

AUS DEM INSTITUT FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE, VIROLOGIE UND HYGIENE

KOMMISSARISCHER DIREKTOR: PD DR. MED. HABIL. PHILIPP WARNKE

**ARGININ-DEIMINASE AUS *STREPTOCOCCUS*  
*PYOGENES* ALS ANTITUMORALES THERAPEUTIKUM  
GEGEN GLIOBLASTOMA MULTIFORME**

INAUGURALDISSERTATION  
ZUR  
ERLANGUNG DES GRADES  
DR. MED.  
DER  
UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

GUTACHTER:

PD DR. RER. NAT. TOMAS FIEDLER (INSTITUT FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE, VIROLOGIE UND HYGIENE DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK)

PD DR. RER. NAT. HABIL. CLAUDIA MALETZKI (MEDIZINISCHE KLINIK III FÜR HÄMATOLOGIE, ONKOLOGIE UND PALLIATIVMEDIZIN, INNERE MEDIZIN DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK)

PROF. DR. MED. HOLGER LODE (KLINIK UND POLIKLINIK FÜR KINDER UND JUGENDMEDIZIN DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN GREIFSWALD)

VORGELEGT VON

ADINA FIEBIG | GEB. AM 11.11.1998 IN PEGNITZ

AUS ROSTOCK

ROSTOCK | 2024

VERTEIDIGUNG: 17.07.2024

DEKAN PROF. DR. MED. UNIV. EMIL C. REISINGER, MBA

DOKTORARBEIT

UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

Ein Teil der vorliegenden Arbeit wurde bereits in der folgenden Publikationen veröffentlicht:

Linke C, Freitag T, Riess C, Scheffler JV, Del Moral K, Schoenwaelder N, et al. 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;23:38. doi:10.1186/s12935-023-02873-2.

Riess C, Del Moral K, Fiebig A, Kaps P, Linke C, Hinz B, et al. HGG-13. Combined CDK inhibition and arginine-deprivation as targeted therapy for arginine-auxotrophic glioblastoma multiforme cells. *Neuro-Oncology.* 2022;24:i62-i63. doi:10.1093/neuonc/noac079.228.

Riess C, Del Moral K, Fiebig A, Kaps P, Linke C, Hinz B, et al. Implementation of a combined CDK inhibition and arginine-deprivation approach to target arginine-auxotrophic glioblastoma multiforme cells. *Cell Death Dis.* 2022;13:555. doi:10.1038/s41419-022-05006-1.

Schwarz R, Zitzow E, Fiebig A, Hering S, Humboldt Y, Schoenwaelder N, et al. PE-Gylation increases antitumoral activity of arginine deiminase of *Streptococcus pyogenes*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2022;106:261–71. doi:10.1007/s00253-021-11728-7.

**INHALTSVERZEICHNIS**

---

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	GLIOBLASTOMA MULTIFORME .....	1
1.2	ARGININ IN PHYSIOLOGISCHEN STOFFWECHSELPROZESSEN.....	2
1.3	ARGININ IM TUMORSTOFFWECHSEL .....	2
1.4	ARGININ DEIMINASE SYSTEM .....	3
1.5	ANTITUMORALE WIRKUNG VON ADI .....	4
1.6	PEGYLIERUNG .....	6
1.7	CDK-INHIBITOREN .....	7
1.8	ZIELE DER ARBEIT .....	8
<b>2.</b>	<b>MATERIAL AND METHODEN .....</b>	<b>10</b>
2.1	MATERIAL .....	10
2.1.1	EUKARYOTISCHE ZELLEN .....	17
2.1.2	BAKTERIENSTAMM UND PLASMID .....	17
2.1.3	NSG MÄUSE .....	18
2.2	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....	19
2.2.1	HETEROLOGE PRODUKTION VON SPYADI IN <i>E. COLI</i> .....	19
2.2.2	STREP-TACTIN AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE.....	20
2.2.3	DIALYSE.....	21
2.2.4	ULTRAFILTRATION .....	21
2.2.5	BRADFORD-ASSAY .....	22
2.2.6	ADI AKTIVITÄTSASSAY .....	22
2.2.7	SDS-POLYACRYLAMID GELELEKTROPHORESE .....	23
2.2.8	WESTERN BLOT .....	24
2.2.8.1	Detektion des Strep-Tag.....	24
2.2.8.2	Detektion von Einzel- und Doppelstrangbrüchen.....	25
2.2.9	PEGYLIERUNG DER NATIVEN ADI .....	25
2.2.10	ANIONENAUSTAUSCHCHROMATOGRAPHIE .....	26

---

2.2.11	BESTIMMUNG VON E-AMINOGRUPPEN .....	27
2.3	IN VITRO METHODEN.....	29
2.3.1	ZELLKULTUR .....	29
2.3.2	ZELLZÄHLUNG .....	29
2.3.3	BEHANDLUNG DER ZELLEN.....	29
2.3.4	BESTRAHLUNG DER ZELLEN .....	30
2.3.5	CALCEIN-ASSAY .....	30
2.3.6	PROTEINEXTRAKTION AUS ZELLEN UND WESTERN BLOT .....	31
2.3.7	$\gamma$ H2AX-ASSAY .....	31
2.3.8	AMINOSÄUREN ANALYSE.....	31
2.4	<i>IN VIVO</i> METHODEN: BLUTPLASMA VON NSG MÄUSEN .....	33
2.5	SOFTWARE .....	33
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>34</b>
3.1	HETEROLOGE SPYADI PRODUKTION UND AUFREINIGUNG .....	34
3.2	PEGYLIERUNG DER SPYADI .....	35
3.3	BESTIMMUNG DES PEGYLIERUNGSGRADES DER SPYADI-PEG20.....	37
3.4	EFFEKT VON SPYADI UND SPYADI-PEG20 AUF DIE KONZENTRATION VON L-ARGININ <i>IN VITRO</i> .....	39
3.5	EFFEKT VON SPYADI UND SPYADI-PEG20 AUF DIE KONZENTRATION VON L-ARGININ IM MAUSMODELL .....	40
3.6	EFFEKTE DER KOMBINATIONSTHERAPIE VON SPYADI UND CDK-INHIBITOREN AUF VIABILITÄT UND STRAHLENSENSITIVITÄT VON GLIOBLASTOMA MULTIFORME ZELLEN <i>IN VITRO</i> .....	42
3.7	DETEKTION VON DNA-STRANGBRÜCHEN NACH MONO- UND KOMBINATIONSTHERAPIE SOWIE BESTRAHLUNG .....	46
3.8	NACHWEIS VON KU80.....	47
3.9	NACHWEIS VON RAD51.....	48
3.10	NACHWEIS VON $\gamma$ H2AX .....	50
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>52</b>
4.1	PEGYLIERUNGSEFFIZIENZ .....	53
4.2	PHARMAKOKINETISCHE AUSWIRKUNGEN DER PEGYLIERUNG <i>IN VITRO</i> .....	55

---

4.3	PHARMAKOKINETISCHE AUSWIRKUNGEN DER PEGYLIERUNG IN VIVO.....	56
4.4	CDK-INHIBITOREN.....	58
4.5	BESTRAHLUNGSABHÄNGIGE EFFEKTE DER KOMBINATIONSTHERAPIE VON SPYADI UND CDK-INHIBITOREN .....	59
4.6	DNA-STRANGBRÜCHE NACH KOMBINATIONSTHERAPIE UND BESTRAHLUNG .....	62
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>64</b>
<b>6.</b>	<b>APPENDIX .....</b>	<b>66</b>
6.1	THESEN .....	66
6.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	67
6.3	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	68
6.4	TABELLENVERZEICHNIS.....	70
<b>7.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>71</b>
<b>8.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>83</b>
<b>9.</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>86</b>
<b>10.</b>	<b>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....</b>	<b>87</b>

## 1. EINLEITUNG

---

### 1.1 GLIOBLASTOMA MULTIFORME

---

Maligne Gliome sind die häufigste Form der primären Hirntumore. Die aggressivste Form stellt dabei das Glioblastoma multiforme (GBM) dar (1). GBM werden als Grad 4 laut WHO Klassifikation von Tumoren des Zentralen Nervensystems eingeteilt und zählen zu den diffusen Gliomen aus astrozytärer Abstammung (2). Ungefähr 90 % aller GBM Fälle sind IDH wildtypisch und treten als primäre Gehirntumore vor allem bei Patienten über 55 Jahren auf. IDH-Mutationen treten insbesondere in sekundären Tumoren bei jüngeren Patienten auf, die sich aus niedrigergradigen diffusen Gliomen entwickeln (1). Die Prognose ist infaust, wobei die mittlere Überlebensdauer nach Diagnose zwischen 9 und 12 Monaten beträgt (3). Die Inzidenz ist bei Männern etwa 1,5 Mal höher als bei Frauen (4). Als ätiologische Risikofaktoren konnten bisher ionisierende Strahlung, Vinylchlorid, Petroleum, Pestizide und Rauchen identifiziert werden (4), (5). Primäre Tumore entstehen meist innerhalb weniger Wochen *de novo*, klinisch präsentieren sich die Patienten mit Kopfschmerzen, fokalneurologischen Defiziten, neu aufgetretenen epileptischen Episoden, Verwirrheitszuständen oder Amnesie (4). Die Behandlung erfolgt bisher durch Resektion sowie eine adjuvante Strahlen- und Chemotherapie. Temozolomid (TMZ), ein alkylierendes Zytostatikum, ist das einzige bisher zugelassene medikamentöse Therapieverfahren. TMZ führt zu einer Guanin Methylierung der DNA an Position O6, welche zu einer inkorrekten Paarung von O6-Methylguanin und Thymin führt. Dies aktiviert das Mismatch Reparatur System. Die resultierenden Doppelstrangbrüche in der DNA führen zum Zellzyklusarrest und zur Induktion der Apoptose (6). MGMT (O6-Methylguanin-DNA Methyltransferase) kann eine TMZ-Resistenz verursachen, indem es die Methylierung von Guanin an der O6 Position eliminiert (6). Eine vollständige chirurgische Resektion des Tumorgewebes ist aufgrund des infiltrativen Wachstums des Tumorgewebes nicht möglich (7). Des Weiteren weisen GBM eine hohe Strahlenresistenz auf und etwa 50 % der behandelten Patienten sprechen nicht auf das eingesetzte Chemotherapeutikum Temozolomid an (7). Zudem stellen Hirntumore eine zusätzliche Herausforderung an die medikamentöse Behandlung dar, weil potenzielle Wirkstoffe erst durch die Blut-Hirn-Schranke gelangen müssen, um am Zielort wirken zu können. Aufgrund der ein-

geschränkten Behandlungsmöglichkeiten und der schlechten Prognose für Patienten mit GBM bedarf es dringend neuer Therapieansätze.

## 1.2 ARGININ IN PHYSIOLOGISCHEN STOFFWECHSELPROZESSEN

---

Arginin hat als semi-essentielle Aminosäure eine besondere Bedeutung für den menschlichen Stoffwechsel. Der normale Plasmaspiegel von L-Arginin liegt zwischen 95 und 250  $\mu\text{mol/l}$  und hängt vom Entwicklungsstadium und Ernährungszustand ab (8). Die körpereigene Synthese findet hauptsächlich in den Nieren statt. Arginin spielt neben seiner Funktion in der Proteinbiosynthese auch bei der Spermatogenese, Wundheilung, fetalen Entwicklung, dem neonatalen Wachstum und chronisch metabolischen Krankheiten eine Rolle (9). Auch immunmodulatorisch ist Arginin wirksam, indem es T-Zellen und NK-Zellen stimuliert (10). Zudem ist Arginin als Vorstufe an der Synthese von Stickstoffmonoxid (NO), Polyaminen, Prolin, Kreatinin und Glutamat beteiligt (9). Die endogene *de-novo* Synthese von L-Arginin erfolgt über den Harnstoffzyklus. Zunächst wird in der mitochondrialen Matrix aus  $\text{NH}_4^+$  und  $\text{HCO}_3^-$  Carbamoylphosphat gebildet. Dieses reagiert mit Ornithin unter Bildung von Citrullin (11). In den Nieren wird Citrullin aus dem Blutplasma extrahiert. Mithilfe von Argininsuccinatsynthetase 1 (ASS1) entsteht Argininsuccinat, das wiederum durch Argininsuccinatlyase (ASL) zu L-Arginin umgesetzt wird (8).

## 1.3 ARGININ IM TUMORSTOFFWECHSEL

---

Die Karzinogenese wird durch verschiedene Mechanismen von Arginin beeinflusst. Unter anderem spielt NO, welches als universelles Signaltransduktionsmolekül wirkt, eine wichtige Rolle in der Tumorgenese (10). Der erste empirische Versuch zur Rolle von Arginin bei Krebserkrankungen wurde 1930 von Gilroy durchgeführt. Dazu wurden Mäusen nichtmetastasierende Karzinome implantiert und einige der Tiere mit einer argininreichen Diät gefüttert. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war in der Gruppe unter erhöhter Argininzufuhr ein größeres Tumorstadium zu verzeichnen (12).

Einige Intermediate des Argininmetabolismus spielen dabei eine Rolle. NO führt in geringen Dosen zum Warburg-Effekt, bei welchem Krebszellen ihre Energie bevorzugt aus der anaeroben Glykolyse gewinnen, was zu einem erhöhten Laktatspiegel

führt, höhere Dosen NO führen zum Zelltod und verlängerter mitochondrialer Depolarisation (13) (14). Glutamin, ein Derivat des Arginin-Metabolismus und eine nicht essentielle Aminosäure, ist wichtig für schnelles Tumorwachstum. Seine Funktion im Tumorstoffwechsel beinhaltet Biosynthese von Nukleotiden und weiteren Aminosäuren, Modulation reaktiver Sauerstoff Spezies sowie Hochregulation von Onkogenen (9).

Tumorzellen haben häufig die Fähigkeit zur Argininbiosynthese verloren. Die Auxotrophie von onkogenem Gewebe für Arginin bietet somit einen potenziellen Angriffspunkt für eine Argininentzugsbehandlung. Die Arginin-Auxotrophie in GBM- und anderen Tumorzellen beruht auf der Stilllegung eines oder mehrerer der Schlüsselenzyme für die *de novo* Arginin Biosynthese. Genetische sowie epigenetische Inaktivierung von *ASS1* ist dabei am häufigsten. Die genetische Stilllegung von *ASS1* erfolgt über HIF1 $\alpha$  (15). Der Mechanismus der epigenetischen Inaktivierung von *ASS1* oder *ASL* basiert auf Hypermethylierung von CpG-Promotorinseln. Diese lässt sich mithilfe methylierungsspezifischer PCR detektieren (16). Weitere Enzyme wie Ornithin Carbonyltransferase (OCT), welche zur Argininbiosynthese genutzt werden, beeinflussen die Arginin Auxotrophie möglicherweise zusätzlich (17).

Arginin degradierende Enzyme wie bakterielle Arginin Deiminasen gelten als potenzielle Therapeutika gegen Arginin-auxotrophe Tumore.

#### 1.4 ARGININ-DEIMINASE SYSTEM

---

*Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) kann neben einigen weiteren Mikroorganismen aus L-Arginin ATP erzeugen. Dies erfolgt mithilfe des Arginin-Deiminase-Systems, das aus den drei Enzymen Arginin-Deiminase (ADI), Ornithin-Carbonyltransferase (OCT) und Carbamat-Kinase besteht (Abb. 1).

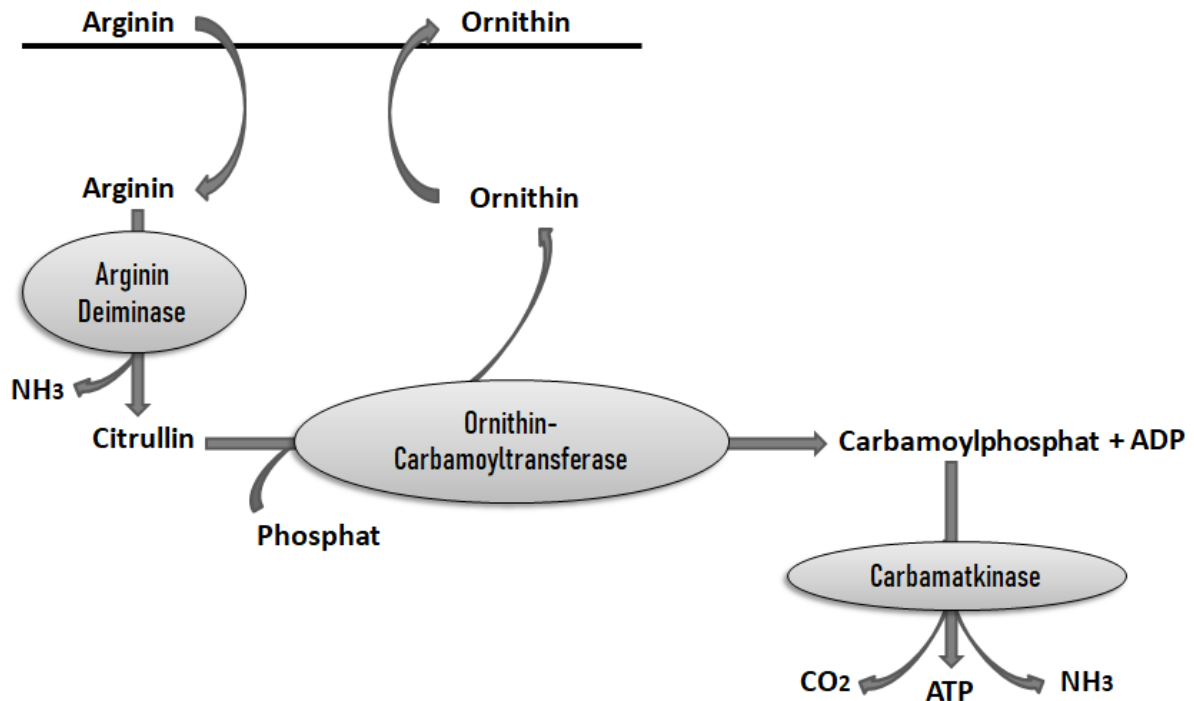


ABBILDUNG 1: ARGININ DEIMINASE SYSTEM

ADI hydrolysiert L-Arginin zu L-Citrullin und Ammoniak. Das entstandene L-Citrullin wird durch die Ornithin-Carbamoyltransferase zu Carbamoylphosphat und Ornithin umgesetzt. Im letzten Schritt wird die Phosphatgruppe von Carbamoylphosphat mithilfe der Carbamat-Kinase auf ADP übertragen, wobei ATP, Ammoniak und CO<sub>2</sub> entstehen (8).

### 1.5 ANTITUMORALE WIRKUNG VON ADI

---

Die Sensitivität eines Tumors gegenüber ADI wird durch seine Arginin-Auxotrophie bestimmt. Arginin-auxotrophe Tumore sind auf die Aufnahme von extrazellulärem Arginin aus dem Blut mithilfe von kationischen Aminosäuretransportern angewiesen. Das im Blut zirkulierende Arginin stammt aus der Degradation von Proteinen aus der Nahrung oder aus der Biosynthese im Harnstoffzyklus in den Nieren (18). Dabei produzieren auch gesunde Zellen im restlichen Körper über den Harnstoffzyklus Arginin für den Eigenbedarf (18). Aufgrund des Selektionsdrucks ist nur ein Teil der GBM Arginin auxotroph. In einer Untersuchung von Syed *et al.* fand sich bei den untersuchten GBM Tumoren in 30 % der Fälle eine Methylierung der ASL CpG Insel, in 22 % bei ASS1. Eine Methylierung an beiden Stellen war in 14 % der GBM Fälle feststell-

bar. In einer weiteren Arbeit konnte gezeigt werden, dass 50 % der untersuchten GBM Linien *in vitro* auf eine Behandlung mit ADI ansprachen (19).

Im Jahre 1963 wurde erstmals in mit Mycoplasmen kontaminierten Lymphomzellen eine Hemmung des Wachstums beobachtet (20). Später wurde gezeigt, dass das Arginin abbauende Enzym ADI der Mycoplasmen für einen Argininenzug und der damit verbundenen Wachstumshemmung verantwortlich war (21). Seitdem wurde *Mycoplasmen* ADI intensiv auf ihr antitumorales Potenzial in verschiedenen onkologischen Bereichen untersucht (22). ADI aus Mycoplasmen wurde unter anderem in pegylierter Form bei Hepatozellulären Karzinomen in Phase III Studien getestet (23). In der vorliegenden Arbeit wurde ADI aus *S. pyogenes* (SpyADI) genutzt, da deren Temperaturoptimum im physiologischen Bereich des Menschen liegt und deren pH Optimum im neutral bis leicht sauren Bereich, was mit den Bedingungen in soliden Tumoren korreliert (16). Die antitumorale Wirkung der Arginindegradierung verursacht zunächst zellulären Stress. Dadurch können autophagozytotische Prozesse sowie Seneszenz angestoßen werden (24). Autophagie wurde erstmals 1963 durch Christian de Duve entdeckt (25). Dabei handelt es sich um einen nicht apoptotischen Weg des programmierten Zelltodes, bei dem eigene Zellbestandteile abgebaut und verwertet werden. Autophagie dient normalerweise zur Aufrechterhaltung der Funktionalität einer Zelle durch den Abbau geschädigter Organellen. Bei langanhaltendem Nährstoffdefizit wie Argininenzug kann jedoch der Zelltod ausgelöst werden. Nach der Induktion kommt es zur Bildung von Autophagosomen. Diese werden aus dem sogenannten Phagophoren sequestriert. An den Membranen werden dann verschiedene ATG-Proteine rekrutiert, welche die Bildung des Autophagosoms abschließen. Daraufhin verschmelzen die Lysosomen mit den Autophagosomen und die innere Membran der Autophagosomen und das aus dem Zytoplasma kommende Material werden degradiert. Die entstandenen Monomere werden zur Wiederverwendung exportiert (26). Des Weiteren kann Argininenzug zelluläre Seneszenz induzieren (16). Dabei handelt es sich um eine Stressreaktion, die einen dauerhaften Zellzyklusstillstand hervorruft und tiefgreifende transkriptionelle, epigenetische, morphologische und metabolische Veränderungen auslöst (27).

## 1.6 PEGYLIERUNG

---

Nicht-humane Proteine wie die bakterielle ADI rufen beim Menschen eine starke Immunreaktion hervor, die bis zum anaphylaktischen Schock führen kann. Zur klinischen Anwendung kann die Immunogenität von Makromolekülen durch Pegylierung erheblich reduziert werden. Dabei werden Polyethylenglykole (PEG) an Zielstrukturen der immunogenen Makromoleküle konjugiert, sodass diese umhüllt werden. Die Pegylierung schirmt antigene und immunogene Epitope vor Erkennung durch das Immunsystem ab. Zudem schützt sie vor Erkennung durch das retikuloendotheliale System und Degradierung durch proteolytische Enzyme (28). Dieser Schutz entsteht durch sterische Hinderung aufgrund der PEG-Moleküle (29). Durch PEG-Konjugation vergrößern sich auch die Polypeptide, wodurch die renale Clearance verkleinert und die Biodistribution verändert werden (28). Eine verminderte renale Ausscheidung verlängert zugleich die Halbwertszeit des Enzyms, beide sind vom Molekulargewicht der konjugierten PEG-Moleküle abhängig. Allerdings führt Pegylierung auch zur Reduzierung der enzymatischen Aktivität. Als besonders günstig im Verhältnis Aktivitätsverlust zu Reduktion der Immunogenität und renalen Ausscheidung hat sich die Konjugation mit PEG-Molekülen mit einem Molekulargewicht von 20 kDa erwiesen (30) (31). Sowohl bei der ADI aus Mycoplasmen als auch bei der SpyADI führt die Konjugation mit 20 kDa PEG Molekülen zu einer Reduktion der Aktivität um ca. 50 % (30) (32). Dennoch bildet die Pegylierung eine bewährte Methode im Tumor-Targeting. Durch das hohe Molekulargewicht können sich pegylierte Makromoleküle via *enhanced permeability and retention* (EPR) Effekt im Tumorgewebe anreichern. Durch die pathologische Neovaskularisation von Tumoren ist die Basalmembran diskontinuierlich oder völlig fehlend. Durch diese Löcher und das Fehlen eines drainagierenden Lymphsystems können die pegylierten Enzyme im Tumorgewebe akkumulieren (33). Die Pegylierung erfolgt normalerweise über die Bindung einer Aminogruppe des Proteins an Estergruppen des entsprechend funktionalisierten PEGs (29).

## 1.7 CDK-INHIBITOREN

---

Der Zellzyklus wird durch koordinierte Aktivität von Cyclin/Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) Komplexen reguliert. Einen Regulationsmechanismus stellt dabei die Bindung der Cyclin/CDK Komplexe an CDK-Inhibitoren (CDKi) dar (Abb. 2) (34). CDKis können die Wirkung körpereigener CDK-Inhibitorproteine imitieren und stellen somit potenzielle Therapeutika im Bereich der Onkologie dar. CDK-Inhibitorproteine können in zwei Familien aufgeteilt werden: Die INK Genfamilie kodiert für p16<sup>INK4a</sup>, p15<sup>INK4b</sup>, p18<sup>INK4c</sup> und p19<sup>INK4d</sup>, welche an CDK4 und CDK6 binden und deren Kinasaktivität über die Assoziation mit D-Typ Cyclinen inhibiert. CDK-Inhibitorproteine der Kip/Cip Familie binden sowohl an Cyclin als auch an CDK-Untereinheiten und können die Aktivität von Cyclin D-, E-, A- und B-CDK Komplexen modulieren (34).

Während des Zyklus werden positive mitogene Signale zunächst durch ein Typ-D Cyclin erkannt, welches an CDK4 und CDK6 während der G<sub>1</sub>-Phase bindet, die Negativkontrolle des CDK4/6 Komplexes erfolgt über CDKis der INK4-Familie (35). Der CDK4/6 Cyclin D Komplex führt zu Inaktivierung von Pocket Proteinen und somit zur Expression von E-Typ Cyclinen, die an CDK2 binden. Der CDK2/Cyclin E Komplex phosphoryliert die Pocket Proteine und führt zu deren vollständiger Inaktivierung sowie der Progression von G<sub>1</sub> zur S-Phase. CDK2 wird in der G<sub>2</sub>-Phase durch Cyclin A2 aktiviert (36). Schließlich wird CDK1 am Ende der Interphase durch A-Typ Cycline aktiviert, um die Induktion der Mitose zu erleichtern. Nach dem Kernhüllenzerfall werden Typ-A Cycline abgebaut und dadurch die Formierung von CDK1/Cyclin B Komplexen, welche die Zellen durch die Mitose bringen, erleichtert (35).

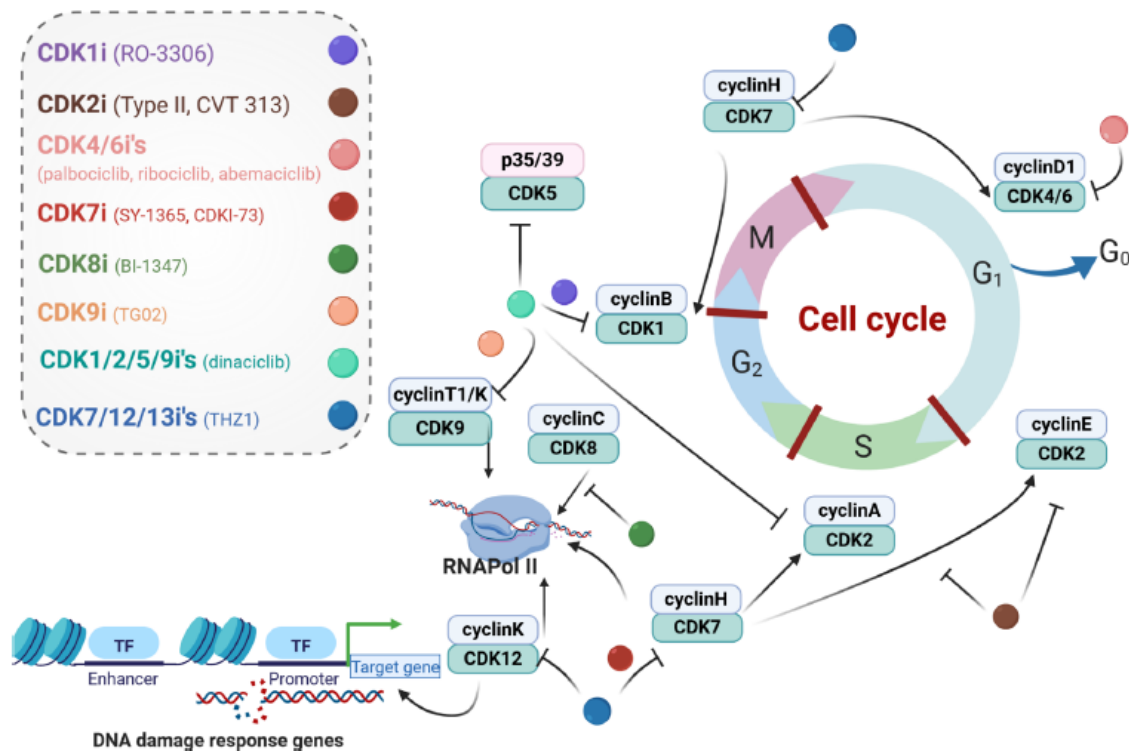


ABBILDUNG 2: CDK-INHIBITOREN ÜBERSICHT (37)

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mit den beiden CDKis Dinaciclib und Abemaciclib gearbeitet. Dinaciclib inhibiert CDK2, CDK5, CDK1 und CDK9. Abemaciclib ist ein Inhibitor der CDKs 4 und 6. CDK 4 und 6 sind mit Cyclin D wesentliche Treiber der Zellproliferation (38).

