

Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar  
(Direktor: Professor Dr. med. M. D. Menger)

# Die Proteinkinase CK2: Ein neuer Regulator des Oberflächenproteins nerve/glial antigen (NG)2

---

**Dissertation**  
zur Erlangung des akademischen Grades  
einer Doktorin der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes  
2022

vorgelegt von  
Beate Maria Schmitt

*In tiefer Dankbarkeit gewidmet*

*Ruth & Sarah*

*In Erinnerung an meinen Vater*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>1</b> <b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b> <b>Summary</b> .....	<b>3</b>
<b>3</b> <b>Einleitung</b> .....	<b>5</b>
3.1        Das Proteoglykan <i>nerve/glial antigen (NG)2</i> .....	5
3.2        Die Proteinkinase CK2 .....	8
3.3        Zielsetzung .....	11
<b>4</b> <b>Material und Methoden</b> .....	<b>13</b>
4.1        Labormaterialien.....	13
4.2        Zellbiologische Techniken .....	13
4.2.1    Zellkultur und Zelllinien.....	13
4.2.2    CK2-Inhibitoren: CX-4945 und TBB.....	14
4.2.3    Analyse der Zellproliferation .....	14
4.2.3.1 <i>Water-soluble tetrazolium (WST)-1 assay</i> .....	14
4.2.3.2    Bromdesoxyuridin (BrdU) <i>assay</i> .....	14
4.2.3.3    Wachstumskurve .....	15
4.2.4    Zytotoxizitätstest.....	15
4.2.5    Inhibition der Proteinsynthese .....	15
4.2.6    Durchflusszytometrie .....	16
4.3        Molekularbiologische Techniken.....	17
4.3.1    Transfektion.....	17
4.3.1.1    CRISPR/Cas-Methode .....	17
4.3.1.1.1    Nachweis einer Deletion im CK2 $\alpha$ -Gen <i>CSNK2A1</i> .....	19
4.3.1.2    RNA-Interferenz (RNAi).....	19
4.3.1.3    Lipofektion.....	20
4.3.2    Genexpressionsanalysen .....	20
4.3.2.1    RNA Isolation .....	20
4.3.2.2    Reverse Transkription .....	21
4.3.2.3    qRT-PCR.....	21
4.3.3    Konstruktion von NG2 Reportergenvektoren .....	21
4.3.3.1.1    DNA-Extraktion.....	22
4.3.3.1.2    PCR .....	22
4.3.3.1.3    Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Extraktion.....	25
4.3.3.1.4    Restriktionsverdau.....	25
4.3.3.1.5    Ligation.....	25

4.3.3.2	Überprüfung der Klonierung .....	26
4.3.3.3	Transformation von <i>E. coli</i> .....	26
4.3.3.4	Reportergen-Analysen.....	26
4.4	Proteinbiochemische Techniken/Methoden .....	26
4.4.1	Proteinextraktion .....	26
4.4.2	<i>Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i> (SDS-PAGE) .....	27
4.4.3	Western Blot und Immundetektion.....	27
4.5	Analyse zellulärer Funktionen.....	29
4.5.1	Analyse der Zellmigration .....	29
4.5.1.1	<i>Scratch assay</i> .....	29
4.5.1.2	<i>Transmigration assay</i> .....	29
4.5.2	<i>Tube formation assay</i> .....	29
4.5.3	<i>Spheroid sprouting assay</i> .....	30
4.6	Versuchstiere .....	30
4.6.1	Genotypisierung .....	30
4.6.2	<i>Matrigel plug assay</i> .....	31
4.6.2.1	Immunhistochemie .....	32
4.6.3	<i>Aortic ring assay</i> .....	32
4.7	Statistik.....	33
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>34</b>
5.1	Die CK2 reguliert über NG2 angiogene Prozesse in Perizyten .....	34
5.1.1	Eine Inhibition der CK2 reduziert den NG2-Proteingehalt in primären humanen Perizyten.....	34
5.1.2	Eine Inhibition der CK2 reprimiert die Promotoraktivität von NG2 .....	38
5.1.3	Eine Inhibition der CK2 reduziert die Proliferation und Migration von primären humanen Perizyten.....	40
5.1.4	Eine Inhibition der CK2 reduziert die angiogene Aktivität von primären humanen Perizyten <i>in vitro</i> .....	42
5.1.5	Eine Inhibition der CK2 reduziert die angiogene Aktivität von primären humanen Perizyten <i>in vivo</i> .....	45
5.2	Die CK2 reguliert über NG2 die Proliferation und Migration von humanen GBM-Zellen .....	49
5.2.1	Eine Inhibition der CK2 verringert den Proteingehalt von NG2 in humanen GBM-Zellen .....	49

---

5.2.2	Eine Inhibition der CK2 reprimiert die Genexpression von NG2 in humanen GBM-Zellen .....	53
5.2.3	Eine Inhibition der CK2 reduziert die Proliferation und Migration von humanen GBM-Zellen .....	55
5.2.4	Die mRNA-Expression von NG2 und den CK2-Untereinheiten korreliert positiv in humanen GBMs .....	60
5.2.5	Eine Inhibition der CK2 reduziert den Proteingehalt von NG2 in primären humanen GBM-Zellen.....	61
5.3	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	63
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>64</b>
6.1	Die CK2 reguliert über NG2 angiogene Prozesse in Perizyten .....	64
6.2	Die CK2 reguliert über NG2 die Proliferation und Migration von humanen GBM-Zellen .....	68
6.3	Schlussfolgerung und Ausblick .....	71
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>73</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>84</b>
<b>9</b>	<b>Publikationen.....</b>	<b>86</b>
9.1	Originalarbeiten dieser Dissertation.....	86
9.2	Weitere Originalarbeiten.....	86
9.3	Übersichtsarbeiten.....	87
9.4	Zitierfähige Abstracts.....	87
9.5	Nicht zitierfähige Abstracts .....	88
<b>10</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>89</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	-	Aminosäure
ANOVA	-	<i>Analysis of variance</i>
ATP	-	Adenosintriphosphat
AU	-	<i>Arbitrary unit</i>
bFGF	-	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
bp	-	Basenpaare
BrdU	-	Bromdesoxyuridin
BSA	-	<i>Bovine serum albumin</i>
cAMP	-	<i>Cyclic adenosinmonophosphate</i>
CBP	-	<i>CREB-binding protein</i>
CD	-	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	-	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i>
C/EBP	-	<i>CCAAT/enhancer-binding-protein</i>
ChIP	-	<i>Chromatin immunoprecipitation</i>
CHX	-	Cycloheximid
CO <sub>2</sub>	-	Kohlenstoffdioxid
CREB	-	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CRISPR	-	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
CSPG	-	Chondroitinsulfat-Proteoglykan
D	-	Asparaginsäure
DMEM	-	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	-	Dimethylsulfoxid
DNA	-	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
E	-	Glutamin
ECL	-	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	-	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	-	Ethylendiamintetraacetat
Egr	-	<i>Early growth response</i>
ERK	-	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
EZM	-	Extrazelluläre Matrix
FACS	-	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FAK	-	<i>Focal adhesion kinase</i>
FITC	-	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	-	Fetales Kälberserum
fw	-	<i>forward</i>

---

FOXO	-	<i>Forkhead box</i>
GAG	-	Glykosaminoglykan
GBM	-	Glioblastoma multiforme
GFP	-	<i>Green fluorescent protein</i>
gRNA	-	<i>Guide RNA</i>
GTP	-	Guanosintriphosphat
HEK	-	<i>Human embryonic kidney</i>
HMW-MAA	-	<i>High molecular weight-melanoma associated antigen</i>
HPF	-	<i>High power field</i>
HRP	-	<i>Horseradish peroxidase</i>
HUVEC	-	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
H <sub>2</sub> O	-	Wasser
JAK	-	Januskinase
KD	-	<i>Knockdown</i>
kDa	-	Kilodalton
KG	-	Körpergewicht
KO	-	<i>Knockout</i>
Kt	-	Kontrolle
LDH	-	Laktat-Dehydrogenase
LV	-	Leervektor
MAPK	-	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCSP	-	<i>Melanoma cell surface proteoglycan</i>
MFI	-	<i>Mean fluorescence intensity</i>
MW	-	Mittelwert
NFκB	-	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NG	-	<i>Nerve/glial antigen</i>
NHDF	-	<i>Normal human dermal fibroblasts</i>
NHEJ	-	<i>Non-homologous end joining</i>
OPZ	-	Oligodendrozyten-Progenitorzellen
p	-	phosphoryliert
pAkt	-	Phospho-Akt
Pax	-	<i>Paired box</i>
PBS	-	<i>Phosphat-buffered saline</i>
PDGF	-	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PDZ	-	<i>postsynaptic density 95/discs large/zonula-occludens-1</i>
PFA	-	Paraformaldehyd

---

PI3K	-	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PMSF	-	Phenylmethylsulfonylfluorid
P/S	-	Penicillin/Streptomycin
PVDF	-	Polyvinylidendifluorid
qRT-PCR	-	<i>Quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
rv	-	<i>reverse</i>
RLU	-	<i>Relative luminescence units</i>
RNA	-	<i>Ribonucleic acid</i>
RNAi	-	RNA Interferenz
rpm	-	<i>Rounds per minute</i>
RPMI	-	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	-	Raumtemperatur
S	-	Serin
SD	-	<i>Standard deviation</i>
SDS-PAGE	-	<i>Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
siRNA	-	<i>Small interfering RNA</i>
Sp	-	<i>Specificity protein</i>
SSC	-	<i>Side scatter</i>
STAT	-	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
T	-	Threonin
TBB	-	4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol
TBST	-	<i>Tris-buffered saline + Tween20</i>
TGF	-	<i>Transforming growth factor</i>
TNF	-	<i>Tumor necrosis factor</i>
U	-	<i>Unit</i>
VEGF	-	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WHO	-	<i>World health organization</i>
Wnt	-	<i>Wingless/integrated</i>
WST	-	<i>Water-soluble tetrazolium</i>

# 1 Zusammenfassung

Das Proteoglykan *nerve/glia antigen* (NG)2 wird unter physiologischen Bedingungen unter anderem von Perizyten exprimiert und ist maßgeblich an angiogenen Prozessen beteiligt. Unter pathologischen Bedingungen exprimieren auch einige Subpopulationen von Tumoren, wie das Glioblastoma multiforme (GBM), dieses Proteoglykan, wodurch deren Proliferations- und Migrationsfähigkeit deutlich erhöht ist. Daher ist NG2 ein vielversprechendes Target für neue anti-angiogene und anti-kancerogene Therapieansätze. Allerdings sind die molekularen Regulationsmechanismen der NG2-Expression bislang weitestgehend unbekannt.

Perizyten zählen zu den perivaskulären Zellen, welche in die Basalmembran des Gefäßendothels eingebettet sind und durch ihren direkten Kontakt mit Endothelzellen die Angiogenese regulieren. Weiterhin ist bekannt, dass das Oberflächenprotein NG2 sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen eine pro-angiogene Wirkung hat und der Verlust von NG2 in Perizyten die Angiogenese hemmt. In Endothelzellen konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass die Proteinkinase CK2 angiogene Signalwege reguliert und CK2-Inhibitoren eine anti-angiogene Wirkung ausüben. Daher wurde im 1. Teil der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die CK2 auch einen Einfluss auf den NG2-Proteingehalt und die angiogene Aktivität von Perizyten hat. Dazu wurden primäre humane Perizyten mit den CK2-Inhibitoren TBB und CX-4945 sowie siRNAs gegen die katalytische CK2 $\alpha$ - und CK2 $\alpha'$ -Untereinheit behandelt und der Proteingehalt sowie die Genexpression von NG2 detektiert. Zudem wurde die putative NG2-Promotorregion und der Effekt einer CK2-Inhibition auf deren transkriptionelle Aktivität mittels Reporter- und *in silico*-Analysen untersucht. Abschließend wurden die Auswirkungen einer CK2-Inhibition auf die angiogene Aktivität von Perizyten *in vitro* mittels *scratch*, *sprouting*, *transmigration* und *tube formation assay* sowie *ex vivo* mittels *aortic ring assay* und *in vivo* mittels *matrigel plug assay* analysiert. Sowohl eine Inhibition als auch ein *knockdown* (KD) der CK2 in Perizyten reduzierten den Proteingehalt von NG2 signifikant. Durch die Analysen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die CK2 die Genexpression von NG2 reguliert und in der NG2-Promotorregion Bindestellen von CK2-abhängigen Transkriptionsfaktoren lokalisiert sind. Sowohl *in vitro*, *ex vivo* als auch *in vivo* konnte in Folge der Reduktion des NG2-Proteingehalts nach CK2-Inhibition eine signifikante Reduktion von angiogenen Prozessen beobachtet werden. Folglich konnte die CK2 als neuer Regulator der NG2-Expression und der angiogenen Aktivität von Perizyten identifiziert werden. Im 2. Teil der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob eine CK2-Inhibition auch in humanen GBM-Zellen die NG2-Expression reduziert. Dazu wurden die beiden humanen GBM-Zelllinien A1207 und U87 mit CX-4945 behandelt sowie zusätzlich mittels CRISPR/Cas-Methode ein CK2 $\alpha$ -*knockout* (KO) generiert und der Proteingehalt und die Genexpression von NG2 detektiert. Zudem wurde der Effekt einer CK2-Inhibition auf die transkriptionelle Aktivität der

putativen NG2-Promotorregion mittels Reporter-gen-Analysen untersucht. An Hand von *scratch* und *transmigration assay* wurde der Effekt einer CK2-Inhibition auf die Proliferations- und Migrationsfähigkeit der Zellen untersucht. Mit Hilfe der Plattform cBioPortal wurde *in silico* die Expression von NG2 und den CK2-Untereinheiten in Patientenproben aus Gliomen und GBMs analysiert. Abschließend wurden primäre Zellen aus humanen GBM-Tumoren mit dem CK2-Inhibitor CX-4945 behandelt und der NG2-Proteingehalt untersucht.

Eine Inhibition und ein KO der CK2 in humanen GBM-Zellen reduzierten den Proteingehalt von NG2 signifikant. Es konnte auch für GBM-Zellen nachgewiesen werden, dass die CK2 über einen genregulatorischen Mechanismus NG2 reguliert. Zudem war die Proliferation und Migration in Folge eines reduzierten NG2-Proteingehalts nach CK2-Inhibition signifikant reduziert. Die Expression von NG2 und den CK2-Untereinheiten waren in GBMs im Vergleich zu anderen Gliomen signifikant erhöht. Darüber hinaus wiesen die *in silico*-Analysen auch auf einen den genregulatorischen Mechanismus zwischen CK2 und NG2 hin. Abschließende Experimente mit Patientenproben bestätigten die Zelllinien-basierten Ergebnisse. Daher kann geschlossen werden, dass die CK2 auch in GBM-Zellen ein wichtiger Regulator der NG2-Expression und der assoziierten Prozesse, wie Migration und Proliferation ist.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass NG2 ein nachgeordnetes Signalmolekül der CK2 ist. Daher könnte der in klinischen Phase I und II Studien befindliche CK2-Inhibitor CX-4945 besonders in NG2-positiven Tumoren, wie dem GBM, auf Grund seiner anti-angiogenen Wirkung im vaskulären Kompartiment und der anti-karzinogenen Wirkung im Tumorkompartiment einen vielversprechenden Therapieansatz darstellen.

## 2 Summary

### **Protein kinase CK2: A new regulator of the surface protein nerve/glia antigen (NG2)**

The proteoglycan NG2 is expressed under physiological conditions by pericytes, among others, and is significantly involved in angiogenic processes. Under pathological conditions, some subpopulations of tumors, such as glioblastoma multiforme (GBM), also express this proteoglycan, significantly increasing their proliferation and migration capacity. Thus, NG2 is a promising target for novel anti-angiogenic and anti-carcinogenic therapeutic approaches. So far, the molecular regulatory mechanisms of NG2 expression are largely unknown.

Pericytes are perivascular cells that are embedded in the basement membrane of the vascular endothelium and regulate angiogenesis through direct contact with endothelial cells. Furthermore, the surface protein NG2 is known to have a pro-angiogenic effect under both physiological and pathological conditions, whereas loss of NG2 in pericytes inhibits angiogenesis. In endothelial cells, the protein kinase CK2 is known to regulate angiogenic signaling pathways, and CK2 inhibitors exert an anti-angiogenic effect. Therefore, in a first part of this thesis, it was investigated whether CK2 also has an effect on NG2 protein levels and the angiogenic activity of pericytes. For this purpose, primary human pericytes were treated with the CK2 inhibitors TBB and CX-4945 and siRNAs against the CK2 $\alpha$  and CK2 $\alpha'$  catalytic subunit, and protein levels as well as gene expression were analyzed. In addition, the putative NG2 promoter region and the effect of CK2 inhibition on its transcriptional activity were examined by reporter gene and *in silico* analyses. Finally, the effects of CK2 inhibition on angiogenic activity of pericytes were analyzed *in vitro* by scratch, sprouting, transmigration, and tube formation assays as well as *ex vivo* by aortic ring assays and *in vivo* by matrigel plug assays. Both inhibition and knockdown (KD) of CK2 in pericytes significantly reduced the protein level of NG2. It was further demonstrated that CK2 regulates NG2 gene expression and that binding sites of CK2-dependent transcription factors are localized in the NG2 promoter region. *In vitro*, *ex vivo* and *in vivo*, a significant reduction of angiogenic processes was observed as a consequence of the reduction of the NG2 protein level after CK2 inhibition. Consequently, CK2 was identified as a novel regulator of NG2 expression and angiogenic activity of pericytes.

In a second part of this thesis, it was investigated whether CK2 inhibition also reduces NG2 expression in human GBM cells. For this purpose, the human GBM cell lines A1207 and U87 were treated with CX-4945 and, in addition, a CK2 $\alpha$ -knockout (KO) was generated by CRISPR/Cas method and the protein level and gene expression of NG2 were analyzed. Moreover, the effect of CK2 inhibition on the transcriptional activity of the putative NG2

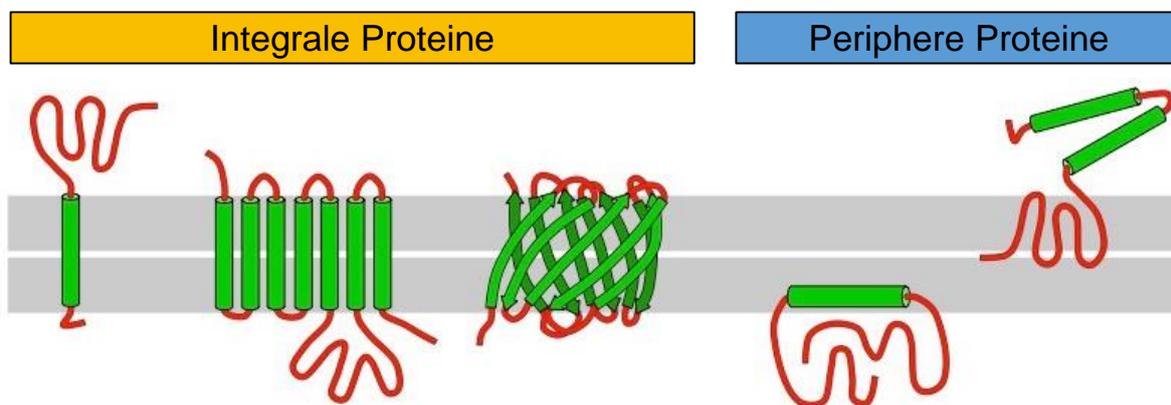
promoter region was investigated by reporter gene analyses. Using scratch and transmigration assays, the effect of CK2 inhibition on cell proliferation and migration was investigated. The cBioPortal platform was used to analyze *in silico* the expression of NG2 and the CK2 subunits in patient samples from gliomas and GBMs. Finally, primary cells from human GBM tumors were treated with the CK2 inhibitor CX-4945 and NG2 protein levels were examined.

Inhibition and KO of CK2 in human GBM cells significantly reduced the protein level of NG2. It was also demonstrated for GBM cells that CK2 regulates NG2 via a gene regulatory mechanism. Moreover, proliferation and migration were significantly decreased as a result of the reduced NG2 protein level after CK2 inhibition. The expression of NG2 and the CK2 subunits were significantly increased in GBMs compared with other gliomas. Moreover, *in silico* analyses indicated a gene regulatory mechanism between CK2 and NG2. Final experiments with patient samples confirmed the cell line-based results. Therefore, it can be concluded that CK2 is also an important regulator of NG2 expression and associated processes, such as migration and proliferation, in GBM cells.

In summary, it could be demonstrated in the present thesis that NG2 is a downstream signaling molecule of CK2. Thus, the CK2 inhibitor CX-4945, which is in phase I and II clinical trials, may represent a promising therapeutic approach, particularly in NG2-positive tumors, such as GBM, due to its anti-angiogenic effect in the vascular compartment and anti-carcinogenic effect in the tumor compartment.

### 3 Einleitung

Eine eukaryotische Zelle muss ihr Expressionsmuster kontinuierlich an die bestehenden extrazellulären Gegebenheiten anpassen. Dafür benötigt die Zelle spezifische, auf der Plasmamembran lokalisierte Proteine. Einige dieser sogenannten Oberflächenproteine können physikalische oder chemische Stimuli wahrnehmen, andere wiederum interagieren mit benachbarten Oberflächenproteinen oder mit Proteinen der extrazellulären Matrix (EZM). Basierend auf der Assoziation mit der Plasmamembran kann zwischen peripheren Membranproteinen, die in der Membran verankert sind, und integralen Membranproteinen, welche die Lipiddoppelschicht durchdringen, unterschieden werden (Abbildung 1). Letztere werden auch als Transmembranproteine bezeichnet und können beispielsweise als Rezeptoren, Transporter und Zelladhäsionsmoleküle fungieren [1-4].



**Abbildung 1: Schematische Darstellung von Oberflächenproteinen.** Grundlegend können Oberflächenproteine an Hand ihrer Assoziation mit der Zellmembran in 2 unterschiedliche Gruppen unterteilt werden: Integrale Proteine, die mindestens eine Transmembrandomäne besitzen und die Lipiddoppelschicht durchdringen (orange), und periphere Proteine, die lediglich in der Membran verankert sind (blau). Modifiziert nach Cornell [5].

#### 3.1 Das Proteoglykan *nerve/glia antigen* (NG)2

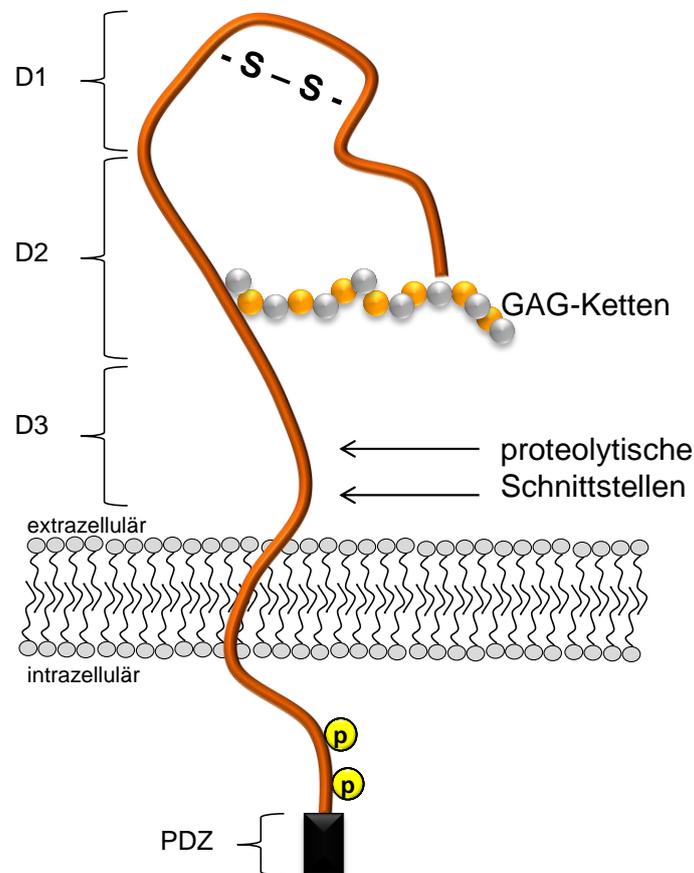
In den frühen 1980er Jahren wurde ein neues Oberflächenprotein auf humanen Melanomzellen entdeckt [6-8], welches daher als *melanoma cell surface proteoglycan* (MCSP) oder *high molecular weight-melanoma associated antigen* (HMW-MAA) bekannt wurde [9]. Es handelt sich um ein Proteoglykan mit einer Transmembrandomäne [10], das auf Grund seiner Chondroitinsulfat-Seitenkette in die Gruppe der Chondroitinsulfat-Proteoglykane (CSPG) eingeordnet wird [11]. Phylogenetische Analysen ergaben zahlreiche Orthologe des kodierenden humanen Gens *CSPG4* in anderen Spezies, wie beispielsweise *AN2* in der Maus oder *NG2* in der Ratte [11,12]. Die Nomenklatur dieses Transmembranproteins ist in der Literatur bis heute nicht einheitlich. Basierend auf dem von Stallcup et al. [7] entdeckten Protein auf Gliazellen in Rattengehirnen wird das Proteoglykan häufig und entsprechend auch

in der vorliegenden Arbeit als NG2 bezeichnet [13]. Das NG2-Kernprotein (*Abbildung 2*) ist etwa 300 Kilodalton (kDa) groß, wobei posttranslationale Glykosylierungen in Form von Glykosaminoglykan-Ketten das Molekulargewicht auf bis zu 500 kDa erhöhen können [13-15]. Der intrazelluläre C-terminale Bereich beinhaltet nicht nur einige Bindungsdomänen, wie das *postsynaptic density 95/discs large/zonula-occludens-1* (PDZ) Motiv, welches an der Signaltransduktion beteiligt ist, sondern auch Phosphorylierungsstellen, die proliferative und migratorische Prozesse regulieren [16]. Der extrazelluläre Teil stellt den größten Bereich des Proteins dar und wird in 3 unterschiedliche Domänen unterteilt. Domäne 1 hat eine hohe Affinität, Disulfidbrücken auszubilden, Domäne 2 wird in der Regel posttranslational glykosyliert und in Domäne 3 befinden sich 2 proteolytische Schnittstellen. Die Interaktion der extrazellulären Domäne sowohl mit Proteinen der EZM als auch mit verschiedenen benachbarten Oberflächenproteinen, wie Integrin  $\beta$ -1, induziert eine Vielzahl von Signalwegen [17-20].

NG2 wird nicht ubiquitär exprimiert und kann daher unter physiologischen Bedingungen als Markerprotein für bestimmte Zellen, wie NG2-Gliazellen, Oligodendrozyten-Progenitorzellen (OPZ) und Perizyten, verwendet werden [21]. Letztere zählen zusammen mit glatten Muskelzellen und Fibroblasten zu den perivaskulären Zellen, die das Gefäßendothel umgeben und maßgeblich an der Aufrechterhaltung und Funktionalität der Blutgefäße beteiligt sind [22-24]. Perizyten sind in die Basalmembran von Arteriolen, Kapillaren und Venolen eingebettet und regulieren dort mitunter den Gefäßdurchmesser und die Gefäßpermeabilität. Sie stehen in direktem Kontakt zu den Endothelzellen und besitzen somit auch eine übergeordnete Rolle bei der Angiogenese [25]. So wandern Perizyten in Folge von wachstumsfördernden Stimuli von Mikrogefäßen ab und initiieren durch parakrine Mechanismen angiogene Prozesse [25,26]. Sie fördern beispielsweise die Proliferation von Endothelzellen durch die Sekretion des *platelet-derived growth factor* (PDGF) und des *transforming growth factor* (TGF)- $\beta$  [27-30]. Interessanterweise ist NG2 auch an der Regulation von angiogenen Prozessen beteiligt. Studien zeigten, dass NG2 an Kollagen V und VI der EZM bindet und dadurch die Angiogenese begünstigt [17-19]. Zudem interagiert das Proteoglykan mit Integrin  $\beta$ -1 auf Endothelzellen, was für die Aufrechterhaltung der endothelialen Barriere essenziell ist [31-35].

Mehrere Studien untersuchten die Expression von NG2 unter pathologischen Bedingungen und konnten zeigen, dass verschiedene Tumorentitäten, wie das Melanom oder das Glioblastoma multiforme (GBM), NG2 exprimieren [36-38]. Das GBM ist der häufigste primäre Hirntumor bei Erwachsenen mit einer Inzidenz von ~3 Neuerkrankungen pro 100.000 Personen jährlich. Die mittlere Lebenserwartung beträgt ~15 Monate und die 1-Jahres-Überlebensrate ist unter 25 %. Bei ~90 % der GBMs handelt es sich um primäre Astrozytome mit der *world health organization* (WHO)-Einstufung Grad IV, die sich *de novo* ausbilden [39-

41]. Lediglich 10 % sind sekundäre GBMs, die sich durch Progression aus Gliomen mit WHO Grad II oder III, wie einem anaplastischen Oligodendrogliom oder Astrozytom, entwickeln.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung des Proteoglykans NG2.** Der extrazelluläre, N-terminale Bereich wird in 3 Domänen unterteilt. In Domäne 1 (D1) sind 2 Disulfidbrücken lokalisiert, die zur Tertiärstruktur beitragen. In Folge von multiplen Glykosylierungen finden sich in Domäne 2 (D2) Glykosaminoglykan (GAG)-Ketten. In Domäne 3 (D3) sind 2 proteolytische Schnittstellen lokalisiert. Der intrazelluläre C-terminale Bereich des Typ-1 Transmembranproteins beinhaltet 2 Threonine, deren Phosphorylierungsstatus über die Initiation von Zellproliferation und -migration entscheidet. Zudem sind im C-Terminus Bindedomänen, wie das PDZ-Motiv lokalisiert, die cytoplasmatische Proteine binden können und somit die intrazelluläre Signalwegweiterleitung vermitteln.

Histologisch lässt sich ein primäres GBM bisher noch nicht von einem sekundären GBM unterscheiden. Allerdings konnten Abweichungen zwischen den Genotypen der beiden GBM-Subgruppen identifiziert werden. So ist beispielsweise eine Mutation des Gens *isocitrat dehydrogenase (IDH)1* an der Stelle Arginin132 typisch für sekundäre GBMs, während primäre GBMs in der Regel keine Mutation aufweisen [42-44]. Charakteristisch für alle GBMs sind die unkontrollierte Zellproliferation, lokale Infiltration, hohe genomische Instabilität, Tendenz zur Nekrose, gesteigerte Angiogenese und Chemoresistenz [45]. Zudem zeichnen sich GBMs durch eine außergewöhnlich heterogene Zellpopulation aus [40,44-47]. So sind nicht alle Tumorzellen positiv für NG2, sondern lediglich eine Subpopulation ist in der Lage, das Proteoglykan zu exprimieren [48]. Diese NG2-positive Subpopulation besitzt ein besonders

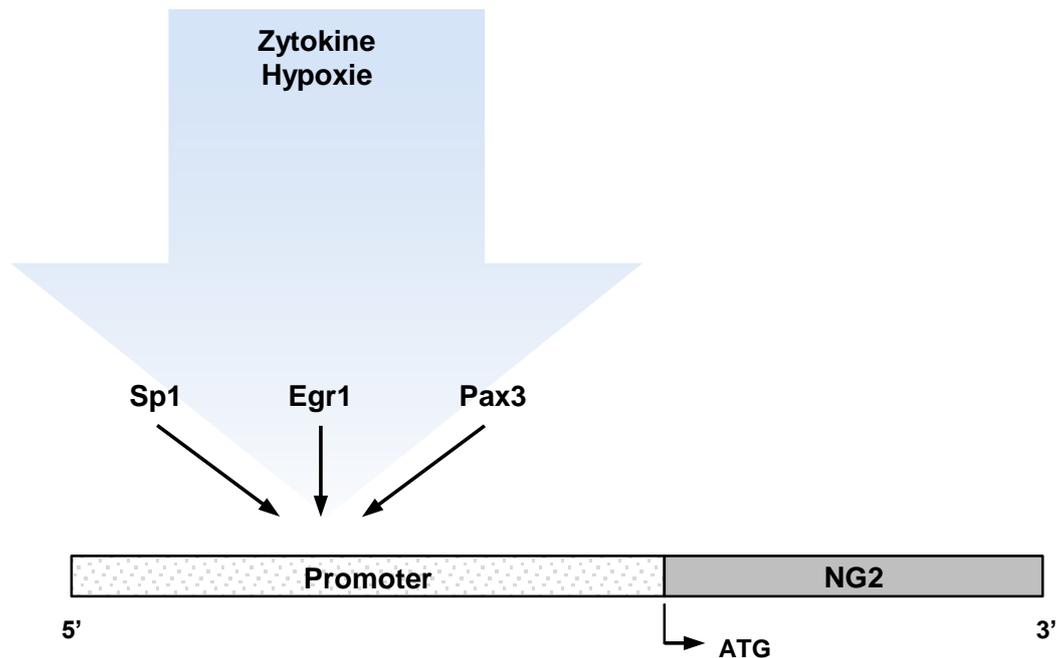
hohes Potential zu proliferieren und zu migrieren, weshalb GBMs mit einem hohen Anteil an NG2-positiven Zellen mit einer schlechten Prognose assoziiert sind [36-38,48]. Dies wird vor allem durch NG2-abhängige und wachstumsfördernde Signalwege hervorgerufen. So stimuliert das Proteoglykan beispielsweise die Aktivität der *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), der *extracellular signal-regulated kinase* (ERK)1/2 und *focal adhesion kinase* (FAK) [28,34,39,49-52]. Daher wird gegenwärtig verstärkt daran geforscht, NG2 nicht nur als therapeutisches Zielmolekül für die Behandlung von NG2-positiven GBMs zu nutzen, sondern auch die Expression von NG2 selbst zu inhibieren [53,54]. Allerdings sind die molekularen Regulationsmechanismen der humanen NG2-Expression weitestgehend unbekannt. Bislang konnten lediglich einige wenige Faktoren identifiziert werden, die Einfluss auf den zellulären NG2-Gehalt nehmen (*Abbildung 3*). So steigern beispielsweise Hypoxie oder Zytokine, wie *tumor necrosis factor* (TNF)- $\alpha$  und TGF- $\beta$ , die Expression von NG2 [55]. Auf genregulatorischer Ebene konnten Transkriptionsfaktoren wie *early growth response* (Egr)1, *paired box* (Pax)3 und *specificity protein* (Sp)1 bestimmt werden, welche die Genexpression des Proteoglykans beeinflussen [56].

Sp1 ist in eine Vielzahl von zellulären Prozessen involviert, wie Proliferation, Apoptose und Angiogenese [57]. In zahlreichen Tumoren wird Sp1 überexprimiert und geht mit einem invasiven Phänotyp und einer gesteigerten Metastasierung einher [58]. Interessanterweise zeigen auch Gliome eine erhöhte Sp1-Expression, die mit steigendem WHO-Schweregrad signifikant zunimmt [59]. Die Aktivität von Sp1 wird hauptsächlich durch posttranslationale Modifikationen, wie Glykosylierungen oder Phosphorylierungen reguliert, welche die *deoxyribonucleic acid* (DNA)-Bindungskapazität von Sp1 sowohl erhöhen als auch reduzieren können [60-63]. Es sind bereits mehrere Kinasen bekannt, die den Transkriptionsfaktor phosphorylieren und dadurch das Expressionsmuster verändern [64]. Hierzu zählt auch die konstitutiv aktive und ubiquitär exprimierte Serin/Threonin-selektive Proteinkinase CK2 [65].

### 3.2 Die Proteinkinase CK2

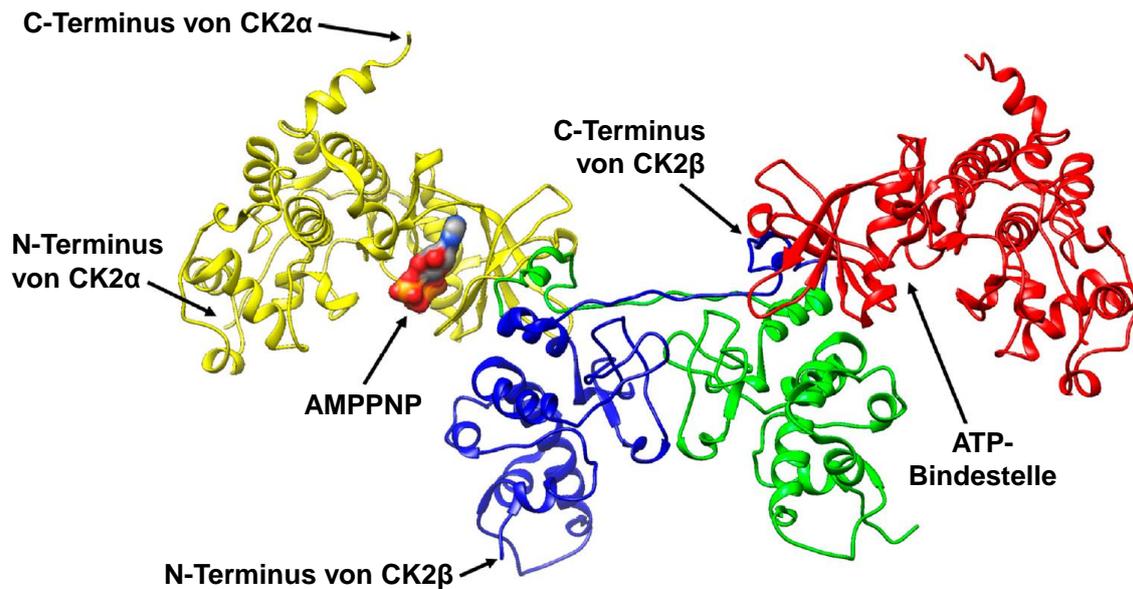
Die CK2 phosphoryliert eine minimale Konsensus-Sequenz, bestehend aus der Aminosäure Serin (S) oder Threonin (T) gefolgt von 2 weiteren beliebigen Aminosäuren (X) und Glutamin-(E), Asparaginsäure (D) oder einem phosphorylierten (p) Serin (S/T-XX-E/D/pS) [66]. Das Holoenzym (*Abbildung 4*) besteht aus je 2 katalytischen CK2 $\alpha$ - oder CK2 $\alpha'$ -Untereinheiten, die über ein Dimer aus 2 regulatorischen CK2 $\beta$ -Untereinheiten interagieren. Das Heterotetramer kann sich auf verschiedene Arten zusammensetzen:  $\alpha\beta_2$ ,  $\alpha'2\beta_2$  oder  $\alpha\alpha'\beta_2$  [46,67]. Die katalytischen Untereinheiten können auch in ihrer monomeren Form Proteine phosphorylieren und unabhängig voneinander spezifische Funktionen ausüben, während die CK2 $\beta$ -Untereinheiten das Holoenzym stabilisieren und dessen Substratspezifität beeinflussen [67-

70]. In der Embryogenese übt die CK2 essentielle Funktionen aus. Entsprechend ist sowohl eine Deletion von CK2 $\alpha$  als auch von CK2 $\beta$  in Mäusen embryonal letal, wohingegen eine Deletion von CK2 $\alpha'$  zu lebensfähigen aber infertilen männlichen Mäusen führt [71].



**Abbildung 3: Regulatorische Faktoren der humanen NG2-Expression.** Der Proteingehalt von NG2 nimmt sowohl durch Zytokine als auch durch hypoxische Bedingungen zu. Die Transkriptionsfaktoren Sp1, Egr1 und Pax3 binden an den humanen NG2-Promotor und beeinflussen dessen Genexpression. Modifiziert nach Ampofo et al. [55].

Aus bioinformatischen Analysen geht hervor, dass die CK2 über 500 putative Substrate besitzt, wovon ~300 Substrate bislang experimentell bestätigt werden konnten [72,73]. Damit ist die CK2 für ~10 % des humanen Phosphoproteoms verantwortlich. Hierunter befinden sich neben Strukturproteinen und Membranproteinen auch eine große Zahl von Transkriptionsfaktoren, wie *cAMP response element-binding protein* (CREB), p65, *signal transducer and activator of transcription* (STAT)3 und das zuvor erwähnte Sp1 [60,66,67,74-77]. Basierend auf diesem überaus großen Substratspektrum wird ersichtlich, dass die CK2 an zahlreichen biologischen Vorgängen beteiligt ist. So ist sie zum Beispiel in Signalwege wie *wingless/integrated* (Wnt), *hedgehog*, Januskinase (JAK)/STAT, Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/AKT oder *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF $\kappa$ B) involviert und fördert so die Proliferation und Migration von Zellen und wirkt gleichzeitig der Apoptose entgegen [39,46,65,76,79-87]. Die Hyperaktivität der Kinase führt zu einer Dysregulation von diversen Signalkaskaden und ist daher mit einer Vielzahl von Erkrankungen assoziiert. Zudem zeichnen sich zahlreiche Tumorentitäten durch eine erhöhte CK2-Aktivität aus [46,80,81,88]. Beispielsweise konnte in GBM-Zellen eine *gain in gene mutation* von CK2 $\alpha$  auf dem Chromosom 20 nachgewiesen werden [89].



**Abbildung 4: Bändermodell des CK2-Holoenzym.** Gezeigt ist die CK2 als heterotetrameres Molekül, bestehend aus 2 katalytischen  $\alpha$ -Untereinheiten (gelb und rot) und 2 regulatorischen  $\beta$ -Untereinheiten (blau und grün). Die regulatorischen Untereinheiten bilden ein Dimer und jede  $\beta$ -Untereinheit bindet jeweils eine katalytische  $\alpha$ -Untereinheit. Das nicht-hydrolysierbare Adenosin-5'-( $\beta,\gamma$ -imido)triphosphat (AMPPNP) ist in der ATP-Bindestelle einer katalytischen CK2 $\alpha$ -Untereinheit gebunden. Modifiziert nach Nienberg et al. [78].

Es ist daher nicht verwunderlich, dass die Inhibition der Kinase in Tumorzellen die Apoptose fördert und der Proliferation und Migration entgegenwirkt [90-92]. Darüber hinaus ist die CK2 auch in den Prozess der Angiogenese involviert [85]. So reguliert die Kinase *vascular endothelial growth factor* (VEGF)-induzierte Signalwege wie PI3K/AKT und MAPK/ERK, die von Tumorzellen aktiviert werden, um das Einwachsen von neuen Mikrogefäßen in Tumoren zu initiieren. Die Inhibition der CK2 reprimiert daher auch die Tumorangiogenese [80,92-94]. Letzteres wird durch eine reduzierte Aktivität von angiogenen Signalwegen in Endothelzellen hervorgerufen [79,95].

