

Aus der
Klinik für Neurochirurgie der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. V. Tronnier

Effekte von Chloroquin auf stammzellähnliche Gliomzellen aus
Glioblastomen und Gliosarkomen
in An- und Abwesenheit von Temozolomid

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Sektion Medizin -

vorgelegt von
Anna Maria Limpert

Lübeck, 2017

1. Berichterstatterin: PD Dr. rer. nat. et med. habil. Christina Zechel
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jan Rupp
Tag der mündlichen Prüfung: 12.06.2018
zum Druck genehmigt. Lübeck, den 12.06.2018

Promotionskommission der Sektion Medizin

Zusammenfassung

Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist der häufigste maligne primäre Tumor des Zentralen Nervensystems. Wie das Gliosarkom (GSarc) weist das GBM trotz einer multimodalen Therapie aus chirurgischer Resektion und adjuvanter Strahlen- und Chemotherapie eine infauste Prognose auf. Eine Ursache für die Therapieresistenz des GBMs ist die Existenz von stammzellähnlichen Gliomzellen (SLGCs; *stem-like glioma cells*). Dies macht die Entwicklung neuer Therapiestrategien erforderlich. In dieser Arbeit wurde der Effekt des Malariamittels Chloroquin (CQ) auf SLGC-Linien in An- und Abwesenheit von Temozolomid (TMZ) untersucht. Dazu wurden in serumfreien Medium kultivierte SLGC-Linien aus humanen GBMs und GSarcs mit CQ und TMZ allein oder der Kombination TMZ/CQ behandelt. Die Effekte der Einfach und Doppelbehandlungen auf die Proliferation und Vitalität der SLGCs wurde mithilfe von Zellproliferations-, Vitalitäts- und Zytotoxizitätstests ermittelt. Es wurden weiterhin durchflusszytometrische Analysen durchgeführt, um Veränderungen des Zellzyklus zu prüfen. Parallel wurde die Expression der Zellzyklusregulatoren CDK4, CDK6, p21^{CIP1} und p27^{WAF1} mittels Western Blot Analyse bestimmt. Zusätzlich zu den *in vitro* Versuchen erfolgte die Überprüfung des Effektes von TMZ in An- und Abwesenheit von CQ in einem orthotopen Mausmodell. Es zeigte sich, dass CQ dosisabhängig die Proliferation und Vitalität aller SLGC-Linien senkte. Eine Abhängigkeit von der Behandlungszeit war nur teilweise feststellbar. Die CQ-Effekte auf Proliferation und Vitalität waren in An- und Abwesenheit des Lösungsmittels DMSO identisch. In Anwesenheit von DMSO kam es immer zu Erhöhungen der LDH-Freisetzung, allerdings wurden in Abwesenheit von DMSO in 3 von 5 SLGC-Linien Reduktionen der LDH-Freisetzung durch CQ beobachtet. CQ hatte in SLGC-Linien keinen Effekt auf die Verteilung der Zellen im Zellzyklus, während in der etablierten Zelllinie U87MG ein G1-Arrest durch CQ induziert wurde. Die CQ/TMZ-Doppelbehandlung führte in allen SLGC-Linien zu einer Senkung von Proliferation und Vitalität sowie zu einer Zunahme der LDH-Freisetzung. Dabei war der Effekt in 7 von 10 Zelllinien durch CQ bedingt; in 3 SLGC-Linien konnte eine Sensibilisierung des TMZ-Effektes durch CQ beobachtet werden. Im Tiermodell wurden eine GBM- und eine GSarc-Linie getestet, die in SCID-Mäusen effizient und reproduzierbar orthotope Tumore generierten. Die Behandlung war mit Komplikationen assoziiert, wobei vor allem intrazerebrale Entzündungen bei Implantation der Alzet-Pumpen auftraten. Daher lassen sich keine validen Aussagen hinsichtlich des *in vivo* Effektes von CQ in Anwesenheit von TMZ machen. Abschließend kann geschlussfolgert werden, dass CQ allein bereits ein effizientes Reagenz ist, um die Proliferation und Vitalität von SLGC-Linien zu senken. Außerdem steigert CQ in einigen SLGC-Linien die Wirkung von TMZ, sodass CQ in einer Untergruppe von malignen Gliomen therapeutisch als Chemosensibilisator eingesetzt werden könnte.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung	1
1.1 Tumore des Zentralen Nervensystems.....	1
1.2 Das Glioblastoma multiforme.....	2
1.3 Therapie des Glioblastoma multiforme.....	6
1.4 Temozolomid und Resistenzmechanismen	8
1.5 Gliomstammzellen.....	10
1.6 Chloroquin in der Therapie des GBM	13
1.7 Das Gliom im Mausmodell	15
1.8 Fragestellung	17
2 Material und Methoden	19
2.1 Material	19
2.1.1 Tumormaterial und Mausmodell	19
2.1.2 Zelllinien und Zellkulturmedien	19
2.1.3 (Bio)Chemikalien, Wachstumsfaktoren, Puffer und Lösungen	22
2.1.4 Antikörper	24
2.1.5 Osmotische Pumpen	25
2.1.6 Weiteres Material	25
2.2 Methoden.....	26
2.2.1 Zellkultur	26
2.2.2 BrdU-ELISA	27
2.2.3 MTT-Test	28
2.2.4 Zytotoxizitätstest.....	29
2.2.5 Proteinextraktion und Western Blot Analyse	29
2.2.6 Durchflusszytometrische Analyse	31
2.2.7 Xenotransplantation von SLGCs und TMZ/CQ-Doppelbehandlung ...	32
2.2.8 Histologische Methoden	34
2.2.9 Auswertung und Statistik	36
3 Ergebnisse	38
3.1 Effekte von Chloroquin in Einfach- und Doppelbehandlungen.....	38
3.1.1 Chloroquin-Einfachbehandlung	38
3.1.2 Chloroquin-Behandlung in Anwesenheit von DMSO	45
3.1.3 TMZ und CQ Doppelbehandlung.....	52
3.2 Zellzyklusanalyse selektierter SLGC-Linien	64
3.2.1 Verteilung der Zellen im Zellzyklus	64
3.2.2 Expression der Zellzyklusregulatoren CDK4/6, p21 ^{CIP1} und p27 ^{WAF1} ..	68

3.3	TMZ und CQ im Mausmodell.....	77
4	Diskussion	84
4.1	In vitro Responsivität.....	85
4.1.1	CQ reduziert dosisabhängig die Proliferation von SLGCs.....	85
4.1.2	CQ reduziert dosisabhängig die Vitalität von SLGCs	89
4.1.3	CQ als möglicher Chemosensibilisator für die TMZ-Behandlung.....	91
4.2	In vivo GBM-Modell.....	97
4.3	Konklusion und Ausblick.....	100
	Anhang	102
	Literaturverzeichnis.....	120
	Danksagungen.....	137
	Lebenslauf	138
	Eidesstattliche Erklärung.....	139

Abkürzungsverzeichnis

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
BE	Belgien
BrdU-ELISA	<i>5-bromo-2'-deoxyuridine-enzyme-linked immunosorbent assay</i>
CDK2NA	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
CDK4	<i>cyclin-dependent kinase 4</i>
CDK6	<i>cyclin-dependent kinase 6</i>
CH	Schweiz
CQ	Chloroquin
CSC	<i>cancer stem cell</i>
D	Deutschland
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF(R)	<i>epidermal growth factor (receptor)</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
GBM	Glioblastoma multiforme
GSarc	Gliosarkom
HE	Hämatoxylin-Eosin
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
LDH	Laktat-Dehydrogenase
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NF1	Neurofibromin 1
NSC	<i>neural stem cell</i>
OD	Optische Dichte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PDGF(R)	<i>platelet-derived growth factor (receptor)</i>
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
pRB	Retinoblastoma-Genprodukt
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SLGC	<i>stem-like glioma cells</i>
SOX2	<i>sex determining region Y-box 2</i>
TMZ	Temozolomid
U87MG	<i>Uppsala 87 malignant glioma</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WCE	<i>whole cell protein extracts</i>

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: SLGC-Linien.....	20
Tab. 2: U87MG	20
Tab. 3: Zellkulturmedien	20
Tab. 4: Biochemikalien, Chemikalien, Wachstumsfaktoren.....	22
Tab. 5: Puffer und Lösungen	233
Tab. 6: Kits.....	24
Tab. 7: Primärantikörper	24
Tab. 8: Sekundärantikörper.....	24
Tab. 9: Zusammensetzung der SDS-PAGE Gele.....	30
Tab. 10: Programm des "ASP300 S Tissue Processor	34
Tab. 11: Entparaffinieren von Paraffinschnitten.....	35
Tab. 12: Dehydratation von Paraffinschnitten.....	35
Tab. 13: Veränderungen von Proliferation und Vitalität nach CQ-Behandlung.....	45
Tab. 14: Veränderungen von Proliferation und Vitalität nach CQ[+DMSO]-Behandlung	52
Tab. 15: Effekte von CQ und TMZ und CQ/TMZ auf Proliferation und Vitalität	64
Tab. 16: Effekte von CQ, TMZ und CQ/TMZ auf Verteilung der Zellen in Zellzyklusphasen	67
Tab. 17: Expression der CDK4 und CDK6 sowie MGMT und ABCG2 in SLGC-Linien	69
Tab. 18: Expression von p21 ^{CIP1} und p27 ^{WAF1} in SLGC-Linien.....	72
Tab. 19: Effekte von CQ, TMZ und CQ/TMZ auf die Expression von p21 ^{CIP1} und p27 ^{WAF1}	77
Tab. 20: Gewichtsverlauf und Versterben der SCID-Mäuse in den Versuchsgruppen	78
Tab. 21: Ergebnisse der HE- und IHC-Färbungen in den Versuchsgruppen	80
Tab. 22: Einfluss von CQ auf Proliferation und Expression von p21 ^{CIP1} und p27 ^{WAF1}	86
Tab. 23: Einfluss von CQ auf Vitalität und LDH-Freisetzung.....	89
Tab. 24: Einfach- bzw. Doppelbehandlung mit effektivster Wirkung auf SLGC-Linien	93
Tab. 25: T-Test Analysen der CQ-Dosissteigerung in der SLGC-Linie T1338	102
Tab. 26: T-Test Analysen der CQ-Dosissteigerung in der SLGC-Linie T1389	103
Tab. 27: T-Test Analysen der CQ-Dosissteigerung in der SLGC-Linie T1440	104
Tab. 28: T-Test Analysen der CQ-Dosissteigerung in der SLGC-Linie T1447	104
Tab. 29: T-Test Analysen der CQ-Dosissteigerung in der SLGC-Linie T1495	105
Tab. 30: T-Test Analysen der CQ-Dosissteigerung in der SLGC-Linie T1522 [DMSO].....	106
Tab. 31: T-Test Analysen der CQ-Dosissteigerung in der SLGC-Linie T1524 [DMSO].....	106
Tab. 32: T-Test Analysen der CQ-Dosissteigerung in der SLGC-Linie T1549 [DMSO].....	107
Tab. 33: T-Test Analysen der CQ-Dosissteigerung in der SLGC-Linie T1556 [DMSO].....	108
Tab. 34: T-Test Analysen der CQ-Dosissteigerung in der SLGC-Linie T1564 [DMSO].....	108
Tab. 35: T-Test Analysen der CQ-Dosissteigerung in der SLGC-Linie T1522 [TMZ].....	109
Tab. 36: T-Test Analysen der CQ-Dosissteigerung in der SLGC-Linie T1524 [TMZ].....	1100
Tab. 37: T-Test Analysen der CQ-Dosissteigerung in der SLGC-Linie T1549 [TMZ].....	111
Tab. 38: T-Test Analysen der CQ-Dosissteigerung in der SLGC-Linie T1556 [TMZ].....	112
Tab. 39: T-Test Analysen der CQ-Dosissteigerung in der SLGC-Linie T1564 [TMZ].....	113
Tab. 40: T-Test Analysen des CQ-Effekts in SLGC-Linien in An- und Abwesenheit von TMZ	114

