi S, et al. Golgi Stress Mediates Redox Imbalance and Ferroptosis in Human Cells. *Commun Biol* (2018) 1:210. doi: 10.1038/s42003-018-0212-6
  44. Erejuwa OO, Sulaiman SA, Ab Wahab MS. Evidence in Support of Potential Applications of Lipid Peroxidation Products in Cancer Treatment. *Oxid Med Cell Longev* (2013) 2013:931251. doi: 10.1155/2013/931251
  45. Lei G, Zhang YL, Koppula P, Liu XG, Zhang J, Lin SH, et al. The Role of Ferroptosis in Ionizing Radiation-Induced Cell Death and Tumor Suppression. *Cell Res* (2020) 30(2):146–62. doi: 10.1038/s41422-019-0263-3
  46. Ye LF, Chaudhary KR, Zandkarimi F, Harken AD, Kinslow CJ, Upadhyayula PS, et al. Radiation-Induced Lipid Peroxidation Triggers Ferroptosis and Synergizes With Ferroptosis Inducers. *ACS Chem Biol* (2020) 15(2):469–84. doi: 10.1021/acscchembio.9b00939
  47. Bersuker K, Hendricks JM, Li Z, Magtanong L, Ford B, Tang PH, et al. The CoQ Oxidoreductase FSP1 Acts Parallel to GPX4 to Inhibit Ferroptosis. *Nature* (2019) 575(7784):688–92. doi: 10.1038/s41586-019-1705-2
  48. Sha R, Xu Y, Yuan C, Sheng X, Wu Z, Peng J, et al. Predictive and Prognostic Impact of Ferroptosis-Related Genes ACSL4 and GPX4 on Breast Cancer Treated With Neoadjuvant Chemotherapy. *EBioMedicine* (2021) 71:103560. doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103560
  49. Liu HJ, Hu HM, Li GZ, Zhang Y, Wu F, Liu X, et al. Ferroptosis-Related Gene Signature Predicts Glioma Cell Death and Glioma Patient Progression. *Front Cell Dev Biol* (2020) 8:538. doi: 10.3389/fcell.2020.00538

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Kram, Prokop, Haller, Gempt, Wu, Schmidt-Graf, Schlogel, Conrad and Liesche-Starnecker. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

### 13. Abkürzungen

|                  |                                                                                                                                                                                                      |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ABC              | Avidin-Biotin-Komplex                                                                                                                                                                                |
| ACD              | Akzidentieller Zelltod/ Accidental Cell Death                                                                                                                                                        |
| ACSL4            | Acyl-CoA-Synthetase 4                                                                                                                                                                                |
| AIFM2            | Apoptose-induzierender Faktor Mitochondrium-assoziiert 2                                                                                                                                             |
| ALDH             | Aldehyd Dehydrogenase                                                                                                                                                                                |
| ALT              | Alternative Verlängerung von Telomeren/ Alternative Lengthening of Telomeres                                                                                                                         |
| Aqua dest.       | Destilliertes Wasser                                                                                                                                                                                 |
| ATF4             | Aktivierender Transkriptions-Faktor 4                                                                                                                                                                |
| ATRX             | Chromosom-X-verbundenes $\alpha$ -Thalassämie-Retardations-Syndrom/<br>Alpha-Thalassemia X-Linked Mental Retardation Syndrome                                                                        |
| BSO              | Buthionin Sulfoximin                                                                                                                                                                                 |
| CBTRUS           | Zentraler Hirntumor Register der Vereinigten Staaten/ The Central Brain Tumor Registry of the United States                                                                                          |
| CDKN2A/B         | Cyclin-abhängige-Kinase-Inhibitoren 2A und 2B/ Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A/B                                                                                                                |
| CHAC1            | ChaC Glutathion-spezifische $\gamma$ -Glutamyl-Zyclotransferase 1                                                                                                                                    |
| cIMPACT NOW      | Konsortium zur Informierung über molekulare und praktische Herangehensweisen über ZNS-Tumore/ The Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumor Taxonomy Not Official ZNS-WHO |
| COX2             | Cyclooxygenase-2                                                                                                                                                                                     |
| DAB              | Diaminobenzidin                                                                                                                                                                                      |
| DAPI             | 4'-6'-Diamino-2-phenylindole                                                                                                                                                                         |
| EANO             | Europäischer Verbund für Neuroonkologie/ European Association of Neuro-Oncology                                                                                                                      |
| EGFR             | Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor/ Epidermal Growth Factor Receptor                                                                                                                               |
| Fe <sup>2+</sup> | Eisen                                                                                                                                                                                                |
| FFPE             | in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet /Formalin-Fixed Paraffin-Embedded                                                                                                                    |
| FITC             | Fluoreszin Isothiocyanat                                                                                                                                                                             |
| FPKM             | Fragmenten pro Kilobasis des Transkripts pro Millionen abgebildeter Erfassungen / Fragment pro Kilobasis of Transcript pro Million mapped reads                                                      |
| FSP1             | Ferroptose-Suppressor-Protein 1                                                                                                                                                                      |
| GBM              | Glioblastoma multiforme                                                                                                                                                                              |