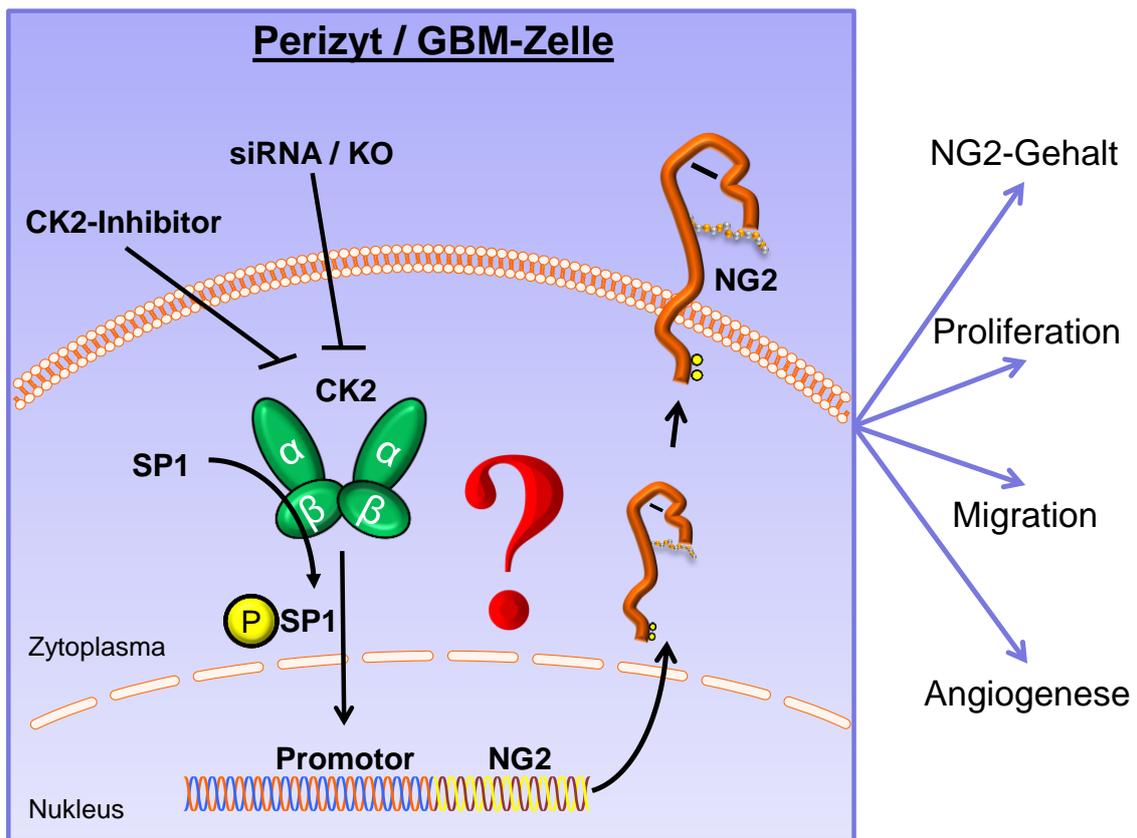
Während der letzten 20 Jahre wurden vielversprechende Hemmstoffe gegen die CK2 identifiziert und synthetisiert. Darunter befinden sich auch die beiden kompetitiven Inhibitoren 4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol (TBB) und CX-4945, welche die Adenosin-5'-( $\beta,\gamma$ -imido)triphosphat (ATP)- oder Guanosin-5'-( $\beta,\gamma$ -imido)triphosphat (GTP)-Bindestellen der katalytischen CK2 $\alpha$ - und CK2 $\alpha'$ -Untereinheiten blockieren [79,96]. CX-4945 besitzt mit 0,38 nM einen deutlich niedrigen  $K_i$ -Wert als TBB (0,4  $\mu$ M) und damit eine bessere Effektivität [97]. Zudem zeichnet sich CX-4945 durch eine gute Bioverfügbarkeit aus, weshalb sich dieser kompetitive Inhibitor als orales Medikament aktuell in klinischen Phase 1 und 2 Studien befindet (NCT01199718, NCT02128282, NCT03897036, NCT03904862) [90,98]. Neben CX-4945 wird lediglich noch ein weiterer CK2-Inhibitor in klinischen Studien getestet. Dabei handelt es sich um CIGB-300, ein synthetisches Peptid, das intravenös oder intratumoral injiziert wird (NCT01639625, NCT01639638) [99].

### 3.3 Zielsetzung

Das Proteoglykan NG2 ist maßgeblich an der Regulation der angiogenen Aktivität von Perizyten beteiligt. Weiterhin zeichnen sich NG2-positive Tumore durch einen stark proliferativen und hoch-invasiven Phänotyp aus. Daher wird gegenwärtig daran geforscht, NG2 als Target für anti-angiogene und anti-kanzerogene Therapiestrategien nutzen zu können. Allerdings ist über den molekularen Mechanismus der NG2-Expression bislang nur wenig bekannt. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor Sp1, ein Substrat der CK2, an der Genexpression von NG2 beteiligt ist. Die anti-angiogenen und anti-kanzerogenen Effekte einer CK2-Inhibition sind bereits gut untersucht und beschrieben. Jedoch lag bei den bisherigen Studien der Fokus weder auf perivaskulären Zellen, noch auf NG2-positiven Tumor-Zellen. Daher war es das Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, ob eine CK2-Inhibition eine geeignete Strategie zur Reduktion von NG2 in humanen primären Perizyten und in humanen GBM-Zellen darstellt.

Im 1. Teil dieser Arbeit wurden humane primäre Perizyten mit 2 unterschiedlichen CK2-Inhibitoren oder siRNA gegen CK2 behandelt. Für den 2. Teil dieser Arbeit wurden humane GBM-Zellen mit dem in klinischen Studien eingesetzten CK2-Inhibitor CX-4945 behandelt. Zusätzlich wurden humane CK2 $\alpha$ -*knockout* (KO)-GBM-Zellen mit Hilfe der *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR)/Cas-Methode generiert. Wie in *Abbildung 5* dargestellt, wurden an den Perizyten und GBM-Zellen die folgenden Fragestellungen bearbeitet:

- ❖ Reduziert eine CK2-Inhibition den Proteingehalt und die Genexpression von NG2?
- ❖ Reguliert die CK2 die Genexpression von NG2 über den Transkriptionsfaktor SP1?
- ❖ Reduziert eine CK2-Inhibition über NG2 die Proliferations- und Migrationsfähigkeit sowie die angiogene Aktivität von Perizyten?
- ❖ Reduziert eine CK2-Inhibition über NG2 die Proliferations- und Migrationsfähigkeit von GBM-Zellen?



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der in der vorliegenden Arbeit bearbeiteten Fragestellungen.** In Perizyten wird die CK2 mittels Inhibitoren und small interfering (si)RNA gehemmt. In GBM-Zellen wird die CK2 mit Hilfe eines Inhibitors gehemmt und mittels der CRISPR/Cas-Methode ein CK2 $\alpha$ -knockout (KO) generiert. Anschließend wird der Proteingehalt und die Genexpression von NG2 (NG2-Gehalt), die Proliferations- und Migrationsfähigkeit der Zellen sowie deren angiogenes Potential analysiert. Zudem wird der Effekt einer CK2-Inhibition auf die transkriptionelle Aktivität des humanen NG2-Promotors untersucht.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Labormaterialien

Für diese Arbeit wurden Plastik- und Glaswaren von der BD GmbH (Heidelberg, Deutschland), Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland), Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) und der Schott AG (Mitterteich, Deutschland) sowie von Corning Incorporated (Kennebunk, USA) bezogen.

Die benötigten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, bei Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roche (Mannheim, Deutschland), Sigma-Aldrich (München, Deutschland) sowie VWR (Darmstadt, Deutschland) gekauft. Für das Ansetzen von Pufferlösungen wurde steriles und pyrogenfreies Wasser (Ampuwa, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) verwendet.

### 4.2 Zellbiologische Techniken

#### 4.2.1 Zellkultur und Zelllinien

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Das Kultivieren der verwendeten Zelllinien und der primären Zellen erfolgte bei 37 °C, 5 % Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80 % im Verhältnis 1:3 passagiert. Für humane Perizyten aus dem Plazentagewebe, humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (*human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC)) und humane Fibroblasten (*normal human dermal fibroblasts* (NHDF)) von PromoCell (Heidelberg, Deutschland) wurde das vom Hersteller empfohlene Medium mit dem Zusatz von 1 % Penicillin (100 *units* (U)/ml) sowie 1 % Streptomycin (100 µg/ml) verwendet. Die Kultivierung der restlichen Zellen erfolgte mit dem jeweilig angegebenen Medium mit dem Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FKS) und Penicillin/Streptomycin (P/S). Die humane embryonale Nierenzelllinie (*human embryonic kidney* (HEK)-293) sowie die humane GBM-Zelllinie U87MG (U87) stammen von ATCC (Manassas, USA) und wurden in *Dulbecco's modified eagle's medium* (DMEM)/FKS/P/S kultiviert. Die humane Glioblastom-Zelllinie A1207 (Symbiotec GmbH, Saarbrücken, Deutschland) wurde in *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI)/FKS/P/S kultiviert. Die Primärzellen (T8399, T8470, T8475, T8478) aus humanem GBM-Gewebe wurden freundlicherweise von der Neurochirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes (Prof. Dr. Oertel und Prof. Dr. Urbschat) zur Verfügung gestellt, in DMEM/FKS/P/S kultiviert und bis Passage 2 für die Untersuchungen verwendet.

#### 4.2.2 CK2-Inhibitoren: CX-4945 und TBB

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen von CX-4945 und TBB auf biologische Prozesse *in vitro*, *ex vivo* und *in vivo* untersucht. In der Literatur werden beide Substanzen als Inhibitoren der CK2 beschrieben [79,96]. CX-4945 blockiert kompetitiv die ATP-Bindestelle der katalytischen Untereinheiten CK2 $\alpha$  und  $\alpha'$ . Für die Verwendung in der Zellkultur wurde eine Stocklösung mit einer Konzentration von 10 mM in Dimethylsulfoxid (DMSO) mit CX-4945-Puder von ActivateScientific (Reinheit > 95 %, Prien, Deutschland) hergestellt. TBB blockiert kompetitiv die ATP- und GTP-Bindestelle der katalytischen Untereinheiten CK2 $\alpha$  und  $\alpha'$ . Der kristalline Feststoff von Cayman Chemical (Reinheit >98 %, Ann Arbor, USA) wurde mit einer Konzentration von 50 mM in DMSO gelöst. Beide Stocklösungen wurden bei -20 °C gelagert und für die Verwendung in der Zellkultur unmittelbar vor Gebrauch 1:1000 in Medium verdünnt. Sofern nicht anders angegeben wurden die Zellen für 24 h, 48 h und 72 h mit DMSO (Vehikel), CX-4945 (10  $\mu$ M) oder TBB (50  $\mu$ M) behandelt und in Abhängigkeit der darauffolgenden Experimente und Analysen verwendet oder geerntet.

#### 4.2.3 Analyse der Zellproliferation

Die Proliferation ist ein Prozess, der sich aus dem Wachstum und der Teilung von viablen Zellen zusammensetzt [100]. Daher wurden die Auswirkungen der beiden CK2-Inhibitoren CX-4945 und TBB auf die Zellproliferation mit unterschiedlichen Methoden analysiert, um die Viabilität, das Wachstum und die Teilung der Zellen detektieren zu können.

##### 4.2.3.1 *Water-soluble tetrazolium (WST)-1 assay*

Die Viabilität von Zellen kann durch deren metabolische Aktivität bestimmt werden. In dieser Arbeit wurde der WST-1 assay (Roche Applied Science) verwendet, um die metabolische Aktivität der Succinat-Tetrazolium-Dehydrogenase zu detektieren. Pro Vertiefung einer 96-Well Platte wurden 3.500 Perizyten, 3.000 A1207- oder 4.000 U87-Zellen in 100  $\mu$ l Kulturmedium ausgesät. Zum jeweiligen Analysezeitpunkt wurden pro Vertiefung 10  $\mu$ l WST-1 Reagenz zugegeben und 30 min inkubiert (37 °C). Anschließend wurde der Umsatz von Tetrazoliumsalz zu Formazan bei 450 nm spektralphotometrisch mit dem PHO MO Photometer (anthos Mikrosysteme GmbH, Friesoythe, Deutschland) detektiert (Referenz 620 nm).

##### 4.2.3.2 Bromdesoxyuridin (BrdU) assay

BrdU (Roche Applied Science) wird von viablen Zellen während der Mitose bei der Replikation als Analogon des Nukleosids Thymidin in die DNA eingebaut. BrdU-positive Zellen werden anschließend durchflusszytometrisch analysiert und geben Aufschluss über den Anteil von wachsenden und sich teilenden Zellen der gemessenen Gesamtpopulation. Die Zellen wurden

mit einer Konfluenz von 30 % ausgesät und wie in Abschnitt 4.2.2 beschrieben für 72 h mit CK2-Inhibitoren behandelt. Nach 62 h wurde zusätzlich BrdU (10 µM) zugegeben. Nach insgesamt 72 h wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und mit 70 % Ethanol fixiert sowie permeabilisiert (30 min, 4 °C). Nach einer Zentrifugation (200 xg, 5 min) bei Raumtemperatur (RT) wurde der Überstand dekantiert und die DNA mit 2 M HCl/0,5 % Triton X-100 denaturiert (30 min, RT). Nach 3 Waschschritten mit 1x *phosphate-buffered saline* (PBS)/0,05 % Tween 20 wurden die Zellen für 30 min im Dunkeln bei RT mit dem Fluoreszeininisothiocyanat (FITC)-konjugierten BrdU Antikörper (BU20A) von eBioscience (Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland) inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden mit einem Waschschrift mit 1x PBS entfernt und die Anzahl von BrdU-positiven Zellen durchflusszytometrisch detektiert (siehe 4.2.6).

#### 4.2.3.3 Wachstumskurve

Die Zellzahl wurde mit Hilfe von Wachstumskurven analysiert. Die Zellen wurden mit einer Konfluenz von 30 % ausgesät und am Folgetag (0 h) mit CK2-Inhibitoren behandelt (siehe 4.2.2). Nach 0 h, 24 h, 48 h und 72 h wurden die Zellen trypsiniert und mit Trypanblau (Thermo Fisher) nach Angaben des Herstellers gefärbt, um die Anzahl von viablen Zellen zu bestimmen. Die Zählung erfolgte mit dem LUNA™ Automated Cell Counter von logosBiosystems (BioCat GmbH, Heidelberg, Deutschland) nach Angaben des Herstellers.

#### 4.2.4 Zytotoxizitätstest

In Folge einer Schädigung der Zellmembran oder von Apoptose gelangt Laktat-Dehydrogenase (LDH) in den Zellüberstand, wo deren Aktivität durch den Umsatz von Tetrazoliumsalz zu Formazan detektiert werden kann. Die zytotoxischen Auswirkungen der in dieser Arbeit verwendeten CK2-Inhibitoren CX-4945 und TBB (siehe 4.2.2) wurden mit Hilfe der LDH-Aktivität mit dem Cytotoxicity Detection Kit<sup>Plus</sup> (Roche Applied Science, Penzberg, Deutschland) nach Angaben des Herstellers im 96-Well Format spektralphotometrisch (PHO MO Photometer) bei 492 nm gemessen (Referenz 620 nm).

#### 4.2.5 Inhibition der Proteinsynthese

Cycloheximid (CHX, Sigma-Aldrich GmbH) induziert in Zellen einen Translationsstopp, wodurch anschließende Änderungen des Proteingehalts durch die Stabilität der Proteine beeinflusst werden. Die Experimente mit CHX sollten zum einen Aufschluss über die Syntheszeit von NG2 geben und zum anderen zeigen, ob CX-4945 und TBB die Stabilität von NG2 beeinflussen. Die Zellen wurden hierzu mit CHX (50 µg/ml) und gegebenenfalls zusätzlich mit CX-4945 oder TBB behandelt (siehe 4.2.2). Der Proteingehalt von NG2 wurde durchflusszytometrisch 24 h, 48 h und 72 h nach Behandlung bestimmt (siehe 4.2.6).

#### 4.2.6 Durchflusszytometrie

Die Methode der Durchflusszytometrie eignet sich besonders gut für die Analyse von membranständigen Proteinen, die mit Hilfe von Fluorochrom-konjugierten Antikörpern detektiert werden. Die in Suspension vorliegenden Zellen werden im BD FACSLytic™ (BD GmbH) durch Unterdruck in einer feinen Kapillare (Messzelle) vereinzelt. Anschließend passieren die Zellen einen Laserstrahl, emittieren Licht und erzeugen Streulicht sowie Fluoreszenz-Signale. Diese Daten geben Aufschluss über Größe (*forward scatter* (FSC)), Granularität (*side scatter* (SSC)) und über den Proteingehalt spezifischer, Antikörpermarkierter Oberflächenproteine.

Für jede Einzelmessung wurden 10.000 Zellen verwendet und die Auswertung der Messungen erfolgte mit der BD FACSuite™ Software (BD GmbH). In Abhängigkeit des zu untersuchenden Oberflächenproteins wurden in der vorliegenden Arbeit die Inkubationsbedingungen und die benötigte Menge des daran bindenden Antikörpers empirisch optimiert. Daher wurden die Zellen unterschiedlich für die durchflusszytometrischen Messungen vorbereitet. Die Zellen wurden im Kulturmedium mit einem Zellschaber abgelöst, zentrifugiert (5 min, 200 xg, RT), mit 1x PBS gewaschen und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde resuspendiert, mit 0,5 µl α-NG2-Antikörper (PE mouse anti-human chondroitin sulfate (9.2.27), BD GmbH) oder 5 µl anti-CD29 Antikörper (PE mouse anti-human cluster of differentiation (CD)29 (MAR4), BD GmbH) gemischt und für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Der Antikörper HUTS-21 erkennt ein Epitop von Integrin β-1, das nur in seinem aktivierten Zustand sterisch ungehindert gebunden werden kann. Dieser Zustand wird für die Durchflusszytometrie mit Hilfe eines Mn<sup>2+</sup>-Ionen-haltigen HEPES-Puffer (+D-Glukose) aufrechterhalten [101]. Die Zellen wurden mit vorgewärmtem HEPES-Puffer gewaschen, darin abgeschabt und zentrifugiert (5 min, 200 xg, RT). Der Überstand wurde dekantiert und die Zellsuspension mit 5 µl anti-CD29 Antikörper (PE mouse anti-human CD29 (HUTS-21), BD GmbH) inkubiert (30 min, 37 °C, dunkel). Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, folgte in jedem Fall ein Waschschrift mit 1x PBS (5 min, 200 xg, RT). Der Überstand wurde dekantiert und die Zellpellets unmittelbar vor der Messung im verbliebenen Puffer (Rücklauf) resuspendiert.

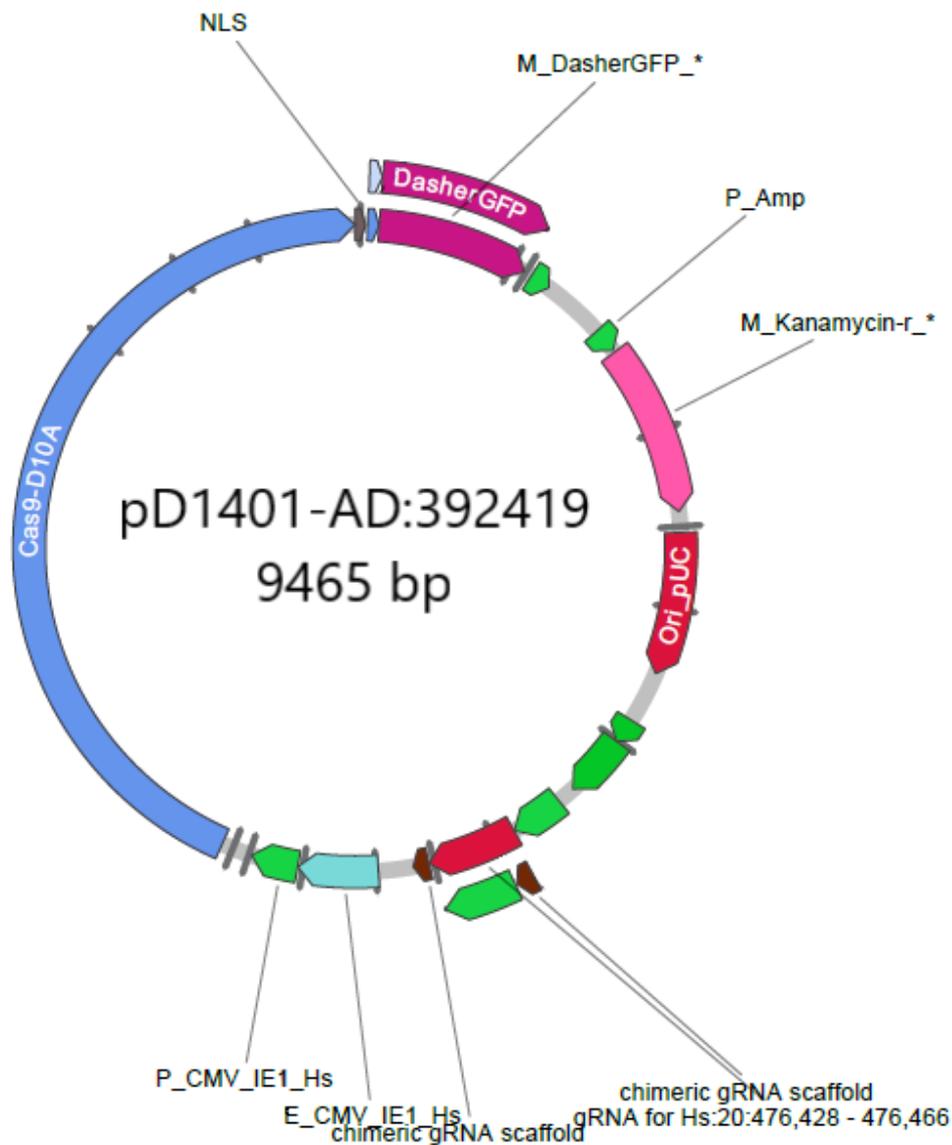
## 4.3 Molekularbiologische Techniken

### 4.3.1 Transfektion

Bei der Analyse von Proteinen, deren Funktion und assoziierten Signalwegen kann es aufschlussreich sein, die kodierenden Gene auszuschalten (KO), zu exprimieren (Überexpression) oder die *messenger* (m)RNA herunterzuregulieren (*knockdown* (KD)) und darauffolgende zelluläre Veränderungen zu untersuchen. Für jede dieser drei Optionen muss exogene DNA oder *ribonucleic acid* (RNA) in die Zelle eingebracht werden, um die Genexpression prä- bzw. posttranskriptionell zu verändern.

#### 4.3.1.1 CRISPR/Cas-Methode

Der stabile KO der katalytischen CK2 $\alpha$ -Untereinheit wurde mit der CRISPR/Cas-Methode generiert. Der Vektor pD1401-AD:392419 (*Abbildung 6*) wurde bei Atum (Newark, USA) gekauft und kodiert für die Cas9-D10A Ninja-Nickase, die durch zwei spezifische *guide* (g)RNAs [#1 (5'-CCTGGATTATTGTCACAGCA-3'), #2 (5'-GTGGGATGAACGGGTCAGAA-3')] zielgerichtet am CK2 $\alpha$ -Gen (*CSNK2A1*) bindet und im Leit- sowie komplementären DNA-Strang einen Einzelstrangbruch erzeugt. Diese Strangbrüche werden von zelleigenen Mechanismen durch nicht-homologe Verbindung der beiden überstehenden DNA-Enden (*non-homologous end joining* (NHEJ)) repariert. Mit dem verwendeten, weiterentwickelten System von CRISPR/Cas-9-D10A, das für 2 unterschiedliche gRNAs und die Ninja-Nickase kodiert, entsteht eine Deletion von 38 Basenpaaren (bp) an der Zielsequenz von *CSNK2A1*. Um einen KO der CK2 $\alpha$  zu generieren, wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 70 % kultiviert (6 cm Kulturschale) und transfiziert. Für einen Transfektionsansatz (6 cm Kulturschale) wurden zum einen 5  $\mu$ l Lipofectamin3000 (Thermo Fisher Scientific) in 250  $\mu$ l Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) und zum anderen 1000 ng Vektor (pD1401-AD:392419) mit 2,5  $\mu$ l P3000 in 250  $\mu$ l Opti-MEM verdünnt. Anschließend wurden beide Ansätze gemischt, 15 min inkubiert (RT) und tropfenweise zu den Zellen pipettiert. Nach 48 h Inkubation wurden die Zellen trypsinisiert, zentrifugiert (5 min, 200 xg, RT) und in PBS/2 % *bovine serum albumin* (BSA) resuspendiert. Der Vektor kodiert zusätzlich für GFP, wodurch transfizierte Zellen, die den Vektor aufgenommen haben, mittels *fluorescence-associated cell sorting* (FACS) identifiziert und vereinzelt werden konnten. Freundlicherweise wurden von PD Dr. Philipp (Pharmakologie und Toxikologie, Universität des Saarlandes) die transfizierten Zellen mit dem MoFlo XDP *cell sorter* (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) an Hand des GFP-Fluoreszenzsignals detektiert und einzeln in die Vertiefungen einer 96-Well Platte ausgesät.

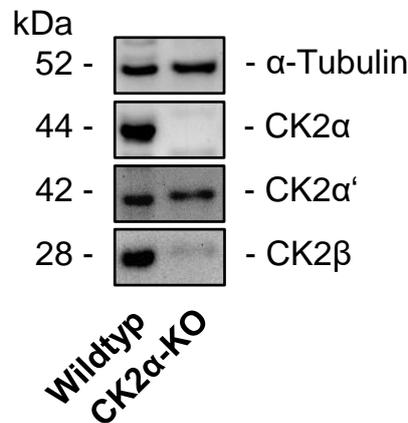


**Abbildung 6: Schematische Vektorkarte von pD1401-AD:392419.** Das nuclear localization signal (NLS) dient dem Transport in den Nukleus. Die Expression des green fluorescence protein (GFP) ermöglicht die Identifikation transfizierter Einzelzellen. Für die Amplifikation in Bakterien kodiert der Vektor für Kanamycin ( $M\_Kanamycin-r\_*$ ) unter der Kontrolle eines Ampicillin-Promotors ( $P\_Amp$ ) und für den bakteriellen Replikationsursprung ( $Ori\_pUC$ ). Dahinter befindet sich die gRNA für CSNK2A1, flankiert von 2 gRNA scaffolds, die auf Proteinebene die Bindung der Nickase an das CK2 $\alpha$ -Gen ermöglichen. Die Expression der Cas9-D10A Nickase wird durch einen humanen CMV-Enhancer ( $E\_CMV\_IE1\_Hs$ ) und -Promotor ( $P\_CMV\_IE1\_Hs$ ) reguliert. Modifiziert nach Atum (Newark, USA).

Für die folgenden Experimente wurden nur diejenigen Klone langfristig kultiviert und verwendet, die eine nachweisbare Deletion im CK2 $\alpha$ -Gen *CSNK2A1* und einen signifikant erniedrigten CK2 $\alpha$ -Proteingehalt im Western Blot zeigten.

#### 4.3.1.1.1 Nachweis einer Deletion im CK2 $\alpha$ -Gen *CSNK2A1*

Die Deletion in *CSNK2A1* ist durch die Sequenz der beiden gRNAs bestimmt und wurde auf Proteinebene mittels Western Blot (siehe 4.4) verifiziert. Dazu wurde der Proteingehalt der CK2-Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\alpha'$  und  $\beta$  von den Klonen gemessen (*Abbildung 7*).



**Abbildung 7: Western Blot-Analyse des CRISPR/Cas-induzierten CK2-KO.** A1207 Zellen wurden mit dem Vektor pD1401-AD:392419 transfiziert, um mittels CRISPR/Cas-Methode einen KO im CK2 $\alpha$ -Gen *CSNK2A1* zu generieren. Nach 48 h wurden die Zellen mittels FACS vereinzelt. Die Zellen wurden geerntet, lysiert und der Proteingehalt von CK2 $\alpha$ , CK2 $\alpha'$ , CK2 $\beta$  und  $\alpha$ -Tubulin (als Ladekontrolle) mittels Western Blot detektiert.

Wie zu erwarten, konnte die  $\alpha$ -Untereinheit nur in den Wildtyp-Zellen nachgewiesen werden und nicht in CK2 $\alpha$ -KO. Zudem wurde eine deutliche Abnahme des Proteingehalts der Untereinheit CK2 $\beta$  in CK2 $\alpha$ -KO Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen detektiert.

#### 4.3.1.2 RNA-Interferenz (RNAi)

Posttranskriptionelle Mechanismen der Genregulation können unter anderem durch zelleigene siRNAs beeinflusst werden. Bei molekularbiologischen Analysen werden siRNAs für einen transienten KD von Proteinen genutzt. Mit Hilfe des Transfektionsreagenz HiPerFect (Qiagen, Hilden, Deutschland) wurde Kontroll (Kt)-siRNA (*AllStars negative control* siRNA, Qiagen), siRNA gegen NG2 (Gen-ID: 1464; Qiagen) oder gegen die katalytischen CK2-Untereinheiten  $\alpha$  (Gen-ID: 1457) und  $\alpha'$  (Gen-ID: 1459; GE Healthcare/Dharmacon (Freiburg, Deutschland)) in Zellen eingebracht. Für die Durchführung der Transfektion wurde sich an Transfektionsprotokollen von Qiagen orientiert, wobei die finale Konzentration der siRNAs im Well, das Volumen des Transfektionsreagenz und die Inkubationszeiten empirisch ermittelt wurden. Für den Transfektionsansatz im 24-Well Format wurden je 3  $\mu$ l HiPerFect und die in *Tabelle 1* angegebene Konzentration der jeweiligen siRNA in 100  $\mu$ l Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) verdünnt, 10 min inkubiert und zu den Zellen pipettiert. Nach der jeweiligen Inkubationszeit erfolgte in Abhängigkeit der weiterführenden Experimente die Zellernte.

**Tabelle 1: Verwendete siRNAs mit Sequenz und benötigter Konzentration.**

siRNA	Zielsequenz	Finale Konzentration	Inkubationszeit
NG2	5'-GCUAUUUUACAUGGUGCUG-3'	20 nM	72 h
CK2 $\alpha$	5'-GATGACTACCAGCTGGTTC-3'	100 nM	48 h
CK2 $\alpha'$	5'-CAGTCTGAGGAGCCGCGAG-3'	100 nM	48 h

#### 4.3.1.3 Lipofektion

Ein chemisches Verfahren, das die (Über-)Expression von Genen, wie *CSPG4* ermöglicht, basiert auf dem Einbringen von exogener DNA in Zellen mittels Lipofectamin3000 (Thermo Fisher Scientific). Die Zellen wurden hierfür bis zu einer Konfluenz von 70 % kultiviert (6-Well Format). Pro Well wurden zum einen 7,5  $\mu$ l Lipofectamin3000 in 250  $\mu$ l Opti-MEM verdünnt und zum anderen 1250 ng *CSPG4* Plasmid (pEF6-*CSPG4*-myc-his wurde freundlicherweise von Wensheng zur Verfügung gestellt (Addgene plasmid # 69037; <http://n2t.net/addgene:69037>; RRID:Addgene\_69037, Massachusetts, USA)) mit 2,5  $\mu$ l P3000 in 250  $\mu$ l Opti-MEM verdünnt. Anschließend wurden beide Ansätze gemischt, 15 min inkubiert (RT) und tropfenweise zu den Zellen pipettiert. Als Kontrolle wurde anstatt des *CSPG4*-Plasmids der Vektor pEF6/Myc-His A, B, and C (Leervektor (LV)) von Invitrogen™ V96220 (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Nach 24 h oder 48 h Inkubation erfolgte in Abhängigkeit der weiterführenden Experimente die Zellernte.

#### 4.3.2 Genexpressionsanalysen

Die Analyse der Genexpression erfolgte mit Hilfe der *quantitative real-time polymerase chain reaction* (qRT-PCR). Dabei werden ausgehend von dem mRNA Gehalt eines Gens Rückschlüsse auf dessen Expression gezogen.

##### 4.3.2.1 RNA Isolation

Für die Isolation von RNA wurden  $1 \times 10^7$  Zellen in 800  $\mu$ l QIAzol™ Lysis Reagent (Qiagen) resuspendiert. Die RNA wurde nach Herstellerangaben aus dem Zelllysate isoliert, gefällt und gewaschen. Das RNA-Pellet wurde in Wasser (H<sub>2</sub>O) resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Die Konzentration der RNA wurde mit dem DeNovix DS-11+ Mikrovolumen-Spektralphotometer (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf) bei 260 nm gemessen und die Reinheit an Hand der beiden Quotienten 260/280 und 260/230 überprüft [102].

### 4.3.2.2 Reverse Transkription

Das qScriber cDNA *synthesis kit* (HighQu, Kraichtal, Deutschland) ermöglicht durch Oligo(dT) und *Random Hexamer Primer* die reverse Transkription von mRNA in *complementary* (c)DNA. Der Reaktionsmix wurde nach Herstellerangaben mit 1 µg RNA pipettiert und für 30 min bei 45 °C inkubiert. Nach der Inaktivierung der Enzyme bei 85 °C (10 min) wurde die Konzentration der einzelsträngigen cDNA mit dem DeNovix DS-11+ Mikrovolumen-Spektralphotometer (Biozym Scientific GmbH) gemessen.

### 4.3.2.3 qRT-PCR

Die qRT-PCR wurde mit dem ORA™ SEE qPCR Green ROX L Mix (HighQu), je 500 nM Primer (*Tabelle 2*) und 100 ng cDNA nach Angaben des Herstellers in Triplets pipettiert. Die Datenerfassung erfolgte mit dem MiniOpticon™ Real-Time PCR Detection System und der CFX Manager™ Software (Bio-Rad, Feldkirchen, Deutschland). Die Daten wurden quantitativ an Hand der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Methode [103] analysiert.

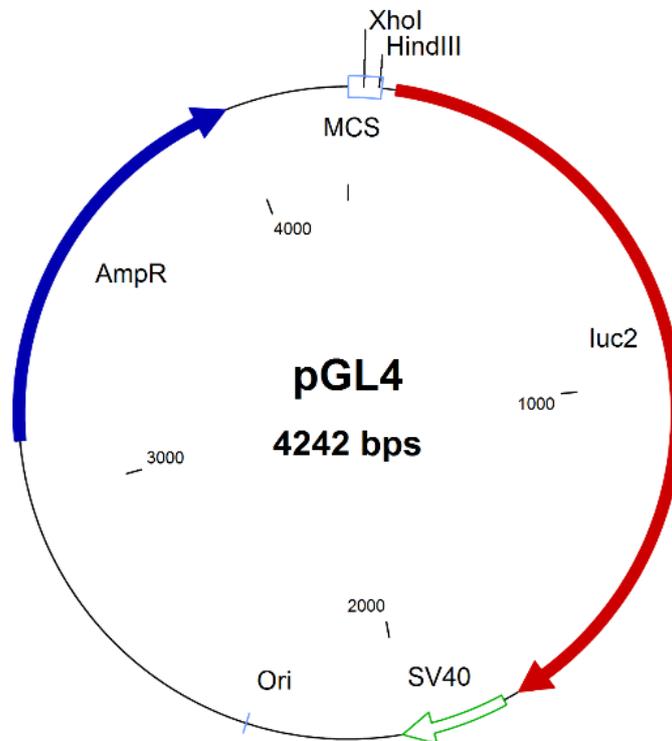
**Tabelle 2: Verwendete qRT-PCR Primer.**

Name	Sequenz	Amplifikatlänge [bp]
NG2 forward	5'-GCAAGCCGATGTGGATTC-3'	141
NG2 reverse	5'-ATGGCGGATGGTAGGATG-3'	
GAPDH forward	5'-CCACCCATGGCAAATTCC-3'	141
GAPDH reverse	5'-ACTCCACGACGTACTIONCAG-3'	

### 4.3.3 Konstruktion von NG2 Reportergenvektoren

Alle Materialien, Geräte und Arbeitsplätze, die für das Klonieren und Arbeiten mit Bakterien benötigt wurden, stellten freundlicherweise Prof. Dr. Götz und Prof. Dr. Montenarh (Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universität des Saarlandes) zur Verfügung. Für diese Arbeit wurde mit dem Bakterienstamm *Escherichia (E.) coli* XL1-Blue (Stratagene, San Diego, USA) gearbeitet, der sich durch die Resistenz gegen das Antibiotikum Tetrazyklin (Carl Roth) auszeichnet. Die Kultivierung erfolgte auf LB-Agarplatten (37 °C) oder in LB-Flüssigmedium (37 °C, 800 *rounds per minute* (rpm)), sofern nicht anders angegeben unter Verwendung von Tetrazyklin (12,5 µg/ml). Für die Identifikation und Charakterisierung des humanen NG2-Promotors wurde die putative Promotorregion aus genomischer DNA isoliert und fragmentiert. Die Fragmente wurden in den Promotor des Reportergenvektors pGL4 (pGL4.10[luc2] von Promega GmbH, Walldorf, Deutschland) kloniert, der für das *firefly* Luciferase-Gen *luc2* kodiert (*Abbildung 8*). Für die Amplifikation des Plasmids in *E. coli* wurden

positive Transformanten durch die Vektor-vermittelte Ampicillin-Resistenz selektiert. Die Analyse der transkriptionellen Aktivität der NG2-Promotorfragmente erfolgte an Hand der Luciferase-Aktivität in HEK-293-Zellen.



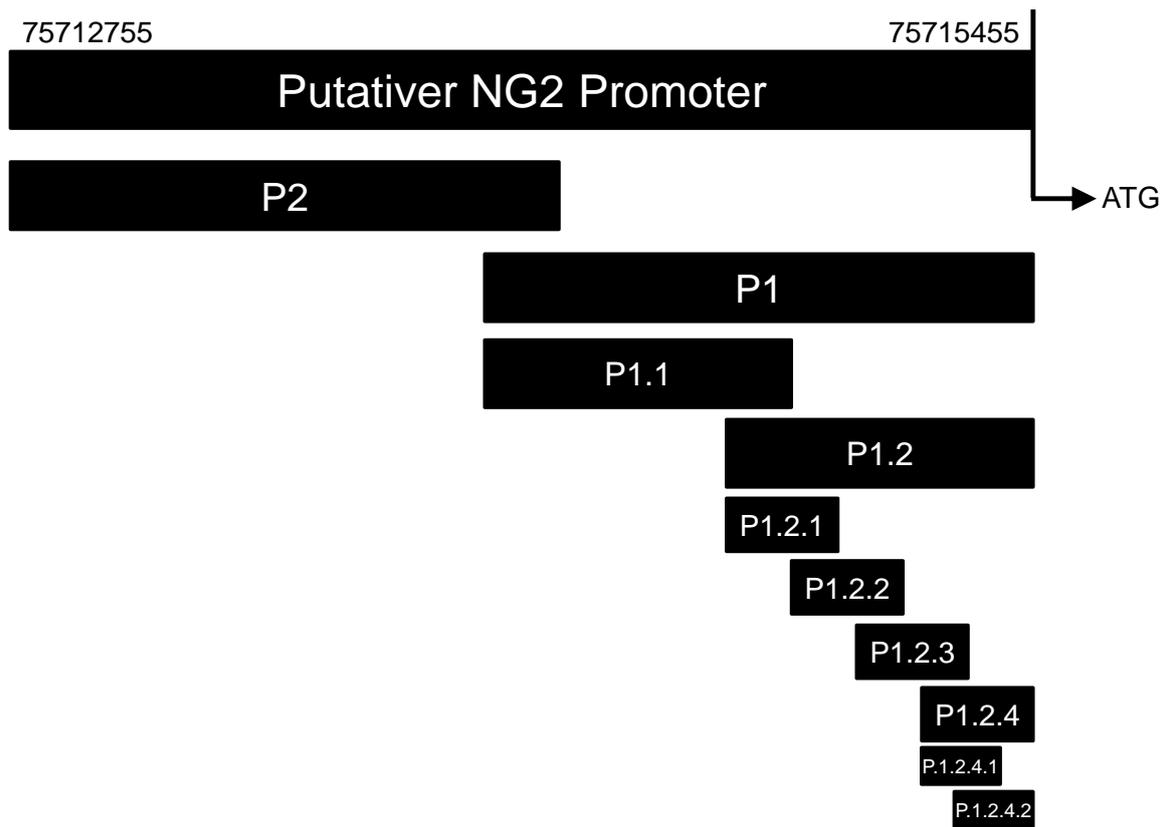
**Abbildung 8: Schematische Vektorkarte von pGL4.** Die multiple cloning site (MCS) des pGL4 Vektors beinhaltet die Restriktionsstellen (XhoI und HindIII), die eine gerichtete Insertion von Promotorfragmenten ermöglichen. Die Expression des darauffolgenden Reportergens luc2 liegt unter der regulatorischen Kontrolle der MCS und deren Insert. Das SV40 späte poly(A) Signal terminiert die Transkription des Reportergens. Der Replikationsursprung Ori dient der Amplifikation im bakteriellen System und die Ampicillin-Resistenz ermöglicht die Selektion positiver Transformanten.

#### 4.3.3.1.1 DNA-Extraktion

Zunächst wurde die genomische DNA aus primären Perizyten nach Angaben des Herstellers mit dem PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific) extrahiert und die Konzentration mit dem DeNovix DS-11+ Mikrovolumen-Spektralphotometer (Biozym Scientific GmbH) bestimmt.

#### 4.3.3.1.2 PCR

Aus der extrahierten, humanen, genomischen DNA wurde mittels PCR unter Verwendung der Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) und spezifischer Primer eine 2677 bp große Region vor dem Transkriptionsstart von NG2 amplifiziert (Abbildung 9). Für eine genaue Identifikation des NG2-Promotors wurden anschließend kleinere, überlappende Fragmente generiert.



**Abbildung 9: Schematische Darstellung der generierten NG2-Promotorfragmente.** Die 2677 bp große Region wurde mittels PCR in P1 und P2 unterteilt. Die folgende Fragmentierung erfolgte auf Grund der transkriptionellen Aktivität von P1 und P1.2.