## 1.8 ZIELE DER ARBEIT

GBM stellt aufgrund seiner geringen Überlebensprognose und als am häufigsten vorkommender maligner Hirntumor eine große Herausforderung für die ärztliche Behandlung dar (39). Die Behandlung erfolgt bisher durch Resektion sowie eine adjuvante Strahlen- und Chemotherapie. TMZ ist das einzige bisher zugelassene medikamentöse Therapeutikum, daher herrscht großer Bedarf für neue Behandlungen (40). Zudem stellen TMZ-Resistenzen eine große Herausforderung dar. SpyADI ist ein potenzielles Therapeutikum im Bereich der Arginin-auxotrophen GBM. Eine Pegylierung könnte die Immunogenität dieses bakteriellen Enzyms senken und die Serumhalbwertszeit erhöhen.

Ziel dieser Arbeit war es, die Effizienz der Pegylierung der SpyADI zu bestimmen und die Auswirkungen der Pegylierung auf pharmakokinetische Eigenschaften des En-

zyms *in vitro* an GBM Zellen und *in vivo* an immunkompromittierten Mäusen zu untersuchen. Des Weiteren sollte der Einfluss von SpyADI in sequenzieller Kombinationstherapie mit CDKis mit und ohne Bestrahlung auf Biomasse und Abundanz von DNA-Reparaturproteinen bei GBM Zellen untersucht werden.

---

**2. MATERIAL AND METHODEN**


---

**2.1 MATERIAL**


---

TABELLE 1: MATERIAL

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
<b>6-well-Platten</b>	Greiner Bio-One GmbH
<b>96-well-Platten</b>	Greiner Bio-One GmbH
<b>Ampulle für Agilent 4226A autosampler</b>	Agilent Technologies
<b>Ampullenaufsatz</b>	Agilent Technologies
<b>Ampulleneinsatz 250 µl mit Polymerfüßen</b>	Agilent Technologies
<b>Chamber slides µ-Slide 8 Well</b>	Ibidi GmbH
<b>Dialyseschlauch VISKING®, MWCO 12-14 kD</b>	Serva Electrophoresis GmbH
<b>EDTA-Rörchen</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>Flaschenaufsatzfilter Filtropur BT25, 0,2 µM</b>	Sarstedt
<b>Glasperlen, Durchmesser 0,07 - 0,11 mm</b>	Carl Roth GmbH
<b>HiTrap Q XL Säule 1 ml</b>	GE Healthcare
<b>Kryokonservierungsmedium</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>Kryowells</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>Küvetten</b>	Sarstedt
<b>Luer-Lock Spritze</b>	BRAUN
<b>Multipettenspitzen</b>	Eppendorf
<b>Neubauer Zählkammer</b>	Carl Roth GmbH
<b>Pipettenspitze</b>	Sarstedt
<b>Poly-Prep Chromatographie Säule</b>	Bio-Rad Laboratories GmbH
<b>PVDF Membran</b>	Carl Roth GmbH
<b>Reaktionsgefäß, 1,5 ml</b>	Eppendorf
<b>Ribolysertubes</b>	VWR International

---

<b>Serologische Pipette</b>	Greiner Bio-One GmbH
<b>Strep-Tactin Sepharose</b>	IBA GmbH
<b>Whatman Chromatographiepapier</b>	BioRad-Laboratories
<b>Zellkulturflaschen 175 cm<sup>2</sup></b>	Greiner Bio-One GmbH
<b>Zellschaber</b>	Greiner Bio-One GmbH
<b>Zentrifugationsfilter Amicon ® Ultra -4 MWCO 30kDa</b>	Merck
<b>Zentrifugationsröhrchen, 15 ml</b>	Greiner Bio-One GmbH
<b>Zentrifugationsröhrchen, 50 ml</b>	Greiner Bio-One GmbH

TABELLE 2: GERÄTE

<b>Ausrüstung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Aqua dest. Aufbereitungspumpe</b>	SG
<b>Eismaschine EF 103 easy-fit</b>	Scotsman
<b>Gammabestrahler IBL 637</b>	CIS bio GmbH
<b>Gel und Blotausleser UVP ChemStudio</b>	Analytik Jena AG
<b>Gelelektrophoresekammer Mini-Protean</b>	BioRad Laboratories GmbH
<b>Gelelektrophoresekammer Power Pac HC</b>	Bio-Rad Laboratories GmbH
<b>HPLC Agilent 1260 Infinity II</b>	Agilent Technologies
<b>Infrarot Aufnahmegerät Odyssey</b>	Li-Cor Bioscience
<b>Inkubator HERA cell</b>	Heraeus
<b>Inkubator HERA cell 240</b>	Heraeus
<b>Konfokalmikroskop</b>	Zeiss
<b>Mikroplattenausleser SpectraMax M3</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>Mikroplattenausleser VERSAMax</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>Mikroskop Olympus CKX41</b>	Olympus Corporation
<b>Multipette® plus</b>	Eppendorf
<b>pH-Meter RCT Basic</b>	IKA Labortechnik
<b>Pipetboy</b>	Eppendorf

<b>Pipetten (2-1000 µl)</b>	Eppendorf
<b>Ribolyserröhrchen Precellys 24</b>	Peqlab, VWR International GmbH
<b>Saugpumpe</b>	OMP
<b>Säulen Poroshell 120 EC-C18</b>	Agilent Technologies
<b>Schüttler</b>	Biometra
<b>Schüttler CM-9</b>	Sarstedt
<b>Schüttler MTS 4</b>	IKA Labortechnik
<b>Schüttelinkubator NB-205L</b>	N-BIOTEK
<b>Spektrometer DS-C</b>	DeNovix
<b>Sterilbank Kojair</b>	Biowizard
<b>Thermomixer compact</b>	Eppendorf
<b>Vakuumpumpe DNA 120</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>Vortexer</b>	Sarstedt
<b>Waage BP 4100S</b>	Sartorius
<b>Waage Scale Adventurer™ Pro</b>	OHAUS
<b>Western Blot Transfer System Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell</b>	BioRad Laboratories GmbH
<b>Zentrifuge Megafuge 1.0R</b>	Heraeus
<b>Zentrifuge 5424 R</b>	Eppendorf

TABELLE 3: CHEMIKALIEN

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Abemaciclib</b>	Selleckchem
<b>Ammonium Assay Kit</b>	Megazyme International Ireland
<b>Ammoniumsulfat</b>	Carl Roth GmbH
<b>Ampicillin</b>	Sigma-Aldrich
<b>Anhydrotetrazyklin</b>	Sigma Aldrich
<b>APS</b>	Carl Roth GmbH
<b>BCIP/NBT Blue Liquid Substrat</b>	Sigma Aldrich
<b>Bovines Serum Albumin</b>	Merck
<b>Bromphenolblau</b>	AppliChem GmbH
<b>β-Mercaptoethanol</b>	Sigma Aldrich

<b>Calcein, 1 mM in DMSO</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>Coomassie Brilliant Blue R 250</b>	Sigma Aldrich
<b>Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>DAPI</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>Desthiobiotin</b>	Sigma Aldrich
<b>Dinaciclib</b>	Pharmakologie Universitätsmedizin Rostock
<b>DMEM/F-12</b>	PAN Biotech
<b>DMSO</b>	Sigma Aldrich
<b>EDTA</b>	Merck
<b>Ethanol</b>	Walther CMP GmbH
<b>FKS</b>	Sigma Aldrich
<b>Fmoc</b>	Agilent
<b>Formaldehyd in H<sub>2</sub>O (36 %)</b>	Sigma Aldrich
<b>Glycin</b>	Merck
<b>HABA</b>	Sigma Aldrich
<b>KCl</b>	Carl Roth GmbH
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Carl Roth GmbH
<b>LB-Broth Base</b>	Invitrogen™, Life Technologies
<b>L-Arginin</b>	Sigma Aldrich
<b>L-Glutamin</b>	Gibco
<b>Li-Cor Intercept Blocking Puffer</b>	LI-COR Biosciences
<b>MES/KOH</b>	Carl Roth
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Serva Electrophoresis GmbH
<b>mPEG20K-Succinimidyl Carboxymethyl ester</b>	Sigma Aldrich
<b>NaCl</b>	Carl Roth GmbH
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O</b>	Carl Roth GmbH
<b>OPA</b>	Agilent
<b>Page Ruler™ Prestained Protein Ladder</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>Phalloidin green</b>	Thermo Fisher Scientific

---

<b>Picrylsulfonischesäure Lösung, 5% in H<sub>2</sub>O</b>	Sigma Aldrich
<b>Protease Inhibitor Complete Mini</b>	Roche
<b>Rotiophorese® Bisacrylamid</b>	Carl Roth GmbH
<b>SDS</b>	Sigma Aldrich
<b>Strep-Tactin AP Konjugat</b>	IBA GmbH
<b>TEMED</b>	Carl Roth GmbH
<b>TMZ</b>	Pharmacy University Hospital Rostock
<b>TNBSA 5% in Methanol</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>Triton-X-100</b>	Sigma Aldrich
<b>Tris-HCl</b>	Carl Roth GmbH
<b>Trizma</b>	Sigma Aldrich
<b>Trypanblau</b>	Life Technologies GmbH
<b>Trypsin-EDTA 0,25%</b>	Gibco

TABELLE 4: LÖSUNGEN

<b>Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>5x SDS Probenpuffer</b>	62,5 mM Tris pH 6,8 20 % Glycerol 5 % β –Mercaptoethanol 2 % SDS 0,1 % Bromphenolblau
<b>10x PBS high salt pH 7,4</b>	10 M NaCl 0,1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O 0,027 M KCl 0,02 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<b>10x PBS low salt pH 7,4</b>	100 mM NaCl 0,1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O 0,027 M KCl 0,02 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<b>10x PBS pH 7,4 und 8</b>	1,37 M NaCl 0,1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O

	0,027 M KCl
	0,02 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$
<b>10x SDS Laufpuffer</b>	144 g Glycin 30 g Tris base 10 g SDS
<b>Anhydrotetracyclin</b>	Lager: 2 mg/ml in Ethanol Arbeitskonzentration: 0,2 $\mu\text{g/ml}$
<b>Blocklösung</b>	10 % Magermilch in 1 x PBS
<b>Coomassie Färbelösung</b>	25 g Ammoniumsulfat 4 g Phosphorsäure
<b>Entfärber</b>	10 % Ethanol 2 % Orthophosphorsäure
<b>Fixierlösung</b>	10 % Essigsäure 50 % Ethanol
<b>Injektionsverdünnungsmittel</b>	10 ml Mobile Phase A mit 40 $\mu\text{l}$ konz. $\text{H}_3\text{PO}_4$
<b>Lysepuffer</b>	5 M NaCl 1 M Tris pH 8 0,25 M EDTA pH 8 0,2 M PMSF 10 % Triton X-100 4 % Natriumazid 10x Proteaseninhibitor
<b>Mobile Phase A</b>	10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 10 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ pH 8,2 3,8 g/l $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$ 1,4 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ Zugabe von 1,2 ml konz. HCL (Final-pH 8,4)
<b>Mobile Phase B</b>	Acetonitril:Methanol:Wasser (45:45:10, v:v:v)
<b>Natriumbikarbonat pH 8,5</b>	0,1 M Natriumbikarbonat pH-Einstellung mit Natriumhydroxid

---

<b>PBST</b>	10 % 10x PBS pH 7,4 0,1 % Tween 20
<b>Puffer E</b>	2,5 mM Desthiobiotin in Puffer W
<b>Puffer R</b>	1 mM HABA in Puffer W
<b>Puffer W</b>	150 mM NaCl 100 mM Tris-HCl (pH 8,0) 1mM EDTA
<b>SemiDry Puffer</b>	192 mM Glycin 25 mM Tris-HCl 20 % Methanol 0,1 % SDS
<b>Stopp-Puffer</b>	2/3 10 % SDS 1/3 1 N HCl

TABELLE 5: NÄHRMEDIEN

<b>Nährmedium</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>DMEM/F12 Medium mit NaHCO<sub>3</sub> and L- Glutamin</b>	PAN Biotech
<b>LB-Medium</b>	10 g LB-Broth Base 2,25 g NaCl 500 ml Aqua dest.

TABELLE 6: ANTIBIOTIKA

<b>Antibiotika</b>	<b>Konzentration</b>
<b>Penicillin-Streptomycin</b>	Stock: 10 mg/ml Arbeitskonzentration: 1 %

TABELLE 7: ANTIKÖRPER

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Anti-H2A.X Phospho Antikörper (primärer AK aus Maus)</b>	BioLegend

<b>Anti-GAPDH Monoklonaler Antikörper (primärer AK aus Maus)</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>Anti-Ku-80 Monoklonaler Antikörper (primärer AK aus Maus)</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>Anti-Rad51 Monoklonaler Antikörper (primärer AK aus Maus)</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>Anti-XRCC1 Monoklonaler Antikörper (primärer AK aus Maus)</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>Goat anti mouse IRDye 800CW Antikörper</b>	Li-Cor Bioscience

### 2.1.1 EUKARYOTISCHE ZELLEN

Vier humane GBM Zelllinien von primärem Tumormaterial aus GBM Stadium IV wurden für die Experimente verwendet. Die Zelllinien stammen aus einer Kooperation mit der "AG Onkologie/Palliativmedizin" (Kinder- und Jugendklinik der Universitätsmedizin Rostock). Herkunft und Charakteristika der Zellen sind der Tabelle 8 zu entnehmen.

TABELLE 8: GBM ZELLEN

Zelllinie	Geschlecht	Alter	Diagnose	Lokalisation	Passage
<b>HROG02</b>	männlich	68 Jahre	Primäres GBM	rechts, parietooccipital	P42 – P45
<b>HROG05</b>	weiblich	60 Jahre	Rezidivierendes GBM	links, temporal	P76 – P87
<b>HROG52</b>	männlich	unbekannt	Primäres GBM	links, temporal	P40 – P44
<b>HROG63</b>	männlich	unbekannt	Rezidivierendes GBM	links, temporal	P36 – P39

### 2.1.2 BAKTERIENSTAMM UND PLASMID

Die Arginin-Deiminase von *S. pyogenes* (SpyADI) wurde heterolog mithilfe des rekombinanten *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  Stamm 4640 aus der Sammlung des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene der Universitätsmedizin Rostock produziert. Das verwendete Plasmid pASK-IBA2-ArcA, welches in Abbildung 3 dar-

gestellt ist, trägt ein Resistenzgen gegen Ampicillin, welches als Selektionsmarker für Bakterienkulturen dient. Das 4,5 kb große Plasmid besitzt ebenfalls einen tet-Promoter und das *arcA* Gen, welches für die ADI von *S. pyogenes* M49 Stamm 591 kodiert. Zusätzlich sorgt die stromaufwärts des *arcA* Gens kodierte OmpA Signalsequenz dafür, dass das Protein ins Periplasma exportiert wird. Dies verhindert die Akkumulation von SpyADI im Cytosol und somit die Bildung von Inclusion Bodies. *StrepTagII* kodiert für einen C-terminalen Affinitätstag, welcher zur Aufreinigung und Detektion der SpyADI verwendet wird.

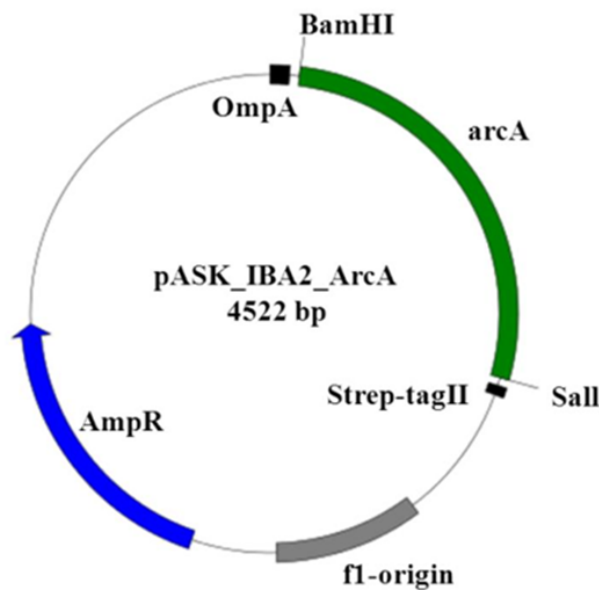


ABBILDUNG 3: SCHEMA DES EXPRESSIONS-PLASMIDS PASK-IBA2-ARCA

OmpA: Signalsequenz zur Proteinsekretion, AmpR: Ampicillin Resistenzgen, f1-origin: Replikationsursprung, Strep-tagII: C-terminaler Strep-Tactin Affinitätstag, BamHI / Sall: Restriktionsstellen, *arcA*: Gen für Arginin-Deiminase von *S. pyogenes*. (41)

### 2.1.3 NSG MÄUSE

Für die *in vivo* Experimente wurden NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>IL2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ NSG Mäuse eingesetzt. NSG Mäuse sind komplex immundefizient und werden als *in vivo* Modell für Krebstherapien eingesetzt. Die vom Jackson Laboratory entwickelte NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>IL2rg<sup>tm1Wjl</sup> (NSG) Maus besitzt mehrere Mutationen: Severe combined immune deficiency (*scid*) und ein Null-Allel der IL2 Rezeptor gemeinsamen Gamma-Kette (*IL2rg*<sup>null</sup>). Die *scid* Mutation verursacht die B- und T-Zell-Defizienz der Mäuse, während die *IL2rg*<sup>null</sup> Mutation Zytokinsignalwege blockiert und somit zu einem Mangel funktioneller NK-Zellen führt (42).

Die Immundefizienz der Mäuse sorgt dafür, dass die Immunreaktion der Tiere auf das rekombinante bakterielle Enzym reduziert werden kann. Zudem können NSG Mäuse auch mit Tumoren transplantiert werden, was für die Nutzung eines NSG Mausmodells spricht (43), (42).

Die Tiere stammen aus eigener Zucht der Zentralen Versuchstierhaltung des Instituts für Experimentelle Chirurgie (Direktorin: Prof. Dr. med. B. Vollmar) der Universitätsmedizin Rostock und wurden ursprünglich von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Die Mäuse wurden in speziellen Filterkäfigen in pathogenfreien Spezialräumen mit maximal vier Tieren pro Käfig unter freiem Zugang zu Wasser und Standardfutter (autoklavierte Pellets) in einem zwölfstündigen Tag-/Nachtzyklus bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes gehalten (spezifisch pathogenfrei-nahe Haltung). Für die Versuche wurden ausschließlich adulte Weibchen eingesetzt. Alle Versuche wurden gemäß Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18.05.2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), zuletzt geändert durch Artikel 280 der Verordnung vom 19. Juni 2020 (BGBl. I S. 1328) und Verordnung zur Umsetzung der Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22.09.2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere (Tierschutz-Versuchstierverordnung) vom 01.08.2013 (BGBl. I S. 3125), zuletzt geändert durch Artikel 394 der Verordnung vom 31.08.2015 (BGBl. I S. 1474) durchgeführt. Alle Versuche wurden vorab durch das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern mit dem Aktenzeichen 7221.3-1-032/19-3 genehmigt.

## **2.2 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN**

---

### **2.2.1 HETEROLOGE PRODUKTION VON SPYADI IN *E. COLI***

---

Für die heterologe Überexpression wurde eine Vorkultur angesetzt. Dazu wurden 25 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie von *E. coli* DH5 $\alpha$ /pASK-IBA2-ArcA inokuliert. Die Vorkultur der fakultativ anaeroben Bakterien wurde über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Am Folgetag wurde die Hauptkultur (Gesamtvolumen 500 ml) mit der Vorkultur inokuliert und bei 37 °C geschüttelt inkubiert bis eine Opti-

---

sche Dichte bei 600 nm von 0,5 – 0,6 erreicht war. Die SpyADI Expression wurde durch das Hinzufügen von 0,2 µg/ml Anhydrotetrazyklin (AHT) induziert und die induzierte Kultur über Nacht unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. 1-ml-Proben wurden vor der Induktion und am Ende der Kultivierung entnommen und mittels SDS PAGE und Western Blot analysiert. Der Rest der Hauptkultur wurde für 10 min bei 3333 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das entstandene Zellpellet bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

## 2.2.2 STREP-TACTIN AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE

---

Die SpyADI wurde mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Das *Strep-TagII* Peptid wirkt dabei als Bindungspartner für die StrepTactin-Sepharose-Matrix (Abb. 4). Die C-terminale Lage des *StrepTagII* erlaubte nur dem vollständig translatierten Protein an die StrepTactin-Sepharose-Matrix zu binden. Strep-Tactin ist ein Derivat von Streptavidin, der *StrepTagII* ist von Biotin abgeleitet. Zwischen *StrepTagII* und der SpyADI liegt ein Spacer, welcher sicherstellt, dass keine sterischen Hinderungen die Chromatographie stören.

Vor Beginn der Affinitätschromatographie wurde das zuvor geerntete Zellpellet aus der Überexpression in 5 ml Puffer W und einer halben Tablette Mini Complete Protease Inhibitor Cocktail suspendiert. Die Suspension wurde zu je 1000 µl in sechs Ribolysertubes transferiert. Die Tubes wurden zuvor mit circa 200 mg Glasperlen mit einem Durchmesser von 0,07 bis 0,11 mm gefüllt. Die Zellyse wurde mechanisch in zwei Zyklen von jeweils 30 s bei 6500 m/s<sup>2</sup> durchgeführt. Zwischen beiden Zyklen wurden die Proben auf Eis gestellt, um eine zu starke Erhitzung und daraus folgende Denaturierung der Enzyme zu verhindern. Schließlich wurden alle Proben bei 10.000 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die Überstände wurden zum fertigen Zellysat gepoolt.

Eine Poly-Prep Chromatographie Säule wurde mit 4 ml Strep-Tactin Sepharose-Lösung (50 %) gefüllt und verschlossen. Nachdem sich die Sepharose abgesetzt hatte, wurde die Säule geöffnet und der Durchfluss verworfen. Die geschlossene Säule wurde dann mit 5 Säulenvolumen (column volumes, CV) Puffer W äquilibriert. Der Puffer wurde abgelassen und das Zellysat wurde auf die Säule gegeben und 30 min auf der Säule inkubiert, um eine möglichst vollständige Bindung der *StrepTagII*-SpyADI an die Säulenmatrix zu gewährleisten. 1 ml des Lysat-Durchflusses wurde

---

aufgefangen und als Probe für SDS PAGE und Western Blot gesammelt. Die Säule wurde zwei Mal mit 5 CV Puffer W gewaschen. Während des zweiten Waschschrittes wurde eine Probe der Waschfraktion abgenommen. Die Elution erfolgte 10 Mal mit je 0,5 ml Puffer E und sämtliche Elutionsfraktionen wurden gesammelt. Abschließend wurde die Säule mit 30 ml Puffer R regeneriert und mit Puffer W gewaschen, bis die Sepharose wieder weiß wurde.

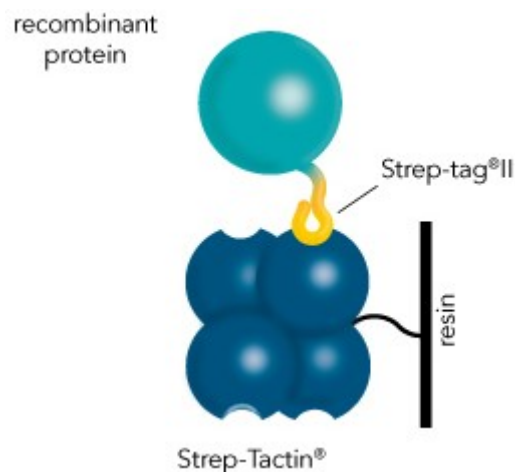


ABBILDUNG 4: STREP-TACTIN AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE (44)

### 2.2.3 DIALYSE

---

Zum Umpuffern und Entfernen niedermolekularer Substanzen von Eluaten der StrepTactin-Affinitätschromatographie wurden diese dialysiert. Es wurde ein Dialyseschlauch mit einer Ausschlussgröße von 12-14 kDa und damit deutlich unter dem Molekulargewicht der SpyADI (46206,6 Da) gewählt. Der Schlauch wurde mit dem während der Strep-Tactin Affinitätschromatographie gesammelten Eluat gefüllt und an beiden Enden verschlossen. Schließlich wurde der Dialyseschlauch in 2 l des gewünschten Dialysepuffers (entspricht dem 400-fachen Probevolumen) über Nacht bei 4 °C unter konstantem Rühren des Dialysepuffers dialysiert.

### 2.2.4 ULTRAFILTRATION

---

Die Ultrafiltration wurde genutzt, um die Proteinkonzentration in Proben zu erhöhen. Hierfür wurden die Proben in Amicon Ultra-4 Zentrifugationsfilter mit einer Aus-

---

schlussgröße von 30 kDa bei 4 °C und 2300 x g für 10 min zentrifugiert und mit dem Retentat weitergearbeitet.

### **2.2.5 BRADFORD-ASSAY**

---

Der Bradford Assay dient der Bestimmung der Proteinkonzentration einer Probe unter Verwendung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue. Die Bindung unspezifischer kationischer, hydrophober und unipolarer Seitengruppen verschiebt das Extinktionsmaximum von Coomassie Brilliant Blue von 465 nm zu 595 nm (45). Unterschiedliche Verdünnungen von Rinderserumalbumin (bovine serum albumin, BSA) von 1 mg/ml bis zu 0,03 mg/ml wurden verwendet, um eine Kalibriergerade zu erstellen. Je 15 µl Kalibrierlösung oder Probe wurden mit 750 µl Bradford Reagenz versetzt, bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert und die Extinktion gegen Aqua dest. bei 595 nm gemessen. Schließlich wurden die Proben mithilfe der BSA Kalibriergerade quantifiziert. Die Proben wurden gegebenenfalls so verdünnt, dass die Messwerte in den Kalibrierbereich fielen.

### **2.2.6 ADI AKTIVITÄTSASSAY**

---

ADI bildet bei der Umsetzung von Arginin Ammonium. Dies kann genutzt werden, um indirekt die Enzymaktivität zu messen. Hierzu wird das entstandene Ammonium mithilfe der Glutamat-Dehydrogenase sowie 2-Oxoglutarat und NADPH zu NADP<sup>+</sup>, L-Glutamat und H<sub>2</sub>O umgesetzt. NADPH und NADP<sup>+</sup> haben aufgrund einer Adenin-Gruppe beide ein Absorptionsmaximum bei 260 nm. Des Weiteren hat NADPH im Gegensatz zu NADP<sup>+</sup> ein zweites Absorptionsmaximum bei 340 nm. Die Abnahme der Absorption bei 340 nm ist somit proportional zum Ammonium, welches von der ADI gebildet wird. Für den Aktivitäts-Assay wurden zunächst 15 µl Enzym-Probe (konzentriert, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 und 1:100 verdünnt) mit 15 µl 0,5 M MES Puffer, 15 µl 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 µl Aqua dest. und 15 µl 50 mM L-Arginin für 10 min bei 37 °C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde jeder Ansatz auch mit 15 µl A. dest. anstelle des L-Arginins mitgeführt. Nach der 10-minütigen Inkubation erfolgte die Quantifizierung des entstanden Ammoniums mit Hilfe des Ammonia Assay (rapid) Kits (Megazyme). Dazu wurden 25 µl der Reaktionsansätze mit 0,5 ml Aqua dest., 75 µl Puffer,

50 µl NADPH-Lösung versetzt und die Absorption gegen Aqua dest. bei 340 nm gemessen. Schließlich wurde die Reaktion durch Hinzufügen von 5 µl Glutamat-Dehydrogenase gestartet und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde die Absorption ein zweites Mal bei 340 nm gemessen. Anhand des Abfalls der Absorption und des Lambert-Beer'schen Gesetzes konnte die Ammoniumkonzentration in jeder Probe berechnet und so die Aktivität der ADI in U/ml bestimmt werden. Eine Unit ist dabei als Umsatz von 1 µmol Arginin pro Minute definiert.

### **2.2.7 SDS-POLYACRYLAMID GELELEKTROPHORESE**

---

Die SDS PAGE trennt Proteine ihrem Größenverhältnis nach in einem elektrischen Feld. Die Proben werden zuvor auf mindestens 95 °C erhitzt, um die sekundäre und tertiäre Struktur durch Denaturierung zu zerstören. Zudem werden die Proteine mit Natriumdodecylsulfat behandelt, welches sich am Protein anlagert und für eine stark negative Ladung sorgt, damit die Proteine im elektrischen Feld nur auf Basis ihres Molekulargewichts getrennt werden. SDS bindet in einem konstanten molaren Verhältnis, sodass eine proportional negative Ladung gewährleistet wird. Im elektrischen Feld bewegen sich die Proteine so in einer größenabhängigen Geschwindigkeit Richtung Anode. Die SDS Gel Proben wurden 1:5 mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Auftrennung im Gel erfolgte in einer Elektrophorese-Kammer, welche mit 1x SDS Laufpuffer gefüllt war. Die erste Geltasche wurde mit 3 µl des Markers Page Ruler™ Prestained Protein Ladder beladen. Die weiteren Taschen wurden mit Proben beladen. Es wurden Trenngele mit einer Acrylamidkonzentration von 12 % verwendet, deren Zusammensetzung der Tabelle 9 zu entnehmen ist. Für den Lauf im Sammelgel (4 % Acrylamid) wurde eine konstante Stromstärke von 0,01 A pro Gel und für das Trenngel 0,02 A pro Gel eingestellt. Das fertige Gel wurde anschließend von der Glasplatte gehoben und entweder für einen Western Blot weiterverwendet oder mit Coomassie gefärbt.

Für die Färbung wurde das Gel zunächst für 30 min in Fixierlösung gelegt und anschließend für drei Stunden mit Coomassie Färbelösung behandelt. Schließlich wurde das Gel mit einem Papiertuch über Nacht in einen Entfärber gegeben, um die überschüssige Farbe aufzusaugen. Das Ergebnis wurde anschließend mittels UVP ChemStudio dokumentiert.

