

AUS DER KINDER- UND JUGENDKLINIK ROSTOCK, PÄDIATRISCHE ONKOLOGIE

DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

DIREKTORIN: UNIV.-PROF. DR. MED. ASTRID BERTSCHE (K)

DER EINFLUSS VON MITHRAMYCIN A - BASIERTEN  
KOMBINATIONSBEHANDLUNGEN AUF VITALITÄT,  
RADIOSENSITIVITÄT & RESISTENZENTWICKLUNG VON  
GLIOBLASTOMA MULTIFORME –  
EINE *IN VITRO* ANALYSE AN PATIENTEN-ABGELEITETEN  
ZELLKULTURMODELLEN

INAUGURALDISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES

Doktor der Medizin (Dr. med.)

DER

UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

VORGELEGT VON

CHARLOTTE LINKE | GEB. AM 01.02.1997 IN ROSTOCK

AUS ROSTOCK

ROSTOCK, MÄRZ 2022

[https://doi.org/10.18453/rosdok\\_id00004568](https://doi.org/10.18453/rosdok_id00004568)

GUTACHTER:

PROF. DR. MED. CARL FRIEDRICH CLASSEN, UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK, KINDER- UND JUGENDKLINIK

PD DR. RER. NAT. ET MED. HABIL. KIRSTEN PETERS, UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK, ZENTRUM FÜR MEDIZINISCHE FORSCHUNG

UNIV.-PROF. DR. MED. ASS. JUR. ALEXANDER RADBRUCH, UNIVERSITÄTSKLINIKUM BONN, KLINIK FÜR NEURORADIOLOGIE

JAHR DER EINREICHUNG: 2022

JAHR DER VERTEIDIGUNG: 2023

## INHALTSVERZEICHNIS

---

<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>V</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>VI</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>VII</b>
<b>I. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 GLIOBLASTOMA MULTIFORME .....	1
1.1.1 EPIDEMIOLOGIE UND ÄTIOLOGIE .....	1
1.1.2 MAKROSKOPISCHE UND HISTOLOGISCHE DARSTELLUNG .....	1
1.1.3 GENETISCHE UND MOLEKULARE PATHOGENESE .....	2
1.1.4 KLINIK.....	2
1.1.5 THERAPIE .....	3
1.2 THERAPEUTISCHE SUBSTANZEN .....	4
1.2.1 MITHRAMYCIN A .....	4
1.2.2 ABEMACICLIB UND DINACICLIB .....	5
1.2.3 TEMOZOLOMID .....	7
1.2.4 ARGININ DEIMINASE.....	8
<b>II. ZIELSTELLUNG .....</b>	<b>10</b>
<b>III. MATERIALIEN UND METHODEN .....</b>	<b>11</b>
3.1 MATERIAL .....	11
3.2 METHODEN .....	16
3.2.1 HUMANE GLIOBLASTOM-ZELLINIEN .....	16
3.2.2 ZELLKULTUR .....	17
3.2.3 ZELLZAHLBESTIMMUNG .....	17
3.2.4 KRYOKONSERVIERUNG .....	18
3.2.5 THERAPIEN DER GBM-ZELLEN .....	18
3.2.5.1 KONZENTRATIONSREIHEN MIT MITA.....	18

3.2.5.2	KOMBINATIONSTHERAPIEN .....	19
3.2.5.3	SPHÄROIDE.....	20
3.2.5.4	LANGZEITTHERAPIEN .....	20
3.2.5.5	RESISTENZBESTIMMUNG .....	21
3.2.5.6	RADIOTHERAPIE .....	22
3.2.6	Γ-H2AX-IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG .....	23
3.2.7	VIABILITÄTSBESTIMMUNG MITTELS CALCEIN AM ASSAY .....	24
3.2.8	BIOMASSEBESTIMMUNG MITTELS KRISTALLVIOLETTFÄRBUNG .....	24
3.2.9	CELLTITER-GLO 3D – ZELLVIABILITÄTSASSAY .....	25
3.2.10	INVASIONSANALYSEN .....	26
3.2.10.1	INVASIONSASSAY IM 2D MODELL .....	26
3.2.10.2	SPHÄROID INVASIONSASSAY .....	27
3.2.11	DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSEN.....	27
3.2.11.1	APOPTOSE- UND NEKROSE-ASSAY .....	27
3.2.11.2	FÄRBUNG ZUM NACHWEIS DES IMMUNOGENEN ZELLTODES .....	28
3.2.11.3	PHÄNOTYPISIERUNG .....	29
3.2.12	IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG ZUM NACHWEIS VON STAMMZELLMARKERN .....	30
3.2.13	SOFTWARE .....	31
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>32</b>
4.1	EINFLUSS DER MITA MONOTHERAPIE AUF DIE VIABILITÄT DER GBM-ZELLEN .....	32
4.2	STRAHLENSENSIBILISIERENDE WIRKUNG VON MITA AUF GBM-ZELLEN.....	34
4.3	SYNERGISTISCHE EFFEKTE DER KOMBINATIONSTHERAPIEN IM 2D- UND 3D-MODELL ....	36
4.3.1	EFFEKT DER KOMBINATIONSTHERAPIE VON MITA UND CDKIs IM 2D MODELL.....	37
4.3.2	EFFEKT DER KOMBINATIONSTHERAPIE VON MITA UND SPYADI IM 2D-MODELL .....	39
4.3.3	EFFEKT DER KOMBINATIONSTHERAPIEN VON MITA, CDKIs UND ADI IM 3D-MODELL ....	41
4.4	TESTUNG AUF RESISTENZENTWICKLUNG UNTER THERAPIE .....	43
4.4.1	EFFEKT EINER LANGZEITKOMBINATIONSTHERAPIE .....	43
4.4.2	EFFEKT EINER LANGZEITTHERAPIE MIT MITA UND SPYADI .....	49
4.4.3	UNTERSUCHUNG EINER RESISTENZENTWICKLUNG UNTER MITA MONOTHERAPIE.....	51

4.5	INHIBITION DER ZELLMOTILITÄT DURCH MITA UND SPYADI IM 2D- UND 3D-MODELL .....	52
4.6	ZELLTODINDUKTION DURCH KOMBINATIONSTHERAPIEN MIT MITA .....	54
4.6.1	APOPTOSE UND NEKROSEINDUKTION.....	54
4.6.2	INDUKTION VON IMMUNOGENEM ZELLTOD .....	57
4.7	EINFLUSS DER ZYTOSTATISCHEN TESTSUBSTANZEN AUF DEN PHÄNOTYP .....	58
4.8	EFFEKT DER TESTSUBSTANZEN AUF DIE EXPRESSION VON STAMMZELLMARKERN.....	59
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>62</b>
5.1	ANTITUMORALE EFFEKTE VON MITA UND DEN TESTSUBSTANZEN .....	63
5.1.1	KONZENTRATIONSABHÄNGIGE WIRKSAMKEIT EINER MITA-MONOTHERAPIE .....	63
5.1.2	MITA ALS RADIOSENSIBILISIERENDE SUBSTANZ .....	64
5.1.3	SYNERGISTISCHE WIRKUNG DER KOMBINATIONSTHERAPIEN .....	65
5.1.3.1	CDKIs - ABEMACICLIB UND DINACICLIB.....	65
5.1.3.2	TMZ.....	67
5.1.3.3	SPYADI .....	67
5.2	LANGZEITTHERAPIEN UND RESISTENZTESTUNG .....	68
5.2.1	EFFEKTE EINER KOMBINATIONSTHERAPIE IM LANGZEITMODELL .....	68
5.2.1.1	CDKIs - ABEMACICLIB UND DINACICLIB.....	68
5.2.1.2	TMZ.....	70
5.2.1.3	SPYADI .....	71
5.2.2	KEINE RESISTENZENTWICKLUNG UNTER EINER MONOTHERAPIE MIT MITA.....	72
5.3	FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DER ANTITUMORALEN EFFEKTE .....	73
5.3.1	INHIBIERUNG DER ZELLMOTILITÄT .....	73
5.3.2	CHARAKTERISIERUNG DER ZELLTODINDUKTION .....	74
5.3.2.1	APOPTOSE UND NEKROSE .....	74
5.3.2.2	IMMUNOGENER ZELLTOD.....	75
5.3.3	EINFLUSS DER ZYTOSTATISCHEN TESTSUBSTANZEN AUF DEN IMMUNPHÄNOTYP .....	75
5.3.4	KEINE VERÄNDERTE EXPRESSION VON STAMMZELLMARKERN.....	77

---

<b>VI.</b>	<b>SCHLUSSTEIL.....</b>	<b>78</b>
6.1	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK .....	78
6.2	ZUSAMMENFASSUNG .....	79
 <b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>		<b>IX</b>
<b>PUBLIKATIONEN.....</b>		<b>XXI</b>
<b>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG .....</b>		<b>XXII</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>		<b>XXIII</b>
<b>LEBENS LAUF .....</b>		<b>XXIV</b>
<b>THESEN .....</b>		<b>XXV</b>

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

---

<b>ABBILDUNG 1:</b> MITA STRUKTURFORMEL .....	4
<b>ABBILDUNG 2:</b> ABEMACICLIB UND DINACICLIB STRUKTURFORMELN .....	5
<b>ABBILDUNG 3:</b> DARSTELLUNG DES EINFLUSSES DER CDKIS AUF DEN ZELLZYKLUS .....	6
<b>ABBILDUNG 4:</b> TMZ STRUKTURFORMEL .....	7
<b>ABBILDUNG 5:</b> ARGININ-STOFFWECHSEL IM HARNSTOFFZYKLUS.....	9
<b>ABBILDUNG 6:</b> LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN 2D-KULTIVierter GBM-ZELLINIEN .....	16
<b>ABBILDUNG 7:</b> THERAPIESCHEMA TESTUNG RESISTENZENTWICKLUNG UNTER MITA. ....	21
<b>ABBILDUNG 8:</b> THERAPIESCHEMA MITA UND BESTRAHLUNG.....	22
<b>ABBILDUNG 9:</b> REAKTION ZUR ERZEUGUNG DES BIOLUMINESZENZSIGNALS .....	25
<b>ABBILDUNG 10:</b> VERGLEICH 1x 72 H UND 2x 72 H MITA THERAPIE .....	33
<b>ABBILDUNG 11:</b> ANALYSE DES $\gamma$ -H2AX GEHALTES MITTELS IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG.....	34
<b>ABBILDUNG 12:</b> KONZENTRATIONSABHÄNGIGER EINFLUSS VON MITA UND BESTRAHLUNG .....	35
<b>ABBILDUNG 13:</b> EINFLUSS EINER SIMULTANEN KOMBINATIONSTHERAPIE DER VERSCHIEDENEN ZYTOSTATISCHEN TESTSUBSTANZEN MIT MITA IM 2D-MODELL.....	38
<b>ABBILDUNG 14:</b> EINFLUSS EINER SIMULTANEN UND SEQUENTIELLEN KOMBINATIONSTHERAPIE VON MITA MIT SPYADI IM 2D-MODELL .....	40
<b>ABBILDUNG 15:</b> EINFLUSS DER SIMULTANEN KOMBINATIONSTHERAPIE DER VERSCHIEDENEN ZYTOSTATISCHEN TESTSUBSTANZEN MIT MITA IM 3D-MODELL.....	42
<b>ABBILDUNG 16:</b> EINFLUSS EINER SIMULTANEN LANGZEITKOMBINATIONSTHERAPIE .....	44
<b>ABBILDUNG 17:</b> LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN DER VIER GBM-ZELLINIEN NACH 10 ZYKLEN SIMULTANER KOMBINATIONSTHERAPIE .....	46
<b>ABBILDUNG 18:</b> DARSTELLUNG DER BIOMASSE DER VIER GBM-ZELLINIEN MITTELS KV NACH 10 ZYKLEN SIMULTANER KOMBINATIONSTHERAPIE .....	47
<b>ABBILDUNG 19:</b> EINFLUSS EINER SIMULTANEN UND SEQUENTIELLEN LANGZEITKOMBINATIONS- THERAPIE VON MITA MIT SPYADI .....	49
<b>ABBILDUNG 20:</b> DARSTELLUNG DER BIOMASSE DER VIER GBM-ZELLINIEN MITTELS KV NACH SIMULTANER KOMBINATIONSTHERAPIE VON MITA MIT SPYADI .....	50
<b>ABBILDUNG 21:</b> EINFLUSS ANSTIEGENDER MITA KONZENTRATIONEN ZUR DETEKTION EINER MÖGLICHEN RESISTENZENTWICKLUNG.....	51
<b>ABBILDUNG 22:</b> EINFLUSS DER MITA UND SPYADI THERAPIE AUF DIE INVASIVITÄT .....	53
<b>ABBILDUNG 23:</b> LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN DER INVASION DER GBM-ZELLEN IN DIE MATRIGEL-MATRIX IM SPHÄROIDMODELL .....	53
<b>ABBILDUNG 24:</b> ANTEIL DER FRÜH APOPTOTISCHEN, SPÄT APOPTOTISCHEN UND NEKROTISCHEN GBM-ZELLEN NACH THERAPIE .....	55

<b>ABBILDUNG 25:</b> ANTEIL DER CALR-POSITIVEN GBM-ZELLEN NACH THERAPIE .....	57
<b>ABBILDUNG 26:</b> ANTEIL DER MHC I-POSITIVEN GBM-ZELLEN NACH THERAPIE .....	59
<b>ABBILDUNG 27:</b> ANALYSE DER GFAP UND A2B5 EXPRESSION .....	60
<b>ABBILDUNG 28:</b> ANALYSE DER OCT-4 UND NANOG EXPRESSION .....	61

## TABELLENVERZEICHNIS

<b>TABELLE 1:</b> LABORGERÄTE .....	11
<b>TABELLE 2:</b> VERBRAUCHSMATERIAL .....	12
<b>TABELLE 3:</b> CHEMIKALIEN .....	13
<b>TABELLE 4:</b> LÖSUNGEN FÜR <i>IN VITRO</i> METHODEN .....	14
<b>TABELLE 5:</b> VERWENDETE TESTSUBSTANZEN.....	15
<b>TABELLE 6:</b> ANTIKÖRPER .....	15
<b>TABELLE 7:</b> GBM-ZELLINIEN.....	16
<b>TABELLE 8:</b> GBM-ZELLZAHL UND VERWENDETE ZELLKULTURPLATTEN.....	17
<b>TABELLE 9:</b> KONZENTRATIONEN DER TESTSUBSTANZEN .....	19
<b>TABELLE 10:</b> MONOKLONALE ANTIKÖRPER ZUR PHÄNOTYPISIERUNG.....	29
<b>TABELLE 11:</b> ANTIKÖRPER FÜR IMMUNFLUORESCENZ.....	30
<b>TABELLE 12:</b> ERMITTLUNG DES KOMBINATIONSINDEX (CI) FÜR DIE KOMBINATIONSTHERAPIEN IM 2D-MODELL.....	38
<b>TABELLE 13:</b> ERMITTLUNG DES KOMBINATIONSINDEX (CI) FÜR DIE KOMBINATIONSTHERAPIE MIT A MIT SPYADI IM 2D-MODELL .....	40
<b>TABELLE 14:</b> ERMITTLUNG DES KOMBINATIONSINDEX (CI) FÜR DIE KOMBINATIONSTHERAPIEN IM 3D-MODELL.....	42



## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional
ADI	Arginin Deiminase
ADI-PEG	Pegylierte ADI
AM	Acetoxymethyl
APC	Allophycocyanin
ASS1	Argininsuccinat Synthetase
ATP	Adenosintriphosphat
Bid	BH3-interacting domain death agonist
BSA	Bovines Serumalbumin
CalR	Calretikulin
CD133	Cluster of Differentiation
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
CDKI	CDK-Inhibitor
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CTLA	Cytotoxic T-lymphocyte-Associated Protein
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälber Serum
GBM	Glioblastoma multiforme
GFAP	Saures Gliafaserprotein
IDH	Isocitrat Dehydrogenase
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogenphosphat
KV	Kristallviolett
Mcl	Myeloid leukemia cell differentiation
MDR	Multidrug Resistance-Related
MGMT	O <sup>6</sup> -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MHC	Major Histocompatibility Complex
MitA	Mithramycin A
MMP	Matrixmetalloprotein
MRT	Magnetresonanztomografie
mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
Oct	Octamer binding transcription factor
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PD1	Programmed cell Death protein 1
PD-L1	Programmed cell Death Ligand 1
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

PI .....	Propidiumiodid
PI3K .....	Phosphoinositid-3-Kinase
Ras.....	Rat sarcoma-Protein
Rb .....	Retinoblastom-Protein
RNA .....	Ribonukleinsäure
ROS .....	Reaktive Sauerstoffspezies
RT .....	Raumtemperatur
Sp1.....	Specificity Protein 1
SpyADl .....	<i>S. pyogenes</i> ADI
TMZ.....	Temozolomid
WHO .....	World Health Organization
WST .....	Water Soluble Tetrazolium

## I. EINLEITUNG

---

### 1.1 GLIOBLASTOMA MULTIFORME

---

#### 1.1.1 EPIDEMIOLOGIE UND ÄTIOLOGIE

---

Die Entität der Gliome umfasst primäre Tumoren des zentralen Nervensystems, die astrozytären Ursprungs sind. Sie werden nach der Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) an Hand histologischer Parameter, wie Zellatypie und Invasivität, in vier Grade eingeteilt. Dabei geht der höchste Grad mit dem aggressivsten Verhalten und der schlechtesten Prognose einher. Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist der häufigste Hirntumor. Er zählt entsprechend der WHO zu den hochmalignen Grad IV Tumoren [82].

Das GBM tritt global mit einer Inzidenz von weniger als 10 pro 100.000 Einwohner auf und hat mit einem durchschnittlichem Überleben von bis zu 15 Monaten nach Diagnosestellung trotz Therapie eine sehr schlechte Prognose [105, 106]. Das mittlere Erkrankungsalter liegt zwischen dem 55. und 65. Lebensjahr. Bei Kindern sind GBM selten und umfassen 3 - 7 % aller pädiatrischen primären Hirntumoren [100]. Der einzig gesicherte Risikofaktor für das Auftreten eines GBM ist neben einer genetischen Disposition, wie dem *Turcot*- und *Li-Fraumeni*-Syndrom, die Exposition von ionisierender Strahlung [2, 33, 50, 90, 146].

#### 1.1.2 MAKROSKOPISCHE UND HISTOLOGISCHE DARSTELLUNG

---

In über 90 % der Fälle entsteht das GBM primär mit einer sehr kurzen Anamnese *de novo* ohne vorher bestehende Läsionen. Es kann sich auch sekundär aus niedrig gradigen WHO Grad II oder III Tumoren entwickeln. Makroskopisch stellt sich das GBM sehr heterogen dar, mit multiplen Hämorrhagien, nekrotischen oder zystischen Bereichen und einem perifokalen Ödem. Es zeichnet sich durch ein ausgeprägtes invasives Verhalten mit diffusem Wachstum, insbesondere entlang kompakter Myelinbahnen, aus. Das GBM ist zu 95 % supratentoriell, in den beiden Hemisphären des Cerebrums, lokalisiert. Histologisch ist das GBM durch polymorphkernige, atypische gliale Tumorzellen in palisadenartiger Anordnung charakterisiert, die eine hohe mitotische Aktivität aufweisen. Des Weiteren sind ausgedehnte Nekroseareale und multiple Gefäßproliferationen typisch [14, 104].

### 1.1.3 GENETISCHE UND MOLEKULARE PATHOGENESE

---

Molekulargenetische Analysen haben wesentlich zum Verständnis der Entstehung und zur Charakterisierung des GBM beigetragen. Es konnte gezeigt werden, dass drei Tumorprogressionswege für die Pathogenese des GBM von Bedeutung sind. Zum einen die Rezeptor-Tyrosinkinase/Ras/PI3K-Signalkaskade, zum anderen treten Mutationen in den Tumorsuppressoren p53 und dem Retinoblastom (Rb)-Protein auf [2, 3, 50, 103].

Zu den wichtigen prognostischen Markern eines GBM zählen vor allem der Methylierungsstatus des MGMT-Promoters und die Mutationen von IDH 1. Das MGMT-Gen codiert eine Alkyltransferase, ein DNA-Reparaturenzym, welches Alkylgruppen von der O<sub>6</sub> Position des Guanins in der DNA entfernt. Durch die Funktion dieses Enzyms sind die GBM weniger sensibel gegenüber dem alkylierenden Standardtherapeutikum Temozolomid (TMZ). Hypermethylierungen des MGMT-Promoters reduzieren die Aktivität des Reparaturenzyms. Im Umkehrschluss steigt die Sensibilität des Tumors gegenüber TMZ. Nicht MGMT-methylierte Tumoren sind demgegenüber eher TMZ-resistent [28, 54, 146]. Ein weiterer positiver prognostischer Marker ist eine Mutation von IDH 1. Das veränderte Enzym bindet an alpha-Ketoglutarat und reduziert es zu D-2-Hydroxyglutarat. IDH 1 mutierte GBM sind charakterisiert durch ein vermindertes infiltratives Wachstum sowie weniger Nekrosen und Immunzellinfiltrate [57].

### 1.1.4 KLINIK

---

Die meisten Patienten mit einem GBM haben eine sehr kurze Anamnese von wenigen Monaten. Durch das stark infiltrative Wachstum des Tumors und die vermehrte Bildung von Nekrosen kommt es bei 40 - 60 % der Betroffenen zu fokal neurologischen Defiziten und kognitiven Beeinträchtigungen. Dies ist abhängig von der Lokalisation des Tumors in den jeweiligen Hemisphären. So kann eine organische Wesensveränderung Erstsymptom eines Tumors im Frontallappen sein. Sekundär kann es durch das Tumorwachstum zu einer Liquorzirkulationsstörung sowie zu einer venösen Stauung kommen. Dies führt zu einem erhöhten Hirndruck, der mit diffusen, frühmorgendlichen Kopfschmerzen, Nüchternerebrechen und Vigilanzstörungen einhergehen kann. In 20 - 40 % der Fälle manifestiert sich ein GBM auch in Form von fokalen oder sekundär generalisierten epileptischen Anfällen. Diagnostiziert wird das GBM mittels MRT. Dabei stellt es sich in der T1-Sequenz gemischt und in der T2-Sequenz hyperintens dar. Bei Kontrastmittelgabe kann ein girlandenförmiges Enhancement beobachtet werden [37, 50, 134].

### 1.1.5 THERAPIE

---

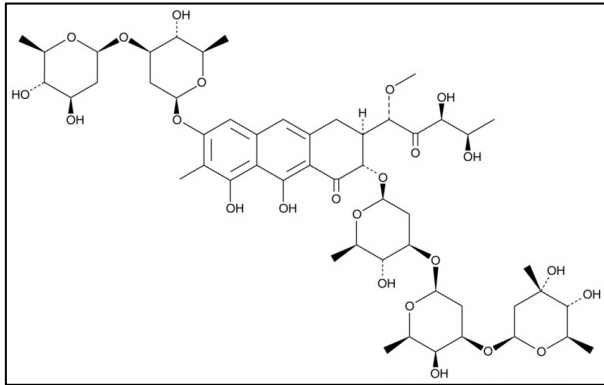
Die Therapie des GBM ist sehr komplex und kann bisher lediglich zu einer eingeschränkten Lebensverlängerung, jedoch nicht zu einer Heilung der Patienten beitragen. Die Behandlung setzt sich aus vier Säulen zusammen: der chirurgischen Resektion, der Chemotherapie, der Radiotherapie und ggf. den Tumortherapiefeldern. Neben diesen vier Säulen ist für die Lebensqualität der Patienten auch die supportive, symptomatische Therapie von großer Bedeutung. Sie umfasst die Senkung des Hirndrucks mittels Osmodiuretika oder Kortikosteroiden, den Einsatz von Antiemetika und Analgetika sowie die Behandlung von epileptischen Anfällen mittels Antikonvulsiva [155]. Ziel der chirurgischen Therapie ist die makroskopisch komplette Resektion des Tumors ohne gravierende neurologische Defekte. Durch die chirurgische Entfernung kann außerdem oft eine Symptomkontrolle erzielt werden, die maßgeblich zur Verbesserung der Lebensqualität der Patienten beiträgt [93]. Auf Grund des komplex-invasiven Wachstums des GBM ist eine vollständige mikroskopische Tumoresektion meist nicht möglich, so dass die chirurgische Versorgung als alleiniger kurativer Therapieansatz nicht ausreichend ist. Deshalb wird im Anschluss an eine Operation eine simultane Radiochemotherapie mit TMZ durchgeführt, gefolgt von einer Erhaltungstherapie über 6 - 12 Zyklen. Die Strahlentherapie erfolgt standardmäßig konventionell fraktioniert mit einer Gesamtdosis von 55 - 60 Gy (1,8 - 2 Gy Fraktionen) [139, 151]. Die Ganzhirnbestrahlung führt zu einer annähernden Verdopplung der Überlebenszeit [101, 154]. Es besteht der allgemeine Konsens, dass ältere Patienten, die nicht für eine kombinierte Radiochemotherapie in Frage kommen, entsprechend ihres MGMT-Promotermethylierungsstatus therapiert werden [51, 93, 155]. Bei Patienten mit methyliertem Promoter wird eine TMZ-Monotherapie oder eine kombinierte Radiochemotherapie angewandt. Patienten ohne Methylierung des MGMT-Promoters profitieren gering von einer TMZ-Therapie und werden alleinig hypofraktioniert bestrahlt [101, 155].

In den letzten Jahren etablierte sich zusätzlich eine nicht invasive Behandlungsmethode, die Tumortherapiefelder. Sie hemmen über elektrische Wechselspannung das Wachstum des Tumors. Durch diese Therapieoption kann die Überlebenszeit um 5 Monate verlängert und die Lebensqualität der Patienten verbessert werden. Jedoch ändert auch diese Therapie das Gesamtüberleben nicht signifikant [69].

Vor diesem Hintergrund ist die Entwicklung neuer Therapieverfahren dringend erforderlich, um die Prognose von GBM-Patienten langfristig zu verbessern [118].

## 1.2 THERAPEUTISCHE SUBSTANZEN

### 1.2.1 MITHRAMYCIN A



Mithramycin A (MitA) ist ein antineoplastisches polyketidisches Antibiotikum, das bereits seit 1970 zur experimentellen Therapie verschiedener Tumorentitäten eingesetzt wird. Dazu zählen unter anderem das Hoden-, Prostata-, Mamma-, Zervikal- und Kolonkarzinom [24, 25, 68, 81, 116].

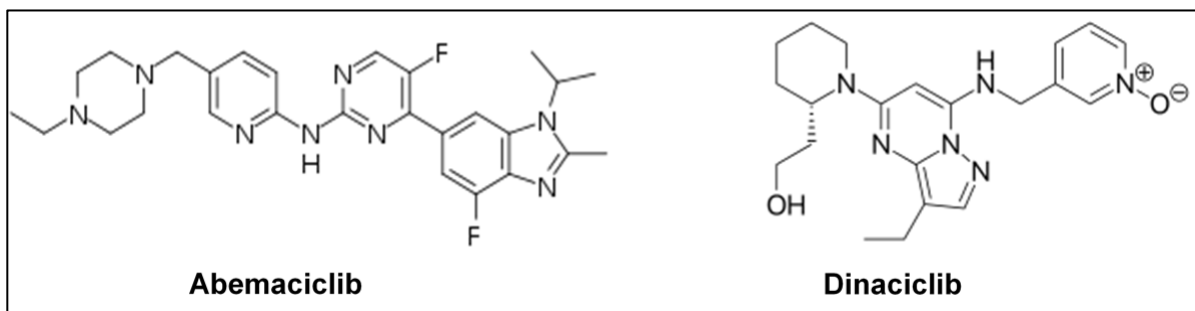
**ABBILDUNG 1:** MITA STRUKTURFORMEL

MitA wird auch als mögliches Therapeutikum zur Behandlung des GBM angewandt [130]. MitA interagiert reversibel und nicht-interkalierend mit GC-reichen Regionen der DNA. Dadurch inhibiert es die Bindung von Transkriptionsfaktoren an ihre Promoter und verhindert so die Transkription verschiedener Proto-Onkogene. So hemmt MitA insbesondere die Funktion des Transkriptionsfaktors Specificity Protein 1 (Sp1). Sp1 spielt eine entscheidende Rolle in unterschiedlichen zellulären Prozessen, wie dem Zellzyklus und der Zelldifferenzierung, und ist in Tumorzellen häufig überexprimiert. Die Hemmung von Sp1 durch MitA hat verschiedenste antitumorale Effekte zur Folge, wie die Induktion von Apoptose, eine Hemmung der Angiogenese und der Zellproliferation [7, 12, 123, 152]. Sp1 spielt auch in der Pathogenese des GBM eine Rolle. Eine hohe Expression von Sp1 geht mit einer höheren Malignität und einer TMZ-Resistenz einher. Es fördert die Induktion von neurogenen Stammzellen im Tumor, die ein Rezidiv und Therapieversagen bedingen können [19].

MitA passiert die Blut-Hirn-Schranke und könnte ein vielversprechendes Therapeutikum zur Behandlung des GBM sein. Den Einsatz limitierte bisher vor allem die systemische Toxizität. Walker *et al.* setzten 1976 MitA zur Therapie von Patienten mit malignen Gliomen ein [153]. Unter der Therapie kam es bei über der Hälfte der Patienten zu gastrointestinalen Symptomen, wie Übelkeit und Erbrechen, einer milden bis moderaten Anämie, dermatologischen Symptomen und Leberfunktionseinschränkungen. Des Weiteren wurden Leukopenien beobachtet [67]. Durch das Wissen über die Biosynthese von MitA konnten jedoch zuletzt weniger toxische MitA Analoga synthetisiert werden, die das klinische Interesse an MitA deutlich steigern [71].

## 1.2.2 ABEMACICLIB UND DINACICLIB

Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) regulieren eine Vielzahl von zellulären Prozessen, insbesondere den Zellzyklus, DNA-Reparaturmechanismen und die Expression von Proto-Onkogenen. Die meisten malignen Tumoren weisen funktionelle Veränderungen in CDKs auf. Häufig ist der Rb Signalweg (p16/CDK4-Cyclin D/pRb), der den Übergang von der G1- zur S-Phase kontrolliert, dysreguliert. Das Rb-Protein fungiert als Tumorsuppressor und inhibiert die Proliferation über die Blockade der E2F-Transkriptionsfaktoren. Rb wird seinerseits über Phosphorylierung durch CDK 4/6 kontrolliert. Mutationen in diesem Kontrollpunkt führen zu einer abnormalen Zellproliferation und sind ein wichtiger Bestandteil der Tumorgenese [31, 84, 125, 132]. Genomanalysen zeigten, dass pathogenetisch für die Entstehung des GBM ebenfalls zu 80 % Veränderungen im p16/CDK4-Cyclin-D/pRb Signalweg sowie der Proteine CDK1 und CDK5 verantwortlich sind [15, 136]. In Abbildung 3 ist die Wirkweise der CDK-Inhibitoren (CDKIs), wie Abemaciclib und Dinaciclib, schematisch dargestellt. Diese Substanzen werden zunehmend präklinisch und klinisch zur Therapie verschiedenster Tumorentitäten eingesetzt [122].



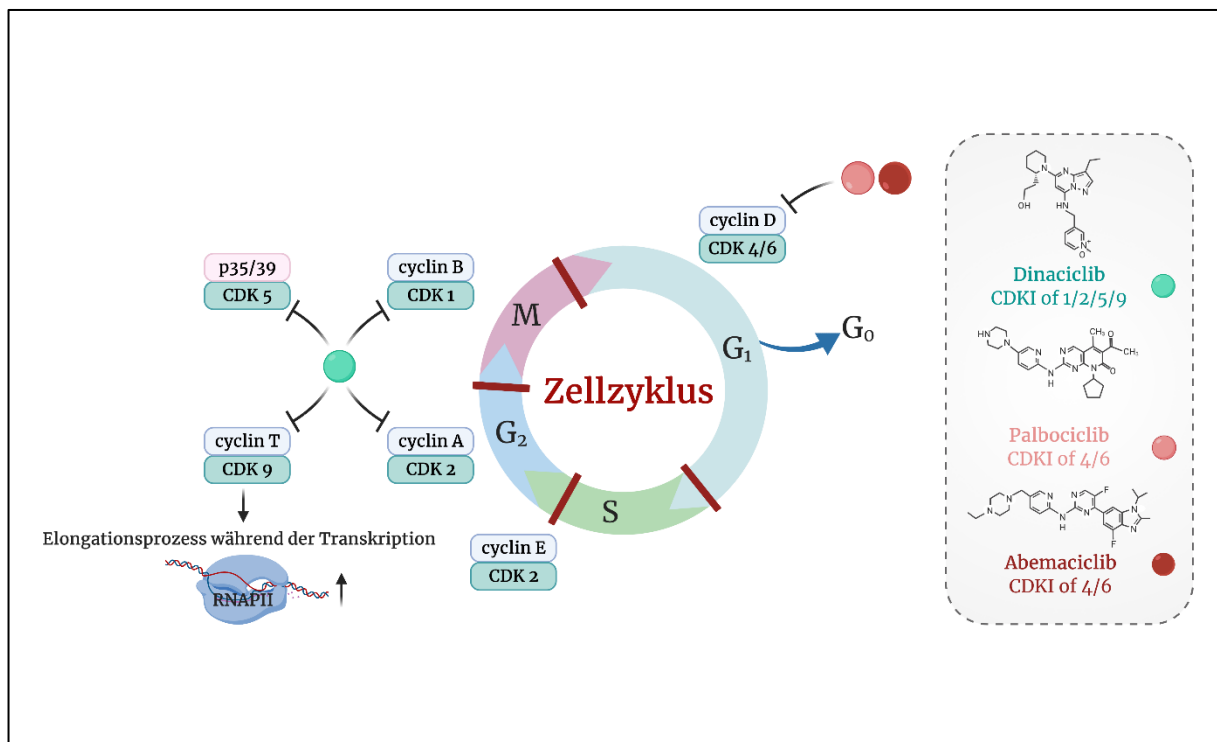
**ABBILDUNG 2:** ABEMACICLIB UND DINACICLIB STRUKTURFORMELN

Abemaciclib ist ein spezifischer CDK 4/6 Inhibitor und führt zur Hemmung des Zellzyklus durch eine Blockade der Phosphorylierung des Rb-Proteins. Dadurch wird der p16/CDK4-Cyclin D/pRb Signalweg beeinflusst [83]. Abemaciclib wurde von der FDA und der EMA zur Therapie des metastasierten HR<sup>+</sup>-HER2<sup>-</sup> Mammakarzinoms in Kombination mit einer Hormontherapie zugelassen [127, 135]. Bisher existieren einige wenige Studien, die den Einsatz von Abemaciclib zur Therapie des GBM untersuchten. Raub *et al.* zeigten *in vivo* einen additiven Effekt von Abemaciclib in Kombination mit TMZ und einer Radiotherapie. Es konnte auch nachgewiesen werden, dass Abemaciclib die Blut-Hirn-Schranke passiert [117]. Abemaciclib wurde bereits in klinischen Phase I Studien an GBM-Patienten getestet und führte dort bei 5/17 Patienten zu einer Stabilisierung. Die Therapie wurde vom Großteil der Patienten ohne Grad IV Nebenwirkungen vertragen. Es kam bei 60 % der Patienten zu gastrointestinalen

Symptomen, wie Diarrhoe und Nausea. Des Weiteren wurde eine Reduktion des Allgemeinzustandes mit Fatigue beobachtet. Es traten auch Blutbildveränderungen, darunter Neutropenie, Thrombozytopenie und Anämie unter der Therapie auf [111].

Dinaciclib ist ein global wirkender CDKI, der die CDK 1, 2, 5 und 9 hemmt und bereits in klinischen Phase I/II Studien zur Therapie verschiedener Tumorentitäten angewendet wurde. Bislang ist es noch nicht von der FDA und der EMA für den klinischen Einsatz zugelassen. Die Therapie mit Dinaciclib führte zu schwereren Nebenwirkungen, als eine Behandlung mit Abemaciclib. Dosislimitierend war insbesondere die Hämatotoxizität und die während der Infusion auftretende Hypotension [5, 22, 98, 110]. Die Ergebnisse aus Studien bezüglich der Effektivität von Dinaciclib zur Therapie des GBM sind widersprüchlich. Jane *et al.* konnten keine Wirksamkeit einer Monotherapie mit Dinaciclib feststellen [63].

Es gibt bislang wenige Studien, die die Effektivität der CDKIs in der Therapie des GBM untersucht haben. Jedoch zeigten Vorarbeiten, dass sowohl Abemaciclib als auch Dinaciclib vielversprechende Therapeutika sein könnten [121].



**ABBILDUNG 3:** DARSTELLUNG DES EINFLUSSES DER CDKIS AUF DEN ZELLYKLUS  
DIE ABBILDUNG WURDE MIT BIORENDER.COM ERSTELLT.

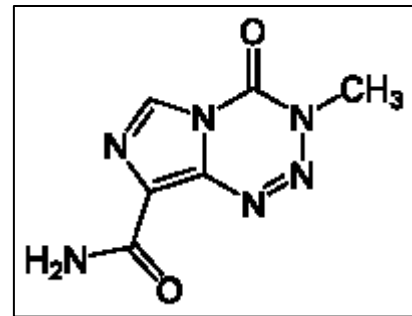
DINACICLIB ALS GLOBALER CDKI HEMMT U.A. DIE BILDUNG DES CDK1/CYCLIN B-KOMPLEXES UND INHIBIERT DADURCH DEN ÜBERGANG DER MITOSE-PHASE ZUR G<sub>1</sub>-PHASE. DES WEITEREN WERDEN DURCH DIE CDK2 INHIBITION DIE ZELLZYKLUS-CHECKPOINTS IN DER G<sub>2</sub>- UND IN DER SYNTHESPHASE GEHEMMT. DINACICLIB BEEINFLUSST ÜBER DIE HEMMUNG VON CDK9 DEN ELONGATIONSPROZESS WÄHREND DER TRANSKRIPTION. ABEMACICLIB ALS SELEKTIVER CDK4/6 INHIBITOR VERHINDERT DIE BILDUNG DES CDK4/6/CYCLIN D-KOMPLEXES UND FÜHRT ZUM ZELLZYKLUSARREST IN DER G<sub>1</sub>-PHASE.