Die Komponenten für die PCR wurden nach Herstellerangaben unter Verwendung von 100 ng DNA entsprechend dem angegebenen Schema (Tabelle 3) pipettiert.

**Tabelle 3: Pipettierschema für die Amplifikation des NG2-Promotors und der Promotorfragmente.**

Komponente	Menge
5x Phusion HF Buffer	4 µl
10 mM dNTPs	0,4 µl
Forward und reverse Primer	je 0,5 µM finale Konzentration
Template DNA	1 µl (100 ng)
Phusion DNA Polymerase	0,2 µl
Wasser	ad 20 µl

Die Bedingungen für die Amplifikation der jeweiligen Promotorfragmente mittels PCR wurden empirisch auf der Grundlage von Herstellerprotokollen optimiert (Tabelle 4).

**Tabelle 4: Protokoll für die Amplifikation des NG2-Promotors und der Promotorfragmente.**

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
Denaturieren	98 °C	30 s	1
Denaturieren	98 °C	5 s	30
Anlagerung Primer und Verlängerung	64 °C (NG2-Promotor, P1, P2)	45 s	
	66 °C (P1.1, P1.2)		
	68 °C (P1.2.1 - P1.2.4)		
72 °C (P1.2.4.1, P1.2.4.2)			
Finale Verlängerung	72 °C	10 min	1
Lagerung	4 °C		

Die verwendeten Primer (Tabelle 5) wurden mit dem Programm Clone Manager 9 (Sci Ed Software LLC, Westminster, USA) generiert und von Thermo Fisher Scientific hergestellt. Alle Primer beginnen mit einer *HindIII* (forward (fw) Primer) oder *XhoI* (reverse (rv) Primer) Restriktionsschnittstelle, damit nachfolgende Ligationen richtungsorientiert (5' zu 3') erfolgten und Selbstligationen des Vektors verhindert wurden.

**Tabelle 5: PCR-Primer für die Fragmentierung des NG2-Promotors.**

Name	Sequenz (5' -> 3')	Länge Amplifikat	Schnittstelle
Promotor-fw	AGACTCGAGCTCTGGTTTCAAGAC	2677 bp	XhoI
Promotor-rv	AGAAAGCTTAGGACTTGCGAGGAG		HindIII
P2-fw	AGACTCGAGCTCTGGTTTCAAGAC	1382 bp	XhoI
P2-rv	AGAAAGCTTCACCTCAGTCTCCCT		HindIII
P1-fw	AGACTCGAGCTCTGGTTTCAAGAC	1369 bp	XhoI
P1-rv	AGAAAGCTTAGGACTTGCGAGGAG		HindIII
P1.1-fw	AGACTCGAGTTGAGCTGCACTTTC	765 bp	XhoI
P1.1-rv	AGAAAGCTTAGGACTTGCGAGGAG		HindIII
P1.2-fw	AGACTCGAGCTCAGTTTCCTCATC	762 bp	XhoI
P1.2-rv	AGAAAGCTTCCCTAAGTGCAGTGC		HindIII
P1.2.1-fw	AGACTCGAGTTGAGCTGCACTTTC	236 bp	XhoI
P1.2.1-rv	AGAAAGCTTACTCCAGAGGCACCA		HindIII
P1.2.2-fw	AGACTCGAGGACTGAGGTGAGGCCCTTC	237 bp	XhoI
P1.2.2-rv	AGAAAGCTTCCCTACTTCCCTCCTTTCTG		HindIII

P1.2.3-fw	AGACTCGAGTCTCCTGAACTCCCGCAAAG	276 bp	XhoI
P1.2.3-rv	AGAAAGCTTCTCGGGTTTCAGGCTTGGAC		HindIII
P1.2.4-fw	AGACTCGAGCGGGCCCTTTAAGAAGGTTG	201 bp	XhoI
P1.2.4-rv	AGAAAGCTTAGGACTTGCAGGAG		HindIII
P1.2.4.1-fw	AGACTCGAGCGGGCCCTTTAAGAAGGTTG	114 bp	XhoI
P1.2.4.1-rv	AGAAAGCTTGGTGTCCGCGCACTTAACTC		HindIII
P1.2.4.2-fw	AGACTCGAGGAGTTAAGTGCGCGGACACC	107 bp	XhoI
P1.2.4.2-rv	AGAAAGCTTAGGACTTGCAGGAG		HindIII

#### 4.3.3.1.3 Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Extraktion

Die PCR-Produkte wurden mit 6x Lade-Puffer (Thermo Fisher Scientific) versetzt und zusammen mit den 1 kb und 100 bp DNA-Leitern (Thermo Fisher Scientific) auf ein 1 %iges, Ethidiumbromid-haltiges (0,5 µg/ml) Agarosegel aufgetragen, durch Anlegen einer Spannung (100 V) auf Grund ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt und somit von unspezifischen DNA-Fragmenten gereinigt. Die Visualisierung der Ethidiumbromid-markierten DNA-Banden erfolgte mittels UV-Licht im Molecular Imager® Gel Doc™ XR System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) mit der Quantity One® 1D Analysis Software 4.6.5 (Bio-Rad). Die DNA-Banden wurden manuell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die DNA-Extraktion erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem GeneJet™ Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific). Die DNA wurde mit H<sub>2</sub>O eluiert und die Konzentration mit dem De Novix DS-11+ Mikrovolumen-Spektralphotometer (Biozym Scientific GmbH) bestimmt.

#### 4.3.3.1.4 Restriktionsverdau

Durch Verwendung der beiden Restriktionsenzyme *HindIII* und *XhoI* (Thermo Fisher Scientific) wurde nach Herstellerangaben zum einen der Vektor linearisiert und zum anderen spezifische Schnittstellen mit kohäsiven Enden in Vektor und PCR-Amplifikaten generiert. Dadurch wurde zusammen mit der nachfolgenden gelelektrophoretischen Reinigung und DNA-Extraktion (siehe 4.3.3.1.3) eine zielgerichtete und effektive Ligation von Vektor und PCR-Amplifikat ermöglicht.

#### 4.3.3.1.5 Ligation

Die T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific) katalysiert die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 3' Hydroxyl- und 5'-Phosphat-Enden (kohäsive Enden). Der Ligationsansatz wurde nach Herstellerangaben pipettiert, wobei die Effizienz durch ein 1:3 Verhältnis von Vektor zu PCR-Amplifikat und einer Inkubation von 16 h bei 8 °C optimiert wurde.

#### 4.3.3.2 Überprüfung der Klonierung

Die Insertion der Promotorfragmente in den pGL4-Vektor wurde durch einen Restriktionsverdau der entstandenen Plasmide mit anschließender gelelektrophoretischer Aufreinigung und Größencharakterisierung überprüft und mittels Sequenzierung (Eurofins GSC Lux SARL Scientific, Luxemburg) verifiziert.

#### 4.3.3.3 Transformation von *E. coli*

Für die Transformation wurden 100 µl kompetente *E. coli* Bakterien zusammen mit 100 ng Ligationsansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Nach 50 s Hitzeschock (42 °C) wurden die Zellen 2 min auf Eis gekühlt, mit 700 µl LB-Medium (ohne Antibiotikum) versetzt und 1 h bei 37 °C im Schüttler (700 rpm) kultiviert. Die Bakterien wurden pelletiert (1 min, 200 xg), 700 µl Überstand verworfen, die restliche Suspension auf LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht kultiviert. Am Folgetag wurden positive Klone ausgewählt, erneut auf LB-Agarplatten ausgestrichen und Vorkulturen (5 ml LB-Medium) angeimpft. Nach 12-16 h Kultivierung (37 °C, 180 rpm) wurde entweder die Plasmid-DNA nach Herstellerangaben mittels GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific) isoliert oder eine Hauptkultur (200 ml LB-Medium) angeimpft, die nach weiteren 12-16 h Kultivierung für die Isolation von Plasmid-DNA (GeneJet Plasmid Midiprep Kit, Thermo Fisher Scientific) geerntet wurde. Die isolierte Plasmid-DNA wurde in H<sub>2</sub>O gelöst und die Konzentration mit dem DeNovix DS-11+ Mikrovolumen-Spektralphotometer (Biozym Scientific GmbH) gemessen.

#### 4.3.3.4 Reporter-Gen-Analysen

Für die Analyse der transkriptionellen Aktivität von NG2-Promotorfragmenten wurden HEK-293-Zellen mit Expressionsplasmiden transfiziert (siehe 4.3.1.3). Nach 24 h Inkubation konnten die Zellen gegebenenfalls zusätzlich behandelt werden (siehe 4.2.2). Die Detektion der Luciferase-Aktivität als *relative luminescence units* (RLU) erfolgte nach Herstellerangaben mit dem *luciferase assay system* von Promega und dem Multimode Mikroplatten-Reader Infinite® 200 PRO (Tecan, Männedorf, Schweiz).

### 4.4 Proteinbiochemische Techniken/Methoden

Die Analyse von Zelllysaten mittels Western Blot ermöglicht die gezielte Detektion einzelner Proteine mit Hilfe von spezifischen Antikörpern.

#### 4.4.1 Proteinextraktion

Für Western Blot-Analysen wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers von der Zellkulturschale gelöst, zentrifugiert (5 min, 200 xg, 4 °C) und mit 1x PBS gewaschen. Der Zellaufschluss erfolgte mit Lyse-Puffer (doppeltes Pelletvolumen; 10 mM Tris-HCl (pH 7,5),

10 mM NaCl, 0,1 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA), 0,5 % Triton-X-100, 0,02 % NaN<sub>3</sub>). Zusätzlich wurden unmittelbar vor Verwendung 2 Protease-Inhibitoren (Complete (1:50) und PMSF (1:500) von Roche) und der Phosphatase-Inhibitor Cocktail (1:50, Sigma-Aldrich) zugegeben. Die Zellen wurden in Lyse-Puffer resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und 30 min zentrifugiert (21600 xg, 4 °C), wodurch Zelltrümmer pelletiert wurden. Die im Überstand befindlichen, gelösten Proteine wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt (Proteinsuspension). Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford-Methode [104] nach Angaben des Herstellers (Bio-Rad) gemessen.

Der Western Blot ermöglicht es, Proben semiquantitativ bezüglich der Präsenz oder Abwesenheit von Proteinen zu analysieren. Quantitative Auswertungen wurden mit Hilfe der Analysesoftware LabImage (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland) erstellt.

#### 4.4.2 *Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE)

Das Auftrennen von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichts erfolgte mit Hilfe der SDS-PAGE. Dazu wurden Proteinextrakte mit 2x Probenpuffer (Sigma-Aldrich) im Verhältnis 1:1 gemischt, im Wasserbad (100 °C) denaturiert (10 min) und auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Durch Anlegen einer konstanten Spannung (100 V) passieren die Proteine entsprechend ihrer Molekülmasse das Gel und auf Grund ihrer negativen Ladung erfolgt dies in Richtung der Kathode. Proteine mit einem Molekulargewicht von 10-170 kDa wurden auf einem 10 %igen Gel, Proteine von 40-300 kDa auf einem 7,5 %igen Gel aufgetrennt. In beiden Fällen wurde ein 5 %iges Sammelgel verwendet. Zur Größenbestimmung der Proteine wurde der peqGOLD pre-stained protein marker IV<sup>®</sup> (10 % Trenngel) bzw. der peqGOLD pre-stained protein marker VII<sup>®</sup> (7,5 % Trenngel) mitgeführt (VWR).

#### 4.4.3 Western Blot und Immundetektion

Bevor die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine durch Immundetektion analysiert werden konnten, erfolgte deren Immobilisierung. Dazu wurden die Proteine mit Hilfe des Semi-Dry Blot Verfahrens (Bio-Rad) nach Angaben des Herstellers auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Roche) transferiert. Anschließend wurde die Membran für 1 h in 1x *tris-buffered saline* + *Tween20* (TBST)/5 % BSA auf einem Schüttler bei RT inkubiert, um die Membran zu saturieren und unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Zuerst wurde der Primärantikörper (in 1x TBST/1 %BSA) auf der Membran inkubiert (*Tabelle 6*). Durch 3 Waschschrte mit 1x TBST je 10 min (RT), wurden ungebundene Antikörper von der PVDF-Membran entfernt. Die Membran wurde 1 h auf dem Schüttler bei RT mit einem sekundären, Peroxidase-konjugierten Antikörper (*Tabelle 6*) inkubiert. Danach erfolgten erneut 3 Waschschrte mit 1x TBST für je 10 min (RT), um nicht gebundene sekundäre Antikörper zu

entfernen. Die Detektion der gebundenen sekundären Antikörper erfolgte unter Verwendung von *enhanced chemiluminescence* (ECL) Western Blot Reagenz (GE Healthcare) und dem ECL Chemocam Imager® (Intas).

**Tabelle 6: Antikörper, die für Western Blot-Analysen verwendet wurden.**

Antikörper	Verdünnung	Inkubation	Hersteller
Anti-pAKT (S129) Antikörper (EPR6150)	1:100	4 °C, über Nacht	Abcam (Cambridge, UK)
Anti-Akt1/2/3 Antikörper (11E7)	1:1000	1 h, RT	Cell Signaling (Frankfurt am Main, Deutschland)
Phospho-FAK (Tyr397) Antikörper (#3283)	1:50	4 °C, über Nacht	
Anti-FAK Antikörper (#3285)	1:100	4 °C, über Nacht	
HRP-konjugierter $\alpha$ -Tubulin monoklonaler Antikörper	1:1000	1 h, RT	Proteintech Germany GMBH (St. Leon-Rot, Deutschland)
HRP-konjugierter $\beta$ -Actin monoklonaler Antikörper (Klon: 2D4H5)	1:1000	1 h, RT	
Mouse IgG HRP-konjugierter Antikörper (HAF007)	1:1000	1 h, RT	R&D Systems, Inc. (Minneapolis, Canada)
Rabbit IgG HRP-konjugierter Antikörper (HAF008)	1:1000	1 h, RT	
NG2 Antikörper (G-9)	1:100	4 °C, über Nacht	Santa Cruz Biotechnology, (Heidelberg, Deutschland)
Casein Kinase II $\beta$ Antikörper (E-9)	1:500	1 h, RT	
CK2 $\alpha$ (KLH)	1:1000	1 h, RT	Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Prof. Montenarh (Homburg, Deutschland)
CK2 $\alpha'$ (# 30) [105]	1:100	4 °C, über Nacht	

## 4.5 Analyse zellulärer Funktionen

### 4.5.1 Analyse der Zellmigration

Die Migrationsfähigkeit von Zellen wurde mittels *scratch* und *transmigration assay* untersucht.

#### 4.5.1.1 *Scratch assay*

Mit einer gelben Pipettenspitze (10-200 µl) wurde manuell eine gerade Furche durch den konfluenten Zellrasen in der Vertiefung einer 24-Well Platte gezogen, das Medium entfernt und die Zellen mit 1x PBS gewaschen. Das Verschließen der Furche wurde zu verschiedenen Zeitpunkten (0 h, 16 h, 24 h) lichtmikroskopisch detektiert (Leica DM IL Mikroskop, 10x Objektiv, DFC 450C Kamera) und die verbleibende, zellfreie Fläche (Spaltfläche) softwareunterstützt (Leica application software Version 4.8) vermessen.

#### 4.5.1.2 *Transmigration assay*

Zellen können auf Grund eines chemotaktischen Gradienten (0,1 % vs. 5 % FKS) durch die Poren (Porengröße: 8 µm) von speziellen Polycarbonat-Filtern (Corning Incorporated) migrieren. Die Filter-Einsätze wurden über Nacht (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) in serumfreiem Medium äquilibriert. Das Medium wurde entfernt, die Vertiefungen der 24-Well Platte mit 700 µl Medium/5 % FKS befüllt und die Einsätze in den Wells positioniert. Pro Well wurden  $2,5 \times 10^5$  Perizyten,  $2,5 \times 10^5$  A1207 oder  $2,5 \times 10^4$  U87 Zellen in 200 µl Medium/0,1 % FKS in den Einsatz pipettiert und 5 h kultiviert. Nicht migrierte Zellen auf der inneren Filterseite wurden mit Hilfe eines Wattestäbchens entfernt. Die Färbung von migrierten Zellen auf der Filteraußenseite erfolgte mit dem Diff-Quick Kit (Dade Diagnostika GmbH, München, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Die Anzahl migrierter Zellen wurde in 20 Sichtfeldern/Polycarbonat-Filter bei 200x Vergrößerung (BZ-8000; Keyence, Osaka, Japan) gezählt.

#### 4.5.2 *Tube formation assay*

Mit Hilfe des *tube formation assays* wurde die Fähigkeit von Zellen untersucht, in einer Kokultur blutgefäßähnliche Strukturen und Gefäßmaschen zu bilden. Dazu wurde ein 1:4 und 1:10 Verhältnis von Perizyten zu HUVEC getestet. Das Anwachsen von Zellen am Boden der Wells wurde durch eine Beschichtung mit *matrigel* (50 µl/Well) verhindert. Insgesamt wurden  $1,5 \times 10^4$  Zellen pro Vertiefung einer 96-Well Platte ausgesät. Nach 48 h wurde die Anzahl von Gefäßmaschen pro *high power field* (HPF) detektiert. Zudem wurden Perizyten mit DMSO (Vehikel), CX-4945 (10 µM) oder TBB (50 µM) behandelt, nach 48 h Inkubation mit PKH67 (*green fluorescence linker* (Sigma-Aldrich)) nach Herstellerangaben markiert, gewaschen und dann mit HUVEC in einer 1:10 Kokultur ausgesät. Nach 6 h und 24 h wurde die Anzahl von

Gefäßmaschen pro HPF mittels Phasen-Kontrast- und Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte mit der ImageJ Software (U.S. NIH).

#### 4.5.3 Spheroid sprouting assay

Das angiogene Potential von Zellen kann an Hand von auswachsenden Zellen (Sprouts) aus Sphäroiden untersucht werden. Dazu wurden 500 Perizyten in 100 µl Medium/0,24 % Methylcellulose resuspendiert und in 96-Well Platten (*non-adherent, round bottom*) ausgesät (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland). Nach 24 h Inkubation wurden die Sphäroide in Kollagen-Lösung aufgenommen (150 Sphäroide/ml). Pro Vertiefung einer 24-Well Platte wurden 300 µl der Sphäroid-Kollagen-Mischung ausgesät und für 45 min inkubiert (37 °C). Die Behandlung der Sphäroide erfolgte durch Überschichtung der Sphäroid-Kollagen-Mischung mit 400 µl Medium, versetzt mit DMSO (Vehikel), CX-4945 (10 µM) oder TBB (50 µM). Nach 48 h Inkubation wurde das Aussprossen von Einzelzellen aus den Sphäroiden mittels Phasen-Kontrast-Mikroskopie visualisiert und die kumulative Sprosslänge quantitativ analysiert.

### 4.6 Versuchstiere

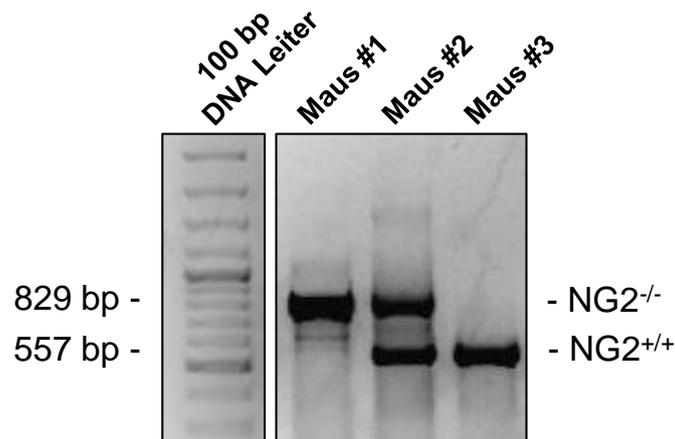
Die in dieser Arbeit verwendeten Versuchstiere wurden unter einem 12 h/12 h-Tag/Nacht-Zyklus mit Pellet-Futter und Wasser *ad libitum* gehalten. NG2-CreERT2 Mäuse (TgH(NG2-CreERT2)) wurden mit Reporter-mäusen (B6; 129S6-Gt(ROSA)26Sor<sup>tm9(CAG-tdTomato)Hze/J</sup> (Ai14)) verpaart, um einen *knock-in* im NG2-Gen zu generieren, der in einem funktionalen KO des NG2-Gens resultiert [106]. Homozygote NG2-CreERT2xRosa26-tdTomato-Mäuse (NG2<sup>-/-</sup>), sowie C57BL/6N Wildtyp-Mäuse (NG2<sup>+/+</sup>) wurden mit einem Körpergewicht von 25-35 g als Spender für die Entnahme von Aorten verwendet. Die Implantation von *matrigel plugs* erfolgte in 8 bis 12 Wochen alten CD1 nu/nu Mäusen mit einem Körpergewicht von 25-30 g.

Alle Experimente wurden vom Landesamt für Verbraucherschutz Saarland (Fachbereich 4.2: Gewerblicher Tierschutz, amtstierärztlicher Dienst) genehmigt (Genehmigungsnummer: 01/2019). Die Versuche wurden in Übereinstimmung mit der deutschen Tierschutzgesetzgebung sowie dem Leitfaden der nationalen Gesundheitsinstitute (NIH) für die Pflege und Verwendung von Versuchstieren (Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council, Washington, DC, USA) durchgeführt.

#### 4.6.1 Genotypisierung

Die Genotypisierung von NG2-CreERT2xRosa26-tdTomato-Mäusen erfolgte mit dem SampleIN™ Direct PCR Kit (HighQu) nach Angaben des Herstellers. Dazu wurde genomische DNA aus Gewebeproben von Ohrstanzen extrahiert und für eine PCR mit den folgenden Primern verwendet: NG2wt-fw: 5'-GGCAAACCCAGAGCCCTGCC-3', NG2wt-rv: 5'-GCTGGAGCTGACAGCGGGTG-3' und NG2CreERT-rv: 5'-GCCCGGACCGACGATGAAGC-

3'. Die PCR-Amplifikate wurden anschließend in einem 2 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die DNA-Banden durch ein anschließendes Ethidiumbromidbad gefärbt. Die Detektion erfolgte mit dem Molecular Imager® Gel Doc™ XR System und der zugehörigen Image Lab Software (Bio-Rad). Dabei wurde zwischen einem homozygoten NG2-KO (NG2<sup>-/-</sup>: Maus #1: 829 bp), einem heterozygoten NG2-KO (NG2<sup>+/-</sup> Maus #2: 829 bp + 557 bp) und dem NG2-Wildtyp (NG2<sup>+/+</sup> Maus #3: NG2<sup>+/+</sup>: 557 bp) unterschieden (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Repräsentative Genotypisierung von 3 Mäusen.** Aus den Ohrstanzen von 3 Mäusen wurde DNA extrahiert und für eine PCR mit folgenden Primern verwendet: NG2wt-fw: 5'-GGCAAACCCAGAGCCCTGCC-3', NG2wt-rv: 5'-GCT GGA GCT GAC AGC GGG TG-3' und NG2CreERT-rv: 5'-GCCCGGACCGACGATGAAGC-3'. Die PCR-Amplifikate wurden anschließend auf einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid in der Gel Doc detektiert. Die Größe der Amplifikate wurde an Hand der 100 bp DNA Leiter bestimmt.

#### 4.6.2 Matrigel plug assay

Die Versuchstiere wurden mittels Isofluran narkotisiert (Einleitung bei 4 %, Erhaltung bei 2 %). Anschließend wurde die Flanke der Mäuse rasiert (Aesculap Spezial GT416; Aesculap, Tuttlingen). Für die Analyse der angiogenen Aktivität von NG2<sup>-/-</sup> und NG2<sup>+/-</sup> Mäusen wurden *matrigel plugs* subkutan in die Flanke von je 6 Mäusen injiziert. Unmittelbar vor Injektion wurden hierzu 150 µl Medium mit 150 µl *matrigel* (~20 mg/ml) vermischt, das VEGF (2 µg/ml), *basic fibroblast growth factor* (bFGF) (2 mg/ml) und Heparin (100 IU/ml) enthielt.

Zudem wurde der Einfluss einer CK2-Inhibition in Perizyten auf die Ausbildung von Blutgefäßen untersucht. Dazu wurden Perizyten für 48 h mit CX-4945 (10 µM) vorbehandelt und abgelöst. Anschließend wurden 1,5x10<sup>4</sup> vorbehandelte Perizyten mit 1,5x10<sup>5</sup> HUVEC in 150 µl Medium aufgenommen, mit 150 µl *matrigel* gemischt und subkutan in die Flanke von CD1 nu/nu Mäusen injiziert. Nach 7 Tagen wurden die Versuchstiere mittels intraperitonealer Narkose (Ketamin (100 mg/kg) Körpergewicht (KG)/Xylazin (10 mg/kg KG) in 0,9 % NaCl) anästhesiert und durch zervikale Dislokation getötet. Die *matrigel plugs* wurden reseziert und immunhistochemisch mit murinem oder humanem anti-CD31 Antikörper analysiert.

#### 4.6.2.1 Immunhistochemie

Die *matrigel plugs* wurden direkt nach der Probenentnahme in 4 % Formalin fixiert (24 h, RT). Mittels Gewebereinbettter (SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland) wurden die Proben mit einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Paraffin eingebettet. Für die immunhistochemischen Färbungen wurden 3 µm-dünne Schnitte von den Proben hergestellt und mit Citracon-Puffer (60 min, 97 °C) permeabilisiert. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen mittels Ziegen-Serum (3 %) blockiert (30 min, RT) und der Primärantikörper (*Tabelle 7*) über Nacht inkubiert (4 °C).

**Tabelle 7: Primär- und Sekundärantikörper, die für die immunhistochemischen Färbungen der *matrigel plugs* verwendet wurden.**

Antikörperbezeichnung	Verdünnung	Inkubation	Hersteller
Anti-CD31 (DIA310)	1:100	4 °C, über Nacht	Dianova GmbH (Hamburg, Deutschland)
Anti-Rat IgG (H+L)-Alexa Fluor 555	1:100	75 min, RT	Thermo Fisher Scientific
Anti-CD31 (EPR3094)	1:100	4 °C, über Nacht	Abcam
Anti-Rabbit IgG (H+L)-Alexa Fluor 555	1:100	75 min, RT	Thermo Fisher Scientific

Die Inkubation mit dem jeweiligen Alexa 555-konjugierten Sekundärantikörper (*Tabelle 7*) erfolgte für 75 min im Dunkeln (RT). Abschließend wurden die Zellkerne mit Hoechst 33342 (2 µg/ml) angefärbt. Die Präparate wurden mithilfe eines BX60 Fluoreszenz-Mikroskops von Olympus (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) in 200x Vergrößerung visualisiert und die quantitative Analyse erfolgte Software-unterstützt mit ImageJ.

#### 4.6.3 Aortic ring assay

Mit Hilfe von Aortenringen kann die angiogene Aktivität von Perizyten *ex vivo* analysiert werden. Dazu wurden die in 4.6.2 verwendeten Versuchstiere nach der Entnahme des *matrigel plug* als Spendertiere für die Aortenringe verwendet. Nach einer medianen Laparotomie und der Auslagerung der Organe wurde die thorakale Aorta freigelegt, reseziert, in eine 6 cm Schale mit Medium/10%FKS/P/S überführt und gründlich von Fett und Gewebe befreit. Die Aorta von NG2<sup>-/-</sup> und NG2<sup>+/+</sup> Mäusen wurde in 0,5 mm breite Ringe geschnitten und in flüssiges

*matrigel* eingebettet. Nach Polymerisation wurde das *matrigel* mit DMEM/FKS überschichtet, das entweder mit DMSO (Vehikel) oder CX-4945 (10  $\mu$ M) versetzt war. Das Medium wurde nach 3 Tagen gewechselt. Nach insgesamt 6 Tagen Inkubation bei 37 °C wurde die Sprossfläche der Aortenringe mit Hilfe von Phasen-Kontrast Mikroskopie (BZ-8000; Keyence) visualisiert. Die Quantifizierung erfolgte mit der ImageJ Software (U.S. NIH).

## 4.7 Statistik

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten wurden zunächst auf Normalverteilung und gleichmäßige Varianz geprüft. Gezeigt sind Mittelwerte (MW), die aus Einzelmessungen generiert wurden, unter Angabe der Standardabweichung (*standard deviation* (SD)). Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mittels ungepaartem Student's t-Test auf Signifikanz überprüft. Beim Vergleich von mehreren Gruppen wurde eine *one way analysis of variance* (ANOVA) gefolgt von einem *Tukey post-hoc Test* mit Korrektur des  $\alpha$ -Fehlers nach Bonferroni durchgeführt. Alle statistischen Analysen wurden mit Hilfe der Prism software 8 (GraphPad) durchgeführt. Ein P-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant definiert und entsprechend in den Abbildungen gekennzeichnet.

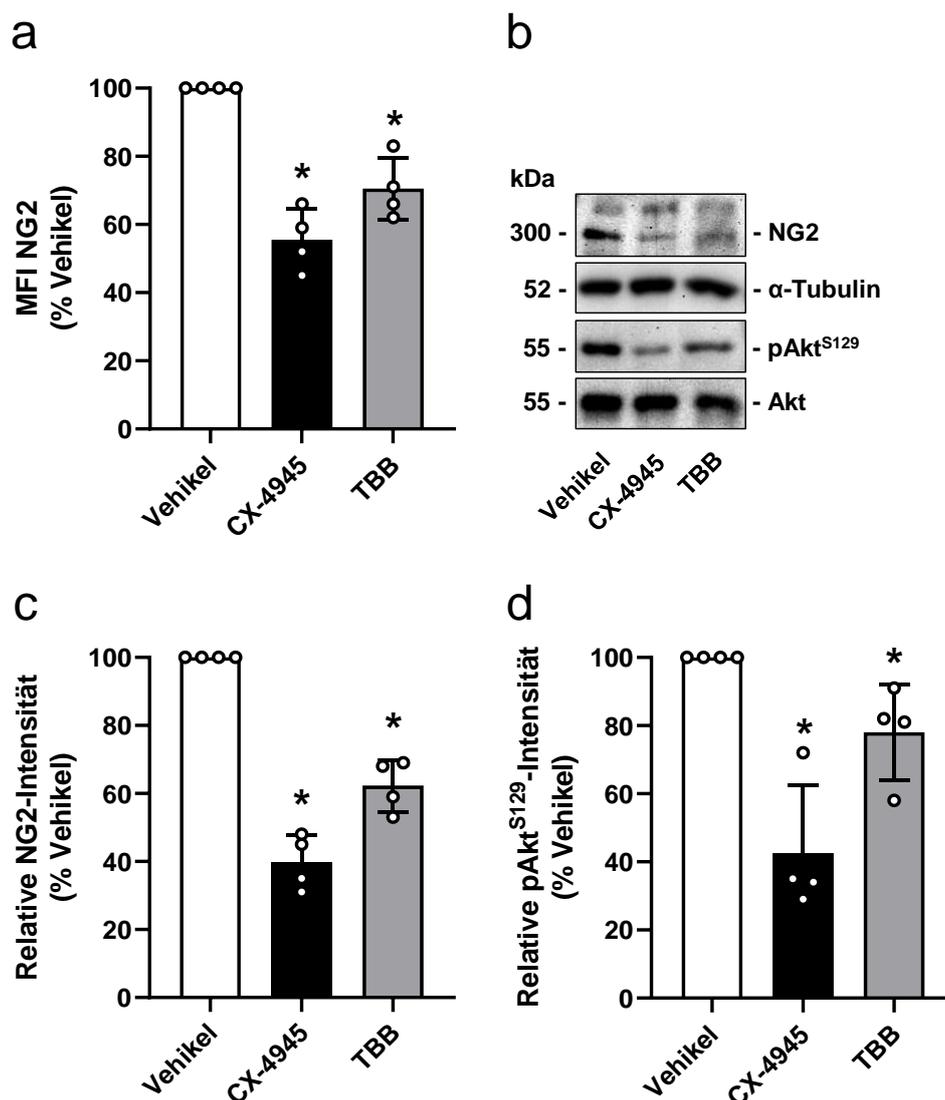
## 5 Ergebnisse

### 5.1 Die CK2 reguliert über NG2 angiogene Prozesse in Perizyten

#### 5.1.1 Eine Inhibition der CK2 reduziert den NG2-Proteingehalt in primären humanen Perizyten

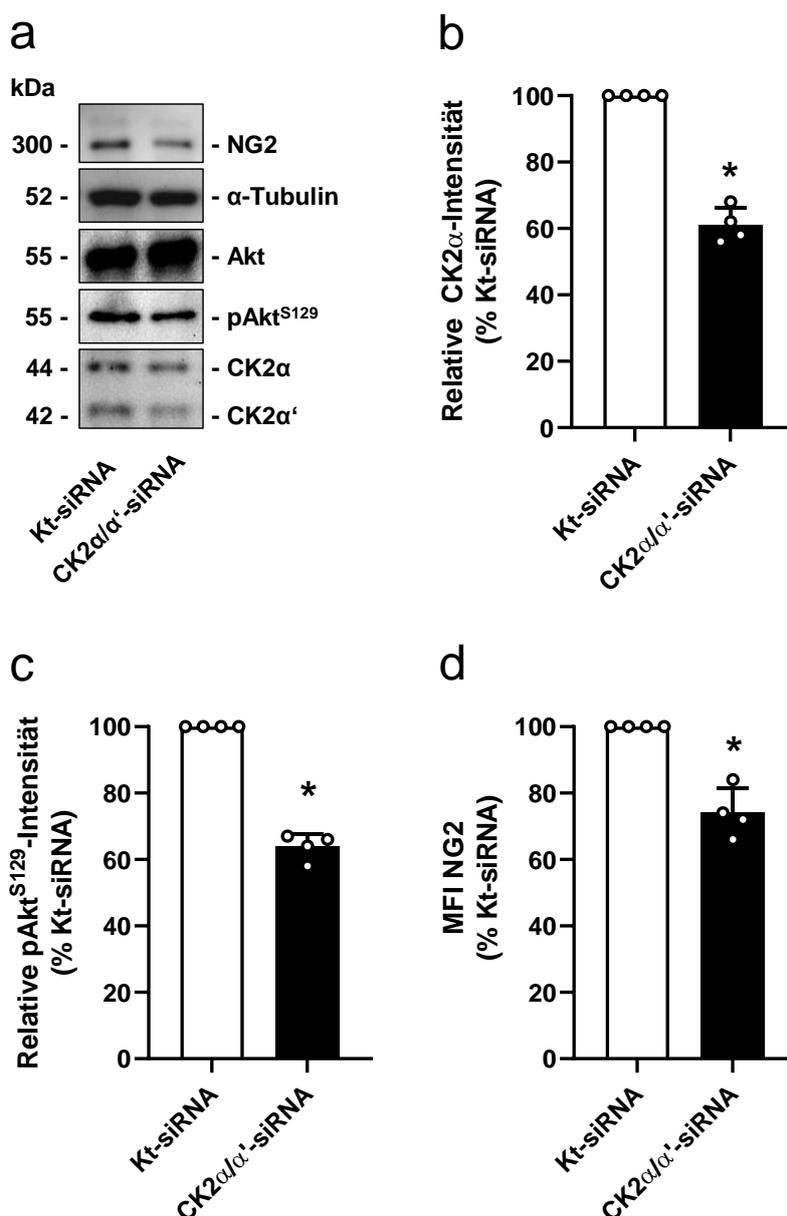
Das von Perizyten exprimierte NG2 ist maßgeblich an angiogenen Prozessen beteiligt. Entsprechend führen die Herunterregulation oder ein KO des Proteoglykans zu einer deutlichen Reduktion der Angiogenese [26,34]. Allerdings ist über den molekularen Mechanismus der NG2-Expression bislang nur wenig bekannt. Daher war es ein Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, ob die CK2 neben Endothelzellen auch die angiogene Aktivität von Perizyten reguliert. Hierzu wurde zunächst der Effekt einer CK2-Inhibition auf den Proteingehalt von NG2 in Perizyten analysiert. Dazu wurden die Zellen mit Vehikel, CX-4945 (10  $\mu$ M) oder TBB (50  $\mu$ M) behandelt. Anschließend wurde der NG2-Proteingehalt mittels Durchflusszytometrie (*Abbildung 11a*) und Western Blot (*Abbildung 11b und c*) bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass sowohl die CX-4945- als auch die TBB-Behandlung von Perizyten deren NG2-Proteingehalt im Vergleich zur Vehikel-Behandlung signifikant reduziert. Zudem wurde die Effizienz der CK2-Hemmung mit Hilfe eines Antikörpers nachgewiesen, der die spezifische CK2-abhängige Phosphorylierung von Akt an der Aminosäure Serin 129 (pAkt<sup>S129</sup>) erkennt [79,107]. Die Western Blot-Analysen von pAkt<sup>S129</sup> zeigten eine starke Abnahme der Phosphorylierung, was auf eine effektive Inhibition der CK2 durch CX-4945 und TBB schließen lässt (*Abbildung 11b und d*).

Die hier verwendeten CK2-Inhibitoren zeichnen sich durch eine hohe Effektivität aus. So konnte an Hand von *in vitro* Experimenten für TBB ein  $K_i$ -Wert von 0,4  $\mu$ M und für CX-4945 ein  $K_i$ -Wert von 0,38 nM bestimmt werden [90,97,98]. Trotzdem ist nicht auszuschließen, dass durch die Inhibition weitere Kinasen gehemmt werden und somit der NG2-Proteingehalt unabhängig von der CK2 reduziert wird. Daher sollten in der vorliegenden Arbeit die bisherigen Beobachtungen durch einen KD der beiden katalytischen Untereinheiten CK2 $\alpha$  und CK2 $\alpha'$  verifiziert werden. Zu diesem Zweck wurden Perizyten mit siRNA gegen CK2 $\alpha$  und CK2 $\alpha'$  transfiziert.



**Abbildung 11: Eine CK2-Inhibition reduziert den NG2-Proteingehalt in primären humanen Perizyten.** (a) Die Zellen wurden für 48 h mit Vehikel, CX-4945 (10  $\mu$ M) oder TBB (50  $\mu$ M) behandelt. Die MFI von NG2-positiven Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt und in Relation zu Vehikel in % angegeben. MW  $\pm$  SD. \*P < 0,05 vs. Vehikel (n = 4). (b) Die Zellen wurden wie in (a) beschrieben behandelt und Zellextrakte generiert. Die Zellextrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und der Proteingehalt von NG2, pAkt<sup>S129</sup>, Akt und  $\alpha$ -Tubulin (als Ladekontrolle) im Western Blot mit spezifischen Antikörpern bestimmt. (c und d) Quantitative Analyse des Proteingehalts von NG2 (c) und pAkt<sup>S129</sup> (d). Die Zellen wurden wie in (a) beschrieben behandelt und für Western Blot-Analysen verwendet. NG2 wurde normiert auf  $\alpha$ -Tubulin und pAkt<sup>S129</sup> wurde normiert auf Akt. Die erhobenen Daten wurden als relative Intensität in Relation zu Vehikel in % angegeben. MW  $\pm$  SD. \*P < 0,05 vs. Vehikel (n = 4).

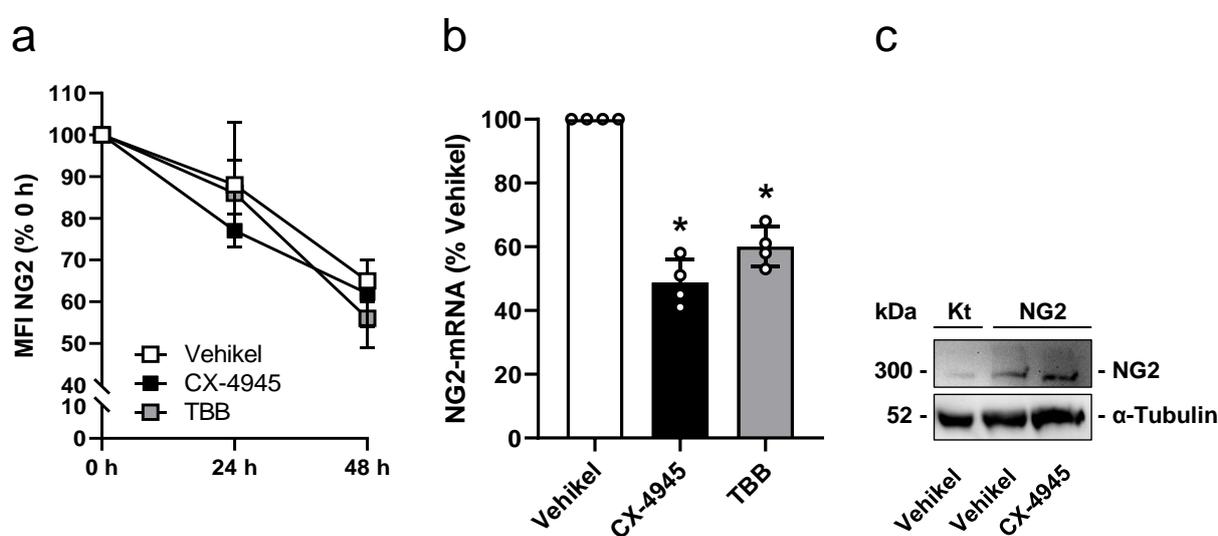
Wie erwartet resultierte der KD von CK2 $\alpha$  und CK2 $\alpha'$  in einem deutlich verringerten Proteingehalt der katalytischen Untereinheiten und einer reduzierten Phosphorylierung von Akt<sup>S129</sup> im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 12a-c). Die durchflusszytometrische Analyse von NG2 in Perizyten nach dem KD von CK2 $\alpha$  und CK2 $\alpha'$  ergab weiterhin eine signifikante Reduktion des Proteingehalts im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 12d).



**Abbildung 12: Ein KD von CK2α und CK2α' reduziert den NG2-Proteingehalt in primären humanen Perizyten.** (a) Die Zellen wurden mit Kt-siRNA oder CK2α/α'-siRNA transfiziert. Nach 48 h wurden Zellextrakte generiert. Die Zellextrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Der Proteingehalt von NG2, pAkt<sup>S129</sup>, Akt, CK2α, CK2α' und α-Tubulin (als Ladekontrolle) wurde mit spezifischen Antikörpern im Western Blot bestimmt. (b und c) Quantitative Analyse des Proteingehalts von CK2α (b) und pAkt<sup>S129</sup> (c). Die Zellen wurden wie in (a) beschrieben transfiziert und für Western Blot-Analysen verwendet. CK2α wurde normiert auf α-Tubulin und pAkt<sup>S129</sup> wurde normiert auf Akt. Die erhobenen Daten wurden als relative Intensität in Relation zu Kt-siRNA in % angegeben. (d) Perizyten wurden wie in (a) beschrieben transfiziert und die MFI von NG2-positiven Zellen durchflusszytometrisch bestimmt und in Relation zu Kt-siRNA in % angegeben. MW ± SD. \*P < 0,05 vs. Kt-siRNA (n = 4).