TABELLE 9: ZUSAMMENSETZUNG FÜR ZWEI SDS-GELE

	<b>Trenngel (12 %)</b>	<b>Sammelgel (4 %)</b>
Aqua dest.	3,33 ml	1,46 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 ml	-
0,5 M Tris (pH 6,8)	-	0,625 ml
30 % Bisacrylamid	4 ml	0,39 ml
10 % SDS	100 µl	100 µl
10 % APS	50 µl	25 µl
TEMED	5 µl	5 µl

## 2.2.8 WESTERN BLOT

Proteinproben aus SDS-Gelen können zusätzlich mittels Western Blot visualisiert werden. Hierfür müssen die Proteine von dem Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran transferiert werden.

### 2.2.8.1 DETEKTION DES STREPTAG

Der Nachweis von *StrepTagII*-gekoppelten Proteinen erfolgte mithilfe eines StrepTactin-alkalische Phosphatase (AP) Konjugats, das spezifisch an den *StrepTagII* bindet. Die alkalische Phosphatase setzt das Substrat NBT/BCIP zu einem blauen Farbkomplex um, der visuell detektierbar ist.

Für entsprechende Blots wurden vier Lagen Whatman Papier und eine PVDF-Membran auf Gelgröße zugeschnitten. Das mit Protein beladene Gel und das Whatman Papier wurden in SemiDry Puffer äquilibriert, während die PVDF Membran in Ethanol und Aqua dest. aktiviert wurde. Zwei Schichten Whatman Papier wurden auf die Anodenplatte des SemiDry-Blotters gelegt, danach folgten die PVDF Membran, das Gel und zwei weitere Schichten Whatman Papier. Eine Glaspipette und ein Papiertuch wurden benutzt, um überschüssige Flüssigkeit und Luftblasen zu entfernen. Die Proteine wurden bei 15 V für 40 min von dem Gel auf die Membran transferiert. Anschließend wurde die Membran mit 250 mg Magermilchpulver in 25 ml 1x PBS pH 7,4 über Nacht geblockt. Der Blocking-Puffer wurde durch dreimaliges Waschen der Membran für 5 min mit 1x PBS pH 7,4 wieder entfernt. Danach wurde die Membran in 1:4000 verdünntem StrepTactin-AP-Konjugat bei Raumtemperatur für

eine Stunde inkubiert und anschließend wieder drei Mal gewaschen. 5 ml NBT/BCIP blue liquid Substrat wurden hinzugefügt und für 10 min im Dunkeln inkubiert. Der Überschuss wurde mit Aqua dest. abgewaschen, der Blot getrocknet und dokumentiert.

### **2.2.8.2 DETEKTION VON EINZEL- UND DOPPELSTRANGBRÜCHEN**

---

Die Detektion spezifischer Proteine aus Proteinextrakten von GBM Zellen in Western Blots erfolgte mittels primärer und sekundärer Antikörper. Im Rahmen dieser Arbeit wurden primäre Antikörper gegen Ku80 und Rad51 sowie gegen GAPDH als Ladekontrolle verwendet. 20 µg Protein aus den jeweiligen GBM Extrakten wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf PVDF-Membranen geblottet und mit Magermilch geblockt wie unter 2.2.8.1 beschrieben. Anschließend wurde die Membran drei Mal für je 5 min mit Blocking Puffer (1:3 in PBST) gewaschen und für 2 h bei Raumtemperatur mit den entsprechenden primären Maus-Antikörpern gegen Ku80 (0,6 µg/ml), Rad51 (1 µg/ml) bzw. GAPDH (1:20.000) in PBST unter Schütteln inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden in drei weiteren Waschsritten mit Blocking Puffer (1:3 in PBST) entfernt und die Membran mit einem sekundären IRDye 800CW-gekoppelten Goat-anti-mouse Antikörper 1:10.000 in Blocking-Puffer (1:3 in PBST) für 45 min unter Lichtausschluss inkubiert. Schließlich wurden drei Waschsritte mit PBST für je 5 min durchgeführt. Die Detektion und Dokumentation erfolgte bei 800 nm am Li-Cor Infrared Imager.

### **2.2.9 PEGYLIERUNG DER NATIVEN ADI**

---

Pegylierung beschreibt einen Vorgang, bei welchem Polyethylenglykol-Moleküle an eine Zielstruktur, z. B. ein Protein, konjugiert werden. Die Konjugation erfolgt in zwei Schritten: PEG reagiert mit dem Kopplungsagens zu aktiviertem PEG und schließlich mit der funktionellen Gruppe, wobei das Kopplungsagens durch das Protein ersetzt wird (46).

Für die Pegylierung der SpyADI wurde diese zuvor über Nacht in 1x PBS pH 8 dialysiert und anschließend die Konzentration mittels Bradford Assay bestimmt. Die Pegylierung wurde nach dem von Kerren Volkmar (47) etablierten Protokoll durchgeführt.

Das Volumen der zu pegylierenden SpyADI und ein 40-facher molarer Überschuss an Pegylierungsreagenz (mPEG20K-Succinimidyl Carboxymethylester) wurden in 1x PBS pH 8 zu einem Gesamtvolumen von 5 ml gelöst. Es folgte eine Inkubation auf einem Schüttler bei Raumtemperatur für drei Stunden. Schließlich wurde der Pegylierungsansatz über Nacht in 1x PBS low salt bei 4 °C dialysiert. Bei der funktionellen Gruppe handelte es sich um primäre Aminogruppen. Der Pegylierungserfolg wurde anschließend mittels SDS-Page analysiert.

Um das molare Verhältnis von mPEG20K-Succinimidyl Carboxymethylester zur SpyADI zu berechnen, wurden folgende Formeln verwendet:

$$(C_{\text{ADI}} \cdot V_{\text{ADI}}) / M_{\text{ADI}} = n_{\text{ADI}}$$

$C_{\text{ADI}}$	Konzentration der nativen SpyADI [g/l]
$V_{\text{ADI}}$	Volumen der nativen SpyADI [l]
$M_{\text{ADI}}$	Molare Masse der SpyADI [46206,6 g/mol]
$n_{\text{ADI}}$	Stoffmenge der SpyADI [mol]

$$n_{\text{ADI}} \cdot 40 \cdot M_{\text{PEG}} = m_{\text{PEG}}$$

$M_{\text{PEG}}$	Molare Masse des mPEG20K-Succinimidyl Carboxymethylester [20000 g/mol]
$m_{\text{PEG}}$	Masse des mPEG20K-Succinimidyl Carboxymethylester [g]

### 2.2.10 ANIONENAUSTAUSCHCHROMATOGRAPHIE

---

Anionenaustauschchromatographie trennt Substanzen basierend auf ihrer Oberflächenladung aufgrund kompetitiver Interaktionen zwischen Ionen und der positiv geladenen Säulenmatrix. Die Stärke der Bindung zwischen Substanzen und Säulenmatrix hängt von der Intensität der negativen Ladung der Substanz ab. Die Oberflächenladung eines Proteins ist hierbei pH-abhängig. Bei einem pH-Wert äquivalent zum Isoelektrischen Punkt gleichen sich positive und negative Ladungen zu einer neutralen Oberflächenladung aus. Über dem Isoelektrischen Punkt ist das Protein negativ und darunter positiv geladen. Bei der Anionenaustauschchromatographie bindet die Substanz an feste Ladungen der stationären Phase, die Elution wiederum erfolgt mithilfe eines Salzgradienten (48). Dadurch lassen sich pegylierte SpyADI-PEG20, nati-

---

ve SpyADI und freie PEG-Moleküle, die bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen eluieren, trennen.

Zur Anionenaustauschchromatographie wurde eine HiTrap Q XL Säule verwendet. Alle Puffer und Lösungen wurden zuvor durch Sterifiltration gereinigt. Die Säule wurde mithilfe einer LuerLock Spritze mit 5 CV 1x PBS low salt pH 7,4 gespült und anschließend mit 5 CV 1x PBS high salt pH 7,4 gewaschen. Die Säule wurde mit 10 CV 1x PBS low salt pH 7,4 äquibriert. Die pegylierte SpyADI-Probe, welche zuvor in 1x PBS low salt pH 7,4 dialysiert wurde, wurde mit einer Flußrate von ungefähr 1 ml/min auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde an die HPLC angeschlossen und mit 0,2 ml/min mit 1x PBS low salt (entspricht 10 mM NaCl) für 10 min gewaschen. Anschließend wurde die SpyADI-PEG20 bei 20 % high salt PBS (entspricht 210 mM NaCl) mit 0,04 ml/min für 45 min eluiert und das Eluat aufgefangen. Im Folgenden wurde die Säule zunächst mit 50 % high salt PBS (entspricht 500 mM NaCl) bei 0,1 ml/min für 15 min und danach bei 100 % high salt (entspricht 1 M NaCl) bei 0,2 ml/min für 15 min gewaschen. Die Regeneration der Säule erfolgte manuell mit 5 CV 1x PBS high salt pH 7,4 und dann 10 CV 1x PBS low salt pH 7,4. Zur Lagerung wurde die Säule mit 10 CV 20 % Ethanol in Aqua dest. gewaschen. Das Eluat wurde ultrafiltriert und die Konzentration mittels Bradford Assay bestimmt.

### 2.2.11 BESTIMMUNG VON E-AMINOGRUPPEN

Trinitrobenzolsulfonsäure reagiert mit primären Aminen (Abb. 5) in einer Farbreaktion, deren Produkt photometrisch bei 335 nm quantifiziert werden kann.

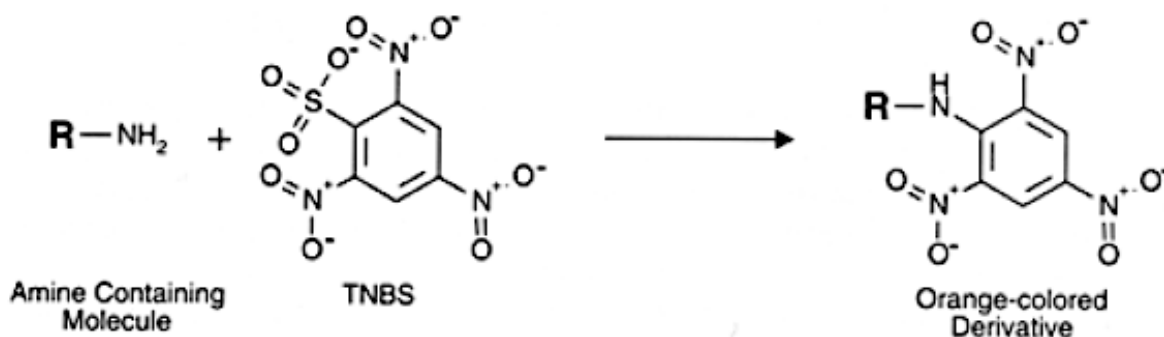


ABBILDUNG 5: TNBSA REAKTION (49)

Deshalb kann TNBSA benutzt werden, um die Anzahl zugänglicher  $\epsilon$ -Aminogruppen in Proteinen zu bestimmen. Durch den Vergleich der Anzahl freier  $\epsilon$ -Aminogruppen der nativen und pegylierten Variante des gleichen Proteins lässt sich so auf die Anzahl der angehängten PEG-Moleküle schließen. Zur Quantifizierung der  $\epsilon$ -Aminogruppen der SpyADI wurde Alanin (enthält eine Aminogruppe) zur Erstellung einer Standardverdünnungsgerade verwendet. Alle Proben und Standards wurden für die Messung in 100 mM Natriumbikarbonat (pH 8,5) direkt in 96-Well Platten verdünnt. Alanin wurde sequenziell zu 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 und 20  $\mu\text{g/ml}$  verdünnt, während SpyADI zu 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 und 200  $\mu\text{g/ml}$  verdünnt wurde.

Jede Verdünnung hatte ein Volumen von 120  $\mu\text{l}$ . 5 % TNBSA wurde in 100 mM Natriumbikarbonat (pH 8,5) zu einer 0,01%-igen Lösung verdünnt. Zu jeder Probe wurden 60  $\mu\text{l}$  der 0,01%-igen TNBSA Lösung dazugegeben und durch Auf- und Abpipetieren gut vermischt. Daraufhin wurden alle Proben im Dunkeln bei 37 °C für zwei Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurden 90  $\mu\text{l}$  Stopp-Puffer zu jeder Probe hinzugefügt. Die anschließende Messung erfolgte bei 335 nm im Mikroplattenreader. Zur Bestimmung der  $\epsilon$ -Aminogruppen der nativen SpyADI wurden für Alanin und SpyADI eine Steigungsgerade erstellt, in der die Extinktion bei 335 nm gegen die Stoffmenge aufgetragen wurde. Aus dem Verhältnis beider zueinander wurde mithilfe des arithmetischen Mittelwerts in mehreren Versuchsreihen die Anzahl der Aminogruppen berechnet.

Zur Bestimmung der  $\epsilon$ -Aminogruppen der SpyADI-PEG20 wurden SpyADI-PEG20 und SpyADI in mehreren Versuchsreihen gemessen. Die Bestimmung der Aminogruppen erfolgte nach der Formel von Holtsberg et al. (30):

**(1 - (Steigung SpyADI-PEG20 nach Konzentration/Steigung SpyADI nach Konzentration)) x Anzahl freier Aminogruppen SpyADI = Molares Verhältnis PEG zu SpyADI-Protein**

## 2.3 IN VITRO METHODEN

---

### 2.3.1 ZELLKULTUR

---

Die verschiedenen GBM Zelllinien wurden in DMEM/F-12 Medium mit 10 % FKS, 6 mM L-Glutamin und 1 % Penicillin-Streptomycin in 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Alle drei bis vier Tage fand ein Mediumwechsel statt, bei einem konfluenten Zellrasen wurden die Zellen passagiert. Zum Passagieren wurde das verbrauchte Medium entfernt, der Zellrasen mit 2 ml 1x PBS pH 7,4 gewaschen und anschließend 2 ml 0,25 % Trypsin zugegeben. Nach 5-10 min Inkubation bei 37 °C waren die nun abgelösten Zellen unter dem Mikroskop erkennbar. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Vollmedium abgestoppt und die Zellsuspension zur weiteren Verwendung in ein steriles Reaktionsgefäß überführt.

### 2.3.2 ZELLZÄHLUNG

---

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 25 µl der Zellsuspension mit 25 µl Trypanblau versetzt, die Suspension in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und fünf Quadrate unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Die Zellzahl pro ml wurde mithilfe der Formel bestimmt:

**(Zellzahl in 5 Quadranten/5) x Verdünnungsfaktor x 10<sup>4</sup> (Volumenfaktor) = Zellen pro ml**

Die gewünschte Zellzahl/ml wurde mit Medium angesetzt.

### 2.3.3 BEHANDLUNG DER ZELLEN

---

Für die Behandlung der GBM Zellen wurden diese mit 10<sup>4</sup> Zellen pro Well in 96-Well-Platten, mit 5 x 10<sup>5</sup> Zellen pro Well in 6-Well-Platten oder mit 1,25 x 10<sup>5</sup> Zellen pro Kammer in Chamber Slides eingesät. Die Behandlung der Zellen erfolgte 24 h nach der Einsaat. Die Behandlung wurde in zwei Schritten mit je 72 h Inkubationszeit durchgeführt wie in Tabelle 10 aufgeführt.

---

TABELLE 10: BEHANDLUNGSSCHEMA

<b>Probennummer</b>	<b>Behandlung 1</b>	<b>Behandlung 2</b>
<b>1</b>	DMSO 1:1000 in 1x PBS	DMSO 1:1000 in 1x PBS
<b>2</b>	35 mU/ml SpyADI	35 mU/ml SpyADI
<b>3</b>	10 nM Dinaciclib	10 nM Dinaciclib
<b>4</b>	10 $\mu$ M Abemaciclib	10 $\mu$ M Abemaciclib
<b>5</b>	10 $\mu$ M TMZ	10 $\mu$ M TMZ
<b>6</b>	35 mU/ml SpyADI	10 nM Dinaciclib
<b>7</b>	35 mU/ml SpyADI	10 $\mu$ M Abemaciclib
<b>8</b>	35 mU/ml SpyADI	10 $\mu$ M TMZ
<b>9</b>	10 nM Dinaciclib	35 mU/ml SpyADI
<b>10</b>	10 $\mu$ M Abemaciclib	35 mU/ml SpyADI
<b>11</b>	10 $\mu$ M TMZ	35 mU/ml SpyADI

#### 2.3.4 BESTRAHLUNG DER ZELLEN

Im Anschluss an die Behandlung wurden die Zellen mit 2 Gy, der einfachen Tagesdosis, die auch GBM Patienten erhalten, bestrahlt (40). Hierzu befanden sich die Zellen in Vollmedium, das mit den entsprechenden Testsubstanzen supplementiert war.

#### 2.3.5 CALCEIN-ASSAY

Zur Bestimmung der Zellvitalität wurde ein Calcein AM-Assay verwendet. Vitale Zellen besitzen eine intakte Membran und intrazelluläre Esterasen. Lebende Zellen setzen somit nicht fluoreszierendes Calcein AM nach Acetoxymethylester-Hydrolyse zu Calcein um, welches grün fluoresziert.

Für den Calcein AM-Assay wurden die Zellen in 96-Well-Platten ausgesät und 24 h bei 37 °C inkubiert. Die adhärenierten Zellen wurden nach dem Behandlungsschema in Tabelle 10 behandelt und ggf. zusätzlich mit 2 Gy bestrahlt. Für die Calcein AM-Färbung wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1x PBS pH 7,4 gewaschen. Pro Well wurden 50  $\mu$ l Calcein AM (4  $\mu$ M in PBS) hinzugefügt. Die Zellkulturplatten wurden für 20 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Die Fluoreszenz wurde bei 485 nm Anregung und 535 nm Emission mithilfe eines Mikroplattenauslesers gemessen.

### **2.3.6 PROTEINEXTRAKTION AUS ZELLEN UND WESTERN BLOT**

---

Zur Proteinextraktion wurden  $5 \times 10^5$  Zellen/Well in 6-Well-Platten ausgesät, nach dem Schema in Tabelle 10 behandelt und ggf. mit 2 Gy bestrahlt. Zur Zellernte wurde das Medium abgesaugt und alle Wells mit 1x PBS gewaschen. 300  $\mu$ l Lysepuffer wurden hinzugegeben und die Zellen mithilfe eines Zellschabers vom Boden gelöst. Das Zell-Puffergemisch wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei  $10.000 \times g$  für 10 min bei  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Der klare proteinhaltige Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt, die Proteinkonzentration mittels Bradford Assay bestimmt und die Proben bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

### **2.3.7 $\gamma$ H2AX-ASSAY**

---

Für den  $\gamma$ H2AX-Assay wurden  $1,25 \times 10^5$  Zellen pro Well in Chamber Slides ausgesät. Die Behandlung erfolgte nach dem Schema in 2.3.3 in je 200  $\mu$ l Medium für zweimal 72 h. Anschließend wurden die Zellen mit 2 Gy bestrahlt. Für die Färbung wurden die Zellen zunächst mit 200  $\mu$ l PBS pro Well gewaschen und anschließend mit je 100  $\mu$ l/Well 2 % Paraformaldehyd (in PBS) für 15 min fixiert. Die Fixierlösung wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS wieder entfernt und die Zellen in 100  $\mu$ l/well 0,5 % Triton-X-100/2 % BSA in PBS für 60 min inkubiert. Schließlich wurden die Zellen über Nacht mit anti-H2AX-ab Lösung (5  $\mu$ g/ml in 0,5 % Triton-X-100/2 % BSA in PBS) bei  $4^\circ\text{C}$  behandelt. Daraufhin wurde die Lösung entfernt und die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen. Zur Darstellung des Zytoskeletts erfolgte zusätzlich die Färbung mit AlexaFluor<sup>TM</sup> 488 Phalloidin (1:50 in PBS) für 20 min. Nach wiederholten Waschschritten wurden die Zellkerne mit 200  $\mu$ l DAPI (1  $\mu$ g/ml) für 2 min gefärbt. Die Chamber Slides wurden bis zur Auswertung mittels Konfokal-Mikroskop bei  $4^\circ\text{C}$  in PBS gelagert.

### **2.3.8 AMINOSÄUREN ANALYSE**

---

Quantitative Aminosäure-Analysen wurden mithilfe einer HPLC durchgeführt. Die Auftrennung in einzelne messbare Aminosäuren findet in einer Trennsäule zwischen

---

einer stationären und einer mobilen Phase, welche mit hohem Druck durch die Säule gepresst wird, statt. Die Probe wird mithilfe eines Ventils durch Injektion in den Fluss der mobilen Phase gebracht. Die verschiedenen Bestandteile der Probe wandern aufgrund der Wechselwirkungen mit der stationären Phase unterschiedlich schnell über die Trennsäule und können mithilfe eines Dioden-Array-Detektors (DAD) gemessen werden. Der DAD kann mithilfe mehrerer Photodioden ein Spektrum mehrerer Wellenlängen im UV und VIS Bereich detektieren (50). Vor der Messung wurden je 1 ml Probe mit 100 µl 35 % Perchlorsäure zur Proteinfällung versetzt, gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 55 µl 7 M Kalilauge zur Neutralisierung hinzugefügt, die Proben erneut gemischt und bei 20.000 x *g* für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde durch eine 0,22 µm Spritzenfilter gefiltert und in eine HPLC Probenphiole überführt. Die Analyse erfolgte nach dem Agilent Manual „Analysis of Amino Acids Derived Online Using an Agilent AdvanceBio AAA Column“ mit einem Agilent 1260 Infinity II HPLC System, das mittels OpenLAB CDS Workstation Software gesteuert wurde. Die Derivatisierung optisch inaktiver Aminosäuren erfolgte per Autosampler in zwölf Schritten. Hierbei werden automatisiert im Gerät 2,5 µl Borat-Puffer mit 1 µl Probe, 0,5 µl OPA-Reagenz und 0,4 µl FMOC-Reagenz gemischt und mit 32 µl Injektionsverdünnungsmittel versetzt. FMOC derivatisiert sekundäre Aminosäuren, während OPA primäre derivatisiert. 20 µl der so aufbereiteten Probe wurden in den Laufmittelfluss injiziert. Die Auftrennung erfolgte mit einer unpolaren InfinityLab Poroshell 120 EC-C18-Säule (4,6 x 100 mm, 2,7 µm, Agilent) mit mobiler Phase A sowie mobiler Phase B bei einer Laufgeschwindigkeit von 1,5 ml/min und einer Säulentemperatur von 40 °C mit dem in Tabelle 11 aufgeführten Gradientenprogramm. Durch den langsam steigenden Anteil des organischen Laufmittels laufen die Aminosäuren aus den Proben mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten durch die Säule, wobei die polaren zuerst gemessen werden. OPA-derivatisierte Aminosäure wurden bei einer Wellenlänge von 338 nm und Bandbreite von 10 nm bei einer Referenz von 390 nm und Bandbreite von 20 nm detektiert, FMOC-derivatisierte Aminosäuren bei einer Wellenlänge von 262 nm und Bandbreite von 16 nm bei einer Referenzwellenlänge von 324 nm und Bandbreite von 8 nm.

TABELLE 11: GRADIENTENPROGRAMM

Zeit (min)	% B
0	2
0,35	2
13,4	57
13,5	100
15,7	100
15,8	2
18	Ende

#### 2.4 *IN VIVO* METHODEN: BLUTPLASMA VON NSG MÄUSEN

---

Alle Versuche wurden an circa acht Wochen alten, weiblichen NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>Il2rg<sup>tm1</sup>Wjl (NSG) Mäusen durchgeführt. Alle Untersuchungen wurden vorab durch das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern mit dem Aktenzeichen 7221.3-1-032/19-3 genehmigt.

Zur Analyse der Auswirkung von SpyADI bzw. SpyADI-PEG20 auf die Plasma-Arginin-Konzentration von NSG Mäusen wurde n=3 Tieren/Gruppe und Zeitpunkt unter kurzer Isoflurannarkose entweder 1x PBS pH 7,4, SpyADI (250 U/kg Körpergewicht) oder SpyADI-PEG20 (250 U/kg Körpergewicht) in die Kaudalvene injiziert. Das Injektionsvolumen betrug 100 µl. Nach einem Zeitraum von 6, 12 oder 24 h wurden den NSG Mäusen Blutproben über den retrobulbären venösen Plexus entnommen. Zur Koagulationsinhibition wurde EDTA zugesetzt. Die Proben wurden bei 2.000 x g für 8 min zentrifugiert, das resultierende zellfreie Plasma aliquotiert und bei -80 °C asserviert.

#### 2.5 SOFTWARE

---

Zur Datenverarbeitung wurden die Programme Soft Max Pro 6.4, VisionWorks, Image Studio Lite Ver 5.2 genutzt.

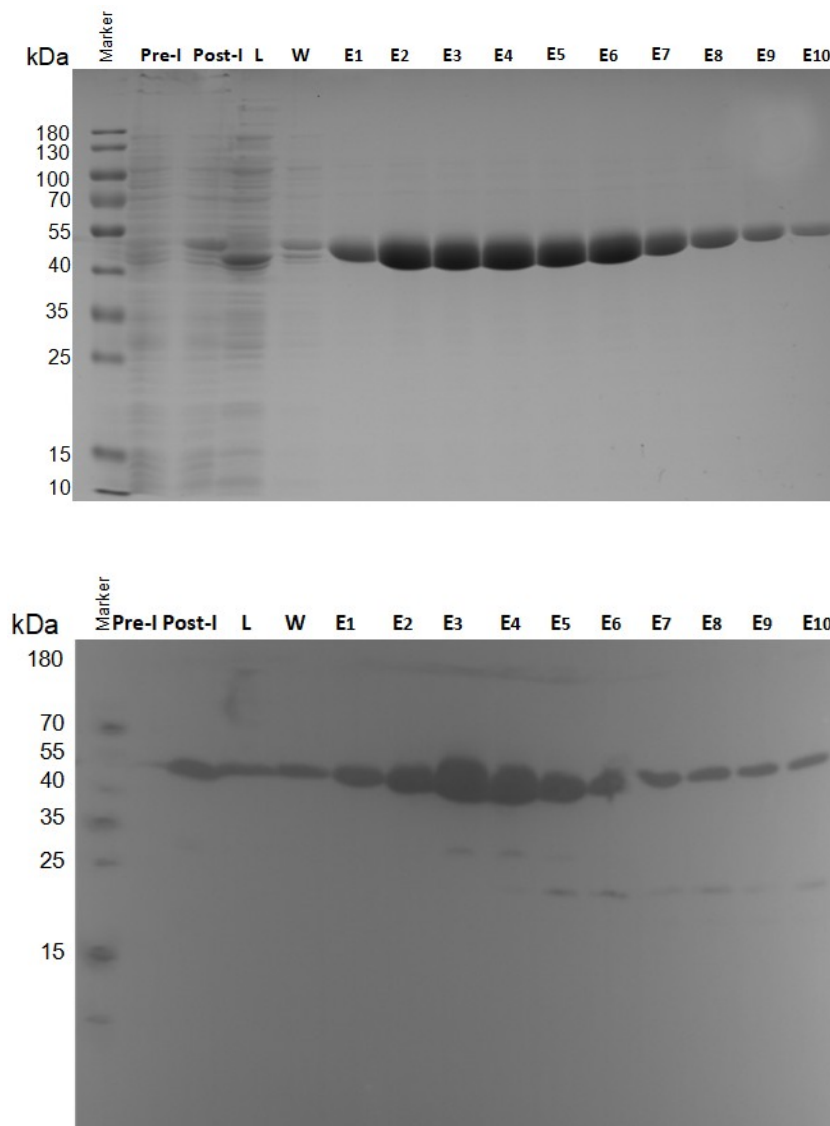
Zur statistischen Auswertung wurden Microsoft Excel und GraphPad PRISM genutzt. Grafiken wurden mit PowerPoint hergestellt.

---

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 HETEROLOGE SPYADI PRODUKTION UND AUFREINIGUNG

ADI aus *S. pyogenes* wurde in *E. coli* DH5 $\alpha$  pASK\_IBA2\_ArcA heterolog produziert. Anschließend wurde das Enzym mittels Affinitätschromatografie aufgereinigt. Während des Produktions- und Reinigungsprozesses wurden Proben der Bakterienkultur vor und nach der Induktion mit AHT, des Proteinrohextraktes (Lysat), einer der Waschfraktion während der Affinitätschromatographie und sämtliche Elutionsfraktionen gesammelt und mittels SDS Page mit anschließender Coomassie Färbung (Abb. 6 A) bzw. mittels Western Blot (Abb. 6 B) analysiert.



**ABBILDUNG 6: COOMASSIE GEFÄRBTES SDS GEL (A) BZW. WESTERN BLOT (B) VON PROBEN WÄHREND DER HETEROLOGEN PRODUKTION UND AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHISCHEN AUFREINIGUNG VON SPYADI**

Pre-I: Vor Induktion, Post-I: Nach Induktion, L: Lysat, W: Waschfraktion, E1-10: Elutionsfraktionen 1-10.

Auf dem SDS Gel zeigen Pre- und Postinduktionsproben ein ähnliches Muster aus verschiedenen großen Proteinen, welche sich in der Bakterienkultur finden lassen. Allein in der Postinduktionsprobe ist eine Bande bei ca. 46 kDa stärker ausgeprägt. Dies entspricht der SpyADI, deren Produktion durch die Induktion der Expression mittels AHT angeschaltet wurde. Im Lysat findet sich neben den *E. coli* Proteinen als prominenteste Bande die SpyADI. Die Waschfraktion wurde während der Aufreinigung an der Strep-Tactin Säule entnommen. Sowohl im SDS-Gel als auch im Western Blot ist SpyADI in der Waschfraktion nachweisbar.