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Genetische Ereignisse bei der Entstehung von Gliomen.....	5
Abb. 2: Effekt steigender CQ-Konzentrationen auf die Proliferation, Vitalität und LDH-Freisetzung der SLGC-Linie T1338 [ANOVA]	39
Abb. 3: Effekt steigender CQ-Konzentrationen auf die Proliferation, Vitalität und LDH-Freisetzung der SLGC-Linie T1389 [ANOVA]	40
Abb. 4: Effekt steigender CQ-Konzentrationen auf die Proliferation, Vitalität und LDH-Freisetzung der SLGC-Linie T1440 [ANOVA]	41
Abb. 5: Effekt steigender CQ-Konzentrationen auf die Proliferation, Vitalität und LDH-Freisetzung der SLGC-Linie T1447 [ANOVA]	42
Abb. 6: Effekt steigender CQ-Konzentrationen auf die Proliferation, Vitalität und LDH-Freisetzung der SLGC-Linie T1495 [ANOVA]	44
Abb. 7: Effekt steigender CQ-Konzentrationen auf die Proliferation, Vitalität und LDH-Freisetzung der SLGC-Linie T1522 in Anwesenheit von DMSO [ANOVA]	46
Abb. 8: Effekt steigender CQ-Konzentrationen auf die Proliferation, Vitalität und LDH-Freisetzung der SLGC-Linie T1524 in Anwesenheit von DMSO [ANOVA]	47
Abb. 9: Effekt steigender CQ-Konzentrationen auf die Proliferation, Vitalität und LDH-Freisetzung der SLGC-Linie T1549 in Anwesenheit von DMSO [ANOVA]	48
Abb. 10: Effekt steigender CQ-Konzentrationen auf die Proliferation, Vitalität und LDH-Freisetzung der SLGC-Linie T1556 in Anwesenheit von DMSO [ANOVA].....	49
Abb. 11: Effekt steigender CQ-Konzentrationen auf die Proliferation, Vitalität und LDH-Freisetzung der SLGC-Linie T1564 in Anwesenheit von DMSO [ANOVA]	50
Abb. 12: Effekt steigender CQ-Konzentrationen auf die Proliferation, Vitalität und LDH-Freisetzung der SLGC-Linie T1522 in Anwesenheit von TMZ [ANOVA].....	53
Abb. 13: Effekt steigender CQ-Konzentrationen auf die Proliferation, Vitalität und LDH-Freisetzung der SLGC-Linie T1524 in Anwesenheit von TMZ [ANOVA].....	55
Abb. 14: Effekt steigender CQ-Konzentrationen auf die Proliferation, Vitalität und LDH-Freisetzung der SLGC-Linie T1549 in Anwesenheit von TMZ [ANOVA].....	57
Abb. 15: Effekt steigender CQ-Konzentrationen auf die Proliferation, Vitalität und LDH-Freisetzung der SLGC-Linie T1556 in Anwesenheit von TMZ [ANOVA]	59
Abb. 16: Effekt steigender CQ-Konzentrationen auf die Proliferation, Vitalität und LDH-Freisetzung der SLGC-Linie T1564 in Anwesenheit von TMZ [ANOVA].....	61
Abb. 17: Durchflusszytometrische Analyse Propidiumiodid-markierter Zellen.....	65
Abb. 18: Expression von CDK4, CDK6, MGMT und ABCG2 in SLGC-Linien.....	68
Abb. 19: Relative Expression der CDK4 nach Behandlung mit TMZ und CQ.....	70
Abb. 20: Relative Expression der CDK6 nach Behandlung mit TMZ und CQ.....	71
Abb. 21: Relative Expression von p21 ^{CIP1} nach Behandlung mit TMZ und CQ.....	73
Abb. 22: Relative Expression von p27 ^{WAF1} nach Behandlung mit TMZ und CQ.....	75
Abb. 23: HE-Färbungen von xenotransplantierten Mausgehirnen.....	79
Abb. 24: HE-Färbung und immunhistologische Analyse von xenotransplantierten SCID-Maus Gehirnen (1).....	81

Abb. 25: HE-Färbung und immunhistologische Analyse von xenotransplantierten SCID-Maus Gehirnen (2).....	82
Abb. 26: HE-Färbung und immunhistologische Analyse von xenotransplantierten SCID-Maus Gehirnen (3).....	83
Abb. 27: Effekt steigender CQ-Konzentrationen auf die Proliferation, Vitalität und LDH-Freisetzung der SLGC-Linie T1338 [T-Test].....	102
Abb. 28: Effekt steigender CQ-Konzentrationen auf die Proliferation, Vitalität und LDH-Freisetzung der SLGC-Linie T1389 [T-Test].....	103
Abb. 29: Effekt steigender CQ-Konzentrationen auf die Proliferation, Vitalität und LDH-Freisetzung der SLGC-Linie T1440 [T-Test].....	103
Abb. 30: Effekt steigender CQ-Konzentrationen auf die Proliferation, Vitalität und LDH-Freisetzung der SLGC-Linie T1447 [T-Test].....	104
Abb. 31: Effekt steigender CQ-Konzentrationen auf die Proliferation, Vitalität und LDH-Freisetzung der SLGC-Linie T1495 [T-Test].....	105
Abb. 32: Effekt steigender CQ-Konzentrationen auf die Proliferation, Vitalität und LDH-Freisetzung der SLGC-Linie T1522 in Anwesenheit von DMSO [T-Test].....	105
Abb. 33: Effekt steigender CQ-Konzentrationen auf die Proliferation, Vitalität und LDH-Freisetzung der SLGC-Linie T1524 in Anwesenheit von DMSO [T-Test].....	106
Abb. 34: Effekt steigender CQ-Konzentrationen auf die Proliferation, Vitalität und LDH-Freisetzung der SLGC-Linie T1549 in Anwesenheit von DMSO [T-Test].....	107
Abb. 35: Effekt steigender CQ-Konzentrationen auf die Proliferation, Vitalität und LDH-Freisetzung der SLGC-Linie T1556 in Anwesenheit von DMSO [T-Test].....	107
Abb. 36: Effekt steigender CQ-Konzentrationen auf die Proliferation, Vitalität und LDH-Freisetzung der SLGC-Linie T1564 in Anwesenheit von DMSO [T-Test].....	108
Abb. 37: Effekt steigender CQ-Konzentrationen auf die Proliferation, Vitalität und LDH-Freisetzung der SLGC-Linie T1522 in Anwesenheit von TMZ [T-Test].....	109
Abb. 38: Effekt steigender CQ-Konzentrationen auf die Proliferation, Vitalität und LDH-Freisetzung der SLGC-Linie T1524 in Anwesenheit von TMZ [T-Test].....	110
Abb. 39: Effekt steigender CQ-Konzentrationen auf die Proliferation, Vitalität und LDH-Freisetzung der SLGC-Linie T1549 in Anwesenheit von TMZ [T-Test].....	111
Abb. 40: Effekt steigender CQ-Konzentrationen auf die Proliferation, Vitalität und LDH-Freisetzung der SLGC-Linie T1556 in Anwesenheit von TMZ [T-Test].....	112
Abb. 41: Effekt steigender CQ-Konzentrationen auf die Proliferation, Vitalität und LDH-Freisetzung der SLGC-Linie T1564 in Anwesenheit von TMZ [T-Test].....	113
Abb. 42: Vergleich des CQ-Effektes auf Proliferation, Vitalität und LDH-Freisetzung von SLGC-Linien in An- und Abwesenheit von TMZ [T-Test].....	114
Abb. 43: Punktwolkendiagramme von Durchflusszytometrischen Analysen	115
Abb. 44: Tumorigenität der SLGC-Linien T1447 und T1495.....	116
Abb. 45: Gewichtsentwicklung von SCID-Mäusen über den Behandlungszeitraum.....	117

1 Einleitung

Hanahan und Weinberg definierten folgende Merkmale als charakteristisch für Krebs bzw. Krebszellen: unbegrenztes Replikationspotential, anhaltende Angiogenese, Umgehen von Apoptose, Autonomie hinsichtlich von Wachstumssignalen, Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen sowie Invasivität und Metastasierung (Hanahan und Weinberg, 2000). Nach einer weiteren Dekade der Krebsforschung kamen zwei Merkmale dazu: der tumorspezifische Metabolismus und das Vermeiden der Eliminierung durch das Immunsystem (Hanahan und Weinberg, 2011). Diese Eigenschaften beinhalten komplexe zelluläre Interaktionen zwischen Tumor und Wirtsorganismus, welche nur durch *in vivo* Modelle dargestellt werden können (Huszthy et al., 2012). In dieser Arbeit wurde demzufolge die Wirkung von Temozolomid (TMZ) und Chloroquin (CQ) auf stammzellähnliche Gliomzellen *in vitro* (serumfreie Zellkulturen) sowie *in vivo* (Xenotransplantation-basiertes Mausmodell) untersucht.

1.1 Tumore des Zentralen Nervensystems

Tumore des Zentralen Nervensystems werden in primäre und sekundäre sowie in benigne und maligne Neoplasien unterteilt. Intrazerebrale Metastasen zählen zu den sekundären Neoplasien und stellen die häufigsten malignen Gehirntumore dar (Johnson und Young, 1996; Taphoorn et al., 2010). Die meisten primären Gehirntumore entstehen im neuroepithelialen Gewebe und werden nach der Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) von 2016 in diffuse Astrozytome und Oligodendrogliome, Ependymome und Tumore des Plexus Choroideus eingeteilt (Louis et al., 2016). Weitere Tumore werden unter dem Begriff der „anderen Astrozytome“ bzw. „anderen Gliome“ zusammengefasst. In der 2016 aktualisierten WHO-Klassifikation werden zusätzlich zur Histologie zum ersten Mal molekulare Parameter genutzt, um Tumorentitäten zu definieren. Demnach werden alle diffus wachsenden (sowohl astrozytäre als auch oligodendrogliale) Gliome basierend auf ihrem Wachstumsmuster und dem Vorhandensein von Isocitratdehydrogenase-1 oder -2 (*IDH1* bzw. *IDH2*) Mutanten in einer Gruppe zusammengefasst. Die Gruppe der diffus wachsenden Gliome umfasst Astrozytome des WHO-Grades II und III, Oligodendrogliome des WHO-Grades II und III sowie das Glioblastom. Dabei wird jeweils zwischen mutierten *IDH*-Status und Wildtyp-*IDH*-Status unterschieden. Die Neoplasien der WHO-Malignitätsgrade I bis IV unterscheiden sich in Präsenz und Häufigkeit von Kernatypien, der Proliferationsrate, der Vaskularisierung und dem Auftreten von Nekrosen (Brat und Van Meir, 2004; Norden und Wen, 2006; Van Meir et al., 2010). Zu den Tumoren der WHO-Grade I und II gehören niedrigmaligne Gliome wie das pilozytische Astrozytom und das diffuse Astrozytom. Das anaplastische Astrozytom und das hochmaligne Glioblastom zählen zu den Tumoren der WHO-Grade III und IV. Im Erwachsenenalter sind

mehr als die Hälfte der auftretenden Gliome hochmaligne (Norden und Wen, 2006). Pilozytische Astrozytome wachsen nicht-infiltrierend und sind aufgrund ihrer guten chirurgischen Resektabilität meist heilbar. Sie treten überwiegend im Kindesalter auf (Zacharoulis und Kieran, 2004). Diffuse Astrozytome sind gut differenzierte, langsam wachsende Tumore, welche zur diffusen Infiltration des Nachbarwebes tendieren. Sie neigen zu Rezidiven nach chirurgischer Resektion und entwickeln sich dann zu Gliomen der WHO-Grade III bzw. IV (Ohgaki und Kleihues, 2009). Anaplastische Astrozytome sind diffus infiltrierende Neoplasien, die fokale oder diffuse Kernatypien und eine gesteigerte Proliferationsrate aufweisen (Van Meir et al., 2010). Das Glioblastom ist zusätzlich durch das Auftreten von Nekrosen und mikrovaskulären Hyperplasien gekennzeichnet (Brat und Van Meir, 2004).

1.2 Das Glioblastoma multiforme

Das Glioblastoma multiforme (GBM) bildet mit 46,1 % den größten Anteil der primären malignen Gehirntumoren (Cerami et al., 2010; Ostrom et al., 2015; Stupp et al., 2005; The Cancer Genome Atlas, 2008). Die mittlere Überlebenszeit der GBM-Patienten liegt bei 14,6 Monaten unter Standardtherapie (Stupp et al., 2005). Damit gehören GBMs zu den soliden Tumoren mit der höchsten Morbidität und Mortalität im Erwachsenenalter.

Beim GBM wird eine primäre Form (90% der Fälle) von einer sekundären Form (10% der Fälle) unterschieden. Das primäre GBM entsteht *de novo*, das sekundäre GBM entsteht aus niedriggradigen Astrozytomen (Ohgaki und Kleihues, 2007). Das primäre GBM zeichnet sich durch einen *IDH*-Wildtyp-Status aus, wohingegen das sekundäre GBM ein mutiertes *IDH*-Gen aufweist (Louis et al., 2016). Auch klinisch zeigen sich Unterschiede zwischen primären und sekundären GBMs. So weisen Patienten mit sekundärem GBM ein jüngeres Erkrankungsalter auf (44 Jahre *versus* 62 Jahre beim primären GBM). Das Gesamtüberleben unter Standardtherapie dagegen ist bei Patienten mit sekundärem GBM länger (31 Monate *versus* 15 Monate) (Louis et al., 2016). Auf molekularer Ebene zeichnen sich primäre GBMs durch Amplifikationen des *Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)*-Gen (35%) und durch Mutationen im *Phosphatase and Tensin homolog (PTEN)*-Tumorsuppressor-Gen (24%) aus, wohingegen sekundäre GBMs häufiger Mutationen im *TP53*-Tumorsuppressor-Gen aufweisen (81% *versus* 27%) (Louis et al., 2016; Ohgaki et al., 2004).