### 1.2.3 TEMOZOLOMID

---

Temozolomid stellt heute das Standardchemotherapeutikum in der GBM-Therapie dar. Es ist seit 2005 von der US Food and Drug Administration (FDA) und seit 2011 von der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) zur Therapie des GBM zugelassen. TMZ ist ein alkylierendes Imidazol-Tetrazin-Derivat. Es wirkt zytotoxisch, indem es die O<sub>6</sub> und N<sub>7</sub> Stellen von Guanin bzw. die O<sub>3</sub> Stellen von



**ABBILDUNG 4:** TMZ STRUKTURFORMEL

Adenin in der DNA und RNA methyliert. Dadurch wird Cytosin während der DNA-Replikation durch Thymin substituiert. Dies hat eine Fehlbasenpaarung zur Folge. Es kommt zum G2-Arrest und zur Apoptoseinduktion. TMZ kann intravenös oder oral appliziert werden. Es ist ein Prodrug, welches zur aktiven Form Monomethyl-triazeno-imidazol-carboxamid hydrolysiert wird. TMZ ist ein kleines (194 Da) und lipophiles Molekül, kann somit die Blut-Hirn-Schranke passieren und im Hirntumorgewebe eine Konzentration von 20 - 35 % der Plasmakonzentration erreichen [99, 128]. Die Effektivität von TMZ wird maßgeblich vom MGMT-Promotermethylierungsstatus beeinflusst. Wie zuvor dargelegt, ist eine durch Hypermethylierung bedingte Repression des MGMT-Promoters mit einer höheren TMZ Sensitivität assoziiert und *vice versa* [17, 51]. TMZ bedingte Nebenwirkungen umfassen eine Myelodepression mit einer Neutro-, Thrombo- und Lymphopenie. Zusätzlich treten Übelkeit, Erbrechen, Gewichtsverlust, Kopfschmerzen und Müdigkeit auf [99].

#### 1.2.4 ARGININ DEIMINASE

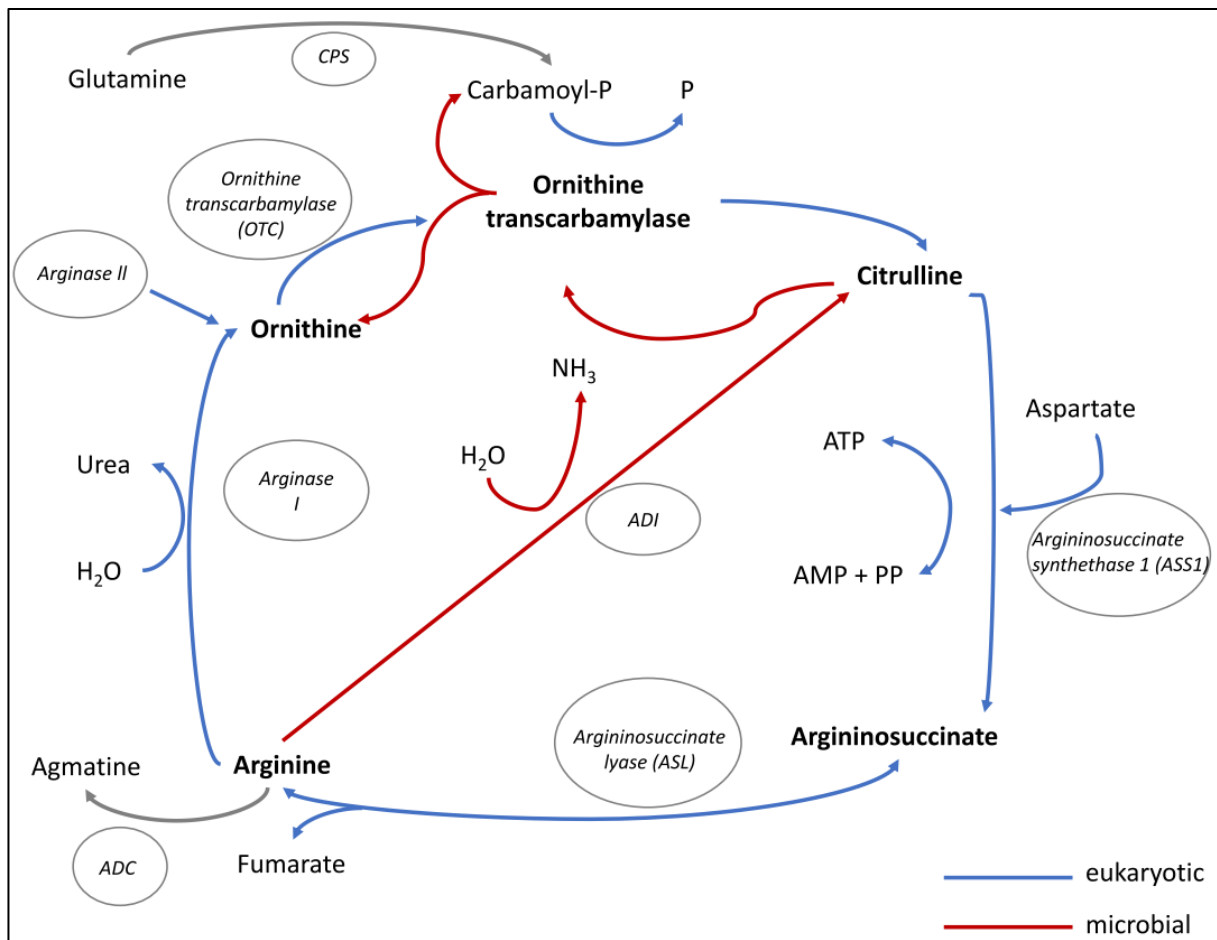
---

Arginin ist eine semi-essentielle Aminosäure, die von humanen Zellen nicht nur *de novo* synthetisiert, sondern auch extrazellulär aufgenommen wird. Sie spielt eine entscheidende Rolle in einer Vielzahl von zellulären Prozessen, wie der Bildung von Harnstoff, NO, Kreatin, Polyaminen und den Aminosäuren Prolin und Glutamat [43, 95]. Die Synthese von Arginin erfolgt über den Harnstoffzyklus über die in Abbildung 5 dargestellten Enzyme. Dabei stellt die Argininsuccinat Synthetase (ASS1) das Schlüsselenzym dar [48].

Einige maligne Tumoren können kein Arginin synthetisieren. Diese sogenannte Auxotrophie beruht auf einer zumeist epigenetischen Inaktivierung des ASS1-Gens über die Methylierung von CpG Inseln [113]. Interessanterweise sind häufig therapieresistente Tumoren mit einer schlechten Prognose Arginin-auxotroph. Zusätzlich konnte u.a. von unserer Arbeitsgruppe bei ca. 30 % aller GBM-Zellen eine Arginin-Auxotrophie festgestellt werden [32, 129, 140].

Dies ist die Grundlage für eine Arginin-depletierende Tumorthherapie, die den Tumorzellen selektiv Arginin entzieht. Besonders vielversprechend ist dabei die Arginin Deiminase (ADI), die erstmals 1933 isoliert wurde. Sie hydrolysiert L-Arginin zu L-Citrullin und Harnstoff [58]. Dies führt dazu, dass die Arginin-auxotrophen Tumorzellen nicht genug Arginin zur Verfügung haben, um ihren Stoffwechsel aufrecht zu erhalten. Das löst in den Tumorzellen eine Stressreaktion aus, die sich insbesondere in einer Induktion von Autophagie-Prozessen äußert, die über den mTOR Signalweg kontrolliert werden [70, 76, 85]. Autophagie führt in den Tumorzellen zur Hochregulierung stressassoziiierter Gene, wie den Hitzeschockproteinen oder Proteinen aus der Familie der Eisen-/Mangan-Superoxiddismutasen [61, 88]. Die ADI, die in dieser Arbeit verwendet wurde, ist aus *S. pyogenes* isoliert worden (SpyADI). Die SpyADI hat im Gegensatz zu der häufiger verwendeten Mykoplasmen-ADI ein Temperatur- sowie pH-Optimum, das den physiologischen Verhältnissen im Menschen gleicht [55].

Die aus Mykoplasmen isolierte PEGylierte ADI (ADI-PEG 20) wurde bereits erfolgreich in Phase I/II Studien an hepatozellulären Karzinomen oder malignen Melanomen eingesetzt [4, 53, 62, 86, 107]. Hall *et al.* setzten ADI-PEG 20 im Rahmen einer Phase I Studie zur Therapie von Patienten mit ASS1-defizienten therapierefraktären GBM ein. Dies führte bei 80 % der Patienten zu keiner Tumorprogression [49]. Patienten, die innerhalb dieser Studien ADI-PEG 20 erhielten, entwickelten keine schwerwiegenden therapieassoziierten Komplikationen. Bei einigen traten Hyperurikämien auf, die jedoch suffizient mit Allopurinol behandelt werden konnten. Die SpyADI/ADI-PEG 20 könnte somit auch eine vielversprechende Substanz zur Therapie des GBM sein [32].



**ABBILDUNG 5:** ARGININ-STOFFWECHSEL IM HARNSTOFFZYKLUS [120]

(ADC = ARGININ DECARBOXYLASE, SPYADI = ARGININ DEIMINASE, CPS = CARBAMYLPHOSPHAT SYNTHETASE)

DAS ENZYM ADI BEWIRKT EINE HYDROLYSE VON ARGININ ZU CITRULLIN UNTER FREISETZUNG VON AMMONIAK UND ENTZIEHT SO DEM ABGEBILDETEN HARNSTOFFZYKLUS DAS SUBSTRAT ARGININ.

## II. ZIELSTELLUNG

---

Das Glioblastoma multiforme ist der häufigste primäre maligne Hirntumor, dessen Prognose trotz radikaler und multimodaler Therapie sehr schlecht ist. Daher ist es notwendig, neue Therapeutika zu finden, um die Prognose der betroffenen Patienten mit GBM zu verbessern. Vorarbeiten von Seznec *et al.* und Irmischer zeigten, dass das antineoplastische Antibiotikum MitA das Wachstum der GBM-Zellen effektiv hemmt und möglicherweise eine neue therapeutische Option in der Behandlung des GBM darstellt [61, 130].

Folglich sollte in dieser Arbeit die antitumorale Effektivität MitAs an vier von Patienten abgeleiteten GBM-Zelllinien untersucht werden. Es wurden Konzentrationsreihen erstellt, um eine möglichst niedrige Dosis von MitA zu ermitteln, die effektiv das Wachstum der GBM-Zellen hemmt. Ergebnisse aus Vorstudien zeigten, dass MitA eine strahlensensibilisierende Wirkung hat. Dies sollte in dieser Arbeit überprüft werden, da die Radiotherapie eine wichtige Säule in der Therapie des GBM darstellt.

Des Weiteren wurde MitA mit verschiedenen Testsubstanzen kombiniert (TMZ, Abemaciclib, Dinaciclib, SpyADI), um potentiell synergistische Effekte zu identifizieren. Die Kombinationsversuche wurden sowohl im konventionellen 2D- als auch im 3D-Sphäroid-Modell durchgeführt.

Die Ergebnisse aus diesen Kurzzeitversuchen wurden schließlich in Langzeitansätzen über 10 Zyklen überprüft und die Resistenzentwicklung erfasst.

Zusätzlich erfolgten funktionelle Analysen, um die MitA-vermittelten Effekte näher zu charakterisieren.

Diese umfassten folgende Aspekte:

- Invasionsverhalten
- Art des Zelltodes
- Abundanz immunologisch-relevanter Marker und neuronaler Stammzellmarker.

### III. MATERIALIEN UND METHODEN

#### 3.1 MATERIAL

TABELLE 1: LABORGERÄTE

Laborgerät	Hersteller
Analysewaage ALT 220-4M	Kern & Sohn, Balingen, BRD
Brutschrank INCO 246	Memmert, Schwabach, BRD
Einfrierhilfe Mr. Frosty	Nalgene, Rochester, USA
Eppendorf-Pipetten (10-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, BRD
FACS Calibur Durchflusszytometer	BD Biosciences, New Jersey, USA
Gamma-Bestrahlungsanlage IBL 637	CIS bio, Berlin, BRD
GloMax Microplate Luminometer	Promega, Walldorf, BRD
IKA Schüttler MS 3 basic	IKA-Werke, Staufen, BRD
Inverses Mikroskop Olympus CK40-F200	Olympus, Shinjuku, Japan
Kühlschrank	Robert Bosch, Gerlingen, BRD
LSM 780 (Laser Scanning Microscope)	Zeiss, Oberkochen, BRD
Mehrkanalpipette (20-200 µl)	Gilson, Middleton, USA
Mikroskop Axio Observer 7	Zeiss, Oberkochen, BRD
Mikroskop Leica DM 4000B	Leica, Heidelberg, BRD
Mini-Zentrifuge NG002 B	Nippon Genetics Europe, Düren, BRD
Multipipette Plus	Eppendorf, Hamburg, BRD
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, BRD
Pipetboy	Integra Biosciences, Biebertal, BRD
Schüttler Rotamax 120	Heidolph Instruments, Schwabach, BRD
Sterilbank SafeMate Vision	EuroClone, Mailand, Italien
Tecan Reader Infinite M200	Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz
Tiefkühlschränke	
-20 °C	Liebherr, Bulle, Schweiz
-80 °C	Sanyo, Moriguchi, Japan
Vakuumpumpe Vacusafe	Integra Biosciences, Biebertal, BRD
Wasserbad WiseBath	Witeg Labortechnik, Wertheim, BRD
Zentrifuge ROTANTA 460R	Andreas Hettich, Tuttlingen, BRD

**TABELLE 2:** VERBRAUCHSMATERIAL

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Bezugsquelle</b>
96-Well, 24-Well, 6-Well-Platten	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
96-Well-Platte, zellabweisend, CELLSTAR®	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Combitips (5 ml, 10 ml)	Eppendorf BIOPUR, Hamburg, BRD
Durchflussszytometer-Tubes	Sarstedt, Nümbrecht, BRD
Kammerobjektträger, µ-Slide, 8-Well	Ibidi, Gräfelfing, BRD
Kryo-Tubes	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pasteurpipetten aus Glas	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pipettenspitzen SafeSeal (0.1 - 10 µl, 2 - 200 µl, 50 - 100 µl, 200 - 1000 µl)	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, BRD
Reaktionsgefäße SafeSeal (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, BRD
Serologische Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 40 ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Sterile Zentrifugierröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Stieltupfer Raucotupf	Lohmann & Rauscher, Neuwied, BRD
Zellkultureinsätze 24 Well, ThinCert, 8 µm	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturflaschen (T25, T75, T175)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich

Alle Chemikalien wurden in der höchstmöglichen Reinheit verwendet, falls nicht anders angegeben.

**TABELLE 3:** CHEMIKALIEN

<b>Chemikalien</b>	<b>Bezugsquelle</b>
1x PBS	PAN-Biotech, Aidenbach, BRD
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Biomol, Hamburg, BRD
Abemaciclib	Selleckchem, München, BRD
Aqua dest.	Carl Roth, Karlsruhe, BRD
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAN-Biotech, Aidenbach, BRD
Calcein-Acetoxymethyl (AM)	Biomol, Hamburg, BRD
CellTiter-Glo 3D Reagenz	Promega, Walldorf, BRD
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt, BRD
Dinaciclib	Selleckchem, München, BRD
DMEM/F-12	PAN-Biotech, Aidenbach, BRD
Epidermal Growth Factor (EGF)	ImmunoTools, Friesoythe, BRD
Ethanol (70 %)	Walter-CMP, Kiel, BRD
Fetales Kälberserum (FKS)	PAN-Biotech, Aidenbach, BRD
Glutamin	PAN-Biotech, Aidenbach, BRD
Kristallviolett (KV)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Matrigel-Basalmembranmatrix	Corning, Amsterdam, Niederlande
Methanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Mithramycin A	Cayman Chemical, Michigan, USA
Paraformaldehyd (PFA) 16 % w/o Methanol	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Penicillin-Streptomycin	Biochrom, Berlin, BRD
Phalloidin grün	BioLegend, San Diego, USA
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<b><i>Streptococcus pyogenes</i></b> Arginin Deiminase (SpyADI) – Heterologe Überexpression in <b><i>E.coli DH5α</i></b>	In Kooperation mit dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, Universitätsmedizin Rostock (PD Dr. rer. nat. Tomas Fiedler, Yvonne Humboldt, Cand. med. Adina Fiebig)
Temozolomid	MSD Sharp & Dohme, Haar, BRD
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin/EDTA	PAN-Biotech, Aidenbach, BRD
WST-1	Merck KGaA, Darmstadt, BRD
Yo-Pro1-Iodid	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

**TABELLE 4:** LÖSUNGEN FÜR *IN VITRO* METHODEN

Lösung	Zusammensetzung
0,2 % KV	200 mg KV 2 ml Ethanol in 100 ml <i>Aqua dest.</i>
0,5 % Triton-X-100	0,5 ml in 100 ml 1x PBS
10x PBS	1,37 M NaCl 0,027 M KCl 0,1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O 0,02 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
2 % BSA	2 g in 100 ml 1xPBS
2 % PFA (16 %)	1ml in 7 ml 1x PBS
Calcein AM	2 µM in 1x PBS
Einfriermedium	FKS mit 10 % DMSO
Phalloidin grün	300 U in 1,5 ml Methanol
PI	20 µg/ml in 1x PBS
Trypanblau	0,4 % in 1x PBS
Yo-Pro1-Iodid	0,2 µM in 1x PBS
Zellkulturmedium	DMEM/F-12 10 % FKS 1 % Penicillin-Streptomycin 6 mM L-Glutamin



**TABELLE 5:** VERWENDETE TESTSUBSTANZEN

Testsubstanzen	Konzentration/Stock
MitA	1,0 mM in DMSO
TMZ	12,9 mM in DMSO
Dinaciclib	10,0 mM in DMSO
Abemaciclib	15,0 mM in DMSO
SpyADI	50,0 U/ml

**TABELLE 6:** ANTIKÖRPER

Antikörper	Bezugsquelle
Alexa Fluor 488 anti-Nanog	BioLegend, San Diego, USA
Alexa Fluor 594 anti-GFAP	BioLegend, San Diego, USA
Alexa Fluor 594 anti-H2A.X Phospho (Ser139)	BioLegend, San Diego, USA
Alexa Fluor 647 anti-mouse/human A2B5	BioLegend, San Diego, USA
Alexa Fluor 647 anti-Oct4	BioLegend, San Diego, USA
Anti-Calretikulin	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-CD133-PE	BioLegend, San Diego, USA
Anti-CD152-PE	BioLegend, San Diego, USA
Anti-CD274-FITC	BioLegend, San Diego, USA
Anti-CD279-APC	BioLegend, San Diego, USA
Anti-CD29-APC	BioLegend, San Diego, USA
Anti-MHC1-FITC	ImmunoTools, Friesoythe, BRD
FITC donkey-anti rabbit Antikörper	BioLegend, San Diego, USA

### 3.2 METHODEN

#### 3.2.1 HUMANE GLIOBLASTOM-ZELLINIEN

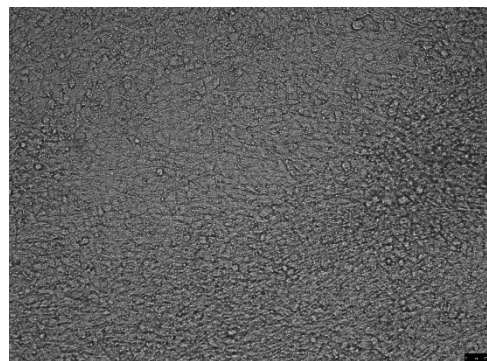
In dieser Arbeit wurden vier verschiedene GBM-Zelllinien verwendet, die aus primärem Tumormaterial etabliert wurden. Dieses Tumormaterial stammt, nach entsprechender Einwilligung (Ethikvotum A2009/34 der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock), von Patienten, bei denen ein GBM WHO Grad IV diagnostiziert wurde. Die Daten zu den einzelnen Zelllinien sind in Tabelle 7 aufgeführt.

**TABELLE 7:** GBM-ZELLINIEN

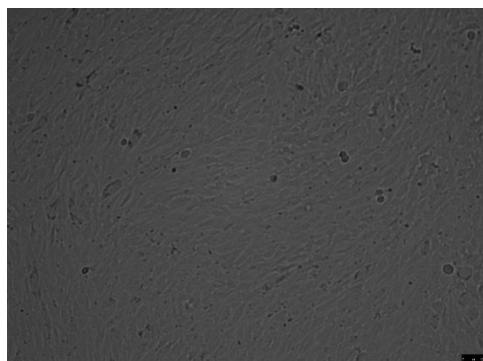
<b>Zelllinie</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Diagnose</b>	<b>MGMT-Status</b>	<b>Lokalisation</b>	<b>Passage</b>
HROG02	Männlich	Primarius	Methyliert	Rechts, parietoccipital	25-43
HROG05	Weiblich	Rezidiv	Methyliert	Links, temporal	51-78
HROG52	Männlich	Primarius	Nicht Methyliert	Links, temporal	28-44
HROG63	Männlich	Rezidiv	Nicht Methyliert	Links, temporal	19-36



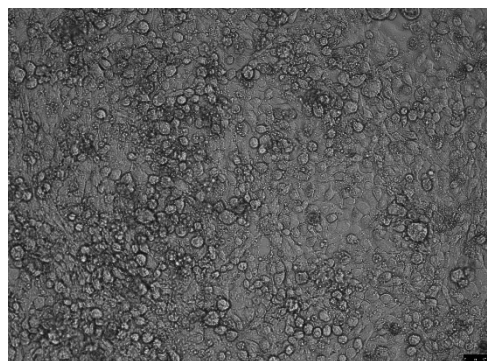
HROG02



HROG05



HROG52



HROG63

**ABBILDUNG 6:** LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN 2D-KULTIVierter GBM-ZELLINIEN

### 3.2.2 ZELLKULTUR

Alle vier GBM-Zelllinien wurden für die *in vitro* Experimente eingesetzt. Dafür wurden die Zellen in DMEM/F-12 Medium bei 37 °C, mit 5 % CO<sub>2</sub> und mit gesättigter Wasserdampfatmosphäre im Brutschrank in 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen inkubiert. Dem Medium wurden 10 % FKS, 1 % Penicillin-Streptomycin und 6 mM L-Glutamin zugesetzt. Zweimal wöchentlich wurde das Medium gewechselt und die Zellen abhängig von ihrer Konfluenz und ihrem Wachstum passagiert.

Für die Passage wurde das Medium in der Flasche abgesaugt und die Zellen mit 1x PBS gespült. Zum Ablösen der Zellen vom Flaschenboden wurde 1 % Trypsin/EDTA hinzugefügt und für 8 Minuten mit 37 °C inkubiert. Mikroskopisch konnte nach der Inkubationszeit überprüft werden, ob sich alle Zellen abgelöst hatten. Anschließend wurde der Vorgang durch Zugabe der drei- bis vierfachen Menge an FKS-haltigem-Medium abgestoppt. Diese Zellsuspension konnte für weitere Experimente in ein Falcon-Tube überführt werden.

### 3.2.3 ZELLZAHLBESTIMMUNG

Zur Ermittlung der Zellzahl wurde frische Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau vermischt. Durch die Färbung mit Trypanblau kann zwischen vitalen und avitalen Zellen unterschieden werden. Mithilfe der Neubauerzählkammer wurden die lebenden Zellen am Lichtmikroskop gezählt. Nach der Auszählung wurde auf die Zellzahl pro Milliliter zurückgerechnet. In Tabelle 8 sind die benötigten Zellzahlen für die verschiedenen Experimente aufgeführt.

**TABELLE 8:** GBM-ZELLZAHL UND VERWENDETE ZELLKULTURPLATTEN

Experiment	Ausgesäte Zellzahl/ Well	Plattenformat
Konzentrationsreihe/Kombinationstherapien/ 3D-Sphäroid-Kultur	1x 10 <sup>4</sup>	96-Well
Langzeitversuche	5x 10 <sup>4</sup>	6-Well
Resistenztestung	5x 10 <sup>4</sup>	24-Well
Durchflusszytometrie	5x 10 <sup>5</sup>	6-Well
Immunfluoreszenz γ-H2AX Stammzellmarker	1,25x 10 <sup>5</sup> 1x 10 <sup>4</sup>	8-Kammerobjektträger
Invasionsassay	2,5x 10 <sup>5</sup>	24-Well

### **3.2.4 KRYOKONSERVIERUNG**

---

Für die Kryokonservierung von GBM-Zellen wurden zwischen  $1,5 \times 10^6$  Zellen und  $3 \times 10^6$  Zellen pro Kryo-Tube benötigt. Die entsprechende Menge an Zellsuspension wurde bei 300xg für 5 Minuten zentrifugiert. Das nach der Zentrifugation erhaltene Zellpellet wurde im Einfriermedium gelöst, die Zellsuspension in ein Kryo-Röhrchen überführt und in eine Einfrierhilfe mit Isopropanol gegeben. Anschließend wurden die Röhrchen bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 24 h gelagert, bis sie letztendlich in Stickstoff (Gasphase) überführt wurden.

### **3.2.5 THERAPIEN DER GBM-ZELLEN**

---

#### **3.2.5.1 KONZENTRATIONSREIHEN MIT MITA**

---

Für die Behandlung der Zellen mit MitA wurden die GBM-Zellen mit  $1 \times 10^4$  Zellen pro Well in jeweils drei technischen Replikaten in 96-Well-Platten eingesät und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Zur Ermittlung der Konzentration, bei der eine 20 - 30 %ige Reduktion der Zellviabilität gemessen werden kann, wurden die Zellen mit 100 nM, 50 nM, 20 nM, 10 nM, 7,5 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM und 2 nM MitA behandelt. Für die Erstellung der Verdünnungsreihen wurde Zellkulturmedium eingesetzt. Als Kontrolle wurde mit DMSO zugesetztes Zellmedium entsprechend der höchsten Konzentration der Verdünnungsreihe (hier 100 nM DMSO) verwendet.

Die Zellen wurden im ersten Ansatz 1x 72 h mit der jeweiligen MitA Dosis inkubiert. Anschließend wurde die Zellviabilität mittels des Calcein AM Assays bestimmt (siehe Abschnitt 3.2.7). Der zweite Ansatz wurde für 2x 72 h behandelt. Nach 72 h Inkubation wurde das Medium entzogen und es erfolgte eine erneute Behandlung mit den entsprechenden MitA Dosen für weitere 72 h. Letztendlich konnte im zweiten Ansatz eine 20 - 30 %ige Zellviabilitätsreduktion bei einer Konzentration von 4 nM MitA beobachtet werden. Mit dieser Dosis wurden alle folgenden Versuche durchgeführt.

### 3.2.5.2 KOMBINATIONSTHERAPIEN

Für die Kombinationsversuche wurden GBM-Zellen mit MitA und den in Tabelle 9 aufgeführten Testsubstanzen in den jeweiligen Konzentrationen simultan behandelt. Neben den Kombinationstherapien wurden zur Kontrolle auch Monotherapien der jeweiligen Testsubstanzen und MitA sowie unbehandelte Zellen im Versuchsaufbau mitgeführt. Die Kombination von MitA mit SpyADI fand in drei unterschiedlichen Versuchsdurchführungen statt: Zum einen wurden die Zellen durch eine simultane Gabe behandelt, zum anderen wurden die Zellen sequentiell mit den Substanzen therapiert. Hierfür wurden die Zellen zuerst 72 h mit der einen Substanz vorbehandelt und anschließend 72 h mit der anderen Substanz therapiert.

**TABELLE 9:** KONZENTRATIONEN DER TESTSUBSTANZEN

Testsubstanz	Verwendete Konzentration
MitA	4 nM
TMZ	10.000 nM
Dinaciclib	10 nM
Abemaciclib	10.000 nM
SpyADI	35 mU/l

Zur Durchführung wurden die GBM-Zellen wie in Abschnitt 3.2.5.1 beschrieben in 96-Well Platten eingesät und 24 h im Brutschrank inkubiert, bis die Therapie erfolgte. Die Behandlung erfolgte für 2x 72 h, mit einem Mediumwechsel nach den ersten 72 h. Die Zellviabilität wurde mittels Calcein AM Assay (siehe Abschnitt 3.2.7) bestimmt.

Zur Quantifizierung der Effekte der Kombinationstherapien wurde das *Bliss Independence Modell* genutzt und der Kombinationsindex (CI) bestimmt. Grundlage dieses Modells ist die Annahme, dass die Substanzen unabhängig voneinander wirken und einen unterschiedlichen Wirkmechanismus aufweisen, ohne die Wirkung der anderen Substanz zu beeinflussen. Beide Substanzen tragen zum gleichen Ergebnis bei, der Reduktion der Zellviabilität. Die Wahrscheinlichkeit für den beobachteten Kombinationseffekt ( $0 \leq E_{AB} \leq 1$ ) wird ins Verhältnis zur Wahrscheinlichkeit des erwarteten additiven Effekts der Einzelsubstanzen

$$E_A + E_B(1 - E_A) = E_A + E_B - E_A E_B \quad \text{mit } (0 \leq E_A \leq 1) \text{ und } (0 \leq E_B \leq 1)$$

gesetzt [11].

Daraus kann der Kombinationsindex berechnet werden:

$$CI = \frac{E_A + E_B - E_A \times E_B}{E_{AB}}$$

**FORMEL 1: BERECHNUNG KOMBINATIONSINDEX**

(CI= KOMBINATIONSINDEX, E= EFFEKT-WAHRSCHEINLICHKEIT, A= SUBSTANZ 1, B= SUBSTANZ 2)

Mithilfe des Kombinationsindex kann eine Aussage über die Wirkung der beiden Substanzen in Kombination getroffen werden. CI-Werte < 1 werden als synergistische Wirkung, CI-Werte = 1 als additive Wirkung und CI-Werte > 1 als antagonistische Wirkung der beiden Substanzen in Kombination gewertet.

### 3.2.5.3 SPHÄROIDE

---

Um den Effekt der Kombinationstherapien in gewebeähnlichen 3D-Strukturen zu untersuchen, wurden Sphäroide angelegt. Hierfür wurden HROG05 und HROG63 Zellen in zellabweisende 96-Well-Platten mit  $1 \times 10^4$  Zellen pro Well eingesät. Um eine Sphäroid-Bildung zu induzieren, wurden die Zellen für drei bis vier Tage im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen entsprechend der in Abschnitt 3.2.5.2 beschriebenen Kombinationstherapien behandelt. Als Kontrolle wurden Sphäroide, denen DMSO zugesetzt wurde, mitgeführt. Die Sphäroide wurden, wie im 2D-Modell,  $2 \times 72$  h mit den jeweiligen Testsubstanzen therapiert. Die Auswertung der Zellviabilität wurde mittels des CellTiter-Glo 3D-Zellviabilitätsassays (siehe Abschnitt 3.2.9) durchgeführt.

### 3.2.5.4 LANGZEITTHERAPIEN

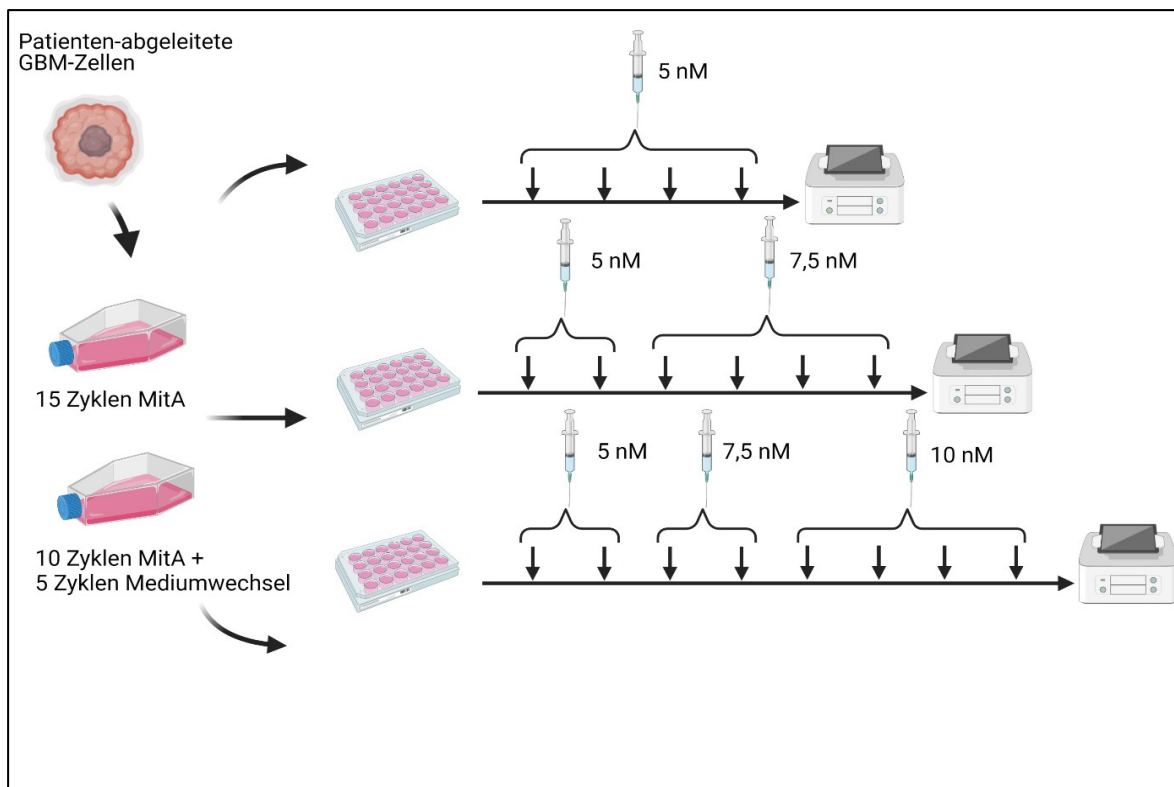
---

Zur Durchführung der Langzeitversuche wurden die GBM-Zellen mit  $5 \times 10^4$  Zellen pro Well in technischen Duplikaten in 6-Well Platten eingesät. Die Behandlung erfolgte in simultanen Kombinationstherapien, unter Mitführung der Monotherapien und der unbehandelten Kontrolle. Es wurden die Konzentrationen, wie in Tabelle 9 aufgeführt, eingesetzt. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 10 Zyklen à 72 h therapiert. Alle 72 h wurde das Medium gewechselt. Die Kombinationstherapie von MitA mit SpyADI wurde neben der simultanen Gabe auch sequentiell durchgeführt, wobei über fünf Zyklen mit einer SpyADI-Monotherapie vorbehandelt und anschließend mit fünf Zyklen MitA therapiert wurde. Nach Ablauf der 10 Zyklen wurde die Zellviabilität mittels des Calcein AM Assays (siehe Abschnitt 3.2.7) und der KV Färbung (siehe Abschnitt 3.2.8) ausgewertet. Zur bildlichen Dokumentation wurden im Anschluss an die Behandlungszyklen mikroskopische Fotos mit dem Mikroskop Leica DM 4000B angefertigt.

### 3.2.5.5 RESISTENZBESTIMMUNG

Zur Ermittlung einer möglichen Resistenzentwicklung unter MitA Therapie wurden die vier GBM-Zelllinien mit  $1 \times 10^5$  Zellen in T175 Zellkulturflaschen eingesät. Die Behandlung wurde mit 4 nM MitA über einen Zeitraum von 10 Zyklen zweimal wöchentlich durchgeführt. Danach wurden die Zellen in zwei Ansätzen in verschiedene T175 Zellkulturflaschen eingesät. Der eine Ansatz wurde für weitere fünf Zyklen einmal wöchentlich mit MitA behandelt. Die Zellen des anderen Ansatzes wurden nicht weiter therapiert. Es erfolgte lediglich ein Mediumwechsel.

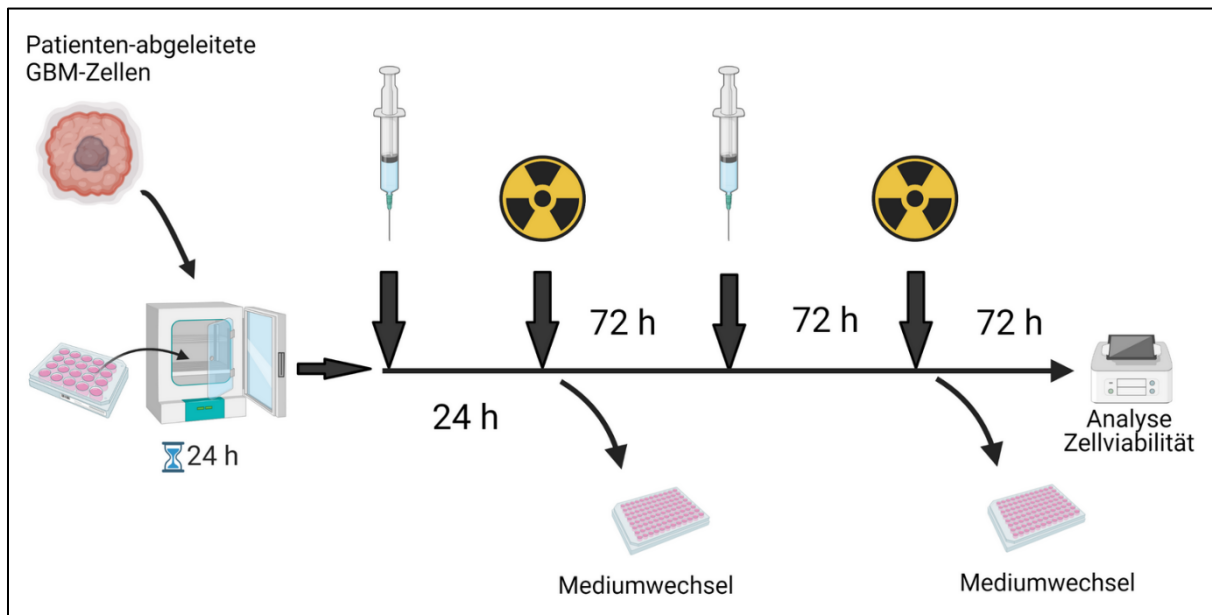
Im Anschluss an die insgesamt 15 Behandlungszyklen wurden die Zellen in 24-Well-Platten mit  $5 \times 10^4$  Zellen pro Well in technischen Duplikaten eingesät. Um eine mögliche Resistenzentwicklung zu testen, wurde die MitA Dosis mit 5 nM, 7,5 nM, 10 nM, 15 nM, 20 nM und 50 nM eskaliert. Die Therapie erfolgte über  $4 \times 72$  h, bis eine Auswertung der Zellviabilität mittels des Calcein AM Assays vorgenommen wurde (siehe Abschnitt 3.2.7). Nach zwei 72 h Zyklen wurde jeweils die Konzentration der MitA Behandlung erhöht beispielsweise von 5 nM auf 7,5 nM. Eine 24-Well-Platte wurde für weitere zwei Zyklen mit 5 nM MitA behandelt, bis die Auswertung erfolgte. Nach diesem Versuchsschema wurde mit steigender Konzentration weiter verfahren. Als Kontrolle dienten Zellen, die kontinuierlich mit 4 nM MitA behandelt wurden.