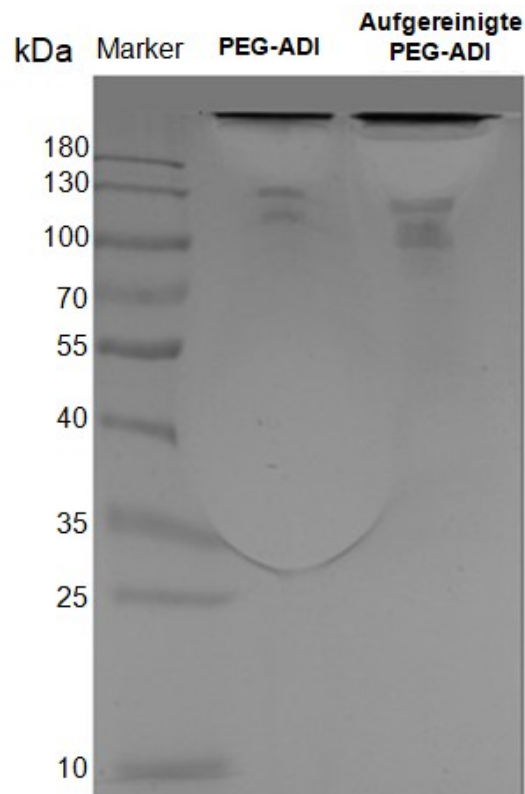
Dies lässt auf einen Überschuss von SpyADI schließen, welcher nicht mehr an die bereits gesättigte Säule binden konnte. Die anschließende Elution wurde in zehn Einzelschritten durchgeführt. Die SpyADI Bande ist in allen Fraktionen detektierbar, wobei die Elutionsfraktionen E<sub>2</sub> bis E<sub>6</sub> die meiste SpyADI enthalten.

In den Elutionsfraktionen wurden zusätzlich schwache Banden mit einem apparenten Molekulargewicht von unter 46 kDa detektiert. Da diese Signale auch im Western Blot nachweisbar waren, handelt es sich vermutlich um einen Teil des C-Terminus der SpyADI, da dieser mit dem im Western Blot detektierten *StrepTagII* fusioniert ist.

### **3.2 PEGYLIERUNG DER SPYADI**

---

20 kDa PEG-Moleküle wurden an die native SpyADI konjugiert, um für die spätere *in vivo* Anwendung die renale Ausscheidung zu verzögern und die Immunogenität des bakteriellen Proteins zu reduzieren. Dazu wurde SpyADI wie in 2.2.9 beschrieben mit Hilfe eines mPEG20K-Succinimidyl Carboxymethylester pegyliert. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der pegylierten SpyADI mithilfe von Anionenaustauschchromatographie, wie in 2.2.10 beschrieben, um die pegylierte SpyADI (SpyADI-PEG20) von ungebundenen PEG-Resten und nicht-pegylierter SpyADI zu trennen. Der Erfolg der PEGylierung und der Aufreinigung mittels Anionenaustauschchromatographie wurde mittels SDS-PAGE überprüft (Abb. 7).



**ABBILDUNG 7: COOMASSIE GEFÄRBTES SDS GEL MIT SPYADI-PEG20 VOR (PEG-ADI) UND NACH (AUFGEREINIGTE PEG-ADI) DER ANIONENAUSTAUSCHCHROMATOGRAPHIE**

In beiden Spuren sind keine Banden bei 46 kDa erkennbar, wie sie bei nativer SpyADI zu sehen wären. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die meisten SpyADI Moleküle pegyliert werden. Die Banden verteilen sich in einem Bereich von 80 bis 180 kDa. Das Molekulargewicht von pegylierten Enzymen ist proportional zur Anzahl der konjugierten PEG-Moleküle (31). Es ist somit SpyADI mit unterschiedlicher Pegylierungsstärke zu erkennen. In der Probe vor Aufreinigung der SpyADI-PEG20 findet sich zusätzlich ein großer tropfenförmig aufgehellter Bereich im Gel, welcher durch ungebundene PEG-Moleküle entsteht. Aufgrund ihres unterschiedlichen Elutionsverhalten in Salzgradienten werden unkonjugierte PEG-Moleküle und eventuell verbliebene native ADI durch die Salzelution in der Anionenaustauschchromatographie von der pegylierten ADI getrennt. Um die Verschiebung des Molekulargewichts durch die PEGylierung zu verdeutlichen, ist in Abbildung 8 zum Vergleich ein SDS-Page Gel mit nativer SpyADI und aufgereinigte SpyADI-PEG20 dargestellt.

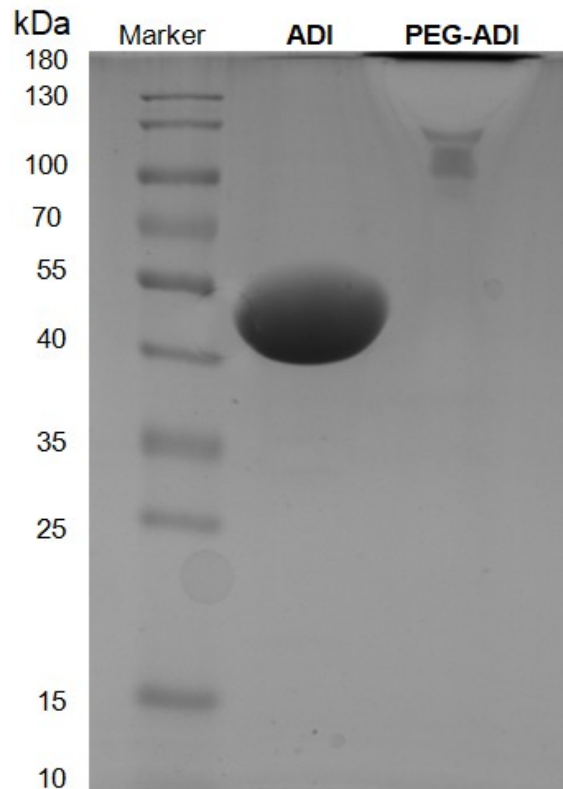
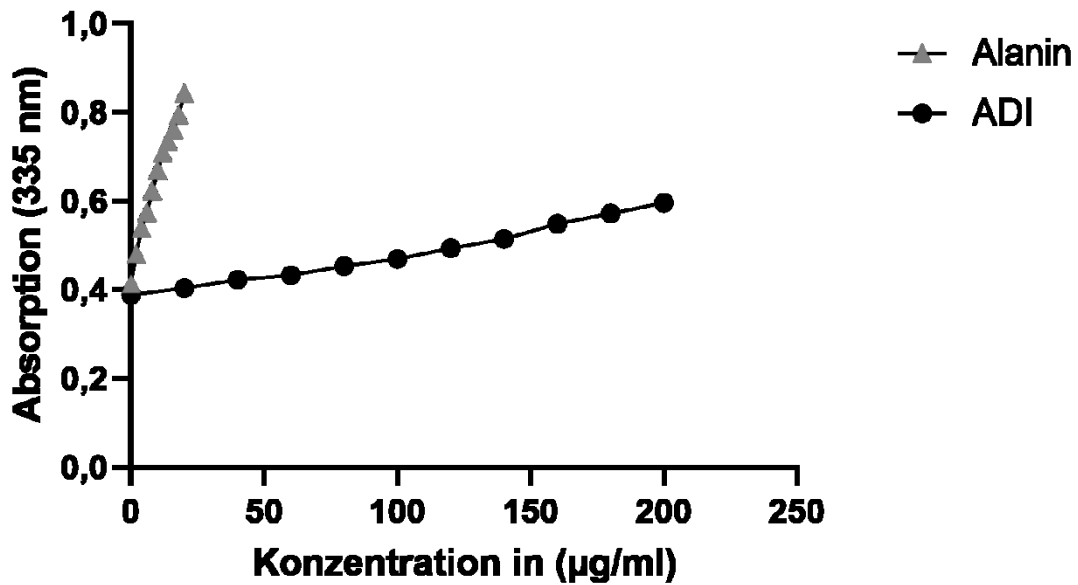


ABBILDUNG 8: COOMASSIE GEFÄRBTES SDS GEL MIT SPYADI UND SPYADI-PEG20 IM VERGLEICH

### 3.3 BESTIMMUNG DES PEGYLIERUNGSGRADES DER SPYADI-PEG20

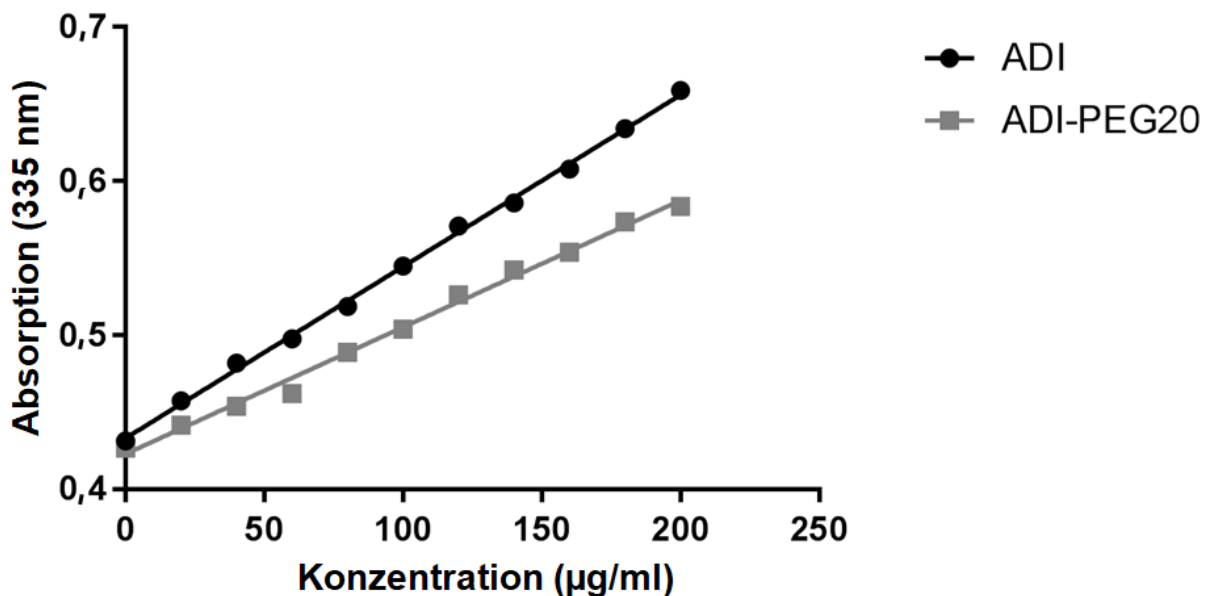
---

Die Effizienz der Pegylierung von SpyADI wurde mithilfe eines TNBSA Assays ermittelt. Mittels TNBSA Färbung kann photometrisch die Anzahl zugänglicher primärer Amine in Proteinen bestimmt werden, an die mit der in dieser Arbeit verwendeten Pegylierungsreagenz PEG-Reste konjugiert werden können. Hierzu wurde zunächst eine Eichgerade mit unterschiedlichen Konzentrationen L-Alanin erstellt, welches genau eine primäre Aminogruppe besitzt (Abb.9). Nach TNBSA Färbung der nativen SpyADI konnte anhand dieser Eichgerade bestimmt werden, dass das Enzym 26 zugängliche primäre Aminogruppen besitzt.



**ABBILDUNG 9: QUANTIFIZIERUNG PRIMÄRER AMINOGRUPPEN**  
 Beispielkurve der konzentrationsabhängigen Absorption von TNBSA gefärbtem Alanin und SpyADI  
 (n = 8 biologische Replikate).

Zur Quantifizierung der Pegylierung wurden native SpyADI und SpyADI-PEG20 unterschiedlicher Konzentrationen mit TNBSA gefärbt und die Absorption bei 335 nm bestimmt, wie in Abbildung 10 dargestellt.



**ABBILDUNG 10: PEGYLIERUNGSEFFEKT**  
 Absorption abhängig von der Konzentration von TNBSA gefärbter SpyADI und SpyADI-PEG20 (n = 5 biologische Replikate). Berechnung der molaren PEGylierungsrate nach Holtsberg et al. (30).  $x = (1 - (\text{Steigung PEG-ADI} / \text{Steigung ADI}) \times 26)$ . 26 als Anzahl der erreichbaren primären Aminogruppen von SpyADI.

Das Verhältnis von PEG20/SpyADI wurde, wie von Holtsberg *et al.* (30) beschrieben, berechnet:

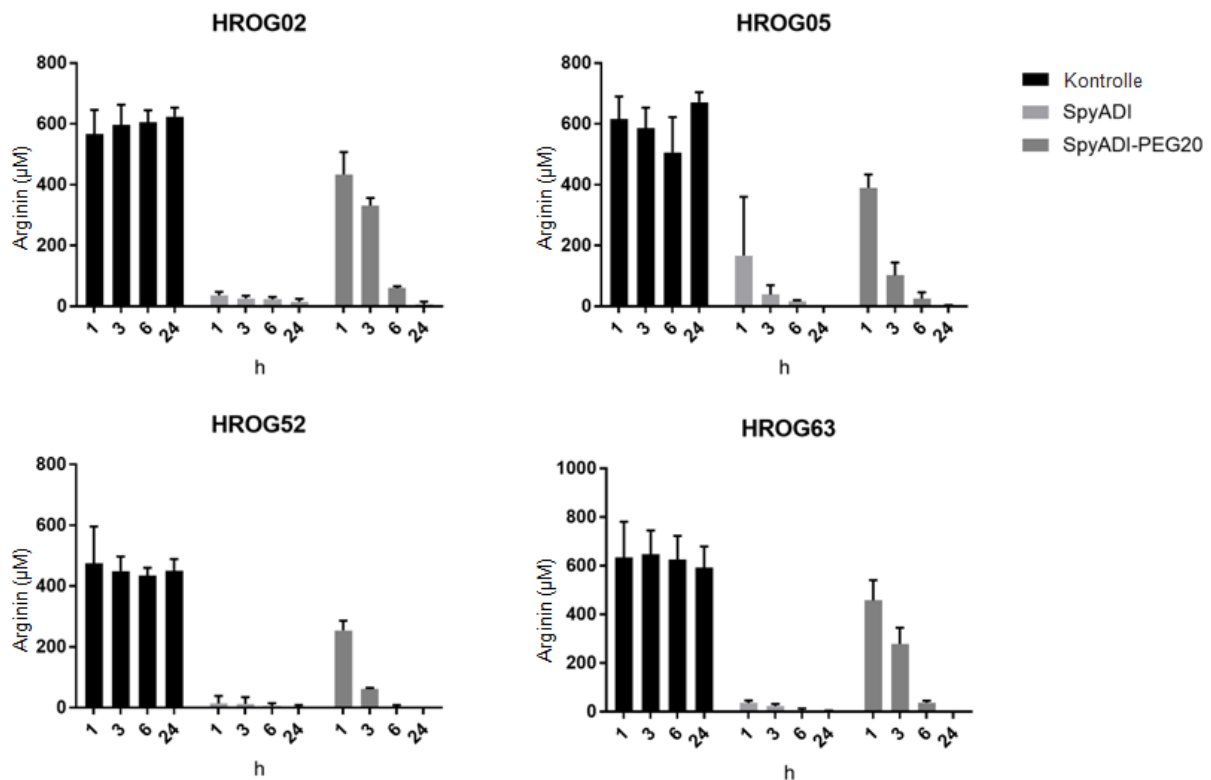
$$x = (1 - (\text{Steigung PEG-ADI} / \text{Steigung ADI}) \times 26)$$

Mit dem verwendeten Pegylierungsverfahren (47), konnten im Durchschnitt 7,5 Mol (+/-1,7; n=5) PEG an ein Mol SpyADI gebunden werden.

### **3.4 EFFEKT VON SPYADI UND SPYADI-PEG20 AUF DIE KONZENTRATION VON L-ARGININ *IN VITRO***

---

Arginin-Auxotrophie ist ein metabolischer Defekt, welcher Tumorzellen responsiv gegenüber Arginin depletierenden Substanzen macht (51). Das Fehlen der Enzyme Argininosuccinat-Synthetase und Argininosuccinat-Lyase führt bei entsprechenden Zellen zur Auxotrophie für Arginin (52). In vorherigen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass GBM Zellen der Linien HROG02, HROG05 und HROG63 responsiv gegenüber Argininentzug sind (19), (17). HROG02 ist ASL und ASS1 negativ, während in HROG05 die ASS1 Expression reduziert ist (19). HROG52 ist OCT negativ, reagiert aber *in vitro* kaum auf Argininentzug. Das zugehörige Rezidiv HROG63, welches ebenfalls OCT negativ ist, zeigt eine stärkere Responsivität gegenüber ADI (17). Zur Untersuchung der Pharmakokinetik von nativer SpyADI und SpyADI-PEG20 *in vitro* wurden HROG02, HROG05, HROG52 und HROG63 mit je 35 mU/ml SpyADI oder SpyADI-PEG20 behandelt. Die Enzyme wurden dem Standardmedium hinzugefügt, um die Effizienz des Argininabbaus zu untersuchen. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen der jeweiligen Zelllinie. Jeweils 1 h, 3 h, 6 h und 24 h nach Applikation der nativen SpyADI oder SpyADI-PEG20 wurde die Argininkonzentration in den Zellkulturüberständen mittels HPLC gemessen.



**ABBILDUNG 11: ARGININKONZENTRATION IN ZELLKULTURÜBERSTÄNDEN**

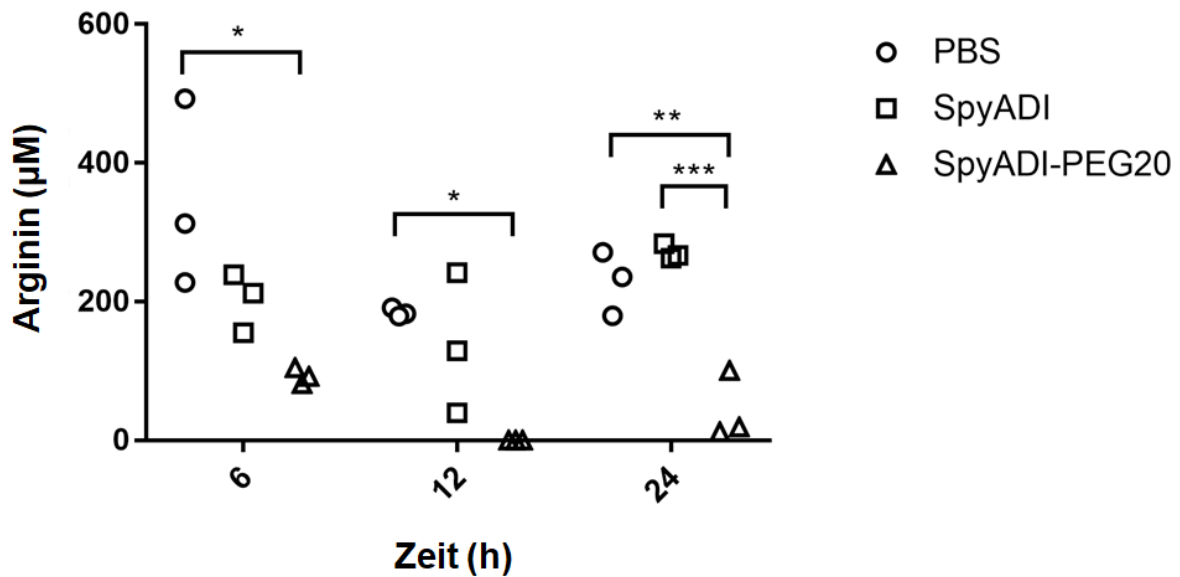
GBM Zellen wurden mit 35 mU/ml SpyADI oder SpyADI-PEG20 im Standardmedium behandelt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Die Argininkonzentrationen wurden aus dem Zellkulturüberstand nach 1, 3, 6 und 24 h gemessen. Balken und Whisker repräsentieren Mittelwert und Standardabweichung von n = 3 biologischen Replikaten.

Sowohl durch SpyADI als auch durch SpyADI-PEG20 wurde die Argininkonzentration im Medium aller Zelllinien auf unter 10 µM gesenkt (Abb. 11). In den Medien aller vier Zelllinien reduzierte sich die Argininkonzentration nach Zusatz der nativen SpyADI schneller als nach Zusatz der SpyADI-PEG20. Nach 24 h war die Argininkonzentration in den Medien der Zelllinien HROG02, HROG52 und HROG63, welche mit SpyADI-PEG20 behandelt wurden, niedriger als in der Vergleichsgruppe mit SpyADI. In den Proben der Zelllinien HROG52 und HROG63 fiel die Argininkonzentration nach 24 h SpyADI-PEG20 Behandlung unter die Detektionsgrenze.

### 3.5 EFFEKT VON SPYADI UND SPYADI-PEG20 AUF DIE KONZENTRATION VON L-ARGININ IM MAUSMODELL

Zur Überprüfung der Pharmakokinetik von SpyADI und SpyADI-PEG20 wurden NSG Mäusen je 250 U/kg Körpergewicht des nativen oder des modifizierten Enzyms intravenös injiziert. Der Kontrollgruppe wurden gleiche Volumina PBS (pH 7,4) injiziert.

Jede Gruppe umfasste neun Tiere. Nach 6, 12 und 24 Stunden wurde je Gruppe drei Mäusen eine Blutprobe entnommen und daraus Plasma gewonnen. Die Argininkonzentration in den murinen Plasmaproben wurde mittels HPLC gemessen, um zu quantifizieren wie viel Arginin durch die Enzyme abgebaut werden konnte. Das Ergebnis ist in der Abbildung 12 dargestellt.



**ABBILDUNG 12: PLASMAARGININKONZENTRATION IN NSG MÄUSEN**

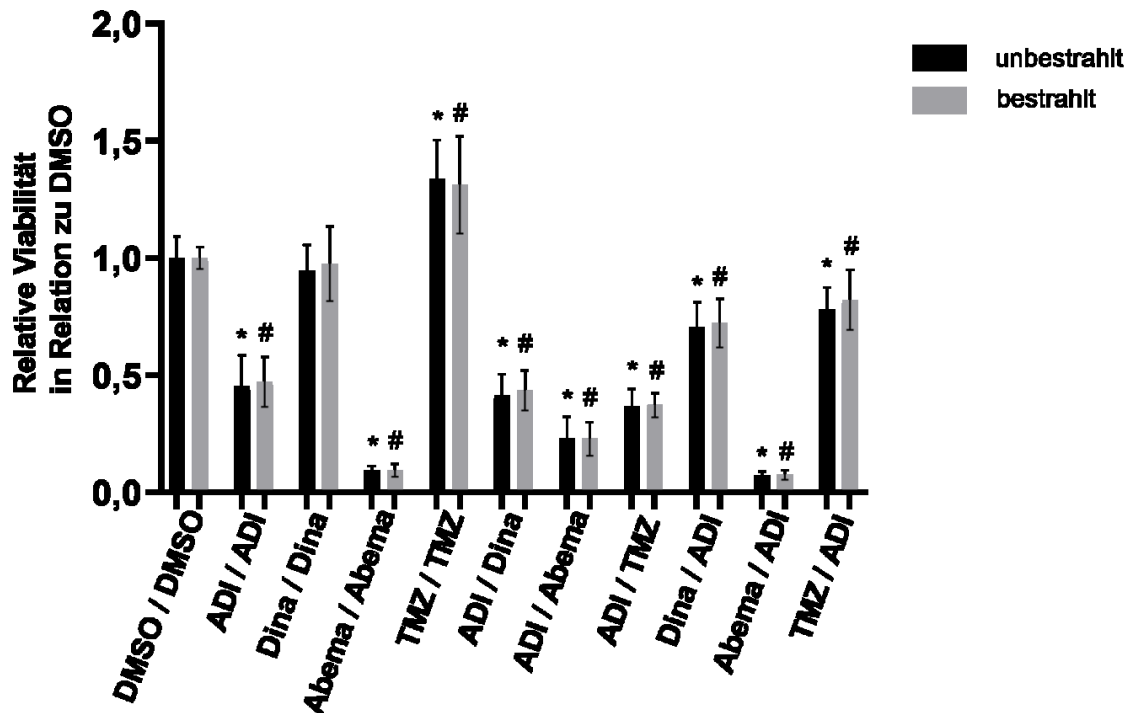
Den Tieren wurde 250 U/kg Körpergewicht SpyADI oder SpyADI-PEG20 injiziert. Kontrolltiere erhielten einmalig PBS in äquivalentem Volumen. Die Plasmaargininkonzentrationen wurden nach 6, 12 und 24 Stunden *post injectionem* bestimmt. Jedes Symbol repräsentiert eine Maus (Einfaktorielle Varianzanalyse, n=3, \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.005$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ ).

Die Argininkonzentration im Blutplasma der NSG Mäuse wurde durch die SpyADI-PEG20 effizienter gesenkt als durch die native SpyADI. Dies war für alle gemessenen Zeitpunkte zu beobachten. Bei den mit SpyADI-PEG20 behandelten Mäusen war die Argininkonzentration im Plasma bereits nach 6 h signifikant niedriger als in der Kontrolle und ist nach 12 h unter die Nachweisgrenze gefallen. Auch nach 24 h war die Argininkonzentration im Plasma von mit SpyADI-PEG20 behandelten Tieren signifikant niedriger als im Plasma von SpyADI behandelten Tieren und der Kontrollgruppe. Die Plasmaargininkonzentration der mit nativer SpyADI behandelten Tiere hingegen war nach 24 h auf dem Niveau der PBS-behandelten Kontrollgruppe.

### **3.6 EFFEKTE DER KOMBINATIONSTHERAPIE VON SPYADI UND CDK-INHIBITOREN AUF VIABILITÄT UND STRAHLENSENSITIVITÄT VON GLIOBLASTOMA MULTIFORME ZELLEN *IN VITRO***

---

Die GBM Strahlungsresistenz stellt eine große Hürde in der Behandlung von Patienten dar. Auf der Suche nach Substanzen, die radiosensibilisierend wirken und einen antitumoralen Effekt von SpyADI unterstützen können, stellen CDKis eine interessante Wirkstoffgruppe dar, um Veränderungen der Zellzyklusregulation in Krebszellen als potenzielle Therapieziele zu nutzen. Zur Überprüfung der Effekte einer Kombinationstherapie aus SpyADI und verschiedenen CDKis wurden HROG05 Zellen in sequenzieller Abfolge in zwei 72-h-Intervallen behandelt, wie in 2.3.3 beschrieben. Zudem sollte untersucht werden, ob die entsprechenden Kombinationstherapien die Strahlensensitivität der intrinsisch strahlungsresistenten GBM Zellen erhöhen. Hierzu wurden entsprechend behandelte Zellen anschließend zusätzlich mit 2 Gy bestrahlt und die Biomasse mittels Calcein AM Assay bestimmt. Abbildung 13 zeigt die Viabilität von HROG05 Zellen in Abhängigkeit von den verschiedenen Behandlungskombinationen sowohl mit als auch ohne Bestrahlung. Als Kontrolle dienten entsprechend DMSO-behandelte Zellen mit und ohne anschließender Bestrahlung. Die Werte sind jeweils relativ zur zugehörigen DMSO-behandelten Kontrolle dargestellt.



**ABBILDUNG 13: EINFLUSS DER SEQUENZIELLEN KOMBINATIONSTHERAPIE VON ADI UND CDK-INHIBITOREN NACH 2 x 72 H INKUBATION UND BESTRAHLUNG VON 2 GY AUF DIE VIABILITÄT VON HROG05**

Die relative Viabilität der HROG05 Zellen wurde mittels Calcein AM-Assay bestimmt. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung (Einfaktorielle Varianzanalyse, n=9, \*p<0,05 vs. DMSO unbestrahlt, #p<0,05 vs DMSO bestrahlt). 35 mU/ml ADI, 10 nM Dinaciclib, 10 µM Abemaciclib, 10 µM Temozolomid.

Unabhängig von der Bestrahlung war die Viabilität der Zellen nach allen Behandlungsschemata - außer der Dinaciclib- und der TMZ-Monotherapie - signifikant gegenüber der entsprechenden Kontrolle reduziert. Die Behandlung mit TMZ, welches als klinisch zugelassenes Zytostatikum vergleichend zu den CDKis eingesetzt wurde, führte zu einer im Vergleich zur Kontrolle signifikant höheren Biomasse von HROG05. Dieser Befund wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten beschrieben und bestätigt die intrinsische Resistenz der verwendeten Zellen gegenüber TMZ. Die größte Biomasse-Reduktion war in den Kombinationen mit Abemaciclib zu erkennen.