Ein weiterer hochmaligner primärer Gehirntumor ist das Gliosarkom (GSarc), welches laut WHO als gut umschriebene Läsion mit gliomatösen und sarkomatösen Anteilen definiert ist (Louis et al., 2016). Die sarkomatösen Anteile können ihren Ursprung in fibroblastären, kartilaginösen, ossären, muskulären oder adipösen Zellen haben (Han et al., 2010). Aus diesem Grund betrachten einige Forscher das GSarc als eigene Tumorentität, während andere von einer GBM-Variante sprechen (Han et al., 2010). GSarcs sind seltener als GBMs (1 - 8% *versus* 55,1% der Gliome). Beide Malignome treten primär im späteren

Lebensalter (ab 60 Jahre) auf und betreffen häufiger Männer als Frauen (60% *versus* 40%) (Chang et al., 2005; Kozak et al., 2009). Die Prognose des GSarc ist etwas schlechter als die des GBMs; die mittlere Überlebenszeit von GSarc-Patienten liegt bei 8 Monaten (*versus* 9 Monate beim GBM) (Kozak et al., 2009). Aufgrund der Seltenheit des GSarcs und der somit mangelnden Studienlage werden GSarc-Patienten wie GBM-Patienten behandelt (Han et al., 2010).

In der zerebralen Bildgebung stellt sich das GBM als unregelmäßig geformte Läsion mit peripherer Kontrastmittelaufnahme dar. Die endgültige Diagnose wird anhand der Histologie gestellt, welche durch Pseudopalisaden um eine zentrale Nekrose mit mikrovaskulärer Hyperplasie gekennzeichnet ist (Brat und Van Meir, 2004).

Klinisch zeigen sich Symptome eines gesteigerten intrakraniellen Druckes wie Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen und Sehstörungen (Chang et al., 2005). Weiterhin kommt es je nach Lokalisation des Tumors zu fokalen neurologischen Ausfällen wie Gedächtnisverlust, sprachlichen und motorischen Defiziten und epileptischen Anfällen. Kognitive und Persönlichkeitsveränderungen können ebenfalls früh auftreten. In der letzten Phase der Erkrankung kommt es zusätzlich zu Benommenheit, Dysphagie und Inkontinenz (Sizoo et al., 2010).

Neben den oben erwähnten Mutationen trägt eine Vielzahl von genetischen Veränderungen zur Entstehung des GBMs bei. Ein US-amerikanisches Forscherkonsortium (TGCA; *The Cancer Genome Atlas*) hat eine Vielzahl von GBMs mithilfe von Genom-, Transkriptom- und Proteom-Analysen untersucht (The Cancer Genome Atlas, 2008). Dabei wurden einerseits Mutationen bestätigt, die in früheren genetischen Analysen als relevant eingestuft wurden. Dazu gehört die Dysregulation von Signalkaskaden, die durch Rezeptortyrosinkinasen, insbesondere des epidermalen (EGFR) oder Blutplättchen-Wachstumsfaktor Rezeptors (PDGFR) reguliert werden, einschließlich der Aktivierung der nachgeschalteten Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) - Signalkaskade. Weiterhin wurde die Inaktivierung der durch die Tumorsuppressoren p53 und pRB (Retinoblastoma-Genprodukt) regulierten Signalwege beobachtet (Cerami et al., 2010; Furnari et al., 2007; Ohgaki und Kleihues, 2009; Verhaak et al., 2010). Letztere werden in der Literatur als p53-Apoptose und pRB-Seneszenz Signalweg bezeichnet (Campisi und d'Adda di Fagagna, 2007; Levine, 1997; Sherr und McCormick, 2002). Zusätzlich wurden Deletionen im Gen identifiziert, das für den Tumorsuppressor Neurofibromin 1 (NF1) kodiert, sowie Amplifikationen im Gen, das für die Kinase AKT3 kodiert (The Cancer Genome Atlas, 2008). Auf der Basis der genetischen Alterationen und der veränderten Genexpressionslevel erfolgte eine Einteilung des GBMs in vier molekulare Subtypen: das klassische, mesenchymale, proneuronale und neuronale GBM (Phillips et al., 2006; Van Meir et al., 2010; Verhaak et al., 2010). Es besteht die Hoffnung durch bessere Kenntnis der zellulären und molekularen Eigenschaften des GBMs und der Schlüsselmutationen bessere Therapien entwickeln zu können, die der Heterogenität dieser Tumorentität gerecht werden.

Der klassische GBM-Subtyp zeichnet sich durch eine Deregulierung des EGF-Rezeptors aus. Dabei können Amplifikationen im *EGFR*-Gen, dessen Überexpression oder Mutationen auftreten. Weiterhin wurden Verluste des *PTEN*-Gens und des *CDK2NA*-Genlocus beobachtet. Letzterer kodiert für die Proteine p14^{ARF}, einen Regulator des p53-Apoptosewegs, und p16^{Ink4A}, einen Regulator des pRB-Seneszenzwegs (Ohgaki und Kleihues, 2009; Verhaak et al., 2010). Veränderungen in den Tumorsuppressorgenen *TP53* und *NF1* oder dem *PDGFRα* (*Platelet Derived Growth Factor Receptor alpha*, eine Rezeptortyrosinkinase) - Gen sind kaum vorhanden und *IDH1/2*-Mutanten kommen nicht vor. Der durch das intakte p53 vermittelte DNA-Reparatur-Mechanismus ist wahrscheinlich für das relativ günstige Ansprechen des klassischen GBM-Subtypes auf Bestrahlung und Chemotherapie verantwortlich (Van Meir et al., 2010; Verhaak et al., 2010).

Der mesenchymale GBM-Subtyp ist mit gesteigerter Angiogenese assoziiert (Phillips et al., 2006). Es zeigen sich häufig Inaktivierungen der Tumorsuppressoren NF1, p53 und PTEN (Verhaak et al., 2010). Patienten mit einem GBM dieses Subtypes zeigten eine signifikante Zunahme des Gesamtüberlebens nach aggressiver Chemotherapie im Vergleich zu Patienten mit einem neuronalen oder proneuronalen GBM (Verhaak et al., 2010). Es wird zudem vermutet, dass der mesenchymale Subtyp gut auf Ras-, PI3K- und Angiogenese-Inhibitoren ansprechen könnte (Li et al., 2004; Mellinghoff et al., 2005; Van Meir et al., 2010). In diesem Kontext ist jedoch auch zu beachten, dass das GBM mit zunehmender Progression einen mesenchymalen Phänotypen annimmt (Phillips et al., 2006).

Der dritte, sogenannte proneuronale, GBM-Subtyp zeigt hinsichtlich der Genexpression viele Ähnlichkeiten mit neuronal differenzierenden Zellen. Dies beinhaltet hohe Expressionslevel von oligodendrozytischen und proneuronalen Entwicklungsgenen, wozu auch *PDGFRα* und *SOX2* (*sex determining region Y-box 2*) zählen. Häufig finden sich Mutationen in den Genen, die für die Proteine PDGFRα, IDH1 und p53 kodieren (Verhaak et al., 2010). Das vergleichsweise junge Alter der Patienten und die Tatsache, dass Mutationen der *IDH1/2*-Gene auch häufig in niedriggradigen Gliomen auftreten, lässt vermuten, dass das sekundäre GBM zum proneuronalen GBM-Subtyp zählt (Parsons et al., 2008). Die GBMs vom proneuronalen Typ sprechen am schlechtesten auf die herkömmliche Therapie an. Dennoch weisen die Patienten ein besseres Gesamtüberleben im Vergleich zu den Patienten anderer GBM-Subtypen auf (Phillips et al., 2006). Inhibitoren des PI3K- und PDGFRα- Signalweges könnten daher effektive Therapieansätze darstellen.

Der neuronale GBM-Subtyp ist am wenigstens gut charakterisiert und zeichnet sich durch Genexpressionsmuster ähnlich denen des normalen Hirngewebes aus. Es werden u.a. die neuronalen Proteine NEFL (*neurofilament light polypeptide*) und SYT1 (Synaptotagmin 1) nachgewiesen (Verhaak et al., 2010).

Ob die oben beschriebene GBM-Klassifikation in der Tat eine Relevanz für die Entwicklung neuer GBM-Therapien hat, wird sich zeigen müssen. Allerdings wurden bereits einige Marker in die klinische Diagnostik aufgenommen, darunter der PTEN-, p53- und der IDH-Status (Louis et al., 2016). Die verschiedenen Genexpressionsmuster der vier GBM-Subtypen lassen vermuten, dass sie von unterschiedlichen Ursprungszellen abstammen. Unabhängig von der Klassifizierung weisen GBMs eine Inaktivierung der Signalwege von Apoptose (87% Mutationen von p53 oder p53-Regulatoren) oder Seneszenz (77% Mutationen in RB oder pRB-Regulatoren), sowie eine Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase-Signalkaskade (88%) auf (The Cancer Genome Atlas, 2008, Van Meir et al. 2010). Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass sich alle GBM-Subtypen von einem gemeinsamen Vorläufer-Gliom mit proneuronalen Charakter ableiten (Ozawa et al., 2014). Wahrscheinlich sind diese Vorläufer-Gliome genotypisch durch eine Deregelung von Chromosom (Chr) 7 und einen Verlust von Chromosom (Chr) 10 gekennzeichnet (Abb. 1). Diese Mutationen resultieren in einer gesteigerten Expression von PDGFA (Chr7) und im Verlust von PTEN (Chr10). Der Erwerb weiterer molekularer Charakteristika wie der Verlust eines funktionellen *CDKN2A*-Lokus (kodiert für den Apoptose-Regulator p14^{ARF} und den Seneszenz-Regulator p16^{INK4A}) und die Amplifikation im *EGFR*-Gen führen zur Entstehung des klassischen bzw. mesenchymalen GBM-Subtyps (Abb. 1). Die Amplifikation des *PDGFRα*-Gens und der Verlust eines funktionellen *NF1*-Gens erfolgen ebenfalls später in der GBM-Entwicklung und führen zur Entstehung des mesenchymalen GBM-Subtyps (Ozawa et al., 2014).

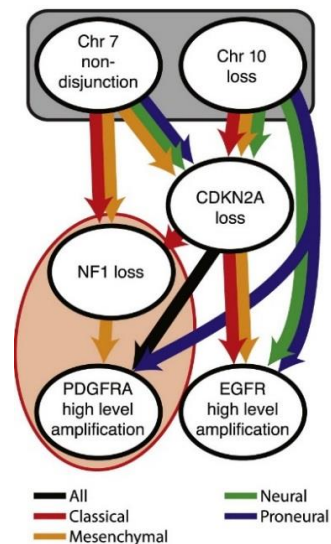


Abb. 1: Genetische Ereignisse bei der Entstehung von Gliomen. - Die Deregelung von Chr 7 und der Verlust von Chr 10 stellen die initialen genetischen Ereignisse in allen GBM-Subtypen dar. Die für die Subtypen charakteristischen Mutationen wie *NF1*- oder *CDKN2A*-Verluste oder Amplifikationen in den *EGFR*/*PDGFRα*-Genen ereignen sich später in der GBM-Entwicklung und bestimmen den GBM-Subtypen (Quelle: Ozawa et al., 2014).

1.3 Therapie des Glioblastoma multiforme

Trotz aller Fortschritte in der Therapie ist das GBM derzeit nicht heilbar. Die aktuelle Standardtherapie besteht aus maximaler chirurgischer Resektion und adjuvanter Radiochemotherapie (Norden und Wen, 2006). Durch die Kombination von fraktionierter Bestrahlung und adjuvanter Behandlung mit dem alkylierenden Chemotherapeutikum Temozolomid (TMZ) konnte die mittlere Überlebenszeit von 12,1 auf 14,6 Monate und das 2-Jahres-Überleben von 10,4 % auf 26,5 % gesteigert werden (Stupp et al., 2005). Kritische Faktoren für die Therapieresistenz des GBMs sind die Expression der O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT), die individuellen Veränderungen in den deregulierten Signalwegen, das Vorhandensein von stammzellähnlichen Gliomzellen (SLGCs; *stem-like glioma cells*), die Integrität der Blut-Hirn-Schranke sowie die Expression von ABC (*ATP-binding cassette*)-Transportern (Beier et al., 2011; Ohka et al., 2012). Auf die Bedeutung des Reparaturproteins MGMT und der SLGCs wird in den Kapiteln 1.4 und 1.5 näher eingegangen. Ansätze zum Eingriff in die deregulierten Signalwege und zum Überwinden der Blut-Hirn-Schranke werden in diesem Kapitel besprochen.