|                                  |                                                                                    |
|----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| GFAP                             | Gliales fibrilläres saures Protein/ Glial Fibrillary Acidic Protein                |
| GPX4                             | Glutathionperoxidase 4                                                             |
| GSC                              | Glioblastom-Stammzellähnlichen Zellen / Glioblastoma Stem Cells                    |
| GSH                              | Glutathion                                                                         |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>    | Wasserstoffperoxid, Hydrogenperoxid                                                |
| HCl                              | Salzsäure                                                                          |
| HE                               | Hämatoxylin-Eosin                                                                  |
| HMGCR                            | 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-Koenzym A Reduktase                                    |
| Hoechst                          | DNA-Marker                                                                         |
| Iba1                             | Ionisiertes Calcium-bindendes Adapter-Molekül 1                                    |
| IDH                              | Isocitratdehydrogenase                                                             |
| IF                               | Immunfluoreszenz                                                                   |
| IgG                              | Immunglobulin G                                                                    |
| IHC                              | Immunhistochemie                                                                   |
| IRS                              | Immunreaktiver Score                                                               |
| J                                | Jahr                                                                               |
| KCl                              | Kaliumchlorid                                                                      |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | Kaliumdihydrogenphosphat                                                           |
| KPS                              | Karnofsky Performance Status                                                       |
| LOX                              | Lipid-Oxygenase                                                                    |
| LPCAT3                           | Lysophosphatidylcholin-Acyltransferase 3                                           |
| M                                | Monat                                                                              |
| MGMT                             | O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase                                              |
| MRT                              | Magnetresonanztomographie                                                          |
| n                                | Patienten- und Patientinnen-Anzahl                                                 |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | Dinatriumhydroxyphosphat                                                           |
| NaCl                             | Natriumchlorid                                                                     |
| NaOH                             | Natronlauge                                                                        |
| NCOA4                            | Nukleärer Rezeptor Ko-Aktivator 4                                                  |
| OH <sup>·</sup>                  | Hydroxyl-Radikal                                                                   |
| OS                               | Gesamtüberleben/ Overall Survival                                                  |
| p                                | p-Wert                                                                             |
| PBS                              | Phosphatgepufferte Salzlösung                                                      |
| PDGFR                            | Wachstumsfaktor-Rezeptor aus Thrombozyten/ Platelet-derived Growth Factor Receptor |