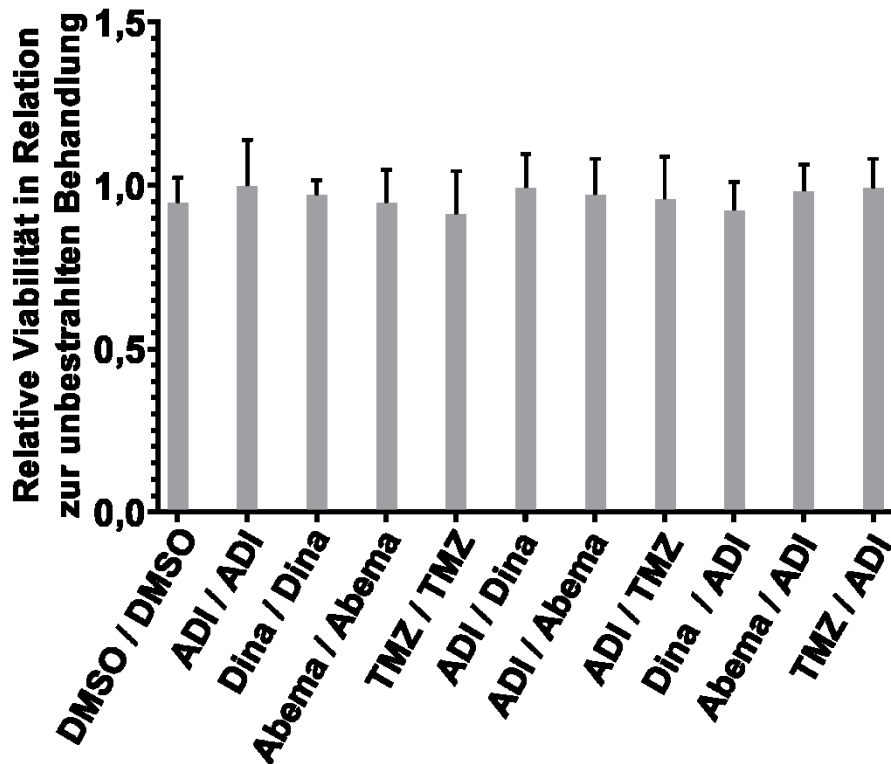
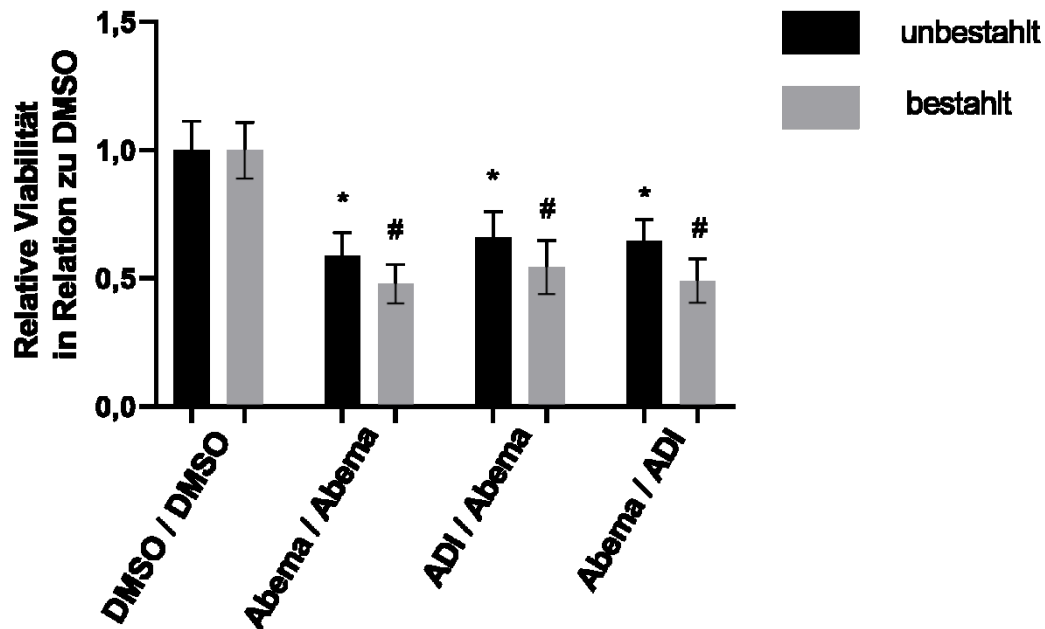


ABBILDUNG 14: EINFLUSS DER SEQUENZIELLEN KOMBINATIONSTHERAPIE MIT ADI UND CDK-INHIBITOREN AUF DIE STRAHLENSENSITIVITÄT VON HROG05

Die relative Viabilität der bestrahlten HROG05 Zellen wurde mittels Calcein AM-Assay bestimmt. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung (Einfaktorielle Varianzanalyse, n=9). 35 mU/ml ADI, 10 nM Dinaciclib, 10  $\mu$ M Abemaciclib, 10  $\mu$ M Temozolomid.

Um die potenzielle Radiosensibilisierung durch die Kombinationstherapien zu visualisieren, wurden die bereits in Abbildung 13 dargestellten Werte aus der Biomasse-Bestimmung mittels Calcein AM Assay in Abbildung 14 so dargestellt, dass jeweils die relative Biomasse der Zellen der jeweiligen Kombinationstherapie mit anschließender Bestrahlung mit der analog behandelten unbestrahlten Probe in Relation gesetzt wurde. Es führte kein Behandlungsschema zu einer signifikanten Reduktion der Biomasse von HROG05 durch die anschließende Bestrahlung. Da alle Kombinationstherapien mit 10  $\mu$ M Abemaciclib bereits zu einer starken Reduktion der Biomasse von bis zu ca. 90 % in den unbestrahlten Proben führten, war die Beurteilbarkeit eines zusätzlichen Effekts durch die Bestrahlung jedoch stark eingeschränkt. Die entsprechenden Versuche dieser Kombinationstherapien wurden daher erneut mit einer auf 1  $\mu$ M reduzierten Abemaciclib Konzentration durchgeführt.

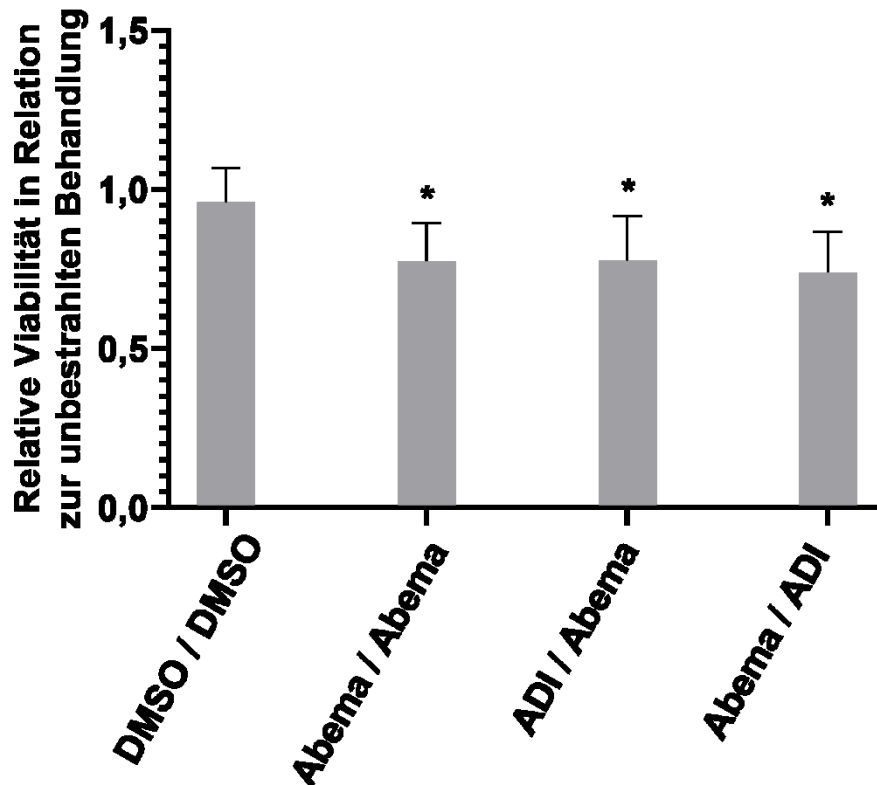
Abbildung 15 zeigt, dass die Biomassereduktion der HROG05 Zellen durch die Kombinationen mit ADI und 1  $\mu\text{M}$  Abemaciclib im Vergleich zur bestrahlten beziehungsweise unbestrahlten DMSO Kontrolle in allen Kombinationen etwa 50 % beträgt.



**ABBILDUNG 15: EINFLUSS DER SEQUENZIELLEN KOMBINATIONSTHERAPIE MIT ADI UND 1  $\mu\text{M}$  ABEMACICLIB NACH 2x 72 H INKUBATION UND BESTRAHLUNG VON 2 Gy AUF DIE VIABILITÄT VON HROG05**

Die relative Viabilität der HROG05 Zellen wurde mittels Calcein AM-Assay bestimmt. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung (Einfaktorielle Varianzanalyse, n=9, \*p<0,05 vs. DMSO unbestrahlt, #p<0,05 vs. DMSO bestrahlt).

Zur besseren Darstellung einer möglichen Radiosensibilisierung wurden die Werte der bestrahlten und unbestrahlten Proben wie oben beschrieben in Relation gesetzt. Bei Verwendung von 1  $\mu\text{M}$  Abemaciclib in den jeweiligen Behandlungsschemata konnte eine signifikante Strahlensensibilisierung nachgewiesen werden. Die Abbildung 16 zeigt, dass bei allen drei Kombinationsbehandlungen die bestrahlten Zellen eine signifikante Reduktion der Biomasse um ca. 25 % gegenüber den unbestrahlten Zellen aufwiesen.



**ABBILDUNG 16: EINFLUSS DER SEQUENZIELLEN KOMBINATIONSTHERAPIE MIT ADI UND 1  $\mu$ M ABEMACICLIB AUF DIE BESTRAHLUNGSENSITIVITÄT VON HROG05**

Die relative Viabilität der bestrahlten HROG05 Zellen wurde mittels Calcein AM-Assay bestimmt. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung (Einfaktorielle Varianzanalyse, n=9, \*p<0,05 vs. jeweilige unbestrahlte Behandlung).

### 3.7 DETEKTION VON DNA-STRANGBRÜCHEN NACH MONO- UND KOMBINATIONSTHERAPIE SOWIE BESTRAHLUNG

DNA-Doppelstrangbrüche gehören zu den schädlichsten Läsionen, die bei Krebszellen durch Bestrahlung hervorgerufen werden können. Da sie zu genomischer Instabilität und damit dem Zelltod führen können, müssen sie in den Zellen umgehend repariert werden (53). Hierfür werden verschiedene Reparaturproteine benötigt. Die Quantifizierung von mit DNA-Doppelstrangbrüchen assoziierten Reparaturproteinen kann somit Auskunft über die Wirkung bestimmter Behandlungen und die daraus resultierende Strahlensensibilität der Zellen geben.

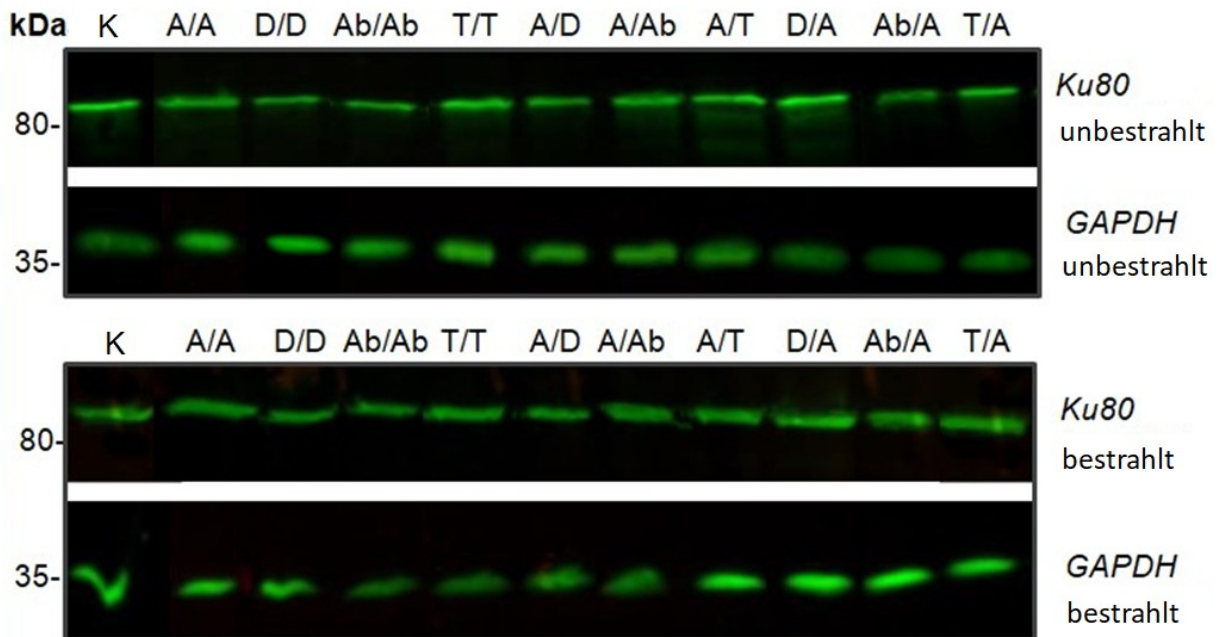
Zu diesem Zweck wurden bei HROG05 Zellen, die nach dem Schema wie in 2.3.3 beschrieben behandelt wurden, die DNA-Reparaturproteine Ku80 und Rad51 mittels Western Blot und das Reparaturprotein  $\gamma$ H2AX mittels Immunfluoreszenzfärbung und

Mikroskopie detektiert. Es wurden jeweils bestrahlte und unbestrahlte Zellen verglichen.

### 3.8 NACHWEIS VON KU80

Ku80 bindet an die Enden von DNA-Bruchkanten und rekrutiert Faktoren für die DNA-Reparatur mittels nicht-homologer Endverknüpfung (*non-homologous end joining* NHEJ) (54).

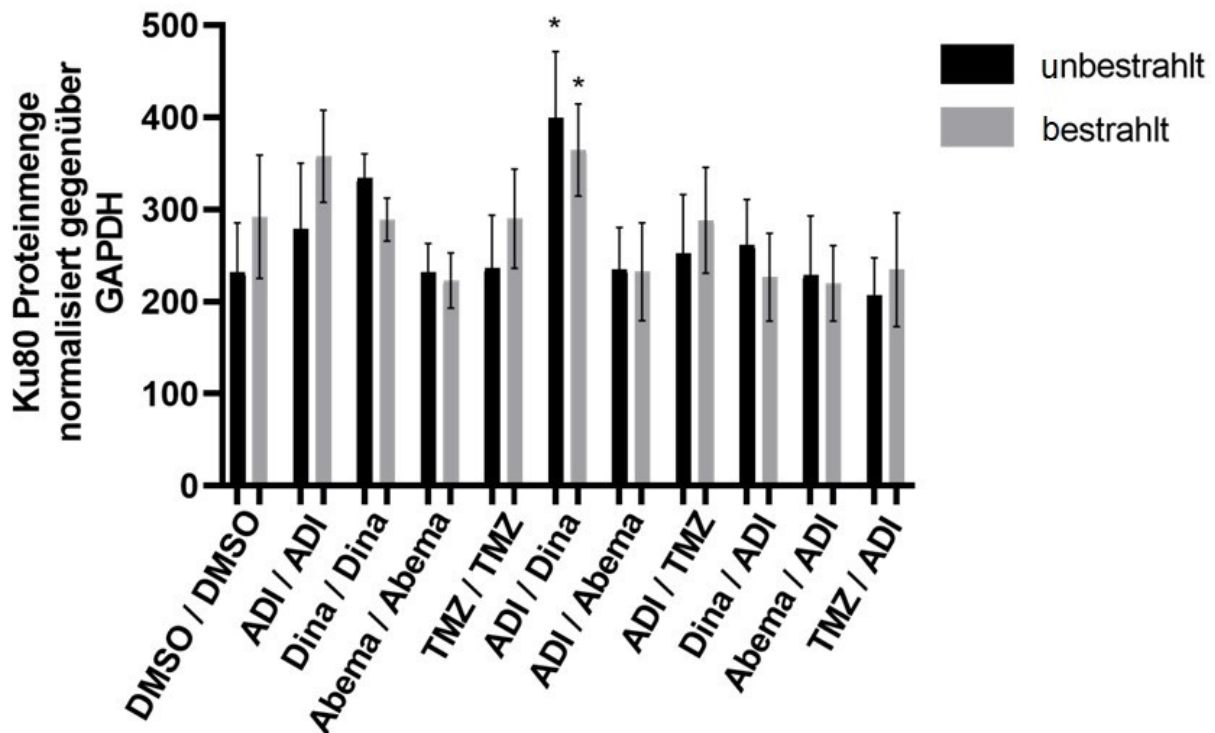
In Abbildung 17 sind repräsentative Western Blots nach Detektion von Ku80 (= 80 kDa) in den Proteinextrakten der entsprechend behandelten HROG05 Zellen im Vergleich zur GAPDH Ladekontrolle dargestellt. Die jeweiligen Behandlungsschemata sind von links nach rechts aufgetragen, direkt nach der DMSO-Kontrolle, welche ganz links dargestellt ist.



**ABBILDUNG 17: WESTERN BLOT NACH DETEKTION DES DNA-REPARATURPROTEINS KU80 NACH ADI, CDK-INHIBITOR UND TMZ BEHANDLUNG IN BESTRAHLTEN UND UNBESTRAHLTEN HROG05-ZELLEN**

K (=Kontrolle mit DMSO), A (=ADI), D (=Dinaciclib), 10 µM Ab (=Abemaciclib) und T (=Temozolomid). Bestrahlung mit 2 Gy. Western Blot mit GAPDH als Ladekontrolle

Die relative Quantifizierung erfolgte im Vergleich zu GAPDH, welches zur Ladekontrolle detektiert wurde. In Abbildung 18 ist die quantitative Analyse von Ku80 dargestellt.



**ABBILDUNG 18: QUANTIFIZIERUNG DES DNA-REPARATURPROTEINS KU80 IN HROG05-ZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT SPYADI, CDK-INHIBITOREN UND TMZ MIT UND OHNE BESTRAHLUNG**

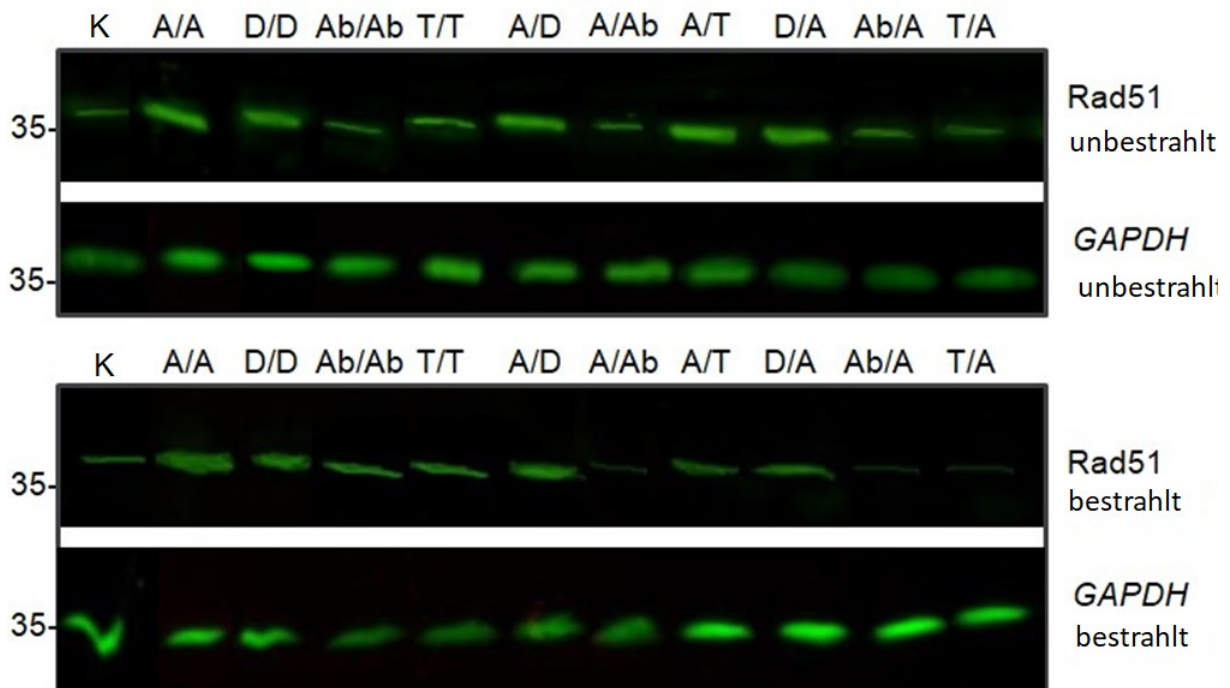
Behandlung von HROG05 Zellen in zwei Zyklen mit je 72 h Inkubationszeit: A (=ADI), D (=Dinaciclib), Ab (=Abemaciclib) und T (=Temozolomid). Bestrahlung mit 2 Gy. Western Blot mit GAPDH als Ladekontrolle (Zweifaktorielle Varianzanalyse, n=3, \*p<0,05 vs. DMSO).

Die Quantifizierung der Ku80-Banden ergab, dass lediglich in Proteinextrakten aus Zellen nach der Behandlung mit ADI und Dinaciclib signifikant mehr Ku80 Reparaturproteine detektierbar waren. Dies war unabhängig von der Bestrahlung. Die Ku80-Abundanzen in den Zellen nach allen anderen Behandlungsschemata wiesen ein ähnliches Niveau wie in den DMSO-behandelten Kontrollzellen auf. Bei Kombinationsbehandlungen mit Abemaciclib war eine Tendenz zur leichten Reduktion erkennbar. In keinem Fall gab es signifikante Unterschiede in der Ku80-Abundanz zwischen der jeweiligen bestrahlten Probe und dem unbestrahlten Pendant.

### 3.9 NACHWEIS VON RAD51

Rad51 spielt eine Rolle bei der homologen Rekombination während der DNA-Doppelstrang-Reparatur (55). Die Abbildung 19 zeigt das in den Proteinextrakten

detektierte Rad51 (~ 37 kDa). Die Reihenfolge der einzelnen Behandlungsschemata entspricht den zuvor dargestellten, die DMSO Kontrolle ist ganz links aufgetragen.



**ABBILDUNG 19: WESTERN BLOT NACH DETEKTION DES DNA-REPARATURPROTEINS RAD51 NACH ADI, CDK-INHIBITOR UND TMZ BEHANDLUNG IN BESTRAHLTEN UND UNBESTRAHLTEN HROG05-ZELLEN**  
 K (=Kontrolle mit DMSO), A (=ADI), D (=Dinaciclib), 10 µM Ab (=Abemaciclib) und T (=Temozolomid). Bestrahlung mit 2 Gy. Western Blot mit GAPDH als Ladekontrolle.

Die in Abbildung 20 dargestellte Quantifizierung der Rad51 Banden zeigt bei der sequenziellen Monotherapie mit Abemaciclib sowie den Kombinationsbehandlungen mit SpyADI signifikante Unterschiede. Alle drei Behandlungsansätze führten zu einer Reduktion der relativen Abundanz von Rad51 in den Proteinlysaten. Nach Behandlung mit der Kombination SpyADI/Dinaciclib hingegen wurde – analog zu Ku80 – vermehrt Rad51 in den Proteinextrakten der entsprechenden Zellen nachgewiesen. Bei allen untersuchten Kombinationen wurde infolge der Bestrahlung eine tendenziell höhere Proteinmenge detektiert als ohne Bestrahlung.

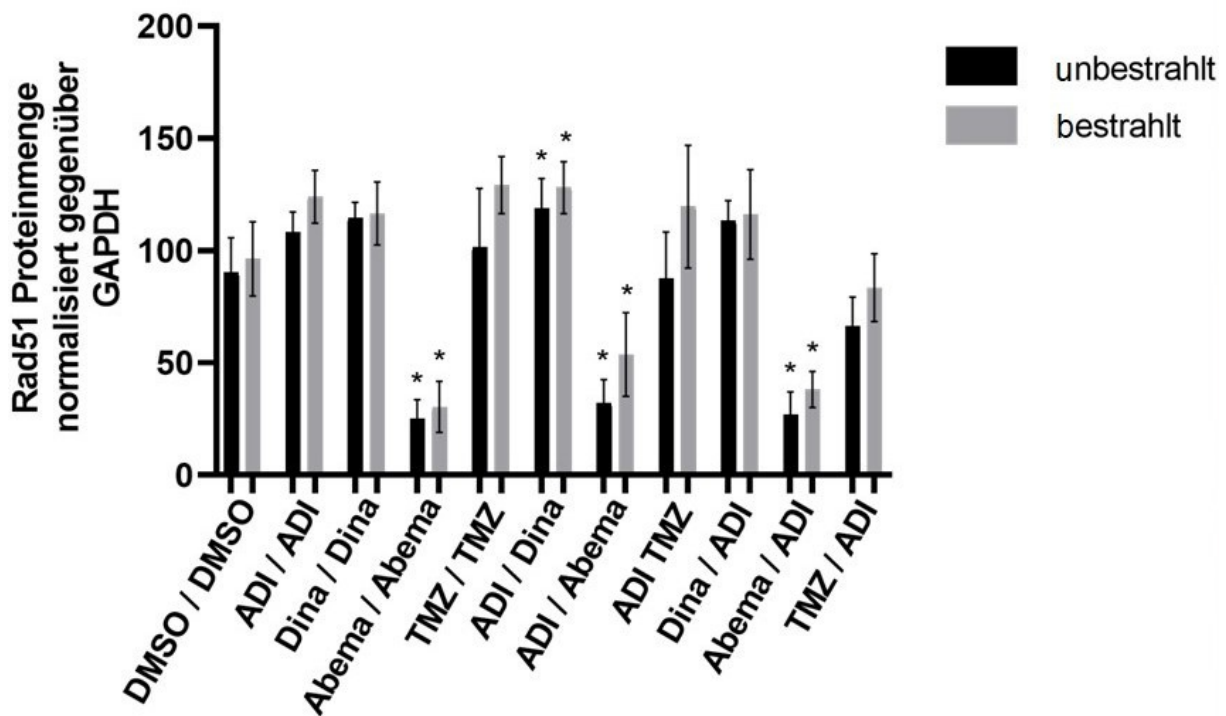


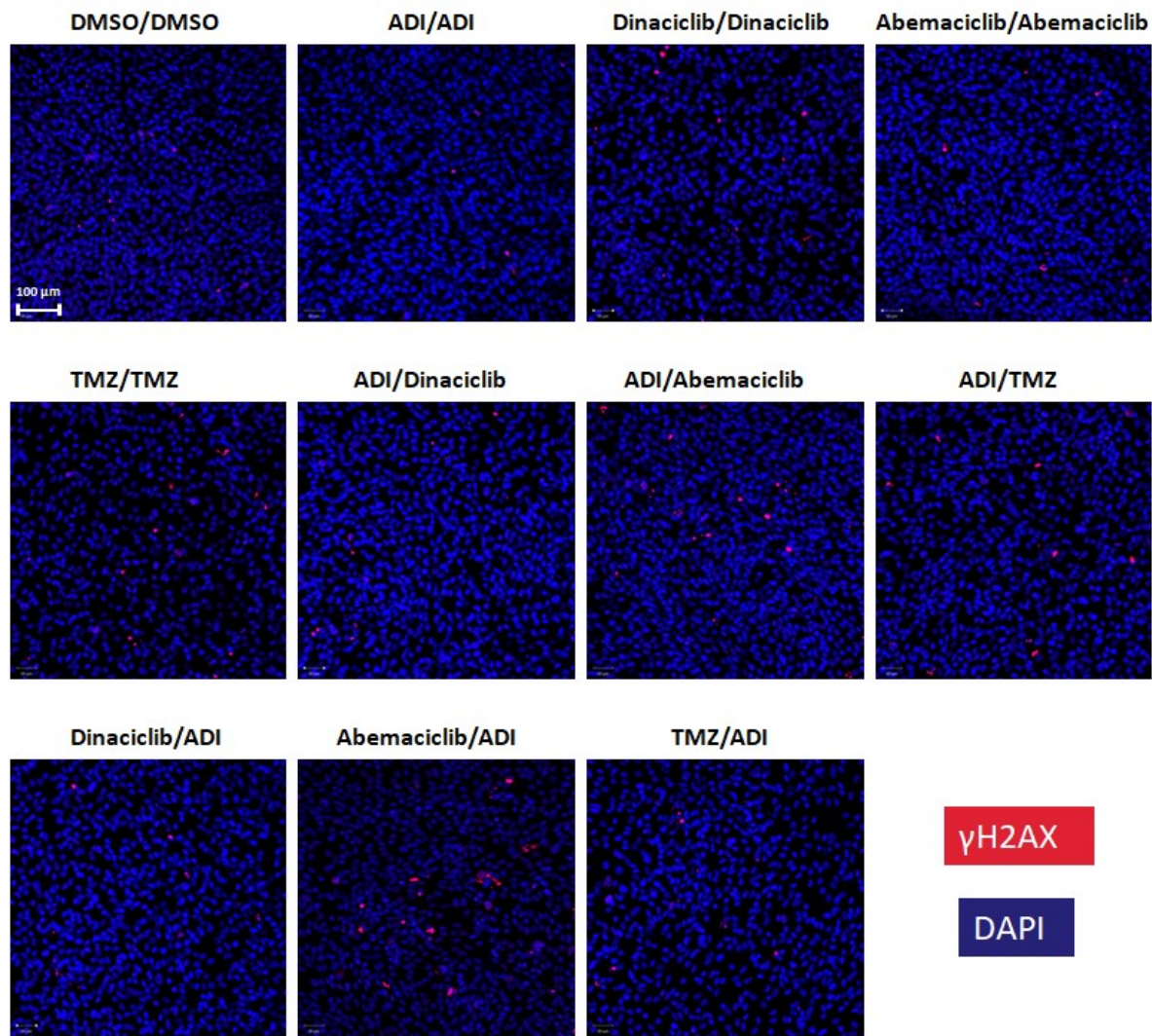
ABBILDUNG 20: QUANTIFIZIERUNG DES DNA-REPARATURPROTEINS RAD51 IN HROG05-ZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT SPYADI, CDK-INHIBITOREN UND TMZ MIT UND OHNE BESTRAHLUNG

Behandlung von HROG05 Zellen in zwei Zyklen mit je 72 h Inkubationszeit: A (=ADI), D (=Dinaciclib), Ab (=Abemaciclib) und T (=Temozolomid). Bestrahlung mit 2 Gy. Western Blot mit GAPDH als Ladekontrolle (Zweifaktorielle Varianzanalyse, n=3, \*p<0,05 vs. DMSO).

### 3.10 NACHWEIS VON $\gamma$ H2AX

Zur Untersuchung auf strahleninduzierte Doppelstrangbrüche erfolgte eine Immunfärbung gegen das Protein  $\gamma$ H2AX. H2AX gehört zu den H2A Histonen und wird als Reaktion auf Doppelstrangbrüche, unter anderem induziert durch radioaktive Strahlung, am Serin an Position 139 zu  $\gamma$ H2AX phosphoryliert (56), (57).

Die Behandlungsschemata entsprachen den zuvor beschriebenen. Im Anschluss an die Behandlung wurden die Zellen mit 2 Gy bestrahlt. Zur Detektion wurden fluoreszenzmarkierte Antikörper gegen  $\gamma$ H2AX verwendet und unter dem konfokalen Laser-scanning Mikroskop mittels Immunfluoreszenz sichtbar gemacht (Abb. 21).