**ABBILDUNG 7:** THERAPIESCHEMA TESTUNG RESISTENZENTWICKLUNG UNTER MITA. DIE ABBILDUNG WURDE MIT BIORENDER.COM ERSTELLT.

### 3.2.5.6 RADIOTHERAPIE

Zur Untersuchung einer strahlensensibilisierenden Wirkung wurde MitA mit einer Radiotherapie kombiniert. Die GBM-Zellen wurden entsprechend Kapitel 3.2.5.1 in 96-Well-Platten eingesät und mit den jeweiligen MitA Konzentrationen behandelt. Nach 24 h Inkubation wurden die Zellen in der Gamma-Bestrahlungsanlage IBL 637 mit 2 Gy bestrahlt. Anschließend wurde das Medium entzogen und durch frisches Zellkulturmedium ohne MitA ersetzt. Nun inkubierten die Zellen für 72 h im Brutschrank. Das Therapieschema ist in Abbildung 8 dargestellt. Nach den 72 h Inkubation wurde das frische Medium entzogen und die Zellen erneut mit MitA für weitere 72 h behandelt. Anschließend fand eine weitere Bestrahlung mit 2 Gy statt. Das Medium wurde abermals gewechselt und die Viabilität nach weiteren 72 h Inkubation bestimmt.



**ABBILDUNG 8:** THERAPIESCHEMA MITA UND BESTRAHLUNG  
DIE ABBILDUNG WURDE MIT BIORENDER.COM ERSTELLT.



---

**3.2.6 NACHWEIS VON DNA-DOPPELSTRANGBRÜCHEN MITTELS  $\gamma$ -H2AX-IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG**

---

Um zu untersuchen, wie stark die Radiotherapie in Kombination mit MitA das Erbgut der GBM-Zellen geschädigt hat, wurde das Histon  $\gamma$ -H2AX mittels Immunfluoreszenz in den Zellkernen angefärbt. H2AX wird in Folge einer DNA-Schädigung insbesondere durch die Bildung von Doppelstrangbrüchen an Serin 139 durch Kinasen des PI3K Signalwegs phosphoryliert und anschließend als  $\gamma$ -H2AX bezeichnet. Es bewirkt die Rekrutierung von DNA-Reparaturproteinen. DNA-Doppelstrangbrüche entstehen unter Einwirkung zytotoxischer Agenzien und ionisierender Strahlung [72].

Zur Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung wurden  $1,25 \times 10^5$  der GBM-Zellen von HROG05 und HROG63 pro Well in 8-Well-Kammerobjektträger eingesät. Anschließend wurden die Tumorzellen, wie in Abschnitt 3.2.5.6 beschrieben, nach 24 h Inkubation mit MitA therapiert und bestrahlt. Als Kontrolle wurden mit DMSO behandelte GBM-Zellen mitgeführt. Im ersten Schritt der Färbung wurde das Medium entfernt und die Wells mit 1x PBS gewaschen und mit 2 %igem PFA in PBS für 15 Minuten fixiert. Im zweiten Schritt wurden die Zellen mittels 0,5 %igem Triton-X-100 permeabilisiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit Hilfe von 1 %igem BSA/PBS blockiert. Die Inkubation erfolgte für 60 Minuten bei RT. Anschließend wurden die Tumorzellen mit dem  $\gamma$ -H2AX-Antikörper (Stock: 0,5 mg/ml, Verdünnung: 1:100 in 1 %igem BSA) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Der verwendete Antikörper war mit dem Fluorchrom Alexa Fluor 594 konjugiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS für zwei Minuten mit DAPI (Stock: 1  $\mu$ g/ml, Verdünnung: 1:1.000) gegengefärbt. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der AT-Regionen der doppelsträngigen DNA bindet und die Zellkerne darstellt. Im Anschluss wurden die Kammerobjektträger im Dunklen bei 4 °C aufbewahrt. Die mikroskopische Auswertung erfolgte am konfokalen Laser Scanning Mikroskop LSM 780. Pro Behandlung wurden drei Fotos erstellt.

### **3.2.7 VIABILITÄTSBESTIMMUNG MITTELS CALCEIN AM ASSAY**

---

Calcein AM ist ein verestertes Derivat des Fluoreszenzfarbstoffes Calcein. Es wird durch vitale Zellen über die Zellmembran aufgenommen. Die veresterten Seitenketten des Calcein AM werden hydrolysiert und in Calcein umgewandelt. Calcein ist nun in der Lage, Calciumionen zu komplexieren. Dies resultiert in einer grünen Fluoreszenz [65].

Der Calcein AM Stock (4 mM) wurde im Verhältnis 1:2.000 mit 1x PBS verdünnt. Das Medium wurde abgesaugt und die Wells mit 1x PBS gewaschen. Das PBS wurde verworfen und die verdünnte Calcein AM Lösung in die Wells gegeben. Die Platte wurde im Brutschrank lichtgeschützt bei 37 °C für 20 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Fluoreszenzmessung bei einer Extinktion/Emission von 485/535 nm am Tecan Reader Infinite M200.

### **3.2.8 BIOMASSEBESTIMMUNG MITTELS KRISTALLVIOLETTFÄRBUNG**

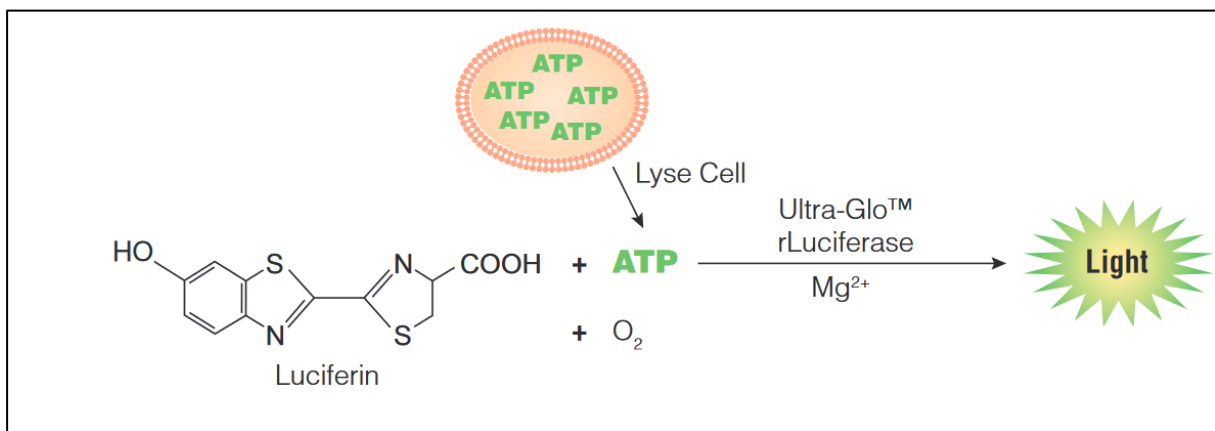
---

Die Kristallviolett färbung (KV Färbung) stellt eine einfache Methode zur Auswertung der Zellmasse dar. Dabei wird KV von den Zellen aufgenommen und bindet an Proteine ebenso wie an die DNA. Avitale Zellen lösen sich jedoch von der Oberfläche der Wells ab. Sie werden inadhärent. Dadurch lassen sich weniger Zellen mit KV anfärben. Somit dient die KV Färbung zur indirekten Quantifizierung der Zellviabilität bzw. des Zelltodes. Je stärker die Farbintensität, desto mehr Zellen sind vital.

Zur Durchführung wurden Zellen auf 6-Well-Platten kultiviert und therapiert, wie in Abschnitt 3.2.5.4 beschrieben. Nach Entfernung des Mediums wurden die Wells jeweils mit 1x PBS gewaschen und anschließend mit KV (0,2 %) gefärbt. Die Färbung wurde für 15 Minuten auf dem Schüttler bei RT inkubiert. Danach wurden das KV verworfen, die Wells dreimal mit 1x PBS gespült und bei RT getrocknet.

### 3.2.9 CELLTITER-GLO 3D – ZELLVIABILITÄTSASSAY

Das Assay ermöglicht die indirekte Bestimmung der Zellviabilität in Sphäroid-Kulturen durch die Quantifizierung von ATP. Dieses Molekül ist ein bedeutender Energielieferant im Zellstoffwechsel und ein Indikator für die metabolische Aktivität vitaler Zellen. Die Quantifizierung des ATP findet indirekt über die Messung eines Lumineszenzsignals statt. Dieses Signal wird durch das Enzym Ultra-Glo-Recombinant Luciferase erzeugt, welches Luciferin in Gegenwart von ATP und Sauerstoff unter Aussendung von Biolumineszenz oxidiert. Das gemessene Lumineszenzsignal ist proportional zum ATP-Gehalt und zur Anzahl vitaler Zellen.



**ABBILDUNG 9:** REAKTION ZUR ERZEUGUNG DES BIOLUMINESZENZSIGNALS [27]

Zur Durchführung des Assays wurde das CellTiter-Glo-3D Reagenz über Nacht bei 4 °C aufgetaut. Nachfolgend wurden sowohl das Reagenz als auch die Kulturplatten für 30 Minuten bei RT äquilibriert. In einem 1:1 Verhältnis wurden Medium und CellTiter-Glo-3D Reagenz vermischt. Um eine Lyse der Sphäroide zu erzeugen, wurde die Platte für 5 Minuten geschüttelt und anschließend bei RT für weitere 25 Minuten inkubiert. Dadurch stabilisierte sich das Lumineszenzsignal, das anschließend am Microplate Luminometer GloMax gemessen werden konnte.

### 3.2.10 INVASIONSANALYSEN

---

#### 3.2.10.1 INVASIONSASSAY IM 2D MODELL

---

Maligne Tumorzellen wachsen infiltrativ in das umliegende Gewebe ein und verdrängen es. Zur Untersuchung dieser Eigenschaft von Tumorzellen *in vitro* wurde ein Invasionsassay verwendet. Hierfür wurden Transwelleinsätze (Porengröße: 8 µm) in die Wells der Zellkulturplatte eingesetzt, welche die Migration von Zellen durch die Membran erlauben. Um die Invasion durch die Extrazellulärmatrix im Gewebe zu simulieren, wurde die Membran zusätzlich mit einer Matrigel-Matrix beschichtet. Diese Matrigel-Matrix ähnelt in ihrer Zusammensetzung der basalmembranständigen Extrazellulärmatrix und bildet bei 37 °C ein Hydrogel aus. Um die Invasionsbewegung der GBM-Zellen zu forcieren, wurden die Zellen in serumfreiem Medium kultiviert und in das untere Well serumhaltiges Medium gegeben [87]. Das Ziel des Versuches war es, zu untersuchen, ob die Testsubstanzen einen Einfluss auf das Invasionsverhalten der GBM-Zellen haben.

Zur Auswertung der Zellviabilität und Proliferation wurde eine WST-1 Färbung durchgeführt. WST-1 ist ein stabiles Tetrazoliumsalz, das vom mitochondrialen Succinat-Tetrazolium-Reduktasesystem zu Formazan gespalten wird. Diese Reaktion kann nur von vitalen, metabolisch aktiven Zellen durchgeführt werden. Formazan ist ein dunkelroter Farbstoff, der spektralphotometrisch gemessen werden kann. Die gemessene Extinktion korreliert direkt mit der Anzahl vitaler Zellen.

Die HROG05 und HROG63 Zellen wurden für 24 h serumfrei im Brutschrank kultiviert. Zur Untersuchung des Invasionsverhaltens wurden die Transwells vor Beginn mit einer Matrigel-Matrix beschichtet (Verhältnis Matrigel-Matrix zu serumfreiem Medium 1:25) und anschließend über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die in serumfreiem Medium kultivierten Zellen geerntet, in technischen Duplikaten mit  $2,5 \times 10^5$  Zellen pro Well in die Einsätze der 24-Well Kulturplatte ausgesät und die Testsubstanzen zugesetzt. Die eingesetzten Konzentrationen sind in Tabelle 9 beschrieben. Zur Kontrolle wurden Zellen in serumfreiem Medium ohne Zusatz von Testsubstanzen mitgeführt. Unter den Einsatz, direkt in das Well, wurde serumhaltiges (10 % FKS) Medium pipettiert. Im Anschluss wurde die Kulturplatte für 72 h im Brutschrank inkubiert. Zur Auswertung wurden die nicht invasiven Zellen aus dem Platteneinsatz abpipettiert und zusätzlich mittels eines Stieltupfers vorsichtig entfernt. In einer separaten 24-Well-Kulturplatte wurden serumfreies Medium und WST-1 (Verhältnis 1:10) vorgelegt und die Einsätze mit den an der Membranunterseite anhaftenden Zellen überführt. Als Kontrolle diente serumfreies Medium mit WST-1 ohne Zellen. Die Messung erfolgte nach einer dreistündigen Inkubationszeit am Tecan Reader in einer 96-Well-Platte in Duplikaten (Extinktion: 480 nm, Referenzwellenlänge: 650 nm).

### **3.2.10.2 SPHÄROID INVASIONSASSAY**

---

Das invadierende Verhalten der GBM-Zellen wurde des Weiteren im 3D-Sphäroid-Modell untersucht. Vergleichbar mit dem 2D-Invasionsassay diente die Matrigel-Matrix auch bei diesem Assay der Simulation des Extrazellulargewebes, in das die malignen Tumorzellen invadieren.

Zur Durchführung des Assays wurden die Tumorzellen, wie in Abschnitt 3.2.5.3 beschrieben, kultiviert. Nach vier Tagen Inkubation wurden die Kulturplatten mit den Sphäroiden auf Eis gestellt. Zur aufgetauten Matrigel-Matrix wurden die Testsubstanzen und der EGF zur Invasionsstimulation gegeben. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgeführt. Die Matrigel-Matrix mit den zugesetzten Substanzen wurde nun im Verhältnis 1:1 zu dem Medium in die Wells pipettiert, so dass die Sphäroide in der Mitte der Wells lokalisiert waren. Zum Festwerden der Matrigel-Matrix wurden die Kulturplatten für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde abermals Matrigel-Matrix in die Wells gegeben. Zur bildlichen Dokumentation des Invasionsverhaltens der Tumorzellen wurden jeweils drei mikroskopische Fotos am Mikroskop Leica DM 4000B nach 0, 5 und 10 Tagen aufgenommen.

### **3.2.11 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSEN**

---

#### **3.2.11.1 APOPTOSE- UND NEKROSE-ASSAY**

---

Zur Differenzierung des Zelltodes, der durch die unterschiedlichen Therapien induziert wird, dient das Apoptose- und Nekrose-Assay, welches die Fluoreszenzfarbstoffe Yo-Pro1 und PI beinhaltet. Yo-Pro1 ist ein grün fluoreszierender Farbstoff, der in apoptotische Zellen aufgenommen wird. PI hingegen fluoresziert rot. Dieser Farbstoff, der unspezifisch die Basen der DNA interkaliert, kann die nicht intakte Membran nekrotischer Zellen durchdringen.

Zur Durchführung des Assays wurden  $5 \times 10^5$  Zellen der GBM-Zelllinien HROG05 und HROG63 in 6-Well-Platten eingesät und nach 24 h mit den Testsubstanzen, wie in Abschnitt 3.2.5.2 beschrieben, für 72 h therapiert. Eine Kontrolle mit DMSO behandelten Zellen wurde ebenfalls mitgeführt. Hierfür wurde das Medium abgenommen und in 15 ml Falcon-Tubes gegeben. Anschließend wurden die Zellen in den Wells einmal mit 1x PBS gewaschen, mit 1x Trypsin/EDTA abgelöst, erneut mit 1x PBS gespült und in die jeweiligen Falcon-Tubes überführt. Die Tubes wurden bei 300xg für 5 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert. Das Pellet wurde mit 1x PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nun wurde das Zellpellet in die Yo-Pro1-Färbelösung aufgenommen (Stock: 1 mM, Verdünnung 1:5.000). Nach einer 20-minütigen Inkubation im Dunklen bei RT wurde die Zellsuspension zentrifugiert. Es erfolgte ein weiterer Waschschrift.

Anschließend wurden die gefärbten Zellen in 1x PBS resuspendiert. Kurz vor der Messung am Durchflusszytometer wurde PI (20 µg/ml) hinzugefügt. Die Messung erfolgte am FACS Calibur Durchflusszytometer, das mit einem blauen (488 nm) und einem roten (633 nm) Laser ausgestattet ist. Yo-Pro1 wurde über den Fluoreszenzkanal FL1 bei einer Extinktion/Emission von 491 nm/509 nm und PI über den Kanal FL3 bei einer Extinktion/Emission von 488 nm/615 nm gemessen. Zur Einstellung wurden pro Zelllinie eine ungefärbte Probe sowie Einzelfärbungen von Yo-Pro1 und PI mitgeführt. Pro Messung wurden 10.000 Events im Live Gate erfasst. Die Auswertung der Daten erfolgte durch das Programm CellQuest.

---

### **3.2.11.2 FÄRBUNG ZUM NACHWEIS DES IMMUNOGENEN ZELLTODES**

---

Beim immunogenen Zelltod werden die apoptotischen Tumorzellen von dendritischen Zellen internalisiert. Diese Zellen des angeborenen Immunsystems fungieren als Antigenpräsentatoren für CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, die wiederum das weitere Tumorstadium kontrollieren. Einen frühen Marker für den immunogenen Zelltod stellt Calretikulin (CalR) dar. Dieses Protein befindet sich gewöhnlich im Lumen des endoplasmatischen Retikulums. Dort unterstützt es u.a. die Proteinfaltung zusammen mit Calnexin. Wird im Zuge einer frühen Apoptose das endoplasmatische Retikulum gestresst, wird CalR an der Zelloberfläche exponiert. Nun wird es von den dendritischen Zellen erkannt, die eine antitumorale Immunreaktion auslösen. Durch die Messung des Gehalts von CalR an der Zellmembran der GBM-Zellen unter Therapie können Rückschlüsse auf die Potenz der Testsubstanzen, eine immunologische Abwehr zu induzieren, gezogen werden [161].

Zur Durchführung der Färbung wurden die GBM-Zellen, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, kultiviert und therapiert. Die Zellen wurden trypsinisiert und die Wells mit 1x PBS gewaschen. Die Zellsuspension wurde bei 300xg für 5 Minuten zentrifugiert und das Zellpellet nochmals mit 1x PBS gespült. Das Pellet wurde nun in der Anti-CalR-Antikörper Lösung (Stock: 1 mg/ml, Verdünnung: 1:50) resuspendiert, mittels Vortex in Suspension gebracht, für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert und erneut zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen für 30 Minuten bei 4 °C mit dem sekundären FITC-konjugierten donkey-anti-rabbit Antikörper (Stock: 1 mg/ml; Verdünnung 1:50) inkubiert. Die Reaktion wurde mit 1x PBS abgestoppt, erneut zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Zellpellet wurde in 1x PBS resuspendiert. Für die Einstellung am FACS Calibur wurden pro Probe ein ungefärbter Ansatz und eine Einzelfärbung mit FITC-konjugiertem Antikörper mitgeführt. In der anschließenden Analyse wurde im FL1-Kanal mit einer Extinktion/Emission von 495 nm/525 nm gemessen.

### 3.2.11.3 PHÄNOTYPISIERUNG

Die Phänotypisierung mittels Durchflusszytometrie ermöglicht eine Charakterisierung spezifischer Marker auf der Zelloberfläche. Es wurde zum einen die Expression von immunregulatorischen Proteinen, wie CD152 (CTLA-4), CD274 (PD-L1), CD279 (PD1) und MHC I, untersucht. Diese Oberflächenmoleküle sind bedeutende Immuncheckpoints, die als Angriffspunkte für verschiedene zielgerichtete onkologische Therapien fungieren. Zusätzlich wurde die Expression des Membranproteins CD133 vor und nach der Behandlung untersucht. Dieses Protein ist ein Marker für mesenchymale und neurogliale Stammzellen.

Zunächst wurden die GBM-Zellen, wie in Abschnitt 3.2.11.1 beschrieben, kultiviert und therapiert. Die Vorbereitung der Zellen auf die Färbung mit den Antikörpern erfolgte wie in den beiden vorherigen Abschnitten beschrieben.

Die resultierenden Zellpellets der einzelnen Zelllinien und Therapieansätze wurden für die Antikörperfärbung auf zwei Falcon-Tubes aufgeteilt. Die Zellen wurden jeweils mit den verschiedenen Antikörpern gefärbt (vgl. Tabelle 10). Die Zellpellets wurden im ersten Ansatz mit den oberen zwei in Tabelle 10 aufgeführten Antikörpern und im zweiten Ansatz mit den unteren drei Antikörpern gefärbt. Hierfür wurde eine Antikörpermischung erstellt. Die jeweiligen monoklonalen Antikörper wurden in einer 1:50 Verdünnung eingesetzt.

**TABELLE 10:** MONOKLONALE ANTIKÖRPER ZUR PHÄNOTYPISIERUNG

Antikörper	Fluorchrom	Fluoreszenzkanal	Extinktion/Emission [nm]
CD152 (CTLA-4)	PE	FL2	566/585
CD274 (PD-L1)	FITC	FL1	495/525
CD133	PE	FL2	566/585
MHC1	FITC	FL1	495/525
CD279 (PD1)	APC	FL4	650/660

Die Zellen wurden in die Antikörpermischung aufgenommen, mittels Vortex in Suspension gebracht und 30 Minuten bei 4 °C lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 1x PBS abgestoppt, die Zellen mit 300xg für 5 Minuten zentrifugiert und pelletiert. Das Zellpellet wurde in 1x PBS resuspendiert. Die Messung erfolgte am FACS Calibur in den in Tabelle 10 aufgeführten Kanälen. Zur Einstellung wurden pro Zelllinie eine ungefärbte Probe sowie Einzelfärbungen mit den monoklonalen Antikörpern mitgeführt. Pro Messung wurden 10.000 Zellen im Live Gate erfasst.

### 3.2.12 IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG ZUM NACHWEIS VON STAMMZELLMARKERN

Um den Einfluss der Testsubstanzen auf die Expression von neuronalen Stammzellmarkern zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt. Es wurden die in Tabelle 11 aufgeführten Proteine mittels der Färbungen dargestellt. Stammzellmarker, wie Oct-4 und Nanog, sind entscheidend für die Pluripotenz und Fähigkeit zur Selbsterneuerung von embryonalen Zellen und sollen auch bei der Entstehung von malignen Tumoren eine Rolle spielen. A2B5 und GFAP sind Marker für neurogiale Stammzellen. A2B5 ist ein zellmembranständiges Gangliosid, das in oligodendrozytären Vorläuferzellen exprimiert wird. GFAP ist ein Intermediärfilament, das insbesondere im Zytoplasma von Astrozyten gefunden wird und in einer Reihe von glialen Tumoren, so auch dem GBM, vorkommt.

Zur Durchführung der Immunfluoreszenz wurden die GBM-Zellen von HROG05 in 8-Well-Kammerobjektträgern mit  $1 \times 10^4$  Zellen pro Well kultiviert. Nach 24 h Inkubation wurden die Zellen mit den zytostatischen Testsubstanzen für 72 h therapiert. Als Kontrolle wurden mit DMSO behandelte Zellen mitgeführt. Im Anschluss wurde das Medium in den Wells verworfen und die Zellen mit 1x PBS gewaschen. Zur Fixierung der Zellen wurde 2 %iges PFA in PBS für 15 Minuten hinzugegeben. Zur Permeabilisierung und Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde 0,5 %iges Triton-X-100 in 2 %igem bovines Serumalbumin (BSA)/PBS verwendet. Die Inkubation erfolgte für 60 Minuten bei RT. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Zellen mit den entsprechenden Antikörperlösungen über Nacht bei 4 °C lichtgeschützt inkubiert. Die Antikörperkonzentrationen sind Tabelle 11 zu entnehmen.

**TABELLE 11:** ANTIKÖRPER FÜR IMMUNFLUORESCENZ

Antikörper/Marker	Fluorchrom	Verdünnung (Stock: 500 µg/ml)
Anti-GFAP	Alexa Fluor 594	1:200
Anti-A2B5	Alexa Fluor 647	1:200
Anti-Nanog	Alexa Fluor 488	1:500
Anti-Oct4	Alexa Fluor 647	1:500
Phalloidin grün	Alexa Fluor 488	1:50 (Stock: 200 U/ml)
DAPI	DAPI 405	1:1000 (Stock: 1 µg/ml)



Am nächsten Tag wurden die Wells dreimal mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurde zum GFAP/A2B5-Ansatz Phalloidin grün (Stock: 200 U/ml, Verdünnung 1:50) in 1x PBS hinzugegeben und für 20 Minuten bei RT lichtgeschützt inkubiert. Phalloidine sind Toxine des Grünen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*) und weisen eine hohe Affinität zu F-Aktin auf. Nach dem Verwerfen des Phalloidins wurden beide Ansätze mit DAPI (Stock: 1 µg/ml, Verdünnung 1:1.000) für zwei Minuten gegengefärbt. Im Anschluss wurden die Kammerobjektträger bis zum Mikroskopieren bei 4 °C im Dunklen aufbewahrt. Die Analyse wurde am Mikroskop Axio Observer 7 durchgeführt. Es wurden pro Behandlung drei Fotos erstellt.

### 3.2.13 SOFTWARE

---

Die ermittelten Daten wurden zunächst in Microsoft Excel eingetragen und Mittelwerte, Standardabweichungen und Standardfehler kalkuliert. Anschließend fand die statistische und grafische Auswertung mittels GraphPad Prism8 (GraphPad Software Inc.) statt. In allen Versuchen wurden mindestens drei unabhängige Experimente (n=3) durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte über eine One-way ANOVA und eine Two-way-ANOVA mit dem Post-hoc Bonferroni Test.

Zur Auswertung der Daten, die mittels des Durchflusszytometers FACS Calibur erhoben wurden, wurden die Programme CellQuest (BD Pharmingen) und FlowJo (FlowJo, LLC) verwendet. Abbildung 7 und Abbildung 8 wurden mit Hilfe der Software von BioRender.com erstellt.

## IV. **ERGEBNISSE**

---

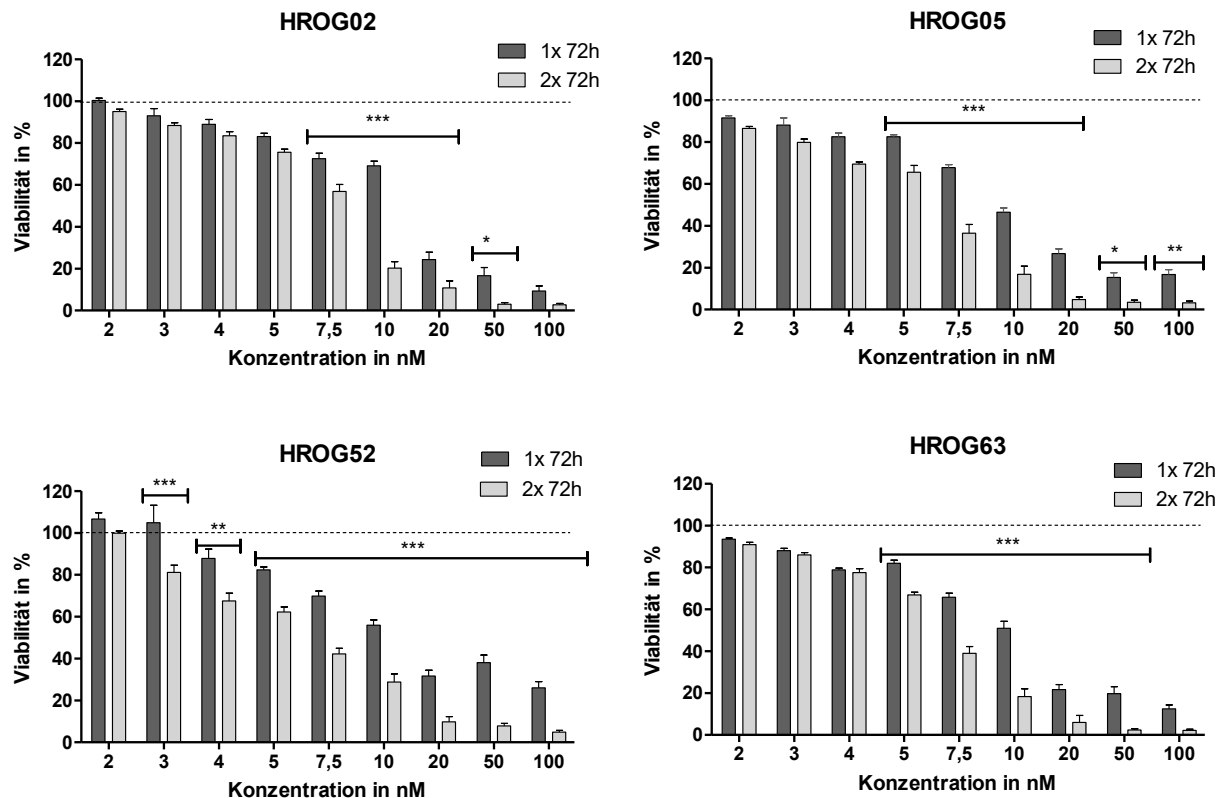
Ziel dieser Arbeit war es, verschiedene Testsubstanzen auf ihre antitumorale Wirksamkeit bei von Patienten abgeleiteten GBM-Zelllinien zu untersuchen. Das Hauptaugenmerk wurde auf die Untersuchung der Effektivität von MitA gelegt. Es wurde die Abhängigkeit der Zellviabilität der GBM-Zellen von der eingesetzten MitA Konzentration ermittelt und untersucht, ob MitA zu einer Strahlensensibilisierung führt. Außerdem wurde die Resistenzentwicklung gegenüber MitA ermittelt, die für den klinischen Einsatz des Therapeutikums eine wichtige Rolle spielt. Des Weiteren wurde untersucht, ob MitA einen synergistischen Effekt in Kombination mit den Testsubstanzen TMZ, Abemaciclib, Dinaciclib sowie SpyADI aufweist. Diese Versuche wurden sowohl im 2D- als auch im 3D-Zellkulturmodell durchgeführt. Ein weiteres Ziel war es, die Wirkung der MitA Therapie und der Kombinationen näher zu erforschen. Hierfür wurden der Zelltod und der Einfluss der Therapie auf das Invasionsverhalten untersucht. Um eine mögliche Sensibilisierung des Immunsystems gegenüber den GBM-Zellen nachzuweisen, wurde eine Phänotypisierung der entsprechenden immunregulatorischen und embryonalen Marker nach Therapie vorgenommen.

### **4.1 KONZENTRATIONSABHÄNGIGER EINFLUSS DER MITA MONOTHERAPIE AUF DIE VIABILITÄT DER GBM-ZELLEN**

---

Der Einfluss von MitA auf die Viabilität der GBM-Zellen wurde nach der im Abschnitt 3.2.5.1 beschriebenen Methode untersucht. Die Auswertung erfolgte mittels des Calcein AM Assays (Abschnitt 3.2.7). Für die nachfolgenden Versuche sollte näherungsweise der IC<sub>20</sub>-Wert ermittelt werden. Er gibt an, bei welcher Konzentration von MitA eine 20 %ige Wachstumshemmung der GBM-Zellen zu verzeichnen ist.

Dabei wurde untersucht, ob die Dauer der Behandlung mit MitA einen Einfluss auf die Zellviabilität hat. Es wurden die Tumorzellen in zwei unterschiedlichen Ansätzen einmal bzw. zweimal für 72 h mit MitA behandelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 dargestellt.



**ABBILDUNG 10:** VERGLEICH 1X 72 H UND 2X 72 H MITA THERAPIE AUF DIE VIABILITÄT DER GBM-ZELLEN

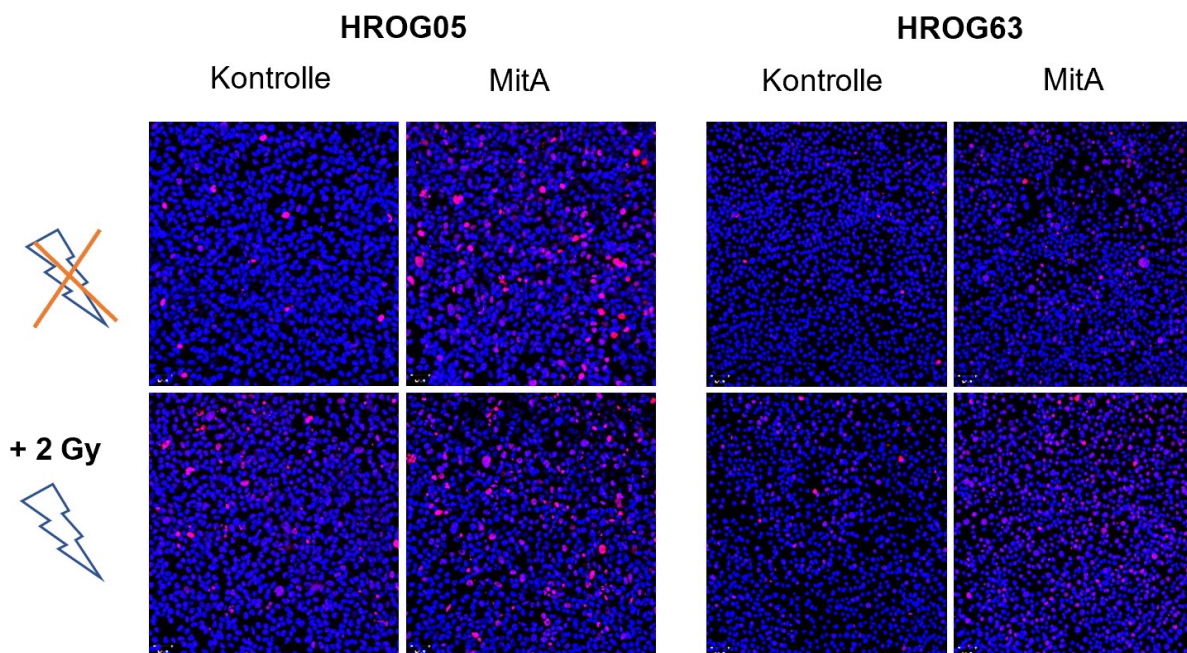
QUANTITATIVE DARSTELLUNG DER MITTELWERTE [%] UND STANDARDFEHLER (VS. KONTROLLE = 100%),  
 TWO-WAY ANOVA, POST-HOC TEST BONFERRONI, N=6 UNABHÄNGIGE VERSUCHE,  
 \* P < 0.05 VS. KONTROLLE, \*\* P < 0.01 VS. KONTROLLE, \*\*\* P < 0.001 VS. KONTROLLE

Im Rahmen der Versuche konnte eine grundlegende dosisabhängige Zytotoxizität von MitA gegenüber den GBM-Zelllinien beobachtet werden. Nach einmaliger und zweimaliger Therapie mit MitA für 72 h bestand ab einer Konzentration von 7,5 nM ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Behandlungsansätzen in der Vitalität aller GBM-Zelllinien. Nach einer zweimaligen Behandlung mit MitA waren signifikant weniger GBM-Zellen im Vergleich zur einmaligen Behandlung vital. Insbesondere bei der GBM-Zelllinie HROG52 wurde der Unterschied zwischen diesen beiden Behandlungsansätzen deutlich. Bereits bei einer Konzentration von 20 nM waren nach zweimal 72 h weniger als 20 % der GBM-Zellen vital. Als IC<sub>20</sub>-Wert wurde eine Konzentration von 4 nM ermittelt. Diese Dosis wurde in allen weiterführenden Versuchen eingesetzt.

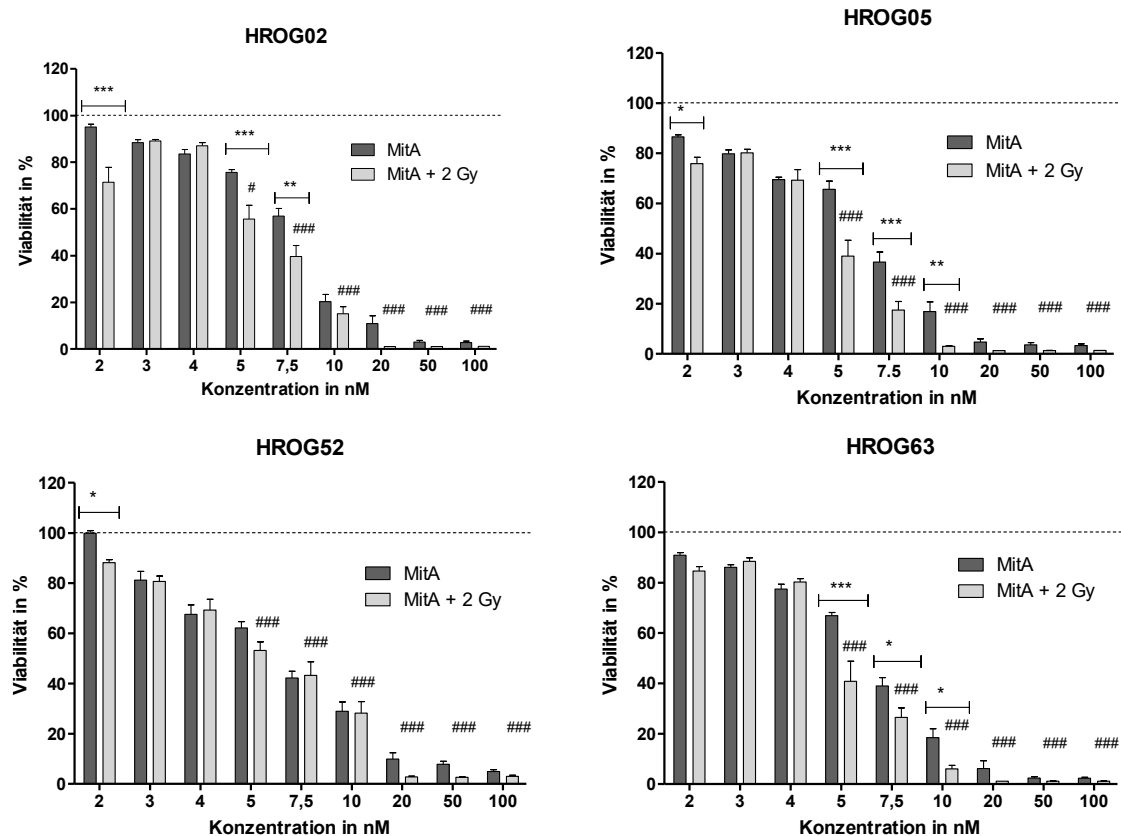
## 4.2 STRAHLENSENSIBILISIERENDE WIRKUNG VON MITA AUF GBM-ZELLEN

Die Bestrahlung erfolgte mit 2 Gy, da diese Dosis im konventionellen Fraktionierungsschema in der Strahlentherapie des GBM eingesetzt wird [139]. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass die verwendeten GBM-Zelllinien für therapeutische Bestrahlungsdosen resistent sind [85]. Es sollte nun untersucht werden, ob MitA zu einer Strahlensensibilisierung in GBM-Zellen führt.