Das GBM gilt aufgrund der früh in das Hirngewebe infiltrierenden Tumorzellen als schwer operabler Tumor (Norden und Wen, 2006). Moderne Operationstechniken wie MRT-gesteuerte Chirurgie, Wachkraniotomie und Fluoreszenz-gestützte Resektion ermöglichen eine effizientere Tumorentfernung. Die chirurgische Resektion verbessert das Wohlbefinden der Patienten durch Reduktion des Tumor-Masse-Effektes. Zusätzlich steigert die chirurgische Intervention das Ansprechen auf andere Therapien, u.a. durch Entfernen nekrotischer Areale, welche für Chemotherapie schlecht zugänglich und resistent gegen Bestrahlung sind (Grossman und Batara, 2004). Anhand von Lage des Tumors, Alter und Allgemeinzustand des Patienten sowie Ausmaß des Masse-Effektes muss die Operationsindikation individuell gestellt werden.

Das Standardregimen sieht eine Bestrahlung mit einer Gesamtdosis von 60 Gray (Gy) über 6 Wochen vor, wobei wöchentlich 5 Fraktionen à 2 Gy verabreicht werden (Ohka et al., 2012; Stupp et al., 2005). Die adjuvante Chemotherapie mit TMZ wird derzeit in verschiedenen Regimen angewandt. In Deutschland weit verbreitet ist das *one week on – one week off* Schema (Han et al., 2014). Ein anderes Schema sieht eine intensivere TMZ-Dosis in der Anwendung von *three weeks on – one week off* vor (Tabatabai et al., 2014). Akute Radiotoxizität betrifft häufiger ältere Patienten und äußert sich in Müdigkeit, Haarausfall, Kopfhautirritationen, Übelkeit und Kopfschmerzen (Norden und Wen, 2006). Um höhere Strahlendosen im Tumorbett bei gleichzeitiger Schonung des umgebenden Hirngewebes zu erzielen, wurden Verfahren wie Radiochirurgie, Brachytherapie und Radioimmuntherapie angewandt. Dabei konnte nur die Radioimmuntherapie mit einem mit Jod-125 markierten Antikörper gegen Tenascin (ein extrazelluläres Matrixprotein, das gehäuft in Gliomen vorkommt) einen positiven Effekt auf die Überlebenszeit belegen (Norden und Wen, 2006).

Die konventionelle Chemotherapie wird ausführlich in Kapitel 1.4 beschrieben. Es gibt jedoch eine Reihe weiterer medikamentöser Therapieansätze, die in bestimmte Abläufe der Tumorentstehung eingreifen. Ein Beispiel hierfür ist der humanisierte monoklonale Antikörper Bevacizumab, der gegen den *Vaskular Endothelial Growth Factor* (VEGF) gerichtet ist (Gerstner und Batchelor, 2009). Ziel ist die Hemmung der gesteigerten Angiogenese des GBMs. Bevacizumab, welches additiv zur Chemoradiotherapie gegeben wird, verbessert bei GBM-Patienten zwar das progressionsfreie, nicht aber das Gesamtüberleben (Chinot et al., 2014). Demzufolge hat die Europäische Arzneimittel-Agentur (EMA) im September 2014 die Zulassung von Bevacizumab für die Behandlung des neu diagnostizierten GBMs abgelehnt. Eine Intervention in den häufig deregulierten PI3K/Akt/mTOR - Signalweg wird als einer der vielversprechendsten Therapieansätze betrachtet (Fan und Weiss, 2010). Die Aktivierung der Rezeptor-Tyrosinkinasen EGFR oder PDGFR α initiiert Signalkaskaden, die zu einer Aktivierung der Proteinkinase B/Akt führen, welche das Zellwachstum und die Proliferation reguliert. Dabei wird auch die Aktivität von mTOR (*mechanistic target of rapamycin*) verstärkt, welches ebenfalls das Zellwachstum kontrolliert. Die Beeinflussung dieser Moleküle könnte also eine neue Therapiestrategie darstellen (De Witt Hamer, 2010). EGFR-Inhibitoren, welche in klinischen Studien untersucht wurden, sind Gefitinib, Erlotinib und Nimotuzumab (Ohka et al., 2012). Gefitinib wird erfolgreich bei einem Teil von Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom mit aktivierender *EGFR*-Mutation eingesetzt. Es konnte jedoch für keinen der EGFR-Inhibitoren eine therapeutische Effektivität für das GBM nachgewiesen werden (Bach, 2011; Rich et al., 2004; van den Bent et al., 2009), was mit der genotypischen Heterogenität des GBMs zu erklären ist (siehe oben). Die Kenntnis der molekularen Subtypen des GBMs könnte diesbezüglich zu anderen Ergebnissen führen (Mellinghoff et al., 2005). Rapamycin und seine Analoga Temsirolimus und Everolimus hemmen die mTOR-Kinase. Temsirolimus und Everolimus sind für die Behandlung von metastasiertem Nierenzellkarzinom zugelassen (Azim et al., 2010). Der Einsatz von Temsirolimus in der Gliomtherapie wurde in klinischen Studien geprüft. Diese ergaben, dass eine Monotherapie mit Temsirolimus die Überlebenszeit von GBM-Patienten nicht verlängert, jedoch eine Kombinationstherapie von Temsirolimus mit Radiochemotherapie die Effektivität verstärkt (De Witt Hamer, 2010).

Die Blut-Hirn-Schranke ist für hydrophile Substanzen sowie für Moleküle größer als 500 Dalton nahezu undurchlässig. Dies stellt ein Problem für die medikamentöse Therapie von Hirntumoren dar, sodass nach neuen lokalen Applikationsformen gesucht wird. Eine Möglichkeit ist der Einsatz von intrakraniellen Implantaten in Form von Carmustin-Wafern, welche eine interstitielle Therapie mit dem alkylierenden Zytostatikum Carmustin ermöglichen. Nach maximaler Tumorresektion können bis zu acht Implantate in die Resektionshöhle eingebracht werden, wo sie Resttumorzellen zerstören sollen. Eine randomisierte kontrollierte klinische Studie ergab eine mittlere Überlebenszeit von 13,8 Monaten der Patienten mit Carmustin-Wafern im Vergleich zu 11,6 Monaten in der Placebogruppe (Westphal et al.,

2006). Es wird vermutet, dass durch die lokale Chemotherapie im Gehirn höhere Wirkstoffkonzentrationen erreicht werden. Komplikationen sind Hirnödeme, Infektionen, Krampfanfälle, Wundheilungsstörungen, Hydrocephalus und Zystenbildung (Ohka et al., 2012).

In der symptomatischen GBM-Therapie kommen Medikamente wie Glukokortikoide (98,8 % der Patienten), Antiepileptika (87,6 %), Antidepressiva (7,3 %) und Antipsychotika (1,4 %) zum Einsatz (Chang et al., 2005).

1.4 Temozolomid und Resistenzmechanismen

Temozolomid (TMZ) ist ein orales Zytostatikum, das eine Alkylierung der DNA bewirkt (Friedman et al., 2000). Die orale Chemotherapie mit TMZ erfolgt nach chirurgischer Resektion als Initialtherapie über 42 Tage mit einer täglichen Dosis von 75 mg/m² Körperoberfläche. Adjuvant erfolgt die Bestrahlung mit einer Kumulativdosis von 60 Gy. Nach einer 4-wöchigen Pause wird der Patient einer alleinigen TMZ-Therapie im Sinne einer Erhaltungstherapie bestehend aus 6 Zyklen zu je 28 Tagen unterzogen. Pro Zyklus wird TMZ über 5 Tage in einer Dosis von 150-200 mg/m² Körperoberfläche verabreicht (Norden und Wen, 2006; Stupp et al., 2005).

TMZ weist ein vergleichsweise geringes Nebenwirkungspotential auf (Friedman et al., 2000). Potentielle Nebenwirkungen sind Übelkeit, Erbrechen, Obstipation, Diarrhoe, Anorexie, Haarausfall sowie Kopfschmerzen, Müdigkeit und Krampfanfälle (Karow und Lang, 2016). Relevante hämatotoxische Ereignisse in Form von Neutropenie (4%) und Thrombozytopenie (3%) treten vergleichsweise selten auf (Stupp et al., 2005). Nach oraler Aufnahme wird TMZ schnell absorbiert und besitzt eine Bioverfügbarkeit von fast 100% (Chakravarti et al., 2006). Im Gegensatz zu anderen Zytostatika kann TMZ die Blut-Hirn-Schranke passieren (Patel et al., 2003). Mit TMZ behandelte Gliompatienten weisen im Liquor 20% der AUC (*area under the concentration-time curve*) - Werte des Plasmas auf (Ostermann et al., 2004). TMZ wird mit einer Halbwertszeit von 1,8 Stunden schnell metabolisiert und ausgeschieden und akkumuliert somit kaum. TMZ ist ein Prodrug, das bei physiologischem pH-Wert spontan zu seinem aktiven Metaboliten MTIC [5-(3-Methyltriazin-1-yl)imidazol-4-carboximid] konvertiert, der die DNA an verschiedenen Basen methyliert (Chakravarti et al., 2006). MTIC wird durch Übertragen der Methylgruppe in AIC (5-Aminoimidazol-4-carboxamid) umgewandelt, welches über die Nieren ausgeschieden wird (Friedmann et al. 2000). Die Methylierungen der DNA durch MTIC finden sich zu überwiegend (80%) an der N⁷-Position des Guanins und an der N³-Position des Adenins (Trivedi et al., 2005). Diese Läsionen werden jedoch durch Basenexzisionsreparatur-Enzyme behoben und haben deswegen keine Bedeutung für die Therapie (Hegi et al., 2008). Die für die zytotoxische Wirkung von TMZ verantwortliche Methylierung findet in der O⁶-Position des Guanins statt, macht aber nur 5-10% der Methylierungen aus (Newlands et al., 1997). Die Methylgruppe in der O⁶-Position des Guanins wird von der

O⁶-Methylguanin-methyltransferase (MGMT) entfernt (Olsson und Lindahl, 1980). Unterbleibt die Reparatur durch MGMT, kommt es während der DNA-Replikation zu einer Fehlpaarung des methylierten Guanins mit Thymin, woraufhin der MMR (*Mismatch Repair*) - Reparaturmechanismus aktiviert wird. Dies resultiert in DNA-Doppelstrangbrüchen, wodurch der Apoptose-Signalweg aktiviert wird, der nachfolgend zum Zelltod führt (Roos et al., 2007). Die Relevanz des MMR-Signalweges wird durch Studien verdeutlicht, welche zeigen, dass Zellen, welche sowohl fehlerhafte MGMT- als auch mangelhafte MMR-Signalwege aufweisen, 100-fach resistenter gegenüber alkylierenden Reagenzien sind (Stojic et al., 2004). Das *MSH6* (mutS homolog 6) - Gen kodiert für ein MMR-Protein. Es wurde beobachtet, dass Mutationen des *MSH6*-Gens in rekurrenten GBMs auftreten, die mit TMZ behandelt wurden (Cahill et al., 2007; The Cancer Genome Atlas, 2008). TMZ kann also eine Resistenz gegen eine erneute, nachfolgende TMZ-Therapie des Rezidivs induzieren, wenn die frühere TMZ-Gabe in einer Inaktivierung des *MSH6*-Gens resultierte (Yip et al., 2009).

GBMs, die die Methyltransferase MGMT exprimieren, sind resistenter gegenüber TMZ als Tumore mit einem inaktiven *MGMT*-Gen (Esteller et al., 2000). Der wichtigste regulatorische Mechanismus ist hierbei die Methylierung des *MGMT*-Promotors in der Base Cytosin in sogenannten CpG-Dinukleotiden. Die Hypermethylierung des *MGMT*-Promotors führt zu einem epigenetischen *Gene Silencing*. Eine Methylierung des Promotors findet sich in 45% der GBMs (Hegi et al., 2005). Der Nachweis einer *MGMT*-Promotor-Methylierung scheint also ein sinnvoller Test, um GBM-Patienten zu identifizieren, die von einer TMZ-Therapie profitieren (Hegi et al., 2005; Stupp et al., 2005). Hegi et al. (2005) konnten in der Tat belegen, dass GBM-Patienten mit einem methylierten *MGMT*-Promoter unter zusätzlicher TMZ-Therapie ein längeres Überleben zeigten (21,7 Monate) als unter alleiniger Radiotherapie (15,3 Monate). Dagegen wurde bei Patienten mit unmethyliertem *MGMT*-Promoter kein signifikanter Unterschied in der Überlebenszeit beider Gruppen festgestellt (12,7 Monate *versus* 11,8 Monate). Neben methylierten und unmethylierten *MGMT*-Promotoren wurde in GBM-Zellkulturen eine Hemimethylierung beobachtet. Hemimethylierung könnte ebenso das Merkmal einiger GBMs sein (Blough et al., 2010). Dies könnte entweder implizieren, dass nur eines der beiden *MGMT*-Allele einer Zelle methyliert ist oder dass verschiedene Subpopulationen von Zellen mit unterschiedlichem Methylierungsstatus innerhalb einer Zellkultur existieren (Piccirillo et al., 2009). Blough et al. (2010) bestätigten, dass alle Zelllinien, die MGMT exprimieren, eine relative Resistenz gegenüber TMZ aufweisen. Die Expression des *MGMT*-Transkriptes und MGMT-Proteins könnten also bessere Indikatoren für den Nutzen von TMZ sein als der Promoter-Methylierungsstatus (Preusser et al., 2008). Zusammenfassend ist festzustellen, dass das beste therapeutische Ansprechen auf TMZ in Tumoren erwartet wird, die keine MGMT-Expression und ein intaktes MMR-System aufweisen (Gerson, 2002). Außer der MGMT-Expression und dem fehlerhaften MMR-Mechanismus scheinen noch weitere Faktoren eine relative TMZ-

Resistenz zu vermitteln. Dazu gehören sogenannte ABC-Transporter (Beier et al., 2011) oder auch ein hypoxisches Mikroumfeld sowie der Stammzellcharakter bestimmter GBM-Zellen.