Ein reduzierter Proteingehalt kann auf einer beschleunigten Proteindegradation oder einer reduzierten Genexpression basieren. Zuerst wurde daher untersucht, wie sich eine CK2-Inhibition auf die Proteinestabilität von NG2 auswirkt. Dazu wurde die Translation in Perizyten mittels CHX inhibiert. Anschließend wurden die Zellen mit Vehikel, CX-4945 (10 μM) oder TBB (50 μM) behandelt. Der Proteingehalt von NG2 wurde über einen Zeitraum von 48 h

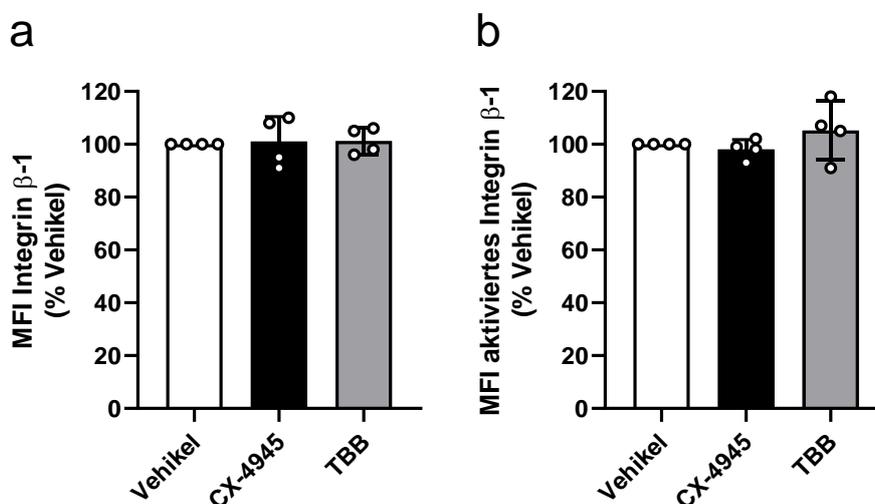
durchflusszytometrisch untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass der NG2-Proteingehalt über den gesamten Zeitraum kontinuierlich und ohne Unterschied zwischen den Gruppen abnimmt (Abbildung 13a). Daher ist anzunehmen, dass eine CK2-Inhibition die Proteinstabilität von NG2 nicht beeinflusst. Anschließend wurde der Effekt der CK2-Hemmung auf die Genexpression von NG2 untersucht. Interessanterweise ergaben die durchgeführten qRT-PCR-Analysen im Vergleich zur Kontrolle einen signifikant verringerten Gehalt von NG2-mRNA in CX-4945- und TBB-behandelten Perizyten (Abbildung 13b). Diese Ergebnisse wurden durch die Überexpression von NG2 bestätigt. Hierbei zeigte sich, dass die CK2-Inhibition nicht den Proteingehalt von exogenem NG2 reduziert (Abbildung 13c).



**Abbildung 13: Eine CK2-Inhibition erniedrigt die NG2-Genexpression in primären humanen Perizyten.** (a) Die Zellen wurden in Anwesenheit von CHX mit Vehikel, CX-4945 (10  $\mu$ M) oder TBB (50  $\mu$ M) behandelt. Nach 0 h, 24 h und 48 h wurde die MFI von NG2-positiven Zellen durchflusszytometrisch detektiert und in Relation zur MFI zum Zeitpunkt 0 h in % angegeben. MW  $\pm$  SD (n = 4). (b) Die Zellen wurden für 48 h mit Vehikel, CX-4945 (10  $\mu$ M) oder TBB (50  $\mu$ M) behandelt. Anschließend wurde die RNA isoliert und der mRNA-Gehalt von NG2 und GAPDH (als Haushaltsgen) mittels qRT-PCR bestimmt. Der NG2-mRNA-Gehalt wurde quantitativ analysiert, auf GAPDH normiert und in Relation zu Vehikel in % angegeben. MW  $\pm$  SD. \*P < 0,05 vs. Vehikel (n = 4). (c) Die Zellen wurden mit einem Kontrollplasmid (Kt) oder dem NG2-Plasmid transfiziert, 48 h inkubiert und für 24 h mit Vehikel oder CX-4945 (10  $\mu$ M) behandelt. Anschließend wurden Zellextrakte generiert. Die Zellextrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und der Proteingehalt von NG2 und  $\alpha$ -Tubulin (als Ladekontrolle) mit spezifischen Antikörpern im Western Blot bestimmt.

Studien konnten zeigen, dass NG2 als verstärkendes Hilfsprotein von Integrin  $\beta$ -1 fungieren kann, wenn beide Proteine in derselben Zelle exprimiert werden [28]. Durch die Bindung des Proteoglykans an das Integrin  $\beta$ -1-Heterodimer wird dessen Aktivität und so verschiedene Prozesse, wie Proliferation, Migration und Angiogenese, gefördert [19,51]. Die Herunterregulation des Proteoglykans kann die Aktivität von Integrin  $\beta$ -1 und somit die assoziierten Signalwege beeinflussen [33]. Daher wurde in einem nächsten Experiment untersucht, ob die CK2-abhängige Reduktion der Genexpression und des Proteingehalts von NG2 auch die Aktivität von Integrin  $\beta$ -1 beeinflusst. Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie

zeigten, dass weder CX-4945 noch TBB den Proteingehalt oder die Aktivität von Integrin  $\beta$ -1 reduziert (Abbildung 14a und b).

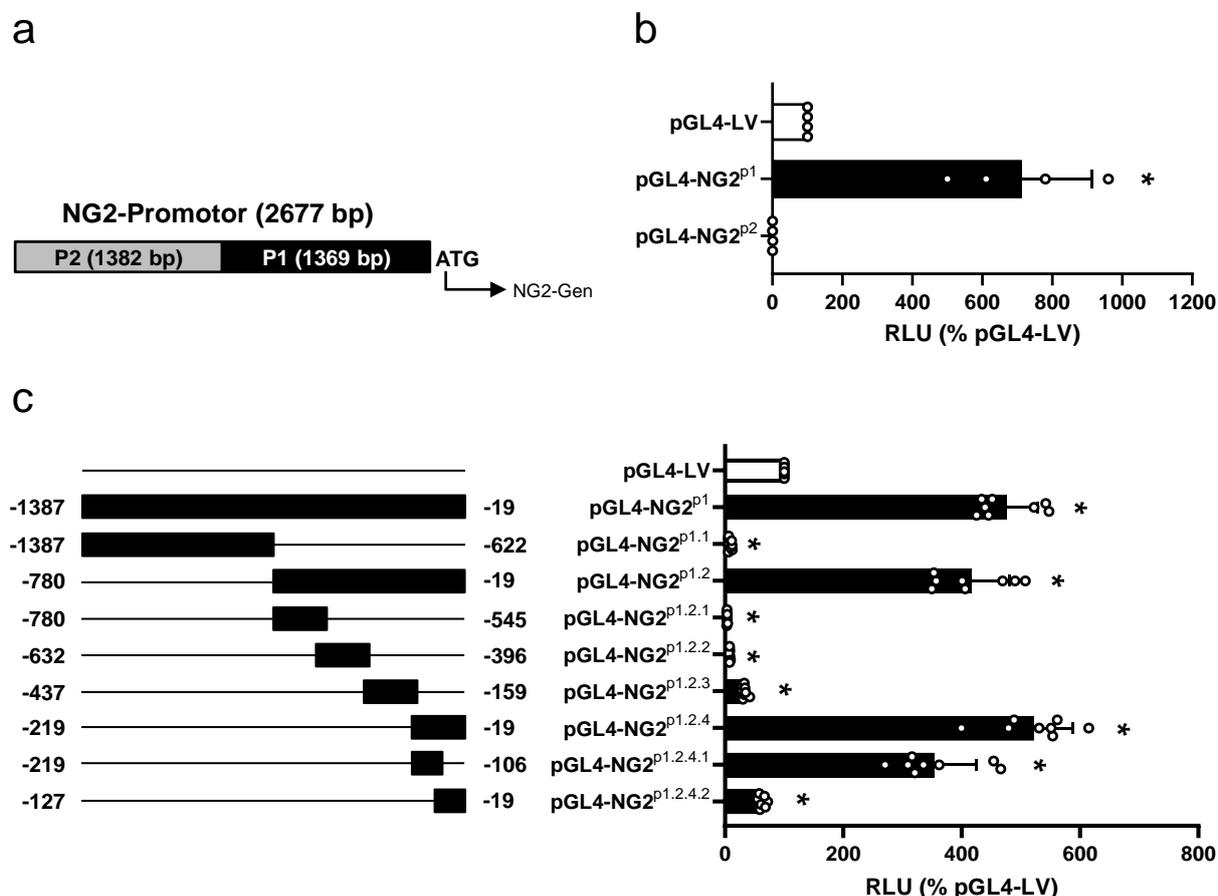


**Abbildung 14: Eine CK2-Inhibition hat keinen Einfluss auf die Aktivierung von Integrin  $\beta$ -1 in primären humanen Perizyten.** (a und b) Die Zellen wurden für 48 h mit Vehikel, CX-4945 (10  $\mu$ M) oder TBB (50  $\mu$ M) behandelt. Die MFI von Integrin  $\beta$ -1 (a) und aktiviertem Integrin  $\beta$ -1 (b) wurde durchflusszytometrisch bestimmt und in Relation zu Vehikel in % angegeben. MW  $\pm$  SD. \* $P < 0,05$  vs. Vehikel ( $n = 4$ ).

### 5.1.2 Eine Inhibition der CK2 reprimiert die Promotoraktivität von NG2

Aus den bisher gezeigten Daten geht hervor, dass die CK2 die NG2-Genexpression in Perizyten reguliert. Allerdings ist der humane NG2-Promotor bislang kaum charakterisiert und es sind nur wenige Transkriptionsfaktoren bekannt, welche die NG2-Genexpression steuern [55]. In einem nächsten Schritt sollte daher der humane NG2-Promotor charakterisiert werden, um mögliche CK2-abhängige Transkriptionsfaktoren zu identifizieren. Dazu wurde aus primären humanen Perizyten genomische DNA extrahiert. Mittels PCR wurde eine 2677 bp große Region in 5'-Richtung vor dem Transkriptionsstart von NG2 amplifiziert und in die Fragmente P1 und P2 unterteilt (Abbildung 15a). Für Reporteragen-Analysen wurden die Promotorfragmente P1 und P2 in einen Luciferase-Vektor (pGL4) kloniert und HEK-293-Zellen mit den resultierenden Expressionsplasmiden (pGL4-NG2<sup>p1</sup> und pGL4-NG2<sup>p2</sup>) transfiziert. Die transkriptionelle Aktivität der Fragmente wurde mittels Luciferase-Test bestimmt. Die Analyse ergab, dass das Fragment pGL4-NG2<sup>p1</sup> eine erhöhte transkriptionelle Aktivität im Vergleich zur Kontrolle (pGL4-LV) besitzt. Im Gegensatz dazu zeigte das Fragment pGL4-NG2<sup>p2</sup> eine verringerte Aktivität im Vergleich zu pGL4-LV (Abbildung 15b). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde P1 weiter fragmentiert (P1.1-P1.2.4.2) und mittels Reporteragen-Analysen die transkriptionelle Aktivität der jeweiligen Fragmente (pGL4-NG2<sup>p1.1</sup>-pGL4-NG2<sup>p1.2.4.2</sup>) analysiert (Abbildung 15c). Die Aktivität von pGL4-NG2<sup>p1.2</sup>, pGL4-NG2<sup>p1.2.4</sup> und pGL4-NG2<sup>p1.2.4.1</sup> war signifikant erhöht, während die restlichen Expressionsplasmide eine deutlich

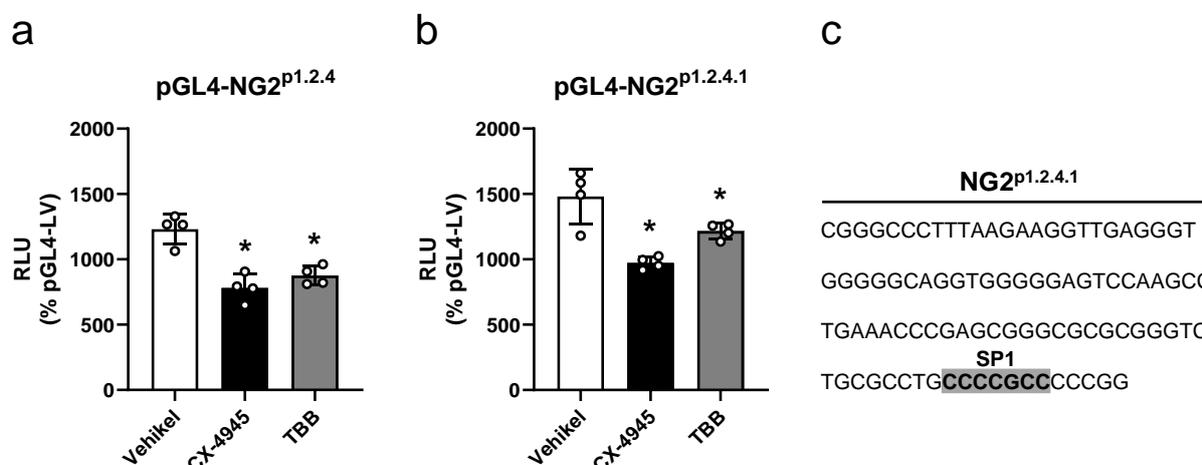
reduzierte Aktivität im Vergleich zu pGL4-LV zeigten (Abbildung 15c). Es ist daher naheliegend, dass pGL4-NG2<sup>p1.2.4.1</sup> ein Kernstück des NG2-Promotors ist, da alle NG2-Promotorfragmente mit einer erhöhten transkriptionellen Aktivität diese Region beinhalten.



**Abbildung 15: Feinanalyse des humanen NG2-Promotors.** (a) Schematische Darstellung der putativen Promotorregion (2677 bp) von NG2, fragmentiert in die Abschnitte P1 und P2. (b) Aus primären humanen Perizyten wurde genomische DNA isoliert und mittels PCR eine 2677 bp große Region vor dem NG2-Startcodon amplifiziert und fragmentiert. P1 und P2 wurden in einen Luciferase-Vektor (pGL4) kloniert und HEK-293-Zellen mit den entstandenen Expressionsplasmiden (pGL4-NG2<sup>p1</sup>, pGL4-NG2<sup>p2</sup> und pGL4-LV (als Kontrolle)) transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und die transkriptionelle Aktivität an Hand der RLU mittels Luciferase-Test bestimmt. Die Luciferase-Aktivität ist in Relation zu pGL4-LV in % angegeben. (c) P1 wurde weiter in P1.1 bis P1.2.4.2 fragmentiert (linke Seite) und die Fragmente in pGL4 kloniert. Anschließend wurden HEK-293-Zellen mit den entstandenen Expressionsplasmiden (pGL4-NG2<sup>p1.1</sup> bis pGL4-NG2<sup>p1.2.4.2</sup> und pGL4-LV (als Kontrolle)) transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und die transkriptionelle Aktivität wurde an Hand der RLU mittels Luciferase-Test bestimmt. Die Luciferase-Aktivität ist in Relation zu pGL4-LV in % angegeben (rechte Seite). MW  $\pm$  SD. \*P < 0,05 vs. pGL4-LV (n = 4).

Mit weiterführenden Reporteragen-Analysen wurde überprüft, ob die CK2 einen genregulatorischen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität der putativen NG2-Promotorregion hat. Dazu wurden HEK-293-Zellen mit den Expressionsplasmiden pGL4-NG2<sup>p1.2.4</sup> und pGL4-NG2<sup>p1.2.4.1</sup> transfiziert und anschließend für 24 h mit Vehikel, CX-4945 (10  $\mu$ M) oder TBB (50  $\mu$ M) behandelt. Aus den Reporteragen-Analysen ging eine signifikant reduzierte transkriptionelle Aktivität von CX-4945- und TBB-behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle hervor (Abbildung 16a und b). Mit Hilfe von zusätzlichen *in-silico* Analysen konnte

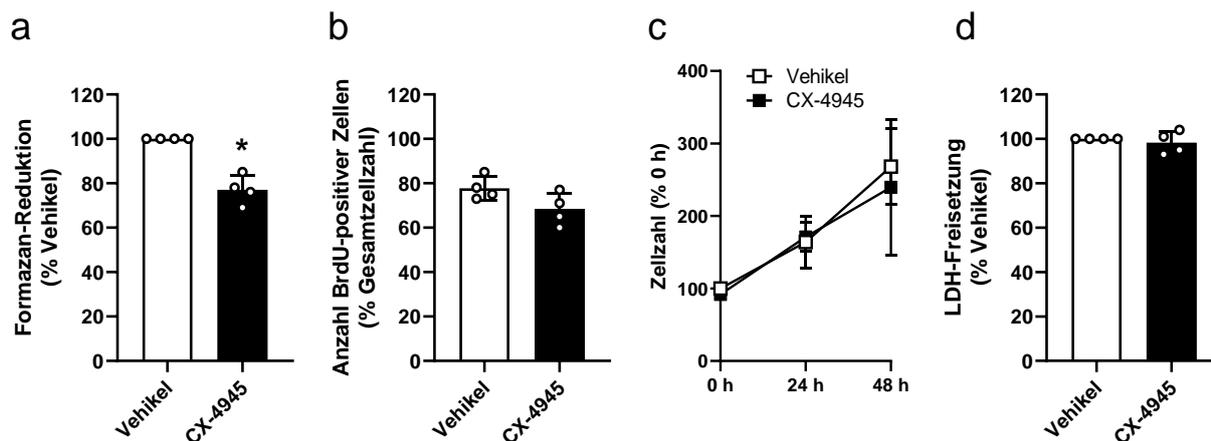
die Konsensus-Sequenz des Transkriptionsfaktors Sp1 in der Nukleotidsequenz des Fragments P1.2.4.1 lokalisiert werden (Abbildung 16c).



**Abbildung 16: Eine CK2-Inhibition reduziert die transkriptionelle Aktivität der NG2-Promotorfragmente P1.2.4 und P1.2.4.1.** (a und b) HEK-293-Zellen wurden mit dem Leervektor pGL4-LV (als Kontrolle), dem Expressionsplasmid pGL4-NG2<sup>P1.2.4</sup> (a) oder pGL4-NG2<sup>P1.2.4.1</sup> (b) transfiziert und für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h mit Vehikel, CX-4945 (10  $\mu$ M) oder TBB (50  $\mu$ M) behandelt und lysiert. Die transkriptionelle Aktivität wurde an Hand der RLU mittels Luciferase-Test bestimmt, auf die RLU von pGL4-LV normiert und in % angegeben. MW  $\pm$  SD. \*P < 0,05 vs. Vehikel (n = 4). (c) Nukleotidsequenz von P1.2.4.1 mit der darin befindlichen Sp1-Konsensussequenz (grau hervorgehoben).

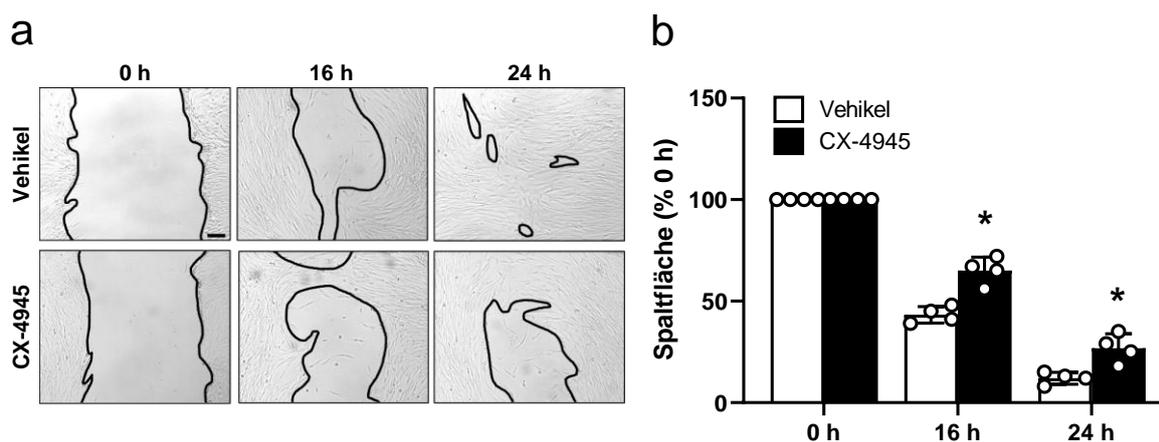
### 5.1.3 Eine Inhibition der CK2 reduziert die Proliferation und Migration von primären humanen Perizyten

In den vorherigen Abschnitten konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der CK2 in Perizyten zu einer Reduktion der Genexpression und des Proteingehalts von NG2 führt. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Effekte einer CK2-abhängigen Reduktion von NG2 auf die Funktionalität der Perizyten zu untersuchen. Dazu wurden die Zellen für 48 h mit Vehikel oder CX-4945 (10  $\mu$ M) behandelt. Die Analyse der Formazan-Reduktion im WST-1 assay ergab eine verringerte metabolische Aktivität von CX-4945-behandelten Perizyten im Vergleich zu Vehikel-behandelten Kontrollen (Abbildung 17a). Im Gegensatz dazu hatte die CX-4945-Behandlung keinen Effekt auf die Inkorporation von BrdU in die DNA und somit auf die Proliferationsfähigkeit der Zellen (Abbildung 17b). Die Analyse der Zellzahl bestätigte dieses Ergebnis. Es konnte kein Unterschied zwischen Vehikel- und CX-4945-behandelten Perizyten festgestellt werden (Abbildung 17c). Zusätzliche Zytotoxizitätsuntersuchungen zeigten keine erhöhte LDH-Freisetzung in Folge der CX-4945-Behandlung im Vergleich zu Vehikel-behandelten Zellen (Abbildung 17d).



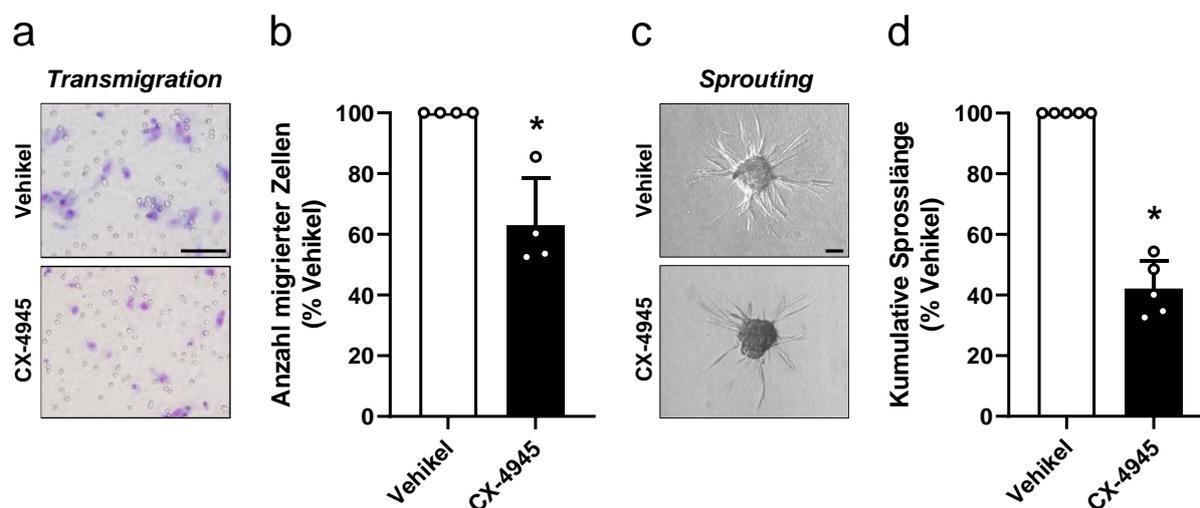
**Abbildung 17: Eine CK2-Inhibition zeigt keinen Effekt auf die Proliferation von primären humanen Perizyten.** (a) Die Zellen wurden für 48 h mit Vehikel oder CX-4945 (10  $\mu$ M) behandelt. Die metabolische Aktivität wurde im WST-1 assay an Hand der Formazan-Reduktion bestimmt, die in Relation zu Vehikel in % angegeben wurde. MW  $\pm$  SD. \* $P < 0,05$  vs. Vehikel ( $n = 4$ ). (b) Die Zellen wurden wie in (a) beschrieben behandelt, wobei nach 38 h zusätzlich BrdU-Reagenz zugegeben wurde. Anschließend wurde die MFI von BrdU-positiven Perizyten durchflusszytometrisch detektiert und in Relation zur Gesamtzellzahl in % angegeben. MW  $\pm$  SD ( $n = 4$ ). (c) Die Zellen wurden wie in (a) beschrieben behandelt und die Zellzahl nach 0 h, 24 h und 48 h bestimmt und in Relation zur Zellzahl zum Zeitpunkt 0 h in % angegeben. MW  $\pm$  SD ( $n = 4$ ). (d) Die Zellen wurden wie in (a) beschrieben behandelt und die Zytotoxizität von CX-4945 wurde mittels LDH-Test analysiert. Die LDH-Freisetzung wurde in Relation zu Vehikel in % angegeben. MW  $\pm$  SD ( $n = 4$ ).

Es ist bekannt, dass NG2 die Migration von Zellen fördert. Daher wurde in einem nächsten Experiment untersucht, ob die Inhibition der CK2 die Migrationsfähigkeit von Perizyten beeinträchtigt. Die Ergebnisse der *scratch* assays zeigten, dass die Spaltfläche von CX-4945-behandelten Zellen im Vergleich zu Vehikel-behandelten Kontrollen nach 16 h und 24 h signifikant größer war (Abbildung 18a und b). Folglich reduzierte die CK2-Inhibition die Migrationsfähigkeit der Perizyten.



**Abbildung 18: Eine CK2-Inhibition verringert die Migrationsfähigkeit von primären humanen Perizyten.** (a) Die Zellen wurden in Vertiefungen einer 24-Well Platte ausgesät und für 48 h mit Vehikel oder CX-4945 (10  $\mu$ M) behandelt. Anschließend wurde manuell ein zellfreier Spalt im Zellrasen generiert und die Fläche nach 0 h, 16 h und 24 h lichtmikroskopisch vermessen (Maßstab: 100  $\mu$ m). (b) Die Zellen wurden wie in (a) beschrieben behandelt und für *scratch* assays verwendet. Die zellfreie Fläche wurde nach 0 h, 16 h und 24 h detektiert und quantitativ analysiert und in Relation zur Spaltfläche zum Zeitpunkt 0 h in % angegeben. MW  $\pm$  SD. \* $P < 0,05$  vs. Vehikel ( $n = 4$ ).

Dieses Ergebnis wurde mit Hilfe von weiteren Experimenten verifiziert. Wie erwartet, konnte unter Verwendung des *transmigration* assays gezeigt werden, dass eine Behandlung mit CX-4945 die Migrationsfähigkeit der Zellen im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert (Abbildung 19a und b). *Spheroid sprouting* assays ergaben eine signifikant kleinere kumulative Sprosslänge in CX-4945-behandelten im Vergleich zu Vehikel-behandelten Perizyten (Abbildung 19c und d).

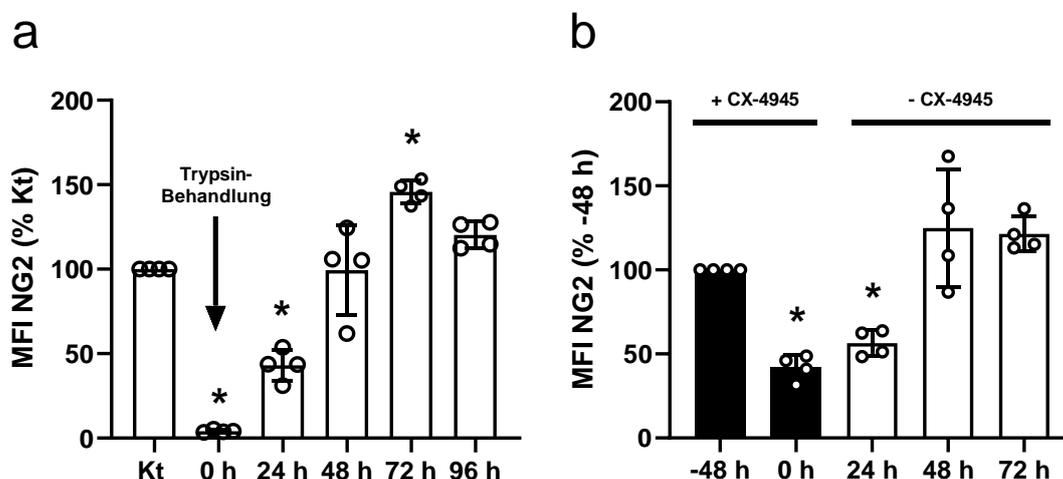


**Abbildung 19: Eine CK2-Inhibition reduziert die Fähigkeit von primären humanen Perizyten zu migrieren und auszusprossen.** (a) Die Zellen wurden für 48 h mit Vehikel oder CX-4945 (10  $\mu$ M) behandelt. Anschließend wurden die Zellen für einen transmigration assay ausgesät. Nach 5 h wurden die migrierten Zellen fixiert, gefärbt und lichtmikroskopisch detektiert (Maßstab: 100  $\mu$ m). (b) Perizyten wurden wie in (a) beschrieben behandelt und für transmigration assays verwendet. Quantitative Auswertung von migrierten Zellen, angegeben in Relation zu Vehikel in %. MW  $\pm$  SD. \*P < 0,05 vs. Vehikel (n = 4). (c) Die Zellen wurden wie in (a) beschrieben behandelt. Anschließend wurden Sphäroide generiert und das Auswachsen von Einzelzellen nach 48 h lichtmikroskopisch detektiert (Maßstab: 100  $\mu$ m). (d) Perizyten wurden wie in (a) beschrieben behandelt und für spheroid sprouting assays verwendet. Quantitative Analyse der kumulativen Sprosslänge, angegeben in Relation zu Vehikel in %. MW  $\pm$  SD. \*P < 0,05 vs. Vehikel (n = 5).

#### 5.1.4 Eine Inhibition der CK2 reduziert die angiogene Aktivität von primären humanen Perizyten *in vitro*

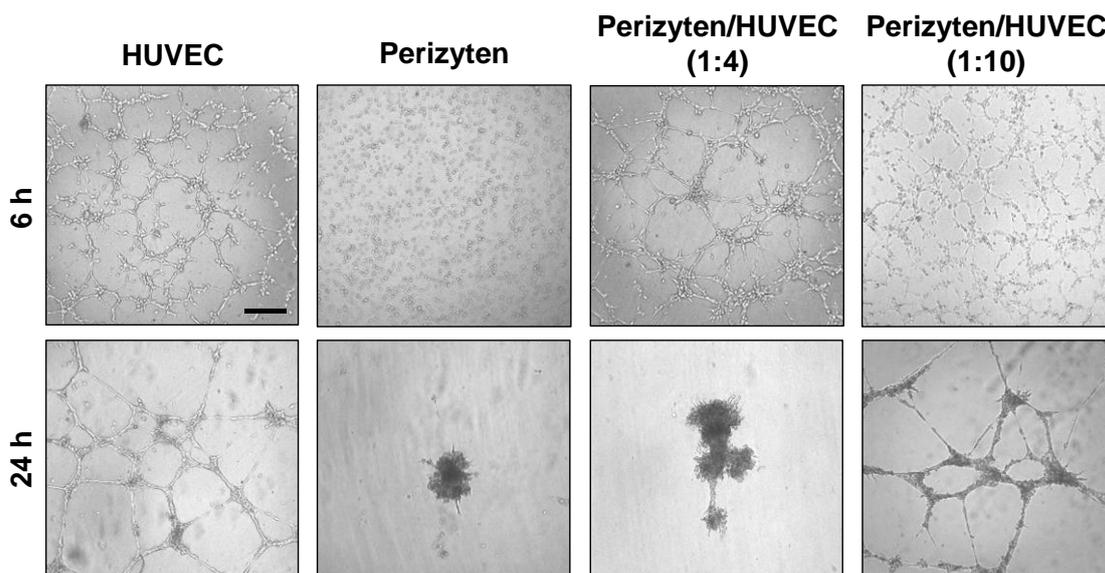
Perizyten fungieren bei der Angiogenese richtungsweisend für die ausprossenden Endothelzellen und gewährleisten die Funktionalität von Gefäßen, indem sie vor allem Gefäßabzweigungen stabilisieren [25,108]. Der Einfluss einer CK2-Hemmung auf diese Perizyten-abhängigen Prozesse wurde in einer Kokultur mit Endothelzellen mittels *tube formation* assays untersucht. Es ist bereits bekannt, dass eine CK2-Inhibition in Endothelzellen eine anti-angiogene Wirkung hat [84,93,95,109]. Daher wurden lediglich Perizyten mit CX-4945 (10  $\mu$ M) behandelt. Zunächst wurde die Biosynthesezeit von NG2 ermittelt und die Wirkung von CX-4945 auf den NG2-Proteingehalt untersucht. Durch eine Behandlung mit Trypsin konnte die extrazelluläre Domäne von NG2 vollständig abgespalten werden (Abbildung 20a). Anschließend wurde der NG2-Proteingehalt über einen Zeitraum von 96 h

detektiert. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass nach ~48 h der Proteingehalt von NG2 wieder den Ausgangswert der nicht-trypsinierten Zellen erreichte (*Abbildung 20a*). Zudem wurde der NG2-Proteingehalt nach Behandlung der Perizyten mit CX-4945 (10  $\mu$ M) über einen Zeitraum von 72 h detektiert. Aus der durchflusszytometrischen Analyse geht hervor, dass ebenfalls nach ~48 h der Ausgangswert des NG2-Proteingehalts wiederhergestellt war (*Abbildung 20b*). Allerdings konnte beobachtet werden, dass 24 h nach CX-4945-Behandlung der Proteingehalt von NG2 verglichen mit der Kontrolle (-48 h) immer noch signifikant reduziert war. Daher kann davon ausgegangen werden, dass eine CX-4945-Behandlung über einen Zeitraum von 48 h eine Wirkung von ~24 h auf den NG2-Proteingehalt in Perizyten ausübt. Basierend auf diesen Vorexperimenten wurden die Auswirkungen einer CK2-Inhibition auf die angiogene Aktivität von Perizyten in der Kokultur mit HUVEC untersucht.



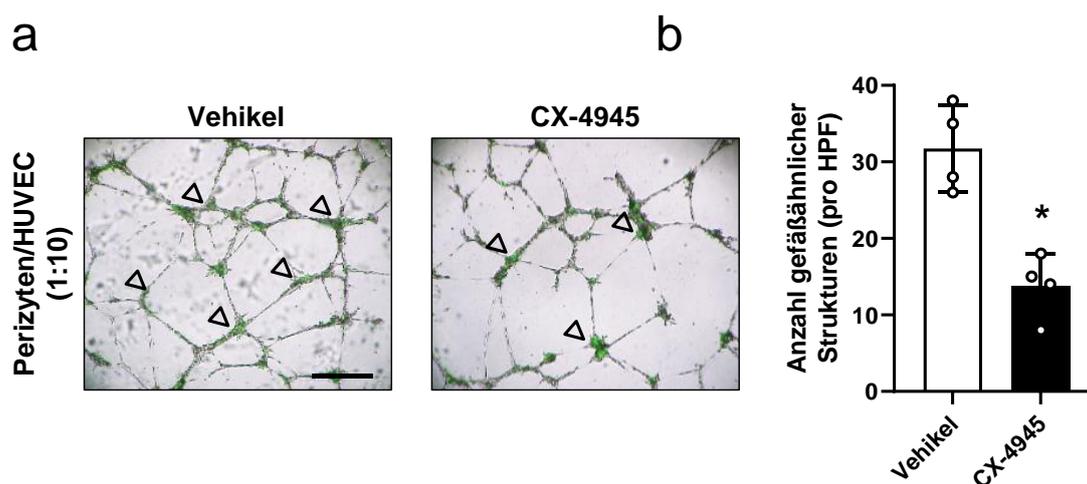
**Abbildung 20: Der CK2-Inhibitor CX-4945 hat eine Wirkung von 24 h auf den NG2-Proteingehalt in primären humanen Perizyten.** (a) Die Zellen wurden für 72 h kultiviert und die MFI von NG2-positiven Perizyten wurde durchflusszytometrisch bestimmt (Kt). Parallel wurden Perizyten trypsinisiert und neu ausgesät. Die MFI von NG2-positiven Zellen wurde durchflusszytometrisch nach 0 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h bestimmt und in Relation zur Kt-MFI in % angegeben. MW  $\pm$  SD. \* $P < 0,05$  vs. Kt ( $n = 4$ ). (b) Perizyten wurden für 48 h mit CX-4945 (10  $\mu$ M) behandelt (+ CX-4945). Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel und die Zellen wurden für weitere 72 h ohne CX-4945 kultiviert (- CX-4945). Die MFI von NG2-positiven Zellen wurde durchflusszytometrisch nach 0 h, 24 h, 48 h und 72 h bestimmt und in Relation zur MFI zum Zeitpunkt -48 h in % angegeben. MW  $\pm$  SD. \* $P < 0,05$  vs. -48 h, ( $n = 4$ ).

Hierfür wurde das optimale Verhältnis von Perizyten zu HUVEC zunächst empirisch ermittelt, da monokultivierte Perizyten im Gegensatz zu HUVEC weder nach 6 h noch nach 24 h gefäßähnliche Strukturen ausbildeten (*Abbildung 21*). Es zeigte sich, dass sich initiale Strukturen in Form von Gefäßmaschen, ähnlich zu denen der HUVEC-Monokultur, bei einem Perizyten/HUVEC-Verhältnis von 1:10 ausbilden (*Abbildung 21*).



**Abbildung 21: Perizyten und HUVEC bilden in Kokultur nach 24 h im Verhältnis 1:10 stabile Gefäßmaschen aus.** Repräsentative Bilder von HUVEC- und Perizyten-Monokulturen sowie Kokulturen aus beiden Zelllinien im Verhältnis 1:4 und 1:10 nach 6 h und 24 h Inkubation. Die Zellen wurden im 96-Well Format in matrigel-beschichtete Vertiefungen ausgesät (Maßstab: 250 µm)

Entsprechend wurden für die *tube formation assays* CX-4945-vorbehandelte Perizyten mit dem grün-fluoreszierenden Farbstoff PKH67 markiert und anschließend in einem Verhältnis von 1:10 mit HUVEC kokultiviert. Die Ausbildung von initialen gefäßähnlichen Strukturen wurde nach 24 h bestimmt. Die *tube formation assays* ergaben verglichen mit Vehikel-behandelten Perizyten eine signifikante Reduktion von gefäßähnlichen Strukturen in der Kokultur mit CX-4945-vorbehandelten Perizyten (Abbildung 22a und b).

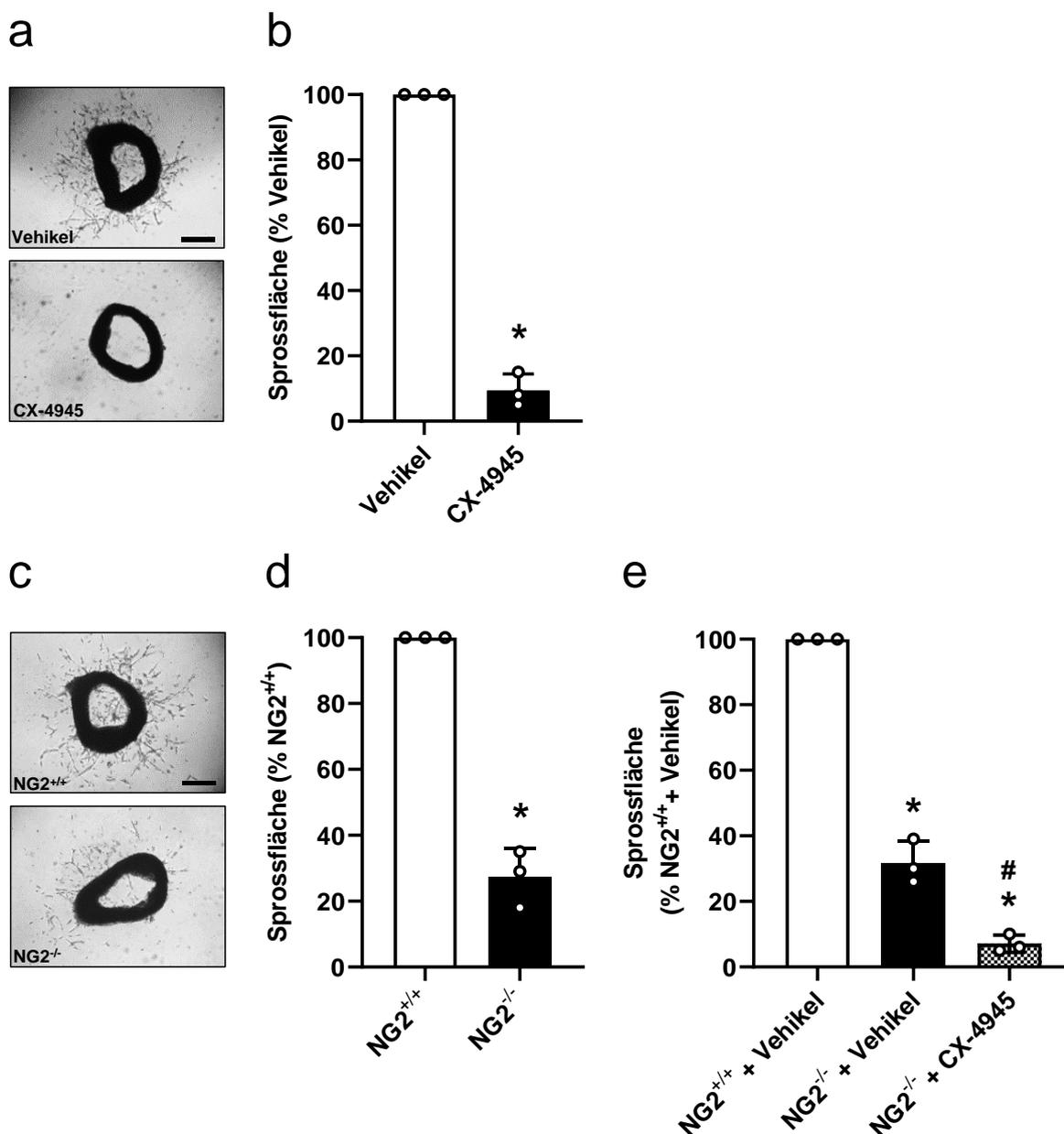


**Abbildung 22: Eine CK2-Inhibition in Perizyten hemmt in der Kokultur mit HUVEC die Ausbildung von Gefäßmaschen.** (a) Perizyten wurden für 48 h mit Vehikel oder CX-4945 (10 µM) behandelt und mit dem grün-fluoreszierenden Farbstoff PKH67 gefärbt. Anschließend wurden die Perizyten gewaschen und in einer Kokultur mit HUVEC im Verhältnis 1:10 in matrigel-beschichtete Vertiefungen einer 96-Well Platte ausgesät. Nach 24 h Inkubation wurde die Ausbildung von Gefäßmaschen lichtmikroskopisch detektiert (Maßstab: 250 µm). (b) Die Zellen wurden wie in (a) beschrieben behandelt und für *tube formation assays* verwendet. Quantitative Analyse von Gefäßmaschen pro HPF. MW ± SD. \*P < 0,05 vs. Vehikel (n = 4).