Hierfür wurden die Zellen nach dem Schema aus Abschnitt 3.2.5.6 kultiviert und therapiert. Die Zellen wurden jeweils zweimal mit MitA behandelt und anschließend, wie im Abschnitt 3.2.5.6 beschrieben, bestrahlt. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel. Dieser wurde durchgeführt, um mögliche toxische Radikale, die im Medium nach der Bestrahlung entstanden waren, zu entfernen und somit nur den Effekt der Radiotherapie auf die GBM-Zellen zu untersuchen. Ähnlich findet auch *in vivo* durch die Blutzirkulation ein ständiger Abtransport von Stoffwechselmetaboliten statt. Als Kontrolle wurden Zellen mitgeführt, die nur mit MitA für zweimal 72 h behandelt wurden. Zur Ermittlung der Zellviabilität wurde das Calcein AM Assay verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 dargestellt. Zur Überprüfung des strahlensensibilisierenden Effektes von MitA wurde im Anschluss an die Therapie eine  $\gamma$ -H2AX Färbung durchgeführt (vgl. Abschnitt 3.2.6), um die strahleninduzierten Doppelstrangbrüche sichtbar zu machen. Die mikroskopischen Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbung sind in Abbildung 11 dargestellt.



**ABBILDUNG 11:** ANALYSE DES  $\gamma$ -H2AX GEHALTES MITTELS IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG IN GBMZELLEN,  
 $\gamma$ -H2AX = ROT, ZELLKERNE = BLAU



**ABBILDUNG 12:** KONZENTRATIONSABHÄNGIGER EINFLUSS VON MITA UND EINER BESTRAHLUNG MIT 2 GY AUF DIE VIABILITÄT DER GBM-ZELLEN

QUANTITATIVE DARSTELLUNG DER MITTELWERTE [%] UND STANDARDFEHLER (VS. KONTROLLE = 100 %),  
 DUNKELGRAUER BALKEN: KONTROLLE = UNBEHANDELTE ZELLEN,  
 HELLGRAUER BALKEN: KONTROLLE = MIT 2 GY BESTRAHLTE ZELLEN,  
 TWO-WAY ANOVA, POST-HOC TEST BONFERRONI, N=6 UNABHÄNGIGE VERSUCHE,  
 \* P < 0.05 VS. KONTROLLE, \*\*\* P < 0.001 VS. KONTROLLE;  
 ONE-WAY ANOVA, POST-HOC TEST BONFERRONI, N=6 UNABHÄNGIGE VERSUCHE,  
 ### P < 0.001 VS. KONTROLLE 2 GY OHNE MITA

Ein signifikanter strahlensensibilisierender Effekt konnte bei allen Zelllinien mit Ausnahme der Zelllinie HROG52 beobachtet werden. Insbesondere unter Therapie mit 5 nM und 7,5 nM MitA wurde bei den anderen drei Zelllinien eine signifikante Strahlensensibilisierung deutlich. Bei den niedrigeren und höheren MitA Konzentrationen waren die Effekte auf das Zellwachstum weniger stark ausgeprägt. Am stärksten war die radiosensibilisierende Wirkung bei der Zelllinie HROG05 (5 nM MitA) mit einer Reduktion der Zellviabilität um 29 % im Vergleich zu den nicht bestrahlten Zellen. Auch die Zelllinie HROG63 wies bei einer Therapie mit 5 nM MitA unter Bestrahlung 27 % weniger vitale Zellen als die unbestrahlten Kontrollzellen auf.

Die Sensibilisierung gegenüber Bestrahlung durch MitA konnte mithilfe der  $\gamma$ -H2AX Färbung bestätigt werden. Unter Therapie mit 4 nM MitA wurden im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in den Zellen beider GBM-Linien signifikant mehr Doppelstrangbrüche induziert (Abbildung 11). In Kombination mit einer 2 Gy Bestrahlung fiel der zytotoxische Effekt noch stärker aus. Dies wird insbesondere bei HROG63 deutlich.

Es lässt sich somit zusammenfassen, dass MitA auf GBM-Zellen strahlensensibilisierend wirkt.

#### 4.3 SYNERGISTISCHE EFFEKTE DER KOMBINATIONSTHERAPIEN IM 2D- UND 3D-MODELL

Im Abschnitt 4.1 konnte gezeigt werden, dass MitA zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Zellviabilität führt. Es sollte nachfolgend der Einfluss der Kombinationstherapien mit verschiedenen Testsubstanzen, wie in Abschnitt 3.2.5.2 beschrieben, auf die Inhibierung des Tumorzellproliferation untersucht werden, mit dem Ziel, mögliche synergistische Effekte aufzudecken.

Hierfür wurde MitA zum einen mit dem derzeitigen Standardchemotherapeutikum TMZ kombiniert. Zum anderen wurde MitA mit den CDKIs Abemaciclib und Dinaciclib kombiniert.

Die Kombinationstherapie der vier GBM-Tumorzelllinien von MitA mit TMZ, Abemaciclib und Dinaciclib erfolgte wie in Abschnitt 3.2.5.2 beschrieben. Die eingesetzten Konzentrationen sind in Tabelle 9 aufgeführt und liegen zwischen 10 nM und 10  $\mu$ M. Die verwendeten Dosen liegen alle unter dem IC<sub>50</sub>-Wert und wurden in vorab erstellten Konzentrationsreihen ermittelt.

Des Weiteren wurde MitA mit SpyADI kombiniert. Dabei wurde eine sequentielle sowie eine simultane Therapie vorgenommen (siehe Abschnitt 3.2.5.2). Es wurde einmal mit SpyADI vorbehandelt und anschließend mit MitA therapiert (SpyADI  $\rightarrow$  MitA) und umgekehrt (MitA  $\rightarrow$  SpyADI). Die beiden Ansätze wurden hinsichtlich der Reduktion der Zellviabilität mit einer simultanen Gabe beider zytostatischer Testsubstanzen verglichen. Dies geschah unter der Annahme, dass eine Depletion des Arginins in den Tumorzellen zu einer vermehrten Stressreaktion führt. Wie in Tabelle 9 aufgeführt, wurde mit einer SpyADI-Aktivität von 35 mU/ml gearbeitet, da sich in früheren Studien diese Aktivität als geeignet für Kombinationstherapien erwies [32].

Neben dem 2D-Modell wurden die Kombinationstherapien auch an 3D-Sphäroiden getestet. Durch die Bildung von Sphäroiden aus GBM-Tumorzellen, wie in Abschnitt 3.2.5.3 erläutert, können gewebeähnliche 3D-Strukturen hergestellt werden, die den Verhältnissen im Tumor *in vivo* gleichen. Durch die komplexe Architektur der Sphäroide kann die Heterogenität des Tumors *in vitro* nachempfunden werden. Die Reduktion der Zellviabilität wurde im 2D-Modell mittels des Calcein AM Assays (siehe Abschnitt 3.2.7) und im 3D-Modell mittels des CellTiter-Glo 3D-Zellviabilitätsassays (siehe Abschnitt 3.2.9) bestimmt.

#### 4.3.1 EFFEKT DER KOMBINATIONSTHERAPIE VON MITA UND CDKIS AUF DIE ZELLVIABILITÄT IM 2D MODELL

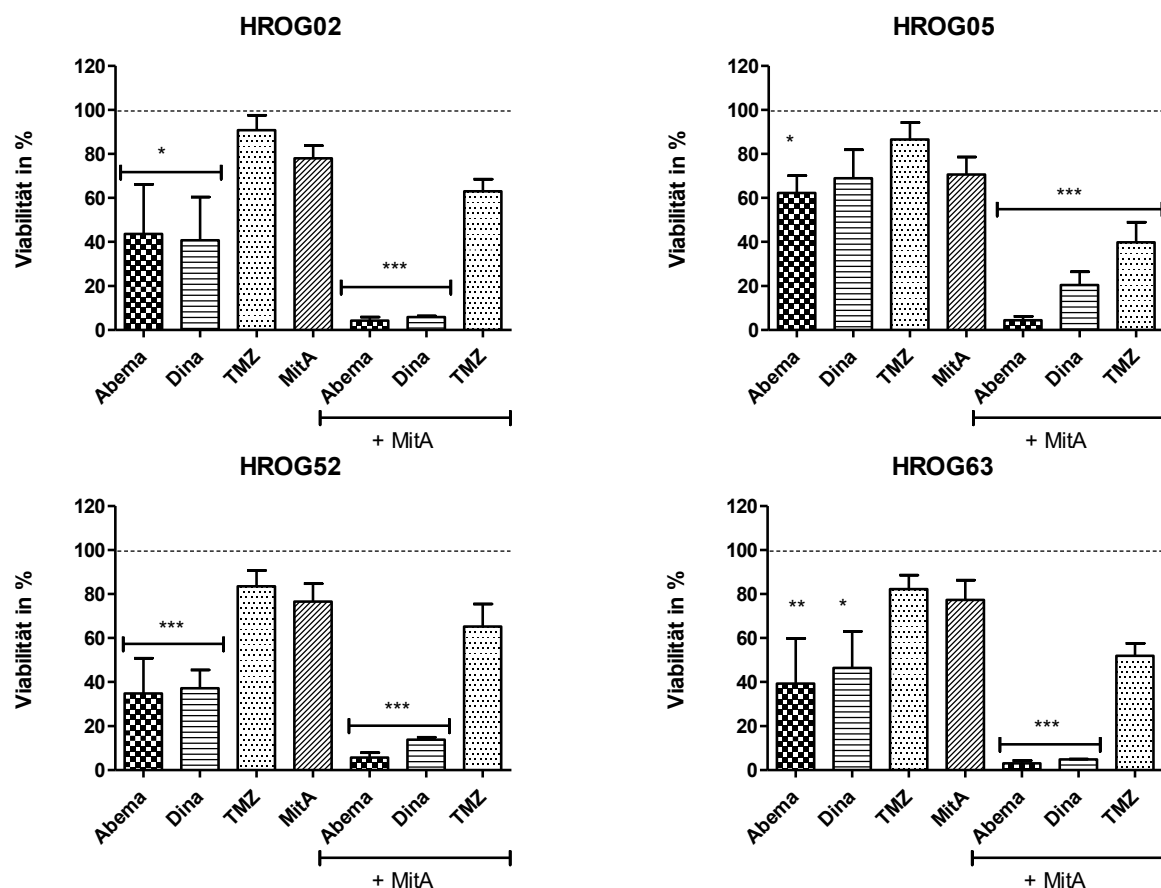
---

Die Monotherapie mit Abemaciclib führte bei allen vier GBM-Zelllinien zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dieser Effekt war am ausgeprägtesten bei HROG52 mit einer Reduktion der vitalen Tumorzellen um 65 % im Vergleich zur Kontrolle. Am wenigsten sensibel gegenüber Abemaciclib war HROG05 mit einer Abnahme der Zellviabilität um 38 % (siehe Abbildung 13). In Kombination mit MitA konnte der antitumorale Effekt von Abemaciclib bei allen GBM-Zelllinien noch signifikant verstärkt werden. Im Gegensatz zur Monotherapie mit Abemaciclib wurde durch die Kombinationstherapie eine 96 %ige Abnahme der vitalen Zellen im Vergleich zur Kontrolle bei allen Zelllinien beobachtet. Entsprechend der ermittelten Werte für den CI (siehe Tabelle 12) wies die Kombination aus MitA mit Abemaciclib somit bei allen GBM-Zelllinien einen ausgeprägten synergistischen Effekt auf.

Ähnlich der Monotherapie mit Abemaciclib führt auch eine Dinaciclib Monotherapie bei allen GBM-Zelllinien, außer bei HROG05, zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität (vs. Kontrolle). Vergleichend mit Abemaciclib war der Effekt auf die Reduktion der vitalen Tumorzellmasse am stärksten bei HROG52 mit einer Reduktion um 63 % und am schwächsten bei HROG05 mit 31 % in Relation zur Kontrolle (siehe Abbildung 13).

Die Kombination mit MitA bewirkte ebenfalls eine stärkere Abnahme der Zellviabilität im Vergleich zur Monotherapie. Dabei war der Effekt aber etwas schwächer als bei der Kombinationstherapie mit Abemaciclib, insbesondere bei HROG05. Bei dieser GBM-Zelllinie wurde durch die Kombinationstherapie mit Dinaciclib eine 80 %ige Zellviabilitätsreduktion erzielt. Bei HROG02 und HROG63 führte die Therapie ebenfalls zu einer 96 %igen Abnahme der vitalen Tumorzellen. Die Kombination aus MitA mit Dinaciclib wirkte bei allen GBM-Zelllinien synergistisch (siehe Tabelle 12).

Die Monotherapie mit TMZ erzielte bei keiner Zelllinie eine signifikante Abnahme der Tumorzellmasse. Das Ausmaß der Reduktion viabler GBM-Zellen lag zwischen 9 % bei HROG02 und 18 % bei HROG63 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. In Kombination mit MitA konnte der Effekt von TMZ tendenziell um durchschnittlich 30 % verstärkt werden. Bei HROG05 konnte eine signifikante Abnahme der vitalen Tumorzellen (vs. Kontrolle) beobachtet werden (siehe Abbildung 13). Entsprechend der ermittelten CI-Werte wies die Kombination aus MitA und TMZ bei allen GBM-Zelllinien außer HROG52 einen synergistischen Effekt auf. Bei HROG52 wirkten beide Substanzen additiv (siehe Tabelle 12).



**ABBILDUNG 13:** EINFLUSS EINER SIMULTANEN KOMBINATIONSTHERAPIE DER VERSCHIEDENEN ZYTOSTATISCHEN TESTSUBSTANZEN MIT MITA AUF DIE VIABILITÄT DER GBM-ZELLEN IM 2D-MODELL ÜBER 2X 72 STUNDEN

QUANTITATIVE DARSTELLUNG DER MITTELWERTE [%] UND STANDARDFEHLER (VS. KONTROLLE = 100%),

ONE-WAY ANOVA, POST-HOC TEST BONFERRONI, N=4 UNABHÄNGIGE VERSUCHE,

\* P < 0.05 VS. KONTROLLE, \*\* P < 0.01 VS. KONTROLLE, \*\*\* P < 0.001 VS. KONTROLLE

**TABELLE 12:** ERMITTLUNG DES KOMBINATIONSINDEX (CI) FÜR DIE KOMBINATIONSTHERAPIEN IM 2D-MODELL.

FARBSKALA:

Synergistisch			Additiv
---------------	--	--	---------

Kombinationsansatz	HROG02	HROG05	HROG52	HROG63
MitA + Abemaciclib	0,68	0,63	0,78	0,71
MitA + Dinaciclib	0,72	0,71	0,83	0,68
MitA + TMZ	0,78	0,9	1	0,77

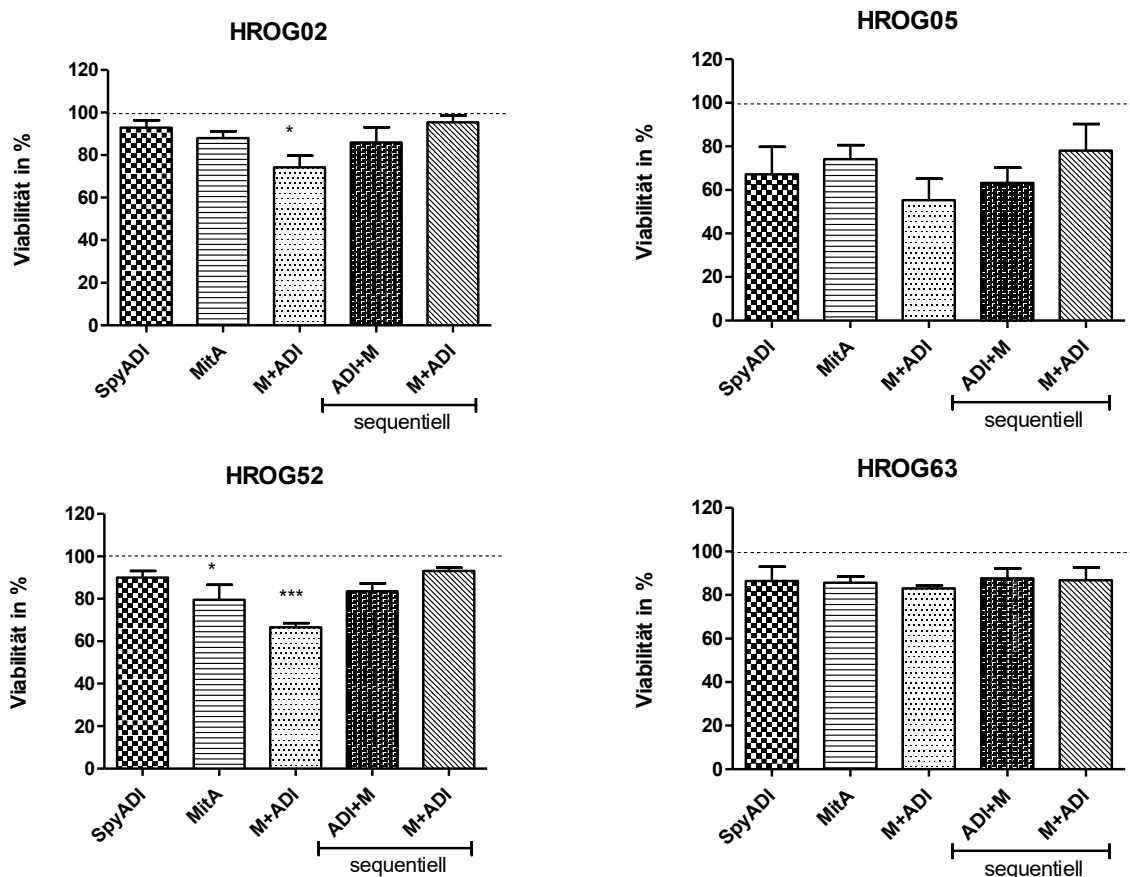


#### **4.3.2 AUSWERTUNG DES EFFEKTES DER KOMBINATIONSTHERAPIE VON MITA MIT SPYADI IM 2D-MODELL AUF DIE ZELLVIABILITÄT**

---

Die sequentiellen Kombinationstherapien, bestehend aus einer 72-stündigen SpyADI oder MitA Vorbehandlung und einer anschließenden Therapie mit der jeweils anderen Testsubstanz, verstärkten den antitumoralen Effekt im Vergleich zu den Monotherapien nicht (siehe Abbildung 14). Entsprechend der eingesetzten  $IC_{20}$  – Dosis führte die Monotherapie mit MitA zu einer durchschnittlich 20 %igen Zellviabilitätsreduktion. Die Monotherapie mit SpyADI erzielte ähnliche Ergebnisse, wobei der antitumorale Effekt noch geringer ausgeprägt war, als bei der MitA Monotherapie. Lediglich die simultane Gabe von MitA und SpyADI führte bei den Zelllinien HROG02 und HROG52 zu einer signifikanten Abnahme vitaler Tumorzellen um 30 % im Vergleich zur Kontrolle. Bei HROG05 konnte eine Reduktion der Zellviabilität um 45 % (vs. Kontrolle) erzielt werden. HROG63 wies am wenigsten Unterschiede in der Anzahl vitaler Tumorzellen zwischen den verschiedenen Therapieschemata auf.

Entsprechend der ermittelten CI-Werte lässt sich zusammenfassen, dass lediglich eine simultane Gabe beider Substanzen einen synergistischen Effekt bei den Zelllinien HROG02 und HROG52 aufweist. Durch die sequentielle Kombination bestehend aus MitA und SpyADI konnte keine Wirkverstärkung erzielt werden (siehe Tabelle 13).



**ABBILDUNG 14:** EINFLUSS EINER SIMULTANEN UND SEQUENTIELLEN KOMBINATIONSTHERAPIE VON MITA MIT SPYADI AUF DIE VIABILITÄT DER GBM-ZELLEN IM 2D-MODELL ÜBER 2X 72H

QUANTITATIVE DARSTELLUNG MITTELWERTE IN [%] UND STANDARDFEHLER

(VS. KONTROLLE = 100),

ONE-WAY ANOVA, POST-HOC TEST BONFERRONI, N=3 UNABHÄNGIGE VERSUCHE,

\* P < 0.05 VS. KONTROLLE, \*\*\* P < 0.001 VS. KONTROLLE

**TABELLE 13:** ERMITTLUNG DES KOMBINATIONSINDEX (CI) FÜR DIE KOMBINATIONSTHERAPIE VON MITA MIT SPYADI IM 2D-MODELL

FARBSKALA:



Behandlungsansatz	HROG02	HROG05	HROG52	HROG63
Simultan MitA + SpyADI	0,7	1,12	0,85	1,65
Sequentiell SpyADI + MitA	1,3	1,33	2,15	2,33
Sequentiell MitA + SpyADI	3,63	2,29	2,55	2,15

### 4.3.3 EFFEKT DER KOMBINATIONSTHERAPIEN VON MITA, CDKIS UND ADI AUF DIE ZELLVIABILITÄT IM 3D-MODELL

---

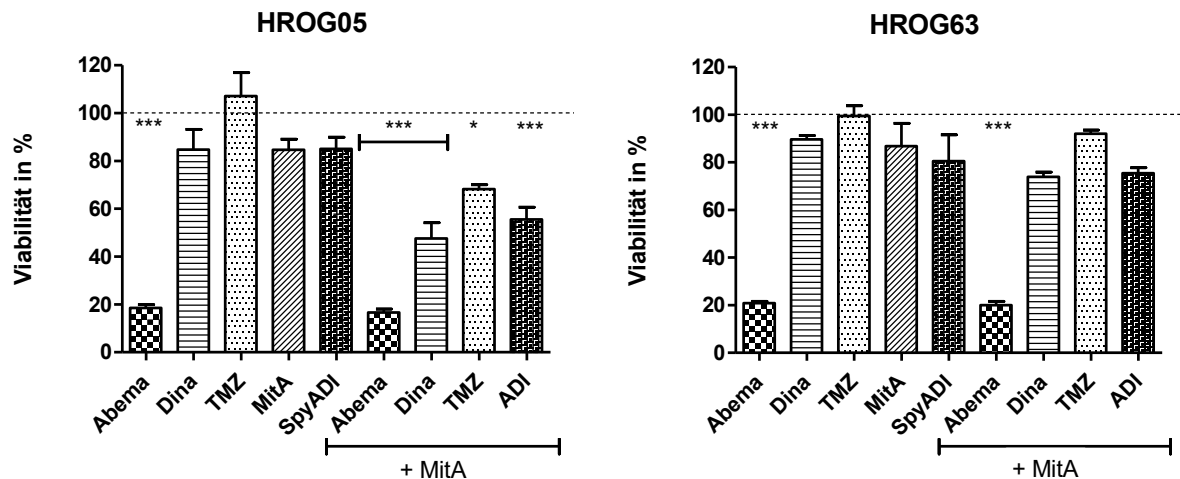
Die weiterführenden Untersuchungen im 3D-Sphäroid-Modell wurden an den Zelllinien HROG05 und HROG63 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 und Tabelle 14 dargestellt. Hierbei konnte zunächst die antitumorale Wirksamkeit von MitA bestätigt werden. Demgegenüber war die zytostatische Wirkung von Abemaciclib noch stärker als im 2D-Modell. Sowohl HROG05 als auch HROG63 wiesen eine Reduktion der Zellviabilität um 80 % im Vergleich zur Kontrolle auf. Die Kombination aus MitA mit Abemaciclib zeigte im 3D-Modell eine additive Wirkung.

Die Dinaciclib Monotherapie führte zu einer Abnahme der vitalen Tumorzellen um 10 - 15 % in Relation zur Kontrolle. Dieser Effekt auf die Zellviabilität war deutlich geringer als im 2D-Modell (vgl. Abbildung 13). In Kombination mit MitA konnte eine Reduktion der lebenden Tumorzellmasse um 52 % bei HROG05 und um 26 % bei HROG63 erzielt werden. Vergleichend zum 2D-Modell war auch hier der Effekt in Relation zur Kontrolle im 3D-Modell weniger stark ausgeprägt. Dennoch wirkte die Kombination aus MitA mit Dinaciclib synergistisch, genau wie im 2D-Modell (vgl. Tabelle 12).

Das Standardchemotherapeutikum TMZ hatte im 3D-Modell keinen Einfluss auf die Viabilität. TMZ wies als Therapeutikum im 3D-Modell eine noch geringere Wirksamkeit auf als im 2D-Modell. In Kombination mit MitA wurde eine Abnahme der Zellviabilität bei HROG05 um 39 % und bei HROG63 um 8 % in Relation zur Kontrolle erzielt. Dies deutet auf eine synergistische Wirkung der beiden Substanzen hin, die durch Bestimmung des CI-Wertes bestätigt werden konnte.

Die Therapie mit SpyADI hatte eine ähnliche antitumorale Wirksamkeit wie die Monotherapie mit MitA und entsprach der Wirksamkeit der SpyADI im 2D-Modell (vgl. Abbildung 14). Durch die Monotherapie mit SpyADI reduzierte sich die Zellviabilität um 15 - 19 % im Vergleich zur Kontrolle. Die simultane Kombinationstherapie von MitA mit SpyADI führte, wie im 2D-Modell, zu einer signifikanten Reduktion der Tumorzellmasse. Es konnte eine Abnahme von 54 % der vitalen HROG05 Zellen beobachtet werden. Der antitumorale Effekt der Kombinationstherapie war somit größer als im 2D-Modell und wirkte sowohl bei HROG05 als auch bei HROG63 synergistisch.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass MitA mit den meisten der hier getesteten Substanzen im 2D- sowie im 3D-Modell synergistisch wirkt, wobei der antitumorale Effekt der Kombination mit Abemaciclib am stärksten war. Die Kombination von MitA mit TMZ beziehungsweise SpyADI scheint am wenigsten Wirkung auf die Zellviabilität zu haben. Keine der Zelllinien war sensitiv gegenüber TMZ.



**ABBILDUNG 15:** EINFLUSS DER SIMULTANEN KOMBINATIONSTHERAPIE DER VERSCHIEDENEN ZYTOSTATISCHEN TESTSUBSTANZEN MIT MITA AUF DIE VIABILITÄT DER GBM-ZELLEN IM 3D-MODELL ÜBER 2X 72 STUNDEN

QUANTITATIVE DARSTELLUNG MITTELWERTE IN [%] UND STANDARDFEHLER

(vs. KONTROLLE = 100%),

ONE-WAY ANOVA, POST-HOC TEST BONFERRONI, N=3 UNABHÄNGIGE VERSUCHE,

\* P < 0.05 vs. KONTROLLE, \*\*\* P < 0.001 vs. KONTROLLE

**TABELLE 14:** ERMITTLUNG DES KOMBINATIONSINDEX (CI) FÜR DIE KOMBINATIONSTHERAPIEN IM 3D-MODELL

FARBSKALA:



Behandlungsansätze	HROG05	HROG63
MitA + Abemaciclib	1	1
MitA + Dinaciclib	0,5	0,6
MitA + TMZ	0,3	0,7
MitA + SpyADI	0,6	0,9

## **4.4 TESTUNG AUF RESISTENZENTWICKLUNG UNTER THERAPIE**

---

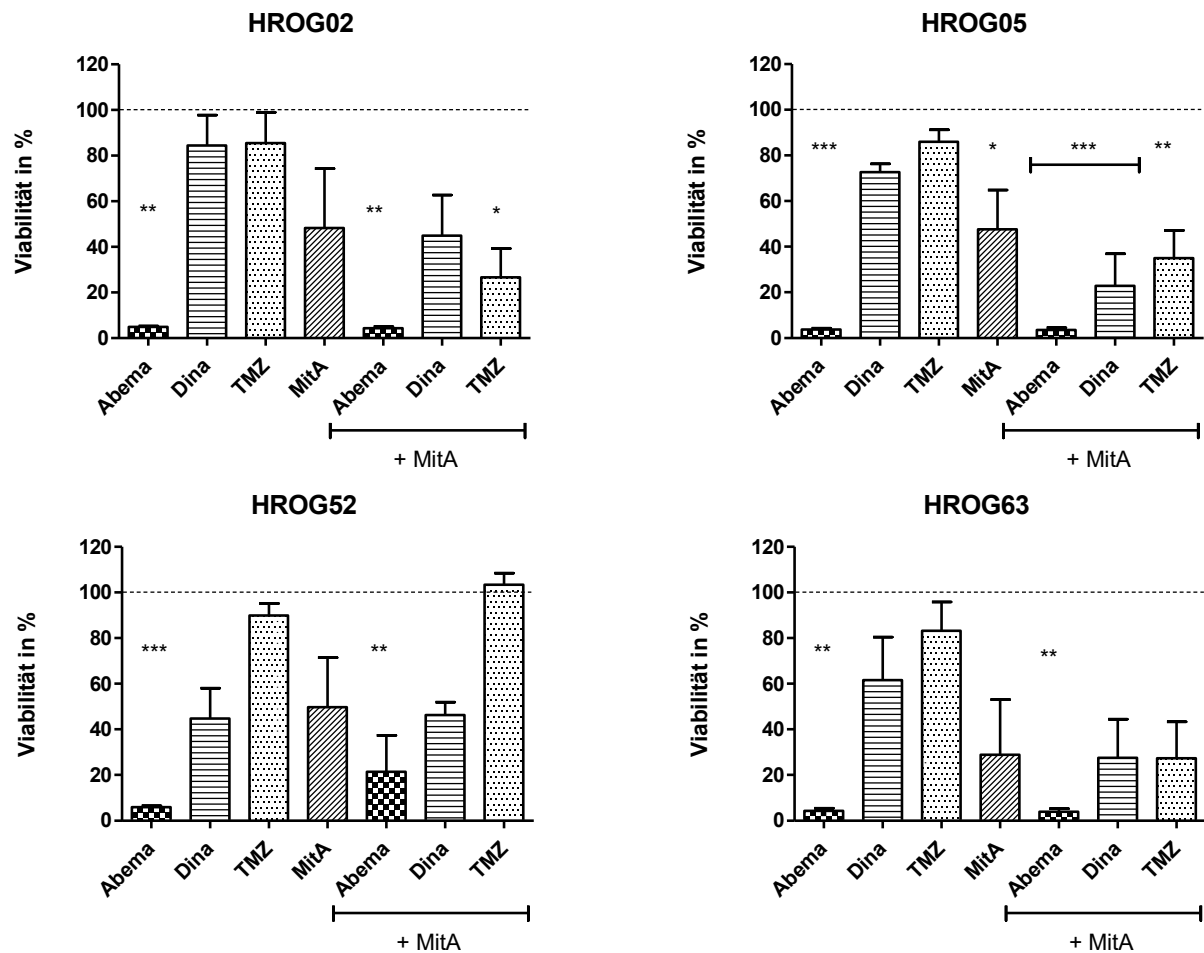
### **4.4.1 EFFEKT EINER LANGZEITKOMBINATIONSTHERAPIE AUF DIE VIABILITÄT DER GBM-ZELLEN**

---

Um zu untersuchen, ob die in Kapitel 4.3 beobachteten Effekte der Kombinationstherapien mit MitA auch bei einer Therapie über einen längeren Zeitraum Bestand haben oder ob sich frühzeitig Resistenzen gegenüber den zytostatischen Testsubstanzen entwickeln, wurde eine Langzeittherapie über 10 Therapiezyklen entsprechend der in Abschnitt 3.2.5.4 beschriebenen Methode durchgeführt. Für die klinische Anwendung ist die Untersuchung möglicher Resistenzen der GBM-Zellen gegenüber den Therapeutika von großer Bedeutung. Die Zellviabilität wurde mittels des Calcein AM Assays (siehe Abschnitt 3.2.7) ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 aufgeführt.

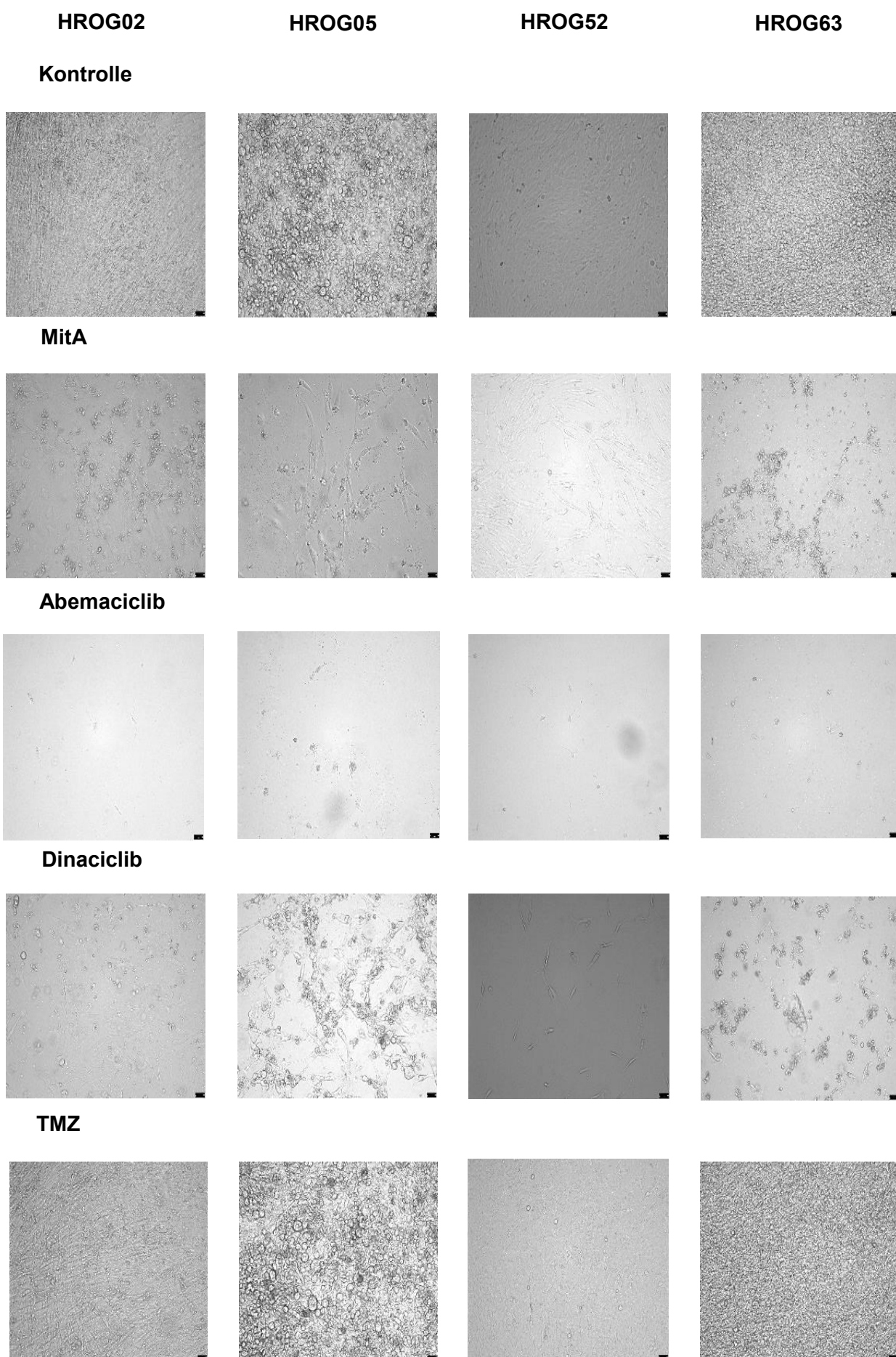
Des Weiteren wurden lichtmikroskopische Aufnahmen zur visuellen Dokumentation der morphologischen Veränderungen der Tumorzellen unter Therapie gemacht. Diese sind in Abbildung 17 dargestellt.

Über eine KV Färbung (siehe Abschnitt 3.2.8) wurde eine bildliche Quantifizierung der Biomassereduktion, die in Abbildung 18 dargestellt ist, vorgenommen.