1.5 Gliomstammzellen

Die Tumorstammzelltheorie stammt aus dem Jahr 1994, als bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) eine Fraktion von Zellen beobachtet wurde, welche die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besaß und nach Xenotransplantation zur klinischen Manifestation der Erkrankung *in vivo* führte (Visvader und Lindeman, 2008). Seitdem wurde die Existenz selbsterneuernder Zellen in verschiedenen soliden Tumoren entdeckt, einschließlich von Tumoren der Mamma, des Kolons, der Lunge, des Gehirns und der Leber (Ricci-Vitiani et al., 2010; Singh et al., 2004). Die Tumorstammzelltheorie geht davon aus, dass in jedem Tumor eine zelluläre Hierarchie existiert, an deren Spitze die Tumorstammzelle (CSC; *cancer stem cell*) steht. CSCs können sich selbst erneuern sowie in eine Vielzahl anderer Zellen differenzieren, welche die Tumormasse bilden (Visvader und Lindeman, 2008). Mit zunehmender Differenzierung verlieren die CSCs ihre Stammzeleigenschaften. Unter pathologischen Bedingungen können die differenzierten Zellen eines Tumors auch dedifferenzieren (Dirks, 2008; Singh et al., 2003). Für das GBM wurde gezeigt, dass pathologische Reize wie Hypoxie (Li et al., 2009), saurer pH-Wert (Hjelmeland et al., 2011) sowie die Therapie mit TMZ (Auffinger et al., 2014; Chen et al., 2012, *Nature*) bei differenzierten Tumorzellen (Non-CSCs) zur Ausbildung eines CSC-Phänotyps führen. CSCs besitzen folgende Merkmale: sie wirken in ihren Wirten bzw. immunsupprimierten Xenograft-Empfängern onkogen, sie proliferieren, sie erneuern sich selbst und sie besitzen die Fähigkeit zur Differenzierung (Reya et al., 2001).

Tumorstammzellen tragen beim GBM zu Erhaltung und Ausbreitung des Tumors (Galli et al., 2004; Singh et al., 2004; Yuan et al., 2004), aber auch zur Ausbildung von Therapieresistenzen bei (Bao et al., 2006, *Nature*; Liu et al., 2006). Tumorstammzellen aus Gliomen wurden 2002 erstmalig *in vitro* kultiviert (Ignatova et al., 2002). Gliomstammzellen werden in der Literatur mit den Begriffen BTSC (*brain tumor stem cells*), GSC (*glioma stem cells*) und SLGC (*stem-like glioma cells*) bezeichnet. Wie unten näher erläutert, gibt es Gründe, den Begriff SLGC zu verwenden, um *in vitro* Kulturen dieser Zelltypen zu beschreiben.

SLGCs weisen Gemeinsamkeiten mit neuronalen Stammzellen (NSCs; *neural stem cells*) auf. Beide, SLGCs und NSCs, exprimieren den Oberflächenmarker CD133 und das Intermediärfilament Nestin und verfügen über aktive Signalwege der neuronalen Entwicklung wie z.B. den Notch-, Wnt- und *Transforming growth factor-β* (TGF-β) - Signalweg (Godlewski et al., 2008; Silber et al., 2008). SLGCs bilden nach Xenotransplantation in Nacktmäusen orthotope Tumore, welche dem humanen Ursprungstumor ähneln (Dirks, 2008; Singh et al., 2003, 2004). Weitere Kriterien zur Identifizierung von SLGCs sind (i) das

Sphärenwachstum, (ii) die Fähigkeit zur Bildung von Kolonien in Softagar oder (iii) die Bildung von Zellklonen in sogenannten *limiting dilution assays* (Schonberg et al., 2013). Dabei ist der „Sphären Assay“ eine unvollkommene Nachweismethode, da nicht alle SLGCs in Kultur Sphären bilden (Choschick et al., 2014; Schonberg et al., 2013).

Der Ursprung der SLGCs ist derzeit nicht erwiesen (Sundar et al., 2014). Die Gemeinsamkeiten in der Genexpression und den Signalwegen unterstützen die These, dass SLGCs von NSCs oder neuralen Progenitoren abstammen, welche nach Anreicherung von Mutationen neoplastisch transformierten. Andererseits könnten die SLGCs von reifen Astrozyten oder Oligodendrozyten abstammen, welche durch Mutationen Tumorzell- und Stammzeleigenschaften erwarben (Huse und Holland, 2010). Für beide Thesen gibt es experimentelle Evidenzen, sodass man annimmt, dass beide Thesen zutreffen. Es wurde sogar vermutet, dass die GBM-Subtypen (siehe Kapitel 1.2) sich von verschiedenen Differenzierungsstadien von neuralen Zellen ableiten, wobei NSCs den Ursprung für GBMs des mesenchymalen Subtypen darstellen sollen, *transit amplifying progenitor cells* für das proliferative (klassische) GBM und Neuroblasten für den proneuronalen Subtypen (Phillips et al., 2006). Diese Vermutung basiert auf der Analyse von Markerexpressionen in GBMs und gesunden neuralen Zellen. Zu den prominenten Markern für SLGCs gehören CD133/Prominin-1, aber auch Nestin sowie Integrin $\alpha 6$ und der Transkriptionsfaktor Sox2 (Dirks 2010; Huse und Holland, 2010; Schonberg et al., 2013).

CD133 ist der bisher am häufigsten verwendete Biomarker für SLGCs. Dies beruht zumindest zum Teil darauf, dass CD133-Antikörper für die ersten erfolgreichen Isolierungen von SLGCs mittels FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) - Analyse genutzt wurden (Dirks, 2010; Singh et al., 2004). Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden jedoch mittels anderer akzeptierter Methoden zur SLGC-Anreicherung gewonnen, die auf selektivem Wachstum in serumfreien NSC-Medien beruhen (Dirks, 2010). Anfänglich wurde die Expression von CD133 mit der Fähigkeit zur Tumorigenität und Radioresistenz assoziiert (Blazek et al., 2007; Singh et al., 2004). Es genügten bereits 100 CD133-positive Zellen aus GBMs oder Medulloblastomen, um im Mausmodell Tumore zu erzeugen (Singh et al., 2004). Inzwischen konnten mehrere Studien belegen, dass auch CD133-negative GBM-Zellen orthotope Tumore in Mäusen generieren (Beier et al., 2007; Ogden et al., 2008; Wang et al., 2008). Die Nutzung von CD133 zur Anreicherung von Gliomstammzellen ist problematisch. Nach Untersuchungen von Chen et al. (2010) ist die CD133-positive Zelle nicht die Tumorstammzelle, sondern eine weiter differenzierte Progenitorzelle, die sogenannte Typ II-Zelle. Typ II-Zellen gehen aus der CD133-negativen Tumorstammzelle, der Typ I-Zelle, hervor. Typ II-Zellen differenzieren weiter zu CD133-negativen Typ III-Zellen, die dann wiederum den Ausgangspunkt für die Differenzierung in die Zellderivate des Tumors bilden. Sowohl die Typ I-, als auch die Typ II- und III-Zellen exprimieren Sox2 und Nestin, wobei die Expressionslevel von der Typ I bis zur Typ III- Zelle abnehmen (Chen et al., 2010). Weiterhin besitzen alle drei

Zelltypen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und generieren orthotope Tumore in Mausmodellen (Chen et al., 2010).

Nestin ist ein Intermediärfilament, das von NSCs und unreifen, neuronal differenzierenden Zellen exprimiert wird und den „unreifen“ Zustand von neuronalen Zellen anzeigt (Veselska et al., 2006).

Der Transkriptionsfaktor SOX-2 (*sex determining region Y-box 2*) reguliert den Stammzellcharakter und ist über den TGF- β -Signalweg an der Selbsterneuerung und Proliferation der SLGCs beteiligt. (Schonberg et al., 2013). Außerdem trägt die Expression von Sox2 zur Tumorigenität der SLGCs bei (Gangemi et al., 2009; Ikushima et al., 2009).

Mehrere Untersuchungen belegten, dass die Mikroumgebung der SLGCs mitverantwortlich für den Erhalt der stammzellähnlichen Eigenschaften ist (Gilbertson und Rich, 2007; Lathia et al., 2011; Malanchi et al., 2011). Im gesunden Gehirn befinden sich NSCs in der subventrikulären Zone der lateralen Ventrikel, dem Gyrus dentatus des Hippocampus und in der subkortikalen weißen Substanz in sogenannten Stammzellnischen (Hadjipanayis und Van Meir, 2009; Sanai et al., 2004; Shen et al., 2004). Dort ist ein ausgeprägtes Kapillarnetz für deren Versorgung mit Nähr- und Signalstoffen verantwortlich. Auch die SLGCs residieren in Nischen, die entsprechend als Tumorstammzellnischen bezeichnet werden. Die bekannteste ist die perivaskuläre Nische (Calabrese et al., 2007; Lathia et al., 2011). Interaktionen zwischen dem Oberflächenprotein Integrin α -6 auf den SLGCs und der Extrazellulären Matrix des perivaskulären Raumes führen zum Erhalt des Stammzellcharakters der SLGCs (Lathia et al., 2010). Weiterhin exprimieren die Endothelzellen der Gefäße Notch-Liganden, welche über Bindung an die Notch-Rezeptoren der SLGCs ebenso für den Stammzellcharakter verantwortlich sind (Fan et al., 2009). Calabrese et al. (2007) beobachteten, dass SLGCs in Ko-Kultur eine Migration zu endothelialen Zellen zeigten. Xenotransplantation von SLGCs mit endothelialen Zellen verstärkte die orthotope Tumorbildung in immundefizienten Mäusen (Calabrese et al., 2007). Dafür sind zwei Fähigkeiten der SLGCs relevant. Einerseits sezernieren CD133-positive SLGCs hohe Spiegel an VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (Bao et al., 2006). Andererseits besitzen SLGCs die Fähigkeit zur Transdifferenzierung in Endothelzellen (Ricci-Vitiani et al., 2010). Das hypoxische Areal der intratumoralen Nekrose des GBMs stellt ebenso eine Nische für SLGCs dar (Persano et al., 2011). Hypoxie führt zu einer vermehrten Sekretion von VEGF durch die SLGCs und somit zu gesteigerter Angiogenese (Hardee und Zagzag, 2012). Überdies kann Hypoxie über die Aktivierung von HIF (*hypoxia-inducible factor*) - 1 α die Selbsterneuerung und somit die Expansion von CD133-positiven SLGCs induzieren (Soeda et al., 2009). Die Expression von HIF-1 α korreliert mit Aggressivität und Progression des Tumors (Persano et al., 2011). Es wurde ebenso eine verstärkte Expression von HIF-2 α und seinen Zielgenen in SLGCs gefunden (Li et al., 2009). Auch die Randgebiete von hochinvasiven GBMs fungieren als Nische. An den Grenzen des Tumors sezernieren Tumormakrophagen TGF- β und regen die SLGCs somit zur Expansion und Invasion in das umliegende Gewebe an (Ye et al., 2012).

Das Ansprechen der Gliomstammzellen auf die Standardtherapie ist begrenzt. Bezüglich der Sensitivität gegenüber TMZ existieren kontroverse Daten, die zum Teil mit den unterschiedlichen experimentellen Begebenheiten zu erklären sind. Einige Studien belegten eine TMZ-Resistenz der SLGCs (Salmaggi et al., 2006). Dagegen berichteten andere Studien über die TMZ-Sensitivität von CD133-positiven SLGCs (Beier et al., 2008). Blough und Kollegen (2010) stellten fest, dass sich 45% der untersuchten SLGC-Linien empfindlich und 55% resistent gegenüber TMZ zeigten. Dabei existierte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der CD133-Expression und dem Ansprechen auf TMZ (Blough et al., 2010). Gegenüber der Radiotherapie wiesen CD133-positive GBM-Zellen eine Resistenz auf, die durch eine effizientere Aktivierung von Reparaturprozessen erklärt wurde (Bao et al., 2006, *Nature*). In einem transgenen Gliom-Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass eine Population von Zellen mit Stammzeleigenschaften die TMZ-Therapie überlebte und erneutes Tumorwachstum propagierte (Chen et al., 2012, *Nature*). Insgesamt belegen die oben beschriebenen Experimente eine mangelnde Zytotoxizität von TMZ und Radiotherapie auf Gliomzellen, insbesondere SLGCs, was die Entwicklung neuer Therapieansätze erfordert. Gegenstand aktueller Forschungen ist dabei das Malariamittel Chloroquin.