### 5.1.5 Eine Inhibition der CK2 reduziert die angiogene Aktivität von primären humanen Perizyten *in vivo*

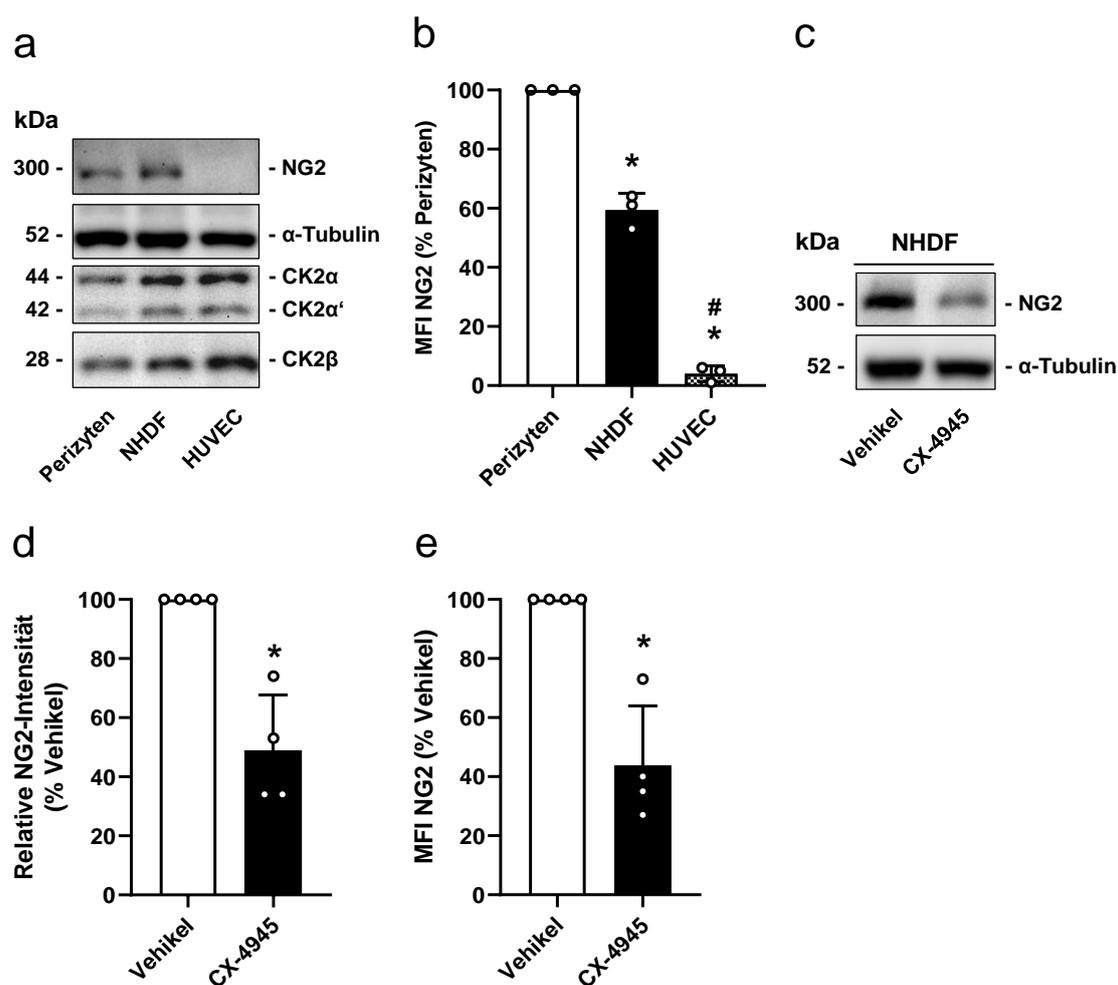
Abschließend wurden die *in vitro* Ergebnisse *in vivo* überprüft, da die Angiogenese ein komplexer Prozess ist, an dem neben Endothelzellen und Perizyten noch weitere Zellen wie Fibroblasten und Muskelzellen beteiligt sind. Das *aortic ring assay* stellt dabei einen Zwischenschritt dar, der es ermöglicht, *ex vivo* angiogene Prozesse in Gewebekulturen über mehrere Tage zu beobachten [110]. Dazu wurden Aortenringe aus NG2<sup>+/+</sup> Mäusen isoliert, in *matrigel* eingebettet und mit Medium überschichtet, das entweder mit Vehikel oder CX-4945 (10 µM) versetzt war. Das Auswachsen der Zellen wurde nach 6 Tagen analysiert (*Abbildung 23a*). Einhergehend mit dem *spheroid sprouting assay* reduzierte die CX-4945-Behandlung im Vergleich zu Vehikel-behandelten Kontrollen das Auswachsen von Zellen aus den Aortenringen (*Abbildung 23a und b*). Zudem wurde die Sprossfläche von unbehandelten Aortenringen aus NG2<sup>+/+</sup> und NG2<sup>-/-</sup> Mäusen verglichen. Die Ergebnisse zeigten, dass bei einem NG2-KO signifikant weniger Zellen auswachsen (*Abbildung 23c und d*). Eine zusätzliche Behandlung der Aortenringe aus NG2<sup>-/-</sup> Mäusen mit CX-4945 führte zu einer weiteren Reduktion der Sprossfläche (*Abbildung 23e*). Dies weist darauf hin, dass neben Perizyten noch weitere NG2-positive Zellen, deren NG2-Proteingehalt durch die CK2-Inhibition reduziert wird, das Aussprossen beeinflussen können. Aus der Literatur ist bekannt, dass neben Endothelzellen und Perizyten auch Fibroblasten an der Gefäßaussprossung beteiligt sind [111]. Letztere exprimieren ebenfalls NG2 [112-114]. Daher wurde mittels Western Blot-Analysen und durchflusszytometrischen Messungen untersucht, ob eine CK2-Inhibition in Fibroblasten die Expression von NG2 reduziert. Perizyten dienten hierbei als Positivkontrolle und HUVEC als Negativkontrolle für den NG2-Proteingehalt. Die Ergebnisse zeigten, dass die hier verwendeten NHDF NG2 exprimieren (*Abbildung 24a und b*) und die Behandlung mit CX-4945 deren NG2-Proteingehalt ebenfalls reduziert (*Abbildung 24c-e*).

Schließlich wurde der Einfluss einer CK2-Inhibition auf die angiogene Aktivität von Perizyten in Abhängigkeit von NG2 *in vivo* untersucht. Dazu wurden primäre humane Perizyten für 48 h mit CX-4945 vorbehandelt und im Verhältnis 1:10 mit HUVEC vermischt. Die Kokultur wurde dann in *matrigel* resuspendiert und in die Flanke von immundefizienten CD1 nu/nu Mäusen injiziert. Nach 6 Tagen wurden die *matrigel plugs* entnommen und deren Gefäßdichte untersucht.



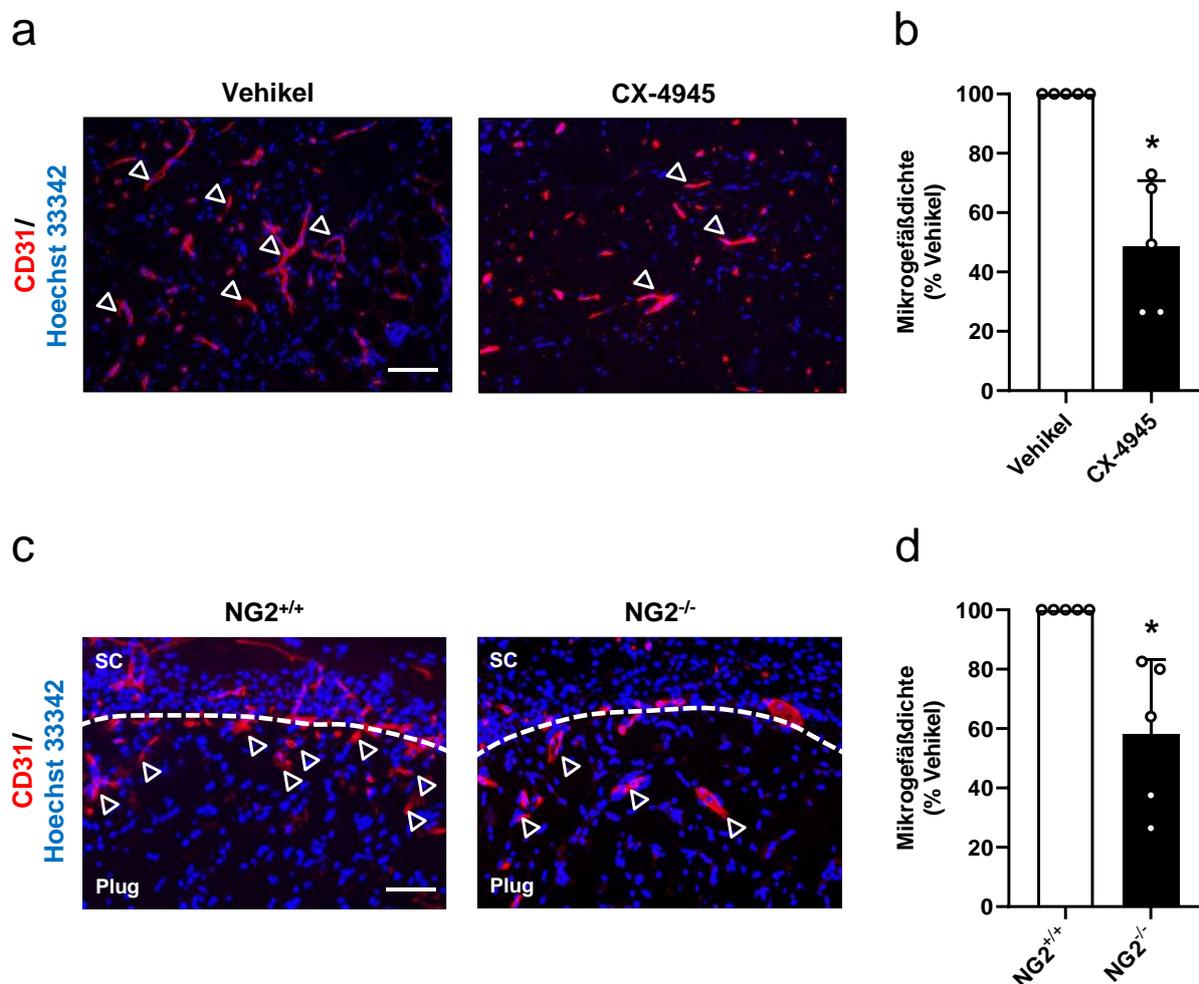
**Abbildung 23: Eine CK2-Inhibition und der KO von NG2 verringern das Auswachsen von Zellen aus murinen Aortenringen.** (a) Aus der Aorta von NG2<sup>+/+</sup> Mäusen wurden einzelne Ringe generiert, in matrigel eingebettet und mit Medium überschichtet, das mit Vehikel oder CX-4945 (10  $\mu$ M) versetzt war. Nach 6 Tagen wurde das Aussprossen von Zellen aus den Aortenringen lichtmikroskopisch detektiert (Maßstab: 300  $\mu$ m). (b) Aortenringe aus NG2<sup>+/+</sup> Mäusen wurden wie in (a) beschrieben behandelt und für aortic ring assays verwendet. Quantitative Analyse der Sprossfläche, angegeben in Relation zu Vehikel in %. MW  $\pm$  SD. \*P < 0,05 vs. Vehikel (n = 3). (c) Aus den Aorten von NG2<sup>+/+</sup> und NG2<sup>-/-</sup> Mäusen wurden einzelne Ringe generiert, die für aortic ring assays verwendet wurden. Das Auswachsen von Zellen aus den Aortenringen wurde nach 6 Tagen lichtmikroskopisch detektiert (Maßstab: 300  $\mu$ m). (d) Aortenringe aus NG2<sup>+/+</sup> und NG2<sup>-/-</sup> Mäusen wurden wie in (c) beschrieben behandelt und für aortic ring assays verwendet. Quantitative Analyse der Sprossfläche von Aortenringen, angegeben in Relation zur Sprossfläche von Aortenringen aus NG2<sup>+/+</sup> Mäusen in %. MW  $\pm$  SD. \*P < 0,05 vs. NG2<sup>+/+</sup> (n = 3). (e) Aus den Aorten von NG2<sup>+/+</sup> und NG2<sup>-/-</sup> Mäusen wurden einzelne Ringe generiert, wie in (a) beschrieben behandelt und für aortic ring assays verwendet. Nach 6 Tagen wurde die Sprossfläche der Aortenringe lichtmikroskopisch detektiert und quantitativ analysiert. Die erhobenen Daten wurden in Relation zur Sprossfläche von Vehikel-behandelten Aortenringen aus NG2<sup>+/+</sup> Mäusen in % angegeben. MW  $\pm$  SD. \*P < 0,05 vs. NG2<sup>+/+</sup> + Vehikel, #P < 0,05 vs. NG2<sup>-/-</sup> + Vehikel (n = 3).

Die immunhistochemischen Färbungen zeigten einhergehend mit den *in vitro*-Analysen der Kokultur eine signifikante Reduktion von humanen CD31-positiven Mikrogefäßen in *plugs* mit CX-4945-vorbehandelten Perizyten im Vergleich zu den *plugs* mit Vehikel-vorbehandelten Perizyten (Abbildung 25a und b). Zusätzlich wurde das angiogene Potential von NG2<sup>+/+</sup> und NG2<sup>-/-</sup> Mäusen verglichen, um den Effekt eines NG2-Verlusts zu untersuchen. Dazu wurden zellfreie *matrigel plugs* in die Flanke von NG2<sup>+/+</sup> und NG2<sup>-/-</sup> Mäusen injiziert und nach einer 6-tägigen Inkubation entnommen. Anschließend wurde das Einwachsen von Blutgefäßen mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen bestimmt.



**Abbildung 24: Eine CK2-Inhibition erniedrigt den Proteingehalt von NG2 in NHDF.** (a) Aus Perizyten, NHDF und HUVEC wurden Zellextrakte generiert. Die Zellextrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Der Proteingehalt von NG2, CK2α, CK2α', CK2β und α-Tubulin (als Ladekontrolle) wurde mit spezifischen Antikörpern im Western Blot detektiert. (b) Die MFI von NG2-positiven Perizyten, NHDF und HUVEC wurde durchflusszytometrisch bestimmt und in Relation zur MFI von Perizyten in % angegeben. \* $P < 0,05$  vs. Perizyten,  $MW \pm SD$ . \* $P < 0,05$  vs. NHDF ( $n = 3$ ). (c) NHDF wurden für 48 h mit Vehikel oder CX-4945 (10  $\mu M$ ) behandelt und wie in (a) beschrieben für Western Blot-Analysen verwendet. Der Proteingehalt von NG2 und α-Tubulin (als Ladekontrolle) wurde mit spezifischen Antikörpern im Western Blot detektiert. (d) Quantitative Analyse des Proteingehalts von NG2. NHDF wurden wie in (c) beschrieben behandelt und für Western Blot-Analysen verwendet. NG2 wurde normiert auf α-Tubulin. Die relative Intensität wurde in Relation zu Vehikel in % angegeben.  $MW \pm SD$ . \* $P < 0,05$  vs. Vehikel ( $n = 4$ ). (e) NHDF wurden wie in (c) beschrieben behandelt. Die MFI von NG2-positiven Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt und in Relation zu Vehikel in % angegeben.  $MW \pm SD$ . \* $P < 0,05$  vs. Vehikel ( $n = 4$ ).

Die Ergebnisse zeigten, dass die Mikrogefäßdichte in den *plugs* aus NG2<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu den *plugs* aus NG2<sup>+/+</sup> Mäusen signifikant geringer war (Abbildung 25c und d). Daher kann davon ausgegangen werden, dass sowohl die Reduktion als auch der KO von NG2 zu einer Hemmung von angiogenen Prozessen *in vivo* führt.



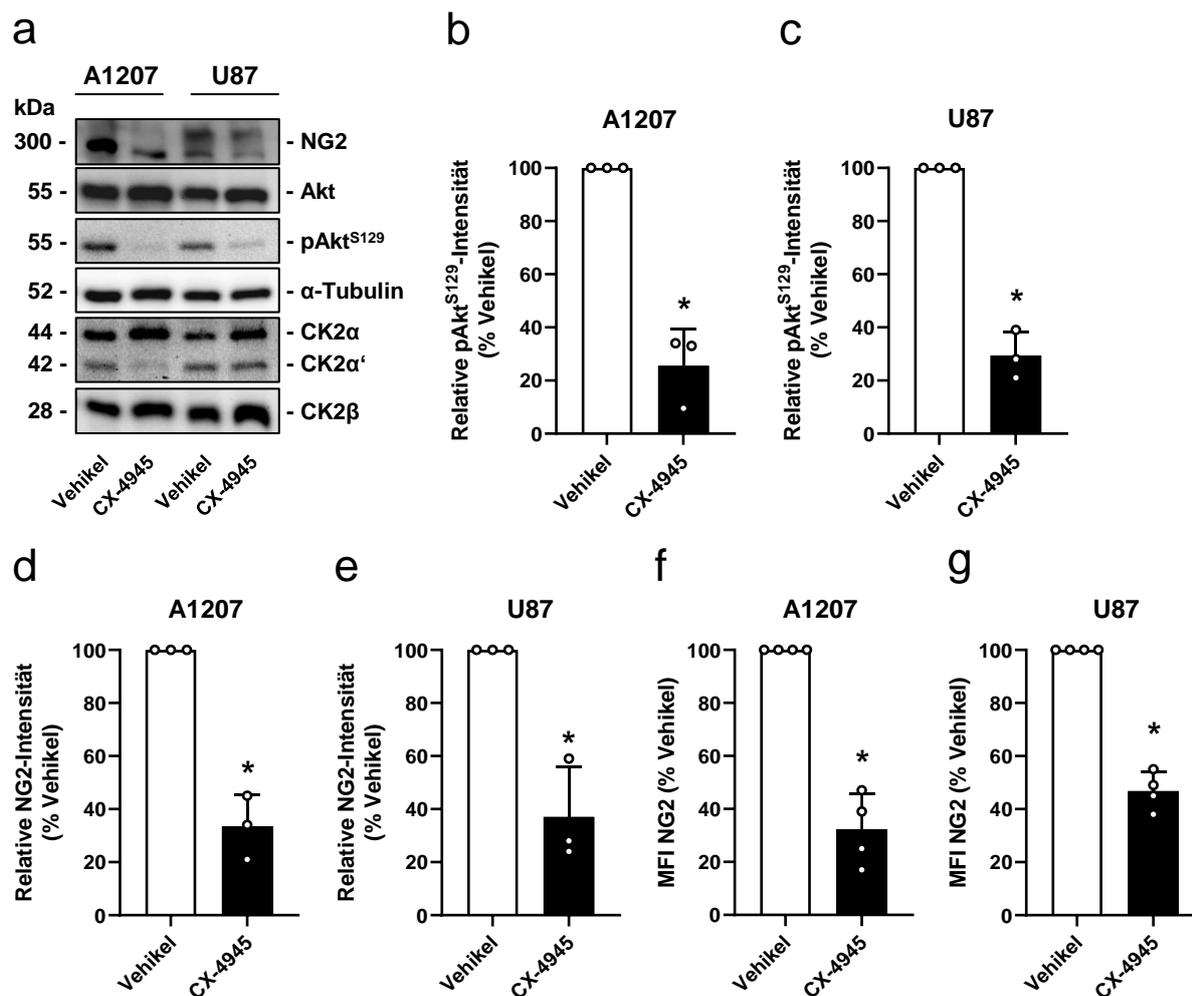
**Abbildung 25: Eine CK2-Inhibition und ein NG2-KO hemmen das Einwachsen von Blutgefäßen in matrigel plugs.** (a) Perizyten wurden für 48 h mit Vehikel oder CX-4945 (10 µM) behandelt und im Verhältnis 1:10 mit HUVEC vermischt. Die Kokultur wurde in flüssiges matrigel überführt und in die Flanke von CD1 nu/nu Mäusen injiziert. Nach 6 Tagen wurden die matrigel plugs entnommen und die Ausbildung von Blutgefäßen immunhistochemisch mittels humanem CD31-Antikörper detektiert (Maßstab: 150 µm). (b) Quantitative Analyse der Ausbildung von Blutgefäßen in matrigel plugs, die wie in (a) beschrieben generiert wurden. Die Mikrogefäßdichte wurde in Relation zu Vehikel in % angegeben. MW ± SD. \*P < 0,05 vs. Vehikel (n = 5). Die weißen Pfeilspitzen zeigen Blutgefäße. (c) Zellfreies matrigel wurde in die Flanke von NG2<sup>+/+</sup> und NG2<sup>-/-</sup> Mäusen injiziert und die matrigel plugs nach 6 Tagen entnommen. Das Einwachsen von Blutgefäßen wurde immunhistochemisch mit einem murinen CD31-Antikörper detektiert. Die gestrichelte, weiße Linie zeigt die Grenze zwischen subcutanem Gewebe (subcutaneous tissue (SC)) und dem matrigel plug (Plug) (Maßstab: 150 µm). (d) Quantitative Analyse von eingewachsenen Blutgefäßen in matrigel plugs, die wie in (c) beschrieben generiert wurden. Die Mikrogefäßdichte ist in Relation zu matrigel plugs aus NG2<sup>+/+</sup> Mäusen in % angegeben. MW ± SD. \*P < 0,05 vs. NG2<sup>+/+</sup> (n = 5). Die weißen Pfeilspitzen zeigen Blutgefäße.

## 5.2 Die CK2 reguliert über NG2 die Proliferation und Migration von humanen GBM-Zellen

Die Ergebnisse des 1. Teils dieser Arbeit zeigten, dass eine Inhibition der CK2 die NG2-Expression in Perizyten reduziert und dadurch deren angiogene Aktivität maßgeblich hemmt. Das Proteoglykan NG2 wird neben Perizyten auch in einigen Tumoren wie dem GBM exprimiert. Es ist bekannt, dass NG2 in Tumorzellen die Proliferation und Migration fördert. Daher wurde im 2. Teil dieser Arbeit untersucht, ob eine CK2-Hemmung die Expression und den Proteingehalt von NG2 in humanen GBM-Zellen reduziert und folglich auch die NG2-vermittelte Proliferation und Migration inhibiert.

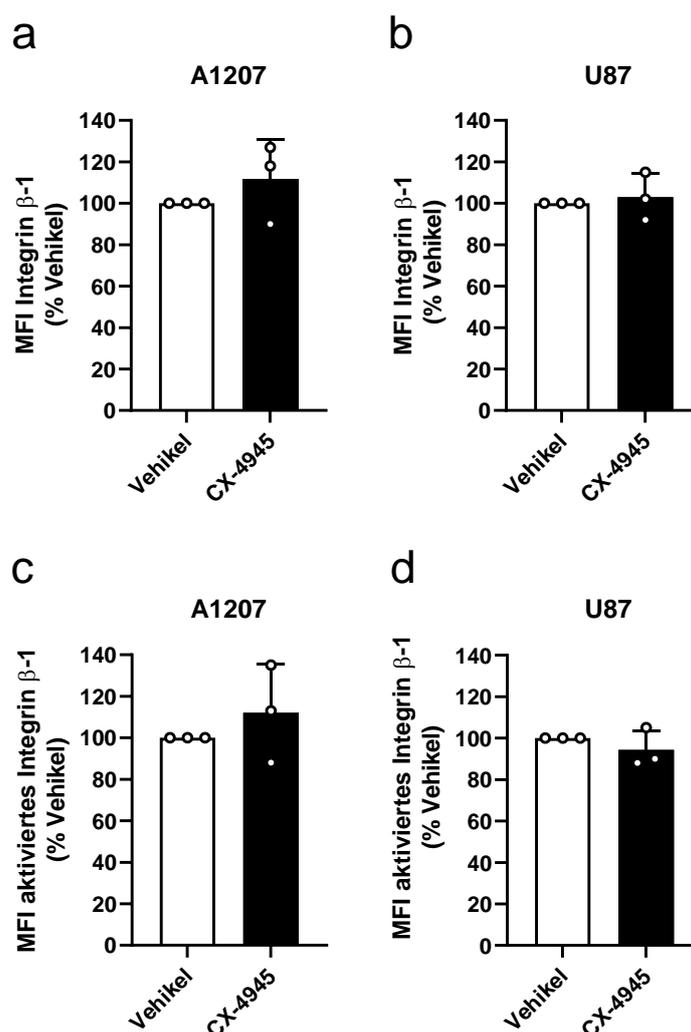
### 5.2.1 Eine Inhibition der CK2 verringert den Proteingehalt von NG2 in humanen GBM-Zellen

Zunächst wurde untersucht, wie sich eine CK2-Inhibition in GBM-Zellen auf den Proteingehalt von NG2 auswirkt. Die Experimente wurden mit zwei unterschiedlichen GBM-Zelllinien (A1207 und U87) durchgeführt, um zelllinienspezifische Effekte ausschließen zu können. Beide Zelllinien wurden mit Vehikel oder dem CK2-Inhibitor CX-4945 (10  $\mu$ M) behandelt und der Gehalt von verschiedenen Proteinen mittels Western Blot und Durchflusszytometrie bestimmt. Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl NG2 als auch die CK2-Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\alpha'$  und  $\beta$  in A1207- und U87-Zellen exprimiert werden (*Abbildung 26a*). Die Inhibition der CK2 durch CX-4945 wurde mit Hilfe der CK2-abhängigen Phosphorylierungsstelle Akt<sup>S129</sup> validiert [79,107]. Wie erwartet, führte die CX-4945-Behandlung zu einer Reduktion von pAkt<sup>S129</sup> im Vergleich zur Vehikel-behandelten Kontrolle (*Abbildung 26a-c*). Zudem zeigten die Western Blot-Analysen und durchflusszytometrischen Messungen, dass der NG2-Proteingehalt in CX-4945-behandelten A1207- und U87-Zellen signifikant erniedrigt ist (*Abbildung 26a, d-g*).



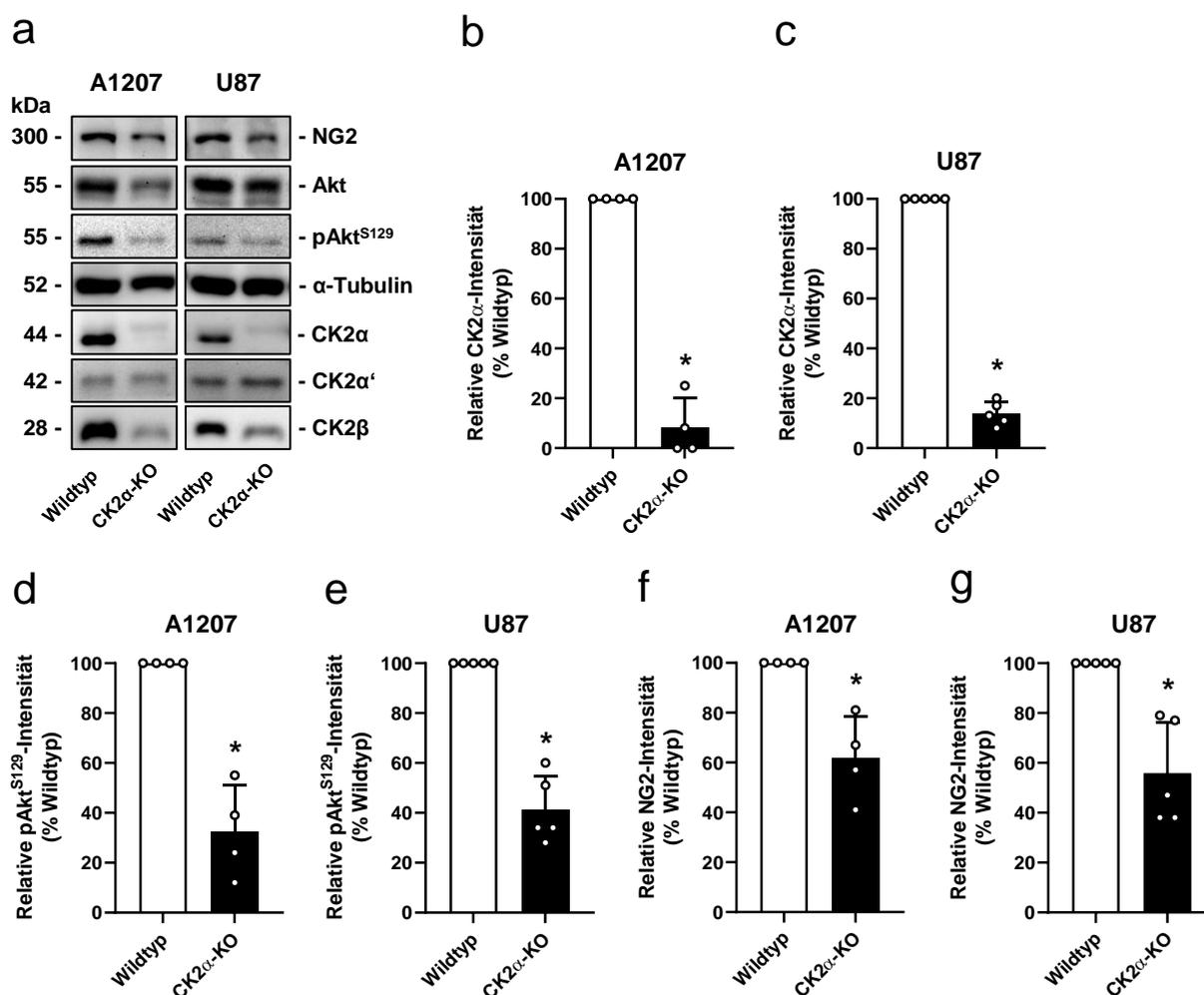
**Abbildung 26: Eine CK2-Inhibition reduziert den Proteingehalt von NG2 in humanen GBM-Zellen.** (a) A1207- und U87-Zellen wurden für 72 h mit Vehikel oder CX-4945 (10  $\mu$ M) behandelt und Zellextrakte generiert. Die Zellextrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Der Proteingehalt von NG2, Akt, pAkt<sup>S129</sup>, CK2 $\alpha$ , CK2 $\alpha'$ , CK2 $\beta$  und  $\alpha$ -Tubulin (als Ladekontrolle) wurde mit spezifischen Antikörpern im Western Blot detektiert. (b-e) Quantitative Analyse des Proteingehalts von pAkt<sup>S129</sup> (b und c) und NG2 (d und e). Die Zellen wurden wie in (a) beschrieben behandelt und für Western Blot-Analysen verwendet. pAkt<sup>S129</sup> wurde normiert auf Akt und NG2 wurde normiert auf  $\alpha$ -Tubulin. Die erhobenen Daten wurden als relative Intensität in Relation zu Vehikel in % angegeben. MW  $\pm$  SD. \* $P < 0.05$  vs. Vehikel ( $n = 3$ ). (f und g) A1207- und U87-Zellen wurden wie in (a) beschrieben behandelt. Die MFI von NG2-positiven Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt und in Relation zu Vehikel in % angegeben. MW  $\pm$  SD. \* $P < 0.05$  vs. Vehikel ( $n = 4$ ).

Die Interaktion von NG2 mit Integrin  $\beta$ -1 resultiert in der Aktivierung von Integrin  $\beta$ -1 und dessen assoziierten Signalwegen wie PI3K/Akt. In Tumorzellen sind diese Signalwege oft dysreguliert und fördern deren Chemoresistenz, Proliferation, Migration und Überleben sowie die Tumorangio-genese [26,28,33,54,115]. Daher wurde auch der Einfluss der CK2-Inhibition auf den Proteingehalt und die Aktivität von Integrin  $\beta$ -1 in A1207- und U87-Zellen untersucht. Die durchflusszytometrischen Analysen zeigten weder einen Unterschied im Proteingehalt (Abbildung 27a und b) noch in der Aktivität (Abbildung 27c und d) von Integrin  $\beta$ -1 nach CK2-Hemmung.



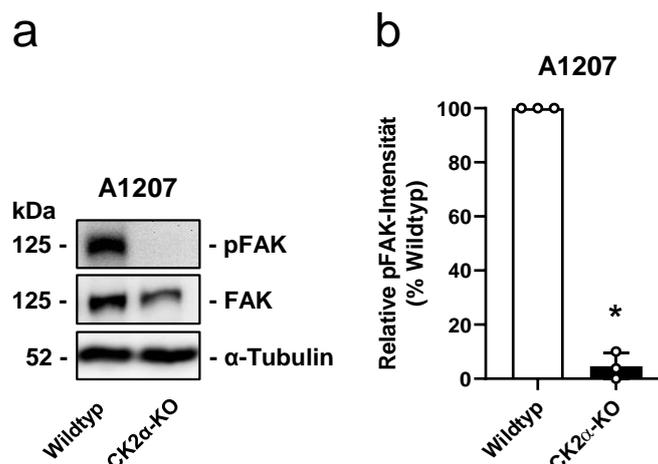
**Abbildung 27: Eine CK2-Inhibition in humanen GBM-Zellen hat keinen Effekt auf den Proteingehalt und die Aktivität von Integrin  $\beta$ -1.** (a-d) A1207- und U87-Zellen wurden für 72 h mit Vehikel oder CX-4945 (10  $\mu$ M) behandelt. Anschließend wurde die MFI von Integrin  $\beta$ -1 (a und b) und aktiviertem Integrin  $\beta$ -1 (c und d) durchflusszytometrisch bestimmt und in Relation zu Vehikel in % angegeben. MW  $\pm$  SD (n = 3).

Mit Hilfe der CRISPR/Cas-Methode wurde in A1207- und U87-Zellen ein CK2 $\alpha$ -KO induziert, um CK2-unabhängige Nebeneffekte von CX-4945 auf den NG2-Proteingehalt ausschließen zu können. Western Blot-Analysen bestätigten den CK2 $\alpha$ -KO in A1207- und U87-Zellen, da die CK2 $\alpha$ -Untereinheit nicht mehr detektiert werden konnte (Abbildung 28a-c). Zudem war pAkt<sup>S129</sup> in den CK2 $\alpha$ -KO-Zellen im Vergleich zum Wildtyp deutlich verringert (Abbildung 28a, d, e). Interessanterweise konnte in den A1207- und U87-CK2 $\alpha$ -KO-Zellen auch ein verringerter Proteingehalt der CK2 $\beta$ -Untereinheit festgestellt werden (Abbildung 28a), was auf die Instabilität der monomeren CK2 $\beta$ -Untereinheit zurückgeführt werden kann [116]. Wie erwartet war in Folge des CK2 $\alpha$ -KO der NG2-Proteingehalt in GBM-Zellen signifikant reduziert (Abbildung 28a, f, g). Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Reduktion des NG2-Proteingehalts nach CX-4945-Behandlung das Resultat der CK2-Inhibition ist.



**Abbildung 28: Ein CK2 $\alpha$ -KO verringert den Proteingehalt von NG2 in humanen GBM-Zellen.** (a) A1207- und U87-Wildtyp sowie CK2 $\alpha$ -KO-Zellen wurden lysiert und Zellextrakte generiert. Die Zellextrakte wurden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Der Proteingehalt von NG2, Akt, pAkt<sup>S129</sup>, CK2 $\alpha$ , CK2 $\alpha'$ , CK2 $\beta$  und  $\alpha$ -Tubulin (als Ladekontrolle) wurde mit spezifischen Antikörpern im Western Blot detektiert. (b-g) Quantitative Analyse des Proteingehalts von CK2 $\alpha$  (b und c), pAkt<sup>S129</sup> (d und e) und NG2 (f und g). Die Zellen wurden wie in (a) beschrieben für Western Blot-Analysen verwendet. CK2 $\alpha$  und NG2 wurden normiert auf  $\alpha$ -Tubulin und pAkt<sup>S129</sup> wurde normiert auf Akt. Die erhobenen Daten wurden als relative Intensität in Relation zu dem Wildtyp in % angegeben. MW  $\pm$  SD. \*P < 0.05 vs. Wildtyp (A1207: n = 4; U87: n = 5).

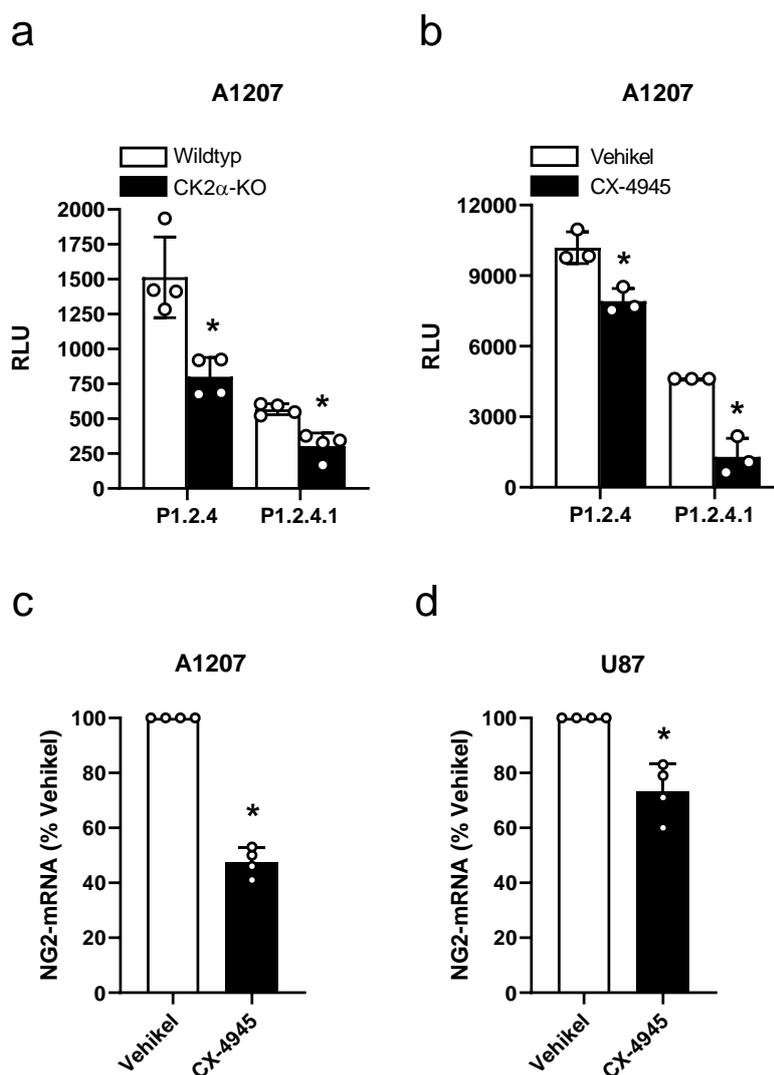
Die FAK ist ein wichtiger Signaltransduktor bei der Zellmigration, die in Folge von Interaktionen mit der EZM initiiert wird [117]. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von NG2 die Phosphorylierung und damit die Aktivität der FAK reduziert [118]. Zudem ist bekannt, dass die Inhibition der CK2 ebenfalls die Aktivität der FAK und deren assoziierten Signalwege hemmt [119,120]. Wie zu erwarten war, zeigten Western Blot-Analysen eine signifikant verringerte Phosphorylierung der FAK in A1207-CK2 $\alpha$ -KO-Zellen im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 29a und b).



**Abbildung 29: Ein CK2 $\alpha$ -KO reduziert die Phosphorylierung der FAK in humanen GBM-Zellen.** (a) A1207-Wildtyp und A1207-CK2 $\alpha$ -KO-Zellen wurden lysiert und Zellextrakte generiert. Die Zellextrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Der Proteingehalt der pFAK, FAK und von  $\alpha$ -Tubulin (als Ladekontrolle) wurde mit spezifischen Antikörpern im Western Blot detektiert. (b) Quantitative Analyse des Proteingehalts von pFAK. Die Zellen wurden wie in (a) beschrieben für Western Blot-Analysen verwendet. pFAK wurde normiert auf FAK. Die erhobenen Daten wurden als relative Intensität in Relation zu dem Wildtyp in % angegeben. MW  $\pm$  SD. \*P < 0.05 vs. Wildtyp (A1207: n = 3).