**ABBILDUNG 21: FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHME ZUR DETEKTION VON DNA-DOPPELSTRANGBRÜCHEN MITTELS  $\gamma$ H2AX FÄRBUNG NACH BEHANDLUNGEN MIT SPYADI, CDK-INHIBITOREN UND TMZ IN MONO- UND KOMBINATIONSTHERAPIE**

Behandlung von HROG05 Zellen in zwei Zyklen mit je 72 h Inkubationszeit: SpyADI 35 mU/ml, Dinaciclib 10 nM, Abemaciclib 10  $\mu$ M, TMZ 10  $\mu$ M. Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen mittels immunhistochemischer  $\gamma$ H2AX Antikörper Färbung nach Bestrahlung mit 2 Gy.

Die meisten Behandlungskombinationen führten zu keiner deutlichen Zunahme des Anteils  $\gamma$ H2AX-positiver Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Die einzige Ausnahme stellt die sequenzielle Kombination Abemaciclib mit darauffolgender SpyADI dar. Hier konnten nach Behandlung mehr Doppelstrangbrüche detektiert werden, erkennbar an einer höheren Anzahl  $\gamma$ H2AX-positiver Zellen.

#### 4. DISKUSSION

---

GBM ist als häufigste maligne Krebserkrankung des Gehirns mit schnellem Tumorprogress sowie mit einer infausten Prognose verknüpft. Die derzeitigen Behandlungsmöglichkeiten sind begrenzt und nur eingeschränkt wirksam (58). Die Arginin-Auxotrophie stellt einen neuen Angriffspunkt für Therapien dar. Die Inaktivierung von Genen des Harnstoffzyklus führt dazu, dass der Tumor seine Fähigkeit zur Arginin-Biosynthese verliert (15). Diese Auxotrophie bei Tumoren ermöglicht ein energie-sparendes Wachstum (9).

Durch den Entzug externen Arginins, z. B. mit Hilfe Arginin-degradierender Enzyme, kann Arginin-auxotrophen Tumoren eine wichtige Wachstumsgrundlage entzogen werden. Die Arginin-Deiminase aus *S. pyogenes* ist ein mögliches Enzym, um diesen Mechanismus therapeutisch zu nutzen. Ein wichtiger Prädiktor für die Arginin-Auxotrophie bei Tumoren und somit auch die Sensitivität gegenüber einer Arginin-depletierenden Therapie ist der Methylierungsstatus der Gene für Argininosuccinat-Synthetase 1 und Argininosuccinat-Lyase (19). Durch die Methylierung der CpG-Inseln im Promotor dieser Gene kommt es zu einer epigenetischen Inaktivierung dieser Schlüsselenzyme der *de novo* Arginin-Biosynthese. Die Häufigkeit solcher CpG-Inseln Methylierungen in GBM Zellen wird für ASS1 mit ungefähr 30 % und für ASL mit ca. 22 % angegeben (52). Bei Zellen, die keine Methylierung aufweisen, wurde in Studien eine Hochregulation beider Schlüsselenzyme als Reaktion auf Behandlung mit ADI-PEG20 aus Mycoplasmen registriert (52). Eine genetische Stilllegung von *ASS1* und *ASL* wurde in vorangegangenen Studien mit einer Hochregulation von *HIF1 $\alpha$*  und einer Herunterregulation von *c-Myc* assoziiert (16), (15). Ebenfalls war die Responsivität der Zellen gegenüber ADI bei Experimenten mit anderen GBM Zelllinien meist, aber nicht in allen Fällen, mit der fehlenden Expression von *ASL* und *ASS1* kongruent (19). Die Arginin-Auxotrophie kann zusätzlich durch weitere Enzyme der Arginin-Biosynthese wie OCT beeinflusst werden (17).

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden bereits in Voruntersuchungen molekular charakterisiert und die Methylierung der Promotoren der entsprechenden Gene bestätigt. Damit einhergehend konnte auch in Vorversuchen die Sensitivität gegen Argininentzug in den Zelllinien HROG02, HROG05, HROG63 aufgezeigt werden (19). HROG52 ist OCT negativ, zeigt aber dennoch eine reduzierte Responsivität gegenüber Argininentzug (17). Bei HROG52 handelt es sich um den Primärtumor zu

---

dem Rezidiv HROG63 (17). HROG63 wiederum ist ebenfalls OCT negativ, zeigt aber eine stärkere Responsivität.

Da GBM Zellen oft durch Herunterregulation von Signalwegen eine intrinsische Resistenz gegenüber Apoptose aufweisen, erfolgt ein durch Argininentzug induzierter Apoptose-unabhängiger Zelltod (52), (59). Autophagie wurde als erste Stressreaktion Arginin-depletierter Tumorzellen beschrieben (17). Dabei handelt es sich um einen nicht apoptotischen Weg des programmierten Zelltodes, um Proteine und Zellorganellen abzubauen und zu recyceln. Autophagie dient zunächst dem Überleben der Zellen während eines Nährstoffmangels, kann als Dauerzustand aber auch zum zellulären Suizid führen (16). Bei Untersuchungen von Syed *et al.* mit ADI-PEG20 aus Mycoplasmen wurden bei Zelllinien mit methyliertem *ASS1* bereits nach 6 h erste Anzeichen zellulärer Autophagie nachgewiesen (52). Auch die Induktion von Seneszenz wurde nach Behandlung mit SpyADI bereits gezeigt (17). Dabei handelt es sich um einen stabilen und langandauernden Verlust zellulärer Proliferationsfähigkeit trotz Viabilität und metabolischer Aktivität (27).

Kombinationstherapien mit verschiedenen Therapeutika stellen eine Möglichkeit dar, die Wirkung einzelner Substanzen zu verstärken. Es wurde bereits gezeigt, dass ADI in Kombination mit einigen Zytostatika eine gesteigerte antitumorale Wirkung zeigt (32). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Pegylierung der rekombinanten SpyADI quantifiziert und ihre Pharmakokinetik *in vitro* und *in vivo* untersucht. Zudem wurden Kombinationstherapien von SpyADI und CDKis getestet und deren Einfluss auf die Strahlensensitivität der GBM Zellen sowie die resultierenden DNA-Schäden geprüft.

#### **4.1 PEGYLIERUNGSEFFIZIENZ**

---

Als bakterielles Fremdenzym wird die SpyADI vom menschlichen Immunsystem erkannt. Die Immunogenität körperfremder Proteine kann mithilfe von Pegylierung reduziert werden (28). Die Pegylierung erfolgt, indem die elektrophil-aktivierten PEG-Carbonsäuren mit den nukleophilen Aminogruppen des Proteins reagieren (47). Durch die sterische Hinderung der PEG-Moleküle, welche das Protein umhüllen, kann das Immunsystem Fremdantigene schlechter erkennen (29). Der Grund für die geringe Immunogenität von PEG selbst ist unbekannt, wird aber meist auf seine einfache Struktur zurückgeführt (60). Derzeit sind mehrere Medikamente, die pegylierte

---

Proteine enthalten, von der U.S. Food and Drug Administration (FDA) zugelassen, darunter die Enzyme PEG-Asparaginase und PEG-Adenosin-Deaminase (61). Angehängte PEG-Moleküle sorgen neben der reduzierten Immunogenität zusätzlich für eine geringere renale Ausscheidung und längere Serumhalbwertszeit von therapeutischen Proteinen (28). Die Pegylierung führt zu einer Steigerung der physiologischen und chemischen Stabilität. Die daraus resultierenden pharmakokinetischen Veränderungen können zu konstanteren Plasmakonzentrationen der entsprechenden therapeutischen Enzyme führen, was die klinische Effektivität steigert (29). Dies kann eine Target-spezifische Behandlung mit konstanter Dosis ermöglichen.

Die Pegylierung der SpyADI erfolgte im Rahmen dieser Arbeit nach dem von Kerren Volkmar erarbeiteten Protokoll (47).

Die pharmakologischen Eigenschaften und pharmakodynamischen Dispositionen pegylierter Proteine werden durch die Größe, die Geometrie und Bindungsstellen der PEGs beeinflusst (29).

Da SpyADI keine primären Aminogruppen im aktiven Zentrum trägt, wurde eine Aminogruppen-spezifische Pegylierung verwendet (47). Bei der Pegylierungsreaktion reagiert die elektrophil-aktivierte PEG-Carbonsäure mit nukleophilen Aminogruppen des Proteins (62). Der verwendete mPEG20K-Succinimidyl Carboxyester hat einen Ester als Schutzgruppe und N-Hydroxysuccinimid als reagierende Gruppe, die reaktiv gegenüber Aminogruppen ist (63). Für die Konjugation mit Protein müssen die PEG-Moleküle durch ein Kupplungsreagenz aktiviert werden (62). Die aktivierten PEGs reagieren dann mit funktionellen Gruppen. Um Crosslinking und Dimerisierung vorzubeugen, wird die zweite Hydroxylgruppe des aktivierten PEGs mit einer Schutzgruppe blockiert (31).

Vorarbeiten berichten häufig von einer Selektivität der PEGs gegenüber  $\epsilon$ -Aminogruppen von Lysinresten (64). Die Pegylierung hängt zudem ebenfalls vom pH-Wert ab. Des Weiteren wurden Temperatur, Zeit und das Verhältnis der Proteinkonzentration zu den PEG-Molekülen als Einflussfaktoren beschrieben (31).

Die PEG-gebundenen Ketten können mithilfe einer photometrischen Reaktion indirekt quantifiziert werden (62).

Die Anzahl der zugänglichen primären Aminogruppen der SpyADI ist mit der, die bei Mykoplasmen ADI gefunden wurde, vergleichbar (30). Im Durchschnitt wurden durch die Pegylierung ein Drittel der primären Aminogruppen pegyliert. Somit ist der Grad

---

der Pegylierung nicht allein von den zur Verfügung stehenden Aminogruppen abhängig. Es spielen wahrscheinlich auch sterische Verhältnisse, Zugänglichkeit und die bereits erwähnte Präferenz für Lysinreste eine Rolle. In Voruntersuchungen wurde gezeigt, dass SpyADI-PEG20 durch die Pegylierung ungefähr 50 % ihrer Aktivität im Vergleich zum nativen Enzym verliert (32). Auch dies entspricht in etwa dem für die ADI aus Mycoplasmen beschriebenen Aktivitätsverlust durch Pegylierung mit 20 kDa-PEG-Resten.

#### **4.2 PHARMAKOKINETISCHE AUSWIRKUNGEN DER PEGYLIERUNG *IN VITRO***

---

Eine vergleichende *in vitro* Charakterisierung der SpyADI und SpyADI-PEG20 wurde in den vier Zelllinien HROG02, HROG05, HROG52 und HROG63 durchgeführt. Dabei wurde untersucht, wie sich die Argininkonzentration in vier verschiedenen Zellkulturen der GBM Zelllinien nach Zugabe von SpyADI oder SpyADI-PEG20 im Vergleich zu unbehandelten Zellen der gleichen Linie und zueinander verhält. Die Argininkonzentration, welche durch das Arginin-abbauende Enzym beeinflusst werden sollte, wurde nach 1 h, 3 h, 6 h und 24 h mittels HPLC gemessen, um den zeitlichen Verlauf der Enzymaktivität abbilden zu können. Die Zelllinien HROG02, HROG05, HROG63 wurden in vorausgehenden Untersuchungen als responsiv gegenüber ADI getestet (17), (19).

In allen Zelllinien erfolgte die Reduktion der Argininkonzentration durch SpyADI schneller als durch SpyADI-PEG20. Dies ist vermutlich auf eine initiale sterische Hinderung durch PEG-Moleküle zurück zu führen, die den Argininabbauprozess verlangsamen (29).

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass für die Zelllinien HROG05 und HROG52 der antitumorale Effekt von SpyADI-PEG20 signifikant höher war als der von SpyADI. Auch in den anderen beiden Zelllinien war diese Tendenz zu erkennen (65). Sowohl in HROG52 als auch HROG63 war die Argininkonzentration nach 24 h Behandlung mit SpyADI-PEG20 nicht mehr detektierbar und auch bei HROG02 war die Argininkonzentration in den SpyADI-PEG20-behandelten Proben niedriger als bei mit nativer SpyADI behandelten. Es kann spekuliert werden, dass die Ergebnisse – auch in Hinblick auf die antitumorale Wirkung – auf eine bessere Stabilität von SpyADI-PEG20 zurückzuführen sind (65). GBM sezernieren eine Vielzahl an Proteasen, welche ge-

---

nutzt werden können, um die Extrazellulärmembran des umgebenden Gewebes zu penetrieren und sind unter anderem für das stark infiltrative Wachstum des Tumors verantwortlich (66). *In vitro* könnte dies Auswirkungen auf die Stabilität von SpyADI haben, welche im Gegensatz zu SpyADI-PEG20 keinen Schutzmantel aus PEG-Molekülen aufweist. Pegylierte Moleküle bieten Enzymen wie Proteasen eine geringere Angriffsfläche (67). Ob eine erhöhte Stabilität gegenüber proteolytischer Degradation für die stärkere Reduktion und antiproliferative Wirkung der SpyADI-PEG20 gegenüber der nativen SpyADI verantwortlich ist, muss in zukünftigen Arbeiten geklärt werden.

#### **4.3 PHARMAKOKINETISCHE AUSWIRKUNGEN DER PEGYLIERUNG IN VIVO**

---

Um die Pharmakokinetik *in vivo* beurteilen zu können, wurden NSG Mäusen SpyADI, SpyADI-PEG20 oder eine PBS-Kontrolle injiziert und über die L-Argininkonzentration im Plasma die Aktivität der Enzyme indirekt gemessen. Die Plasma Arginin-Konzentration nahm zunächst sowohl bei Mäusen, welche SpyADI erhalten hatten, als auch in der Gruppe, welcher SpyADI-PEG20 injiziert wurde, ab. Während die Plasmaargininkonzentration bei mit SpyADI behandelten Tiere nach 24 h wieder auf dem ursprünglichen Niveau war, blieb bei Tieren, die SpyADI-PEG20 erhalten hatten, der Arginin-Spiegel im Blut noch 24 h *post injectionem* niedrig. Insgesamt war der Argininabbau in der mit SpyADI-PEG20 behandelten Versuchsgruppe zu allen gemessenen Zeitpunkten effektiver als beim nativen Enzym. Dies kann auf verschiedene Einflussfaktoren zurückgeführt werden.

Ein Pharmakon, wie die injizierte SpyADI und SpyADI-PEG20, durchläuft verschiedene Phasen des LADME Prozesses (Liberation, Absorption, Distribution, Metabolismus und Exkretion) (68).

Nach Liberation des in PBS gelösten Wirkstoffes kommt es zur Absorption, die bei intravenöser Gabe zu einer formalen Bioverfügbarkeit von 100 % führt (69). Die Biodistribution von Substanzen wird durch PEG-Moleküle aufgrund der Veränderung ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften sowie ihrer Löslichkeit verändert (62). Vor allem Größe, Zusammensetzung der Polymere, Ladung und Oberflächeneigenschaften spielen bei der Distribution eine Rolle (70). Bei Pegylierung ist nicht zuletzt die PEG-Schicht und deren Eigenschaften wie Dicke, Ladung, Dichte, funktionelle Gruppen und Konformation von großer Bedeutung (71). In früheren Untersuchungen

---

wurde auch das Molekulargewicht der Polyethylenglykole als Einflussfaktor auf die Distribution erfasst, wobei die PEG-Kettenlänge keine Rolle zu spielen schien (72). PEG-Ketten können die eingehüllten Moleküle auch durch sterische Hemmung vor Plasmaproteinen im Blutkreislauf schützen und somit eine gute Wasserlöslichkeit und verminderte Clearance bewirken (73). Dieser Schutzeffekt wird durch größere PEG-Moleküle und höhere Konzentrationen weiter verstärkt (73).

Der First-Pass-Metabolismus der Leber wird durch die Applikationsform sowohl für das native als auch das pegylierte Enzym umgangen. Die Pegylierung reduziert insgesamt die Erreichbarkeit von Stoffen durch Stoffwechsellenzyme (67).

Zum Schluss erfolgt die Exkretion des Wirkstoffes. Die Pegylierung von Molekülen beeinflusst ihre renale Filtration (29). Ein Minimum an molekularer Masse von 20 kDa (Stokes Radius von 70 Å) ist notwendig, um die renale Clearance *via* glomerulärer Filtration signifikant zu senken (74), (75). Allerdings führt die Größenzunahme durch Pegylierung zu einer inversen Abnahme der Enzymaktivität (32), (30). Bei der glomerulären Filtration passieren Makromoleküle das fenestrierte Endothel, welches in Teilen durch die glomeruläre Basalmembran verengt wird, sowie das Schlitzdiaphragma der Podozyten (76). Dieser Weg wird durch den veränderten makromolekularen Aufbau und die Größe nach der Pegylierung erschwert. Durch Makromoleküle, welche größer sind als der renale Schwellenwert, wird die Serumhalbwertszeit verlängert (30).

Die Blutzirkulationszeit vergrößert sich mit dem Gewicht der schützenden PEG-Ketten (77). Dabei ist nicht nur die Pegylierung selbst, sondern auch das Molekulargewicht der angehängten PEG-Moleküle relevant (77). In Studien mit *Mycoplasma* ADI wurde bei PEG bis zu 20 kDa eine verbesserte Pharmakodynamik beobachtet, darüber hinaus war kein zusätzlicher Effekt zu verzeichnen (30).

Zu den wichtigsten Clearance Mechanismen zur Entfernung von Substanzen, welche größer sind als der renale Schwellenwert, gehören Opsonierung und Phagozytose.

Dabei werden Fremdkörper mit Opsoninen markiert und dadurch Phagozyten rekrutiert, welche mittels Phagozytose die körperfremde Substanz letztendlich endozytisch aufnehmen und somit aus dem Blutkreislauf entfernen (71). Bei den Makrophagen handelt es sich typischer Weise um Kupffer Zellen oder Makrophagen der Leber (71). Die Clearance des Mononukleären Phagozytensystems erfolgt hauptsächlich in Leber und Milz und kann durch Pegylierung verringert werden (70).

---

In Versuchen, welche mithilfe von Größenausschluss-Chromatographie durchgeführt wurden, wurde beschrieben, dass pegylierte Dendrimere gegenüber der Biodegradation *in vivo* wesentlich resistenter waren als deren native Korrelate (72). Durch die PEG-Konjugate wird die Oberfläche der Moleküle maskiert. Durch die PEG-Schicht wird auch der proteolytische Abbau verlangsamt und Antikörper oder Antigenprozessierende Zellen, welche zu einer Enzyminhibition führen können, können schlechter binden (62). In Versuchen mit Mycoplasmen ADI wurden signifikant höhere Antikörper-Konzentrationen gegen das Enzym nach Injektion mit nativer ADI gemessen, als nach Injektion mit ADI die mit PEG eines Molekulargewichts von entweder 5 kDa oder 20 kDa konjugiert war (30). Obwohl PEG selbst nicht antigen ist, kann durch PEG-Konjugation an Proteine mittels chemischer Bindungen, welche sperrige aromatisch oder heterozyklische Gruppen im PEG-Konjugat hinterlassen, die Antikörperbildung induziert werden (31).

Insgesamt ist anzunehmen, dass die oben beschriebenen Mechanismen auch im Falle der SpyADI-PEG20 für die verbesserte Pharmakokinetik verantwortlich sind.

Die Ergebnisse für die SpyADI-PEG20 sind mit den Resultaten von Holtsberg *et al.* zu pharmakokinetischen Untersuchungen mit *Mycoplasma* ADI vergleichbar. Die Plasmaargininkonzentration bei Mäusen, welche mit nativer *Mycoplasma* ADI behandelt wurden, stieg nach Abfall wesentlich schneller an, als dies bei der mit pegylierter ADI behandelten Gruppe der Fall war. Dort war für bis zu sechs Tage nach Injektion eine Argininreduktion detektierbar. In der nativen ADI Versuchsgruppe fiel die Argininkonzentration zudem nie auf die Level, welche in der Vergleichsgruppe mit pegylierter ADI erreicht wurden (30). Dies konnte auch für die SpyADI beobachtet werden. Der Nachbeobachtungszeitraum war in dieser Untersuchung allerdings kürzer.

Zusammenfassend sprechen die Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit nicht nur für eine Nutzung der pegylierte ADI *in vitro*, sondern auch für Untersuchungen *in vivo*.

#### 4.4 CDK-INHIBITOREN

---

Deregulationen des Zellzyklus kommen besonders häufig in Krebszellen vor (36). Die Progression durch den Zellzyklus wird durch Komplexe bestehend aus Cyclin und Cyclin abhängigen Kinasen reguliert. CDKs spielen in verschiedenen weiteren Bereichen, wie onkogener Transkription, DNA-Reparatur und Stammzellselbsterneuerung,

---

eine wichtige Rolle. Die CDKs selbst können durch Bindung mit CDKi gehemmt werden (34).

Abemaciclib ist ein selektiver Inhibitor der Cyclin abhängigen Kinasen 4 und 6 (38). Zudem kann Abemaciclib in Retinoblastoma protein (Rb)-kompetenten Zellen den Zellzyklusarrest induzieren und die von CDK 4/6 und Cyclin D1 Komplexen aktivierte Rb-Phosphorylierung, Zellzyklusprogression und Zellproliferation inhibieren (38). Es wurde außerdem bereits als Therapeutikum zur Behandlung von HR-positivem und HER2-negativem fortgeschrittenem oder metastasiertem Brustkrebs zugelassen (38). Es ist zudem bekannt, dass Abemaciclib die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann, weshalb es grundsätzlich auch eine Option für die Behandlung von Hirntumoren darstellt (78).

Ein weiterer CDKi, Dinaciclib, kann CDK2, CDK5, CDK1 und CDK9 - unabhängig vom *TP53*-Mutationsstatus einer Zelle - inhibieren (78), (79). Dabei werden CDK1 und CDK9 in ähnlichem Maße gehemmt. Die Inhibition von CDK2 und CDK5 ist dazu bis zu 14 Mal stärker (79). Dinaciclib kann, ebenso wie Abemaciclib, über Rb-Phosphorylierung den Zellzyklus beeinflussen (79).

Die verwendeten CDKis zeigen zudem verschiedene immunmodulatorische Effekte. Abemaciclib verstärkt die antitumorale Immunität durch vermehrte Antigenpräsentation, induziert MHC I/II und unterdrückt selektiv regulatorische T-Zellen (37). Dinaciclib induziert die Expression von Typ I IFN Response Genen, steuert die Infiltration von NK-Zellen und Makrophagen und unterdrückt die Aktivierung von INF $\gamma$  induzierter IDO-Hochregulation in GBM (37).

Es gibt zunehmend Belege dafür, dass Tumorzellen spezifische Anforderungen an individuelle CDKs haben, die ein potenzielles Ziel für antitumorale Therapien bieten (36).

#### **4.5 BESTRAHLUNGSABHÄNGIGE EFFEKTE DER KOMBINATIONSTHERAPIE VON SPYADI UND CDK-INHIBITOREN**

---

Zur Untersuchung der Effekte einer sequenziellen Kombinationstherapie aus SpyADI und verschiedenen CDKis auf HROG05 Zellen wurde zunächst die Viabilität bestimmt. Zudem wurde untersucht, ob die entsprechenden Kombinationstherapien die Strahlensensitivität von GBM Zellen erhöhen.

---

Unabhängig von der Bestrahlung war die Viabilität der HROG05 Zellen nach allen Behandlungsschemata reduziert. Ausnahmen bildeten hierbei die Monotherapien mit Dinaciclib und TMZ. Obgleich letzteres das Standardzytostatikum beim GBM darstellt, wurde in dieser Arbeit kein therapeutischer Effekt durch TMZ erzielt.

Die Kombinationen mit Abemaciclib und ADI führten zur stärksten Reduktion der Viabilität. Dinaciclib zeigte bereits mit anderen Substanzen synergistische antitumorale Effekte gegenüber GBM Zellen (80). Die durch CDKi Behandlung hervorgerufenen Veränderungen umfassen u.a. eine Hochregulation von Genen, die verantwortlich sind für Zelladhäsion, Teilung, DNA-Bindung, Apoptose (*Casp3*, *Casp8*), Seneszenz (*ASF1A*, *CENPA*, *FBXO31*) und Autophagie (*ATG4D*, *ATG2A*, *SOGA1*) (80). Gleichzeitig werden Chemotaxis steuernde Gene (*CXCL8*, *CCL20*) sowie Protoonkogene (*JUNB*, *FOS*) in GBM Zellen herunterreguliert (80). Der Cyclin D1-CDK4/6-Rb Signalweg, welcher in einer Vielzahl an GBM Zellen verändert ist, kann mit Abemaciclib gezielt angegriffen werden (78). In Experimenten mit HROG63 zeigten die Zellen nach einer Behandlung mit Abemaciclib Anzeichen früher Apoptose (81). In Langzeitbehandlung waren die Effekte zur Verhinderung von Koloniebildung unter Abemaciclib stärker ausgeprägt als unter Dinaciclib, dies unterstreicht die therapeutische Relevanz des CDK4/6 Inhibitors (81). HROG05 wiederum zeigte in früheren Untersuchungen mit CDKis morphologische Veränderung mit massiver Vaskularisierung und LAMP1/2-Rab7a Anreicherung (81).

Bei Langzeitbehandlung verschiedener GBM Zelllinien mit Abemaciclib wurde bei keinem Fall eine Resistenz induziert. Infolge der Langzeitbehandlung mit Dinaciclib zeigte sich in 1/5 Fällen (=HROG05) eine Resistenzentwicklung (80). Die geringere Wirkung von Dinaciclib gegenüber Abemaciclib insbesondere in HROG05 war bereits aus Vorversuchen mit dieser Zelllinie bekannt und wurde auf einen intrinsisch resistenten Zellklon zurückgeführt (81). Einer der Hauptgründe für das Auswachsen resistenter Klone in GBM ist die genetische und phänotypische Heterogenität der Tumorzellen, welche mit verschiedenen Behandlungen einem hohen Selektionsdruck ausgesetzt werden (37). Zusätzlich neigen GBM Zellen dazu, neue Resistenzen zu entwickeln.

Die Monotherapie mit TMZ hatte, wie zuvor beschrieben, keinen Einfluss auf das Zellwachstum. Dieser Befund ist zwar kongruent mit Voruntersuchungen, jedoch etwas überraschend, da molekular eine MGMT-Promotormethylierung vorliegt (Primarius: 58 %, Daten vom Institut für Pathologie der UMR zur Verfügung gestellt). Epige-

---

netische Veränderungen im Rahmen der *in vitro* Kultivierung und seriellen Passagierung können nicht ausgeschlossen werden. TMZ vermittelt in Zellen mit MGMT-Promotormethylierung den Zelltod durch Induktion von DNA Doppelstrangbrüchen, die schließlich zu Wachstumsstopp und Initiierung zellulärer Apoptose führen (82). Neben epigenetischen Modifikationen tragen Mutationen oder Deletionen von *TP53*, welche bei ca. 1/3 aller GBM Fälle auftreten, zur TMZ Resistenz bei (18). Die hier verwendete Zelllinie HROG05 trägt eine *KRAS* G12D Mutation, welche sehr wahrscheinlich an der Vermittlung der TMZ Resistenz beteiligt ist. Folglich stellen CDKis eine vielversprechende Alternative zu TMZ dar.

Kombinatorische Effekte von CDKis und SpyADI verstärkten die Biomassereduktion. Es zeigte sich in Vorversuchen, dass durch duale CDKi Applikation vermehrt mitochondriale reaktive Sauerstoffspezies nachweisbar sind (81). Des Weiteren wurde sowohl in CDKi Einzel- und Kombinationsbehandlungen die Induktion spezifischer seltener Zelltod-Typen getriggert, welche durch multivaskuläre Phänotypen und Zeichen früher Methuosis gekennzeichnet ist (81). CDKis induzieren überdies p21 und p16-vermittelte Seneszenz (81). Zudem wurde in 3D Modellen gezeigt, dass eine sequenzielle Kombination aus CDKi und SpyADI die Invasivität der GBM Zellreihen beeinträchtigt (83). Eine reduzierte Invasivität konnte auch für eine SpyADI Monotherapie im 2D Modell für HROG05 und HROG63 festgestellt werden (84).

Eine Radiosensibilisierung war bei den Kombinationen mit SpyADI und Abemaciclib erkennbar. Die Biomasse war um etwa 20 % gegenüber der bestrahlten Kontrolle verringert. Dieser Effekt ist wahrscheinlich genauso in der kombinatorischen Behandlung mit höherer Abemaciclibdosis vorhanden, konnte allerdings aufgrund der bereits rund 90%igen Biomassereduktion in der unbestrahlten Probe nicht mehr detektiert werden. Ein radiosensibilisierender Effekt von Abemaciclib wurde bereits in Vorarbeiten aufgezeigt (80). Auch Arginin Entzugstherapie zeigte in einer 3D-Zellkultur radiosensibilisierende Effekte (18). Die gemessene Radiosensibilisierung in Kombinationsbehandlung wurde sehr wahrscheinlich durch die SpyADI-induzierte Autophagie unterstützt (85). Diese hat vermutlich durch Auslösung stressbedingter Signalwege infolge der Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies zu additivem Zelltod geführt (18). Autophagie nach Bestrahlung von GBM ist mit G<sub>1</sub>-Zellzyklusarrest in radiosensitiven Zellen und Modulation der Expression der CDKis p21 und p27 assoziiert (85). Protein 27 reguliert die G<sub>1</sub>-S-Transition durch die Inhibierung der Cycline D, E und A (85). Insgesamt ist die mögliche Radiosensibilisierung auch von der Zellzy-

---

klusprogression abhängig, wobei GBM Zellen in der G<sub>2</sub>-M Phase am vulnerabelsten sind (18). Auch ER-Stressantwort-Signalwege sind für die GBM Radiosensitivität relevant (18). P53-*knockdown* Zellen sind stärker strahlungsresponsiv gegenüber Argininentzug (18). Dies mag durch die verminderte p53-assoziierte DNA-Reparatur und den fehlenden p53-induzierten Zellzyklusarrest bedingt sein (18).