1.6 Chloroquin in der Therapie des GBM

Chloroquin (CQ) wurde 1934 im Rahmen systematischer Studien zur Entwicklung neuer Malariamittel entdeckt und wird seit 1947 gegen die Malaria eingesetzt. Nach 70 Jahren klinischer Erfahrung gilt Chloroquin heute als effektives und gut verträgliches Medikament, das Verwendung in der Therapie und Prophylaxe der Malaria sowie bei rheumatischen Erkrankungen findet (Munshi, 2009).

Nebenwirkungen sind gastrointestinale Beschwerden, Juckreiz, Photosensibilisierung, Schwindel, Kopfschmerzen, Augenschäden und selten hämatologische Störungen wie Hämolyse, Thrombopenie oder Leukopenie (Karow und Lang, 2016). Nach oraler Aufnahme wird Chloroquin schnell und fast vollständig resorbiert. Die Eliminierung erfolgt renal und langsam mit einer Halbwertszeit von 30 bis 60 Tagen. Chloroquin reichert sich in den Organen an. Hohe Konzentrationen finden sich in Auge, Leber, Nieren, Milz und Lunge (200- bis 700-Faches der Plasmawerte) sowie in Leukozyten, Erythrozyten, ZNS und Intestinum (10- bis 30-Faches der Plasmawerte) (Aktories et al., 2013).

Über den Wirkmechanismus von Chloroquin als Malariamittel liegen Erkenntnisse vor, die dessen Einsatz in der Tumorthherapie interessant machen. Chemisch betrachtet ist Chloroquin eine schwache Base, welche sowohl in protonierter als auch in unprotonierter Form vorliegen kann (Solomon und Lee, 2009). Unprotoniertes Chloroquin diffundiert durch die Lipiddoppelschichten von Zellen und Zellorganellen. So gelangt es in die Nahrungsvakuole der Plasmodien, wo es im sauren Milieu protoniert wird. In protonierter Form verliert es die Fähigkeit Lipiddoppelschichten zu durchqueren und reichert sich

in der Nahrungsvakuole an. Hier hemmt Chloroquin die Hämpolymerase (ein essentielles Enzym für den Hämoglobin-Abbau), sodass sich toxische Hämmetaboliten anreichern und zur Zerstörung der Plasmodien führen (Aktories et al., 2013). Die in eukaryotischen Zellen enthaltenen Lysosomen sind mit den sauren Nahrungsvakuolen der Plasmodien vergleichbar. Die Akkumulation von protoniertem Chloroquin in den Lysosomen führt zur Inhibierung lysosomaler Enzyme sowie zur Hemmung der Degradation von Autophagosomen (Carew et al., 2007).

Aus diesen Gründen wurde auch der mögliche Einsatz von Chloroquin in der Tumorthherapie erforscht. Aktuelle Evidenzen deuten darauf hin, dass Chloroquin Zellen effektiv für die zytotoxischen Effekte von ionisierender Strahlung und von Chemotherapeutika sensibilisieren kann (Solomon und Lee, 2009). Sotelo und Kollegen führten drei kleinere randomisierte kontrollierte klinische Studien durch, in welchen GBM-Patienten zusätzlich zur konventionellen GBM-Therapie mit Chloroquin behandelt wurden. Die erste klinische Studie mit nur 9 Patienten in jeder Gruppe zeigte eine deutliche Zunahme in der mittleren Überlebenszeit auf 33 ± 5 Monate in der Chloroquin-Gruppe *versus* 11 ± 2 Monate in der Kontrollgruppe (Carmustin plus adjuvante Radiotherapie) (Briceno et al., 2003). Die zweite klinische Studie umfasste 15 Patienten in jeder Gruppe und zeigte eine mittlere Überlebenszeit in der mit Chloroquin behandelten Gruppe von 24 Monaten gegenüber 11 Monaten in der Kontrollgruppe (Sotelo et al., 2006). In der dritten Studie befanden sich 41 Patienten in der Chloroquin-Gruppe und 82 Patienten dienten als Kontrollgruppe. Die mittlere Überlebenszeit betrug für die mit Chloroquin behandelten Patienten $25 \pm 3,4$ Monate und für die Kontrollgruppe $11,4 \pm 1,3$ Monate (Briceno et al., 2007). Sotelo und Kollegen gingen davon aus, dass unter der Chemo- und Radiotherapie neue Mutationen entstehen, die zu therapieresistenten Zellklonen im Gliom führen. Da Chloroquin zur Interkalation in die DNA fähig ist (Chatterjee et al., 1998), könnte es durch Stabilisierung der DNA anti-mutagen wirken und das Auftreten von Tumorzellklonen verhindern (Briceno et al., 2003; Sotelo et al., 2006). Toler und Kollegen vertraten dagegen die Hypothese, dass die Wirkung von Chloroquin in einer Verstärkung von zellulärem oxidativen Stress bestand (Toler et al., 2006). Chloroquin hemmt die Entgiftung von Ferriprotoporphyrin IX durch Herabsetzen der Verfügbarkeit von reduzierten Glutathion (Ginsburg et al., 2003). In einer Studie mit GBM-Zellen wurde ebenfalls beobachtet, dass Chloroquin neben der Induktion von Apoptose zu einer Verminderung von reduzierten Glutathion führte (Park et al., 2008). Weitere Studien mit etablierten GBM-Zelllinien ergaben ebenfalls Hinweise auf die zytotoxische Wirkung von Chloroquin auf GBM-Zellen, wobei festgestellt wurde, dass Induktion von Apoptose p53-abhängig war (Kim et al., 2010). In dieser Arbeit sollte erstmals die Responsivität von SLGC-Linien erforscht werden. Um zusätzlich zu den *in vitro* Daten *in vivo* Evidenzen zu gewinnen, erfolgte die orthotope Xenotransplantation von SLGC-Linien in immundefiziente Mäuse und deren Kombinationsbehandlung mit TMZ und Chloroquin.

1.7 Das Gliom im Mausmodell

Die Labormaus ist eines der besten Modellsysteme für die Tumorforschung (Frese und Tuveson, 2007). Die Vorteile von Mäusen bestehen in ihrer geringen Körpergröße, der günstigen Haltung, der schnellen Reproduktionsrate und ihrer genetischen Manipulierbarkeit (Cheon und Orsulic, 2011). Mäuse weisen molekulare und physiologische Gemeinsamkeiten zu Menschen auf, sodass die genetischen Alterationen und die physiologischen Vorgänge in der Tumorentstehung denen von Menschen gleichen (Chen et al., 2012, *Cell*).

Die ersten *in vivo* Modelle von Gehirntumoren wurden von Greene et al. (1945) durch die Transplantation von humanen Gehirntumoren in die vordere Augenkammer von Meerschweinchen etabliert. 1952 erfolgte die erste Transplantation in das Gehirn. Die Anwachsrate waren jedoch aufgrund der Immunkompetenz der Tiere gering. Mit dem Einführen der athymischen Nacktmäuse gelangen zuverlässige Transplantationen von Gliomen (Jones et al., 1981). Heute lassen sich die in der Gliomforschung angewandten Tiermodelle in drei Kategorien einteilen: chemisch induzierte Modelle, genetisch manipulierte Modelle und Xenotransplantatmodelle (Huszthy et al., 2012).

Bei chemisch induzierten Modellen werden Tumore zum Beispiel durch Exposition von adulten oder schwangeren Ratten mit N-Nitroso-Verbindungen induziert (Schmideke et al., 1971). Allerdings ist ihre Verwendung in der Gliomforschung aufgrund einiger Einschränkungen fragwürdig, u.a. weil auf diese Weise erzeugte Tumore histologische Unterschiede zu humanen Gliomen aufweisen. Man bezeichnet diese Tumore als „Gliosarkome“ oder „gliom-ähnliche Läsionen“ (Huszthy et al., 2012).

Das Generieren von genetisch manipulierten Modellen erfolgt durch die *in vivo* Aktivierung von Onkogenen, die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen oder beidem. Dabei werden *Gene Targeting* Methoden, wie *Knockouts* oder *Knockins* verwendet (Cheon und Orsulic, 2011). Das Erzeugen von Gliommodellen durch alleinige Tumorsuppressor *Knockouts* oder alleinige Onkogen-Überexpression ist problematisch, da für das Entstehen von Gliomen Alterationen in mehreren Hauptsignalwegen entscheidend sind (siehe 1.2; The Cancer Genome Atlas; Van Meir et al., 2010). Allerdings konnten mittels dieser Modelle die Schlüsselmutationen in Gliomen identifiziert werden. Chow et al. (2011) entwickelten z.B. ein Mausmodell eines hochgradigen Astrozytomes durch Manipulieren der Tumorsuppressoren PTEN, p53 und RB. Dabei ergaben sich ausgeprägte Ähnlichkeiten in der Genkopienzahl und den Alterationen zwischen den Mausgliomen und den humanen GBMs bis hin zu den molekularen GBM-Subtypen (Chow et al., 2011). Mittlerweile wurden mehrere Gendefekte des humanen GBMs im Mausmodell nachgestellt (Chen et al., 2012, *Cell*). Einer der vielen Vorteile der genetisch manipulierten Modelle liegt in der Immunkompetenz der Mäuse, welche eine Darstellung der für die Tumorbologie wichtigen

Mikroumgebung (Nischen) ermöglicht (Charles und Holland, 2010). Ein Nachteil besteht in der Tatsache, dass Maustumoren keine humanen Tumoren sind und demzufolge oft nicht voraussagen, wie humane Tumoren auf eine Therapie reagieren (Richmond und Su, 2008).

Das Xenotransplantatmodell basiert auf ektoper oder orthotoper Transplantation von Zelllinien oder Tumorgewebe einer Spezies in immunkomprimierte Mäuse (Frese und Tuveson, 2007). Für die Xenotransplantation von Gliomen existieren drei Transplantatkonzepte: Monolayerzelllinien, Sphärenzelllinien und Biopsiesphäroide. Die Vorteile der beiden Zelllinien-basierten Modelle sind ihre gute Reproduzierbarkeit bezüglich der Anwachsrate und ihr zuverlässiges Wachstum. Außerdem können die immortalisierten Zellen unbegrenzt *in vitro* passagiert werden, sodass größere Mengen an Zellen für die experimentelle Verwendung resultieren (Huszthy et al., 2012). Werden die GBM-Biopsate in serumhaltigem Medium kultiviert, so entstehen Monolayer- oder Sphärenzelllinien. Ein Beispiel ist die etablierte GBM-Linie U87MG, die zwar keinen Stammzellcharakter hat, aber dennoch effizient orthotope Tumore generiert. Die *in vivo* erzeugten Läsionen sind histologisch homogener als ihre menschlichen Ursprungstumoren (Jones et al., 1981). Überdies zeigen diese Xenotransplantate histologisch nur mäßig Angiogenese sowie ein begrenztes Wachstum mit geringer Zellinvasion; für das GBM charakteristische Nekrosen und mikrovaskuläre Abnormalitäten fehlen meist (Mahesparan et al., 2003). Die Xenotransplantation von stammzellähnlichen Gliomzellen (SLGCs) geht häufig von Neurosphären aus. Allerdings wachsen nicht alle SLGCs als Sphären (Choschzick et al., 2014). Generell spiegeln die Xenotransplantate von SLGCs besser den molekularen Aufbau des Originaltumors wider, außerdem zeigt sich das molekulare Profil über die Zeit stabiler (Günther et al., 2008). Gleichzeitig zeichnen sich diese Zellpopulationen durch eine ausgeprägte Variabilität aus. Manche Populationen zeigen ein stammzellähnliches Expressionsprofil ähnlich dem Patiententumor, während andere ein eher mesenchymales Expressionsprofil aufweisen, das sich vom Originaltumor unterscheidet (Schulte et al., 2011). Neurosphären können höchst invasive Xenotransplantate erzeugen, welche die weiße Substanz und das Corpus callosum infiltrieren (Li et al., 2008). Der Vollständigkeit wegen wird kurz auf die Herstellung und den Einsatz von Biopsiesphäroiden eingegangen. Durch Einbetten in Agar behalten die GBM-Biopsate ihre originale Gewebsarchitektur bei (Bjerkvig et al., 1990). Die Biopsiesphäroide zeigen die gleiche DNA-Ploidie sowie einen ähnlichen Prozentsatz proliferierender Zellen wie der Tumor *in situ* (Wang et al., 2009). Nach orthotoper Xenotransplantation weisen die Tumore diffuse Tumorzellinfiltrationen auf und nach wiederholten Transplantationszyklen in immundefizienten Tieren entwickeln sie histologische Merkmale des GBMs (Sakariassen et al., 2006). Der besondere Vorteil dieses Modells liegt darin, dass es die Histologie des humanen GBMs rekapituliert und die genetischen Alterationen des Originaltumors beibehält. Demnach weist es die gleiche Heterogenität des GBMs von Patienten auf, was eine Standardisierung und experimentelle Planung erheblich erschwert (Huszthy et al., 2012).