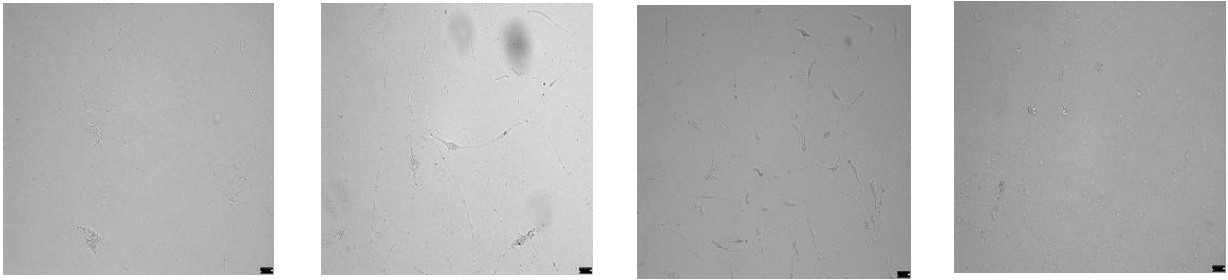


**ABBILDUNG 16:** EINFLUSS EINER SIMULTANEN LANGZEITKOMBINATIONSTHERAPIE DER VERSCHIEDENEN ZYTOSTATISCHEN TESTSUBSTANZEN MIT MITA AUF DIE VIABILITÄT DER GBM-ZELLEN ÜBER 10 THERAPIEZYKLEN

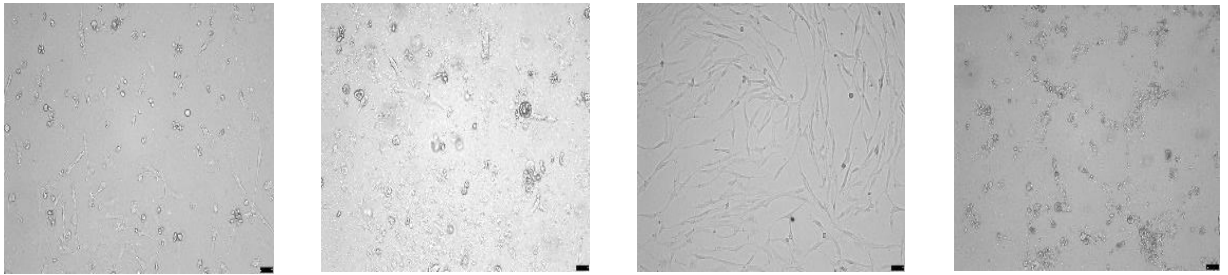
QUANTITATIVE DARSTELLUNG MITTELWERTE [%] UND STANDARDFEHLER  
(VS. KONTROLLE = 100%),  
ONE-WAY ANOVA, POST-HOC TEST BONFERRONI, N=3 UNABHÄNGIGE VERSUCHE,  
\* P < 0.05 VS. KONTROLLE, \*\* P < 0.01 VS. KONTROLLE, \*\*\* P < 0.001 VS. KONTROLLE



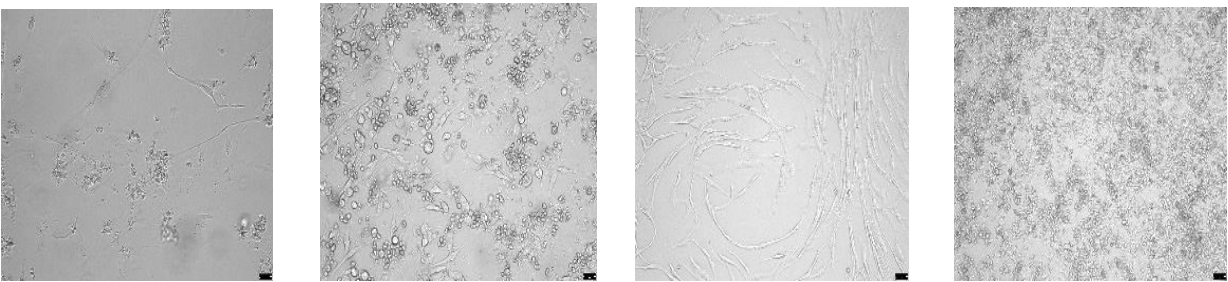
**MitA + Abemaciclib**



**MitA + Dinaciclib**

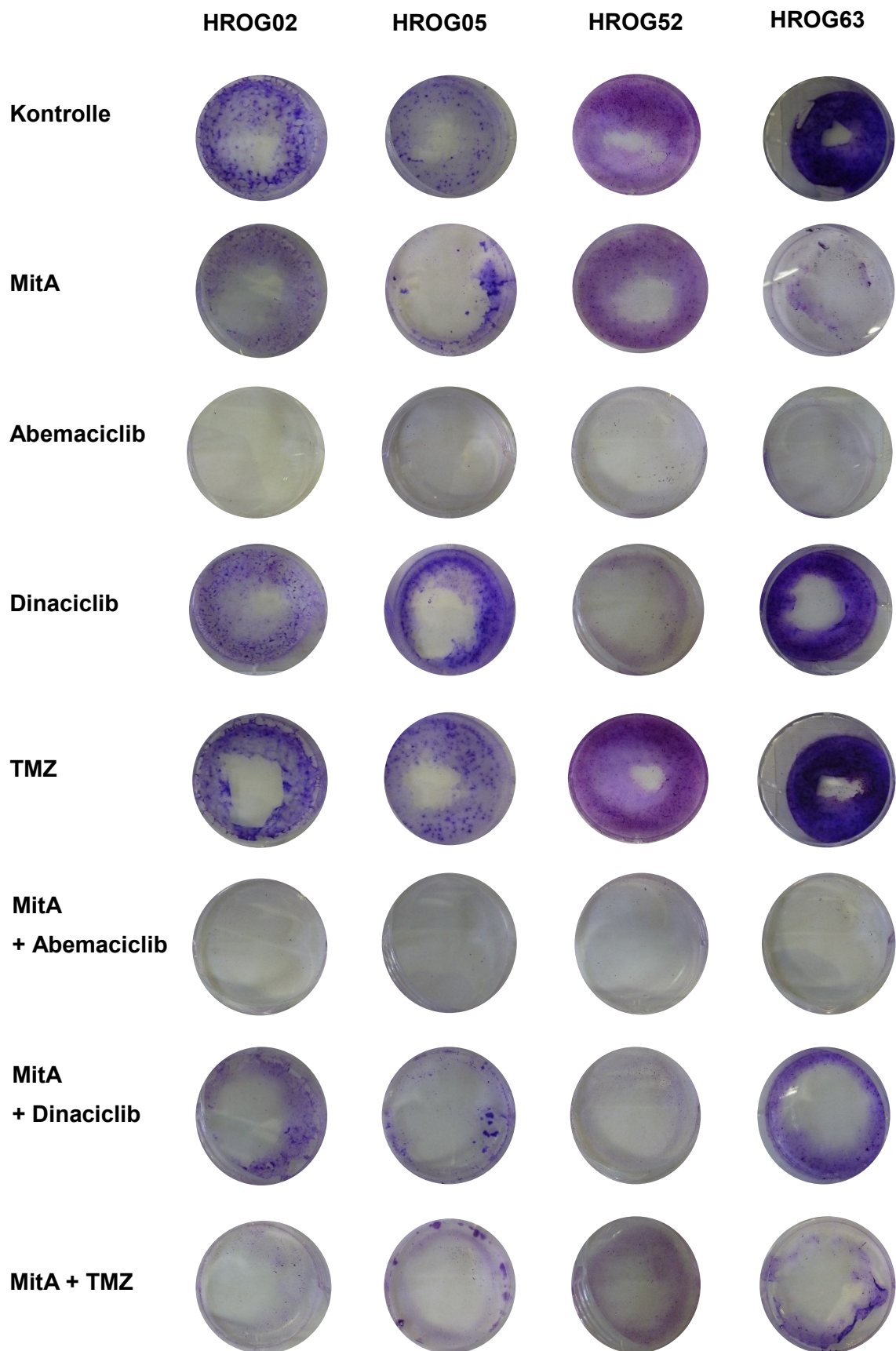


**MitA + TMZ**



**ABBILDUNG 17:** LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN DER VIER GBM-ZELLINIEN NACH 10 ZYKLEN SIMULTANER KOMBINATIONSTHERAPIE. AUFGENOMMEN MIT DEM MIKROSKOP LEICA DM 4000B





**ABBILDUNG 18:** REPRÄSENTATIVE DARSTELLUNG DER BIOMASSE DER VIER GBM-ZELLINIEN MITTELS KV NACH 10 ZYKLEN SIMULTANER KOMBINATIONSTHERAPIE

Unter Langzeittherapie über 10 Zyklen führte eine Monotherapie mit MitA zu einer durchschnittlich 50 %igen Reduktion der Viabilität (Calcein AM) und Biomasse (KV). Bei HROG63 waren nach der Therapie 30 % der Tumorzellen vital. Morphologisch wiesen die GBM-Zellen unter Therapie mit MitA Zeichen einer Zellschädigung auf. Es konnte eine Zellschrumpfung sowie eine Fragmentierung der Zellen beobachtet werden.

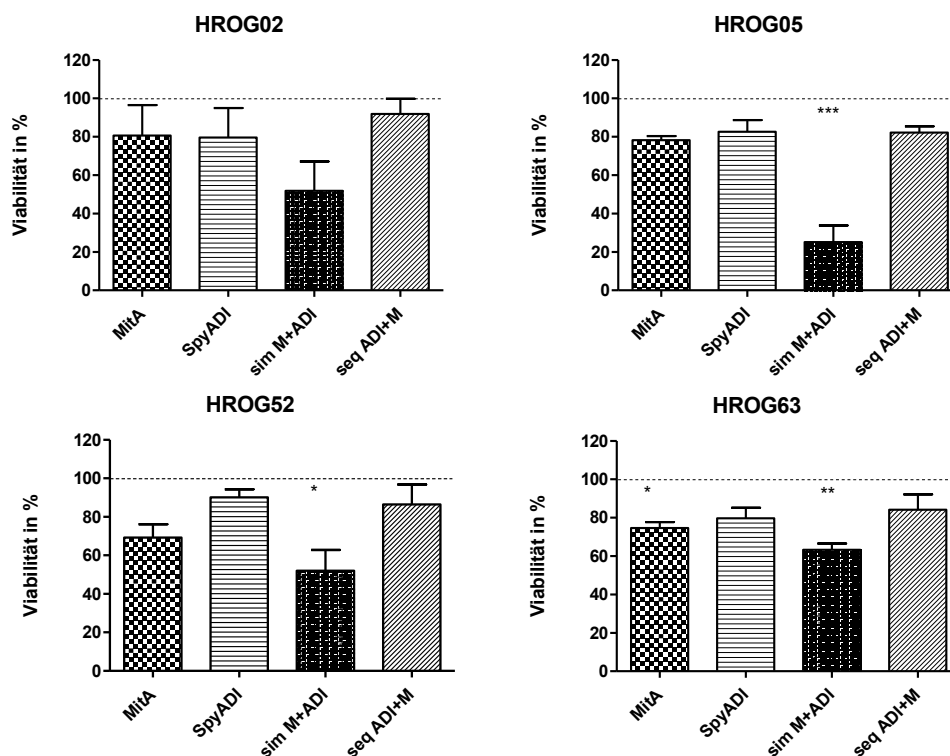
Vergleichend mit den Kombinationsversuchen über zweimal 72 h (vgl. Abschnitt 4.3.1) führte eine Therapie mit Abemaciclib nach 10 Therapiezyklen zu keiner Resistenzentwicklung. Bei allen GBM-Zelllinien waren nach Ablauf der Therapie weniger als 5 % der Tumorzellen vital. In den lichtmikroskopischen Aufnahmen waren nur noch vereinzelt Zellen im Sichtfeld abgebildet, die im Gegensatz zur Kontrolle morphologisch verändert waren. Sie waren zusammengeschrumpft und wiesen pyknotische Zellkerne auf. In den mit KV angefärbten Wells waren im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nahezu gar keine adhärenenten Tumorzellen mehr vorhanden. Ähnlich verhielt es sich mit der Kombination aus Abemaciclib und MitA. Alle Zelllinien, außer HROG52, wiesen eine signifikante Reduktion der Zellviabilität um mehr als 95 % im Vergleich zur Kontrolle auf.

Die GBM-Zelllinien sprachen im Vergleich zu Abemaciclib weniger gut auf eine Therapie mit Dinaciclib an. Die starken antitumoralen Effekte der zweimal 72 h Dinaciclib Behandlung im 2D-Modell (vgl. Abschnitt 4.3.1) konnten im Langzeitansatz nicht bestätigt werden. Hier führte Dinaciclib zu einer maximalen Reduktion der Zellviabilität um 65 % bei HROG52. Am wenigsten sprach HROG02 mit einer Abnahme der vitalen Tumorzellmasse um 15 % an. Entsprechend nahm auch die Biomasse nur marginal ab. Die Kombination mit MitA war der Monotherapie deutlich überlegen. Durch die Kombinationstherapie konnte eine durchschnittlich um 28 % höhere Reduktion der Zellviabilität im Vergleich zur Dinaciclib Monotherapie erzielt werden. Morphologisch führte sowohl die Kombinationstherapie als auch die Monotherapie mit Dinaciclib zu einer Schrumpfung der Tumorzellen. Sie bildeten vermehrt kleine Vakuolen aus.

Vergleichend mit den Ergebnissen aus dem Kapitel 4.3.1 hatte die Therapie mit TMZ im Langzeitansatz kaum zytostatische Wirkung auf die GBM-Zelllinien. Die Zellviabilitätsreduktion lag lediglich zwischen 10 - 17 % nach 10 Therapiezyklen. Die GBM-Zellen zeigten keine morphologischen Veränderungen. Die Kombination mit MitA zeigte hingegen eine höhere antitumorale Effektivität. Bei allen GBM-Zelllinien, außer bei HROG52, die weitestgehend resistent gegen die Therapie war, wurde eine 70 - 80 %ige Reduktion der Zellviabilität beobachtet. Auch morphologisch waren bei den Zellen vermehrt Veränderungen erkennbar, die auf eine Zellschädigung hinwiesen. Im Langzeitansatz schien die Kombinationstherapie mit TMZ ähnlich effektiv zu sein, wie eine Kombination mit Dinaciclib. Dies konnte in den Kurzzeitbehandlungen über zweimal 72 h nicht beobachtet werden (vgl. Abschnitt 4.3.1).

#### 4.4.2 EFFEKT EINER SIMULTANEN UND SEQUENTIELLEN LANGZEITTHERAPIE MIT MITA UND SPYADI

Um zu untersuchen, wie sich eine Langzeittherapie der Kombination von MitA und SpyADI auf die Viabilität der GBM-Zellen auswirkt, wurden die Tumorzellen über 10 Zyklen simultan und sequentiell mit den beiden Substanzen, wie in Kapitel 3.2.5.4 beschrieben, behandelt. Die sequentielle Therapie erfolgte mit einer fünf Zyklen langen Vorbehandlung mit SpyADI, der sich eine Behandlung mit MitA über fünf Zyklen anschloss. Die Kurzzeittherapie über zweimal 72 h, wie bereits in Kapitel 4.3.2 erläutert, führte nur im simultanen Ansatz zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität. Es sollte nun untersucht werden, ob sich diese Ergebnisse auch im Langzeitansatz entsprechend bestätigen ließen. Die Auswertung der Therapie erfolgte mittels des Calcein AM Assays und eine visuelle Quantifizierung wurde durch eine KV Färbung (vgl. Abschnitt 3.2.8) vorgenommen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 dargestellt.



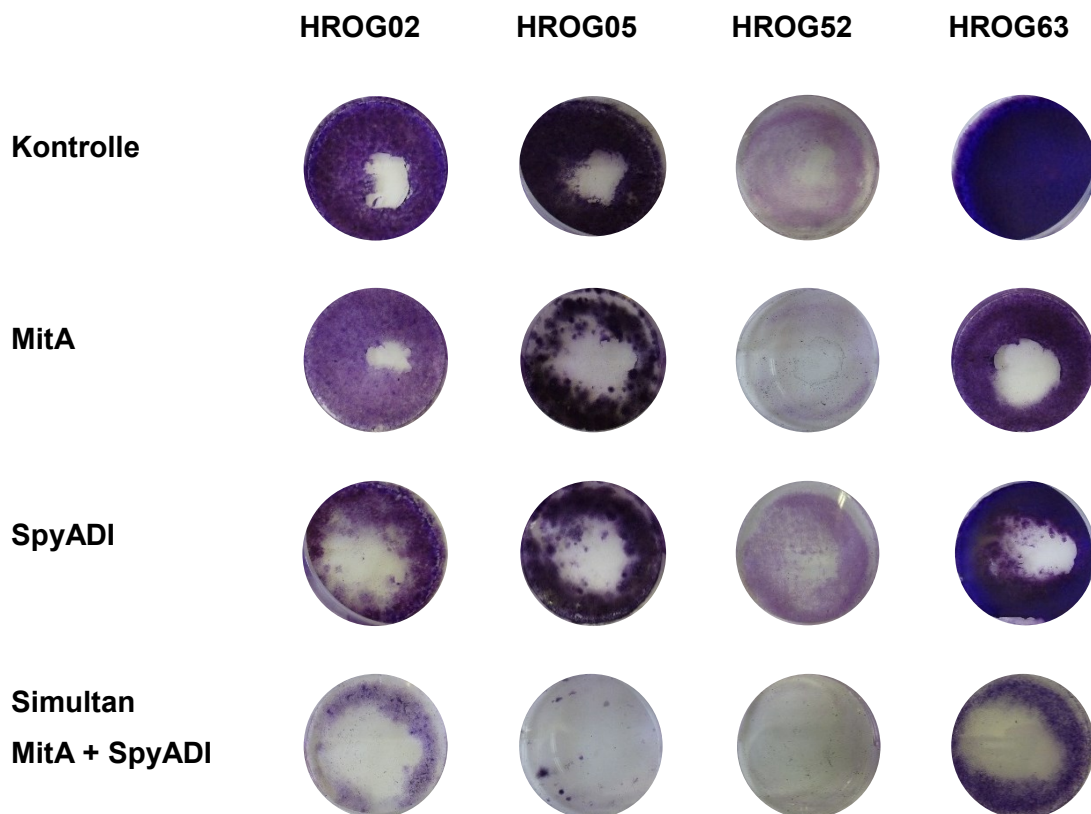
**ABBILDUNG 19:** EINFLUSS EINER SIMULTANEN UND SEQUENTIELLEN LANGZEITKOMBINATIONSTHERAPIE VON MITA MIT SPYADI AUF DIE VIABILITÄT DER GBM-ZELLEN ÜBER 10 THERAPIEZYKLEN

QUANTITATIVE DARSTELLUNG MITTELWERTE [%] UND STANDARDFEHLER

(VS. KONTROLLE = 100%),

ONE-WAY ANOVA, POST-HOC TEST BONFERRONI, N=3 UNABHÄNGIGE VERSUCHE,

\* P < 0.05 VS. KONTROLLE, \*\*P < 0.01, \*\*\* P < 0.001 VS. KONTROLLE

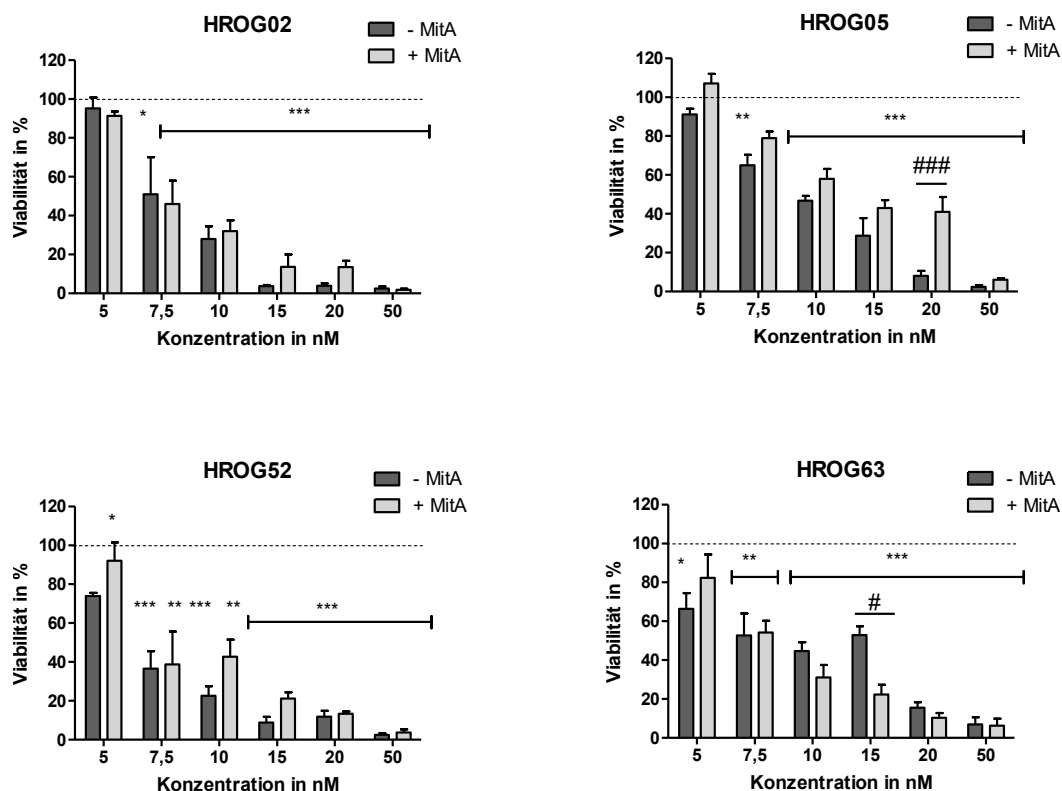


**ABBILDUNG 20:** REPRÄSENTATIVE DARSTELLUNG DER BIOMASSE DER VIER GBM-ZELLINIEN MITTELS KV NACH 10 ZYKLEN SIMULTANER KOMBINATIONSTHERAPIE VON MITA MIT SPYADI

Eine Monotherapie mit SpyADI führte, wie die Kurzzeittherapie über zweimal 72h (vgl. Abschnitt 4.3.2), zu einer Abnahme der Viabilität und Biomasse von 10 - 20 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (siehe Abbildung 20). Des Weiteren bestätigten sich die antitumoralen Effekte der unterschiedlichen Kombinationsansätze von MitA und SpyADI, die bereits im 2D-Modell beobachtet wurden. Nur die simultane Kombinationstherapie hatte eine signifikante Wirkung auf die Zellviabilität. Die maximal erreichte Reduktion der Tumorzellen betrug 75 % bei HROG05. HROG63 sprach mit einer 38 %igen Reduktion am wenigsten auf die simultane Therapie an. Die in Abbildung 20 dargestellte KV Färbung verdeutlichte die signifikante Abnahme der Tumorzellzahl unter einer simultanen Kombinationstherapie. Beim sequentiellen Ansatz konnte lediglich eine Abnahme der Viabilität um 8 - 18 % beobachtet werden. Auch im 2D-Modell war der antitumorale Effekt einer sequentiellen Kombinationstherapie tendenziell schwach ausgeprägt (vgl. Abschnitt 4.3.2).

#### 4.4.3 UNTERSUCHUNG EINER RESISTENZENTWICKLUNG UNTER MITA MONOTHERAPIE

Um zu untersuchen, ob die GBM-Zellen resistent gegenüber MitA werden, wurden die Tumorzellen entsprechend des in Abschnitt 3.2.5.5 beschriebenen Schemas therapiert. Hierfür wurden die Zellen über 15 Behandlungszyklen mit 4 nM, der IC<sub>20</sub>-Dosis von MitA, vorththerapiert. Im Anschluss wurden die GBM-Zellen mit ansteigenden MitA Konzentrationen jeweils über vier Zyklen exponiert, um zu untersuchen, ob sich durch die Vorththerapie die Sensibilität gegenüber MitA verändert hat. Die Viabilitätsmessung erfolgte mittels des Calcein AM Assays. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 dargestellt.



**ABBILDUNG 21:** EINFLUSS ANSTIEGENDER MITA KONZENTRATIONEN AUF DIE ZELLVIABILITÄT VORTHHERAPIERTER GBM-ZELLEN ZUR DETEKTION EINER MÖGLICHEN RESISTENZENTWICKLUNG

QUANTITATIVE DARSTELLUNG DER MITTELWERTE [%] UND STANDARDFEHLER (VS. KONTROLLE = 100%),

DUNKELGRAUER BALKEN: 10 BEHANDLUNGSZYKLEN MIT 4 nM MITA UND 5 ZYKLEN MEDIUMWECHSEL,

HELLGRAUER BALKEN: 15 BEHANDLUNGSZYKLEN MIT 4nM MITA,

ONE-WAY ANOVA, POST-HOC TEST BONFERRONI, N=3 UNABHÄNGIGE VERSUCHE, KONTROLLE: MIT 4 nM MITA THERAPIERTE ZELLEN,

\* P < 0.05 VS. KONTROLLE, \*\*\* P < 0.001 VS. KONTROLLE;

TWO-WAY ANOVA, POST-HOC TEST BONFERRONI, N=3 UNABHÄNGIGE VERSUCHE, KONTROLLE: MIT 4 nM MITA THERAPIERTE ZELLEN,

# P < 0.05 VS. KONTROLLE ### P < 0.001 VS. KONTROLLE

Aus der Resistenztestung ging hervor, dass die GBM-Tumorzellen trotz Vortherapie sensibel gegenüber MitA reagierten. Bei allen Zelllinien war ab einer MitA Konzentration von 7,5 nM eine signifikante Reduktion der Zellviabilität im Vergleich zur mit 4 nM MitA behandelten Kontrolle zu beobachten. Auch vergleichend mit den erstellten Konzentrationsreihen von MitA, die in Abschnitt 3.2.5.1 beschrieben sind, änderte sich das Ansprechen der GBM-Zellen nicht. Das Ausmaß der Reduktion der Zellviabilität (siehe Abschnitt 4.1) war vergleichbar mit der hier ermittelten Tumorzellabnahme. Zwischen den GBM-Zellen, die nur über 10 Zyklen mit MitA therapiert wurden und denen, die kontinuierlich 15 Behandlungszyklen durchliefen, gab es lediglich gering ausgeprägte Unterschiede hinsichtlich des Ansprechens auf die MitA Therapie. Tendenziell war zu beobachten, dass die HROG02, HROG05 und HROG52 Zellen, die kontinuierlich mit MitA behandelt wurden, weniger sensibel gegenüber einer MitA Therapie waren, als die GBM-Zellen, die nur über 10 Zyklen behandelt wurden. Bei HROG63 wurde dies nicht beobachtet.

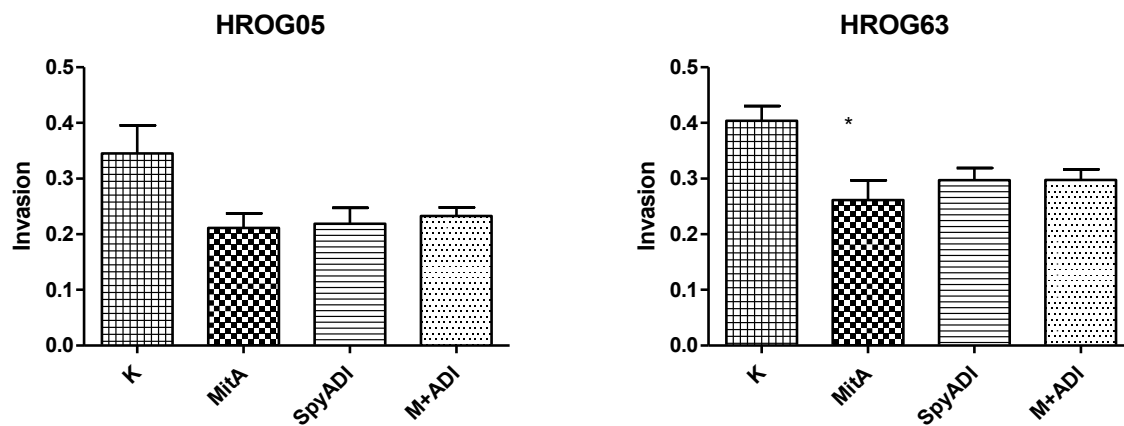
### **4.5 INHIBITION DER ZELLMOTILITÄT DURCH MITA UND SPYADI IM 2D- UND 3D-MODELL**

---

Motilität und Invasivität von Tumorzellen sind ausschlaggebend für die Malignität eines Tumors. Das GBM ist ein hoch infiltrativ wachsender Tumor, der zur Verdrängung und zum Untergang von wichtigen Hirnstrukturen führt. Durch die hohe Invasivität ist der kurative Erfolg der chirurgischen Therapie begrenzt und selten kann eine komplette mikroskopische Resektion erzielt werden. Deshalb ist es von großer Bedeutung, Chemotherapeutika zu identifizieren, die die Motilität der Tumorzellen inhibieren.

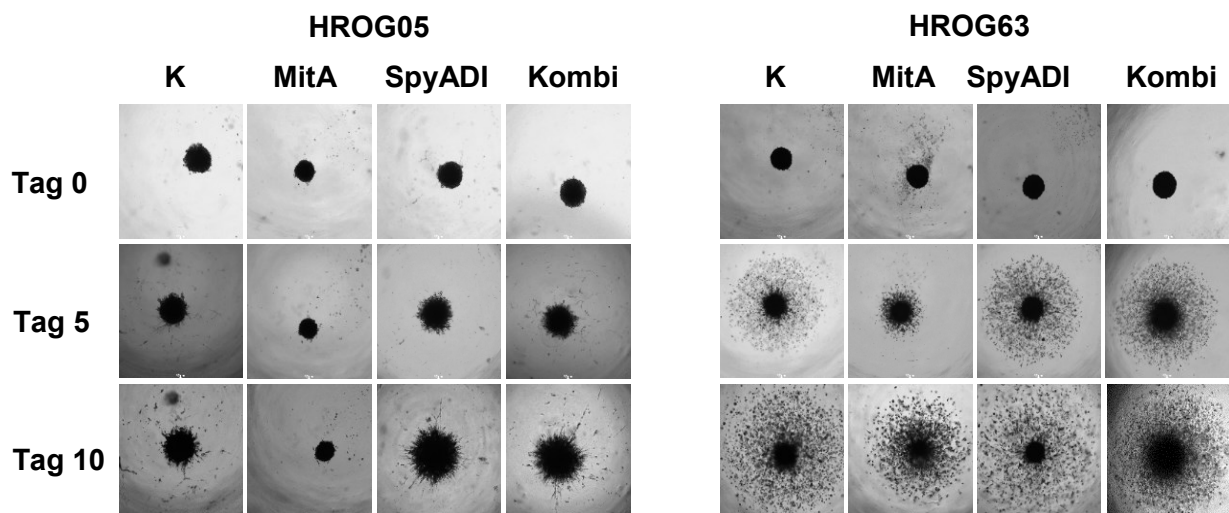
Zur Untersuchung des Effektes von MitA und SpyADI auf die Zellmotilität wurden ein 2D- und ein 3D-Invasionsassay, wie in Abschnitt 3.2.10 beschrieben, durchgeführt. Dabei wurde das Invasionsverhalten der GBM-Zellen von HROG05 und HROG63 durch die Matrigel-Matrix unter Therapie untersucht. Die Zellen wurden mit MitA, SpyADI und einer simultanen Kombination beider Substanzen behandelt. Nach Durchführung des 2D-Assays fand eine Quantifizierung der vitalen invadierten Zellen mittels WST-1 Färbung statt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 dargestellt. Zusätzlich wurde der Einfluss der Testsubstanzen auf das Invasionsverhalten der GBM-Zellen im 3-Sphäroid-Modell untersucht. Die mikroskopische Auswertung der invadierenden GBM-Zellen in die umgebende Matrigel-Matrix erfolgte über einen Beobachtungszeitraum von 10 Tagen.

Die Aufnahmen sind in Abbildung 23 dargestellt.



**ABBILDUNG 22:** EINFLUSS DER MITA UND SPYADI THERAPIE AUF DIE INVASIVITÄT VON GBM-ZELLEN

QUANTITATIVE DARSTELLUNG DER MITTELWERTE UND STANDARDFEHLER,  
ONE-WAY ANOVA, POST-HOC TEST BONFERRONI, N=3 UNABHÄNGIGE VERSUCHE,  
\* P < 0.05 VS. KONTROLLE



**ABBILDUNG 23:** LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN DER INVASION DER GBM-ZELLEN IN DIE MATRIGEL-MATRIX IM SPHÄROIDMODELL. AUFGENOMMEN MIT DEM MIKROSKOP LEICA DM 4000B

Durch eine MitA Mono- und Kombinationstherapie mit SpyADI konnte die Zellmotilität der GBM-Zellen marginal inhibiert werden und führte bei HROG05 zu einer Abnahme der invasiven Zellen um 33 - 39 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Bei HROG63 waren die Effekte auf die Invasivität der Zellen zwischen den unterschiedlichen Therapien annähernd gleich ausgeprägt. So waren bei HROG63 zwischen 26 - 36 % weniger Zellen als bei der unbehandelten Kontrolle durch die Matrigel-Matrix invadiert.

Dabei war bei HROG63 der motilitätshemmende Effekt der MitA Monotherapie mit einer Abnahme der invasiven Zellen um 36 % signifikant am stärksten. Im 3D-Sphäroid-Modell konnte beobachtet werden, dass insbesondere MitA die Invasion der GBM-Zellen in die umgebende Matrigel-Matrix hemmte. Im Vergleich zur Kontrolle waren bei HROG05 nach 10 Tagen nur wenige Zellen in die umliegende Matrix invadiert. Bei HROG63 war dieser motilitätshemmende Effekt von MitA nach 5 Tagen erkennbar. Die Monotherapie mit SpyADI sowie die Kombinationstherapie beeinflussten die Motilität der GBM-Zellen im Sphäroid-Modell nicht.

Zusammenfassend konnte eine inhibierende Wirkung auf die Motilität der GBM-Zellen durch MitA gezeigt werden, die durch Zugabe von SpyADI nicht verstärkt wurde.

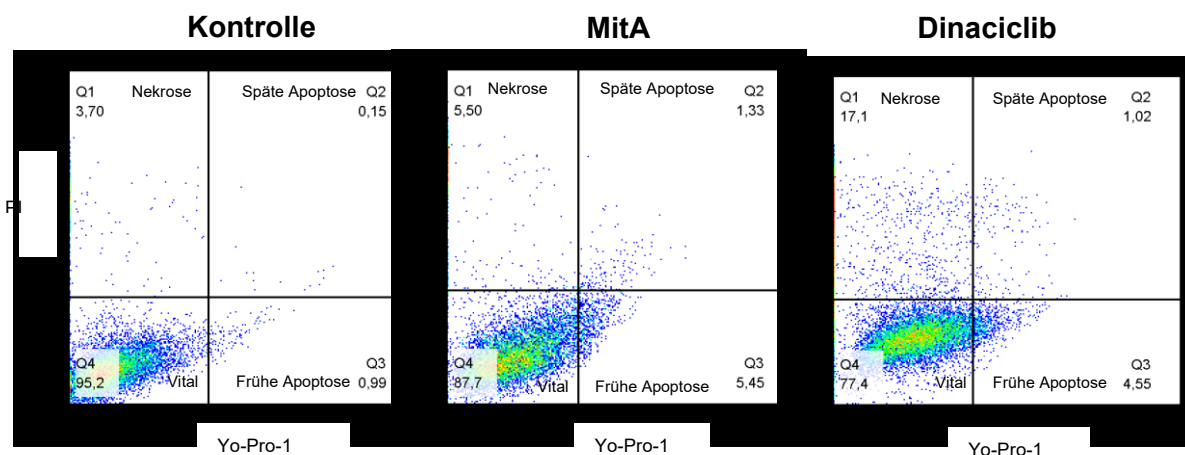
## 4.6 ZELLTODINDUKTION DURCH KOMBINATIONSTHERAPIEN MIT MITA

### 4.6.1 APOPTOSE UND NEKROSEINDUKTION

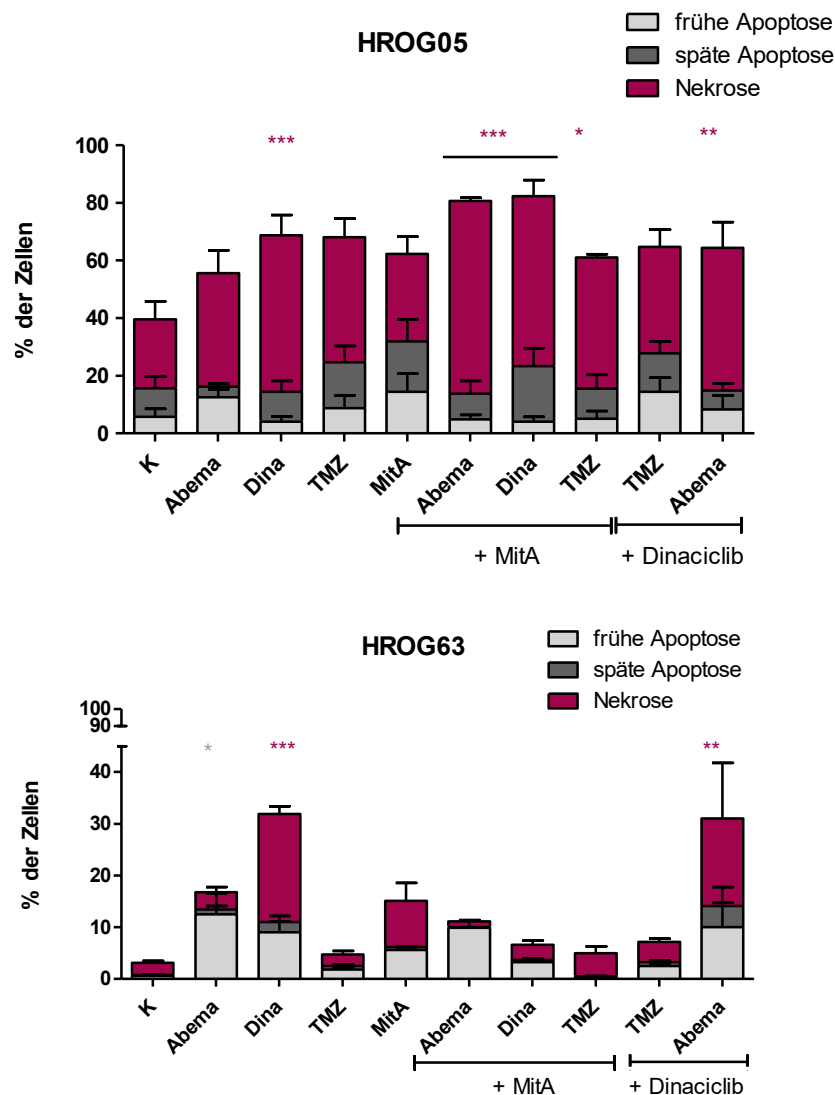
Um zu untersuchen, inwiefern MitA und die Testsubstanzen den Zelltod in den GBM-Zelllinien induzieren, wurden durchflusszytometrische Analysen mithilfe der Farbstoffe Yo-Pro 1 und PI vorgenommen. Zur Differenzierung zwischen den beiden wesentlichen Mechanismen des Tumorzelluntergangs wurde ein Apoptose-Nekrose-Assay, wie in Abschnitt 3.2.11.1 beschrieben, durchgeführt. Am Durchflusszytometer FACS Calibur fand ein Ausschluss des Zelldebris über ein Gating im Forward- und Sideward-Scatter statt. Anschließend konnten die ausgewählten GBM-Zellen entsprechend Abschnitt 3.2.11.1 nach ihrer Positivität für Yo-Pro-1 und PI quantifiziert werden. Yo-Pro 1<sup>+</sup> und PI<sup>-</sup> Zellen wurden als früh apoptotisch und für beide Farbstoffe positive GBM-Zellen als spät apoptotisch deklariert. Ein alleiniger Nachweis PI gefärbter Zellen bedeutete, dass diese nekrotisch sind.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 dargestellt.

#### HROG63







**ABBILDUNG 24:** ANTEIL DER FRÜH APOPTOTISCHEN, SPÄT APOPTOTISCHEN UND NEKROTISCHEN GBM-ZELLEN NACH 1X 72 H THERAPIE MIT DEN ZYTOSTATISCHEN TESTSUBSTANZEN UND DEN KOMBINATIONEN

QUANTITATIVE DARSTELLUNG DER MITTELWERTE [%] UND STANDARDFEHLER,  
TWO-WAY ANOVA, N=4 UNABHÄNGIGE VERSUCHE,

\* P < 0.05 VS. KONTROLLE, \*\* P < 0.01 VS. KONTROLLE, \*\*\* P < 0.001 VS. KONTROLLE

Aus Abbildung 24 geht hervor, dass sich das Ausmaß der Zelltodinduktion zwischen den GBM-Zelllinien HROG05 und HROG63 unterscheidet. So sind bereits in der unbehandelten Kontrolle von HROG05 lediglich 60 % der Zellen vital. Bei HROG63 leben nur 3 % der Tumorzellen nicht mehr. Tendenziell reagiert HROG05 sensibler auf eine zytostatische Therapie als HROG63.