Abschließend lässt sich die Wirkung von Abemaciclib Monotherapie und die Kombinationen CDKis mit SpyADI festhalten, bei denen insbesondere Abemaciclib zur Radiosensibilisierung beiträgt.

#### **4.6 DNA-STRANGBRÜCHE NACH KOMBINATIONSTHERAPIE UND BESTRAHLUNG**

---

Zur Detektion von strahlungsinduzierten Strangbrüchen nach CDKi und SpyADI-Behandlung wurden die Proteine Ku80 und Rad51 mittels Western Blot quantifiziert. Ku80 dient zur Detektion von Doppelstrangbrüchen und rekrutiert Faktoren für die DNA-Reparatur mittels nicht-homologer Endverknüpfung (NHEJ) (54). Dabei wirkt es als Rekrutierungsfaktor für andere NHEJ-relevante Faktoren (54). Der für NHEJ benötigte Ku70/Ku80 Komplex liegt im Nukleus in höherer Konzentration vor, sodass dieser Reparaturweg unabhängig vom Zellzyklus ist (86). Der NHEJ-Reparaturweg ist fehleranfällig und führt oft zu genomischer Instabilität. Er ist bei vielen malignen Zellen verändert. Eine Überexpression der verbesserten NHEJ-Reparatur-Aktivität ist mit Therapieresistenz in GBM assoziiert (53). Rad51 ist an der homologen Rekombination während der DNA-Doppelstrang-Reparatur als Reparaturprotein beteiligt (55). Es hilft bei der Bindung der DNA des geschädigten Chromatids mit dem homologen doppelsträngigen Bereich des Schwesterchromatides (87). Homologe Rekombination findet hauptsächlich während der S- und G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus statt und ist weniger anfällig für Fehler als NHEJ (53). Doppelstrangbrüche sind die toxischsten Läsionen, die Krebszellen durch ionisierende Strahlung zugefügt werden können. Sie müssen unbedingt repariert werden, um chromosomale Instabilität und den folgenden Zelltod zu verhindern (53).

In Proteinextrakten der Zellen nach der sequenziellen SpyADI/Dinaciclib Kombinationstherapie waren signifikant mehr Ku80 Reparaturproteine unabhängig von der Bestrahlung detektierbar. Dies lässt auf eine Aktivierung des NHEJ-Reparaturweges schließen, um entstandene Schäden zu reparieren. Bei Kombinationen mit Abema-

ciclib war eine Tendenz zur leichten Reduktion erkennbar. Diese ist jedoch nicht signifikant. Es wäre denkbar, dass die Aktivierung des NHEJ hier vermindert stattfand. Rad51 war bei der sequenziellen Einzeltherapie mit Abemaciclib sowie den Kombinationsbehandlungen mit ADI reduziert. Abemaciclib hemmt den Zellzyklus in der frühen G<sub>1</sub>-Phase (86). Die Homologe Rekombination mit Rad51 ist in dieser Phase also in geringerem Maße zu erwarten. Eine Inhibition dieses Markerproteins der homologen Rekombination führte zu einer gesteigerten Sensitivität von GBM Zellen gegenüber Bestrahlung (88). Die geringe Detektion des Rad51 Proteins könnte auch darauf hindeuten, dass die Reparatur von Doppelstrangbrüchen über NHEJ in dieser Behandlungskombination vergleichsweise weniger aktiv war.

In der sequenziellen Kombination ADI/Dinaciclib hingegen wurde vermehrt Rad51 nachgewiesen. In GBM Zellen wird vorzugsweise der G<sub>2</sub>-Checkpoint unabhängig von der initialen Zellzyklusphase in Folge von strahleninduzierten Schäden genutzt (88). In dieser Phase würde eine Reparatur über Homologe Rekombination ablaufen. Die Hochregulierung deutet auf eine direkte Therapie-assoziierte Veränderung hin. Somit könnten zwar Schäden induziert worden sein, diese wurden aber schnell durch das Reparatursystem der strahlenresistenten GBMs beseitigt (89). Rad51 ist insgesamt verstärkt in Krebszellen gegenüber gesundem Gewebe messbar (90). Eine Überexpression von Rad51 führt zu verstärkter genomischer Instabilität und Resistenz gegenüber Doppelstrangbruch-induzierenden Therapien (87). In neoplastischem Gewebe ist das Tumorsuppressorprotein p53 oft mutiert. Dieses interagiert normalerweise mit dem Rad51 Core-Promoter und Rad51 Protein, um seine Expression und Aktivität zu inhibieren (87). Frühere Studien stellten die präferierte Aktivierung der Homologen Rekombination als Antwort auf strahleninduzierte DNA-Schäden fest (90). In dieser Arbeit wurden keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Ku80 Proteinmenge zwischen den bestrahlten und unbestrahlten Proteinextrakten gefunden.

Bei Rad51 war infolge der Bestrahlung eine tendenziell höhere Menge des zu detektierenden Proteins messbar, die jedoch keine statistische Signifikanz erreichte. Dies lässt darauf schließen, dass die Bestrahlung zellulären Stress in den HROG05 verstärkte, welcher charakterisiert ist durch eine Aktivierung von Reparaturproteinen (90), (91).

In ergänzenden Analysen wurde zur Untersuchung auf strahleninduzierte Doppelstrangbrüche eine Immunfärbung gegen das Protein  $\gamma$ H2AX durchgeführt. Durch Bestrahlung wird das Histon H2AX an Doppelstrangbruchstellen durch ATM Kinasen oder DNA-PKs phosphoryliert.

In den meisten Proben konnte keine erhöhte Anzahl an Doppelstrangbrüchen detektiert werden. Eine Ausnahme bildete die sequenzielle Behandlung mit Abemaciclib und SpyADI und war in HROG05 am stärksten ausgeprägt. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Untersuchung der Viabilität *in vitro*, die ebenfalls die stärksten Effekte in dieser Behandlung zeigte. Zudem war auch die Proteinmenge von Rad51 nach Behandlung mit Abemaciclib und SpyADI reduziert. Die entstandenen Strahlenschäden könnten somit auf eine ineffektive Reparatur der Doppelstrangbrüche hindeuten. Eine mögliche Erklärung wäre eine Sensibilisierung der Zellen durch die Abemaciclib Behandlung, welche durch den folgenden Arginin-Entzug in einer erhöhten Responsivität gegenüber der Strahlung resultierte und Doppelstrangbrüche induziert.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass Abemaciclib ein vielversprechender Kandidat für weitere Untersuchungen an GBM Zellen ist. Die antitumoralen Effekte waren bei Abemaciclib sowohl bezüglich der Viabilität als auch der Strahlensensibilisierung am stärksten ausgeprägt. Da die Abemaciclib Kombination mit SpyADI auch vermehrt Doppelstrang-Brüche nach Bestrahlung induzierte, sollte dieser Kombinationsansatz weiter evaluiert werden.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

---

GBM ist der häufigste maligne Gehirntumor. Da die bisherigen Behandlungsmöglichkeiten nur eine begrenzte Wirksamkeit zeigen, ist die Überlebensprognose schlecht. Es besteht ein dringender Bedarf für neue Therapieansätze. SpyADI, ein aus *S. pyogenes* stammendes Arginin abbauendes Enzym, stellt ein potenzielles Therapeutikum für die Behandlung von Arginin-auxotrophen GBM Tumoren dar. Durch Pegylierung kann die Antigenität des bakteriellen Enzyms verringert werden.

In dieser Arbeit wurde SpyADI auf ihre Pegylierungsfähigkeit untersucht. SpyADI hat 26 potenziell für die Pegylierung erreichbare  $\epsilon$ -Aminogruppen. Die durchschnittliche Pegylierungsrate lag mit 7,5 Mol PEG pro Mol ADI bei etwa 30 %.

*In vitro* waren SpyADI und SpyADI-PEG20 in der Lage, in Kulturüberständen der Zelllinien HROG02, HROG05, HROG52 und HROG63 Arginin abzubauen. Native SpyADI reduzierte die Argininkonzentration schneller, mit SpyADI-PEG20 konnte bei drei der vier Zelllinien die Argininkonzentration stärker abgesenkt werden. In HROG52 und HROG63 war die Argininkonzentration nach 24 h Behandlung mit SpyADI-PEG20 sogar unter das Detektionsniveau gefallen.

In einem *in vivo* Mausmodell wurden die Pharmakokinetiken von SpyADI und SpyADI-PEG20 verglichen. Dabei wurde durch die SpyADI-PEG20 die Plasmaargininkonzentration in den Mäusen sowohl stärker als auch länger anhaltend reduziert als durch die native SpyADI.

An HROG05 Zellen wurde zudem der Einfluss einer sequenziellen Kombinationstherapie aus SpyADI und CDKis auf die Viabilität und Strahlensensitivität untersucht. Die stärksten antitumoralen Effekte wiesen Kombinationsbehandlungen mit Abemaciclib auf. Diese Kombinationen zeigten zudem einen leichten strahlensensibilisierenden Effekt auf die GBM Zellen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass weder die Bestrahlung von HROG05 noch die Behandlungen mit SpyADI, Dinaciclib und TMZ einen Einfluss auf die Abundanz der DNA-Reparaturproteine Ku80 und Rad51 hatten. Nach Kombinationsbehandlungen mit Abemaciclib zeigten sich im Verhältnis weniger Rad51 und eine Tendenz zu erniedrigter Ku80 Abundanz. Somit wurde hier wahrscheinlich die DNA-Reparatur über homologe Rekombination und NHEJ gestört. In einem  $\gamma$ H2AX Assay zur Untersuchung strahleninduzierter Doppelstrangbrüche konnten vermehrt Läsionen in der sequenziellen Kombinationsbehandlung mit Abemaciclib und SpyADI festgestellt werden. Dies unterstützt die Hypothese einer beeinträchtigten DNA-Reparatur und sollte in weiterführenden Untersuchungen näher charakterisiert werden.

## 6. APPENDIX

---

### 6.1 THESEN

---

Im Rahmen dieser Dissertation wurde das aus *Streptococcus pyogenes* stammende argininabbauende Enzyme SpyADI hinsichtlich seiner Pegylierungsfähigkeit und der Auswirkungen der Pegylierung auf die Pharmakokinetik des Enzyms *in vitro* in GBM Zellen und *in vivo* in NSG Mäusen untersucht. Des Weiteren wurden Effekte von SpyADI und den CDK-Inhibitoren Abemaciclib und Dinaciclib auf Viabilität und Strahlensensibilität in GBM-Zelllinien getestet.

Die Untersuchungen erfolgten mit SpyADI, die mit dem rekombinanten *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  Stamm 4640 produziert wurde, und den Zelllinien HROG02, HROG05, HROG52 und HROG63:

- SpyADI ist ein potentiell neues Therapeutikum gegen Glioblastoma multiforme.
- SpyADI hat 26 für die Pegylierung erreichbare  $\epsilon$ -Aminogruppen.
- Das in dieser Arbeit verwendete Pegylierungsverfahren führte zur Pegylierung von etwa 30 % der erreichbaren  $\epsilon$ -Aminogruppen der SpyADI.
- SpyADI-PEG20 reduzierte die Argininkonzentration in Überständen von GBM Zellen langsamer, aber bei drei von vier Zelllinien stärker als die native SpyADI.
- SpyADI-PEG20 reduzierte in NSG Mäusen nach intravenöser Applikation die Plasmaargininkonzentration stärker und länger anhaltend als die native SpyADI.
- Die Pegylierung von SpyADI verbessert die pharmakokinetischen Eigenschaften des Enzyms.
- Sequenzielle Kombinationen des CDKi Abemaciclib mit SpyADI zeigten hinsichtlich Viabilität und Strahlensensibilität in HROG05 die stärksten Effekte.
- Kombinationsbehandlungen von HROG05 mit Abemaciclib führten im Verhältnis zu verringerten Abundanzen der DNA-Reparaturproteine Rad51 und Ku80. Dies weist auf eine Störung der Homologen Rekombination und Nicht-homologe Endverknüpfung hin.

---

**6.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

---

<b>ABBILDUNG 1:</b> ARGININ DEIMINASE SYSTEM.....	4
<b>ABBILDUNG 2:</b> CDK-INHIBITOREN ÜBERSICHT .....	8
<b>ABBILDUNG 3:</b> SCHEMA DES EXPRESSIONS-PLASMIDS PASK-IBA2-ARCA .....	18
<b>ABBILDUNG 4:</b> STREP-TACTIN AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE.....	21
<b>ABBILDUNG 5:</b> TNBSA REAKTION.....	27
<b>ABBILDUNG 6:</b> COOMASSIE GEFÄRBTES SDS GEL (A) BZW. WESTERN BLOT (B) VON PROBEN WÄHREND DER HETEROLOGEN PRODUKTION UND AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHISCHEN AUFREINIGUNG VON SPYADI .....	34
<b>ABBILDUNG 7:</b> COOMASSIE GEFÄRBTES SDS GEL MIT SPYADI-PEG20 VOR (PEG-ADI) UND NACH (AUFGEREINIGTE PEG-ADI) DER ANIONENAUSTAUSCHCHROMATOGRAPHIE.....	36
<b>ABBILDUNG 8:</b> COOMASSIE GEFÄRBTES SDS GEL MIT SPYADI UND SPYADI-PEG20 IM VERGLEICH.....	37
<b>ABBILDUNG 9:</b> QUANTIFIZIERUNG PRIMÄRER AMINOGRUPPEN .....	38
<b>ABBILDUNG 10:</b> PEGYLIERUNGSEFFEKT .....	38
<b>ABBILDUNG 11:</b> ARGININKONZENTRATION IN ZELLKULTURÜBERSTÄNDEN .....	40
<b>ABBILDUNG 12:</b> PLASMAARGININKONZENTRATION IN NSG MÄUSEN.....	41
<b>ABBILDUNG 13:</b> EINFLUSS DER SEQUENZIELLEN KOMBINATIONSTHERAPIE VON ADI UND CDK-INHIBITOREN NACH 2 X 72 H INKUBATION UND BESTRAHLUNG VON 2 GY AUF DIE VIABILITÄT VON HROG05 .....	43
<b>ABBILDUNG 14:</b> EINFLUSS DER SEQUENZIELLEN KOMBINATIONSTHERAPIE MIT ADI UND CDK-INHIBITOREN AUF DIE STRAHLENSENSITIVITÄT VON HROG05 .....	44
<b>ABBILDUNG 15:</b> EINFLUSS DER SEQUENZIELLEN KOMBINATIONSTHERAPIE MIT ADI UND 1 µM ABEMACICLIB NACH 2X 72 H INKUBATION UND BESTRAHLUNG VON 2 GY AUF DIE VIABILITÄT VON HROG05 .....	45
<b>ABBILDUNG 16:</b> EINFLUSS DER SEQUENZIELLEN KOMBINATIONSTHERPIE MIT ADI UND 1 µM ABEMACICLIB AUF DIE BESTRAHLUNGSSENSITIVITÄT VON HROG05 .....	46
<b>ABBILDUNG 17:</b> WESTERN BLOT NACH DETEKTION DES DNA-REPARATURPROTEINS KU80 NACH ADI, CDK-INHIBITOR UND TMZ BEHANDLUNG IN BESTRAHLTEN UND UNBESTRAHLTEN HROG05-ZELLEN .....	47
<b>ABBILDUNG 18:</b> QUANTIFIZIERUNG DES DNA-REPARATURPROTEINS KU80 IN HROG05-ZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT SPYADI, CDK-INHIBITOREN UND TMZ MIT UND OHNE BESTRAHLUNG... ..	48
<b>ABBILDUNG 19:</b> WESTERN BLOT NACH DETEKTION DES DNA-REPARATURPROTEINS RAD51 NACH ADI, CDK-INHIBITOR UND TMZ BEHANDLUNG IN BESTRAHLTEN UND UNBESTRAHLTEN HROG05-ZELLEN .....	49

---

<b>ABBILDUNG 20:</b> QUANTIFIZIERUNG DES DNA-REPARATURPROTEINS RAD51 IN HROG05-ZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT SPYADI, CDK-INHIBITOREN UND TMZ MIT UND OHNE BESTRAHLUNG... 50
<b>ABBILDUNG 21:</b> FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHME ZUR DETEKTION VON DNA-DOPPELSTRANGBRÜCHEN MITTELS $\gamma$ H2AX FÄRBUNG NACH BEHANDLUNGEN MIT SPYADI, CDK-INHIBITOREN UND TMZ IN MONO- UND KOMBINATIONSTHERAPIE ..... 51
<b>ABBILDUNG 22:</b> WESTERN BLOT NACH DETEKTION VON GAPDH IN PROTEINEXTRAKTEN..... 83
<b>ABBILDUNG 23:</b> WESTERN BLOT NACH DETEKTION VON KU80 IN PROTEINEXTRAKTEN..... 84
<b>ABBILDUNG 24:</b> WESTERN BLOT NACH DETEKTION VON RAD51 IN PROTEINEXTRAKTEN ..... 85

### 6.3 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>Abema</b>	Abemaciclib
<b>ADI</b>	Arginindesaminase
<b>AHT</b>	Anhydrotetrazyklin
<b>AK</b>	Antikörper
<b>Aqua dest.</b>	Aqua destillata
<b>ASL</b>	Argininosuccinat-Lyase
<b>ASS1</b>	Argininosuccinat-Synthetase
<b>ATM Kinase</b>	Ataxia Telangiectasia Mutated Kinase
<b>CDK</b>	Cyclin-dependet-kinase (deutsch: Cyclin-abhängige-Kinasen)
<b>CDKi</b>	Cyclin-dependent-kinase-Inhibitoren
<b>CV</b>	Column Volumes (deutsch: Säulenvolumen)
<b>DAD</b>	Diode Array Detektor
<b>Dina</b>	Dinaciclib
<b>DNA</b>	Desoxyribonucleic acid (deutsch: Desocytiribonukleinsäure)
<b>DNA-PK</b>	DNA-abhängige Proteinkinase
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration (USA)
<b>FOMC</b>	9-Fluorenylmethyl Chloroformat
<b>GBM</b>	Glioblastoma multiforme
<b>HPLC</b>	High performance liquid chromatography

---

	(deutsch: Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
<b>MGMT</b>	O6-Methylguanin-DANN Methyltransferase
<b>NHEJ</b>	Non-homologous end joining (deutsch: nicht-homologer Endverknüpfung)
<b>NK-Zellen</b>	Natürliche Killerzellen
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid
<b>NSG Maus</b>	NOD scid gamma Maus
<b>OPA</b>	Ortho-Phthalaldehyd
<b>OCT</b>	Ornithin Carbomyltransferase
<b>PCA</b>	Perchloric acid (deutsch: Perchlorsäure)
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction (deutsch: Polymerasekettenreaktion)
<b>PEG</b>	Polyethlyenglykol
<b>Rb</b>	Retinoblastoma protein
<b><i>S. pyogenes</i></b>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<b>SDS PAGE</b>	Sodiumdodecylsulfat - Polyacrylamid Gel Elektrophorese
<b>SpyADI</b>	Arginindesaminase aus <i>Streptococcus pyogenes</i>
<b>SpyADI-PEG20</b>	Mit PEG 20 kDa pegylierte Arginindesaminase aus <i>S. pyogenes</i>
<b>TMZ</b>	Temozolomid
<b>TNBSA</b>	Trinitrobenzene sulphonic acid (deutsch: Trinitrobenzensulfonsäure)

---

## 6.4 TABELLENVERZEICHNIS

---

TABELLE 1: MATERIAL .....	10
TABELLE 2: GERÄTE .....	11
TABELLE 3: CHEMIKALIEN .....	12
TABELLE 4: LÖSUNGEN.....	14
TABELLE 5: NÄHRMEDIEN .....	16
TABELLE 6: ANTIBIOTIKA.....	16
TABELLE 7: ANTIKÖRPER .....	16
TABELLE 8: GBM ZELLEN.....	17
TABELLE 9: ZUSAMMENSETZUNG FÜR ZWEI SDS-GELE .....	24
TABELLE 10: BEHANDLUNGSSCHEMA .....	30
TABELLE 11: GRADIENTENPROGRAMM .....	33

---

**7. LITERATURVERZEICHNIS**

---

1. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, Deimling A v., Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016;131(6):803–20. doi:10.1007/s00401-016-1545-1 Cited in: PubMed; PMID 27157931.
  2. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, Hawkins C, Ng HK, Pfister SM, Reifenberger G, Soffietti R, Deimling A v., Ellison DW. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncology.* 2021;23(8):1231–51. doi:10.1093/neuonc/noab106 Cited in: PubMed; PMID 34185076.
  3. Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, Rowitch DH, Louis DN, Cavenee WK, DePinho RA. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev.* 2001;15(11):1311–33. doi:10.1101/gad.891601 Cited in: PubMed; PMID 11390353.
  4. Alifieris C, Trafalis DT. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacol Ther.* 2015;152(152):63–82. doi:10.1016/j.pharmthera.2015.05.005 Cited in: PubMed; PMID 25944528.
  5. Wrensch M, Minn Y, Chew T, Bondy M, Berger MS. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro-Oncology.* 2002;4(4):278–99. doi:10.1093/neuonc/4.4.278 Cited in: PubMed; PMID 12356358.
  6. Zhang J, Stevens MFG, Bradshaw TD. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Curr Mol Pharmacol.* 2012;5(1):102–14. doi:10.2174/1874467211205010102 Cited in: PubMed; PMID 22122467.
  7. Wank M, Schilling D, Schmid TE, Meyer B, Gempt J, Barz M, Schlegel J, Liesche F, Kessel KA, Wiestler B, Bette S, Zimmer C, Combs SE. Human Glioma Migration and Infiltration Properties as a Target for Personalized Radiation Medicine. *Cancers (Basel).* 2018;10(11):1–13. doi:10.3390/cancers10110456 Cited in: PubMed; PMID 30463322.
  8. Szeffel J, Danielak A, Kruszewski WJ. Metabolic pathways of L-arginine and therapeutic consequences in tumors. *Adv Med Sci.* 2019;64(1):104–10. doi:10.1016/j.advms.2018.08.018 Cited in: PubMed; PMID 30605863.
-

9. Zou S, Wang X, Liu P, Ke C, Xu S. Arginine metabolism and deprivation in cancer therapy. *Biomed Pharmacother.* 2019;118(118):1–11. doi:10.1016/j.biopha.2019.109210 Cited in: PubMed; PMID 31330440.
10. Lind DS. Arginine and cancer. *J Nutr.* 2004;134(10):2837-2841. doi:10.1093/jn/134.10.2837S Cited in: PubMed; PMID 15465796.
11. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R. *Biochemie*. 4th ed. Georg Thieme Verlag KG. Stuttgart: Thieme; 2016. 879 p. (Duale Reihe). ger.
12. Gilroy E. The influence of arginine upon the growth rate of a transplantable tumour in the mouse. *Biochem J.* 1930;24(3):589–95. doi:10.1042/bj0240589. Cited in: PubMed; PMID 16744397.
13. Somasundaram V, Basudhar D, Bharadwaj G, No JH, Ridnour LA, Cheng RYS, Fujita M, Thomas DD, Anderson SK, McVicar DW, Wink DA. Molecular Mechanisms of Nitric Oxide in Cancer Progression, Signal Transduction, and Metabolism. *Antioxid Redox Signal.* 2019;30(8):1124–43. doi:10.1089/ars.2018.7527 Cited in: PubMed; PMID 29634348.
14. Potter M, Newport E, Morten KJ. The Warburg effect: 80 years on. *Biochem Soc Trans.* 2016;44(5):1499–505. doi:10.1042/BST20160094 Cited in: PubMed; PMID 27911732.
15. Long Y, Tsai W-B, Chang JT, Estecio M, Wangpaichitr M, Savaraj N, Feun LG, Chen HHW, Kuo MT. Cisplatin-induced synthetic lethality to arginine-starvation therapy by transcriptional suppression of ASS1 is regulated by DEC1, HIF-1 $\alpha$ , and c-Myc transcription network and is independent of ASS1 promoter DNA methylation. *Oncotarget.* 2016;7(50):82658–70. doi:10.18632/oncotarget.12308 Cited in: PubMed; PMID 27765932.
16. Riess C, Shokraie F, Classen CF, Kreikemeyer B, Fiedler T, Junghanss C, Maletzki C. Arginine-Depleting Enzymes - An Increasingly Recognized Treatment Strategy for Therapy-Refractory Malignancies. *Cell Physiol Biochem.* 2018;51(2):854–70. doi:10.1159/000495382 Cited in: PubMed; PMID 30466103.
17. Maletzki C, Rosche Y, Riess C, Scholz A, William D, Classen CF, Kreikemeyer B, Linnebacher M, Fiedler T. Deciphering molecular mechanisms of arginine deiminase-based therapy - Comparative response analysis in paired human

- primary and recurrent glioblastomas. *Chem Biol Interact.* 2017;278(278):179–88. doi:10.1016/j.cbi.2017.10.007 Cited in: PubMed; PMID 28989041.
18. Hinrichs CN, Ingargiola M, Käubler T, Löck S, Temme A, Köhn-Luque A, Deutsch A, Vovk O, Stasyk O, Kunz-Schughart LA. Arginine Deprivation Therapy: Putative Strategy to Eradicate Glioblastoma Cells by Radiosensitization. *Mol Cancer Ther.* 2018;17(2):393–406. doi:10.1158/1535-7163.MCT-16-0807 Cited in: PubMed; PMID 28830984.
19. Fiedler T, Strauss M, Hering S, Redanz U, William D, Rosche Y, Classen CF, Kreikemeyer B, Linnebacher M, Maletzki C. Arginine deprivation by arginine deiminase of *Streptococcus pyogenes* controls primary glioblastoma growth in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther.* 2015;16(7):1047–55. doi:10.1080/15384047.2015.1026478 Cited in: PubMed; PMID 25774632.
20. Simberkoff MS, Thorbecke GJ, Thomas L. Studies of PPLO infection. V. Inhibition of lymphocyte mitosis and antibody formation by mycoplasmal extracts. *J Exp Med.* 1969;129(6):1163–81. doi:10.1084/jem.129.6.1163 Cited in: PubMed; PMID 4306341.
21. Simberkoff MS, Thorbecke GJ, Thomas L. Studies of PPLO infection. V. Inhibition of lymphocyte mitosis and antibody formation by mycoplasmal extracts. *J Exp Med.* 1969;129(6):1163–81. doi:10.1084/jem.129.6.1163 Cited in: PubMed; PMID 4306341.
22. Han R-Z, Xu G-C, Dong J-J, Ni Y. Arginine deiminase: recent advances in discovery, crystal structure, and protein engineering for improved properties as an anti-tumor drug. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016;100(11):4747–60. doi:10.1007/s00253-016-7490-z Cited in: PubMed; PMID 27087524.
23. Abou-Alfa GK, Qin S, Ryou B-Y, Lu S-N, Yen C-J, Feng Y-H, Lim HY, Izzo F, Colombo M, Sarker D, Bolondi L, Vaccaro G, Harris WP, Chen Z, Hubner RA, Meyer T, Sun W, Harding JJ, Hollywood EM, Ma J, Wan PJ, Ly M, Bomalaski J, Johnston A, Lin C-C, Chao Y, Chen L-T. Phase III randomized study of second line ADI-PEG 20 plus best supportive care versus placebo plus best supportive care in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Ann Oncol.* 2018;29(6):1402–8. doi:10.1093/annonc/mdy101 Cited in: PubMed; PMID 29659672.
-

24. Escamilla-Ramírez A, Castillo-Rodríguez RA, Zavala-Vega S, Jimenez-Farfan D, Anaya-Rubio I, Briseño E, Palencia G, Guevara P, Cruz-Salgado A, Sotelo J, Trejo-Solís C. Autophagy as a Potential Therapy for Malignant Glioma. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2020;13(7):1–76. doi:10.3390/ph13070156 Cited in: PubMed; PMID 32707662.
25. De Duve C. The lysosome. *Sci Am*. 1963;208(208):64–72. doi:10.1038/scientificamerican0563-64 Cited in: PubMed; PMID 14025755.
26. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev*. 2007;21(22):2861–73. doi:10.1101/gad.1599207 Cited in: PubMed; PMID 18006683.
27. Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Dev*. 2010;24(22):2463–79. doi:10.1101/gad.1971610 Cited in: PubMed; PMID 21078816.
28. Roberts MJ, Bentley MD, Harris JM. Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012;64(64):116–27. doi:10.1016/j.addr.2012.09.025
29. Harris JM, Martin NE, Modi M. Pegylation: a novel process for modifying pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet*. 2001;40(7):539–51. doi:10.2165/00003088-200140070-00005 Cited in: PubMed; PMID 11510630.
30. Holtsberg FW, Ensor CM, Steiner MR, Bomalaski JS, Clark MA. Poly(ethylene glycol) (PEG) conjugated arginine deiminase: effects of PEG formulations on its pharmacological properties. *Journal of Controlled Release*. 2002;80(1-3):259–71. doi:10.1016/s0168-3659(02)00042-1
31. Bailon P, Won C-Y. PEG-modified biopharmaceuticals. *Expert Opin Drug Deliv*. 2009;6(1):1–16. doi:10.1517/17425240802650568 Cited in: PubMed; PMID 19236204.
32. Irscher N. Stressantwort von Glioblastoma multiforme nach ADI-basierten Argininenzug [Masterarbeit]. Rostock: Universität Rostock; 2019. 98 p.