Allen drei Xenotransplantatmodellen ist gemeinsam, dass sie humanem Tumorgewebe entspringen und somit gut das Ansprechen von menschlichen Tumoren auf Medikamente voraussagen und für die Entwicklung individueller Therapieansätzen genutzt werden können (Richmond und Su, 2008).

1.8 Fragestellung

Wie in Kapitel 1.6 dargelegt, wirkte sich die Koapplikation von CQ zur GBM-Standardtherapie positiv auf die Überlebenszeit der Patienten aus. Weiterhin wurde in *in vitro* Experimenten mit der etablierten GBM-Zelllinie U87MG festgestellt, dass Chloroquin das Wachstum von GBM-Zellen hemmt, wobei Zelllinien mit Wildtyp-p53-Status eine stärkere Responsivität gegenüber Chloroquin zeigten. Zudem nahm die Tumorigenität der U87MG-Zellen im Mausmodell ab. Über die Responsivität von SLGCs in solchen experimentellen Ansätzen ist dagegen nichts bekannt. In dieser Arbeit wurden die Effekte von CQ und TMZ auf phänotypisch und genotypisch verschiedene SLGC-Linien *in vitro* und *in vivo* im Mausmodell untersucht. Dabei wurden sowohl der MGMT-, p53 und PTEN-Status als auch der Stammzellcharakter der untersuchten SLGC-Linien in die Betrachtung einbezogen. Über die Expression von MGMT und PTEN sowie über das Vorhandensein eines mutierten oder Wildtyp p53 in den SLGC-Linien liegen Erkenntnisse in der Arbeitsgruppe vor.

Zuerst wurde der Frage nachgegangen, welchen Einfluss TMZ und CQ in Einfach- und Doppelbehandlung auf die Proliferation und Vitalität der verschiedenen SLGC-Linien ausüben. Dazu wurde die Proliferationsrate mittels BrdU-ELISA und die Vitalität mittels MTT-Test untersucht. Um potentielle Veränderungen der Vitalität besser deuten zu können, wurde parallel die LDH-Freisetzung mithilfe eines Zytotoxizitätstests gemessen, da eine gesteigerte LDH-Freisetzung als Hinweis für vermehrtes Zellsterben gilt. Bei diesen Versuchen wurde auch geprüft, ob CQ die Empfindlichkeit der SLGC-Linien gegenüber TMZ steigern kann und ob dabei eine Konzentrationsabhängigkeit besteht.

Zweitens wurde die Frage gestellt, welche Auswirkung TMZ und CQ auf den Zellzyklus haben. Dafür wurde die Expression von Zellzyklusregulatoren, die eine Zyklusprogression (Cyclin-abhängige Kinasen CDK4 und CDK6) bzw. einen Zyklusarrest (CDK-Inhibitoren p21^{CIP1} und p27^{WAF1}) bedingen, mittels Western Blot Analyse analysiert. Außerdem wurden durchflusszytometrische Analysen mit Propidiumiodid-markierten Zellen durchgeführt, um die Anreicherung der Zellen in Zellzyklusphasen bzw. das Auftreten eines Zellzyklusarrests zu untersuchen.

Drittens wurde die Wirkung von TMZ und CQ in einem Mausmodell analysiert. Hierzu erfolgte die orthotope Xenotransplantation von zwei SLGC-Linien mit mutiertem *TP53*-Gen (T1447-N239D; T1495-R273H) in immundefiziente Nacktmäuse. Die Mäuse wurden fünf Wochen nach Xenotransplantation für 28 Tage mit TMZ und CQ behandelt und anschließend geopfert. Die Gehirne wurden histologisch

mittels Hämatoxylin-Eosin (HE) - und immunhistologischer Färbung untersucht. Als Kontrolle diente die etablierte GBM-Linie U87MG, für die bereits Daten vorlagen (Kim et al., 2010).

Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten dazu beitragen, einen *proof of principle* für die Wirksamkeit von Chloroquin in der GBM-Kombinationsbehandlung zu erbringen, der den Beginn einer klinischen Studie rechtfertigen würde. Weiterhin sollen Hinweise auf die molekulare Wirkweise von Chloroquin in SLGCs in Abhängigkeit von p53- und Stammzellstatus gewonnen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tumormaterial und Mausmodell

Die Experimente mit Tumormaterial wurden gemäß der Helsinki-Leitlinie und der nationalen Regelung für die experimentelle Verwendung menschlichen Materials (Votum 08-070 der Ethikkommission der Universität zu Lübeck) durchgeführt. Die Glioblastom- und Gliosarkomproben stammten von Patienten, die im Rahmen der Standardtherapie operiert wurden und ihr Einverständnis zur Verwendung der Tumorproben in der Forschung gaben. Die Klassifikation von Art und Grad des Tumors erfolgte gemäß der WHO-Klassifikation durch einen Neuropathologen. Die Proben wurden anonymisiert und die daraus kultivierten Zelllinien mit einem „T“ und einer nachfolgenden Codenummer bezeichnet.

Die Tierversuche wurden gemäß der EU-Richtlinie 86/609/EWG und dem nationalen Tierschutzgesetz mit Zustimmung des Ministers für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume Schleswig-Holsteins [V312-72241.122-13 (14-1/11)] durchgeführt. Es wurden 6 Wochen alte, weibliche, immunsupprimierte Nacktmäuse des Genus SHOTM (SHO; *SCID Hairless Outbread*), Crl: SHO-Prkdc^{scid}HR^{hr}, Zuchtcode 474, verwendet. Diese wurden von der Charles River GmbH (Sulzfeld, D) bezogen und stammten aus Zuchten des Lieferanten. Diese kurz als SCID-Mäuse bezeichneten Tiere sind durch einen schweren T- und B-Zell-Immundefekt (SCID; *Severe Combined Immune Deficiency*) gekennzeichnet und daher für Tumor-Xenograft-Modelle geeignet (Dalerba et al., 2007). Die Mäuse wurden während der experimentellen Phase unter sterilen Bedingungen bei 24°C und 35% Luftfeuchtigkeit in der Barriere 1 der Gemeinsamen Tierhaltung (GTH) der Universität zu Lübeck gehalten. Dabei wurden die Tiere in einzeln belüfteten Käfigen (ICVs; *Individually Ventilated Cages*) untergebracht und mit Nacktmaus-Futter und Trinkwasser versorgt, das mit 10% Glucosteril (Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg, D) versetzt wurde.

2.1.2 Zelllinien und Zellkulturmedien

Es wurden Zelllinien mit stammzellähnlichen Gliomzellen (SLGCs; *stem-like glioma cells*) eingesetzt. Diese Zelllinien wurden in der Arbeitsgruppe angelegt und werden in serumfreien Medium expandiert. Einige der Phänotypen wurden bereits publiziert (Choschick et al., 2014; Raju et al., 2015), andere sind in Bachelor- und Masterarbeiten beschrieben. Der Stammzellcharakter ist nach den Untersuchungen des Labors über bis zu 50 Passagen sehr stabil. Die Zellen sind kryokonservierbar und zeigen nach der Reaktivierung einen nahezu identischen Phänotyp wie vor dem Einfrieren, wobei allerdings der Stammzellcharakter der Kulturen in der Regel ansteigt. D.h. der Anteil an Sox2 stark positiven Zellen

nimmt nach Rekultivierung zu. Es wurden stets Zelllinien eingesetzt, deren Stammzellcharakter im Labor überprüft wurde.

Tab. 1: SLGC-Linien

Bezeichnung	Tumorart	Wachstum	TP53-Mutation	MGMT-Status	Tumorigen im Mausmodell
T1338-N	GBM	semi-adhärent	het-#	u	+
T1371-N	GSarc	semi-adhärent	+ (R175H)	u	+
T1389-N	GBM	adhärent mit Aggregaten	+	u	+
T1440-N	GBM	adhärent, Rosetten	-	m	+
T1447-N	GSarc	semi-adhärent	+ (N239D)	u/m	+
T1495-N	GBM	adhärent mi Aggregaten	+ (R273H)	m	+
T1522-N	GBM	adhärent	-	u/m	+
T1524-N	GBM	adhärent	<i>n.u.</i>	u/m	+
T1549-N	GBM	semi-adhärent	<i>n.u.</i>	u/m	+
T1556-N	GBM	Sphären	<i>n.u.</i>	<i>n.u.</i>	+
T1564-N	GBM	adhärent	<i>n.u.</i>	<i>n.u.</i>	+

GBM: Glioblastoma multiforme; GSarc: Gliosarkom; MGMT: Methylguanintransferase; m: methyliert; N: N-Linie (unter serumfreien Bedingungen kultivierte Zelllinie); het-#: heterogot mutiert in einer Subpopulation der T1338-Mutterkultur; n.u.: nicht untersucht; T: Tumor, u: unmethyliert; +: ja; -: nein

Als Kontrolle diente die Zelllinie U87MG (Uppsala 87 Malignes Gliom). Es handelt sich dabei um eine GBM-Zelllinie, die keinen Stammzellcharakter aufweist, den Tumorsuppressor p53 in Wildtypform exprimiert und in serumhaltigen Medium expandiert wird (Ishii et al., 1999; Lee et al., 2006).

Tab. 2: U87MG

Bezeichnung	Tumorart	Wachstum	TP53-Mutation	MGMT-Status	Tumorigen im Mausmodell
U87MG	GBM	adhärent	-	m	+

GBM: Glioblastoma multiforme; MG: Malignes Gliom; MGMT: Methylguanintransferase; m: methyliert; U: Uppsala; +: ja; -: nein

Tab. 3: Zellkulturmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung	Anwendung
F-Medium	DMEM/Ham's F12 (88%), FCS (10%), Penicillin/Streptomycin (1%), Amphotericin (1%)	Kultivierung von U87MG
Basismedium	DMEM/Ham's F12 (96%), L-Glutamin 200 mM (2%), Penicillin/Streptomycin (1%), Amphotericin (1%)	N - Medium, N - Stoppmedium
Serumfreies Stammzellmedium (N-Medium)	Basismedium (80%), BIT-9500 Serumersatz (20%), hu rEGF (20 ng/ml), hu rbFGF (20 ng/ml)	Kultivierung von SLGC-Linien
Stoppmedium	45 ml Basismedium, 5 ml FCS	Inaktivierung von Trypsin/EDTA

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's medium; FCS: Fetales Kälberserum, EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure; EGF: Epidermaler Wachstumsfaktor; bFGF: basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor; hu: human; r: rekombinant; SLGC: *stem-like glioma cells*; U87MG: Uppsala 87 Malignes Gliom

2.1.3 (Bio)Chemikalien, Wachstumsfaktoren, Puffer und Lösungen

Tab. 4: Biochemikalien, Chemikalien, Wachstumsfaktoren

Bezeichnung	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid 30%/0,8%	BioRad, München, D
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, München, D
Amphotericin B (1 ng/10µl)	PromoCell, Heidelberg, D
Basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF), human, rekombinant	PromoCell, Heidelberg, D
BIT-9500 Serumersatz	PELOBiotech GmbH, Planegg, D
Bradford Reagenz (5x konzentriert)	BioRad, München, D
Chloroquin	Sigma-Aldrich, München, D
Coomassie Brilliant Blue R 250	MP Biomedicals, Eschwege, D
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Roth, Karlsruhe, D
DMEM/Ham's F12-Medium, flüssig	Biochrom, Berlin, D
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt, D
Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), human, rekombinant	PromoCell, Heidelberg, D
Entellan Eindeckmittel	Merck, Darmstadt, D
Fluoromount Eindeckmittel	Southern Biotech, Birmingham, USA
Eosin G (1%)	Roth, Karlsruhe, D
FCS (Fetales Kälberserum)	Gibco BRL, Karlsruhe, D
Fibronektin (4µg/ml)	PromoCell, Heidelberg, D
Hämalaunlösung nach Mayer	Roth, Karlsruhe, D
L-Glutamin (200 mM)	PromoCell, Heidelberg, D
MTT (Thiazolylblau-Tetrazoliumbromid 98%)	Sigma-Aldrich, München, D
Penicillin/Streptomycin (1 ng/10µl)	PromoCell, Heidelberg, D
Propidiumiodid (PI) - Stammlösung (1 mg/ml in H ₂ O dest.)	Roth, Karlsruhe, D
PIC (Proteinase Inhibitor Cocktail)	Roche, Mannheim, D
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Merck, Darmstadt, D
RNAse A (100 mg/ml)	Roche, Mannheim, D
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (10-260 kDa, gefärbt), Proteinmolekulargewichtsmarker	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Supersignal West Detektionslösung für Western Blot	Pierce, Rockford, USA
Temodal® (Temozolomid)	Essex Pharma GmbH, München, D
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Sigma-Aldrich, München, D
Trockenmilchpulver	Becton Dickenson, Heidelberg, D
Trypanblau (0,5%)	Seromed, Berlin, D
Trypsin/EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure), 0,5%	Invitrogen-Gibco, Karlsruhe, D