### 5.2.2 Eine Inhibition der CK2 reprimiert die Genexpression von NG2 in humanen GBM-Zellen

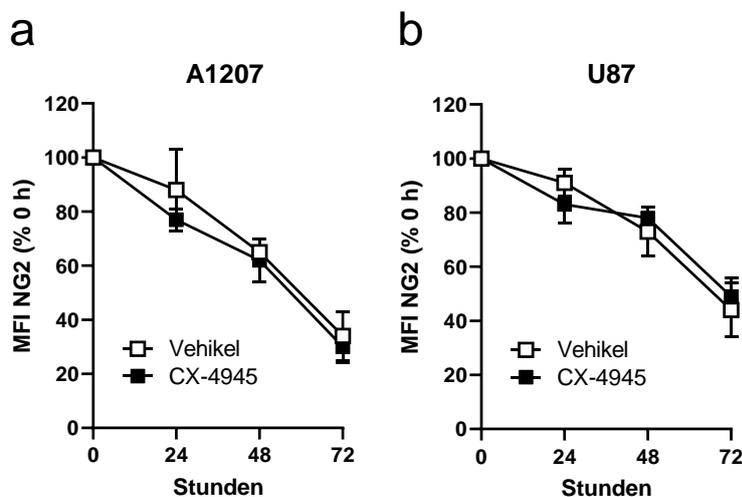
Die NG2-Promotoranalysen in Perizyten legen nahe, dass das Fragment pGL4-NG2<sup>p1.2.4.1</sup> ein Kernstück des NG2-Promotors ist. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die transkriptionelle Aktivität dieser Region durch den CK2-Inhibitor CX-4945 reduziert wird. Daher wurde untersucht, ob die CK2-Inhibition auch in GBM-Zellen die Genexpression von NG2 reduziert. Dazu wurden zum einen A1207-Wildtyp- und A1207-CK2 $\alpha$ -KO-Zellen mit dem Expressionsplasmid pGL4-NG2<sup>p1.2.4</sup> oder pGL4-NG2<sup>p1.2.4.1</sup> transfiziert und die transkriptionelle Aktivität mittels Luciferase-Test bestimmt (Abbildung 30a). Zum anderen wurden A1207-Zellen mit dem Expressionsplasmid pGL4-NG2<sup>p1.2.4</sup> oder pGL4-NG2<sup>p1.2.4.1</sup> transfiziert, anschließend mit Vehikel oder CX-4945 (10  $\mu$ M) behandelt und für Luciferase-Tests verwendet (Abbildung 30b). Die transkriptionelle Aktivität von NG2<sup>p1.2.4</sup> und NG2<sup>p1.2.4.1</sup> war sowohl bei KO als auch nach Inhibition der CK2 im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle signifikant verringert (Abbildung 30a und b). Zusätzlich wurde die Genexpression von NG2 in A1207- und U87-Zellen mittels qRT-PCR bestimmt. Wie erwartet, war die NG2-Genexpression nach CX-4945-Behandlung in beiden GBM-Zelllinien signifikant reduziert (Abbildung 30c und d).



**Abbildung 30: Eine CK2-Inhibition reprimierte die Genexpression von NG2 in humanen GBM-Zellen.** (a) A1207-Wildtyp- und A1207-CK2 $\alpha$ -KO-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid pGL4-NG2<sup>p1.2.4</sup> oder pGL4-NG2<sup>p1.2.4.1</sup> transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und die transkriptionelle Aktivität mittels Luciferase-Test bestimmt. MW  $\pm$  SD. \*P < 0,05 vs. Wildtyp (n = 4). (b) A1207-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid pGL4-NG2<sup>p1.2.4</sup> oder pGL4-NG2<sup>p1.2.4.1</sup> transfiziert und 24 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h mit Vehikel oder CX-4945 (10  $\mu$ M) behandelt und lysiert. Die transkriptionelle Aktivität wurde mittels Luciferase-Test bestimmt. MW  $\pm$  SD. \*P < 0.05 vs. Vehikel (n = 3). (c und d) Quantitative Analyse des Gehalts von NG2-mRNA. A1207- und U87-Zellen wurden für 72 h mit Vehikel oder CX-4945 (10  $\mu$ M) behandelt. Anschließend wurde die RNA isoliert und der mRNA-Gehalt von NG2 und GAPDH (als Haushaltsgen) mittels qRT-PCR bestimmt. Der mRNA-Gehalt von NG2 wurde normiert auf den mRNA-Gehalt von GAPDH. Die Werte sind in Relation zu Vehikel in % angegeben. MW  $\pm$  SD. \*P < 0.05 vs. Vehikel (n = 4).

Neben einer reduzierten Genexpression kann auch eine beschleunigte Proteindegradation zu einem verringerten Proteingehalt führen. Daher wurde zusätzlich untersucht, ob die CK2-Inhibition einen Effekt auf die Proteinstabilität von NG2 in GBM-Zellen hat. Dazu wurde die Translation in A1207- und U87-Zellen mittels CHX inhibiert. Anschließend wurden die Zellen mit Vehikel oder CX-4945 behandelt. Der NG2-Proteingehalt wurde über einen Zeitraum von 72 h durchflusszytometrisch erfasst. Die Ergebnisse zeigten eine kontinuierliche Abnahme des Proteingehalts von NG2 über die Zeit. Hierbei wurde kein Unterschied im NG2-Proteingehalt

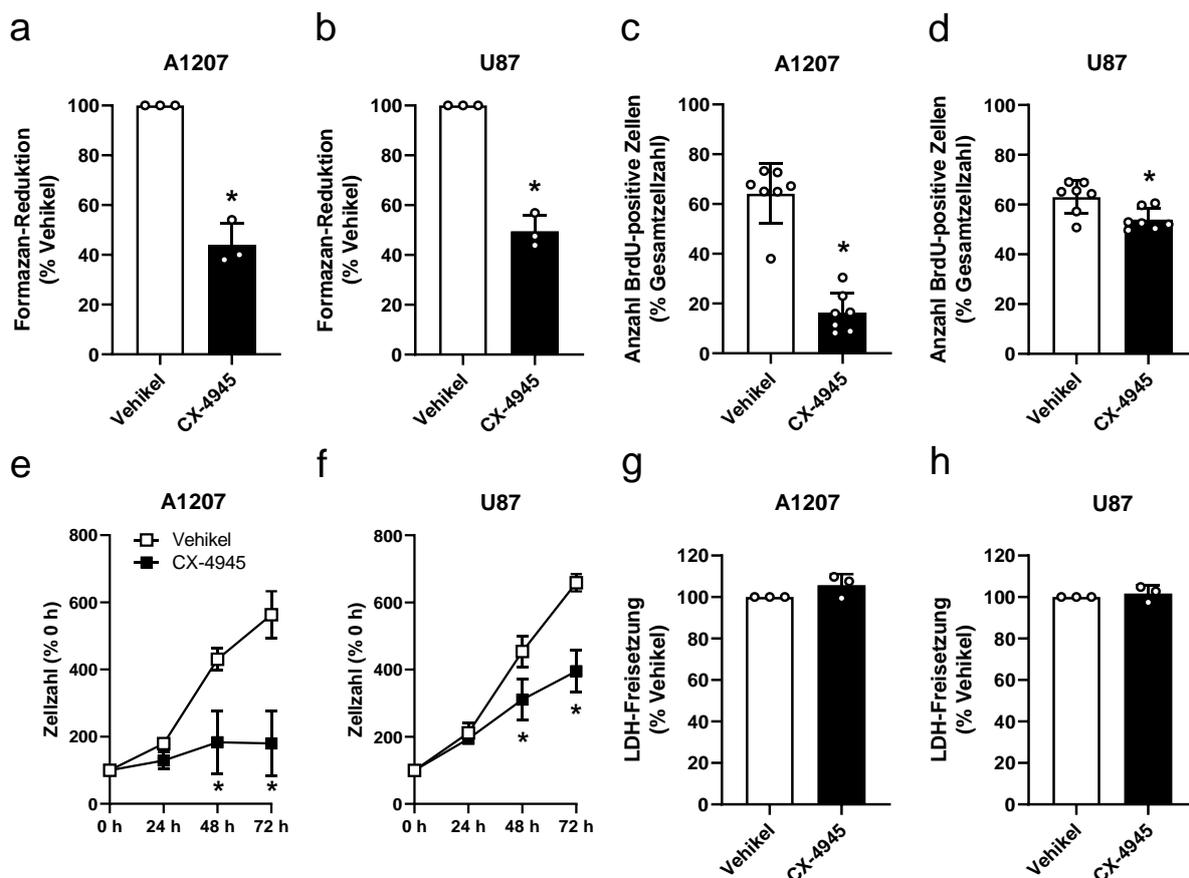
zwischen den Gruppen beobachtet (*Abbildung 31a und b*). Daher ist davon auszugehen, dass die CK2 keinen Einfluss auf die NG2-Proteinstabilität hat.



**Abbildung 31: Eine CK2-Inhibition hat keinen Einfluss auf die Proteinstabilität von NG2 in humanen GBM-Zellen.** (a und b) A1207- und U87-Zellen wurden in Anwesenheit von CHX mit Vehikel oder CX-4945 (10  $\mu$ M) behandelt. Nach 0 h, 24 h, 48 h und 72 h wurde die MFI von NG2-positiven Zellen durchflusszytometrisch detektiert und in Relation zur jeweiligen MFI zum Zeitpunkt 0 h in % angegeben. MW  $\pm$  SD (n = 4).

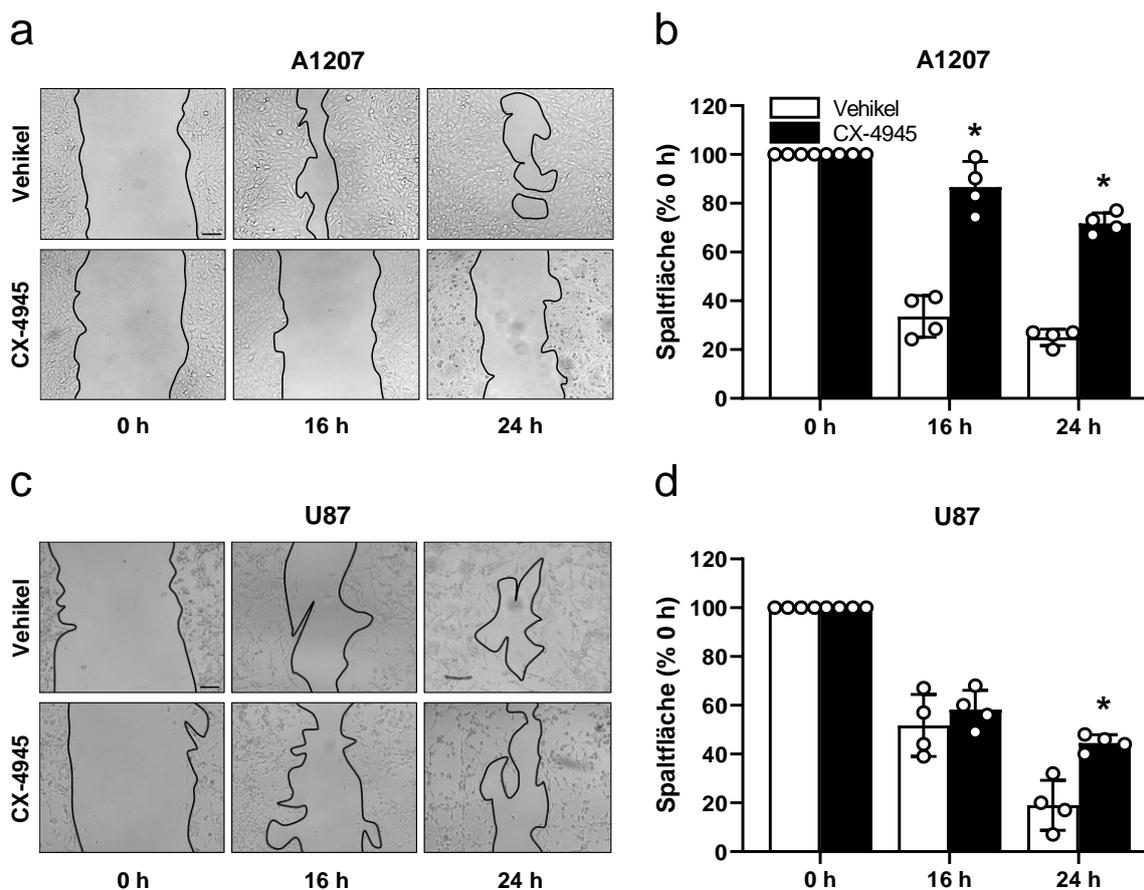
### 5.2.3 Eine Inhibition der CK2 reduziert die Proliferation und Migration von humanen GBM-Zellen

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass die CK2 in GBM-Zellen die Genexpression und den Proteingehalt von NG2 reguliert. In weiterführenden Experimenten wurden die Effekte einer CK2-abhängigen Reduktion von NG2 auf die Funktionalität der GBM-Zellen untersucht. Dazu wurden A1207- und U87-Zellen für 72 h mit Vehikel oder CX-4945 (10  $\mu$ M) behandelt. Die Analyse der Formazan-Reduktion im WST-1 assay ergab eine deutlich verringerte metabolische Aktivität der CX-4945-behandelten GBM-Zellen im Vergleich zur Kontrolle (*Abbildung 32a und b*). Damit einhergehend konnte eine reduzierte Inkorporation von BrdU in die DNA nach CX-4945-Behandlung beobachtet werden (*Abbildung 32c und d*). Nach CK2-Inhibition war dementsprechend die Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert (*Abbildung 32e und f*). Zusätzliche Zytotoxizitätsuntersuchungen zeigten keine erhöhte LDH-Freisetzung in Folge der CX-4945-Behandlung (*Abbildung 32g und h*).



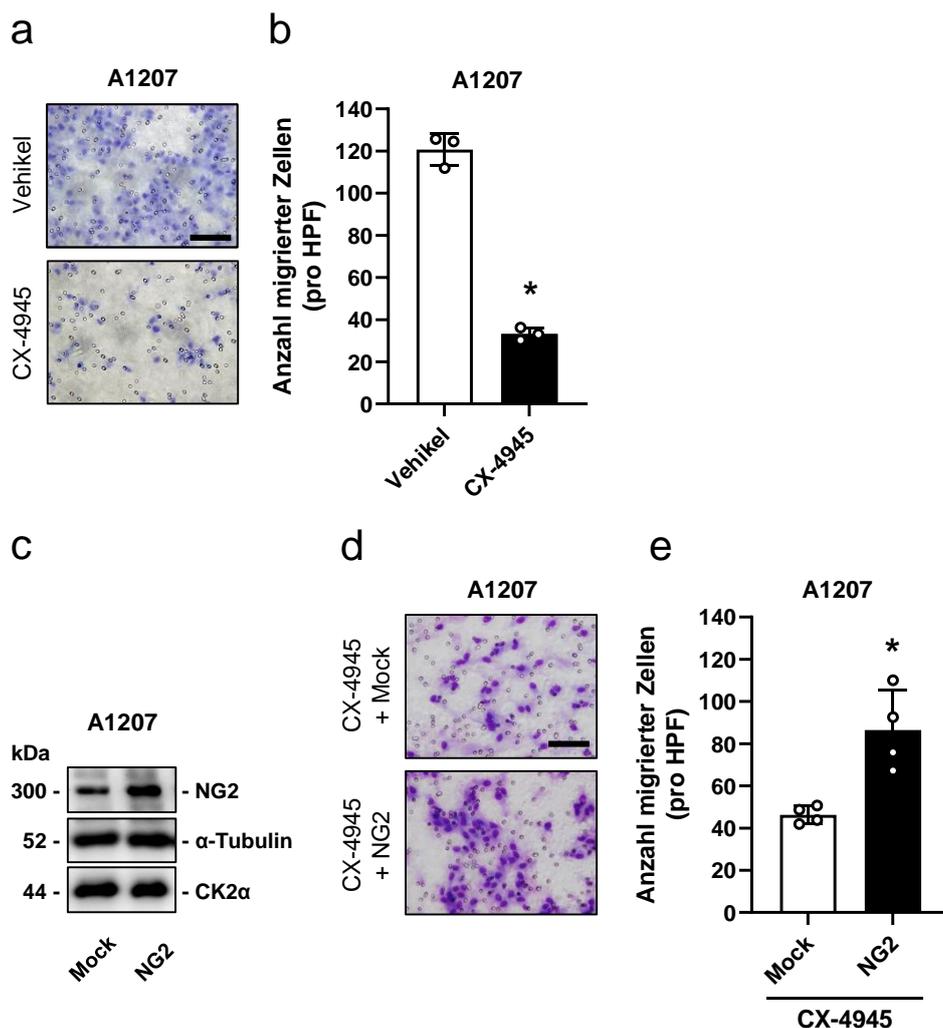
**Abbildung 32: Eine CK2-Inhibition reduziert die Proliferationsfähigkeit von humanen GBM-Zellen.** (a und b) A1207- und U87-Zellen wurden für 72 h mit Vehikel oder CX-4945 (10  $\mu$ M) behandelt. Die metabolische Aktivität wurde mittels WST-1 assay bestimmt. Die Formazan-Reduktion wurde in Relation zu Vehikel in % angegeben. MW  $\pm$  SD. \* $P < 0,05$  vs. Vehikel ( $n = 3$ ). (c und d) Die Zellen wurden wie in (a) beschrieben behandelt, wobei nach 62 h zusätzlich BrdU-Reagenz zugegeben wurde. Anschließend wurden die MFI von BrdU-positiven Zellen durchflusszytometrisch detektiert und in Relation zur Gesamtzahl gemessener Zellen in % angegeben. MW  $\pm$  SD. \* $P < 0,05$  vs. Vehikel ( $n = 4$ ). (e und f) Die Zellen wurden wie in (a) beschrieben behandelt. Die Zellzahl wurde nach 0 h, 24 h, 48 h und 72 h bestimmt und in Relation zur Zellzahl zum Zeitpunkt 0 h in % angegeben. MW  $\pm$  SD. \* $P < 0,05$  vs. Vehikel ( $n = 4$ ). (g und h) Die Zellen wurden wie in (a) beschrieben behandelt und die Zytotoxizität von CX-4945 mittels LDH-Test analysiert. Die LDH-Freisetzung wurde in Relation zu Vehikel in % angegeben. MW  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

Es ist bekannt, dass NG2 zu einem sehr aggressiven Phänotyp von humanen Tumoren wie dem GBM beiträgt, indem es unter anderem die Zellmigration und -invasion fördert [38,48]. Daher wurde in den nachfolgenden Experimenten untersucht, ob eine CK2-Inhibition die Migrationsfähigkeit der beiden NG2-positiven GBM-Zelllinien A1207 und U87 beeinträchtigt. Dies wurde mit Hilfe von *scratch assays* analysiert. Die Spaltfläche von CX-4945-behandelten A1207-Zellen war im Vergleich zu Vehikel-behandelten Zellen nach 16 h und 24 h signifikant größer (Abbildung 33a und b). Weiterhin war auch die Spaltfläche von CX-4945-behandelten U87-Zellen im Vergleich zu Vehikel-behandelten Zellen nach 24 h signifikant größer (Abbildung 33c und d).



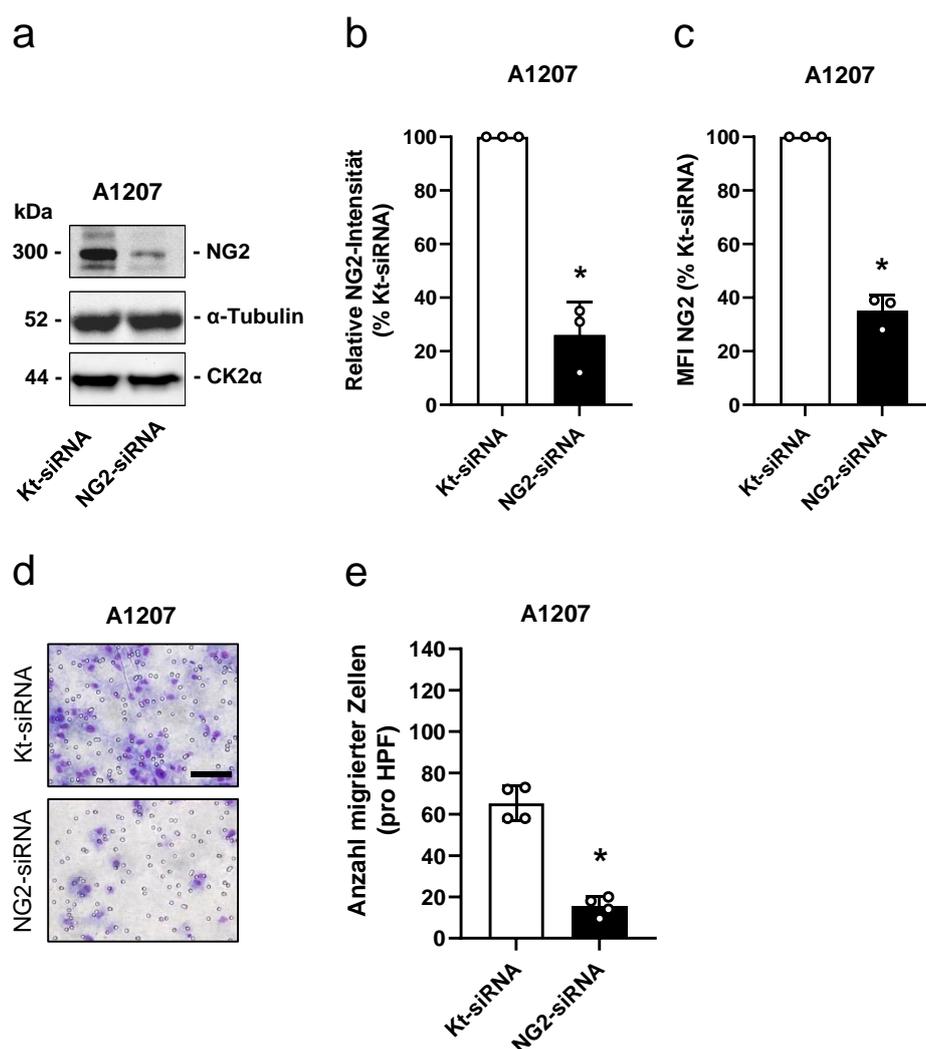
**Abbildung 33: Eine CK2-Inhibition reduziert die Migrationsfähigkeit von humanen GBM-Zellen.** (a und c) A1207- (a) und U87-Zellen (b) wurden für 72 h mit Vehikel oder CX-4945 (10  $\mu$ M) behandelt. Anschließend wurde ein Spalt im Zellrasen erzeugt und die Fläche nach 0 h, 16 h und 24 h bestimmt (Maßstab: 100  $\mu$ m). (b und d) Quantitative Analyse der zellfreien Fläche von A1207- (c) und U87-Zellen (d). Die Zellen wurden wie in (a) beschrieben behandelt, für scratch assays verwendet und die zellfreie Fläche nach 0 h, 16 h und 24 h bestimmt. Die Spaltfläche wurde in Relation zur Spaltfläche zum Zeitpunkt 0 h in % angegeben. MW  $\pm$  SD. \* $P < 0,05$  vs. Vehikel, (n = 4).

Die Ergebnisse der *scratch assays* zeigten, dass eine CK2-Inhibition einen anti-migratorischen Effekt auf GBM-Zelllinien ausübt. Mit Hilfe von *transmigration assays* sollten diese Beobachtungen verifiziert werden. Dazu wurden A1207-Zellen mit Vehikel oder CX-4945 behandelt. Wie erwartet resultierte die Hemmung der CK2 in einer deutlich reduzierten Anzahl von migrierten Zellen (Abbildung 34a und b). Anschließend wurde geprüft, ob eine CK2-unabhängige Expression von NG2 dem anti-migratorischen Effekt der CK2-Inhibition entgegenwirken kann. Dazu wurden A1207-Zellen mit einem Kontroll-Plasmid (Mock) oder einem NG2-Plasmid transfiziert und mit CX-4945 behandelt. Die Überexpression von NG2 konnte im Western Blot detektiert werden (Abbildung 34c) und resultierte im Vergleich zur Kontrolle in einem Wiederanstieg von migrierten Zellen trotz CK2-Inhibition (Abbildung 34d und e).



**Abbildung 34: Eine Überexpression von NG2 wirkt dem anti-migratorischen Effekt einer CK2-Inhibition entgegen.** (a) A1207-Zellen wurden für 72 h mit Vehikel oder CX-4945 (10 µM) behandelt und für transmigration assays ausgesät. Nach 5 h wurden die migrierten Zellen fixiert, gefärbt und lichtmikroskopisch detektiert (Maßstab: 100 µm). (b) Die Zellen wurden wie in (a) beschrieben behandelt und für transmigration assays verwendet. Quantitative Analyse von migrierten Zellen pro HPF. MW ± SD. \*P < 0.05 vs. Vehikel (n = 3). (c) A1207-Zellen wurden mit dem pEF6-Vektor (Mock) oder dem NG2-Plasmid transfiziert. Nach 48 h wurden Zellextrakte generiert. Die Zellextrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Der Proteingehalt von NG2, CK2α und α-Tubulin (als Ladekontrolle) wurde mit spezifischen Antikörpern im Western Blot detektiert. (d) A1207-Zellen wurden wie in (c) beschrieben transfiziert und anschließend für 24 h mit CX-4945 (10 µM) behandelt. Die Zellen wurden für transmigration assays ausgesät. Nach 5 h wurden die migrierten Zellen fixiert, gefärbt und lichtmikroskopisch detektiert (Maßstab: 100 µm). (e) Die Zellen wurden wie in (d) beschrieben transfiziert, behandelt und für transmigration assays verwendet. Quantitative Analyse von migrierten Zellen pro HPF. MW ± SD. \*P < 0.05 vs. Mock (n = 4).

Zusätzlich zum CK2-Inhibitor CX-4945 wurde der Proteingehalt von NG2 mittels siRNA reduziert und der Effekt auf die Transmigrationsfähigkeit von GBM-Zellen untersucht. Western Blot-Analysen (Abbildung 35a und b) und durchflusszytometrische Messungen (Abbildung 35c) bestätigten im Vergleich zu Kt-siRNA-transfizierten Zellen eine signifikante Reduktion des NG2-Proteingehalts in Zellen, die mit NG2-siRNA transfiziert worden waren. Zudem zeigten die Ergebnisse der *transmigration* assays, dass der KD von NG2 zu einer deutlich verringerten Migration von A1207-Zellen führt (Abbildung 35d und e).

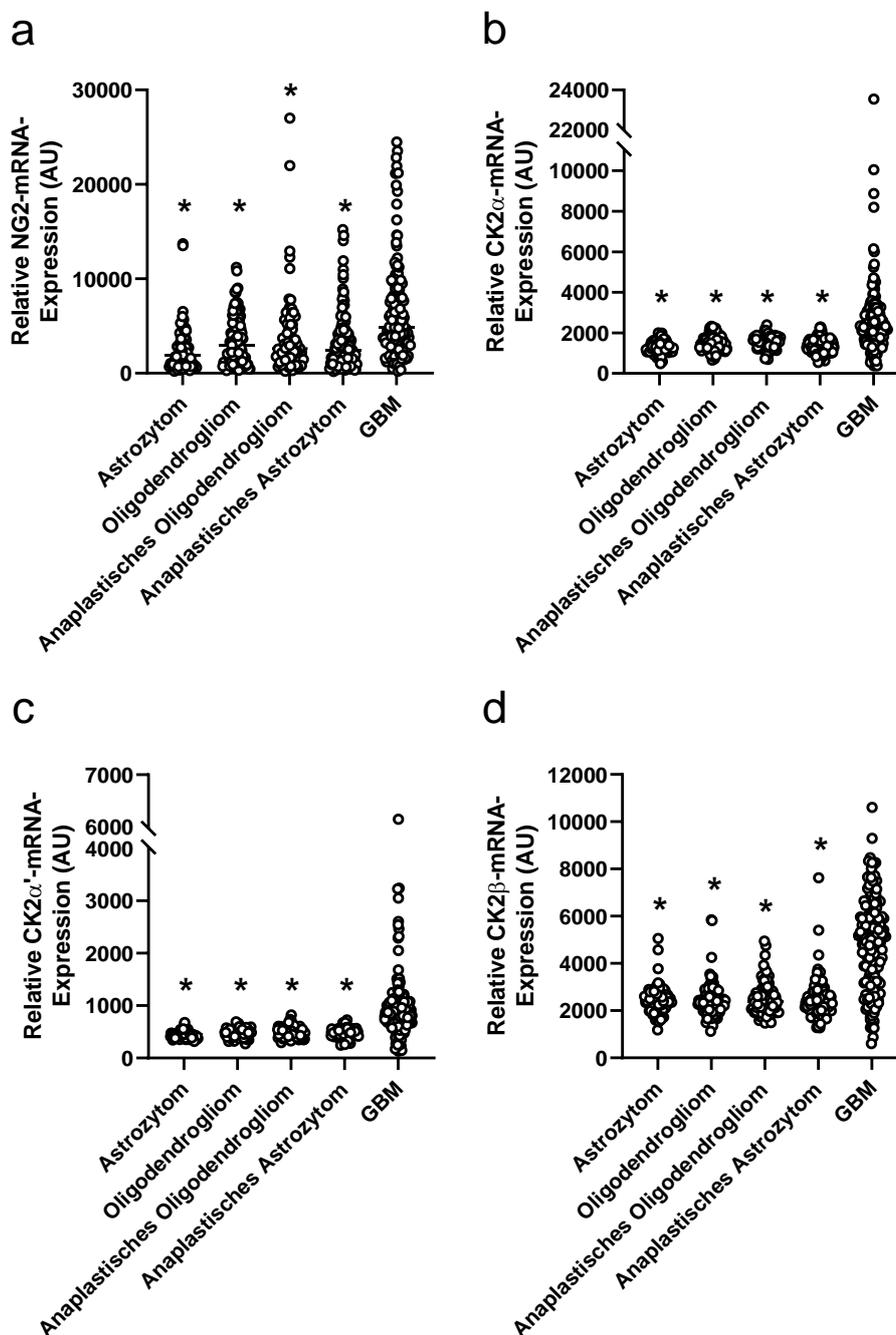


**Abbildung 35: Ein NG2-KD reduziert die Migrationsfähigkeit von humanen GBM-Zelllinien.** (a) A1207-Zellen wurden mit Kt-siRNA oder NG2-siRNA transfiziert. Nach 72 h wurden Zellextrakte generiert. Die Zellextrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Der Proteingehalt von NG2, CK2 $\alpha$  und  $\alpha$ -Tubulin (als Ladekontrolle) wurde mit spezifischen Antikörpern im Western Blot detektiert. (b) Quantitative Analyse des Proteingehalts von NG2. Die Zellen wurden wie in (a) beschrieben transfiziert und für Western Blot-Analysen verwendet. NG2 wurde normiert auf  $\alpha$ -Tubulin. Die erhobenen Daten wurden als relative Intensität von NG2 in Relation zur Kt-siRNA in % angegeben. MW  $\pm$  SD. \* $P < 0.05$  vs. Kt-siRNA ( $n = 3$ ). (c) Die Zellen wurden wie in (a) beschrieben transfiziert. Die MFI von NG2-positiven Zellen wurde durchflusszytometrisch detektiert und in Abhängigkeit von der Kt-siRNA in % angegeben. MW  $\pm$  SD. \* $P < 0.05$  vs. Kt-siRNA ( $n = 3$ ). (d) A1207-Zellen wurden wie in (a) beschrieben transfiziert und für transmigration assays ausgesät. Nach 5 h wurden die migrierten Zellen fixiert, gefärbt und lichtmikroskopisch detektiert (Maßstab: 100  $\mu$ m). (e) Die Zellen wurden wie in (a) beschrieben transfiziert und für transmigration assays verwendet. Quantitative Analyse von migrierten Zellen pro HPF. MW  $\pm$  SD. \* $P < 0,05$  vs. Kt-siRNA, ( $n = 4$ ).

Zusammenfassend konnte in Folge einer Reduktion des NG2-Proteingehalts durch CX-4945 sowohl ein anti-proliferativer als auch anti-migratorischer Effekt in GBM-Zellen beobachtet werden.

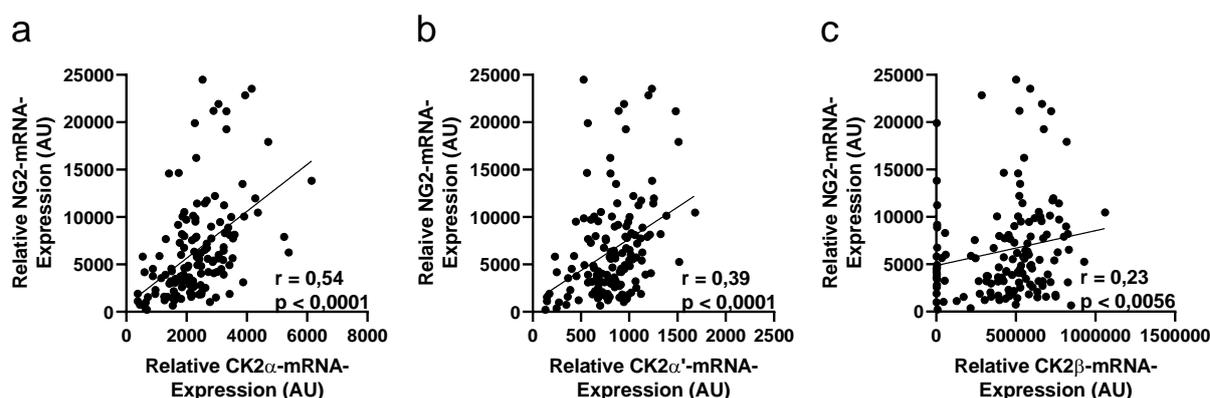
## 5.2.4 Die mRNA-Expression von NG2 und den CK2-Untereinheiten korreliert positiv in humanen GBMs

Zusätzlich zu den bisher generierten *in vitro* Daten wurden auch *in silico*-Analysen humaner Tumorproben durchgeführt.



**Abbildung 36: Die CK2-Untereinheiten und NG2 sind in humanen GBMs stark exprimiert.** (a-d) Die relative mRNA-Expression (TCGA-basierte Datensätze (Firehose Legacy (Brain Lower Grade Glioma) und Cell 2013 (Glioblastoma)) der cBioPortal Plattform; arbitrary units (AU)) von NG2 (a), CK2 $\alpha$  (b), CK2 $\alpha'$  (c) und CK2 $\beta$  (d) wurde in Gewebeproben aus humanen Astrozytomen (Grad I-II), Oligodendrogliomen (Grad II), anaplastischen Oligodendrogliomen und Astrozytomen (Grad III) sowie GBMs (Grad IV) bestimmt. \* $P < 0.05$  vs. GBM ( $n = 682$ ).

Die Online Datenbank cBioPortal bietet hierbei die Möglichkeit, auf Tumorgenom-Datensätze zuzugreifen [121,122]. Für die Analyse der Genexpression von NG2 und den CK2-Untereinheiten in Gliomen Grad I bis IV wurden die beiden TCGA Datensätze (Firehose Legacy (Brain Lower Grade Glioma) und Cell 2013 (Glioblastoma)) verwendet. Dabei zeigte sich eine signifikant erhöhte mRNA-Expression von NG2 (*Abbildung 36a*) in GBM-Proben (Grad IV) verglichen mit Proben aus Gliomen Grad I bis III (Astrozytom, Oligodendrogliom, anaplastisches Oligodendrogliom und Astrozytom). Für die mRNA von CK2 $\alpha$  (*Abbildung 36b*), CK2 $\alpha'$  (*Abbildung 36c*) und CK2 $\beta$  (*Abbildung 36d*) wurde ebenfalls eine signifikant erhöhte mRNA-Expression in GBM-Proben (Grad IV) beobachtet. Zusätzlich ergab sich eine positive Spearman Korrelation zwischen der mRNA-Expression von NG2 und den CK2-Untereinheiten in humanen GBM-Proben (*Abbildung 37*). Die Korrelation zwischen NG2 und CK2 $\alpha$  kann an dieser Stelle hervorgehoben werden, da ein Spearman-Korrelationskoeffizient von  $r = 0,54$  ( $p < 0,0001$ ) errechnet wurde, der auf eine starke Korrelation schließen lässt.



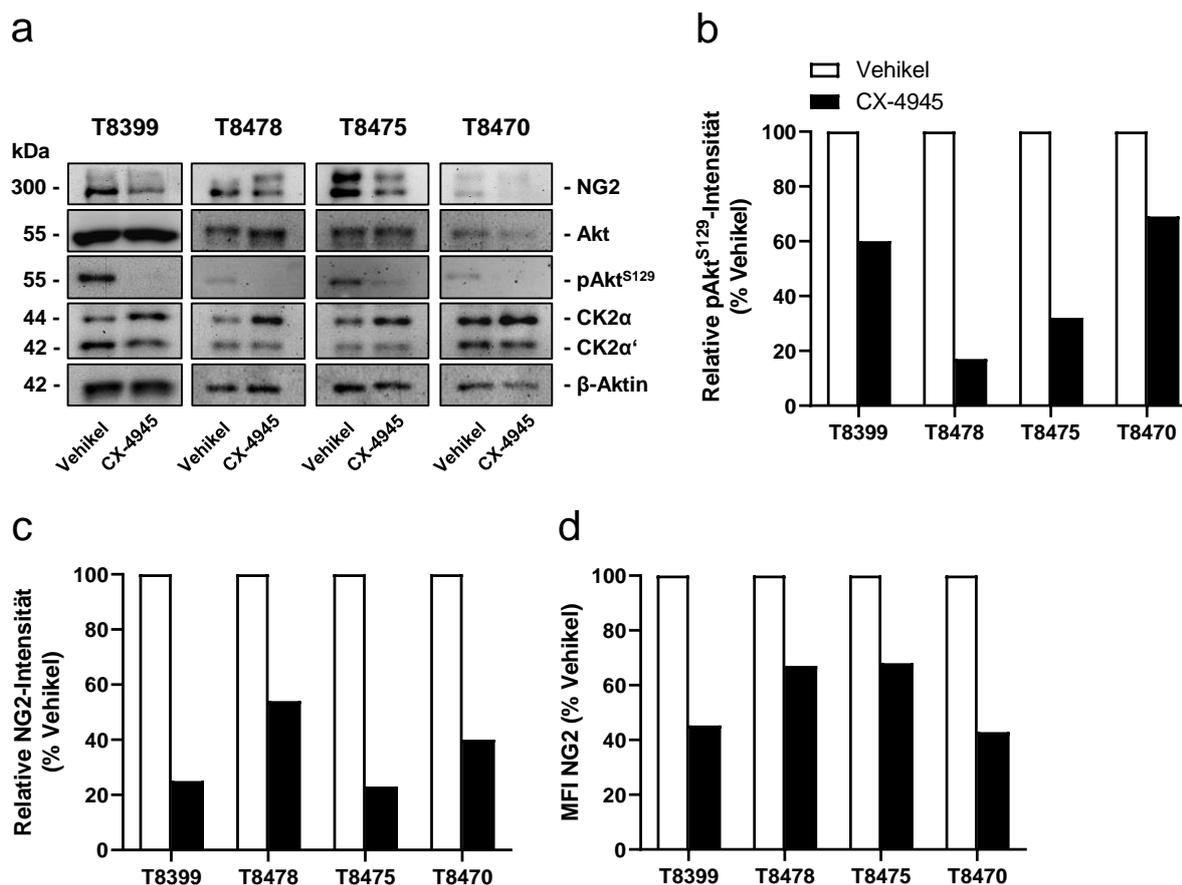
**Abbildung 37:** Die mRNA-Expression von NG2 und den CK2-Untereinheiten korreliert positiv in humanen GBMs. (a-c) Spearman Korrelation der mRNA-Expression von NG2 mit der mRNA-Expression von CK2 $\alpha$  (a), CK2 $\alpha'$  (b) und CK2 $\beta$  (c) (TCGA-basierter Datensatz (Cell 2013 (Glioblastoma)) der cBioPortal Plattform; arbitrary units (AU)),  $n = 141$ ).

Diese Daten bekräftigen die bisherigen Ergebnisse, die auf einen genregulatorischen Mechanismus zwischen der CK2 und NG2 hindeuten.

### 5.2.5 Eine Inhibition der CK2 reduziert den Proteingehalt von NG2 in primären humanen GBM-Zellen

In einer letzten Reihe von Experimenten wurde überprüft, ob die CK2 in primären humanen Zellen aus GBM-Patientenproben ebenfalls einen regulatorischen Effekt auf den NG2-Proteingehalt hat. Die klinisch-pathologischen Befunde ergaben keine Mutation von *IDH1* an der Stelle Arginin132, weswegen davon ausgegangen werden kann, dass die in dieser Studie verwendeten Zellen (T8399, T8478, T8475 und T8470) aus primären GBMs Grad IV stammen [42-44]. Die primären humanen GBM-Zellen wurden für 72 h mit Vehikel oder CX-4945 (10  $\mu$ M)

behandelt und mittels Western Blot und Durchflusszytometrie untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die Zellen sowohl NG2 als auch die beiden katalytischen Untereinheiten CK2 $\alpha$  und CK2 $\alpha'$  exprimieren, wobei Patienten-abhängig Schwankungen im Proteingehalt beobachtet werden konnten (Abbildung 38a). Trotzdem führte die Behandlung mit CX-4945 im Vergleich zu Vehikel in jeder Probe zu einer Reduktion der CK2-abhängigen Phosphorylierung von Akt<sup>S129</sup> (Abbildung 38b) und des NG2-Proteingehalts (Abbildung 38c und d).