33. Hatakeyama H, Akita H, Harashima H. A multifunctional envelope type nano device (MEND) for gene delivery to tumours based on the EPR effect: a strategy for overcoming the PEG dilemma. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2011;63(3):152–60. doi:10.1016/j.addr.2010.09.001 Cited in: PubMed; PMID 20840859.
34. Besson A, Dowdy SF, Roberts JM. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell*. 2008;14(2):159–69. doi:10.1016/j.devcel.2008.01.013 Cited in: PubMed; PMID 18267085.
35. Ding L, Cao J, Lin W, Chen H, Xiong X, Ao H, Yu M, Lin J, Cui Q. The Roles of Cyclin-Dependent Kinases in Cell-Cycle Progression and Therapeutic Strategies in Human Breast Cancer. *Int J Mol Sci*. 2020;21(6):1–28. doi:10.3390/ijms21061960 Cited in: PubMed; PMID 32183020.
36. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(3):153–66. doi:10.1038/nrc2602 Cited in: PubMed; PMID 19238148.
37. Riess C, Irscher N, Salewski I, Strüder D, Classen C-F, Große-Thie C, Jung-hanss C, Maletzki C. Cyclin-dependent kinase inhibitors in head and neck cancer and glioblastoma-backbone or add-on in immune-oncology? *Cancer Metastasis Rev*. 2021;40(1):153–71. doi:10.1007/s10555-020-09940-4 Cited in: PubMed; PMID 33161487.
38. Kim ES. Abemaciclib: First Global Approval. *Drugs*. 2017;77(18):2063–70. doi:10.1007/s40265-017-0840-z Cited in: PubMed; PMID 29128965.
39. Preusser M, Ribaupierre S de, Wöhrer A, Erridge SC, Hegi M, Weller M, Stupp R. Current concepts and management of glioblastoma. *Ann Neurol*. 2011;70(1):9–21. doi:10.1002/ana.22425 Cited in: PubMed; PMID 21786296.
40. Wick W. et al. Gliome, S2k-Leitlinie, 2021: Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie [Internet]. 2021; [78 p.]. Available from: [www.dgn.org/leitlinien](http://www.dgn.org/leitlinien)
41. Hering S. Charakterisierung der Arginin Deiminase von *Streptococcus pyogenes* M49 und deren potentielle Anwendung in der Charakterisierung der Arginin Deiminase von *Streptococcus pyogenes* M49 und deren potentielle Anwendung in der Tumorthherapie [Dissertation]. Rostock: Universität Rostock; 2014. 133 p.

42. Hasgur S, Aryee KE, Shultz LD, Greiner DL, Brehm MA. Generation of Immunodeficient Mice Bearing Human Immune Systems by the Engraftment of Hematopoietic Stem Cells. *Methods Mol Biol.* 2016;1438(1438):67–78. doi:10.1007/978-1-4939-3661-8\_4 Cited in: PubMed; PMID 27150084.
43. Maletzki C, Bock S, Fruh P, Macius K, Witt A, Prall F, Linnebacher M. NSG mice as hosts for oncological precision medicine. *Lab Invest.* 2020;100(1):27–37. doi:10.1038/s41374-019-0298-6
44. IBA, editor. *Expression and Purification of proteins using Strep-Tactin - A comprehensive manual*; 2017. 33 p.
45. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 1976;72(72):248–54. doi:10.1006/abio.1976.9999 Cited in: PubMed; PMID 942051.
46. Abuchowski A, van Es T, Palczuk NC, Davis FF. Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. *Journal of Biological Chemistry.* 1977;252(11):3578–81. doi:10.1016/S0021-9258(17)40291-2
47. Volkmar K. PEGylation of *S. pyogenes* ADI and its effect on the vitality and phenotype of Glioblastoma multiforme cell lines [Masterarbeit]. Rostock: Universität Rostock; 2019. 81 p.
48. Clarke AP, Jandik P, Rocklin RD, Liu Y, Avdalovic N. An Integrated Amperometry Waveform for the Direct, Sensitive Detection of Amino Acids and Amino Sugars Following Anion-Exchange Chromatography. *Anal. Chem.* 1999;71(14):2774–81. doi:10.1021/ac9811524
49. Thermo Scientific, editor. *TNBSA (2,4,6-Trinitrobenzene Sulfonic Acid) Product Instructions*; 2008. 2 p.
50. Agilent, editor. *Amino Acid Analysis How-To Guide*; 2018. 21 p.
51. Shokraie F, Riess C, Fiedler T, Schneider B, Classen CF, Maletzki C. Arg- auxotrophic patient-derived Glioblastoma multiforme cell lines show increased sensitivity towards doxycycline-induced growth inhibition. *Neuro-Oncology.* 2018;20(2):95-96. doi:10.1093/neuonc/noy059.304

52. Syed N, Langer J, Janczar K, Singh P, Lo Nigro C, Lattanzio L, Coley HM, Hatzimichael E, Bomalaski J, Szlosarek P, Awad M, O'Neil K, Roncaroli F, Crook T. Epigenetic status of argininosuccinate synthetase and argininosuccinate lyase modulates autophagy and cell death in glioblastoma. *Cell Death Dis.* 2013;4(4):1–11. doi:10.1038/cddis.2012.197 Cited in: PubMed; PMID 23328665.
  53. Kaur E, Nair J, Ghorai A, Mishra SV, Achareker A, Ketkar M, Sarkar D, Salunkhe S, Rajendra J, Gardi N, Desai S, Iyer P, Thorat R, Dutt A, Moiyadi A, Dutt S. Inhibition of SETMAR-H3K36me2-NHEJ repair axis in residual disease cells prevents glioblastoma recurrence. *Neuro-Oncology.* 2020;22(12):1785–96. doi:10.1093/neuonc/noaa128 Cited in: PubMed; PMID 32458986.
  54. Nemoz C, Ropars V, Frit P, Gontier A, Drevet P, Yu J, Guerois R, Pitois A, Comte A, Delteil C, Barboule N, Legrand P, Baconnais S, Yin Y, Tadi S, Barbet-Massin E, Berger I, Le Cam E, Modesti M, Rothenberg E, Calsou P, Charbonnier JB. XLF and APLF bind Ku80 at two remote sites to ensure DNA repair by non-homologous end joining. *Nat Struct Mol Biol.* 2018;25(10):971–80. doi:10.1038/s41594-018-0133-6 Cited in: PubMed; PMID 30291363.
  55. Baumann P, West SC. Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double-stranded-break repair. *Trends in Biochemical Sciences.* 1998;23(7):247–51. doi:10.1016/s0968-0004(98)01232-8
  56. Mariotti LG, Pirovano G, Savage KI, Ghita M, Ottolenghi A, Prise KM, Schettino G. Use of the  $\gamma$ -H2AX assay to investigate DNA repair dynamics following multiple radiation exposures. *PLoS One.* 2013;8(11):1-12. doi:10.1371/journal.pone.0079541 Cited in: PubMed; PMID 24312182.
  57. Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem.* 2001;276(45):42462–7. doi:10.1074/jbc.C100466200 Cited in: PubMed; PMID 11571274.
  58. Cao Y, Li X, Kong S, Shang S, Qi Y. CDK4/6 inhibition suppresses tumour growth and enhances the effect of temozolomide in glioma cells. *J Cell Mol Med.* 2020;24(9):5135–45. doi:10.1111/jcmm.15156 Cited in: PubMed; PMID 32277580.
-

59. Krakstad C, Chekenya M. Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. *Mol Cancer*. 2010;9(9):1–14. doi:10.1186/1476-4598-9-135 Cited in: PubMed; PMID 20515495.
  60. Schellekens H, Hennink WE, Brinks V. The immunogenicity of polyethylene glycol: facts and fiction. *Pharm Res*. 2013;30(7):1729–34. doi:10.1007/s11095-013-1067-7 Cited in: PubMed; PMID 23673554.
  61. Mozar FS, Chowdhury EH. Impact of PEGylated Nanoparticles on Tumor Targeted Drug Delivery. *Curr Pharm Des*. 2018;24(28):3283–96. doi:10.2174/1381612824666180730161721 Cited in: PubMed; PMID 30062957.
  62. Veronese FM. Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions. *Biomaterials*. 2001;22(5):405–17. doi:10.1016/s0142-9612(00)00193-9 Cited in: PubMed; PMID 11214751.
  63. Gao A, Yang X, Zhang C, Long G, Pu J, Yuan Y, Liu H, Li Y, Liao F. Facile spectrophotometric assay of molar equivalents of N-hydroxysuccinimide esters of monomethoxyl poly-(ethylene glycol) derivatives. *Chem Cent J*. 2012;6(1):1–9. doi:10.1186/1752-153X-6-142 Cited in: PubMed; PMID 23176729.
  64. Hermanson GT. PEGylation and Synthetic Polymer Modification. In: *Bioconjugate Techniques*: Elsevier; 2013. p. 787–838.
  65. Schwarz R, Zitzow E, Fiebig A, Hering S, Humboldt Y, Schoenwaelder N, Kämpfer N, Volkmar K, Hinz B, Kreikemeyer B, Maletzki C, Fiedler T. PEGylation increases antitumoral activity of arginine deiminase of *Streptococcus pyogenes*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2022;106(1):261–71. doi:10.1007/s00253-021-11728-7 Cited in: PubMed; PMID 34910240.
  66. Hatoum A, Mohammed R, Zakieh O. The unique invasiveness of glioblastoma and possible drug targets on extracellular matrix. *Cancer Manag Res*. 2019;11(11):1843–55. doi:10.2147/CMAR.S186142 Cited in: PubMed; PMID 30881112.
  67. Zhang X, Wang H, Ma Z, Wu B. Effects of pharmaceutical PEGylation on drug metabolism and its clinical concerns. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2014;10(12):1691–702. doi:10.1517/17425255.2014.967679 Cited in: PubMed; PMID 25270687.
-

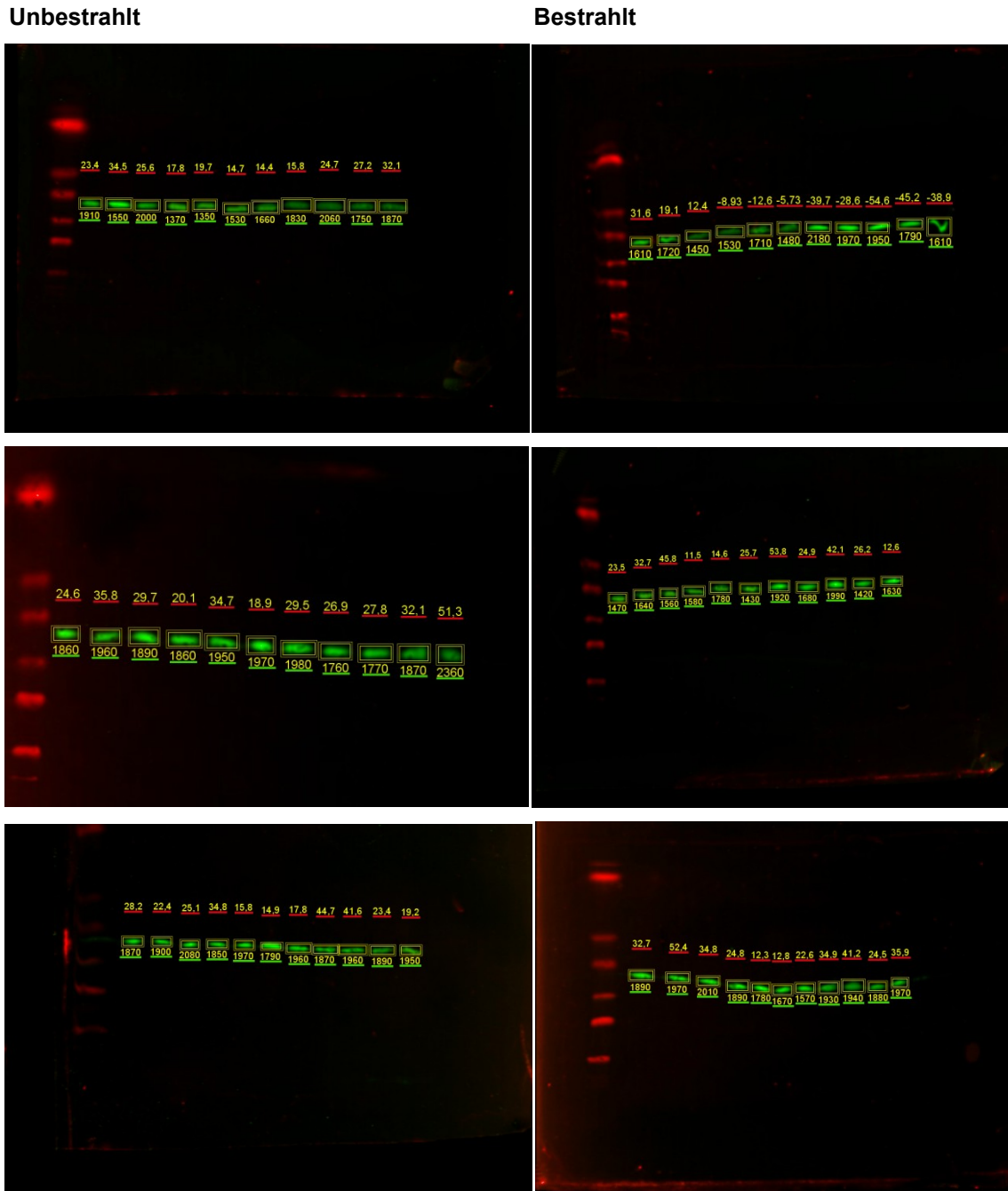
68. Ruiz-Garcia A, Bermejo M, Moss A, Casabo VG. Pharmacokinetics in drug discovery. *J Pharm Sci.* 2008;97(2):654–90. doi:10.1002/jps.21009 Cited in: PubMed; PMID 17630642.
69. Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Menzel S, Ruth P. *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie, der klinischen Pharmakologie und Toxikologie: mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie.* 10th ed. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart. Stuttgart: WVG Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 2013. 1197 p. ger.
70. Mathaes R, Winter G, Besheer A, Engert J. Influence of particle geometry and PEGylation on phagocytosis of particulate carriers. *Int J Pharm.* 2014;465(1-2):159–64. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.02.037 Cited in: PubMed; PMID 24560647.
71. Owens DE, Peppas NA. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm.* 2006;307(1):93–102. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.10.010 Cited in: PubMed; PMID 16303268.
72. Kaminskis LM, Boyd BJ, Karellas P, Krippner GY, Lessene R, Kelly B, Porter CJH. The impact of molecular weight and PEG chain length on the systemic pharmacokinetics of PEGylated poly L-lysine dendrimers. *Mol Pharm.* 2008;5(3):449–63. doi:10.1021/mp7001208 Cited in: PubMed; PMID 18393438.
73. Lee H. Molecular Simulations of PEGylated Biomolecules, Liposomes, and Nanoparticles for Drug Delivery Applications. *Pharmaceutics.* 2020;12(6):1–23. doi:10.3390/pharmaceutics12060533 Cited in: PubMed; PMID 32531886.
74. Bailon P, Won C-Y. PEG-modified biopharmaceuticals. *Expert Opin Drug Deliv.* 2009;6(1):1–16. doi:10.1517/17425240802650568 Cited in: PubMed; PMID 19236204.
75. Besheer A, Liebner R, Meyer M, Winter G. Challenges for PEGylated Proteins and Alternative Half-Life Extension Technologies Based on Biodegradable Polymers. In: Scholz C, Kressler J, editors. *Tailored Polymer Architectures for Pharmaceutical and Biomedical Applications.* Washington, DC: American Chemical Society; 2013. p. 215–33. (ACS Symposium Series; vol. 1135).

76. Venkatachalam MA, Rennke HG. The structural and molecular basis of glomerular filtration. *Circ Res.* 1978;43(3):337–47. doi:10.1161/01.res.43.3.337 Cited in: PubMed; PMID 354819.
77. Gref R, Domb A, Quellec P, Blunk T, Müller RH, Verbavatz JM, Langer R. The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 1995;16(2-3):215–33. doi:10.1016/0169-409X(95)00026-4 Cited in: PubMed; PMID 25170183.
78. Lubanska D, Porter L. Revisiting CDK Inhibitors for Treatment of Glioblastoma Multiforme. *Drugs R D.* 2017;17(2):255–63. doi:10.1007/s40268-017-0180-1 Cited in: PubMed; PMID 28324583.
79. Parry D, Guzi T, Shanahan F, Davis N, Prabhavalkar D, Wiswell D, Seghezzi W, Paruch K, Dwyer MP, Doll R, Nomeir A, Windsor W, Fischmann T, Wang Y, Oft M, Chen T, Kirschmeier P, Lees EM. Dinaciclib (SCH 727965), a novel and potent cyclin-dependent kinase inhibitor. *Mol Cancer Ther.* 2010;9(8):2344–53. doi:10.1158/1535-7163.MCT-10-0324 Cited in: PubMed; PMID 20663931.
80. Riess C, Classen CF, Maletzki C. HGG-07. Cyclin-Dependent Kinases as Target Structures for Cancer Therapy – a comparative in vitro analysis on patient-derived Glioblastoma Cell culture models. *Neuro-Oncology.* 2020;22(3):345-345. doi:10.1093/neuonc/noaa222.298 Cited in: PubMed; PMID 33723248.
81. 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;7(1):1–15. doi:10.1038/s41420-021-00423-1 Cited in: PubMed; PMID 33723248.
82. Juric V, Murphy B. Cyclin-dependent kinase inhibitors in brain cancer: current state and future directions. *CDR.* 2020;3(3):48–62. doi:10.20517/cdr.2019.105
83. 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 HN, Engel N, Classen CF, Maletzki C. HGG-13. Combined CDK inhibition and arginine-deprivation as targeted therapy for arginine-auxotrophic glioblastoma multiforme cells. *Neuro-Oncology.* 2022;24(Supplement\_1):i62-i63. doi:10.1093/neuonc/noac079.228

84. 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;23(1):38. doi:10.1186/s12935-023-02873-2 Cited in: PubMed; PMID 36843002.
  85. Yao KC, Komata T, Kondo Y, Kanzawa T, Kondo S, Germano IM. Molecular response of human glioblastoma multiforme cells to ionizing radiation: cell cycle arrest, modulation of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, and autophagy. *J Neurosurg.* 2003;98(2):378–84. doi:10.3171/jns.2003.98.2.0378 Cited in: PubMed; PMID 12593626.
  86. Spath V. Der Einfluss der Kombinationstherapie von Arginin-Deiminase und CDK-Inhibitoren auf die Strahlensensibilität von Glioblastoma multiforme Zellen [Bachelorarbeit]. Rostock: Universität Rostock; 2020. 62 p.
  87. Hine CM, Seluanov A, Gorbunova V. Use of the Rad51 promoter for targeted anti-cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(52):20810–5. doi:10.1073/pnas.0807990106 Cited in: PubMed; PMID 19106292.
  88. Tachon G, Cortes U, Guichet P-O, Rivet P, Balbous A, Masliantsev K, Berger A, Boissonnade O, Wager M, Karayan-Tapon L. Cell Cycle Changes after Glioblastoma Stem Cell Irradiation: The Major Role of RAD51. *Int J Mol Sci.* 2018;19(10):1–14. doi:10.3390/ijms19103018 Cited in: PubMed; PMID 30282933.
  89. 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 HN, 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;13(6):555. doi:10.1038/s41419-022-05006-1 Cited in: PubMed; PMID 35717443.
  90. Balbous A, Cortes U, Guilloteau K, Rivet P, Pinel B, Duchesne M, Godet J, Boissonnade O, Wager M, Bensadoun RJ, Chomel J-C, Karayan-Tapon L. A radiosensitizing effect of RAD51 inhibition in glioblastoma stem-like cells. *BMC Cancer.* 2016;16(16):1–13. doi:10.1186/s12885-016-2647-9 Cited in: PubMed; PMID 27495836.
-

91. King HO, Brend T, Payne HL, Wright A, Ward TA, Patel K, Egnuni T, Stead LF, Patel A, Wurdak H, Short SC. RAD51 Is a Selective DNA Repair Target to Radiosensitize Glioma Stem Cells. *Stem Cell Reports*. 2017;8(1):125–39. doi:10.1016/j.stemcr.2016.12.005 Cited in: PubMed; PMID 28076755.

8. ANHANG



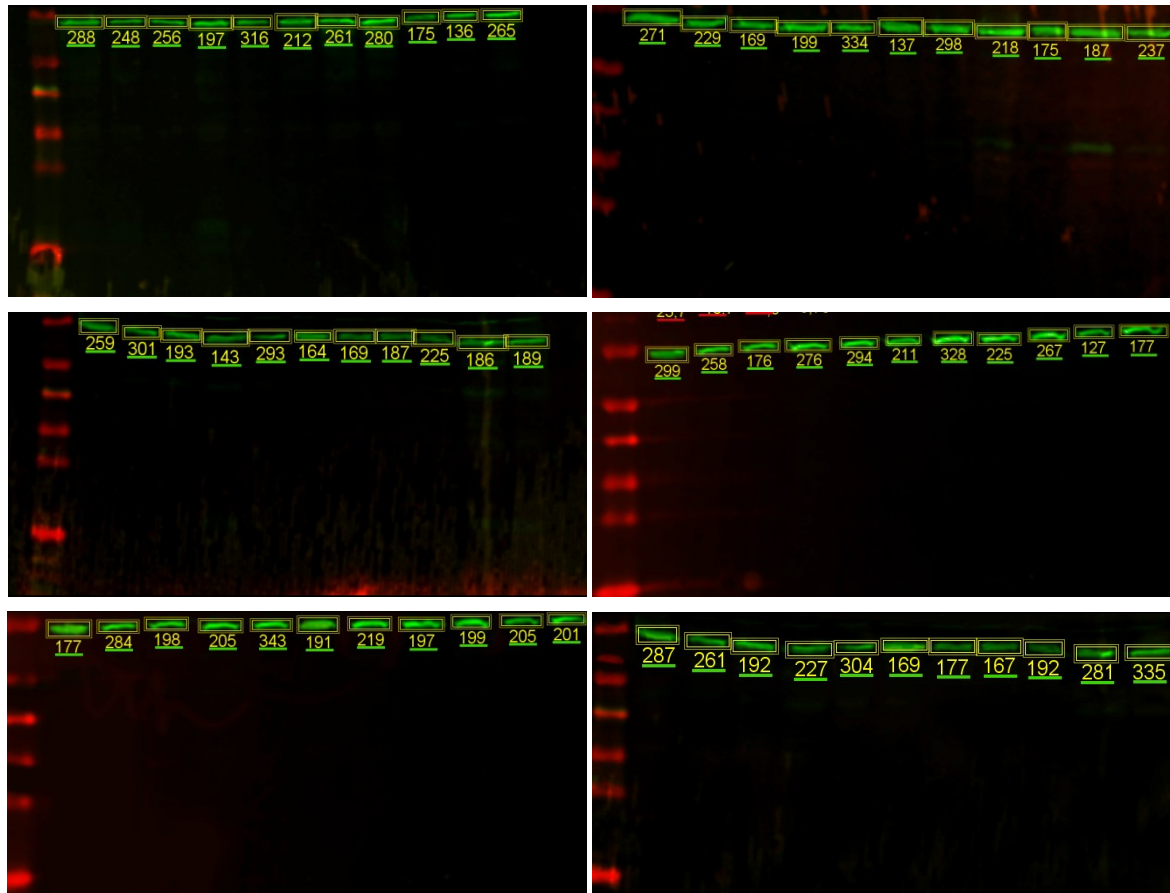
**ABBILDUNG 22: WESTERN BLOT NACH DETEKTION VON GAPDH IN PROTEINEXTRAKTEN**

(20 µg Protein) von mit den entsprechend behandelten und unbestrahlten bzw. anschließend mit 2 Gy bestrahlten HROG63 Zellen im 1.-3. Versuchsdurchlauf. 1. ADI, 2. Dina, 3. Abema, 4. TMZ, 5. ADI / Dina, 6. ADI / Abema, 7.

ADI / TMZ, 8. Dina / ADI, 9. Abema / ADI, 10. TMZ / ADI, 11. DMSO

Unbestrahlt

Bestrahlt



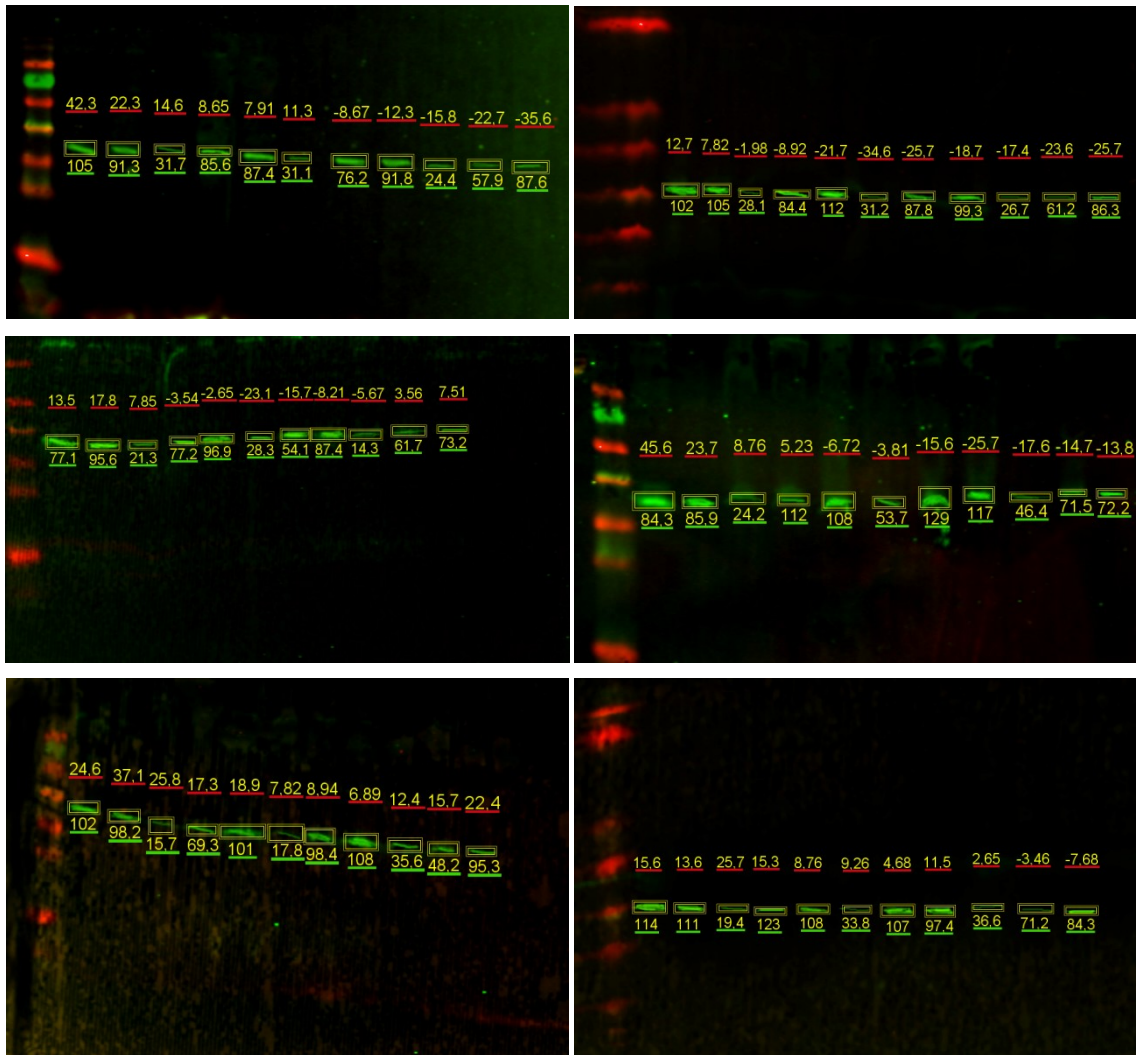
**ABBILDUNG 23: WESTERN BLOT NACH DETEKTION VON KU80 IN PROTEINEXTRAKTEN**

(20 µg Protein) von mit den entsprechend behandelten und unbestrahlten bzw. anschließend mit 2 Gy bestrahlten HROG63 Zellen im 1./2. Versuchsdurchlauf. 1. ADI, 2. Dina, 3. Abema, 4. TMZ, 5. ADI / Dina, 6. ADI / Abema, 7.

ADI / TMZ, 8. Dina / ADI, 9. Abema / ADI, 10. TMZ / ADI, 11. DMSO

Unbestrahlt

Bestrahlt



**ABBILDUNG 24: WESTERN BLOT NACH DETEKTION VON RAD51 IN PROTEINEXTRAKTEN**

(20 µg Protein) von mit den entsprechend behandelten und unbestrahlten bzw. anschließend mit 2 Gy bestrahlten HROG63 Zellen im 1./2. Versuchsdurchlauf. 1. ADI, 2. Dina, 3. Abema, 4. TMZ, 5. ADI + Dina, 6. ADI / Abema, 7.

ADI / TMZ, 8. Dina / ADI, 9. Abema / ADI, 10. TMZ / ADI, 11. DMSO

## **10. DANKSAGUNG**

---

Ich möchte mich bei Tomas und Claudia bedanken, die es mir möglich gemacht haben, an diesem spannenden Thema zu arbeiten und mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Ebenfalls gilt mein Dank dem Laborteam der Mikrobiologie Uni Rostock, insbesondere Yvonne und Eric, die auch die letzten Hindernisse an der HPLC überwunden habe.

Des Weiteren möchte ich mich bei Rico bedanken. Ohne ihn wären Experimente, für die ich aufgereinigte ADI brauchte, vermutlich nicht möglich gewesen.

Und meinen Dank für ihre Unterstützung bei der Zellkulturarbeit möchte ich auch Christin aussprechen.

Außerdem will ich noch Philip erwähnen, der als Laborbanknachbar ebenfalls immer einen guten Ratschlag parat hatte.

Und nicht zuletzt danke ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meiner Schwester, sowie Freundinnen und Freunde, auf deren Unterstützung ich immer zählen konnte.

**11. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG**

---

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Rostock

\_\_\_\_\_  
(Abgabedatum)

\_\_\_\_\_  
(Vollständige Unterschrift)