MitA führte bei HROG05 zu einer 22 %igen und bei HROG63 zu einer 14 %igen Reduktion der vitalen Tumorzellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

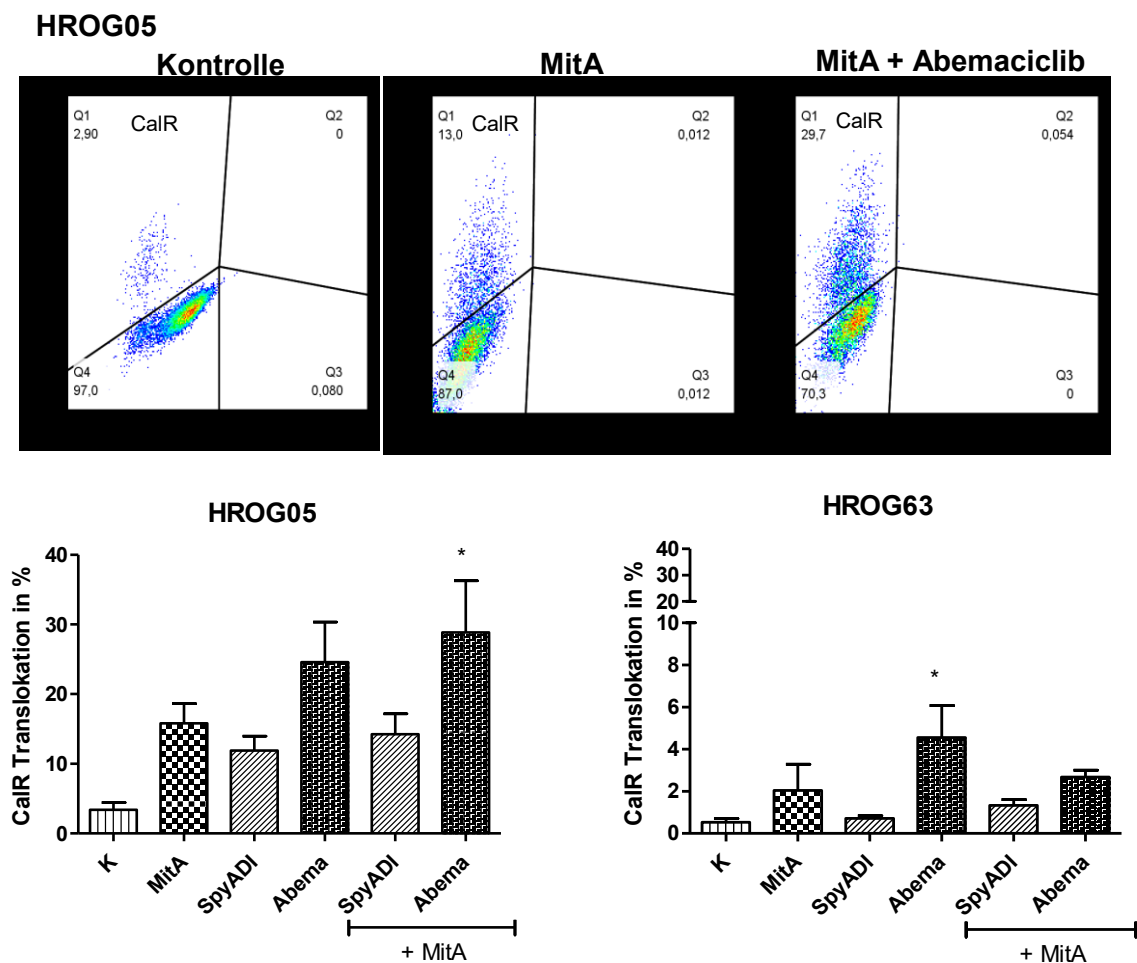
Von den abgestorbenen Tumorzellen befanden sich bei HROG05 gegenüber der Kontrolle jeweils 8 % mehr Zellen in früher und später Apoptose. Nur 6 % der avitalen HROG05 Zellen waren nekrotisch. Somit dominierte hier die Apoptose. Bei HROG63 Zellen waren nach MitA Therapie jeweils 7 % der Zellen apoptotisch bzw. nekrotisch.

Nach Therapie der GBM-Zellen mit den CDKIs Abemaciclib und Dinaciclib war zu beobachten, dass insbesondere Dinaciclib bei beiden Zelllinien zu einer signifikanten Zunahme nekrotischer Zellen in Relation zur Kontrolle führte. So waren bei HROG05 30 % und bei HROG63 20 % mehr Zellen nekrotisch als bei der Kontrolle. Bei HROG63 war außerdem zu beobachten, dass 10 % von insgesamt 30 % avitalen Tumorzellen nach Dinaciclib Behandlung früh apoptotisch waren. Auch Abemaciclib induzierte bei HROG63 mit 13 % fast ausschließlich Apoptose. Bei HROG05 führte die Abemaciclib Monotherapie vor allem zu einer Nekrose. Die Kombination der CDKIs mit MitA induzierte den primär nekrotischen Zelltod bei HROG05 (bis zu 43 %). Bei HROG63 fiel der Effekt der Kombinationen auf die Zelltodinduktion bedeutend geringer aus als bei den einzelnen Monotherapien. Die duale Kombination der CDKIs führte bei beiden Zelllinien zu einer signifikanten 15 - 25 %igen Zunahme nekrotischer Zellen im Vergleich zur Kontrolle.

Der Effekt von TMZ und den jeweiligen Kombinationstherapien auf die Zelltodinduktion war bei HROG63 sehr gering ausgeprägt. Die Abnahme der vitalen Zellen betrug maximal 4 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Bei HROG05 führten die TMZ Monotherapie sowie die Kombinationstherapien zu einer Reduktion von 21 - 28 % der vitalen Tumorzellen vergleichend zur Kontrolle. Dabei löste die Kombination aus TMZ und MitA nur Nekrose in den Tumorzellen aus. Die Kombinationstherapie aus TMZ und Dinaciclib führte zu gleichen Teilen zu einer Apoptose und Nekrose.

#### 4.6.2 INDUKTION VON IMMUNOGENEM ZELLTOD

Um zu untersuchen, ob die therapieassoziierten Effekte auch auf einen immunogenen Zelltod zurückzuführen sind, wurde der Marker CalR mittels einer durchflusszytometrischen Analyse am FACS Calibur quantifiziert. Es wurde der Einfluss von MitA, SpyADI und Abemaciclib sowie der Kombinationen untersucht. Die Methode zur Messung wurde in Abschnitt 3.2.11.2 beschrieben. Die Ergebnisse sind in Abbildung 25 dargestellt.



**ABBILDUNG 25:** ANTEIL DER CALR-POSITIVEN GBM-ZELLEN NACH THERAPIE MIT MITA, SPYADI, ABEMACICLIB UND DEREN KOMBINATIONEN

QUANTITATIVE DARSTELLUNG DER MITTELWERTE [%] UND STANDARDFEHLER,  
ONE-WAY ANOVA, POST-HOC TEST BONFERRONI, N=4 UNABHÄNGIGE VERSUCHE,  
\* P < 0.05 VS. KONTROLLE

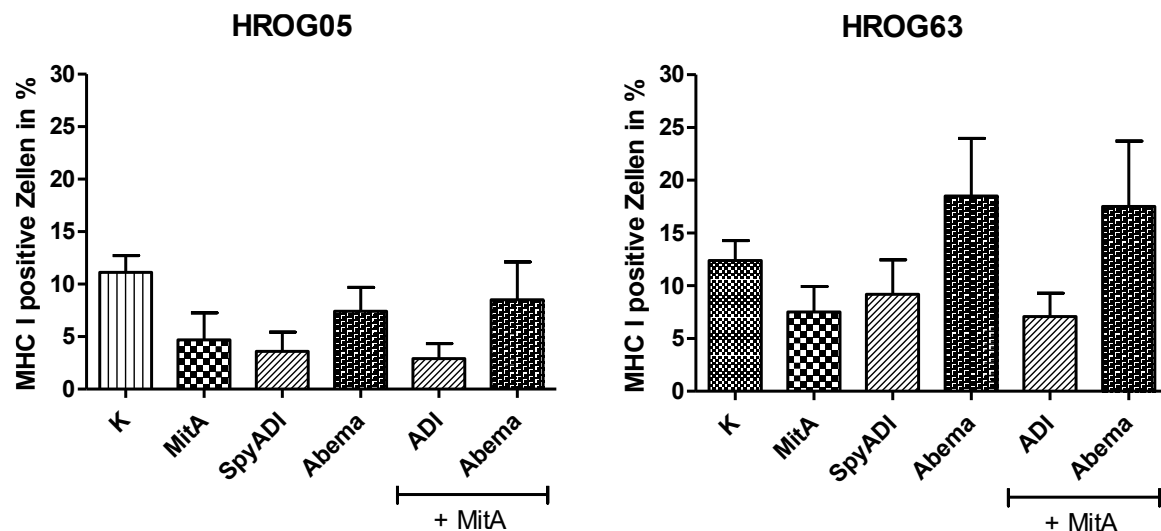
In Analogie zu den Befunden des Apoptose-/Nekrose-Assays (Abschnitt 4.6.1) waren auch hinsichtlich der CalR-Translokation deutliche Unterschiede zwischen den GBM-Zelllinien HROG05 und HROG63 zu beobachten. HROG05 Zellen translozierten mehr CalR an ihre Oberfläche als HROG63 Zellen. Die MitA Therapie führte zu einer 21 %igen Zunahme der CalR<sup>+</sup> Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Die stärkste CalR Translokation wurde bei HROG05 durch Therapie mit Abemaciclib und der Kombinationstherapie mit MitA erzielt. Unter Einfluss dieser Therapien wurden in 25 - 33 % mehr GBM-Zellen CalR an der Oberfläche transloziert. Bei den HROG63 Zellen wurden nur marginale Unterschiede zwischen den einzelnen Therapieschemata detektiert.

### **4.7 EINFLUSS DER ZYTOSTATISCHEN TESTSUBSTANZEN AUF DEN PHÄNOTYP**

---

Um zu untersuchen, ob eine Therapie mit den zytostatischen Testsubstanzen die Abundanz immunregulatorischer Marker wie CD152 (CTLA-4), CD274 (PD-L1), CD279 (PD1) und MHC I sowie des mesenchymalen Stammzellmarkers CD133 beeinflusst, wurde eine durchflusszytometrische Analyse, wie in Abschnitt 3.2.11.3 beschrieben, durchgeführt. Es wurde der Einfluss von MitA, SpyADI und Abemaciclib sowie der Kombinationen untersucht.

Die immunregulatorischen Proteine, mit Ausnahme von MHC I, waren bei beiden GBM-Zelllinien HROG05 und HROG63 unabhängig von der Therapie bei unter 5 % der Zellen nachweisbar. MHC I konnte sowohl bei HROG05 als auch bei HROG63 bei 10 % der Zellen nachgewiesen werden. Abemaciclib induzierte MHC I auf HROG63, jedoch nicht auf HROG05. Die Therapien mit MitA, SpyADI sowie der Kombinationen führten bei beiden Zelllinien zu einer Abnahme von MHC I. Die Ergebnisse sind in Abbildung 26 dargestellt.



**ABBILDUNG 26:** ANTEIL DER MHC I-POSITIVEN GBM-ZELLEN NACH THERAPIE MIT MITA, SPYADI, ABEMACICLIB UND DEREN KOMBINATIONEN

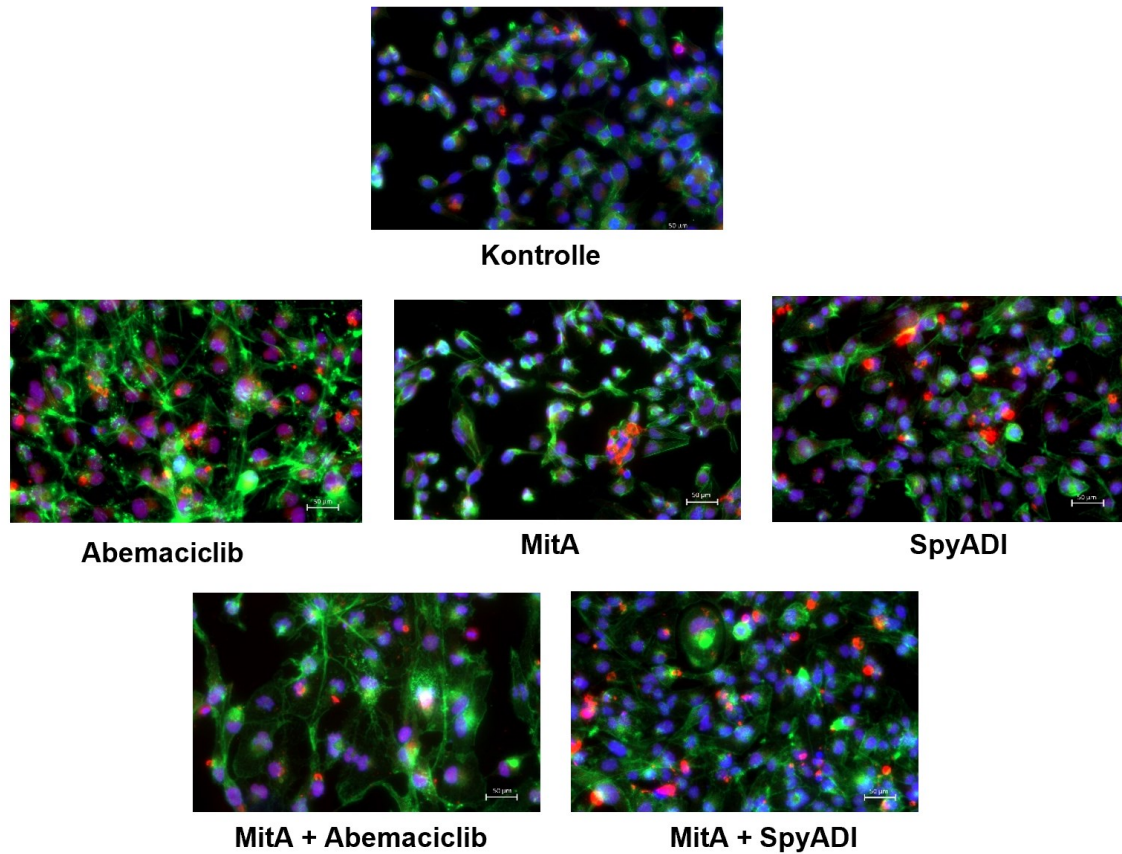
QUANTITATIVE DARSTELLUNG DER MITTELWERTE [%] UND STANDARDFEHLER, ONE-WAY ANOVA, POST-HOC TEST BONFERRONI, N=4 UNABHÄNGIGE VERSUCHE

Der Anteil des mesenchymalen Stammzellmarkers CD133 war nach Therapie unverändert. CD133 konnte vergleichbar mit den immunregulatorischen Markern bei unter 5 % der GBM-Zellen nachgewiesen werden.

#### 4.8 EFFEKT DER TESTSUBSTANZEN AUF DIE EXPRESSION VON STAMMZELLMARKERN

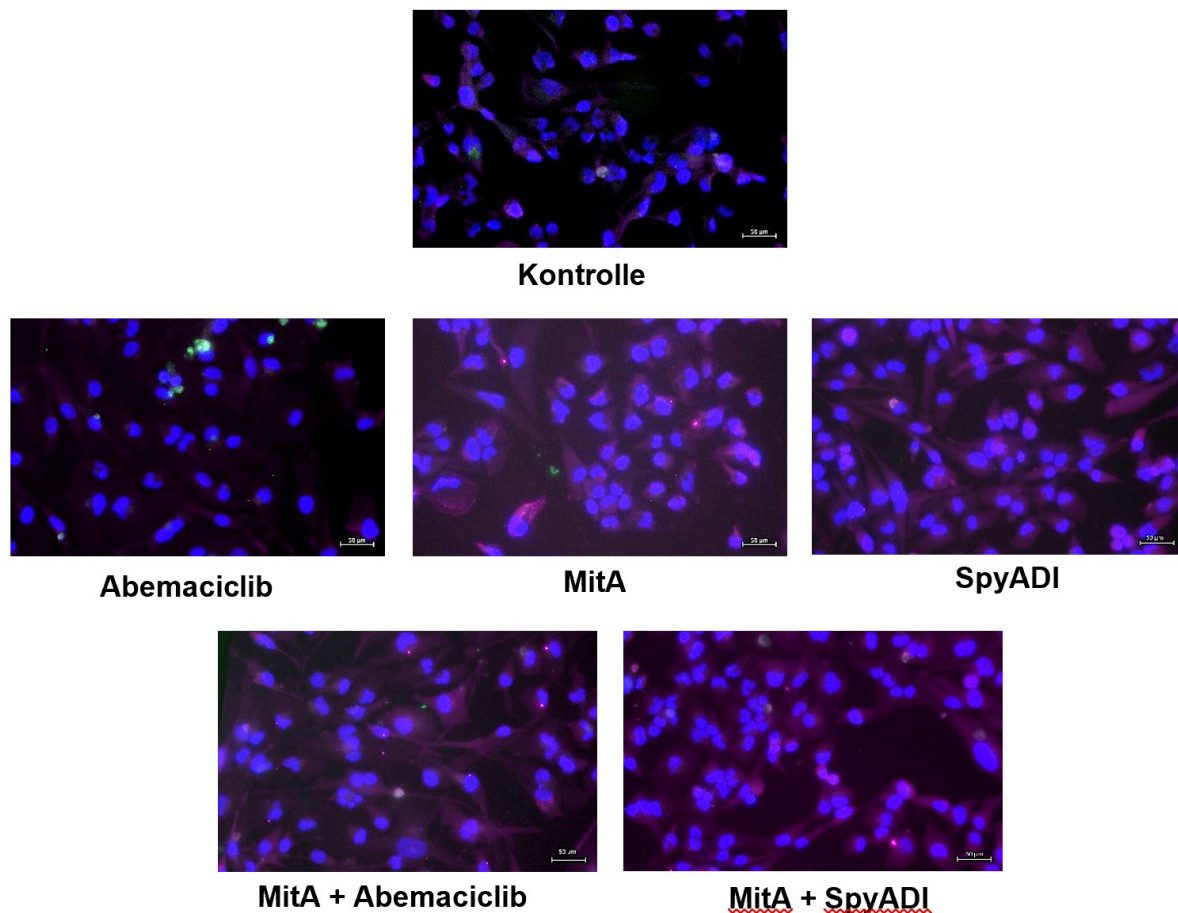
Ergänzend zu den durchflusszytometrischen Analysen erfolgten Untersuchungen zur Abundanz der Stammzellmarker GFAP, A2B5, Nanog und Oct-4. Die Analysen erfolgten exemplarisch an der GBM-Zelllinie HROG05. Die genannten Marker wurden mittels einer Immunfluoreszenzfärbung, wie in Abschnitt 3.2.12 beschrieben, erfasst. Die Ergebnisse sind in Abbildung 27 und Abbildung 28 dargestellt.

Alle verwendeten Substanzen induzierten GFAP. Am deutlichsten war dies nach Mono- und Kombinationstherapie mit Abemaciclib und SpyADI. MitA hingegen führte nicht zu einem veränderten Expressionsprofil von GFAP. Ein weiterer Befund war die Veränderung der Zytoskelettstruktur unter Behandlung, insbesondere nach Abemaciclib (+/- MitA). Unter SpyADI Therapie kam es zum Anschwellen und zur Vergrößerung der Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Auch die Abemaciclib Therapie führte zur Größenzunahme der Tumorzellen. Ein vergleichbarer Effekt war nach MitA Behandlung nicht nachweisbar. A2B5 konnte sowohl in der Kontrolle als auch nach Therapie nicht detektiert werden.



**ABBILDUNG 27:** ANALYSE DER GFAP UND A2B5 EXPRESSION MITTELS IMMUNFLUORESCENZ-MIKROSKOPIE IN GBM-ZELLEN (HROG05)  
 GFAP = ROT, ZYTOSKELETT = GRÜN, ZELLKERNE = BLAU. DER MESSBALKEN IN DER RECHTEN UNTEREN ECKE DER BILDER REPRÄSENTIERT EINE LÄNGE VON 50 µM.

Wie in Abbildung 28 erkennbar, waren sowohl Oct-4 als auch Nanog in den unbehandelten Zellen nur sehr schwach bis gar nicht nachweisbar. Unter Therapie mit MitA, SpyADI und der Kombination beider Substanzen wurde Oct-4 induziert. Nach Behandlung der GBM-Zellen mit Abemaciclib wurde Nanog punktuell in den Tumorzellen nachgewiesen. Die anderen Behandlungsschemata führten nicht zur Induktion von Nanog.



**ABBILDUNG 28:** ANALYSE DER OCT-4 UND NANOG EXPRESSION MITTELS IMMUNFLUORESCENZ-MIKROSKOPIE IN GBM-ZELLEN (HROG05)

OCT-4 = ROSA, NANOG = GRÜN, ZELLKERNE = BLAU. DER MESSBALKEN IN DER RECHTEN UNTEREN ECKE DER BILDER REPRÄSENTIERT EINE LÄNGE VON 50 µM.

## V. DISKUSSION

---

Das Glioblastoma multiforme ist trotz multimodaler Therapie eine Tumorentität mit einer sehr schlechten Überlebensprognose. Der Tumor zeichnet sich durch eine hohe intrinsische Therapieresistenz aus. Außerdem führen die hohe Invasivität und aktive Migration des GBM häufig zu Rezidiven und letztendlich zum Tod des Patienten [29]. Für die schlechte Prognose ist auch die von den GBM-Zellen vermittelte Immunsuppression verantwortlich [41].

Daher ist es von entscheidender Bedeutung, innovative Testsubstanzen zu identifizieren, die das Wachstum hemmen, die Invasivität inhibieren und den Tumor möglicherweise für einen Angriff durch das Immunsystem sensibilisieren [130].

In dieser Arbeit wurden verschiedene Testsubstanzen im Hinblick auf ihre antitumorale Wirksamkeit gegenüber GBM-Zellen untersucht. Der Fokus lag dabei insbesondere auf MitA, einem seit 1960 bekannten antineoplastischen Antibiotikum [137]. Aufgrund seiner antitumoralen Wirksamkeit wurde MitA bereits zur Behandlung verschiedenster Tumoren experimentell eingesetzt [71].

Vorstudien zeigten, dass MitA auch effektiv in der Behandlung des GBM ist und radiosensibilisierend wirkt [79, 130]. Dies ist besonders bedeutsam, da die Strahlentherapie eine wichtige Säule in der Behandlung von GBM-Patienten darstellt.

Chemotherapie-Regimes bestehen häufig aus Kombinationen verschiedener antineoplastischer bzw. zielgerichteter Substanzen, die synergistisch wirken und dadurch effektiver das Tumorwachstum inhibieren. Da MitA multiple Stoffwechselprozesse beeinflusst, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob durch die Kombination mit verschiedenen Substanzen die antitumorale Wirksamkeit noch gesteigert werden kann. Ergänzend wurden funktionelle Analysen durchgeführt. Es wurde zum einen untersucht, inwieweit die Substanzen das infiltrierende Wachstum der Tumorzellen beeinflussen. Zum anderen wurden die Art des Zelltodes, die Modulierung des Immunphänotyps und der Stammzeleigenschaften näher beleuchtet.

Für eine perspektiv klinische Anwendung der hier verwendeten Substanzen ist die Entwicklung potentieller Resistenzen ein limitierender Faktor. Folglich wurde sowohl nach Kurzzeit- als auch nach Langzeitbehandlung die Ausbildung von Resistenzen untersucht. Die Ergebnisse der Arbeit werden im Folgenden diskutiert.



## 5.1 ANTITUMORALE EFFEKTE VON MITA UND DEN TESTSUBSTANZEN

---

### 5.1.1 KONZENTRATIONSABHÄNGIGE WIRKSAMKEIT EINER MITA-MONOTHERAPIE

---

MitA inhibiert die Bindung des Transkriptionsfaktors Sp1 an seinen Promoter und moduliert die Expression verschiedenster Proto-Onkogene, wodurch MitA antineoplastisch wirkt [71]. Anhand der vier GBM-Zelllinien wurde eine konzentrationsabhängige Zytotoxizität nach 1x 72 h und 2x 72 h festgestellt. Alle Zelllinien waren sensitiv gegenüber MitA und wiesen nach 72 h ab einer Dosis von 10 nM eine 30 - 50 %ige Viabilitätsreduktion auf. Dies ist vergleichbar mit den Ergebnissen aus Vorarbeiten mit den vier HROG-Zelllinien [61]. Wie zu erwarten, war eine Therapie über zwei Zyklen à 72 h effektiver als eine einmalige MitA Therapie. Dieser Unterschied wurde insbesondere bei höheren Dosen von MitA ab 7,5 nM deutlich. Seznec *et al.* therapierten ebenfalls maligne Gliom-Zelllinien über 72 h mit MitA [130]. Bei den Gliom-Zelllinien führte eine Behandlung auch zu konzentrationsabhängigen zytotoxischen Effekten, die aber zwischen den unterschiedlichen Zelllinien stark differierten. Die in dieser Arbeit verwendeten HROG-Zelllinien reagierten im Vergleich deutlich sensibler auf niedrigere Dosen von MitA. Zhao *et al.* untersuchten das Ansprechen von Kolonkarzinom-Zellen auf eine MitA Therapie. Sie konnten ebenfalls eine signifikante Viabilitätsreduktion feststellen [160]. Eine erste Phase I/II Studie, in der MitA zur Therapie von Patienten mit Ewing-Sarkom eingesetzt wurde, konnte bei einer applizierten Dosis von 17 µg/kg Plasmakonzentrationen von 14 - 18 nM erreichen. Der Einsatz höherer Dosen wurde von den Patienten aufgrund der Hepatotoxizität nicht toleriert [44]. Wenn diese Konzentration auch bei Patienten mit GBM im Tumor erreicht werden könnte, würde MitA im Hinblick auf die Ergebnisse aus dieser Arbeit bereits signifikant zytotoxisch wirken. Es ist außerdem sehr vielversprechend, dass MitA insbesondere das Wachstum der rezidierten GBM-Zelllinien (HROG05, HROG63) effektiv inhibiert, da Tumorzidive meist therapieresistent und prognostisch ungünstig sind. Da, wie bereits beschrieben, die Therapie mit MitA eine nicht zu vernachlässigende systemische Toxizität aufweist, war es das Ziel, eine möglichst niedrige, aber trotzdem effektive MitA Dosis für die Kombinations- und Resistenzversuche zu finden. Vor diesem Hintergrund war ein wichtiges Ergebnis der vorliegenden Studie, dass alle Zelllinien vergleichbar sensitiv auf MitA reagierten, so dass eine 20 %ige Wachstumshemmung bei 4 nM erreicht wurde, welche für die folgenden Versuche Anwendung fand.

### 5.1.2 MITA ALS RADIOSENSIBILISIERENDE SUBSTANZ

---

Walker *et al.* veröffentlichten bereits 1976 eine klinische Studie über MitA zur Therapie von anaplastischen Gliomen [153]. In Kombination mit einer Radiotherapie wurde damals ein signifikant längeres Überleben der Patienten beobachtet. *In vitro* Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die verwendeten GBM-Zelllinien resistent gegenüber Bestrahlung sind. Ohne Vorbehandlung trat ein zytotoxischer Effekt erst ab Dosen über 30 Gy auf [85].

Das Wirkprinzip der Radiotherapie beruht auf einer DNA-Schädigung durch die Bildung von Doppelstrangbrüchen. Sp1 induziert als Transkriptionsfaktor die Rekrutierung von Doppelstrangbruch-Reparaturmechanismen. Die Hemmung von Sp1 durch MitA kann eine Aktivierung dieser Reparatursysteme verhindern und die Tumorzellen gegenüber einer Strahlentherapie sensibilisieren [8, 19].

Irmscher zeigte, dass MitA in Kombination mit einer 2 Gy Radiotherapie zu einer signifikanten Abnahme der vitalen HROG-Zellen im Vergleich zu den unbestrahlten Tumorzellen führte [61]. Der strahlensensibilisierende Effekt wurde in dieser Arbeit nochmals überprüft, wobei ein anderes Therapieschema angewendet wurde. Die GBM-Zellen wurden vor der Bestrahlung mit MitA therapiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 2 Gy bestrahlt und das Zellkulturmedium direkt ausgetauscht. Dieser Mediumwechsel wurde durchgeführt, um die Verhältnisse *in vivo* zu simulieren und um mögliche toxische Radikale, die durch die Bestrahlung entstehen, zu entfernen. Irmscher inkubierte die HROG-Zellen für 7 Tage nach der Bestrahlung im MitA-haltigen Medium [61]. Trotz dieses veränderten Therapieschemas konnte genau wie bei Irmscher ein strahlensensibilisierender Effekt beobachtet werden, der jedoch geringer ausfiel. Dennoch konnte der strahlensensibilisierende Effekt bei drei von vier Zelllinien beobachtet werden. Die Zelllinie HROG52 ist die einzige Ausnahme. Bei den anderen getesteten Linien verringerte sich die Anzahl viabler Zellen nach kombinierter MitA Radiotherapie um bis zu 30 % und bestätigte im Wesentlichen die Daten der vorherigen Studie. Ebenso reagierte bei Irmscher HROG52 schwächer als die anderen GBM-Zelllinien auf eine MitA Therapie in Kombination mit einer Strahlentherapie [61]. Die Ursache hierfür könnte die langsamere Wachstumsgeschwindigkeit von HROG52 mit einer Duplikationszeit ca. 4 Tagen sein.

Die radiosensibilisierende Wirkung von MitA wurde in dieser Studie durch das vermehrte Auftreten von DNA-Doppelstrangbrüchen mittels  $\gamma$ -H2AX-Immunfluoreszenzfärbung bestätigt. Somit konnte die klinisch von Walker *et al.* beobachtete Lebensverlängerung der Patienten, die eine Strahlentherapie in Kombination mit MitA erhielten, im *in vitro* Modell bestätigt werden [153].

Auch bei Zellen vom Ewing-Sarkom konnte gezeigt werden, dass MitA in Kombination mit einer Strahlentherapie durch die Hemmung von DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturmechanismen zytotoxisch wirkt [79]. Aufgrund der strahlensensibilisierenden Wirkung in niedrigen Dosen ist MitA ein sehr vielversprechender Ansatzpunkt zur Therapie von GBM.

### 5.1.3 SYNERGISTISCHE WIRKUNG DER KOMBINATIONSTHERAPIEN

---

MitA beeinflusst über die Hemmung der Bindung von Sp1 an seinen Promoter eine Vielzahl zellulärer Signalwege, die auch Angriffspunkt für andere Testsubstanzen sind. Da MitA eine hohe Toxizität besitzt, war es Ziel dieser Arbeit, mit einer möglichst niedrigen MitA Dosis (4 nM) Kombinationspartner zu finden, die synergistisch wirken und dadurch eine höhere antitumorale Effektivität bei weniger toxischen Nebenwirkungen aufweisen. Dafür wurden simultane Kombinationstherapien im konventionellen 2D- sowie im 3D-Modell durchgeführt. Das 3D-Sphäroid-Modell imitiert dabei die physiologischen *in vivo* Verhältnisse im Tumor realistischer als das 2D-Modell [47].

Zur Einschätzung der Effektivität der Kombinationstherapien im Gegensatz zu den Monotherapien wurde der Kombinationsindex berechnet. Es existieren verschiedenste Modelle, um den synergistischen Effekt von Testsubstanzen einzuschätzen. In dieser Arbeit wurde das *Bliss Independence Modell* verwendet. Es ist das am häufigsten angewandte Modell, um einen Kombinationseffekt zu berechnen [40]. Jedoch weist es einige Limitationen auf, weshalb die hier ermittelten Aussagen bezüglich der Synergie idealisiert angenommen werden müssen. Das *Bliss Independence Modell* geht davon aus, dass die verwendeten Substanzen unabhängig voneinander wirken [42]. Da bei MitA der Wirkmechanismus nicht vollends geklärt ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass MitA nicht teilweise abhängig von den anderen verwendeten Substanzen wirkt. Des Weiteren kann keine konkrete Aussage über die Stärke des synergistischen Effektes gemacht werden [34, 80]. Trotzdem liefern die Ergebnisse des *Bliss Independence Modells* richtungsweisende Aussagen bezüglich der Effektivität der verwendeten Kombinationen.

#### 5.1.3.1 CDKIs - ABEMACICLIB UND DINACICLIB

---

Eine Monotherapie mit Abemaciclib sowie mit Dinaciclib inhibierte das Wachstum der GBM-Zellen im 2D-Modell um 30 - 65 %. Dies entspricht den Ergebnissen aus den Vorstudien unserer Arbeitsgruppe [121]. Interessanterweise wurde die stärkste Wachstumshemmung bei der Zelllinie HROG52 nachgewiesen – dies verhält sich entgegengesetzt zur Sensitivität gegenüber MitA. Der therapeutische Effekt von Abemaciclib konnte auch im 3D-Sphäroid-Modell aufrechterhalten bzw. noch verstärkt werden.

Die Ergebnisse bestätigten somit vorherige Studien von Raub *et al.* und Riess *et al.* [117, 122]. Folglich scheint die CDK 4/6 Inhibition ein effektiver Weg zur Hemmung des GBM-Wachstums zu sein.

Demgegenüber war die Wirksamkeit von Dinaciclib im Sphäroid-Modell abgeschwächt. Dies steht im Widerspruch zu vorherigen Daten unserer Arbeitsgruppe, in denen das Wachstum der HROG-Zelllinien auch im Sphäroid-Modell effektiv gehemmt wurde [121]. Möglicherweise penetrierte Dinaciclib nicht ausreichend in das Sphäroid, um wirksam zu sein. Da das Sphäroid-Modell die Verhältnisse *in vivo* realistischer widerspiegelt, ist es diskutabel, ob Dinaciclib tatsächlich wirksam in der GBM-Therapie ist. Die Literatur liefert diesbezüglich widersprüchliche Ergebnisse. Jane *et al.* testeten Dinaciclib an einer Reihe von Gliomzellen und stellten fest, dass mit einer Monotherapie lediglich eine Stagnation des Tumorwachstums, jedoch keine zytotoxische Wirkung erzielt werden konnte, während sowohl Riess *et al.* beim GBM als auch Fu *et al.* beim Osteosarkom eine antitumorale Effektivität von Dinaciclib zeigten [35, 63, 122]. Cicas *et al.* vermuteten, dass die Effektivität der CDKIs insbesondere in Kombination mit anderen zytostatischen Substanzen zum Tragen kommt [26].

Sp1 induziert die Transkription sowohl von Genen der CDK, wie *Cyclin D/E* und *CDK2*, als auch von *E2F* und *c-Myc*. Diese Faktoren fördern die Progression des Zellzyklus von der G1- zur S-Phase und führen zur Zellproliferation. Eine Hemmung von Sp1 würde folglich zu einem Zellzyklusarrest führen [16, 152].

Die CDKIs spielen eine entscheidende Rolle in der Regulation des Zellzyklus, greifen ebenfalls in den Kontrollpunkt von der G1- zur S-Phase ein und hemmen so die Tumorzellproliferation [133]. Somit stellt die Kombination aus MitA und den CDKIs eine interessante Therapieoption dar, die hinsichtlich ihrer antitumoralen Effektivität in dieser Arbeit untersucht wurde.

Im 2D- sowie im Sphäroid-Modell wirkte die Kombinationstherapie synergistisch. Insbesondere im 2D-Modell konnte eine signifikante Zunahme der zytotoxischen Wirkung sowohl durch die Kombination von MitA mit Abemaciclib als auch mit Dinaciclib erzielt werden. Im Sphäroid-Modell war der Unterschied zwischen den Monotherapien und den Kombinationstherapien weniger stark. Ursächlich dafür könnte sein, dass im Sphäroid-Modell bereits die Monotherapie mit Abemaciclib zu einer 80 %igen Reduktion der vitalen Tumorzellen führte und deshalb der zusätzliche zytotoxische Effekt der Kombination weniger zum Tragen kam. In der Literatur konnte keine Studie gefunden werden, die diese Kombinationen untersuchte. Insbesondere die MitA-Abemaciclib Kombination führte zur nahezu vollständigen Elimination der Tumorzellen und ist daher besonders vielversprechend. Die zugrunde liegenden Mechanismen sollten in weiteren Untersuchungen näher charakterisiert werden.

### 5.1.3.2 TMZ

---

TMZ ist das Chemotherapeutikum, das standardmäßig zur Therapie des GBM eingesetzt wird. Die Hälfte der behandelten Patienten weist jedoch eine Resistenz gegenüber TMZ auf. Die Wirksamkeit ist abhängig vom MGMT-Promotermethylierungsstatus. So profitieren eher die Patienten von einer TMZ-Therapie, bei denen der MGMT-Promoter durch Methylierung inhibiert wird und die DNA-Reparaturmechanismen der Tumorzellen defizitär sind.

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde der MGMT-Methylierungsstatus der hier untersuchten HROG-Zelllinien charakterisiert und es stellte sich heraus, dass HROG52 und das Rezidiv HROG63 keinen methylierten Promoter des MGMT-Gens aufwiesen [96]. Im Gegensatz dazu waren die MGMT-Promotoren von HROG02 und HROG05 methyliert. Dies wies auf ein besseres Ansprechen dieser beiden Zelllinien auf eine Therapie mit TMZ hin [96].

Jedoch führte eine Monotherapie mit TMZ lediglich zu einer geringen Abnahme der Zellviabilität unabhängig vom MGMT-Methylierungsstatus, die im 2D-Modell maximal 18 % betrug. Im Sphäroid-Modell konnte kein antitumoraler Effekt beobachtet werden. Die untersuchten GBM-Zelllinien waren somit nahezu resistent gegenüber TMZ.

Dieses geringe Ansprechen auf die Therapie konnte bereits in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe beobachtet werden [122]. Wie Jiaper *et al.* aufzeigten, ist es daher von großer Bedeutung, Testsubstanzen zu finden, die die Effektivität von TMZ verstärken und die Resistenzmechanismen der GBM-Zellen überwinden [64].

In dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass TMZ zusammen mit MitA im 2D- sowie im 3D-Sphäroid-Modell synergistisch wirkt. Wie Lin *et al.* an Lungenkarzinomzellen zeigten, könnte auch in GBM-Zellen durch MitA die DNA-Methyltransferase inhibiert worden sein [78]. Dies könnte die Sensibilisierung gegenüber TMZ erklären. Eine weitere Ursache für die Wirksamkeitssteigerung könnte die Hemmung der MDR1 Genexpression durch MitA sein, wodurch die Resistenz gegenüber Testsubstanzen reduziert wird [142]. Die synergistische Wirkung der beiden Substanzen sollte in den folgenden Langzeitversuchen bestätigt werden.

### 5.1.3.3 SPYADI

---

Bereits in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass SpyADI das Wachstum Arginin-auxotropher GBM-Zellen beeinträchtigt [32, 61, 88]. Das Ausmaß der therapieassoziierten Effekte ist jedoch deutlich geringer als bei konventionellen zytostatischen bzw. zytotoxischen Substanzen. Vergleichbar mit den Vorarbeiten von Fiedler *et al.* und Irmischer wurden auch in dieser Studie sowohl im 2D- als auch im 3D-Modell nur leichte wachstumshemmende Effekte beobachtet [32, 61].