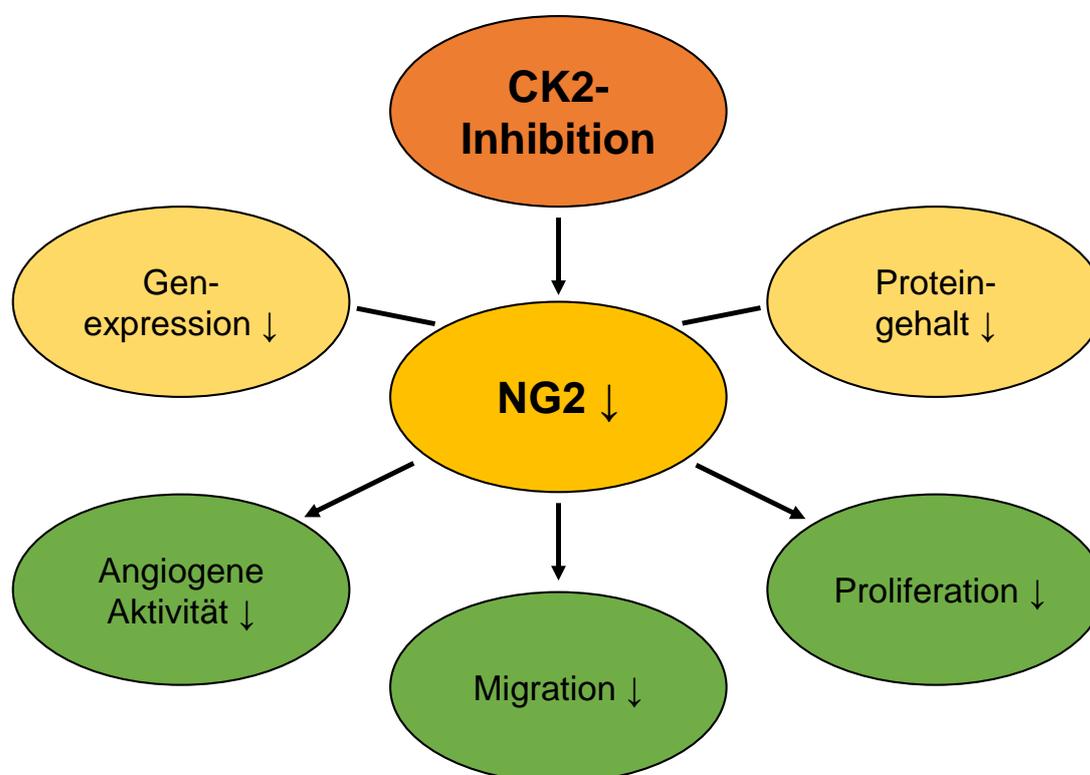


**Abbildung 38: Eine Inhibition der CK2 reduziert den NG2-Proteingehalt in primären humanen GBM-Zellen.** (a) Aus Patientenproben extrahierte primäre GBM-Zellen (T8399, T8478, T8475 und T8470) wurden für 72 h mit Vehikel oder CX-4945 (10  $\mu$ M) behandelt und Zellextrakte generiert. Die Zellextrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Der Proteingehalt von NG2, Akt, pAkt<sup>S129</sup>, CK2 $\alpha$ , CK2 $\alpha'$  und  $\alpha$ -Tubulin (als Ladekontrolle) wurde mit spezifischen Antikörpern im Western Blot detektiert. (b und c) Quantitative Analyse des Proteingehalts von pAkt<sup>S129</sup> (b) und NG2 (c). Die Zellen wurden wie in (a) beschrieben für Western Blot-Analysen verwendet. pAkt<sup>S129</sup> wurde normiert auf Akt und NG2 wurde normiert auf  $\alpha$ -Tubulin. Die erhobenen Daten wurden als relative Intensität in Relation zu Vehikel in % angegeben. (d) Die primären humanen GBM-Zellen (T8399, T8478, T8475 und T8470) wurden wie in (a) beschrieben behandelt. Die MFI von NG2-positiven Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt und in Relation zu Vehikel in % angegeben.

### 5.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im 1. Teil der vorliegenden Arbeit wurde unter Verwendung der beiden Inhibitoren TBB und CX-4945 gezeigt, dass die Hemmung der CK2 in Perizyten den NG2-Proteingehalt reduziert. Diese Beobachtung wurde zusätzlich mit einem siRNA-vermittelten KD der katalytischen Untereinheiten CK2 $\alpha$  und CK2 $\alpha'$  verifiziert. Weiterführende qRT-PCR- und Reportergen-Analysen ergaben, dass die CK2-Inhibition die Genexpression von NG2 reprimiert. Aus funktionalen Analysen ging hervor, dass in Folge der Reduktion des NG2-Proteingehalts nach CK2-Inhibition angiogene Prozesse sowohl *in vitro* als *in vivo* signifikant gehemmt werden (Abbildung 39) [108].

Im 2. Teil konnte gezeigt werden, dass auch in GBM-Zellen in Folge einer CK2-Inhibition mittels CX-4945 oder einem CK2 $\alpha$ -KO der Proteingehalt von NG2 signifikant reduziert wird. Auch hier wurde durch qRT-PCR- und Reportergen-Analysen bestätigt, dass es sich um einen genregulatorischen Mechanismus handelt. Funktionale Analysen zeigten, dass in Folge eines reduzierten NG2-Proteingehalts nach CK2-Inhibition sowohl die Proliferation als auch die Migration von GBM-Zellen signifikant reduziert war. Abschließende *in silico*-Analysen und Experimente mit Patientenproben bestätigten die Zelllinien-basierten Ergebnisse (Abbildung 39) [123].



**Abbildung 39: Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse.** Eine CK2-Inhibition reduziert die Genexpression und den Proteingehalt von NG2 in humanen primären Perizyten und GBM-Zellen. In Folge dessen wird sowohl eine Reduktion der angiogenen Aktivität als auch der Migration und Proliferation beobachtet.

## 6 Diskussion

Das Proteoglykan NG2 ist ein interessantes Target für neue Therapien, da es sowohl in Blutgefäßen als auch in Tumorzellen exprimiert wird. Entsprechend ist NG2 an angiogenen Prozessen aber auch an der Proliferation, Migration und Invasion von Tumorzellen beteiligt. Allerdings ist bislang nur wenig über die molekularen Regulationsmechanismen der NG2-Expression bekannt. Auf Grund von vorangegangenen Studien wurde in der vorliegenden Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass die Proteinkinase CK2 ein wesentlicher Regulator von NG2 sein könnte und damit die angiogene Aktivität primärer humaner Perizyten sowie die Proliferation und Migration humaner GBM-Zellen steuert.

### 6.1 Die CK2 reguliert über NG2 angiogene Prozesse in Perizyten

Perizyten sind in die Basalmembran von Kapillaren eingebettet und stabilisieren durch ihren direkten Kontakt sowohl mit Endothelzellen als auch Komponenten der EZM das Mikrogefäßnetzwerk und tragen so zu dessen Funktionalität bei. Darüber hinaus unterstützen und stabilisieren Perizyten auch das Aussprossen von neuen Mikrogefäßen und fördern damit die Angiogenese [25]. In den letzten Jahren wurden verschiedene Proteine in Perizyten identifiziert, die sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen einen pro-angiogenen Effekt haben, wozu auch das Proteoglykan NG2 zählt. So fördert beispielsweise die Interaktion von NG2 mit Kollagen V und VI das Aussprossen von Perizyten und Endothelzellen [17-19,26,31,32,124]. Entsprechend bewirkt ein Verlust von NG2 in Perizyten eine Hemmung der Angiogenese [34,84,93,95,109]. In Endothelzellen konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass die Proteinkinase CK2 angiogene Signalwege, wie Raf/MAPK/ERK und PI3K/AKT, maßgeblich reguliert und CK2-Inhibitoren, wie CIGB-300, TBB oder CX-4945, *in vitro* und *in vivo* eine anti-angiogene Wirkung ausüben [84,93,95,109].

Im 1. Teil der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die CK2 einen Einfluss auf den NG2-Proteingehalt von Perizyten hat. Mit Hilfe von molekularbiologischen Analysen konnte gezeigt werden, dass die beiden membrangängigen, kompetitiven aber strukturell unterschiedlichen CK2-Inhibitoren TBB und CX-4945 den NG2-Proteingehalt reduzieren. Allerdings handelt es sich weder bei TBB noch CX-4945 um einen monoselektiven Inhibitor gegen die CK2. Daher wurde der NG2-Proteingehalt auch nach einem siRNA-vermittelten KD der katalytischen Untereinheiten CK2 $\alpha$  und CK2 $\alpha'$  untersucht. Die Ergebnisse dieser Analysen konnten bestätigen, dass der NG2-Proteingehalt in Abhängigkeit von der CK2 reprimiert wird und es sich somit im Falle von TBB und CX-4945 nicht um Inhibitor-spezifische Nebeneffekte handelt. Zudem konnte in Folge einer CK2-Inhibition auch eine reduzierte Genexpression von NG2 in Perizyten detektiert werden. Der humane NG2-Promotor auf Chromosom 15 wurde jedoch noch nicht charakterisiert, weshalb die regulatorischen Mechanismen der NG2-Genexpression

bisher weitestgehend unbekannt sind [55]. Bislang wurden nur die Transkriptionsfaktoren SoxE, bHLH, Pax3, Egr-1, *myocardin-related transcription factors* und Sp1, identifiziert, die die Genexpression von NG2 aktivieren oder inhibieren [55,125-127]. Beispielsweise zeigten Bin et al. [56] in humanen Keratinozyten, dass ein KD von Sp1 einen reprimierenden Effekt auf die NG2-Genexpression hat. Im Gegensatz dazu ist der murine NG2-Promotor auf Chromosom 9 bereits gut charakterisiert. Sellers et al. [128] konnten hier mit Hilfe von *in silico*-Analysen unter anderem Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren *CCAAT/enhancer-binding-protein* (C/EBP), p300, *CREB-binding protein* (CBP) und Sp1 detektieren. Weiterführende Luciferase-basierte Analysen zeigten, dass lediglich Sp1 die transkriptionelle Aktivität des murinen NG2-Promotors signifikant steigert [128]. Allerdings unterscheiden sich der humane und der murine NG2-Promotor in ihrer chromosomalen Lokalisation und zeigen keine signifikante Sequenzhomologie. Daher können die Daten des murinen Promotors nicht einfach auf den humanen Promotor transferiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden genregulatorische Mechanismen der NG2-Expression in Abhängigkeit von der CK2 untersucht. Dazu wurde eine 2677 bp große Region in 5'-Richtung vor dem humanen NG2-Gen generiert. Durch die systematische Fragmentierung und Analyse dieses Promotorbereichs konnte der 114 bp große Abschnitt P1.2.4.1 identifiziert werden, der die transkriptionelle Aktivität positiv beeinflusst. In darauffolgenden *luciferase reporter assays* wurde der Effekt von CX-4945 auf die transkriptionelle Aktivität von P1.2.4.1 untersucht. Wie erwartet reprimiert die Inhibition der CK2 die transkriptionelle Aktivität der NG2-Promotorregion. Interessanterweise ergaben *in silico*-Analysen von P1.2.4.1 eine Bindestelle für den Transkriptionsfaktor Sp1, ein Substrat der CK2. Es ist bekannt, dass Sp1 die Genexpression sowohl aktivieren als auch reprimieren kann, wobei die Aktivität des Transkriptionsfaktors von dessen DNA-Bindungskapazität abhängt [63]. Diese wird zum einen von dem Methylierungsmuster der DNA selbst und zum anderen von posttranslationalen Modifikationen des Transkriptionsfaktors, wie Glykosylierungen und Phosphorylierungen, beeinflusst [57,63,64]. Wilms et al. [127] konnten kürzlich zeigen, dass auch der Redox-Status die DNA-Bindungskapazität von Sp1 beeinflusst. So bindet die reduzierte Form von Sp1 sowohl in der putativen Promotorregion als auch an einem *enhancer* des humanen NG2-Gens und steigert dessen Expression. Sp1 kann in Abhängigkeit von der jeweiligen posttranskriptionellen Modifikation als auch von der DNA-Bindestelle des Zielgens reprimierend oder aktivierend auf die Genexpression wirken [58]. Da bekannt ist, dass die CK2-induzierte Phosphorylierung am C-Terminus von Sp1 dessen DNA-Bindungskapazität reduziert [62,129], wurde in dieser Arbeit spekuliert, dass die CK2-Inhibition in einer verbesserten DNA-Bindungskapazität von Sp1 resultieren könnte. Basierend auf der reprimierenden Wirkung des Transkriptionsfaktors würde die Genexpression von NG2 entsprechend reduziert werden.

Die Reporter-gen-Analysen ergaben nicht nur Fragmente mit einer erhöhten, sondern auch mit einer reduzierten transkriptionellen Aktivität. Es ist bekannt, dass Promotoren sich über mehrere tausend bp in 5'-Richtung vor dem Transkriptionsstart erstrecken können und sowohl Sequenzen für *enhancer* als auch *silencer* enthalten [130]. Die reduzierte transkriptionelle Aktivität von NG2-Promotorfragmenten, wie P2, könnte durch *silencer* Elemente verursacht worden sein. Somit ist anzunehmen, dass die Genexpression von NG2 sowohl durch *enhancer* als auch *silencer* reguliert wird. Die Verwendung der NG2-Promotorfragmente für *chromatin immunoprecipitation* (ChIP) assays könnte zukünftig Aufschluss geben, ob noch weitere Transkriptionsfaktoren an den Promotor binden und somit womöglich angiogene Prozesse in Perizyten beeinflussen. Allerdings würde die vollständige Charakterisierung des NG2-Promotors den Umfang dieser Arbeit übersteigen, da der Fokus lediglich auf CK2-abhängigen Regulationsmechanismen lag.

Ein weiteres Ziel war es, die funktionalen Auswirkungen eines reduzierten NG2-Proteingehalts in Perizyten in Folge einer CK2-Inhibition zu untersuchen. Perizyten selbst sind in der Monokultur im Gegensatz zu Endothelzellen nicht in der Lage, sich in gefäßähnlichen Strukturen zusammenzulagern [131]. Jedoch ist deren stabilisierende Funktion maßgeblich an der Aufrechterhaltung des Mikrogefäßnetzwerks beteiligt [132]. Daher wurde mittels Kokultur untersucht, wie sich eine CK2-Inhibition in Perizyten auf die Fähigkeit von Endothelzellen Gefäßmaschen auszubilden auswirkt. Hierfür mussten zuerst die Bedingungen für eine Kokultur aus Perizyten und HUVEC optimiert werden, da deren Verhältnis *in vivo* gewebeabhängig von 1:1 bis 1:100 variieren kann [133]. Ein Verhältnis von 1:4 verhinderte die Ausbildung von gefäßähnlichen Strukturen, während ein Verhältnis von 1:10 zur Ausbildung von gefäßähnlichen Strukturen führte. Da Perizyten in der Monokultur Sphäroide bilden, könnte die hohe Anzahl von Perizyten in der 1:4 Kokultur das Ausbilden sphäroidaler Strukturen fördern, anstatt gefäßähnliche Strukturen zu stabilisieren [131]. Dagegen spiegelt das Verhältnis 1:10 eine weitverbreitete Verteilung von Perizyten im Organismus wider [30] und wurde daher für weiterführende *tube formation assays* verwendet. Diese Analysen zeigten, dass die Vorbehandlung von Perizyten mit CX-4945 einen destabilisierenden Effekt auf die Ausbildung von Gefäßmaschen in der Kokultur mit HUVEC ausübt. Dieser anti-angiogene Effekt der CK2-Inhibition wurde durch weitere *in vitro*-Analysen, wie *scratch*, *transmigration* und *sprouting assays*, bestätigt.

Zusätzlich wurden *ex vivo*-Experimente mit Aortenringen aus WT und NG2<sup>-/-</sup> Mäusen durchgeführt. Wie erwartet, zeigte sich ein reduziertes Aussprossen von vaskulären Zellen aus den Aortenringen von NG2<sup>-/-</sup> Mäusen. Zudem wurden Aortenringe aus NG2<sup>-/-</sup> Mäusen mit CX-4945 behandelt. Der hierbei beobachtete additive anti-angiogene Effekt lässt sich unter anderem dadurch erklären, dass die Inhibition der CK2 auch die Proliferation und Migration

von Endothelzellen hemmt [79]. Neben Endothelzellen und Perizyten sind auch Fibroblasten und Muskelzellen in der Gefäßwand lokalisiert und tragen zur Aufrechterhaltung und Funktionalität des Gefäßnetzwerks bei [22-24,134]. Muskelzellen sind maßgeblich an der Arteriogenese beteiligt, wohingegen Fibroblasten durch die Synthese und Aufrechterhaltung der EZM sowie durch die Sekretion von pro-angiogenen Faktoren in den Prozess der Angiogenese involviert sind [111-113,135]. Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten zeigen, dass NHDF das Proteoglykan NG2 exprimieren und die CX-4945-Behandlung auch deren NG2-Proteingehalt reduziert. Daher kann spekuliert werden, dass die CK2 sowohl in Perizyten als auch in Fibroblasten NG2-abhängige, angiogene Prozesse reguliert.

Abschließende *in vivo*-Untersuchungen in Form von *matrigel plug assays* zeigten einhergehend mit den *in vitro*-Ergebnissen der *tube formation assays*, dass sowohl der KO von NG2 als auch die Inhibition der CK2 in Perizyten zu einer signifikanten Reduktion der Mikrogefäßdichte führt. Stallcup et al. [26] und Ozerdem et al. [34] analysierten die angiogene Funktion von NG2 in Perizyten *in vitro* mit Hilfe von KD-basierten Experimenten sowie *in vivo* mittels KO im Mausmodell. Aus ihren Studien geht hervor, dass der Verlust von NG2 in Perizyten deren angiogene Aktivität und die Ausbildung von Gefäßnetzwerken inhibiert. Zusammen mit diesen vorangegangenen Studien kann geschlussfolgert werden, dass eine erniedrigte Proliferation und Migration von Perizyten in Folge eines reduzierten NG2-Proteingehalts mit einer erniedrigten Anzahl von Blutgefäßen assoziiert ist [33,34]. Zudem führt ein erniedrigter NG2-Proteingehalt in Perizyten zu einer gestörten Interaktion mit Endothelzellen, woraufhin sich weniger Verbindungen (*cell junctions*) ausbilden und die Permeabilität der betroffenen Mikrogefäße zunimmt [33]. Allerdings kann der Verlust von NG2 auch das Ablösen der Perizyten von Mikrogefäßen und deren Migration in das umliegende Gewebe begünstigen [33]. In welchem Maß der anti-angiogene Effekt durch die Absenz von NG2 selbst oder das Abwandern von Perizyten verursacht wird, wurde in dieser Arbeit nicht detailliert untersucht und stellt eine interessante Fragestellung für zukünftige Studien dar. Diese Fragestellung könnte beispielsweise beantwortet werden, indem die Anzahl von Perizyten im Gewebe von CX-4945-behandelten Mäusen, wie Retinagewebe, mittels immunhistochemischer Analysen quantitativ erfasst wird [49].

Wie bereits beschrieben, weist die Proteinkinase CK2 ein großes Substratspektrum von mehr als 300 Proteinen auf und ist damit sowohl in diverse Signalkaskaden als auch verschiedene, genregulatorische Mechanismen involviert [73]. Daher ist es naheliegend, dass neben NG2 auch noch weitere Proteine in Perizyten von der CK2 reguliert werden. Einhergehend mit Di Maira et al. [107] konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Inhibition der CK2 die Phosphorylierung von Akt<sup>S129</sup> reduziert. Es ist bekannt, dass eine Reduktion von pAkt<sup>S129</sup> die Aktivität des Transkriptionsfaktors *forkhead box* (FOXO)3A verringert [136].

---

Interessanterweise identifizierten Teichert et al. [137] FOXO3A kürzlich als wichtigen Transkriptionsfaktor in der Tie2-vermittelten Akt-Signalkaskade in Perizyten. Die autokrine Stimulation von Perizyten mit Ang1 reprimiert die Aktivität von FOXO3A, woraufhin das Ausreifen der Mikrogefäße gefördert wird. Da das Ausreifen von Blutgefäßen und die Angiogenese einander entgegengesetzte Prozesse sind [138], kann spekuliert werden, dass die CK2-Inhibition die Entwicklung von Blutgefäßen hemmt, indem sie die Aktivität von FOXO3A in Perizyten verringert.

## 6.2 Die CK2 reguliert über NG2 die Proliferation und Migration von humanen GBM-Zellen

NG2 wird unter physiologischen Bedingungen von Perizyten, OPZ und NG2-Gliazellen exprimiert [21]. Unter pathologischen Bedingungen wird das Proteoglykan auch von einigen Tumoren, wie dem Melanom oder GBM, exprimiert [36-38]. Allerdings sind nicht alle GBM-Zellen positiv für NG2, sondern lediglich eine Subpopulation, die sich durch einen aggressiven Phänotyp auszeichnet [29,48,124,139,140]. Hierbei fördert NG2 maßgeblich die Chemoresistenz, Proliferation, Migration und Invasion der Zellen [39,41,141]. Daher wird NG2 zum einen als Markerprotein für besonders aggressive Subpopulationen von Tumoren, wie dem Melanom und dem GBM, diskutiert und dient zum anderen als potentiell Target für neue therapeutische Ansätze [21,29,37,48,53,115,139]. Allerdings ist noch nicht bekannt, über welchen molekularen Mechanismus die Expression von NG2 in GBM-Zellen induziert wird. Bislang konnten keine genetischen Aberrationen, wie Genamplifikationen oder chromosomale Translokationen, identifiziert werden [142]. Zudem sind auch keine Mutationen im NG2-Gen bekannt, die zu einer *gain* oder *loss of function* führen.

Interessanterweise ergaben genomweite *copy number variation* Analysen von GBM-Proben eine *gain in gene dosage* Mutation des CK2 $\alpha$ -Gens auf Chromosom 20 [143]. Allgemein führt die Überexpression der CK2 in Tumoren zur Aktivierung von Signalwegen, wie JAK/STAT, Raf/MAPK/ERK und PI3K/AKT, wodurch die Proliferation, Migration und das Überleben der Tumorzellen gefördert wird. Gleichzeitig werden apoptotische Signalwege, wie NF $\kappa$ B, in Folge einer CK2-Hyperaktivität gehemmt [80,91,144]. Daher kann angenommen werden, dass die *gain in gene dosage* Mutation des CK2 $\alpha$ -Gens auf molekularer Ebene ein entscheidender Faktor für die Progression von Gliomen ist. In der Tat konnten mehrere Studien bestätigen, dass die CK2 auch in GBM-Zellen Signalwege, wie JAK/STAT und PI3K/AKT, reguliert und damit an der Entwicklung und Progression des GBM beteiligt ist [46,89,145].

Im 1. Teil der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der CK2 in primären humanen Perizyten den Proteingehalt von NG2 über einen genregulatorischen Mechanismus reduziert. Daher wurde im 2. Teil dieser Arbeit untersucht, ob dieser

genregulatorische Mechanismus auch in humanen GBM-Zellen nachgewiesen werden kann. Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl die Inhibition als auch der KO der CK2 den Proteingehalt und die Genexpression von NG2 in den humanen GBM-Zelllinien A1207 und U87 signifikant reduzieren. Aus Reportergen-Analysen ging hervor, dass die transkriptionelle Aktivität der 114 bp großen Region P1.2.4.1 des putativen NG2-Promotors in Folge einer CX-4945-Behandlung reprimiert wird. Einhergehend mit den Ergebnissen der qRT-PCR konnte daher auch für GBM-Zellen bestätigt werden, dass die CK2 die Genexpression von NG2 reguliert. Die *in silico*-Analysen im 1. Teil dieser Arbeit zeigten eine Bindestelle für den Transkriptionsfaktor Sp1 in der NG2-Promoterregion P1.2.4.1. Es ist bekannt, dass Sp1 die Genexpression in Abhängigkeit seines Phosphorylierungsmusters sowohl aktivieren als auch reprimieren kann [64]. Wie bereits beschrieben, reduziert die CK2-abhängige Phosphorylierung von Sp1 die DNA-Bindungskapazität des Transkriptionsfaktors [62,129]. Daher kann analog zur Hypothese im 1. Teil dieser Arbeit auch hier spekuliert werden, dass die CK2-Inhibition zu einer gesteigerten DNA-Bindungskapazität von Sp1 führt, woraufhin die NG2-Genexpression reprimiert wird.

*In silico*-Analysen ergaben neben der Bindestelle für den Transkriptionsfaktor Sp1, der sowohl an der Regulation von proliferativen als auch invasiven Prozessen von Gliomzellen beteiligt ist [146,147], auch eine Bindestelle für den Transkriptionsfaktor Olig2. Interessanterweise konnten Gotoh et al. [125] bereits zeigen, dass Olig2 an einer *enhancer* Region in einem Intron des humanen NG2-Gens bindet und dessen Expression fördert. Darüber hinaus ist die CK2 eine von drei Kinasen, deren Phosphorylierung an Olig2 dazu führt, dass die Proliferation von Gliomzellen gefördert wird. Zhou et al. [148] konnten zeigen, dass der Inhibitor CX-4945 die CK2-abhängige Phosphorylierung von Olig2 reduziert. Daher könnte die CK2 die Genexpression von NG2 über die Phosphorylierung von Sp1 und Olig2 regulieren. Neben den bereits beschriebenen ChIP-Analysen könnten auch weiterführende Reportergen-Analysen durchgeführt werden. Denkbar wäre beispielsweise hierfür die NG2-Promotorfragmente in Kombination mit Plasmiden, die für Sp1- oder Olig2-KO-Mutanten kodieren, zu verwenden. Weiterhin könnte sowohl die Bindestelle von Sp1 als auch von Olig2 mutiert werden, um das Bindungsverhalten und den Einfluss der beiden Transkriptionsfaktoren genauer zu untersuchen.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die funktionalen Auswirkungen des reduzierten NG2-Proteingehalts in Folge einer CK2-Inhibition in humanen GBM-Zellen zu untersuchen. Aus den verschiedenen Experimenten dieser Arbeit, wie den *scratch* und *transmigration assays*, ging hervor, dass eine CK2-Inhibition zu einer signifikanten Reduktion der Proliferations- und Migrationsfähigkeit von A1207- und U87-Zellen führt. Die Überexpression von NG2 konnte diesem anti-migratorischen Effekt des CK2-Inhibitors

CX-4945 signifikant entgegenwirken. Dieses sogenannte “*rescue*“-Experiment bekräftigt die Hypothese, dass NG2 ein nachgeordnetes Signalmolekül der CK2 ist.

Vorangegangene Studien konnten bereits zeigen, dass NG2 die Proliferation, Migration und Invasion von GBM-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen molekularen Interaktionen beeinflusst [29]. Beispielsweise fungiert NG2 als Ko-Rezeptor von Integrin  $\beta$ -1 und verstärkt dessen Signaltransduktion. Die Gruppe von Stallcup [28] beobachtete, dass eine Herunterregulation von NG2 die Aktivierung von Integrin  $\beta$ -1 reduziert, woraufhin die Phosphorylierung der FAK abnimmt. Dies resultiert in einer verringerten Proliferations- und Migrationsfähigkeit der Zellen *in vitro* und einer Reduktion des Tumorwachstums *in vivo* [26,28,33]. In der vorliegenden Arbeit konnte keine reduzierte Aktivität von Integrin  $\beta$ -1 in GBM-Zellen nachgewiesen werden, obwohl NG2 in Folge der CK2-Inhibition signifikant herunterreguliert war. Allerdings wurde in Übereinstimmung mit Stallcup et al. [28] eine deutlich verringerte Phosphorylierung der FAK in Folge einer CK2-abhängigen Reduktion von NG2 in GBM-Zellen detektiert. Die FAK ist nicht nur ein Signaltransduktor von Integrin  $\beta$ -1, sondern auch an der Wachstumsfaktoren-induzierten Zellproliferation und -migration beteiligt. Interessanterweise konnten Kim et al. [149] zeigen, dass die CK2-Inhibition die TGF- $\beta$ -1-ausgelöste Phosphorylierung der FAK in humanen Lungen-Adenokarzinomzellen reduziert. Daher kann spekuliert werden, dass die erniedrigte Proliferation und Migration von NG2-positiven GBM-Zellen nach CK2-Inhibition auf einer gestörten NG2/FAK Signalweiterleitung basiert. Weiterführende Analysen mit spezifischen Inhibitoren gegen die einzelnen Faktoren der Signalkaskade könnten klären, ob es sich um Integrin-unabhängige und somit Wachstumsfaktor-induzierte Signalwege von NG2 handelt [118,150-152].

Neben der FAK wurde auch die Phosphorylierung von Akt in A1207- und U87-Zellen nach CK2-Inhibition untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl CX-4945 als auch ein CK2 $\alpha$ -KO zu einer starken Reduktion der CK2-abhängigen Phosphorylierung von Akt<sup>S129</sup> führen. Franke et al. [153] fassten in einer detaillierten Übersichtsarbeit die wichtigen Funktionen von Akt in Tumorzellen zusammen. So fördert eine Hyperphosphorylierung von Akt das Überleben von mutierten, beschädigten und transformierten Zellen. Folglich resultiert eine gesteigerte Aktivität von Akt in der Proliferation von Tumorzellen, die eigentlich durch programmierten Zelltod zu Grunde gehen sollten. Interessanterweise identifizierten Di Maira et al. [107] zusätzlich zu den beiden bekanntesten PI3K-induzierten Akt-Phosphorylierungsstellen T308 und S473 [154] die Position S129 als CK2-Phosphorylierungsstelle. In darauffolgenden Jahren wurde mehrfach gezeigt, dass die CK2-abhängige Phosphorylierung von Akt deren Aktivität maßgeblich fördert und somit zu der anti-apoptischen Wirkung beiträgt [155-157].

Die CK2 ist jedoch in viele weitere anti-apoptotische und pro-proliferative Signalwege involviert [89,107,145]. Daher kann an dieser Stelle nicht sicher bestimmt werden, in welchem Maß die CK2-abhängige Phosphorylierung von Akt<sup>S129</sup> zur Zellproliferation und -migration beiträgt. Weiterführende Hochdurchsatzverfahren, wie ein *protein microarray*, könnten helfen, genauer zu differenzieren, welche zusätzlichen CK2-abhängigen Signalkaskaden in diesem Kontext aktiviert oder gehemmt sind.

In der Literatur wird diskutiert, ob Ergebnisse, die mit etablierten Zelllinien erzielt werden, auf die jeweiligen Primärtumore von Patienten übertragbar sind. Die Kultivierung von Zelllinien über Jahre hinweg kann zu genetischen Aberrationen führen und somit auch den Geno- und Phänotyp der Zellen verändern [158]. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich *in silico* das CK2- und NG2-Expressionsmuster in Proben aus humanen Gliomen WHO Grad I bis VI mit Hilfe der cBioPortal Plattform analysiert. Sowohl die Expression der CK2-Untereinheiten als auch von NG2 war in humanen GBM-Proben mit WHO Grad IV im Vergleich zu Proben aus anderen Gliomen mit WHO Grad I-III (Astrozytom, Oligodendrogliom, anaplastisches Oligodendrogliom und Astrozytom) signifikant erhöht. Zudem konnte eine positive Korrelation zwischen dem mRNA-Gehalt von NG2 und den CK2-Untereinheiten festgestellt werden. Darüber hinaus ergab sich eine starke positive Korrelation zwischen dem mRNA-Gehalt von NG2 und CK2 $\alpha$ . Das bedeutet, dass der mRNA-Gehalt des putativen Regulators CK2 signifikant mit dem mRNA-Gehalt des putativen Zielmoleküls NG2 korreliert. Diese *in silico*-Analysen unterstützen die Hypothese, dass NG2 ein nachgeordnetes Signalmolekül der CK2 ist. Abschließende Experimente mit primären Zellen aus GBM-Patientenproben zeigten einhergehend mit den Analysen an den humanen GBM-Zelllinien A1207 und U87, dass die Inhibition der CK2 mit CX-4945 den NG2-Proteingehalt deutlich reduziert. Sowohl die *in silico*-Analysen als auch die Experimente mit Patientenproben konnten somit die Zelllinien-basierten Ergebnisse bestätigen.

### 6.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Das Proteoglykan NG2 ist sowohl im vaskulären Kompartiment an angiogenen Prozessen als auch im Tumorkompartiment an kanzerogenen Prozessen beteiligt. Folglich stellt dieses Oberflächenprotein ein interessantes Target für neue anti-angiogene und anti-kanzerogene Therapieansätze dar. Allerdings sind die regulatorischen Mechanismen der Genexpression sowie der humane Promotor von NG2 weitestgehend unbekannt.

Daher war es das Ziel dieser Arbeit, neue Regulationsmechanismen der NG2-Expression im vaskulären Kompartiment, genauer in Perizyten, und in NG2-positiven Tumoren, wie dem GBM, zu identifizieren. Wie bereits detailliert beschrieben, zeichnen sich NG2-positive Tumor-Subpopulationen durch einen äußerst aggressiven und invasiven Phänotyp aus. Bislang ist

jedoch nicht bekannt, wie diese "Re-Expression" des Proteoglykans induziert und reguliert wird. Basierend auf den generierten experimentellen Daten dieser Arbeit sowie den durchgeführten *in silico*-Analysen von Patientenproben kann hypothetisiert werden, dass die Hyperaktivität der CK2 aufgrund der *gain in gene dosage* Mutation der CK2 $\alpha$ -Untereinheit die Expression von NG2 in humanen GBM-Zellen induziert. Folglich könnten CK2-Inhibitoren, wie CX-4945, einen neuen therapeutischen Ansatz speziell für NG2-positive GBMs darstellen. Bisherige Antikörper-basierte Therapiemodelle in der Maus und Ratte konnten bereits vielversprechende Ergebnisse in Experimenten mit Melanomen, primären und metastatischen Hirntumoren und sogar GBMs liefern [118,142]. Allerdings erfolgte die Applikation in diesen Studien auf Grund der selektiven Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke entweder intratumoral oder mit Hilfe von speziellen Kathetersystemen und Perfusion, der sogenannten konvektionsverstärkten Abgabe (CED) [159-162]. Der CK2-Inhibitor CIGB-300 konnte in klinischen Phase I und II Studien gegen Gebärmutterhalskrebs bereits vielversprechende Ergebnisse liefern und zeigte im Mausmodell ein reduziertes Tumorwachstum, geringere Metastasierung sowie anti-angiogene und pro-apoptische Wirkung [163-165]. Das Peptid kann intravenös oder intratumoral injiziert werden, kann allerdings auf Grund seines Molekulargewichts von 3060,63 kDa die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren [99]. Es wird deutlich, dass sowohl die Lokalisation des Tumors als auch die Blut-Hirn-Schranke eine große Hürde für die Applikationsmöglichkeit von putativen Therapeutika gegen das GBM darstellen. Der *small molecule inhibitor* CX-4945 könnte dahingehend eine Alternative darstellen, da er aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften und einem Molekulargewicht von 349,77 kDa die Blut-Hirn-Schranke passieren kann [166,167] und gleichzeitig als orales Medikament eine gute Bioverfügbarkeit von bis zu 50 % aufweist [88]. Darüber hinaus hängt der Metabolismus von Tumorzellen im Vergleich zu gesunden Zellen deutlich stärker von der CK2 ab [168]. In der Literatur wird daher auch von einer „CK2-Sucht“ gesprochen, die letztlich dazu führt, dass Tumorzellen deutlich sensitiver auf Inhibitoren wie CX-4945 reagieren als gesunde Zellen [80,168,169]. Da CX-4945 bereits in klinischen Phase I und II Studien zur Behandlung von Medulloblastomen (NCT03904862) verwendet wird, wäre eine zukunftsnahe Anwendung gegen NG2-positive GBMs in der Klinik denkbar. Sowohl im Tiermodell als auch in klinischen Studien wird von einer guten Verträglichkeit von CX-4945 und einer guten Wirksamkeit gegen das Tumorwachstum berichtet [90,170]. Entsprechend könnten die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zur CK2 als neuer Regulator von NG2-medierten angiogenen und kanzerogenen Signalwegen in Gefäß- und Tumorzellen zur Entwicklung neuer Therapiestrategien beitragen.

## 7 Literaturverzeichnis

1. **Baker M.** Making membrane proteins for structures: a trillion tiny tweaks. *Nat Methods* 7: 429-434, 2010
2. **Sadowski PG, Groen AJ, Dupree P, Lilley KS.** Sub-cellular localization of membrane proteins. *Proteomics* 8: 3991-4011, 2008
3. **Tan S, Tan HT, Chung MC.** Membrane proteins and membrane proteomics. *Proteomics* 8: 3924-3932, 2008
4. **Carpenter EP, Beis K, Cameron AD, Iwata S.** Overcoming the challenges of membrane protein crystallography. *Curr Opin Struct Biol* 18: 581-586, 2008
5. **Cornell B.** <<https://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-1-cell-biology/13-membrane-structure/membrane-proteins.html>> 2016
6. **Bumol TF, Reisfeld RA.** Unique glycoprotein-proteoglycan complex defined by monoclonal antibody on human melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 1245-1249, 1982
7. **Stallcup WB.** The NG2 antigen, a putative lineage marker: immunofluorescent localization in primary cultures of rat brain. *Dev Biol* 83: 154-165, 1981
8. **Harper JR, Bumol TF, Reisfeld RA.** Serological and biochemical analyses of monoclonal antibodies to human melanoma-associated antigens. *Hybridoma* 1: 423-432, 1982
9. **Campoli MR, Chang CC, Kageshita T, Wang X, McCarthy JB, Ferrone S.** Human high molecular weight-melanoma-associated antigen (HMW-MAA): a melanoma cell surface chondroitin sulfate proteoglycan (MSCP) with biological and clinical significance. *Crit Rev Immunol* 24: 267-296, 2004
10. **Nishiyama A, Dahlin KJ, Prince JT, Johnstone SR, Stallcup WB.** The primary structure of NG2, a novel membrane-spanning proteoglycan. *J Cell Biol* 114: 359-371, 1991
11. **Tamburini E, Dallatomasina A, Quartararo J, Cortelazzi B, Mangieri D, Lazzaretti M, Perris R.** Structural deciphering of the NG2/CSPG4 proteoglycan multifunctionality. *FASEB J* 33: 3112-3128, 2019
12. **Campoli M, Ferrone S, Wang X.** Functional and clinical relevance of chondroitin sulfate proteoglycan 4. *Adv Cancer Res* 109: 73-121, 2010
13. **Stallcup WB.** The NG2 proteoglycan: past insights and future prospects. *J Neurocytol* 31: 423-435, 2002
14. **Pankova D, Jobe N, Kratochvilova M, Buccione R, Brabek J, Rosel D.** NG2-mediated Rho activation promotes amoeboid invasiveness of cancer cells. *Eur J Cell Biol* 91: 969-977, 2012
15. **Wilson BS, Ruberto G, Ferrone S.** Immunochemical characterization of a human high molecular weight--melanoma associated antigen identified with monoclonal antibodies. *Cancer Immunol Immunother* 14: 196-201, 1983
16. **Trotter J, Karram K, Nishiyama A.** NG2 cells: Properties, progeny and origin. *Brain Res Rev* 63: 72-82, 2010
17. **Burg MA, Tillet E, Timpl R, Stallcup WB.** Binding of the NG2 proteoglycan to type VI collagen and other extracellular matrix molecules. *J Biol Chem* 271: 26110-26116, 1996
18. **Stallcup WB, Dahlin K, Healy P.** Interaction of the NG2 chondroitin sulfate proteoglycan with type VI collagen. *J Cell Biol* 111: 3177-3188, 1990

19. **Tillet E, Gential B, Garrone R, Stallcup WB.** NG2 proteoglycan mediates beta1 integrin-independent cell adhesion and spreading on collagen VI. *J Cell Biochem* 86: 726-736, 2002
20. **Nishiyama A, Lin XH, Giese N, Heldin CH, Stallcup WB.** Interaction between NG2 proteoglycan and PDGF alpha-receptor on O2A progenitor cells is required for optimal response to PDGF. *J Neurosci Res* 43: 315-330, 1996
21. **Yadavilli S, Hwang EI, Packer RJ, Nazarian J.** The role of NG2 proteoglycan in glioma. *Transl Oncol* 9: 57-63, 2016
22. **Peppiatt CM, Howarth C, Mobbs P, Attwell D.** Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature* 443: 700-704, 2006
23. **Tilton RG, Kilo C, Williamson JR, Murch DW.** Differences in pericyte contractile function in rat cardiac and skeletal muscle microvasculatures. *Microvasc Res* 18: 336-352, 1979
24. **Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C.** Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res* 97: 512-523, 2005
25. **Ribatti D, Nico B, Crivellato E.** The role of pericytes in angiogenesis. *Int J Dev Biol* 55: 261-268, 2011
26. **Stallcup WB, You WK, Kucharova K, Cejudo-Martin P, Yotsumoto F.** NG2 proteoglycan-dependent contributions of pericytes and macrophages to brain tumor vascularization and progression. *Microcirculation* 23: 122-133, 2016
27. **Kelly-Goss MR, Sweat RS, Stapor PC, Peirce SM, Murfee WL.** Targeting pericytes for angiogenic therapies. *Microcirculation* 21: 345-357, 2014
28. **Stallcup WB.** NG2 proteoglycan enhances brain tumor progression by promoting beta-1 integrin activation in both cis and trans orientations. *Cancers (Basel)* 9, 2017
29. **Schiffer D, Mellai M, Boldorini R, Bisogno I, Grifoni S, Corona C, Bertero L, Cassoni P, Casalone C, Annovazzi L.** The significance of chondroitin sulfate proteoglycan 4 (CSPG4) in human gliomas. *Int J Mol Sci* 19, 2018
30. **Armulik A, Genove G, Betsholtz C.** Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell* 21: 193-215, 2011
31. **Stapor PC, Sweat RS, Dashti DC, Betancourt AM, Murfee WL.** Pericyte dynamics during angiogenesis: new insights from new identities. *J Vasc Res* 51: 163-174, 2014
32. **Franco M, Roswall P, Cortez E, Hanahan D, Pietras K.** Pericytes promote endothelial cell survival through induction of autocrine VEGF-A signaling and Bcl-w expression. *Blood* 118: 2906-2917, 2011
33. **You WK, Yotsumoto F, Sakimura K, Adams RH, Stallcup WB.** NG2 proteoglycan promotes tumor vascularization via integrin-dependent effects on pericyte function. *Angiogenesis* 17: 61-76, 2014
34. **Ozerdem U, Stallcup WB.** Pathological angiogenesis is reduced by targeting pericytes via the NG2 proteoglycan. *Angiogenesis* 7: 269-276, 2004
35. **Stallcup WB.** The NG2 proteoglycan in pericyte biology. *Adv Exp Med Biol* 1109: 5-19, 2018
36. **Beard RE, Abate-Daga D, Rosati SF, Zheng Z, Wunderlich JR, Rosenberg SA, Morgan RA.** Gene expression profiling using nanostring digital RNA counting to identify potential target antigens for melanoma immunotherapy. *Clin Cancer Res* 19: 4941-4950, 2013