|         |                                                                                     |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| PFS     | Progressionsfreies Überleben/ Progressionfree survival                              |
| PL      | Phospholipid                                                                        |
| PL●     | Phospholipid-Radikal                                                                |
| PLOH    | Phospholipid-Alkohol                                                                |
| PLOO●   | Phospholipid-Peroxyradikal                                                          |
| PLOOH   | Phospholipid-Hyperoxide                                                             |
| Primär  | Primärtumor                                                                         |
| PTGS2   | Prostaglandin-Synthase 2                                                            |
| PUFA    | Mehrfach ungesättigte Fettsäuren/ Polyunsaturated Fatty Acids                       |
| PUFA-PL | Phospholipid gebunden an mehrfach ungesättigte Fettsäure                            |
| RCD     | Regulierter Zelltod/ Regulated Cell Death                                           |
| ROS     | Sauerstoffradikal/ Reactive Oxygen Species                                          |
| RSL3    | RAS-selektiv letal 3                                                                |
| SSZ     | Sulfasalazin                                                                        |
| TCGA    | Krebs-Genom-Atlas/ The Cancer Genome Atlas                                          |
| TERT    | Telomerase-Reverse-Transkriptase                                                    |
| TfR1    | Transferrin-1-Rezeptors                                                             |
| TMZ     | Temozolomid                                                                         |
| TP53    | Tumorsuppressor 53                                                                  |
| TXNRD1  | Thioredoxin-Reduktase 1                                                             |
| VEGFR   | Vaskulär-endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor/ Vascular Endothelial Growth Factor |
| WHO     | Weltgesundheitsorganisation/ World Health Organisation                              |
| ZNS     | Zentrales Nervensystem                                                              |
| γ-GCS   | γ-Glutamat-Cystein-Ligase                                                           |

## Einheiten

|      |                                                                                                                                                 |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| °C   | Grad Celcius                                                                                                                                    |
| µg   | Mikrogramm                                                                                                                                      |
| µl   | Mikroliter                                                                                                                                      |
| µm   | Mikrometer                                                                                                                                      |
| µM   | Mikromolar                                                                                                                                      |
| cm   | Centimeter                                                                                                                                      |
| FPKM | Fragmenten pro Kilobasis des Transkripts pro Millionen abgebildeter Erfassungen / Fragment pro Kilobasis of Transcript pro Million mapped reads |
| g    | Gramm                                                                                                                                           |
| Gy   | Gray                                                                                                                                            |
| kDa  | Kilodalton                                                                                                                                      |
| mg   | Milligramm                                                                                                                                      |
| min  | Minute                                                                                                                                          |
| ml   | Milliliter                                                                                                                                      |
| mM   | Millimolar                                                                                                                                      |
| nm   | Nanometer                                                                                                                                       |
| pH   | pH-Wert                                                                                                                                         |

## 14. Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die zur Durchführung und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank gebührt meinem Betreuer Univ.-Prof. Dr. med. Jürgen Schlegel für die Möglichkeit der Durchführung dieser Studie und die hervorragende Betreuung. Seine kollegiale und wertschätzende Teamführung hat maßgeblich zu der ausgezeichneten Betreuung im Team beigetragen.

Zudem möchte ich meiner Mentorin, Priv.-Doz. Dr. med. Friederike Schmidt-Graf, meinen Dank aussprechen. Durch ihre interdisziplinären Anregungen verlieh sie dem Projekt stets neue Blickwinkel und Ansätze, was von unschätzbarem Wert war.

Des Weiteren möchte ich mich bei Priv.-Doz. Dr. med. Friederike Liesche-Starnecker bedanken. Zu jeder Zeit konnte ich mich mit Fragen bezüglich meiner Arbeit und des veröffentlichten Manuskripts an sie wenden und erhielt stets auf eine herzliche und motivierende Weise Rat.

Für die freundliche Aufnahme ins Team der Neuropathologie der Technischen Universität München und die geduldige Einarbeitung in die Laborarbeit möchte ich mich bei Sandra Baur und Christian Schustetter sowie bei Claudia Walter bedanken.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie, vor allem meiner Schwester Leonie, danken. Ohne ihre Unterstützung während des Studiums und der Dissertation, wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.