Eine Therapie mit SpyADI bewirkt in den Tumorzellen einen Argininentzug. Es wird angenommen, dass SpyADI durch die Auslösung von zellulärem Stress die Empfindlichkeit gegenüber zytostatischen Testsubstanzen steigert [88].

MitA beeinflusst über die Hemmung von Sp1 auch die Reaktion der Tumorzellen auf oxidativen Stress und führt zu einer Herabregulation des Arylkohlenwasserstoffrezeptors [143].

Folglich wurde in sequentiellen Therapieschemata getestet, ob eine Vortherapie mit SpyADI oder MitA die Empfindlichkeit der Tumorzellen für die darauffolgende Testsubstanz steigert. Trotz der theoretischen Betrachtungen konnte, wie bei Imscher, kein zusätzlicher zytotoxischer Effekt einer sequentiellen Therapie beobachtet werden [61]. Dies könnte u.a. darauf zurück zu führen sein, dass eine Vortherapie über einen Zyklus à 72 h zu kurz ist, um die Tumorzellen suffizient zu sensibilisieren. Deshalb wurden nachfolgend Langzeitversuche durchgeführt, in denen die GBM-Zellen über mehrere Zyklen mit SpyADI vortherapiert wurden. Die simultane Therapie von MitA mit SpyADI reduzierte die Viabilität der GBM-Zellen signifikant – sowohl im 2D- als auch im 3D-Modell. Synergistische Effekte wurden bei drei von vier Zelllinien nachgewiesen. Die einzige Ausnahme ist HROG63. Da diese Zelllinie alle Gene zur Arginin-Synthese exprimiert, ist molekular von einer SpyADI-Resistenz auszugehen. Ursächlich für die Wirkverstärkung bei den restlichen Zelllinien könnte oxidativer Stress sein, der in Kombination potenziert ist. In der Konsequenz hemmt dies die Proliferation signifikant. Somit stellt die Kombination aus MitA und SpyADI eine potentielle Option für Arginin-auxotrophe Tumoren dar.

## 5.2 LANGZEITTHERAPIEN UND RESISTENZTESTUNG

---

### 5.2.1 EFFEKTE EINER KOMBINATIONSTHERAPIE IM LANGZEITMODELL

---

#### 5.2.1.1 CDKIs - ABEMACICLIB UND DINACICLIB

---

Es gibt eine Vielzahl von Studien, die die Resistenzentwicklung von Tumorzellen gegenüber CDKIs untersuchen. Dabei liegt der Fokus insbesondere auf Abemaciclib in der Therapie des metastasierten Mammakarzinoms. Es konnten verschiedene Mechanismen detektiert werden, die eine Resistenz gegenüber Abemaciclib bedingen. Für eine Resistenz gegenüber den CDK 4/6 Inhibitoren wurde insbesondere ein Funktionsverlust des Rb-Proteins verantwortlich gemacht. CDK 4/6 regulieren über Rb den Zellzyklus durch Beeinflussung der Aktivität von E2F und CyclinE-CDK2. Durch den Funktionsverlust von Rb würde die Progression des Zellzyklus unabhängig von CDK 4/6 ablaufen [18, 108, 127, 135, 156].

Michaud *et al.* beobachteten, dass auch das Ansprechen von GBM-Zellen auf eine Therapie mit einem CDK 4/6 Inhibitor von der Aktivität des Rb-Proteins abhängt [91].

In den Kurzzeitversuchen konnte gezeigt werden, dass alle hier verwendeten GBM-Zelllinien sensitiv gegenüber einer Therapie mit Abemaciclib sind. Im Langzeitversuch sollte nun geprüft werden, ob die Tumorzellen über mehrere Zyklen resistente Tumorklone bilden.

Nach der Monotherapie mit Abemaciclib über 5 Wochen waren nahezu alle Tumorzellen eliminiert. Das zeigte sich konsistent bei allen vier GBM-Zelllinien. Somit steigerte sich die antitumorale Effektivität mit mehrmaliger Therapie, ohne Resistenzentwicklung.

Lichtmikroskopisch sowie quantitativ waren lediglich einzelne Zellen sichtbar, die morphologisch hochgradig verändert waren. Riess *et al.* führten ebenfalls Langzeitversuche mit Abemaciclib an GBM-Zellen durch [122]. Die Ergebnisse gleichen denen in dieser Arbeit. Abemaciclib ist somit höchst effektiv. Auch im Xenograft-Modell von Michaud *et al.* konnte durch eine vierwöchige Therapie mit einem anderen CDK 4/6 Inhibitor das Überleben von Mäusen in einem intrakraniellen GBM-Modell signifikant verlängert werden [91].

In dieser Arbeit führte bereits die Monotherapie mit Abemaciclib zum Absterben nahezu aller Tumorzellen. Somit war auch nach 10 Therapiezyklen in Kombination mit MitA kein verstärkender Effekt zu beobachten. Jedoch wird aus den Ergebnissen ersichtlich, dass die Kombinationstherapie aus Abemaciclib und MitA nach mehreren Zyklen ebenso wirksam ist und sich in diesem Zeitraum keine Resistenzen bilden. Da die Kurzzeitversuche sowohl im 2D- als auch im Sphäroid-Modell eine starke synergistische Wirkung der beiden Substanzen zeigten, wäre es zukünftig interessant, eine Langzeittherapie mit einer reduzierten Dosis von Abemaciclib durchzuführen, um zu untersuchen, ob auch niedrigere Dosen in Kombination mit MitA zur Eliminierung aller Tumorzellen führen und sich der synergistische Effekt auch im Langzeitansatz bestätigt.

Dinaciclib hingegen war weniger effektiv in der Langzeittherapie und erzielte nur bei einer von vier GBM-Linien antitumorale Wirksamkeit. Dies war unerwartet, da in den 2D-Kurzzeitversuchen deutliche zytotoxische Effekte beobachtet wurden, und lässt vermuten, dass die GBM-Zellen rasch Resistenzen gegen Dinaciclib entwickeln bzw. einzelne Zellklone bereits vor der Therapie intrinsisch resistent sind. Diese Daten bestätigen Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe [121]. Da die Therapie im Sphäroid-Modell ebenfalls weniger effektiv war, muss die Wirksamkeit von Dinaciclib als Monotherapie zukünftig eingehender untersucht werden.

Mita *et al.* führten eine Phase I Studie mit Dinaciclib über drei Wochen an Patienten, die an verschiedenen Tumorentitäten erkrankt waren, durch [94]. In der Studie konnte keine Reduktion der Tumorgroße festgestellt werden. Somit ist bislang nicht endgültig geklärt, ob Dinaciclib als Substanz zur Therapie des GBM in Betracht kommt.

Die Kombination mit MitA war mit einer Reduktion der vitalen Tumorzellen um 30 % deutlich effektiver als die jeweiligen Monotherapien. Dies bestätigt den synergistischen Effekt von Dinaciclib in Kombination mit MitA, der bereits in den Kurzzeitmodellen beobachtet wurde. Wie bereits erläutert, hemmt MitA über Sp1 auch die Proliferation der Tumorzellen durch Beeinflussung des Zellzyklus.

Dinaciclib als global wirkender CDKI inhibiert die einzelnen CDKs weniger effektiv als selektive CDKIs wie Abemaciclib. Dies könnte zur Abschwächung der antitumoralen Wirksamkeit führen [94, 131]. Möglicherweise kann durch die Kombination mit MitA die Progression des Zellzyklus effektiver unterbunden werden.

Somit geht aus den Ergebnissen hervor, dass einer Monotherapie mit Dinaciclib eine Kombinationstherapie mit MitA vorzuziehen ist. Hinsichtlich potentiell kumulativer toxischer Nebenwirkungen sollten zunächst umfassende *in vivo* Studien durchgeführt werden.

### 5.2.1.2 TMZ

---

Die Kurzzeitversuche zeigten bereits, dass die in dieser Arbeit untersuchten GBM-Zellen nahezu resistent gegenüber einer TMZ-Therapie waren. Jedoch führte eine simultane Kombinationstherapie mit MitA zu einer signifikanten Abnahme der vitalen Tumorzellen. In den weiterführenden Untersuchungen wurden die GBM-Zellen über 5 Wochen mit TMZ behandelt, um die Wirksamkeit nach längerer Behandlung zu evaluieren. Dies führte jedoch ebenfalls nicht zur Verstärkung der Effekte. Ebenso waren morphologisch keine Veränderungen erkennbar. Dies entspricht den Beobachtungen von Riess *et al.* und bestätigt die intrinsische Resistenz der verwendeten GBM-Zelllinien gegenüber TMZ, welche für andere GBM ebenfalls in der Literatur dokumentiert sind [74, 120].

Der MGMT-Methylierungsstatus ist nicht der einzige Faktor, der für die Resistenz der Tumorzellen verantwortlich ist. So waren die GBM-Zelllinien, die in dieser Arbeit untersucht wurden, unabhängig von ihrem MGMT-Methylierungsstatus resistent gegenüber einer TMZ-Monotherapie. Bocangel *et al.* fanden heraus, dass eine dysfunktionale p53 Antwort auf eine DNA-Schädigung unabhängig von der MGMT Aktivität zur Resistenzentwicklung beiträgt [13]. Dennoch zeigte eine Reihe von Studien, dass intrinsisch resistente GBM-Zellen vermehrt MGMT exprimieren [52, 54, 56, 144]. Eine größere Menge von MGMT-Proteinen kann jedoch auch in Zellen vorliegen, die einen methylierten MGMT-Promoter aufweisen [74]. So ist prognostisch für das Ansprechen auf eine TMZ-Therapie neben dem MGMT-Methylierungsstatus auch die MGMT-Proteinmenge entscheidend [148, 150]. Darüber hinaus können aber auch andere Proteine für die Resistenz gegen alkylierende Zytostatika verantwortlich sein. Dazu zählt die Alkylpurin-DNA-N-Glycolase [1].

Um intrinsisch resistente GBM zu therapieren, werden insbesondere zytostatische Testsubstanzen angewandt, die MGMT inhibieren oder die Expression von MGMT in den Tumorzellen reduzieren und dadurch die DNA-Reparaturmechanismen hemmen [66, 74].

Die Studie von Lin *et al.* lieferte Hinweise, dass MitA eine inhibierende Wirkung auf DNA-Methyltransferasen in Lungenkarzinomzellen hat und dadurch die Sensibilität für alkylierende Substanzen steigern könnte [78].



Bereits die Ergebnisse aus den Kurzzeitversuchen zeigten eine synergistische Wirkung von TMZ in Kombination mit MitA. Dies konnte auch bei wiederholter Gabe der Kombinationstherapie im Langzeitversuch bestätigt werden.

Bei drei von vier Zelllinien konnte eine bis zu 80 %ige Reduktion der vitalen Tumorzellen beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, wie von Lin *et al.* beschrieben, dass MitA das Potential hat, eine TMZ-Resistenz zu überwinden [78]. Lin *et al.* fanden heraus, dass die Inhibierung der DNA-Methyltransferase nicht allein über die Hemmung von Sp1 abläuft, sondern dass MitA auch direkt inhibierend auf die Reparaturenzyme wirkt [78].

Andererseits konnten Seznec *et al.* keine Sensibilisierung von Gliom-Zellen gegenüber TMZ durch MitA feststellen [130]. Da es bisher lediglich wenige Studien gibt, die eine Kombination von TMZ und MitA näher untersuchen, kann keine klare Aussage bezüglich der Effektivität getätigt werden. Jedoch weisen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass MitA eine Therapieoption für TMZ-resistente GBM-Zellen darstellen könnte.

### 5.2.1.3 SPYADI

---

In den Kurzzeitversuchen zeigte sich, dass entgegen der ursprünglichen Erwartung die sequentielle Kombination aus MitA und SpyADI der Monotherapie unterlegen war. Um zu untersuchen, ob eine Vortherapie mit den jeweiligen Testsubstanzen über fünf Zyklen die Wirksamkeit steigert, wurden Langzeitversuche durchgeführt.

Vorstudien wiesen darauf hin, dass eine ADI-Monotherapie über einen längeren Zeitraum zu einer Resistenzinduktion durch die Re-Expression des ASS1-Gens führen kann [86, 115, 141]. Zur Überprüfung dieser präklinischen Beobachtungen wurde eine Monotherapie mit SpyADI über 10 Zyklen durchgeführt.

Nach den fünf Therapiewochen konnte eine Reduktion der vitalen GBM-Zellen festgestellt werden, die den Ergebnissen aus den Kurzzeitversuchen entsprach. Dies ist vergleichbar mit vorherigen Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe [88]. Zusätzlich konnte bereits in einer früheren Studie gezeigt werden, dass sich die Expressionsprofile von Genen, die für den Arginin-Stoffwechsel entscheidend sind und das Ansprechen auf eine ADI-Therapie bedingen, im Laufe der Langzeittherapie nicht verändern [85, 88]. Die oftmals in Studien verwendete ADI-PEG 20 induziert metabolische Veränderungen in Tumorzellen. Somit könnte die Verwendung der SpyADI, die in dieser Arbeit eingesetzt wurde, im Hinblick auf eine verminderte Resistenzentwicklung von Vorteil sein [120].

In Vorstudien wurde festgestellt, dass eine Vortherapie mit ADI die Tumorzellen vulnerabler für darauffolgend applizierte Therapeutika macht [32, 85]. Eine sequentielle Therapie bestehend aus fünf Zyklen SpyADI, gefolgt von fünf Zyklen MitA war im Vergleich zu den jeweiligen Monotherapien nicht effektiver. Somit scheint eine Vortherapie mit SpyADI die GBM-Zellen nicht für eine folgende MitA Therapie zu sensibilisieren.

Im Gegensatz dazu war eine simultane Behandlung beider Substanzen deutlich effektiver. Dies bestätigt die Befunde aus den Kurzzeitversuchen, die eine synergistische Wirkung von SpyADI und MitA nahelegten. Eine wiederholte Therapie mit SpyADI induziert in den therapierten Zellen keine typische Autophagie mehr. Es kommt zu einer atypischen Autophagie, zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und daraus folgend zur DNA-Schädigung und zum Absterben der Zellen [20]. Über die Hemmung von Sp1 beeinflusst MitA den mTOR Signalweg und wirkt durch die Induktion pro-apoptotischer Gene zytotoxisch [24]. Durch die Arginin-Deprivation in den Tumorzellen wird der mTOR Signalweg gehemmt und die Tumorzellen werden apoptotisch [120]. Saha *et al.* zeigten, dass MitA die ROS-assoziierte zytotoxische Wirkung von Doxorubicin verstärkt [124]. Dies könnte auch die Effektivitätssteigerung der simultanen Kombination aus MitA und SpyADI erklären und sollte in weiterführenden Untersuchungen näher charakterisiert werden.

---

### 5.2.2 KEINE RESISTENZENTWICKLUNG UNTER EINER MONOTHERAPIE MIT MITA

---

Da MitA bezüglich der Ergebnisse in dieser Arbeit und in Vorstudien ein potentiell effektives Therapeutikum zur Behandlung des GBM sein könnte, ist es entscheidend, zu untersuchen, ob eine MitA Therapie über einen längeren Zeitraum eine Resistenzbildung induziert. Zum einen wurden die Tumorzellen mit MitA wie in den Kombinationstherapien über 10 Zyklen therapiert, zum anderen wurde ein spezielles Therapieschema entwickelt, um die Resistenzentwicklung eingehender zu untersuchen. In diesem Therapieschema wurde ein Teil der Zellen mehr als 7 Wochen mit der niedrigen IC<sub>20</sub>-Dosis (4 nM) von MitA therapiert. Der andere Teil wurde nach 10 Behandlungszyklen für 5 Wochen ohne Behandlung kultiviert. Danach erfolgte eine Dosisescalation, um zu untersuchen, wie sensitiv die Zellen auf MitA reagierten und ob es einen Unterschied zwischen den kontinuierlich behandelten oder den regenerierten Zellen gab.

Nach 5 Wochen Therapie mit MitA wiesen die GBM-Zellen morphologische Veränderungen auf und es waren durchschnittlich 50 % der Tumorzellen vital. Somit führte eine wiederholte Therapie mit einer niedrigen Dosis von MitA zu einer Wirksteigerung im Vergleich zu den Kurzzeitversuchen.

In der speziellen Resistenztestung zeigte sich, dass die GBM-Zellen trotz des langen Therapiezeitraums sensibel auf ansteigende Dosen MitA reagierten. In der Literatur fand sich bisher keine Studie, die die Resistenzentwicklung gegen MitA nach kontinuierlicher Therapie untersucht hatte. Grundlage für die fehlende Resistenzentwicklung könnte das globale Wirkspektrum von MitA sein. Tagashira *et al.* zeigten, dass MitA die Expression der *MDR1* Gene hemmt. Proteine der MDR-Familie sind u.a. für die Resistenz gegen verschiedene Zytostatika verantwortlich [142].

Bisher wurde dies in Verbindung mit der chemosensibilisierenden Funktion von MitA gebracht. Möglicherweise könnte es aber auch die Ursache für die fehlende Resistenzentwicklung gegenüber MitA sein. Dieser Aspekt könnte in kommenden Studien näher untersucht werden. Letztendlich muss kritisch bemerkt werden, dass eine Therapiezeit über maximal 15 Zyklen nicht vollends repräsentativ ist, um endgültig eine Aussage über die Resistenzentwicklung treffen zu können. Die Ergebnisse zeigen außerdem, dass trotz der hoch dosierten Therapie die Eliminierung aller Tumorzellen nicht möglich war und die GBM-Zellen, die länger mit MitA behandelt wurden, tendenziell weniger sensibel auf die ansteigenden MitA Dosen reagierten. Daraus hätten sich perspektivisch resistente Kolonien entwickeln können. Da die Resistenzentwicklung für die klinische Anwendung von MitA bedeutsam ist, sollten die vitalen Tumorzellen nach langer Therapie zukünftig eingehender charakterisiert werden. Dennoch sind die Ergebnisse richtungsweisend und zeigen auf, dass MitA insbesondere nach wiederholter Therapie mit niedrigen Dosen sehr wirksam ist.

### **5.3 FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DER ANTITUMORALEN EFFEKTE DER ZYTOSTATISCHEN TESTSUBSTANZEN**

---

#### **5.3.1 INHIBIERUNG DER ZELLMOTILITÄT**

---

Das GBM ist ein sehr proliferativ wachsender Tumor, der gesundes Hirngewebe infiltriert und wichtige Hirnstrukturen zerstört. Deshalb ist es von Interesse, ob durch die verwendeten zytostatischen Testsubstanzen die Migrationsfähigkeit der Tumorzellen inhibiert werden kann. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von MitA und ADI auf die Invasivität der GBM-Zellen untersucht.

Studien belegen eine inhibierende Wirkung von MitA auf die Motilität von Tumorzellen. MitA soll die Migration und Proliferation von GBM-Zellen hemmen, indem es u.a. die Synthese von Matrixmetalloproteinen (MMP) beeinflusst und dadurch zu einem verminderten invadierenden Verhalten führt [7, 23, 45, 130].

Sowohl im 2D-Modell als auch im Sphäroid-Modell konnte gezeigt werden, dass MitA die Invasion der Tumorzellen inhibiert. Auch Seznec *et al.* konnten einen hemmenden Effekt von MitA im Transwell-Migrations-Assay auf die Motilität von GBM-Zellen feststellen [130]. Ferner wurden ähnliche Effekte auch bei anderen Tumorentitäten beschrieben [36, 78].

SpyADI hingegen, weder alleine noch in Kombination mit MitA, hatte keinen (3D) bzw. nur einen marginalen Einfluss auf die Invasivität. Bisher gibt es kaum Studien, die den Einfluss einer Arginin-Depletion auf das infiltrierende Verhalten im Tumor untersucht haben. Lediglich Tsai *et al.* zeigten an Magenkarzinomzellen, dass ASS1 über die Inhibition von Autophagie und lysosomaler Aktivität die Fähigkeit der Tumorzellen, das umliegende Gewebe zu

infiltrieren, unterstützt [147]. Dies führt des Weiteren zu einer Akkumulation von aktivem  $\beta$ -Catenin, Snail und Twist, die ebenfalls die Zellmotilität beeinflussen [147]. Ein Mangel an Arginin würde folglich zu einer Hemmung der Tumordinvasion führen. Dies konnte für die verwendeten GBM-Zellen in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Möglicherweise könnte der Einfluss der Arginin-Depletion auf die Zellmigration tumorspezifisch sein.

---

### 5.3.2 CHARAKTERISIERUNG DER ZELLTODINDUKTION

---

#### 5.3.2.1 APOPTOSE UND NEKROSE

---

Apoptose ist ein programmierter Zelltod, der für die Eliminierung beschädigter Körperzellen verantwortlich ist, wenn diese beispielsweise während des Zellzyklus einen DNA-Schaden erleiden. Die Einleitung der Apoptose ist komplex und gliedert sich in einen extrinsischen und einen intrinsischen Weg. Letztendlich werden Caspasen aktiviert, die zu apoptotischen Veränderungen der Zellen führen. Die apoptotische Körperzelle wird vom Immunsystem erkannt und beseitigt. Es erfolgt jedoch keine generelle Aktivierung des Immunsystems. In der Pathogenese von Tumoren kommt es häufig zu einer Dysregulation der Apoptose mit einer Überexpression von anti-apoptotischen Faktoren [114].

Die Nekrose hingegen ist ein unorganisierter Zelltod. Die Zellorganellen schwellen an, die Zellmembran rupturiert und es werden unkontrolliert Moleküle, wie die Laktat-Dehydrogenase, freigesetzt. Dies löst eine Immunreaktion aus und es kommt zu inflammatorischen Reaktionen [75]. In dieser Arbeit ergaben sich deutliche Unterschiede hinsichtlich des Ausmaßes und der Art der Zelltodinduktion in den untersuchten Zelllinien. Die GBM-Zelllinien reagierten heterogen auf eine antitumorale Therapie. Insbesondere bei HROG05 war bereits ein großer Teil der Kontrollzellen avital. Dies bestätigte sich in allen unabhängigen Versuchen. Vor Durchführung des Apoptose-/Nekrose-Assays wurden die Zellen mit Trypanblau angefärbt, um die Tumorzellen hinsichtlich ihrer Vitalität zu überprüfen. Dort konnten keine Auffälligkeiten festgestellt werden. Möglicherweise ist die Zellmembran der HROG05-Zellen bereits im vitalen Zustand durchlässig für den Farbstoff PI oder die Tumorzellen wurden während des Färbeprozesses geschädigt.

Eine Niedrigdosis-MitA Therapie führte zu gleichen Teilen zur Apoptose und Nekrose. Mit steigender Dosis von MitA dominierte die Nekrose. Choi *et al.* untersuchten die Induktion der Apoptose-Mechanismen unter MitA Therapie und stellten fest, dass MitA ein effektiver Inhibitor des Tumorwachstums durch Beeinflussung des TOR/Mcl-1/t-Bid Signalwegs ist [24]. Weitere Studien belegen die pro-apoptotische Wirkung von MitA [30, 73, 130]. Vergleichbare Effekte wurden auch durch Abemaciclib erzielt, wobei die Ausprägung zelllinienspezifisch war. Beispielsweise führte die Therapie bei HROG63 zur Apoptose und bei HROG05 zur Nekrose.

Es ist bekannt, dass die CDKIs durch die Auslösung eines Zellzyklusarrests zur Apoptose-Induktion führen [10]. Die Therapie der Tumorzellen mit Dinaciclib sowie die Dinaciclib Kombinationen führten hauptsächlich zur Nekrose. Dies bestätigt Vorbefunde bei GBM und Kopf-Hals-Tumoren [38, 121]. Möglicherweise sind das breite Wirkspektrum und die höhere Toxizität von Dinaciclib dafür verantwortlich, dass vermehrt Tumorzellen unter der Therapie nekrotisch werden.

### 5.3.2.2 IMMUNOGENER ZELLTOD

---

Chemotherapeutika können zu einer immunogenen Apoptose in Tumorzellen führen. Die sterbenden Tumorzellen werden anhand der Translokation von CalR auf die Zelloberfläche von dendritischen Zellen erkannt. Diese aktivieren zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die gegen den Tumor gerichtet sind. Einige Zytostatika, darunter Anthrazykline, verstärken die Translokation von CalR und erhöhen dadurch die Tumorimmunogenität [102, 158, 161].

Die hier verwendeten zytostatischen Testsubstanzen lösten in unterschiedlichem Ausmaß einen immunogenen Zelltod aus. In Analogie zu den Befunden des Apoptose-/Nekrose-Assays waren die Effekte auf die CalR Translokation heterogen. Dies verdeutlicht abermals die Vielfältigkeit dieser Tumorentität.

Insbesondere Abemaciclib und die Kombination aus Abemaciclib und MitA führten zu einer verstärkten CalR Translokation. Durch die Therapie waren bei HROG05 bis zu einem Drittel der untersuchten GBM-Zellen CalR<sup>+</sup>. MitA und SpyADI führten zu einem geringen Anstieg der CalR Translokation. Möglicherweise ist aber bereits eine geringe Menge an CalR<sup>+</sup> Zellen ausreichend, um die Immunogenität des Tumors zu erhöhen. Es existieren bereits Studien, die den Einfluss von Abemaciclib auf das Immunmilieu im Tumor untersuchten [112]. So stellten Schaer *et al.* im murinen Mamma-Ca-Modell eine vermehrte T-Zell-Infiltration ins Tumorgewebe durch Abemaciclib fest [126].

In Kombination mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit lässt sich schlussfolgern, dass Abemaciclib die Immuntoleranz des GBM reduzieren könnte. Hinsichtlich der Therapie mit MitA und SpyADI müssen noch weitere Untersuchungen folgen, um eine Aussage über den Einfluss dieser beiden Substanzen auf die Tumorimmunogenität treffen zu können.

### 5.3.3 EINFLUSS DER ZYTOSTATISCHEN TESTSUBSTANZEN AUF DEN IMMUNPHÄNOTYP

---

Aufgrund der zuvor beschriebenen Erhöhung der Tumorimmunogenität durch CalR Translokation wurde zusätzlich eine Immunphänotypisierung an den GBM-Zelllinien vorgenommen, um zu untersuchen, ob die Abundanz immunregulatorischer Marker verändert wird.

Immuncheckpoints, wie CD152 (CTLA-4), CD274 (PD-L1) und CD279 (PD1), sind in jüngster Zeit Angriffspunkte für Tumorthapien geworden. Diese Moleküle verhindern eine suffiziente Reaktion des Immunsystems gegen den Tumor.

Inhibitoren dieser Immuncheckpoints führen zur (Re-) Aktivierung des Immunsystems gegen den Tumor und revolutionierten die Therapie einiger Tumorentitäten, wie des malignen Melanoms [109, 159]. Der Einsatz von Immuntherapien zur Behandlung des GBM ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Das GBM zählt jedoch nicht zu den Malignomen, die klassischerweise einer Immuntherapie zugänglich sind. Daher sollten Kombinationsstrategien eingesetzt werden, die zur Erhöhung der Tumorimmunogenität beitragen [89].

In dieser Arbeit wurden die Expressionsprofile einiger Immuncheckpoints untersucht, um herauszufinden, ob diese potentielle therapieassoziierte Angriffspunkte für Immuncheckpoint-Inhibitoren darstellen. Dabei stellte sich heraus, dass weniger als 5 % der GBM-Zellen die untersuchten immunregulatorischen Marker exprimierten. Dies ist konsistent zu den Untersuchungen von Nduom *et al.*, in denen 2,7 % der untersuchten GBM-Zellen PDL-1<sup>+</sup> waren [97]. Des Weiteren spielen verschiedenste komplexe Signalwege in der immunregulatorischen Pathogenese des GBM eine Rolle. Im Gegensatz dazu konnte in vorangegangenen Arbeiten von Berghoff *et al.* bei bis zu 80 % der GBM-Zellen PD-L1 nachgewiesen werden [9]. Somit ist die derzeitige Datenlage bezüglich der Expressionsprofile von Immuncheckpoints im GBM sehr uneinheitlich. Bisher ist auch der prognostische Stellenwert der Expression der immunregulatorischen Marker unklar [59].

Die hier verwendeten Therapeutika hatten keinen Einfluss auf die Expression der Immuncheckpoints. Demgegenüber führte die Behandlung von Abemaciclib zu einer leichten Hochregulation von MHC I, welche jedoch durch die anderen Therapien nicht hervorgerufen wurde. Indraccolo *et al.* untersuchten die Expression von MHC I in verschiedenen GBM-Tumoren und stellten fest, dass eine große Heterogenität in den Expressionsprofilen bestand, die zwischen 0 - 95 % schwankte [60]. Der Stellenwert von MHC I als Marker für das Ansprechen auf eine Therapie mit Checkpointinhibitoren bleibt weiterhin unklar. Bei Charles *et al.* führte eine Low-Dose Therapie mit Abemaciclib auch zu einer erhöhten MHC I Translokation auf Mammakarzinom-Zellen [21]. Möglicherweise ist Abemaciclib ein Induktor für die MHC I Expression und aktiviert dadurch die zytotoxische Immunantwort gegen den Tumor. Dies ist zusammen mit der erhöhten CalR Translokation ein weiteres Argument dafür, dass Abemaciclib die Immuntoleranz gegenüber dem GBM reduzieren könnte.

Weiterhin wurde die Abundanz des mesenchymalen Stammzellmarkers CD133 untersucht. CD133 ist ein Transmembranglykoprotein, dessen Funktion noch nicht endgültig geklärt ist. CD133 wird jedoch vermehrt in neuronalen Stammzellen exprimiert und CD133 positive Tumoren haben eine höhere Rezidiv- und Proliferationsrate. Somit wird CD133 als möglicher prognostischer Marker für die Krankheitsprogression des GBM gehandelt [6, 39, 77]. Die untersuchten GBM-Zelllinien waren überwiegend CD133<sup>-</sup>.

Dies ging auch aus den Untersuchungen von Matzack hervor [88]. Beier *et al.* beobachteten, dass CD133<sup>-</sup> Tumorzellen *in vitro* adhären auf dem Boden der Wells wuchsen, wie es auch bei den GBM-Zelllinien in dieser Arbeit der Fall war, während CD133<sup>+</sup> GBM-Zellen ein inadhärentes, neurosphärisches Wachstum aufwiesen [6]. Unter Therapie mit den zytostatischen Testsubstanzen änderte sich das Expressionsprofil von CD133 nicht.

#### 5.3.4 KEINE VERÄNDERTE EXPRESSION VON STAMMZELLMARKERN

---

Neuronale Stammzellen spielen in der Pathogenese des GBM eine wichtige Rolle. So sind stammzellähnliche Eigenschaften mit einer schlechteren Prognose durch eine Therapieresistenz, ein schnelleres Fortschreiten der Erkrankung und eine höhere Rezidivrate assoziiert [119, 138]. Folglich sollte untersucht werden, ob die Stammzellmarker GFAP, A2B5, Nanog und Oct-4 in der untersuchten GBM-Zelllinie nachweisbar sind und ob die Therapie das Expressionsprofil beeinflusst.

GFAP, ein astrozytäres Intermediärfilament, ist ein klassischer Marker für Astrozytome. Es wird physiologisch in ausgereiften Astrozyten gefunden. Deshalb wurde lange angenommen, dass eine größere Menge von GFAP in zentralnervösen Tumoren mit einem höheren Differenzierungsgrad und mit einer besseren Prognose einhergeht. Jedoch wird GFAP auch von neuronalen Stammzellen gebildet [92, 149]. Es zeigte sich, dass unter Therapie im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle vermehrt GFAP exprimiert wurde. Diese Expressionsveränderung wurde durch eine morphologische Veränderung des Zytoskeletts begleitet. Es kann jedoch nicht daraus geschlossen werden, dass die höheren Werte von GFAP mit einer Induktion von Stammzeleigenschaften einhergehen. Van Bodegraven *et al.* fanden heraus, dass es GFAP-Subtypen-abhängig ist, welche Tumoreigenschaften damit verbunden sind [149].

Die Abundanz der Transkriptionsfaktoren A2B5, Nanog und Oct-4 in GBM-Zelllinien wurde bereits in Studien untersucht [145, 157]. Sie sind assoziiert mit stammzellähnlichen Eigenschaften und hohe Expressionslevel gehen mit einer schlechteren Prognose einher [46]. In der hier untersuchten GBM-Zelllinie (HROG05) wurden diese Stammzellmarker sowohl in der unbehandelten Kontrolle als auch unter Therapie nicht oder nur sehr schwach exprimiert. Da in der Kontrolle die Stammzellmarker nicht exprimiert wurden, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die zytostatischen Testsubstanzen Stammzeleigenschaften supprimieren. Die Expression von Stammzellmarkern ist zelllinienspezifisch. Folglich müsste ein größeres Kollektiv an GBM-Zelllinien untersucht werden, um den Einfluss der Substanzen einzuschätzen. Eine deutliche Induktion der Stammzellmarker konnte jedoch nicht beobachtet werden.

## VI. SCHLUSSTEIL

---

### 6.1 SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

---

Ziel dieser Arbeit war es, die Effektivität von MitA als Therapeutikum von GBM-Zellen *in vitro* zu überprüfen. Es zeigte sich, dass bereits sehr niedrige Dosen von MitA das Tumorstadium effektiv hemmen. Des Weiteren konnte bestätigt werden, dass MitA eine radiosensibilisierende Wirkung hat. Dies ist von klinischem Interesse, da die Radiotherapie einen wesentlichen Bestandteil der konventionellen GBM-Therapie darstellt. Aus den Kombinationsversuchen wurde ersichtlich, dass MitA ein idealer Kombinationspartner ist, der mit allen untersuchten Substanzen synergistisch wirkt. Es konnte ein zusätzlicher zytotoxischer Effekt in Kombination mit TMZ beobachtet werden. Somit könnte diese Kombination zu einer Augmentation des Standardchemotherapie-Regimes, insbesondere bei TMZ resistenten GBM-Fällen, eingesetzt werden. Die Mechanismen, die für eine Sensibilisierung der GBM-Zellen gegenüber TMZ verantwortlich sind, sollten zukünftig näher erforscht werden.

Besonders effektiv zeigte sich die Kombination von MitA und Abemaciclib. Sowohl im Kurzzeit- als auch insbesondere im Langzeitmodell wurden nahezu alle Tumorzellen eliminiert. Diese Kombination führte zu Apoptose, Nekrose und immunogenem Zelltod. Dies könnte zukünftig für die Kombination mit Immuntherapien interessant sein, die bislang in der Therapie des GBM weniger erfolgreich sind. Die Kombinationen von MitA mit SpyADI und Dinaciclib waren weniger effektiv als die Kombination mit Abemaciclib, wirkten jedoch ebenfalls synergistisch. Die Kombination aus MitA und SpyADI zeigte sich lediglich durch eine simultane Gabe als effektiv, sequentiell konnte keine zytostatische Wirkung beobachtet werden. Es ist weiterhin fraglich und bedarf weiterer Forschung, ob die Kombination aus MitA und SpyADI einen Stellenwert in der GBM-Therapie haben sollte. Genauso verhielt es sich mit der Kombination aus MitA und Dinaciclib, die insbesondere im Langzeitmodell eine geringere antitumorale Wirksamkeit aufwies.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass MitA potentiell als Therapeutikum, insbesondere in Kombination mit anderen zytostatischen Testsubstanzen, in Frage kommt. Vor allem die Entwicklung von MitA Analoga, die eine verminderte Toxizität aufweisen, machen MitA für die klinische Anwendung interessant. Zukünftig müssen Xenograftmodelle zeigen, ob sich die *in vitro* Beobachtungen hinsichtlich der Effektivität MitAs auch *in vivo* bestätigen lassen.



## 6.2 ZUSAMMENFASSUNG

---

Das GBM ist der häufigste primäre maligne Hirntumor, dessen Diagnose mit einer relevanten Lebenszeitverkürzung einhergeht. Die therapeutischen Optionen sind bislang begrenzt. Es ist von großer Relevanz, neue Therapeutika zu detektieren, die die Prognose der erkrankten Patienten verbessern können. Vorstudien zeigten, dass MitA, ein antineoplastisches Antibiotikum, das den Transkriptionsfaktor Sp1 hemmt, das Potential hat, effektiv das Wachstum von GBM-Zellen zu inhibieren. MitA gilt als radiosensibilisierend und durch das breite Wirkspektrum ist MitA ein geeigneter Kombinationspartner für andere zytostatische Testsubstanzen. Um MitA potentiell auch wiederholt zu applizieren, wurde im Langzeitansatz getestet, ob sich nach mehrmaliger Gabe Resistenzen ausbilden.

In dieser Arbeit zeigte sich, dass MitA konzentrationsabhängig zytotoxisch wirkt. Bereits niedrige Dosen führten zu einer signifikanten Viabilitätsabnahme. In Kombination mit einer Radiotherapie bestätigte sich die strahlensensibilisierende Wirkung von MitA. Unter Langzeittherapie über 7 Wochen entwickelten sich keine Resistenzen. Die Funktionsanalysen ergaben, dass MitA die Tumorzellinvasion inhibierte und apoptotische und nekrotische Reaktionen auslöste. Jedoch hatte MitA lediglich einen geringen Einfluss auf den Immunphänotyp und veränderte die Immunogenität des Tumors nicht.