37. **Jamil NS, Azfer A, Worrell H, Salter DM.** Functional roles of CSPG4/NG2 in chondrosarcoma. *Int J Exp Pathol* 97: 178-186, 2016
38. **Wang J, Svendsen A, Kmiecik J, Immervoll H, Skaftnesmo KO, Planaguma J, Reed RK, Bjerkvig R, Miletic H, Enger PO, Rygh CB, Chekenya M.** Targeting the NG2/CSPG4 proteoglycan retards tumour growth and angiogenesis in preclinical models of GBM and melanoma. *PLoS One* 6: e23062, 2011
39. **de Gooijer MC, Guillen Navarro M, Bernards R, Wurdinger T, van Tellingen O.** An experimenter's guide to glioblastoma invasion pathways. *Trends Mol Med* 24: 763-780, 2018
40. **Friedmann-Morvinski D.** Glioblastoma heterogeneity and cancer cell plasticity. *Crit Rev Oncog* 19: 327-336, 2014
41. **Rajaratnam V, Islam MM, Yang M, Slaby R, Ramirez HM, Mirza SP.** Glioblastoma: pathogenesis and current status of chemotherapy and other novel treatments. *Cancers (Basel)* 12, 2020
42. **Han S, Liu Y, Cai SJ, Qian M, Ding J, Larion M, Gilbert MR, Yang C.** IDH mutation in glioma: molecular mechanisms and potential therapeutic targets. *Br J Cancer* 122: 1580-1589, 2020
43. **Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA, Jr., Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SK, Shinjo SM, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW.** An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 321: 1807-1812, 2008
44. **Qazi MA, Vora P, Venugopal C, Sidhu SS, Moffat J, Swanton C, Singh SK.** Intratumoral heterogeneity: pathways to treatment resistance and relapse in human glioblastoma. *Ann Oncol* 28: 1448-1456, 2017
45. **DeCordova S, Shastri A, Tsolaki AG, Yasmin H, Klein L, Singh SK, Kishore U.** Molecular heterogeneity and immunosuppressive microenvironment in glioblastoma. *Front Immunol* 11: 1402, 2020
46. **Castello J, Ragnauth A, Friedman E, Rebholz H.** CK2-an emerging target for neurological and psychiatric disorders. *Pharmaceuticals (Basel)* 10, 2017
47. **Vartanian A, Singh SK, Agnihotri S, Jalali S, Burrell K, Aldape KD, Zadeh G.** GBM's multifaceted landscape: highlighting regional and microenvironmental heterogeneity. *Neuro Oncol* 16: 1167-1175, 2014
48. **Al-Mayhany MT, Grenfell R, Narita M, Piccirillo S, Kenney-Herbert E, Fawcett JW, Collins VP, Ichimura K, Watts C.** NG2 expression in glioblastoma identifies an actively proliferating population with an aggressive molecular signature. *Neuro Oncol* 13: 830-845, 2011
49. **Schmitt BM, Laschke MW, Rossler OG, Huang W, Scheller A, Menger MD, Ampofo E.** Nerve/glia antigen (NG) 2 is a crucial regulator of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 expression. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1865: 57-66, 2018
50. **Ferrara G, Errede M, Girolamo F, Morando S, Ivaldi F, Panini N, Bendotti C, Perris R, Furlan R, Virgintino D, Kerlero de Rosbo N, Uccelli A.** NG2, a common denominator for neuroinflammation, blood-brain barrier alteration, and oligodendrocyte precursor response in EAE, plays a role in dendritic cell activation. *Acta Neuropathol* 132: 23-42, 2016
51. **Fukushi J, Makagiansar IT, Stallcup WB.** NG2 proteoglycan promotes endothelial cell motility and angiogenesis via engagement of galectin-3 and alpha3beta1 integrin. *Mol Biol Cell* 15: 3580-3590, 2004

- 
52. **Rivera Z, Ferrone S, Wang X, Jube S, Yang H, Pass HI, Kanodia S, Gaudino G, Carbone M.** CSPG4 as a target of antibody-based immunotherapy for malignant mesothelioma. *Clin Cancer Res* 18: 5352-5363, 2012
  53. **Bagley RG, Rouleau C, Morgenbesser SD, Weber W, Cook BP, Shankara S, Madden SL, Teicher BA.** Pericytes from human non-small cell lung carcinomas: an attractive target for anti-angiogenic therapy. *Microvasc Res* 71: 163-174, 2006
  54. **Huang FJ, You WK, Bonaldo P, Seyfried TN, Pasquale EB, Stallcup WB.** Pericyte deficiencies lead to aberrant tumor vascularization in the brain of the NG2 null mouse. *Dev Biol* 344: 1035-1046, 2010
  55. **Ampofo E, Schmitt BM, Menger MD, Laschke MW.** The regulatory mechanisms of NG2/CSPG4 expression. *Cell Mol Biol Lett* 22: 4, 2017
  56. **Bin L, Kim BE, Hall CF, Leach SM, Leung DY.** Inhibition of transcription factor specificity protein 1 alters the gene expression profile of keratinocytes leading to upregulation of kallikrein-related peptidases and thymic stromal lymphopoietin. *J Invest Dermatol* 131: 2213-2222, 2011
  57. **O'Connor L, Gilmour J, Bonifer C.** The role of the ubiquitously expressed transcription factor Sp1 in tissue-specific transcriptional regulation and in disease. *Yale J Biol Med* 89: 513-525, 2016
  58. **Beishline K, Azizkhan-Clifford J.** Sp1 and the 'hallmarks of cancer'. *FEBS J* 282: 224-258, 2015
  59. **Guan H, Cai J, Zhang N, Wu J, Yuan J, Li J, Li M.** Sp1 is upregulated in human glioma, promotes MMP-2-mediated cell invasion and predicts poor clinical outcome. *Int J Cancer* 130: 593-601, 2012
  60. **Harris SM, Harvey EJ, Hughes TR, Ramji DP.** The interferon-gamma-mediated inhibition of lipoprotein lipase gene transcription in macrophages involves casein kinase 2- and phosphoinositide-3-kinase-mediated regulation of transcription factors Sp1 and Sp3. *Cell Signal* 20: 2296-2301, 2008
  61. **Leggett RW, Armstrong SA, Barry D, Mueller CR.** Sp1 is phosphorylated and its DNA binding activity down-regulated upon terminal differentiation of the liver. *J Biol Chem* 270: 25879-25884, 1995
  62. **Zhang S, Kim KH.** Protein kinase CK2 down-regulates glucose-activated expression of the acetyl-CoA carboxylase gene. *Arch Biochem Biophys* 338: 227-232, 1997
  63. **Li L, He S, Sun JM, Davie JR.** Gene regulation by Sp1 and Sp3. *Biochem Cell Biol* 82: 460-471, 2004
  64. **Chu S, Ferro TJ.** Sp1: regulation of gene expression by phosphorylation. *Gene* 348: 1-11, 2005
  65. **Guerra B, Issinger OG.** Protein kinase CK2 in human diseases. *Curr Med Chem* 15: 1870-1886, 2008
  66. **Salvi M, Sarno S, Cesaro L, Nakamura H, Pinna LA.** Extraordinary pleiotropy of protein kinase CK2 revealed by weblogo phosphoproteome analysis. *Biochim Biophys Acta* 1793: 847-859, 2009
  67. **Litchfield DW.** Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem J* 369: 1-15, 2003
  68. **Schuster N, Prowald A, Schneider E, Scheidtmann KH, Montenarh M.** Regulation of p53 mediated transactivation by the beta-subunit of protein kinase CK2. *FEBS Lett* 447: 160-166, 1999

- 
69. **Prowald A, Schuster N, Montenarh M.** Regulation of the DNA binding of p53 by its interaction with protein kinase CK2. *FEBS Lett* 408: 99-104, 1997
70. **Meggio F, Boldyreff B, Marin O, Pinna LA, Issinger OG.** Role of the beta subunit of casein kinase-2 on the stability and specificity of the recombinant reconstituted holoenzyme. *Eur J Biochem* 204: 293-297, 1992
71. **Xu X, Toselli PA, Russell LD, Seldin DC.** Globozoospermia in mice lacking the casein kinase II alpha' catalytic subunit. *Nat Genet* 23: 118-121, 1999
72. **Bian Y, Ye M, Wang C, Cheng K, Song C, Dong M, Pan Y, Qin H, Zou H.** Global screening of CK2 kinase substrates by an integrated phosphoproteomics workflow. *Sci Rep* 3: 3460, 2013
73. **Meggio F, Pinna LA.** One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB J* 17: 349-368, 2003
74. **Nunez de Villavicencio-Diaz T, Rabalski AJ, Litchfield DW.** Protein kinase CK2: intricate relationships within regulatory cellular networks. *Pharmaceuticals (Basel)* 10, 2017
75. **Quotti Tubi L, Canovas Nunes S, Brancalion A, Doriguzzi Breatta E, Manni S, Mandato E, Zaffino F, Macaccaro P, Carrino M, Gianesin K, Trentin L, Binotto G, Zambello R, Semenzato G, Gurrieri C, Piazza F.** Protein kinase CK2 regulates AKT, NF-kappaB and STAT3 activation, stem cell viability and proliferation in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 31: 292-300, 2017
76. **Marmioli S, Fabbro D, Miyata Y, Pierobon M, Ruzzene M.** Phosphorylation, signaling, and cancer: Targets and Targeting. *Biomed Res Int* 2015: 601543, 2015
77. **Shanware NP, Zhan L, Hutchinson JA, Kim SH, Williams LM, Tibbetts RS.** Conserved and distinct modes of CREB/ATF transcription factor regulation by PP2A/B56gamma and genotoxic stress. *PLoS One* 5: e12173, 2010
78. **Nienberg C, Retterath A, Becher KS, Saenger T, Mootz HD, Jose J.** Site-specific labeling of Protein kinase CK2: combining surface display and click chemistry for drug discovery applications. *Pharmaceuticals (Basel)* 9, 2016
79. **Siddiqui-Jain A, Drygin D, Streiner N, Chua P, Pierre F, O'Brien SE, Bliesath J, Omori M, Huser N, Ho C, Proffitt C, Schwaebe MK, Ryckman DM, Rice WG, Anderes K.** CX-4945, an orally bioavailable selective inhibitor of protein kinase CK2, inhibits prosurvival and angiogenic signaling and exhibits antitumor efficacy. *Cancer Res* 70: 10288-10298, 2010
80. **Ruzzene M, Pinna LA.** Addiction to protein kinase CK2: a common denominator of diverse cancer cells? *Biochim Biophys Acta* 1804: 499-504, 2010
81. **Dominguez I, Sonenshein GE, Seldin DC.** Protein kinase CK2 in health and disease: CK2 and its role in Wnt and NF-kappaB signaling: linking development and cancer. *Cell Mol Life Sci* 66: 1850-1857, 2009
82. **Ampofo E, Schmitt BM, Laschke MW, Menger MD.** Function of protein kinase CK2 in thrombus formation. *Platelets* 30: 421-427, 2019
83. **Al Quobaili F, Montenarh M.** CK2 and the regulation of the carbohydrate metabolism. *Metabolism* 61: 1512-1517, 2012
84. **Feng D, Welker S, Korbel C, Rudzitis-Auth J, Menger MD, Montenarh M, Laschke MW.** Protein kinase CK2 is a regulator of angiogenesis in endometriotic lesions. *Angiogenesis* 15: 243-252, 2012
85. **Montenarh M.** Protein kinase CK2 and angiogenesis. *Adv Clin Exp Med* 23: 153-158, 2014

86. **Ampofo E, Nalbach L, Menger MD, Montenarh M, Gotz C.** Protein kinase CK2-a putative target for the therapy of Diabetes Mellitus? *Int J Mol Sci* 20, 2019
87. **Ferrer-Font L, Villamanan L, Arias-Ramos N, Vilardell J, Plana M, Ruzzene M, Pinna LA, Itarte E, Arus C, Candiota AP.** Targeting protein kinase CK2: evaluating CX-4945 potential for GL261 glioblastoma therapy in immunocompetent mice. *Pharmaceuticals (Basel)* 10, 2017
88. **Chon HJ, Bae KJ, Lee Y, Kim J.** The casein kinase 2 inhibitor, CX-4945, as an anti-cancer drug in treatment of human hematological malignancies. *Front Pharmacol* 6: 70, 2015
89. **Zheng Y, McFarland BC, Drygin D, Yu H, Bellis SL, Kim H, Bredel M, Benveniste EN.** Targeting protein kinase CK2 suppresses prosurvival signaling pathways and growth of glioblastoma. *Clin Cancer Res* 19: 6484-6494, 2013
90. **Borgo C, Ruzzene M.** Protein kinase CK2 inhibition as a pharmacological strategy. *Adv Protein Chem Struct Biol* 124: 23-46, 2021
91. **Duncan JS, Litchfield DW.** Too much of a good thing: the role of protein kinase CK2 in tumorigenesis and prospects for therapeutic inhibition of CK2. *Biochim Biophys Acta* 1784: 33-47, 2008
92. **Kim J, Kim SH.** Druggability of the CK2 inhibitor CX-4945 as an anticancer drug and beyond. *Arch Pharm Res* 35: 1293-1296, 2012
93. **Benavent Acero F, Capobianco CS, Garona J, Cirigliano SM, Perera Y, Urtreger AJ, Perea SE, Alonso DF, Farina HG.** CIGB-300, an anti-CK2 peptide, inhibits angiogenesis, tumor cell invasion and metastasis in lung cancer models. *Lung Cancer* 107: 14-21, 2017
94. **Kulbe H, Iorio F, Chakravarty P, Milagre CS, Moore R, Thompson RG, Everitt G, Canosa M, Montoya A, Drygin D, Braicu I, Sehoul J, Saez-Rodriguez J, Cutillas PR, Balkwill FR.** Integrated transcriptomic and proteomic analysis identifies protein kinase CK2 as a key signaling node in an inflammatory cytokine network in ovarian cancer cells. *Oncotarget* 7: 15648-15661, 2016
95. **Ljubimov AV, Caballero S, Aoki AM, Pinna LA, Grant MB, Castellon R.** Involvement of protein kinase CK2 in angiogenesis and retinal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45: 4583-4591, 2004
96. **Ruzzene M, Penzo D, Pinna LA.** Protein kinase CK2 inhibitor 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole (TBB) induces apoptosis and caspase-dependent degradation of haematopoietic lineage cell-specific protein 1 (HS1) in Jurkat cells. *Biochem J* 364: 41-47, 2002
97. **Sarno S, Reddy H, Meggio F, Ruzzene M, Davies SP, Donella-Deana A, Shugar D, Pinna LA.** Selectivity of 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole, an ATP site-directed inhibitor of protein kinase CK2 ('casein kinase-2'). *FEBS Lett* 496: 44-48, 2001
98. **Pierre F, Chua PC, O'Brien SE, Siddiqui-Jain A, Bourbon P, Haddach M, Michaux J, Nagasawa J, Schwaebe MK, Stefan E, Vialettes A, Whitten JP, Chen TK, Darjania L, Stansfield R, Anderes K, Bliesath J, Drygin D, Ho C, Omori M, Proffitt C, Streiner N, Trent K, Rice WG, Ryckman DM.** Discovery and SAR of 5-(3-chlorophenylamino)benzo[c][2,6]naphthyridine-8-carboxylic acid (CX-4945), the first clinical stage inhibitor of protein kinase CK2 for the treatment of cancer. *J Med Chem* 54: 635-654, 2011
99. **Perea SE, Baladron I, Valenzuela C, Perera Y.** CIGB-300: A peptide-based drug that impairs the Protein Kinase CK2-mediated phosphorylation. *Semin Oncol* 45: 58-67, 2018
100. **Conlon I, Raff M.** Size control in animal development. *Cell* 96: 235-244, 1999

101. **Luque A, Gomez M, Puzon W, Takada Y, Sanchez-Madrid F, Cabanas C.** Activated conformations of very late activation integrins detected by a group of antibodies (HUTS) specific for a novel regulatory region (355-425) of the common beta 1 chain. *The Journal of biological chemistry* 271: 11067-11075, 1996
102. **Gallagher SR, Cole S.** DNA quantitation with a benchtop fluorometer. *Am Biotechnol Lab* 10: 42, 1992
103. **Schmittgen TD, Livak KJ.** Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3: 1101-1108, 2008
104. **Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72: 248-254, 1976
105. **Faust M, Schuster N, Montenarh M.** Specific binding of protein kinase CK2 catalytic subunits to tubulin. *FEBS Lett* 462: 51-56, 1999
106. **Huang W, Zhao N, Bai X, Karram K, Trotter J, Goebbels S, Scheller A, Kirchhoff F.** Novel NG2-CreERT2 knock-in mice demonstrate heterogeneous differentiation potential of NG2 glia during development. *Glia* 62: 896-913, 2014
107. **Di Maira G, Salvi M, Arrigoni G, Marin O, Sarno S, Brustolon F, Pinna LA, Ruzzene M.** Protein kinase CK2 phosphorylates and upregulates Akt/PKB. *Cell Death Differ* 12: 668-677, 2005
108. **Schmitt BM, Boewe AS, Becker V, Nalbach L, Gu Y, Gotz C, Menger MD, Laschke MW, Ampofo E.** Protein kinase CK2 regulates nerve/glial antigen (NG)2-mediated angiogenic activity of human pericytes. *Cells* 9, 2020
109. **Zhao R, Feng D, Zhuang G, Liu Y, Chi S, Zhang J, Zhou X, Zhang W, Wang H.** Protein kinase CK2 participates in estrogen-mediated endothelial progenitor cell homing to endometriotic lesions through stromal cells in a stromal cell-derived factor-1- CXCR4-dependent manner. *Fertil Steril* 113: 1067-1079 e1065, 2020
110. **Baker M, Robinson SD, Lechertier T, Barber PR, Tavora B, D'Amico G, Jones DT, Vojnovic B, Hodivala-Dilke K.** Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis. *Nat Protoc* 7: 89-104, 2011
111. **Newman AC, Nakatsu MN, Chou W, Gershon PD, Hughes CC.** The requirement for fibroblasts in angiogenesis: fibroblast-derived matrix proteins are essential for endothelial cell lumen formation. *Mol Biol Cell* 22: 3791-3800, 2011
112. **Chang HY, Sneddon JB, Alizadeh AA, Sood R, West RB, Montgomery K, Chi JT, van de Rijn M, Botstein D, Brown PO.** Gene expression signature of fibroblast serum response predicts human cancer progression: similarities between tumors and wounds. *PLoS Biol* 2: E7, 2004
113. **Karen J, Rodriguez A, Friman T, Dencker L, Sundberg C, Scholz B.** Effects of the histone deacetylase inhibitor valproic acid on human pericytes in vitro. *PLoS One* 6: e24954, 2011
114. **Tsioumpekou M, Cunha SI, Ma H, Ahgren A, Cedervall J, Olsson AK, Heldin CH, Lennartsson J.** Specific targeting of PDGFRbeta in the stroma inhibits growth and angiogenesis in tumors with high PDGF-BB expression. *Theranostics* 10: 1122-1135, 2020
115. **Chekenya M, Krakstad C, Svendsen A, Netland IA, Staalesen V, Tysnes BB, Selheim F, Wang J, Sakariassen PO, Sandal T, Lonning PE, Flatmark T, Enger PO, Bjerkvig R, Sioud M, Stallcup WB.** The progenitor cell marker NG2/MPG promotes chemoresistance by activation of integrin-dependent PI3K/Akt signaling. *Oncogene* 27: 5182-5194, 2008

- 
116. **Salizzato V, Zanin S, Borgo C, Lidron E, Salvi M, Rizzuto R, Pallafacchina G, Donella-Deana A.** Protein kinase CK2 subunits exert specific and coordinated functions in skeletal muscle differentiation and fusogenic activity. *FASEB J* 33: 10648-10667, 2019
117. **Yang J, Price MA, Neudauer CL, Wilson C, Ferrone S, Xia H, Iida J, Simpson MA, McCarthy JB.** Melanoma chondroitin sulfate proteoglycan enhances FAK and ERK activation by distinct mechanisms. *J Cell Biol* 165: 881-891, 2004
118. **Chang CC, Campoli M, Luo W, Zhao W, Zaenker KS, Ferrone S.** Immunotherapy of melanoma targeting human high molecular weight melanoma-associated antigen: potential role of nonimmunological mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 1028: 340-350, 2004
119. **Winska P, Karatsai O, Staniszewska M, Koronkiewicz M, Chojnacki K, Redowicz MJ.** Synergistic interactions of 5-fluorouracil with inhibitors of protein kinase CK2 correlate with p38 MAPK activation and FAK inhibition in the triple-negative breast cancer Cell Line. *Int J Mol Sci* 21, 2020
120. **Kim J, Choi WJ, Moon SH, Jung J, Park JK, Kim SH, Lee JO.** Micropillar arrays as potential drug screens: Inhibition of micropillar-mediated activation of the FAK-Src-paxillin signaling pathway by the CK2 inhibitor CX-4945. *Acta Biomater* 27: 13-20, 2015
121. **Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E, Antipin Y, Reva B, Goldberg AP, Sander C, Schultz N.** The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* 2: 401-404, 2012
122. **Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larsson E, Cerami E, Sander C, Schultz N.** Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* 6: p11, 2013
123. **Schmitt BM, Boewe AS, Gotz C, Philipp SE, Urbschat S, Oertel J, Menger MD, Laschke MW, Ampofo E.** CK2 activity mediates the aggressive molecular signature of glioblastoma multiforme by inducing nerve/glia antigen (NG2) expression. *Cancers (Basel)* 13, 2021
124. **Burg MA, Nishiyama A, Stallcup WB.** A central segment of the NG2 proteoglycan is critical for the ability of glioma cells to bind and migrate toward type VI collagen. *Exp Cell Res* 235: 254-264, 1997
125. **Gotoh H, Wood WM, Patel KD, Factor DC, Boshans LL, Nomura T, Tesar PJ, Ono K, Nishiyama A.** NG2 expression in NG2 glia is regulated by binding of SoxE and bHLH transcription factors to a Cspg4 intronic enhancer. *Glia* 66: 2684-2699, 2018
126. **Rippe C, Moren B, Liu L, Stenkula KG, Mustaniemi J, Wennstrom M, Sward K.** NG2/CSPG4, CD146/MCAM and VAP1/AOC3 are regulated by myocardin-related transcription factors in smooth muscle cells. *Sci Rep* 11: 5955, 2021
127. **Wilms C, Lepka K, Haberlein F, Edwards S, Felsberg J, Pudelko L, Lindenberg TT, Poschmann G, Qin N, Volbracht K, Prozorovski T, Meuth SG, Kahlert UD, Remke M, Aktas O, Reifenberger G, Brautigam L, Odermatt B, Berndt C.** Glutaredoxin 2 promotes SP-1-dependent CSPG4 transcription and migration of wound healing NG2 glia and glioma cells: Enzymatic Taoism. *Redox Biol* 49: 102221, 2022
128. **Sellers DL, Maris DO, Horner PJ.** Postinjury niches induce temporal shifts in progenitor fates to direct lesion repair after spinal cord injury. *J Neurosci* 29: 6722-6733, 2009
129. **Armstrong SA, Barry DA, Leggett RW, Mueller CR.** Casein kinase II-mediated phosphorylation of the C terminus of Sp1 decreases its DNA binding activity. *J Biol Chem* 272: 13489-13495, 1997
130. **Levine M, Tjian R.** Transcription regulation and animal diversity. *Nature* 424: 147-151, 2003

- 
131. **Herrmann M, Bara JJ, Sprecher CM, Menzel U, Jalowiec JM, Osinga R, Scherberich A, Alini M, Verrier S.** Pericyte plasticity - comparative investigation of the angiogenic and multilineage potential of pericytes from different human tissues. *Eur Cell Mater* 31: 236-249, 2016
132. **Bagley RG, Weber W, Rouleau C, Teicher BA.** Pericytes and endothelial precursor cells: cellular interactions and contributions to malignancy. *Cancer Res* 65: 9741-9750, 2005
133. **Zhang ZS, Zhou HN, He SS, Xue MY, Li T, Liu LM.** Research advances in pericyte function and their roles in diseases. *Chin J Traumatol* 23: 89-95, 2020
134. **Chen L, Cui Y, Li B, Weng J, Wang W, Zhang S, Huang X, Guo X, Huang Q.** Advanced glycation end products induce immature angiogenesis in in vivo and ex vivo mouse models. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 318: H519-H533, 2020
135. **Carmeliet P.** Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6: 389-395, 2000
136. **Chatterjee A, Chatterjee U, Ghosh MK.** Activation of protein kinase CK2 attenuates FOXO3a functioning in a PML-dependent manner: implications in human prostate cancer. *Cell death & disease* 4: e543, 2013
137. **Teichert M, Milde L, Holm A, Stanicek L, Gengenbacher N, Savant S, Ruckdeschel T, Hasanov Z, Srivastava K, Hu J, Hertel S, Bartol A, Schlereth K, Augustin HG.** Pericyte-expressed Tie2 controls angiogenesis and vessel maturation. *Nature communications* 8: 16106, 2017
138. **Wietecha MS, Cerny WL, DiPietro LA.** Mechanisms of vessel regression: toward an understanding of the resolution of angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 367: 3-32, 2013
139. **Tsidulko AY, Kazanskaya GM, Kostromskaya DV, Aidagulova SV, Kiselev RS, Volkov AM, Kobozev VV, Gaitan AS, Krivoshapkin AL, Grigorieva EV.** Prognostic relevance of NG2/CSPG4, CD44 and Ki-67 in patients with glioblastoma. *Tumour Biol* 39: 1010428317724282, 2017
140. **Di Maira G, Gentilini A, Pastore M, Caligiuri A, Piombanti B, Raggi C, Rovida E, Lewinska M, Andersen JB, Borgo C, Salvi M, Ottaviani D, Ruzzene M, Marra F.** The protein kinase CK2 contributes to the malignant phenotype of cholangiocarcinoma cells. *Oncogenesis* 8: 61, 2019
141. **Schaff LR, Yan D, Thyparambil S, Tian Y, Cecchi F, Rosenblum M, Reiner AS, Panageas KS, Hembrough T, Lin AL.** Characterization of MGMT and EGFR protein expression in glioblastoma and association with survival. *J Neurooncol* 146: 163-170, 2020
142. **Ilieva KM, Cheung A, Mele S, Chiaruttini G, Crescioli S, Griffin M, Nakamura M, Spicer JF, Tsoka S, Lacy KE, Tutt ANJ, Karagiannis SN.** Chondroitin sulfate proteoglycan 4 and its potential as an antibody immunotherapy target across different tumor types. *Front Immunol* 8: 1911, 2017
143. **Bredel M, Scholtens DM, Harsh GR, Bredel C, Chandler JP, Renfrow JJ, Yadav AK, Vogel H, Scheck AC, Tibshirani R, Sikic BI.** A network model of a cooperative genetic landscape in brain tumors. *JAMA* 302: 261-275, 2009
144. **Zheng Y, Qin H, Frank SJ, Deng L, Litchfield DW, Tefferi A, Pardanani A, Lin FT, Li J, Sha B, Benveniste EN.** A CK2-dependent mechanism for activation of the JAK-STAT signaling pathway. *Blood* 118: 156-166, 2011
145. **Rowse AL, Gibson SA, Meares GP, Rajbhandari R, Nozell SE, Dees KJ, Hjelmeland AB, McFarland BC, Benveniste EN.** Protein kinase CK2 is important for the function of glioblastoma brain tumor initiating cells. *J Neurooncol* 132: 219-229, 2017

- 
146. **Kambe A, Yoshioka H, Kamitani H, Watanabe T, Baek SJ, Eling TE.** The cyclooxygenase inhibitor sulindac sulfide inhibits EP4 expression and suppresses the growth of glioblastoma cells. *Cancer Prev Res (Phila)* 2: 1088-1099, 2009
147. **Park MH, Ahn BH, Hong YK, Min do S.** Overexpression of phospholipase D enhances matrix metalloproteinase-2 expression and glioma cell invasion via protein kinase C and protein kinase A/NF-kappaB/Sp1-mediated signaling pathways. *Carcinogenesis* 30: 356-365, 2009
148. **Zhou J, Tien AC, Alberta JA, Ficarro SB, Griveau A, Sun Y, Deshpande JS, Card JD, Morgan-Smith M, Michowski W, Hashizume R, James CD, Ligon KL, Snider WD, Sicinski P, Marto JA, Rowitch DH, Stiles CD.** A sequentially priming phosphorylation cascade activates the gliomagenic transcription factor Olig2. *Cell Rep* 18: 3167-3177, 2017
149. **Kim J, Hwan Kim S.** CK2 inhibitor CX-4945 blocks TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition in A549 human lung adenocarcinoma cells. *PLoS One* 8: e74342, 2013
150. **Stallcup WB, Huang FJ.** A role for the NG2 proteoglycan in glioma progression. *Cell Adh Migr* 2: 192-201, 2008
151. **Goretzki L, Burg MA, Grako KA, Stallcup WB.** High-affinity binding of basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor-AA to the core protein of the NG2 proteoglycan. *J Biol Chem* 274: 16831-16837, 1999
152. **Lee BY, Timpson P, Horvath LG, Daly RJ.** FAK signaling in human cancer as a target for therapeutics. *Pharmacol Ther* 146: 132-149, 2015
153. **Franke TF, Hornik CP, Segev L, Shostak GA, Sugimoto C.** PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene* 22: 8983-8998, 2003
154. **Fayard E, Xue G, Parcellier A, Bozulich L, Hemmings BA.** Protein kinase B (PKB/Akt), a key mediator of the PI3K signaling pathway. *Curr Top Microbiol Immunol* 346: 31-56, 2010
155. **Ribeiro ST, Tesio M, Ribot JC, Macintyre E, Barata JT, Silva-Santos B.** Casein kinase 2 controls the survival of normal thymic and leukemic gammadelta T cells via promotion of AKT signaling. *Leukemia* 31: 1603-1610, 2017
156. **Cheong JW, Min YH, Eom JI, Kim SJ, Jeung HK, Kim JS.** Inhibition of CK2{alpha} and PI3K/Akt synergistically induces apoptosis of CD34+CD38- leukaemia cells while sparing haematopoietic stem cells. *Anticancer Res* 30: 4625-4634, 2010
157. **Olsen BB, Bjorling-Poulsen M, Guerra B.** Emodin negatively affects the phosphoinositide 3-kinase/AKT signalling pathway: a study on its mechanism of action. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 227-237, 2007
158. **Seidel S, Garvalov BK, Acker T.** Isolation and culture of primary glioblastoma cells from human tumor specimens. *Methods Mol Biol* 1235: 263-275, 2015
159. **Uranowska K, Samadaei M, Kalic T, Pinter M, Breiteneder H, Hafner C.** A chondroitin sulfate proteoglycan 4specific monoclonal antibody inhibits melanoma cell invasion in a spheroid model. *Int J Oncol* 59, 2021
160. **Yu X, Dobrikov M, Keir ST, Gromeier M, Pastan IH, Reisfeld R, Bigner DD, Chandramohan V.** Synergistic antitumor effects of 9.2.27-PE38KDEL and ABT-737 in primary and metastatic brain tumors. *PLoS One* 14: e0210608, 2019
161. **Mehta AM, Sonabend AM, Bruce JN.** Convection-Enhanced Delivery. *Neurotherapeutics* 14: 358-371, 2017

- 
162. **Hjortland GO, Garman-Vik SS, Juell S, Olsen OE, Hirschberg H, Fodstad O, Engebraaten O.** Immunotoxin treatment targeted to the high-molecular-weight melanoma-associated antigen prolonging the survival of immunodeficient rats with invasive intracranial human glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* 100: 320-327, 2004
163. **Cirigliano SM, Diaz Bessone MI, Berardi DE, Flumian C, Bal de Kier Joffe ED, Perea SE, Farina HG, Todaro LB, Urtreger AJ.** The synthetic peptide CIGB-300 modulates CK2-dependent signaling pathways affecting the survival and chemoresistance of non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Cell Int* 17: 42, 2017
164. **Perea SE, Reyes O, Puchades Y, Mendoza O, Vispo NS, Torrens I, Santos A, Silva R, Acevedo B, Lopez E, Falcon V, Alonso DF.** Antitumor effect of a novel proapoptotic peptide that impairs the phosphorylation by the protein kinase 2 (casein kinase 2). *Cancer Res* 64: 7127-7129, 2004
165. **Perera Y, Farina HG, Gil J, Rodriguez A, Benavent F, Castellanos L, Gomez RE, Acevedo BE, Alonso DF, Perea SE.** Anticancer peptide CIGB-300 binds to nucleophosmin/B23, impairs its CK2-mediated phosphorylation, and leads to apoptosis through its nucleolar disassembly activity. *Mol Cancer Ther* 8: 1189-1196, 2009
166. **Liu X, Chen J, Li W, Hang C, Dai Y.** Inhibition of casein kinase II by CX-4945, but not Yes-associated protein (YAP) by Verteporfin, enhances the antitumor efficacy of Temozolomide in Glioblastoma. *Transl Oncol* 13: 70-78, 2020
167. **Nitta RT, Gholamin S, Feroze AH, Agarwal M, Cheshier SH, Mitra SS, Li G.** Casein kinase 2alpha regulates glioblastoma brain tumor-initiating cell growth through the beta-catenin pathway. *Oncogene* 34: 3688-3699, 2015
168. **Zonta F, Borgo C, Quezada Meza CP, Masgras I, Rasola A, Salvi M, Pinna LA, Ruzzene M.** Contribution of the CK2 catalytic isoforms alpha and alpha' to the glycolytic phenotype of tumor cells. *Cells* 10, 2021
169. **Silva-Pavez E, Tapia JC.** Protein kinase CK2 in cancer energetics. *Front Oncol* 10: 893, 2020
170. **Borgo C, Ruzzene M.** Role of protein kinase CK2 in antitumor drug resistance. *J Exp Clin Cancer Res* 38: 287, 2019

## 8 Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. M.D. Menger und Herrn Prof. Dr. M.W. Laschke für die Möglichkeit zur Promotion am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie und für die Bereitstellung aller nötigen Materialien und Geräte sowie das berufliche und persönliche Mentoring bedanken.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Laschke besonderen Dank aussprechen für konstruktive Diskussionen, das außerordentliche Coaching im wissenschaftlichen Schreiben sowie der Darstellung und Präsentation von generierten Daten und für die Korrektur dieser Arbeit als Gutachter. Vielen Dank für die stets „offene Tür“ und die geduldige Unterstützung.

Ein ganz herzliches und großes Dankeschön gilt Herrn PD Dr. Emmanuel Ampofo, der meinen wissenschaftlichen Werdegang seit meiner Masterarbeit bis hin zu dieser Dissertation begleitet hat. Vielen Dank für Deine nie endende wissenschaftliche Begeisterung und Neugierde, die Motivation, konstruktive Kritik und zahlreichen Diskussionen. Ich möchte aber auch Danke sagen für Zuspruch, Geduld, Verständnis und ein stets „offenes Ohr“ sowohl für berufliche als auch persönliche Themen.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Mathias Montenarh und Frau Prof. Dr. Claudia Götz für die Möglichkeit, einen Arbeitsplatz sowie Geräte und Materialien in der Medizinischen Biochemie und Molekularbiologie zu nutzen. Danke für die fachliche Unterstützung, Diskussion der Daten und das berufliche als auch private Mentoring.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Joachim Oertel und Frau Prof. Dr. Steffi Urbschat aus der Neurochirurgie des Universitätsklinikums in Homburg/Saar für die Bereitstellung der primären humanen GBM-Zellen aus Patientenproben.

Herrn Prof. Dr. Kirchhoff und Frau Dr. Scheller aus der Physiologie der Universität des Saarlandes danke ich für die Bereitstellung von NG2-CreERT2xRosa26-tdTomato-Mäusen.

Herrn PD Dr. Philipp aus der Pharmakologie und Toxikologie der Universität des Saarlandes danke ich für fachliche und technische Unterstützung bei den FACS-Analysen von transfizierten Zellen.

Frau Prof Dr. Carola Meier möchte ich für die Korrektur dieser Arbeit als Gutachterin danken.

Ich möchte Frau Caroline Bickelmann für ihre unbezahlbare Unterstützung bei der Durchflusszytometrie, dem Western Blot, den Transmigrations-Experimenten und für das Anfertigen und Färben der histologischen Schnitte danken. Frau Ruth Nickels gilt mein Dank für ihre langjährige und technische Unterstützung bei der Durchflusszytometrie und den BrdU-Tests. Ich möchte auch Frau Christina Marx für ihre Unterstützung in der Zellkultur sowie Frau Julia Parakenings für die Einarbeitung in das *semi-dry* Western Blot-Verfahren danken. Herrn Prof. Dr. Laschke und Frau Dr. Yuan Gu möchte ich für die Unterstützung bei den *aortic ring assays* und *matrigel plug assays* danken. Besonderer Dank gilt Frau Dr. Jeanette Rudzitis-Auth, Frau Dr. Lisa Nalbach, Frau Anne-Sophie Böwe, Frau Caroline Bickelmann, Frau Helena Simon, Frau Selina Wrublewsky, Frau Mandy Pack und Herrn Dr. Tim Gulde für die schöne berufliche und private Zeit, den Austausch, die technische und administrative Unterstützung; kurzum die gute Arbeitsatmosphäre. Mein Dank gilt allen Mitarbeitern des Instituts, die mich auf meinem Werdegang begleitet haben.

Ich möchte mich an dieser Stelle auch ganz herzlich bei der Hans und Ruth Giessen Stiftung bedanken, deren Auszeichnung mir einen einjährigen Forschungsaufenthalt an der Universität Yale in den USA sowie das Besuchen von internationalen Kongressen ermöglicht hat. Dank gilt auch dem juristischen Träger der Stiftung, dem Gemeinnützigen Verein der Freunde Rotary St. Ingbert e.V. und insbesondere Notar a. D. Wilhelm Burgemeister, für die organisatorische Unterstützung.

Meine tiefe Dankbarkeit, die sich kaum in Worte fassen lässt, gilt ganz besonders meiner Familie und meinen Freunden. Meine wissenschaftliche und persönliche Entwicklung hätte ohne Eure Unterstützung und Motivation so nicht stattfinden können. Ich kann mich unendlich glücklich schätzen, so verständnisvolle, geduldige und liebevolle Menschen um mich zu wissen.

---

## 9 Publikationen

### 9.1 Originalarbeiten dieser Dissertation

**Schmitt BM**, Boewe AS, Götz C, Philipp SE, Urbschat S, Oertel J, Menger MD, Laschke MW, Ampofo E. CK2 activity mediates the aggressive molecular signature of glioblastoma multiforme by inducing nerve/glia antigen (NG)2 expression. *Cancers (Basel)* 13, 2021

**Schmitt BM**, Boewe AS, Becker V, Nalbach L, Gu Y, Götz C, Menger MD, Laschke MW, Ampofo E. Protein kinase CK2 regulates nerve/glia antigen (NG)2-mediated angiogenic activity of human pericytes. *Cells* 9, 2020

### 9.2 Weitere Originalarbeiten

Nalbach L, Roma LP, **Schmitt BM**, Becker V, Körbel C, Wrublewsky S, Pack M, Später T, Metzger W, Menger MM, Frueh FS, Götz C, Lin H, Manning Fox JE, MacDonald PE, Menger MD, Laschke MW, Ampofo E. Improvement of islet transplantation by the fusion of islet cells with functional blood vessels. *EMBO Mol Med* 13, 2021

**Schmitt BM**, Ampofo E, Montenarh M, Stumpf H, Schmitz D, Götz C. The stability of CREB3/Luman is regulated by protein kinase CK2 phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 523, 639-644, 2020

Nalbach L, **Schmitt BM**, Becker V, Scheller A, Laschke MW, Menger MD, Ampofo E. Nerve/glia antigen 2 is crucially involved in the revascularization of freely transplanted pancreatic islets. *Cell Tissue Research* 378, 195-205, 2019

**Schmitt BM**, Laschke MW, Rossler OG, Huang W, Scheller A, Menger MD, Ampofo E. Nerve/glia antigen (NG) 2 is a crucial regulator of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 expression. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1865: 57-66, 2018

Ampofo E, Lachnitt N, Rudzitis-Auth J, **Schmitt BM**, Menger MD, Laschke MW. Indole-3-carbinol is a potent inhibitor of ischemia-reperfusion-induced inflammation. *J Surg Res* 215, 34-46, 2017

### 9.3 Übersichtsarbeiten

Ampofo E, **Schmitt BM**, Menger MD, Laschke MW. Targeting the microcirculation by indole-3-carbinol: Effects on angiogenesis, thrombosis and inflammation. *Mini Rev Med Chem* 2018

Ampofo E, **Schmitt BM**, Laschke MW, Menger MD. Function of protein kinase CK2 in thrombus formation. *Platelets* 30, 421-427, 2018

Ampofo E, **Schmitt BM**, Menger MD, Laschke MW. The regulatory mechanisms of NG2/CSPG4 expression. *Cell Mol Biol Lett* 22: 4, 2017

### 9.4 Zitierfähige Abstracts

**Schmitt BM**, Laschke MW, Menger MD, Ampofo E. Protein kinase CK2 regulates the expression of nerve/glial antigen (NG)2 in glioblastoma. *Eur Surg Res* 60, 1-33, 2019

Vortrag im Rahmen des 136. Kongresses der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie 2019 in München

**Schmitt BM**, Becker V, Nalbach L, Gu Y, Götz C, Menger MD, Laschke M.W, Ampofo E. Protein kinase CK2 regulates nerve/glial antigen (NG)2-mediated angiogenic activity of human pericytes, 2019

Vortrag im Rahmen der 23. Chirurgischen Forschungstage 2019 in Aachen

**Schmitt BM**, Laschke MW, Menger MD, Ampofo E. Inhibition of protein kinase CK2: A novel strategy to regulate nerve/glial antigen (NG)2 expression in glioblastoma, 2018

Vortrag im Rahmen der 22. Chirurgischen Forschungstage 2018 in Erlangen

Ampofo E, Lachnitt N, Rudzitis-Auth J, **Schmitt BM**, Menger MD, Laschke MW. Indole-3-carbinol is a potent inhibitor of ischemia/reperfusion-induced inflammation. *Eur Surg Res* 57, 263-335, 2016

Poster im Rahmen der 20. Chirurgischen Forschungstage 2016 in Magdeburg

**Schmitt BM**, Ampofo E, Laschke MW, Menger MD. Regulation of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 expression by neural/glial antigen (NG) 2 in pericytes. *Eur Surg Res* 57, 263-335, 2016

Vortrag im Rahmen der 20. Chirurgischen Forschungstage 2016 in Magdeburg

## 9.5 Nicht zitierfähige Abstracts

**Schmitt BM**, Laschke MW, Menger MD, Ampofo E. Nerve/glial antigen (NG)2 in glioblastoma:

A new target of protein kinase CK2, 2019

Poster im Rahmen des 6. Zoo Meetings 2019 in Rotterdam

## **10 Lebenslauf**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen ist der Lebenslauf nur in der gedruckten Version der Dissertation enthalten.

---

Tag der Promotion:

02.09.2022

Dekan:

Prof. Dr. M. D. Menger

Berichterstatter:

Prof. Dr. M. W. Laschke

Prof. Dr. C. Meier