MitA wurde mit TMZ, den CDKIs Abemaciclib und Dinaciclib sowie mit SpyADI kombiniert. Die Kombinationsversuche wurden im 2D- sowie im 3D-Sphäroid-Modell, im Kurzzeit- und Langzeitansatz durchgeführt. MitA wirkte mit allen zytostatischen Testsubstanzen in der simultanen Therapie synergistisch. Die Kombination aus MitA und den CDKIs, insbesondere Abemaciclib, inhibierte in den Kurzzeit- sowie in den Langzeitversuchen die Tumorzellviabilität am effektivsten. Diese Kombination führte auch als einzige Therapie zu einer Steigerung der Immunogenität der GBM-Zellen durch die vermehrte Translokation von CalR und Hochregulation von MHC I. Die Kombinationstherapie aus MitA und TMZ führte zu einer signifikant größeren Reduktion der vitalen Tumorzellen als eine Monotherapie mit TMZ, die das Wachstum der Tumorzellen nicht inhibierte. Des Weiteren wurde MitA mit SpyADI kombiniert. Diese Kombinationstherapie wurde in einem sequentiellen sowie im simultanen Therapieschema durchgeführt, wobei sich lediglich die simultane Kombination als wirksam erwies. Es zeigte sich, dass eine Therapie mit SpyADI sowie in Kombination mit MitA nur zu einer tendenziellen Abnahme der Tumorzellinvasion führte. Der Immunphänotyp wurde durch diese Kombination kaum beeinflusst. Keine der untersuchten Therapien führte zu einer signifikanten Änderung der Expression von Stammzellmarkern.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

1. Agnihotri, S. *et al.* (2012). "Alkylpurine-DNA-N-glycosylase confers resistance to temozolomide in xenograft models of glioblastoma multiforme and is associated with poor survival in patients". *J Clin Invest* 122(1):253–266. doi:10.1172/JCI59334
2. Agnihotri, S. *et al.* (2013). "Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies".  
*Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 61(1):25–41. doi:10.1007/s00005-012-0203-0
3. Aldape, K. *et al.* (2015). "Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers".  
*Acta Neuropathol* 129(6):829–848. doi:10.1007/s00401-015-1432-1
4. Ascierto, P. *et al.* (2005). "Pegylated arginine deiminase treatment of patients with metastatic melanoma: results from phase I and II studies".  
*J Clin Oncol* 23(30):7660–7668. doi:10.1200/JCO.2005.02.0933
5. Asghar, U. *et al.* (2015). "The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy". *Nat Rev Drug Discov* 14(2):130–146. doi:10.1038/nrd4504
6. Beier, D. *et al.* (2007). "CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles".  
*Cancer Res* 67(9):4010–4015. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4180
7. Beishline, K.; Azizkhan-Clifford, J. (2015). "Sp1 and the 'hallmarks of cancer'".  
*The FEBS Journal* 282(2):224–258. doi:10.1111/febs.13148
8. Beishline, K. *et al.* (2012). "Sp1 Facilitates DNA Double-Strand Break Repair through a Nontranscriptional Mechanism".  
*Mol Cell Biol* 32(18):3790–3799. doi:10.1128/MCB.00049-12
9. Berghoff, A.S. *et al.* (2015). "Programmed death ligand 1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes in glioblastoma".  
*Neuro-oncology* 17(8):1064–1075. doi:10.1093/neuonc/nou307
10. Besson, A.; Dowdy, S.F.; Roberts, J.M. (2008). "CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond". *Dev Cell* 14(2):159–169. doi:10.1016/j.devcel.2008.01.013
11. Bliss, C.I. (1939). "The Toxicity of Poisons Applied Jointly".  
*Annals of Applied Biology* 26(3):585–615. doi:10.1111/j.1744-7348.1939.tb06990.x
12. Blume, S.W. *et al.* (1991). "Mithramycin inhibits SP1 binding and selectively inhibits transcriptional activity of the dihydrofolate reductase gene in vitro and in vivo".  
*J Clin Invest* 88(5):1613–1621. doi:10.1172/JCI115474
13. Bocangel, D.B. *et al.* (2002). "Multifaceted resistance of gliomas to temozolomide".  
*Clin Cancer Res* 8(8):2725–2734
14. Böcker, W.; Heitz, P.U. (Hrsg) (2012) Pathologie. 5. Aufl. Elsevier, München

15. Brennan, C. W. *et al.* (2013). "The somatic genomic landscape of glioblastoma". *Cell* 155(2):462–477. doi:10.1016/j.cell.2013.09.034
16. Bretones, G. *et al.* (2015). "Myc and cell cycle control". *Biochem Biophys Acta* 1849(5):506-16. doi: 10.1016/j.bbagr.2014.03.013
17. Butler, M. *et al.* (2020). "MGMT Status as a Clinical Biomarker in Glioblastoma". *Trends in cancer* 6(5):380–391. doi:10.1016/j.trecan.2020.02.010
18. Cen, L. *et al.* (2012). "p16-Cdk4-Rb axis controls sensitivity to a cyclin-dependent kinase inhibitor PD0332991 in glioblastoma xenograft cells". *Neuro-oncology* 14(7):870–881. doi:10.1093/neuonc/nos114
19. Chang, K. *et al.* (2017). "Stress stimuli induce cancer-stemness gene expression via Sp1 activation leading to therapeutic resistance in glioblastoma". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 493(1):14–19. doi:10.1016/j.bbrc.2017.09.095
20. Changou, C.A. *et al.* (2014). "Arginine starvation-associated atypical cellular death involves mitochondrial dysfunction, nuclear DNA leakage, and chromatin autophagy". *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(39):14147–14152. doi:10.1073/pnas.1404171111
21. Charles, A. *et al.* (2021). "Low-dose CDK4/6 inhibitors induce presentation of pathway specific MHC ligands as potential targets for cancer immunotherapy". *Oncoimmunology* 10(1):1916243. doi:10.1080/2162402X.2021.1916243
22. Chen, X. *et al.* (2015). "Cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib potently synergizes with cisplatin in preclinical models of ovarian cancer". *Oncotarget* 6(17):14926–14939. doi:10.18632/oncotarget.3717
23. Chen, Y. *et al.* (2019). "High-level Sp1 is Associated with Proliferation, Invasion, and Poor Prognosis in Astrocytoma". *Pathology oncology research* 25(3):1003–1013. doi:10.1007/s12253-018-0422-8
24. Choi, E. *et al.* (2013). "Mithramycin A induces apoptosis by regulating the mTOR/Mcl-1/tBid pathway in androgen-independent prostate cancer cells". *J Clin Biochem Nutr* 53(2):89–93. doi:10.3164/jc.13-28
25. Choi, E. *et al.* (2014). "Modulation of specificity protein 1 by mithramycin A as a novel therapeutic strategy for cervical cancer". *Sci Rep* 4:7162. doi:10.1038/srep07162
26. Cicenas, J.; Valius, M. (2011). "The CDK inhibitors in cancer research and therapy". *J Cancer Res Clin Oncol* 137(10):1409–1418. doi:10.1007/s00432-011-1039-4
27. Corporation P CellTiter-Glo 3D Cell Viability Assay Technical Manual, TM412
28. Dejaegher, J. *et al.* (2021). "DNA methylation based glioblastoma subclassification is related to tumoral T-cell infiltration and patient survival". *Neuro-oncology* 23(2):240–250. doi:10.1093/neuonc/noaa247
29. Demuth, T.; Berens, M.E. (2004). "Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion". *J Neurooncol* 70(2):217–228. doi:10.1007/s11060-004-2751-6

30. Duverger, V. *et al.* (2004). "The anticancer drug mithramycin A sensitises tumour cells to apoptosis induced by tumour necrosis factor (TNF)".  
*Br J Cancer* 90(10):2025–2031. doi:10.1038/sj.bjc.6601824
31. Dyson, N. (1998). "The regulation of E2F by pRB-family proteins".  
*Genes & development* 12(15):2245–2262. doi:10.1101/gad.12.15.2245
32. Fiedler, T. *et al.* (2015). "Arginine deprivation by arginine deiminase of *Streptococcus pyogenes* controls primary glioblastoma growth in vitro and in vivo".  
*Cancer biology & therapy* 16(7):1047–1055. doi:10.1080/15384047.2015.1026478
33. Fisher, J.L. *et al.* (2007). "Epidemiology of brain tumors".  
*Neurol Clin* 25(4):867-90, vii. doi:10.1016/j.ncl.2007.07.002
34. Foucquier, J.; Guedj, M. (2015). "Analysis of drug combinations: current methodological landscape". *Pharmacol Res Perspect* 3(3):e00149. doi:10.1002/prp2.149
35. Fu, W. *et al.* (2011). "The cyclin-dependent kinase inhibitor SCH 727965 (dinaciclib) induces the apoptosis of osteosarcoma cells".  
*Mol Cancer Ther* 10(6):1018–1027. doi:10.1158/1535-7163.MCT-11-0167
36. Gao, Y. *et al.* (2011). "Combining betulinic acid and mithramycin a effectively suppresses pancreatic cancer by inhibiting proliferation, invasion, and angiogenesis".  
*Cancer Res* 71(15):5182–5193. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2016
37. Gaurav, G. *et al.* (2015). "Neurologic manifestations of glioblastoma multiforme clinical presentation". Medscape. <https://emedicine.medscape.com/article/1156220-clinical> [zuletzt zugegriffen am 01.03.2022]
38. Gesche, J. (2019). "Die Relevanz von Indolamin-2,3-Dioxygenase und assoziierten Signalwegen bei Kopf-Hals Tumoren unter zielgerichteter Therapie".  
Masterarbeit, Universität Rostock
39. Glumac, P.M.; LeBeau, A.M. (2018). "The role of CD133 in cancer: a concise review".  
*Clin Transl Med* 7(1):18. doi:10.1186/s40169-018-0198-1
40. Goldoni, M.; Johansson, C. (2007). "A mathematical approach to study combined effects of toxicants in vitro: evaluation of the Bliss independence criterion and the Loewe additivity model". *Toxicol In Vitro* 21(5):759–769. doi:10.1016/j.tiv.2007.03.003
41. Gomez, G.G.; Kruse, C.A. (2006). "Mechanisms of malignant glioma immune resistance and sources of immunosuppression". *Gene Ther Mol Biol* 10(A):133–146
42. Greco, W.R.; Bravo, G.; Parsons, J.C. (1995). "The search for synergy: a critical review from a response surface perspective". *Pharmacological reviews* 47(2):331–385
43. Grillo, M.A.; Colombatto, S. (2004). "Arginine revisited: minireview article".  
*Amino Acids* 26(4):345–351. doi:10.1007/s00726-004-0081-9

44. Grohar, P.J. *et al.* (2017). "A phase I/II trial and pharmacokinetic study of mithramycin in children and adults with refractory Ewing sarcoma and EWS-FLI1 fusion transcript". *Cancer chemotherapy and pharmacology* 80(3):645–652.  
doi:10.1007/s00280-017-3382-x
45. Guan, H. *et al.* (2012). "Sp1 is upregulated in human glioma, promotes MMP-2-mediated cell invasion and predicts poor clinical outcome". *International Journal of Cancer* 130(3):593–601. doi:10.1002/ijc.26049
46. Günther, H.S. *et al.* (2008). "Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria". *Oncogene* 27(20):2897–2909. doi:10.1038/sj.onc.1210949
47. Guyon, J. *et al.* (2020). "A 3D Spheroid Model for Glioblastoma". *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* (158):e60998. doi:10.3791/60998
48. Haines, R.J. *et al.* (2011). "Argininosuccinate synthase: at the center of arginine metabolism". *Int J Biochem Mol Biol* 2(1):8–23
49. Hall, P.E. *et al.* (2019). "A Phase I Study of Pegylated Arginine Deiminase (Pegargiminase), Cisplatin, and Pemetrexed in Argininosuccinate Synthetase 1-Deficient Recurrent High-grade Glioma". *Clin Cancer Res* 25(9):2708–2716. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-3729
50. Hanif, F. *et al.* (2017). "Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment". *Asian Pac J Cancer Prev* 18(1):3–9. doi:10.22034/APJCP.2017.18.1.3
51. Hanna, C. *et al.* (2020). "Treatment of newly diagnosed glioblastoma in the elderly: a network meta-analysis". *Cochrane Database Syst Rev* 3:CD013261.  
doi:10.1002/14651858.CD013261.pub2
52. Happold, C. *et al.* (2012). "Distinct molecular mechanisms of acquired resistance to temozolomide in glioblastoma cells". *Journal of Neurochemistry* 122(2):444–455. doi:10.1111/j.1471-4159.2012.07781.x
53. Harding, J. *et al.* (2018). "A phase 1 study of ADI-PEG 20 and modified FOLFOX6 in patients with advanced hepatocellular carcinoma and other gastrointestinal malignancies". *Cancer chemotherapy and pharmacology* 82(3):429–440.  
doi:10.1007/s00280-018-3635-3
54. Hegi, M.E. *et al.* (2005). "MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma". *The new england journal of medicine* 352(10):997–1003. doi:10.1056/NEJMoa043331
55. Hering S. *et al.* (2013). "Kinetic characterization of arginine deiminase and carbamate kinase from *Streptococcus pyogenes* M49". *Protein Expr Purif* 91(1):61–68. doi:10.1016/j.pep.2013.07.002

56. Hermisson, M. *et al.* (2006). "O6-methylguanine DNA methyltransferase and p53 status predict temozolomide sensitivity in human malignant glioma cells".  
*Journal of Neurochemistry* 96(3):766–776. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03583.x
57. Horbinski, C. (2013). "What do we know about IDH1/2 mutations so far, and how do we use it?" *Acta Neuropathol* 125(5):621–636. doi:10.1007/s00401-013-1106-9
58. Horn, F. (1933). "Über den Abbau des Arginins zu Citrullin durch *Bacillus pyocyaneus*".  
*Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* 216(5-6):244–247.  
doi:10.1515/bchm2.1933.216.5-6.244
59. Hung, A.L.; Garzon-Muvdi, T.; Lim, M. (2017). "Biomarkers and Immunotherapeutic Targets in Glioblastoma".  
*World Neurosurg* 102:494–506. doi:10.1016/j.wneu.2017.03.011
60. Indraccolo, S. *et al.* (2019). "Genetic, Epigenetic, and Immunologic Profiling of MMR-Deficient Relapsed Glioblastoma".  
*Clin Cancer Res* 25(6):1828–1837. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-1892
61. Irmischer, N. (2019). "Stressantwort von Glioblastoma multiforme nach ADI-basierten Argininentzug". Masterarbeit, Universität Rostock
62. Izzo, F. *et al.* (2004). "Pegylated arginine deiminase treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: results from phase I/II studies".  
*J Clin Oncol* 22(10):1815–1822. doi:10.1200/JCO.2004.11.120
63. Jane, E.P. *et al.* (2016). "Dinaciclib, a Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Promotes Proteasomal Degradation of Mcl-1 and Enhances ABT-737-Mediated Cell Death in Malignant Human Glioma Cell Lines".  
*J Pharmacol Exp Ther* 356(2):354–365. doi:10.1124/jpet.115.230052
64. Jiaper, S. *et al.* (2018). "Potential Strategies Overcoming the Temozolomide Resistance for Glioblastoma".  
*Neurol Med Chir (Tokyo)* 58(10):405–421. doi:10.2176/nmc.ra.2018-0141
65. Jonsson, B. *et al.* (1996). "Cytotoxic Activity of Calcein Acetoxymethyl Ester (Calcein/AM) on Primary Cultures of Human Haematological and Solid Tumours".  
*European Journal of Cancer* (32):883-887
66. Kanzawa, T. *et al.* (2003). "Inhibition of DNA repair for sensitizing resistant glioma cells to temozolomide". *J Neurosurg* 99(6):1047–1052. doi:10.3171/jns.2003.99.6.1047
67. Kennedy, B.J. (1970). "Metabolic and toxic effects of mithramycin during tumor therapy".  
*The American Journal of Medicine* 49(4):494–503. doi:10.1016/S0002-9343(70)80044-4
68. Kennedy, B.J.; Torkelson, J.L. (1995). "Long-term follow-up of stage III testicular carcinoma treated with mithramycin (plicamycin)".  
*Med Pediatr Oncol* 24(5):327–328. doi:10.1002/mpo.2950240511

69. Kim, C. *et al.* (2020). "Tumor treating fields plus temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: a sub-group analysis of Korean patients in the EF-14 phase 3 trial". *J Neurooncol* 146(3):399–406. doi:10.1007/s11060-019-03361-2
70. Kim, R.H.; Bold, R.J.; Kung, H.-J. (2009). "ADI, autophagy and apoptosis: metabolic stress as a therapeutic option for prostate cancer". *Autophagy* 5(4):567–568. doi:10.4161/auto.5.4.8252
71. Kormanec, J. *et al.* (2020). "The antitumor antibiotic mithramycin: new advanced approaches in modification and production". *Appl Microbiol Biotechnol* 104(18):7701–7721. doi:10.1007/s00253-020-10782-x
72. Kuo, L.J.; Yang L.-X. (2008). "Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks". *In Vivo* 22(3):305–309
73. Lee, T.-J. *et al.* (2006). "Mithramycin A sensitizes cancer cells to TRAIL-mediated apoptosis by down-regulation of XIAP gene promoter through Sp1 sites". *Mol Cancer Ther* 5(11):2737–2746. doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0426
74. Lee, S.Y. (2016). "Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme". *Genes & Diseases* 3(3):198–210. doi:10.1016/j.gendis.2016.04.007
75. Lee, S.Y. *et al.* (2018). "Regulation of Tumor Progression by Programmed Necrosis". *Oxid Med Cell Longev* 2018:3537471. doi:10.1155/2018/3537471
76. Lefranc, F.; Kiss, R. (2006). "Autophagy, the Trojan horse to combat glioblastomas". *Neurosurgical Focus* 20(4):E7. doi:10.3171/foc.2006.20.4.4
77. Li, B. *et al.* (2017) "CD133 in brain tumor: the prognostic factor". *Oncotarget* 8(7):11144–11159. doi:10.18632/oncotarget.14406
78. Lin, R.-K.; Hsu, C.-H.; Wang, Y.-C. (2007). "Mithramycin A inhibits DNA methyltransferase and metastasis potential of lung cancer cells". *Anticancer Drugs* 18(10):1157–1164. doi:10.1097/CAD.0b013e3282a215e9
79. Lin, M.Y. *et al.* (2021). "Mithramycin A Radiosensitizes EWS:Flt1+ Ewing Sarcoma Cells by Inhibiting Double Strand Break Repair". *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 109(5):1454–1471. doi:10.1016/j.ijrobp.2020.12.010
80. Liu, Q. *et al.* (2018). "Evaluation of drug combination effect using a Bliss independence dose-response surface model". *Stat Biopharm Res* 10(2):112–122. doi:10.1080/19466315.2018.1437071
81. Liu, R. *et al.* (2018). "Mithramycin A suppresses basal triple-negative breast cancer cell survival partially via down-regulating Krüppel-like factor 5 transcription by Sp1". *Sci Rep* 8(1):1138. doi:10.1038/s41598-018-19489-6
82. Louis, D.N. *et al.* (2016). "The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary". *Acta Neuropathol* 131(6):803–820. doi:10.1007/s00401-016-1545-1

83. Lubanska, D.; Porter, L. (2017). "Revisiting CDK Inhibitors for Treatment of Glioblastoma Multiforme". *Drugs R D* 17(2):255–263. doi:10.1007/s40268-017-0180-1
84. Lundberg, A.S.; Weinberg, R.A. (1998). "Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes". *Mol Cell Biol* 18(2):753–761. doi:10.1128/MCB.18.2.753
85. Maletzki, C. *et al.* (2017). "Deciphering molecular mechanisms of arginine deiminase-based therapy – Comparative response analysis in paired human primary and recurrent glioblastomas". *Chemico-Biological Interactions* 278:179–188. doi:10.1016/j.cbi.2017.10.007
86. Manca, A. *et al.* (2011). "Induction of arginosuccinate synthetase (ASS) expression affects the antiproliferative activity of arginine deiminase (ADI) in melanoma cells". *Oncology Reports* 25(6):1495–1502. doi:10.3892/or.2011.1220
87. Marshall, J. (2011). "Transwell® Invasion Assays".  
In: Wells, C.M.; Parsons, M. (Hrsg). "Cell migration. Developmental methods and protocols", 2. Aufl. Springer, Totowa, N.J., S 97–110
88. Matzack, C. (2017). "ADI-based GBM therapy – underlying ADI-based GBM therapy – underlying molecular mechanism & influence on radiosensitivity".  
Masterarbeit, Universität Rostock
89. Medikonda, R. *et al.* (2021). "A review of glioblastoma immunotherapy". *J Neurooncol* 151(1):41–53. doi:10.1007/s11060-020-03448-1
90. Messali, A.; Villacorta, R.; Hay, J.W. (2014). "A review of the economic burden of glioblastoma and the cost effectiveness of pharmacologic treatments". *Pharmacoeconomics* 32(12):1201–1212. doi:10.1007/s40273-014-0198-y
91. Michaud, K. *et al.* (2010). "Pharmacologic inhibition of cyclin-dependent kinases 4 and 6 arrests the growth of glioblastoma multiforme intracranial xenografts". *Cancer Res* 70(8):3228–3238. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4559
92. Middeldorp, J.; Hol, E.M. (2011). "GFAP in health and disease". *Prog Neurobiol* 93(3):421–443. doi:10.1016/j.pneurobio.2011.01.005
93. Miltner, F. (2015). "S2k-Gliome-2015".  
Kommission Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (030/099)
94. Mita, M.M. *et al.* (2017). "Phase 1 safety, pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib administered every three weeks in patients with advanced malignancies". *Br J Cancer* 117(9):1258–1268. doi:10.1038/bjc.2017.288
95. Morris, S.M. (2007). "Arginine metabolism: boundaries of our knowledge". *J Nutr* 137(6 Suppl 2):1602S–1609S. doi:10.1093/jn/137.6.1602S



96. Mullins, C.S. *et al.* (2013). "Establishment and characterization of primary glioblastoma cell lines from fresh and frozen material: a detailed comparison".  
*PLoS One* 8(8):e71070. doi:10.1371/journal.pone.0071070
97. Nduom, E.K. *et al.* (2016). "PD-L1 expression and prognostic impact in glioblastoma".  
*Neuro-oncology* 18(2):195–205. doi:10.1093/neuonc/nov172
98. Nemunaitis, J.J. *et al.* (2013). "A first-in-human, phase 1, dose-escalation study of dinaciclib, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, administered weekly in subjects with advanced malignancies". *J Transl Med* 11:259. doi:10.1186/1479-5876-11-259
99. Newlands, E.S. *et al.* (1997). "Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials".  
*Cancer treatment reviews* 23(1):35–61. doi:10.1016/s0305-7372(97)90019-0
100. Nikitović, M. *et al.* (2016). "Pediatric glioblastoma: a single institution experience".  
*Childs Nerv Syst* 32(1):97–103. doi:10.1007/s00381-015-2945-6
101. Norden, A.D.; Wen, P.Y. (2006). "Glioma therapy in adults".  
*Neurologist* 12(6):279–292. doi:10.1097/01.nrl.0000250928.26044.47
102. Obeid, M. *et al.* (2007). "Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death". *Nat Med* 13(1):54–61. doi:10.1038/nm1523
103. Ohgaki, H.; Kleihues, P. (2007). "Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma". *Am J Pathol* 170(5):1445–1453. doi:10.2353/ajpath.2007.070011
104. Ohgaki, H.; Kleihues, P. (2013). "The definition of primary and secondary glioblastoma".  
*Clin Cancer Res* 19(4):764–772. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3002
105. Ostrom, Q.T. *et al.* (2014). "CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011".  
*Neuro-oncology* 16 Suppl 4:iv1-63. doi:10.1093/neuonc/nou223
106. Ostrom, Q.T. *et al.* (2014). "The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review". *Neuro-oncology* 16(7):896–913. doi:10.1093/neuonc/nou087
107. Ott, P.A. *et al.* (2013). "Phase I/II study of pegylated arginine deiminase (ADI-PEG 20) in patients with advanced melanoma".  
*Investigational new drugs* 31(2):425–434. doi:10.1007/s10637-012-9862-2
108. Pandey, K. *et al.* (2019). "Molecular mechanisms of resistance to CDK4/6 inhibitors in breast cancer: A review".  
*International Journal of Cancer* 145(5):1179–1188. doi:10.1002/ijc.32020
109. Pardoll, D.M. (2012). "The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy".  
*Nat Rev Cancer* 12(4):252–264. doi:10.1038/nrc3239
110. Parry, D. *et al.* (2010). "Dinaciclib (SCH 727965), a novel and potent cyclin-dependent kinase inhibitor".  
*Mol Cancer Ther* 9(8):2344–2353. doi:10.1158/1535-7163.MCT-10-0324

- 111.Patnaik, A. *et al.* (2016). "Efficacy and Safety of Abemaciclib, an Inhibitor of CDK4 and CDK6, for Patients with Breast Cancer, Non-Small Cell Lung Cancer, and Other Solid Tumors". *Cancer Discov* 6(7):740–753. doi:10.1158/2159-8290.CD-16-0095
- 112.Petroni, G. *et al.* (2020). "Immunomodulation by anticancer cell cycle inhibitors". *Nat Rev Immunol* 20(11):669–679. doi:10.1038/s41577-020-0300-y
- 113.Phillips, M.M.; Sheaff, M.T.; Szlosarek, P.W. (2013). "Targeting arginine-dependent cancers with arginine-degrading enzymes: opportunities and challenges". *Cancer Res Treat* 45(4):251–262. doi:10.4143/crt.2013.45.4.251
- 114.Pistritto, G. *et al.* (2016). "Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies". *Aging (Albany NY)* 8(4):603–619. doi:10.18632/aging.100934
- 115.Qiu, F.; Huang, J.; Sui, M. (2015). "Targeting arginine metabolism pathway to treat arginine-dependent cancers". *Cancer Lett* 364(1):1–7. doi:10.1016/j.canlet.2015.04.020
- 116.Quarni, W. *et al.* (2019). "Mithramycin A Inhibits Colorectal Cancer Growth by Targeting Cancer Stem Cells". *Sci Rep* 9(1):15202. doi:10.1038/s41598-019-50917-3
- 117.Raub, T.J. *et al.* (2015). "Brain Exposure of Two Selective Dual CDK4 and CDK6 Inhibitors and the Antitumor Activity of CDK4 and CDK6 Inhibition in Combination with Temozolomide in an Intracranial Glioblastoma Xenograft". *Drug Metab Dispos* 43(9):1360–1371. doi:10.1124/dmd.114.062745
- 118.Reardon, D.A.; Wen, P.Y. (2006). "Therapeutic Advances in the Treatment of Glioblastoma: Rationale and Potential Role of Targeted Agents". *The Oncologist* 11(2):152–164. doi:10.1634/theoncologist.11-2-152
- 119.Reya, T. *et al.* (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells". *Nature* 414:105–111. doi:10.1038/35102167
- 120.Riess, C. *et al.* (2018). "Arginine-Depleting Enzymes - An Increasingly Recognized Treatment Strategy for Therapy-Refractory Malignancies". *Cell Physiol Biochem* 51(2):854–870. doi:10.1159/000495382
- 121.Riess, C. *et al.* (2021). "Cyclin-dependent kinase inhibitors exert distinct effects on patient-derived 2D and 3D glioblastoma cell culture models". *Cell Death Discov* 7(1):54. doi:10.1038/s41420-021-00423-1
- 122.Riess, C. *et al.* (2020). "Activation of the Kynurenine Pathway in Human Malignancies Can Be Suppressed by the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Dinaciclib". *Front Immunol* 11:55. doi:10.3389/fimmu.2020.00055
- 123.Safe, S. *et al.* (2014). "Transcription factor Sp1, also known as specificity protein 1 as a therapeutic target". *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 18(7):759–769. doi:10.1517/14728222.2014.914173

- 124.Saha, S. *et al.* (2015). "Mithramycin A sensitizes therapy-resistant breast cancer stem cells toward genotoxic drug doxorubicin".  
*Transl Res* 165(5):558–577. doi:10.1016/j.trsl.2014.10.011
- 125.Sánchez-Martínez, C. *et al.* (2019). "Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors as anticancer drugs: Recent advances (2015-2019)".  
*Bioorg Med Chem Lett* 29(20):126637. doi:10.1016/j.bmcl.2019.126637
- 126.Schaer, D.A. *et al.* (2018). "The CDK4/6 Inhibitor Abemaciclib Induces a T Cell Inflamed Tumor Microenvironment and Enhances the Efficacy of PD-L1 Checkpoint Blockade".  
*Cell Reports* 22(11):2978–2994. doi:10.1016/j.celrep.2018.02.053
- 127.Schoninger, S.F.; Blain, S.W. (2020). "The Ongoing Search for Biomarkers of CDK4/6 Inhibitor Responsiveness in Breast Cancer".  
*Mol Cancer Ther* 19(1):3–12. doi:10.1158/1535-7163.MCT-19-0253
- 128.Schreck, K.C.; Grossman, S.A. (2018). "Role of Temozolomide in the Treatment of Cancers Involving the Central Nervous System". *Oncology Journal* 32:555–560
- 129.Scott, L. *et al.* (2000). "Single amino acid (arginine) deprivation: rapid and selective death of cultured transformed and malignant cells".  
*Br J Cancer* 83(6):800–810. doi:10.1054/bjoc.2000.1353
- 130.Seznec, J.; Silkenstedt, B.; Naumann, U. (2011). "Therapeutic effects of the Sp1 inhibitor mithramycin A in glioblastoma".  
*J Neurooncol* 101(3):365–377. doi:10.1007/s11060-010-0266-x
- 131.Shapiro, G.I. (2006). "Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment". *J Clin Oncol* 24(11):1770–1783. doi:10.1200/JCO.2005.03.7689
- 132.Sherr, C.J.; Beach, D.; Shapiro, G.I. (2016). "Targeting CDK4 and CDK6: From Discovery to Therapy".  
*Cancer Discov* 6(4):353–367. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0894
- 133.Sherr, C.J.; Roberts, J.M. (1999). "CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression".  
*Genes & development* 13(12):1501–1512. doi:10.1101/gad.13.12.1501
- 134.Sitzer, M.; Steinmetz, H. (Hrsg) (2018). "Neurologie hoch2".  
Urban & Fischer in Elsevier, München
- 135.Sobhani, N. *et al.* (2019). "Updates on the CDK4/6 Inhibitory Strategy and Combinations in Breast Cancer". *Cells* 8(4). doi:10.3390/cells8040321
- 136.Solomon, D.A. *et al.* (2008). "Conspirators in a capital crime: co-deletion of p18INK4c and p16INK4a/p14ARF/p15INK4b in glioblastoma multiforme".  
*Cancer Res* 68(21):8657–8660. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2084
- 137.Spear, P.W. (1963). "Clinical trial with mithramycin".  
*Cancer chemotherapy reports* 29:109–110

- 138.Stopschinski, B.E.; Beier, C.P.; Beier, D. (2013). "Glioblastoma cancer stem cells--from concept to clinical application".  
*Cancer Lett* 338(1):32–40. doi:10.1016/j.canlet.2012.05.033
- 139.Stupp, R. *et al.* (2005). "Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma". *N Engl J Med* 10;352(10):987-96. doi:10.1056/NEJMoa043330
- 140.Syed, N. *et al.* (2013). "Epigenetic status of argininosuccinate synthetase and argininosuccinate lyase modulates autophagy and cell death in glioblastoma".  
*Cell Death Dis* 4(1):e458. doi:10.1038/cddis.2012.197
- 141.Synakiewicz, A.; Stachowicz-Stencel, T.; Adamkiewicz-Drozynska, E. (2014). "The role of arginine and the modified arginine deiminase enzyme ADI-PEG 20 in cancer therapy with special emphasis on Phase I/II clinical trials".  
*Expert Opin Investig Drugs* 23(11):1517–1529. doi:10.1517/13543784.2014.934808
- 142.Tagashira, M. *et al.* (2000). "Mithramycin represses MDR1 gene expression in vitro, modulating multidrug resistance".  
*Biological & Pharmaceutical Bulletin* 23(8):926–929. doi:10.1248/bpb.23.926
- 143.Tang, T. *et al.* (2010). "Overexpression of antioxidant enzymes upregulates aryl hydrocarbon receptor expression via increased Sp1 DNA-binding activity".  
*Free Radic Biol Med* 49(3):487–492. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.05.007
- 144.Taylor, J.; Schiff, D. (2015). "Treatment considerations for MGMT-unmethylated glioblastoma". *Curr Neurol Neurosci Rep* 15(1):507. doi:10.1007/s11910-014-0507-z
- 145.Tchoghandjian, A. *et al.* (2010). "A2B5 cells from human glioblastoma have cancer stem cell properties". *Brain pathology* 20(1):211–221. doi:10.1111/j.1750-3639.2009.00269.x
- 146.Thakkar, J.P. *et al.* (2014). "Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma". *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 23(10):1985–1996.  
doi:10.1158/1055-9965.EPI-14-0275
- 147.Tsai, C.-Y. *et al.* (2018). "Argininosuccinate synthetase 1 contributes to gastric cancer invasion and progression by modulating autophagy".  
*The FASEB Journal* 32(5):2601–2614. doi:10.1096/fj.201700094r
- 148.Uno, M. *et al.* (2011). "Correlation of MGMT promoter methylation status with gene and protein expression levels in glioblastoma".  
*Clinics (Sao Paulo)* 66(10):1747–1755. doi:10.1590/S1807-59322011001000013
- 149.van Bodegraven, E.J. *et al.* (2019). "Importance of GFAP isoform-specific analyses in astrocytoma". *Glia* 67(8):1417–1433. doi:10.1002/glia.23594
- 150.van Nifterik, K.A. *et al.* (2010). "Absence of the MGMT protein as well as methylation of the MGMT promoter predict the sensitivity for temozolomide".  
*Br J Cancer* 103(1):29–35. doi:10.1038/sj.bjc.6605712

151. Villà, S.; Balañà, C.; Comas, S. (2014). "Radiation and concomitant chemotherapy for patients with glioblastoma multiforme".  
*Chin J Cancer* 33(1):25–31. doi:10.5732/cjc.013.10216
152. Vizcaíno, C.; Mansilla, S.; Portugal, J. (2015). "Sp1 transcription factor: A long-standing target in cancer chemotherapy".  
*Pharmacology & Therapeutics* 152:111–124. doi:10.1016/j.pharmthera.2015.05.008
153. Walker, M.D. *et al.* (1976). "Evaluation of mithramycin in the treatment of anaplastic gliomas". *J Neurosurg* 44(6):655–667. doi:10.3171/jns.1976.44.6.0655
154. Walker, M.D. *et al.* (1978). "Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial".  
*J Neurosurg* 49(3):333–343. doi:10.3171/jns.1978.49.3.0333
155. Wick, W. (2021). "S2k Gliome 2021".  
Kommission Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (030/099)
156. Wiedemeyer, W.R. *et al.* (2010). "Pattern of retinoblastoma pathway inactivation dictates response to CDK4/6 inhibition in GBM".  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 107(25):11501–11506. doi:10.1073/pnas.1001613107
157. Yuan, Y. *et al.* (2021). "Nanog promotes stem-like traits of glioblastoma cells".  
*Front Biosci (Landmark Ed)* 26(3):552–565. doi:10.2741/4907
158. Zamanian, M. *et al.* (2013). "Calreticulin and cancer".  
*Pathology oncology research* 19(2):149–154. doi:10.1007/s12253-012-9600-2
159. Zaremba, A. *et al.* (2020). "Immuntherapie beim malignen Melanom".  
*Internist* 61(7):669–675. doi:10.1007/s00108-020-00812-1
160. Zhao, Y. *et al.* (2013). "Inhibition of the transcription factor Sp1 suppresses colon cancer stem cell growth and induces apoptosis in vitro and in nude mouse xenografts".  
*Oncology Reports* 30(4):1782–1792. doi:10.3892/or.2013.2627
161. Zitvogel L. *et al.* (2010). "Immunogenic tumor cell death for optimal anticancer therapy: the calreticulin exposure pathway".  
*Clin Cancer Res* 16(12):3100–3104. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2891

## PUBLIKATIONEN

---

### Originalarbeiten

1. Linke, C, Freitag T, Riess C, Scheffler, JV, Del Moral K, Schoenwaelder N, Fiedler T, Fiebig A, Kaps P, Dubinski D, Schneider B, Bergmann W, Classen CF, Maletzki C  
The addition of arginine deiminase potentiates Mithramycin A-induced cell death in patient-derived glioblastoma cells via ATF4 and cytochrome C.  
*Cancer Cell Int.* 2023 Feb 27;23(1):38. doi:10.1186/s12935-023-02873-2
2. Riess C, Del Moral, K, Fiebig A, Kaps P, Linke C, Hinz B, Rupprecht A, Frank M, Fiedler T, Koczan D, Troschke-Meurer S, Lode H, Engel N, Freitag T, Classen CF, Maletzki C  
Implementation of a combined CDK inhibition and arginine-deprivation approach to target arginine-auxotrophic glioblastoma multiforme cells.  
*Cell Death Dis.* 2022 Jun 18;13(6):555. doi:10.1038/s41419-022-05006-1
3. Riess C, Koczan D, Schneider B, Linke C, Del Moral K, Classen CF, Maletzki C  
Cyclin-dependent kinase inhibitors exert distinct effects on patient-derived 2D and 3D glioblastoma cell culture models.  
*Cell Death Discov.* 2021 Mar 15;7(1):54. doi:10.1038/s41420-021-00423-1

### Kongressbeiträge

1. Del Moral K, Riess C, Fiebig A, Linke C, Frank M, Fiedler T, Junghanss C, Classen CF, Maletzki C  
Combined CDK inhibition and arginine-deprivation boosts antitumoral effects against arginine-auxotrophic glioblastoma multiforme cells.  
2021, Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie (DGHO).

## **EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG**

---

Die eidesstattliche Versicherung wird aus Datenschutzgründen nicht online veröffentlicht.

## **DANKSAGUNG**

---

Die Danksagung wird aus Datenschutzgründen nicht online veröffentlicht.



## LEBENS LAUF

---

Der Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen nicht online veröffentlicht.

## THESEN

---

1. Im Rahmen von *in vitro* Studien an vier von Patienten abgeleiteten Glioblastoma multiforme (GBM)-Zelllinien konnte ein konzentrationsabhängiger Effekt von Mithramycin A (MitA) auf die Tumorzellviabilität beobachtet werden. Bereits niedrige Dosen führten zu einer signifikanten Abnahme viabler Tumorzellen.
2. MitA wirkte strahlensensibilisierend und induzierte DNA-Doppelstrangbrüche in Kombination mit einer Radiotherapie.
3. Unter Langzeittherapie mit MitA konnte keine Resistenzentwicklung beobachtet werden.
4. Funktionsanalysen ergaben, dass MitA die Tumorzellinvasion inhibierte, Apoptose sowie Nekrose auslöste, jedoch lediglich einen geringen Einfluss auf den Immunphänotyp hatte und somit die Immunogenität des Tumors nicht veränderte.
5. MitA wurde im 2D- sowie 3D-Sphäroid-Modell mit Temozolomid (TMZ), den CDK-Inhibitoren (CDKIs) Abemaciclib und Dinaciclib sowie mit *S. pyogenes* Arginin Deiminase (SpyADI) im Kurzzeit- und Langzeitansatz kombiniert. MitA wirkte mit allen zytostatischen Testsubstanzen in der simultanen Therapie synergistisch.
6. Die Kombination aus MitA und den CDKIs, insbesondere Abemaciclib, inhibierte in den Kurzzeit- sowie in den Langzeitversuchen die Tumorzellviabilität am effektivsten. Diese Kombination führte zu einer Steigerung der Immunogenität der GBM-Zellen durch die vermehrte Translokation von Calretikulin und Hochregulation von MHC I.
7. Die Kombinationstherapie aus MitA mit TMZ führte zu einer signifikant größeren Reduktion der vitalen Tumorzellen als eine Monotherapie mit TMZ, die das Wachstum der Tumorzellen nicht inhibierte.
8. MitA und SpyADI wurden in einem sequentiellen sowie im simultanen Therapieschema kombiniert, wobei lediglich die simultane Gabe wirksam war. Diese Kombination führte zu einer tendenziellen Abnahme der Tumorzellinvasion. Der Immunphänotyp wurde kaum beeinflusst.
9. Keine der untersuchten Therapien führte zu einer signifikanten Änderung der Stammzellmarkerexpression.