Tab. 5: Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Lösung zum Verdünnen der Antikörper für die Immunhistologie	1x PBS mit 10 % FCS und 1 % Natriumazid
BrdU-Fixierlösung	70 ml 100% Ethanol + 23 ml H ₂ O bidest. + 6,7 ml 25% HCl
BrdU-Waschmedium	DMEM mit 2% FCS
BrdU-Nuklease-Lösung	1:100 Nukleaselösung in Inkubationspuffer (BrdU Kit)
Citratpuffer für Immunhistologie	41 ml Natriumcitrat + 9 ml Zitronensäure + 450 ml H ₂ O dest.
Coomassie-Entfärber	7,5 % Essigsäure, 25 % Ethanol
Coomassie-Färbelösung	0,1 % Coomassie R 250, 10 % Essigsäure, 50 % Ethanol
JLB-Lysepuffer für WCE (<i>whole cell protein extracts</i>)	50 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 10 % Glycerol, 0,5 % Triton-X-100
Laemmli Puffer (2x)	25 ml Sammelgelpuffer + 40 ml 10% SDS + 20 ml Glycerol (85%) + 10 ml β-Mercaptoethanol + 5 ml Bromphenolblau-Lösung (2,5%)
MTT-Lösung	50 mg MTT in 10 ml 1x PBS
MTT-Stopplösung	10 % SDS, 50 % N, N-Dimethylformamid, in H ₂ O dest.
PBS (10x) pH 7,4	80 g NaCl + 2 g KCl + 11,5 g Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O + 2 g KH ₂ PO ₄ , mit H ₂ O dest. auf 1000 ml
Propidiumiodid- (PI-)Färbelösung	40 µl PI – Stammlösung + 10 µl RNase + 950 µl 1xPBS
SDS-PAGE Elektrophoresepuffer (5x)	30 g Tris-Base und 144 g Glycin in 1,8 l H ₂ O dest. lösen, 100 ml 10% SDS zugeben, mit H ₂ O dest. auf 2000 ml
SDS-PAGE Sammelgelpuffer	12 g Tris-Base in 160 ml H ₂ O dest. lösen, mit HCl konz. auf pH 6,8 einstellen (mit HCl), 2 ml 10% SDS, mit H ₂ O dest. auf 200 ml
SDS-PAGE Trenngelpuffer	36,3 g Tris-Base in 160 ml H ₂ O dest. lösen, mit HCl konz. auf pH 8,8 einstellen (mit HCl), 2 ml 10% SDS, mit H ₂ O dest. auf 200 ml
TEN-Puffer (1x)	10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA (pH 8) 100 mM NaCl,
Western Blot Blockpuffer	1x PBS mit 1 % Trockenmilch
Western Blot Transferpuffer	5,8 g Tris-Base + 2,9 g Glycin + 10% SDS (v/v) zu 800 ml H ₂ O dest. + 200 ml Methanol
Western Blot Waschpuffer	500 µl Tween 20 in 1 l 1x PBS

BrdU: Bromdesoxyuridin; FCS: fetales Kälberserum; DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's medium; EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure; MTT: Thiazolylblautetrazoliumbromid; PAGE: *polyacrylamide gel electrophoresis*; PBS: *phosphate buffer solution*; SDS: *sodium dodecyl-sulfate*

Tab. 6: Kits

Bezeichnung	Hersteller
BrdU – Labelling and Detection Kit III	Roche, Mannheim, D
Cell Cycle Regulation Antibody Sampler Kit	Cell Signaling, Frankfurt, D
CytoTox 96® Non-Radio. Cytotoxicity Assay Kit	Promega, Madison, WI, USA

2.1.4 Antikörper

Tab. 7: Primärantikörper

Antikörper	Hersteller	Ursprungsorganismus	Verdünnung	MW des Proteins	Anwendung
αpan-Aktin (C4) mAb #1501	Chemicon	Maus	1: 1000	42 kDa	WB
αCDK4 (D9G3E) mAb#12790	Cell Signaling	Kaninchen	1: 1000	30 kDa	WB
αCDK6 (DCS83) mAb #3136	Cell Signaling	Maus	1: 1000	36 kDa	WB
αKU80 (C48E7) mAb #2180	Cell Signaling	Kaninchen	1: 100	80 kDa	IMH
αNestin (10C2) mAb #5326	Chemicon	Maus	1: 100	240 kDa	IMH
αp21 Waf1/Cip1 (12D1) mAb #2947	Cell Signaling	Kaninchen	1: 1000	21 kDa	WB
αp27 Kip1 (D69C12) XP® mAb #3686	Cell Signaling	Kaninchen	1: 1000	27 kDa	WB

α: Zeichen für Antikörper, CDK: Cyclin-abhängige Kinasen; IMH: Immunhistologische Färbung; kDa: Kilodalton; MW: Molekülmasse; WB: Western Blot Analyse

Tab. 8: Sekundärantikörper

Name	Hersteller	Verdünnung	Anwendung
αCy3™ 3-konjugierter Ziege-anti-Kaninchen IgG (H+L)	Jackson Immunotech	1: 300	IMH
αDyLight® (488) Ziege-anti-Maus IgG (H+L)	Thermo Scientific	1: 400	IMH
αZiege-anti-Kaninchen (GAR-) Peroxidase	Beckman Coulter	1: 5000	WB
αZiege-anti-Maus (GAM-) Peroxidase	Beckman Coulter	1: 10000	WB

Ig: Immunglobulin; H+L: reagiert mit der *heavy* und *light* chain des Immunglobulins; IMH: Immunhistologische Färbung; WB: Western Blot Analyse

2.1.5 Osmotische Pumpen

Zur intrazerebralen Applikation von Chloroquin (CQ) im Mausmodell wurden osmotische Pumpen genutzt (Alzet Brain Infusion Kit 3, Durect, Cupertino, USA). Dazu wurde eine Pumpe (100 µl Füllvolumen) subkutan auf dem Rücken der Tiere implantiert. Die osmotische Pumpe wurde über einen subkutanen Schlauch mit einer Infusionskanüle verbunden, die das Reagenz direkt in die Tumorzellinokulationsstelle beförderte. Die Förderrate betrug 0,11 µl/h und wirkte über den osmotischen Gradienten zwischen Pumpe und Gewebe. Um *in vivo* eine Chloroquinkonzentration von 40 µg/d zu erreichen, wurde eine sterile CQ-Lösung von 15,2 mg/ml mit H₂O dest. angesetzt. Die Applikationsdauer betrug 28 Tage. Parallel wurde den Mäusen oral Temozolomid verabreicht (siehe unten).

2.1.6 Weiteres Material

Für die Zellkultur wurde steriles Einmalplastikmaterial von Greiner bio-one, Frickenhausen, D bezogen: Pipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml), Mikrotiterplatten (96-Lochplatten), Zellkulturgefäße [25 cm² Flaschen (T25), 75 cm² Flaschen (T75), 10 cm Schalen], Einmalplastikröhrchen (10 ml) sowie Spitzen (200 µl, 1000 µl) für automatische Pipetten (Gilson P20/P200/P1000 von Gilson, Middletown, WI, USA und Labmate 10µl/100µl von HighTech, Warschau, PL). Spitzen (10 µl, 1-200 µl, 300 µl) für die 8-Kanal-Pipette (CAPP 5-50 µl, 50-300 µl; Starlab, Ahrensburg, D) stammten von Starlab, Ahrensburg, D. Reaktionsgefäße (0,75 ml, 1,5 ml, 2,2 ml) stammten von Eppendorf, Hamburg, D. Sterile Einmalspritzen (1 ml) wurden von B. Braun, Melsungen, D und sterile Kanülen (20G, 25G, 27G, 30G) von Becton Dickinson, Heidelberg, D bezogen. Objektträger (Superfrost) stammten von Roth, Karlsruhe, D und Deckgläser (24 x 50 mm) von Thermo Scientific, Braunschweig, D. Angaben zu weiteren Materialien und Geräten befinden sich im Text des Methodenteils.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle Zelllinien wurden in Zellbrutschränken bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre (Heraeus Hera Cell Inkubat 80, Heraeus, Hanau, D) kultiviert. Sowohl bei den N-Kulturen (stammzellähnliche Gliomzellen) als auch bei U87MG wurde 1/8 bis 1/4 des Mediums zwei- bis dreimal die Woche erneuert. Das Wachstum der Zellen wurde lichtmikroskopisch kontrolliert (Labovert FS, Leitz, Wetzlar, D).

Die Passage der adhärennten und semi-adhärennten Zellen erfolgte, sobald die Kulturen eine Konfluenz von mehr als 80% erreichten. Die Sphäroide wurden passagiert, sobald sich im Zentrum eine dunkle Verfärbung auszubilden begann. Bei den adhärennten Kulturen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1xPBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin/EDTA (T25; 2ml für T75) inkubiert, bis sie sich makroskopisch sichtbar ablösten. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml bzw. 2 ml Stoppmedium (Tab. 3) beendet. Dann wurde die Zellsuspension in ein Einmalplastikröhrchen überführt und zentrifugiert (5 min/ 250 x g/ Raumtemperatur). Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 1 ml Medium resuspendiert. Je nach Proliferationsgeschwindigkeit der Zelllinie wurde 1/2 bis 1/8 der Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche (T25) mit vorgelegtem Medium überführt. Bei den semi-adhärennten und sphärischen Kulturen wurde das Medium abgenommen und die darin schwimmenden Zellen für 5 min bei 250 x g und Raumtemperatur pelletiert, gewaschen und in 1 ml Trypsin/EDTA resuspendiert. Währenddessen wurden die im Zellkulturgefäß verbliebenen Zellen mit 1xPBS gewaschen und durch Zugabe von Trypsin/EDTA abgelöst. Das in Trypsin/EDTA suspendierte Zellpellet wurde mechanisch dissoziiert und mit Stoppmedium versetzt. Die Zellsuspension aus der Zellkulturflasche wurde hinzugefügt und es wurde erneut für 5 min bei 250 x g und Raumtemperatur zentrifugiert und danach die Zellen in 1 ml Medium resuspendiert.

Vor dem Ausplattieren der Zellkulturen wurden die 96-Lochplatten mit Fibronectin beschichtet, um die Adhärenz zu erhöhen. Dazu wurde eine Fibronectin-Stammlösung (4 µg/ml) 1:1000 mit sterilen 1xPBS verdünnt und 60µl pro Vertiefung auf den Platten verteilt. Die Platten inkubierten danach für mindestens 4 h bei 37 °C im Brutschrank. Anschließend wurde die Fibronectin-Lösung abgesaugt und die Platten zweimal mit sterilem 1xPBS gewaschen und mit sterilem 1xPBS überschichtet. Die Platten verblieben dann bis zum Gebrauch im Brutschrank.

Für die Behandlung mit Temozolomid (TMZ) und Chloroquin (CQ) wurden die Zellen in einer Dichte von $1 \times 10^4 / \text{cm}^2$ ausgesät. Hierzu wurden sie wie beim Passagieren geerntet. Nach dem Resuspendieren des Zellpelletes in 1 ml Medium wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau vermischt. Dieser Farbstoff ist in der Lage defekte Zellmembranen zu durchdringen und färbt somit tote Zellen blau,

wobei lebende Zellen ungefärbt bleiben. 10 µl dieses Gemisches wurden auf eine Neubauer-Zählkammer (Zählkammerfaktor 1×10^4 ; Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim, D) gegeben und die vitalen Zellen unter dem Lichtmikroskop gezählt. Es wurden Zellen in 96-Lochplatten (BrdU-ELISA, MTT-Test, Zytotoxizitätstest; siehe Seite 26 bis 28), 10 cm Schalen (Western Blot Analyse; siehe Seite 28) und T25-Zellkulturflaschen (Durchflusszytometrie; siehe Seite 30) plattiert.

Nach dem Ausplattieren wurde das Wachstum der Zellen täglich kontrolliert. Sobald eine Konfluenz von 70 % erreicht wurde, erfolgte bei den T25-Zellkulturflaschen und den 10cm Schalen die Behandlung mit TMZ und CQ. Dagegen wurden die 96-Lochplatten stets am folgenden Tag behandelt. Es wurde stets eine Lösungsmittelkontrolle mitgeführt, die 0,2% DMSO (Dimethylsulfoxid) bzw. 1% DMSO (96-Lochplatten) enthielt. Für BrdU-ELISA, MTT- und Zytotoxizitätsassay wurde eine konstante Konzentration des TMZ von 100 µM eingesetzt, während die Konzentrationen des CQ 5, 10 und 20 µg/ml betragen. Für die Behandlung der Proben für die Western Blot und durchflusszytometrischen Analysen wurden die TMZ-Konzentrationen in Abhängigkeit vom jeweiligen MGMT-Status der Zelllinien eingesetzt, während CQ stets in der Konzentration von 10 µg/ml appliziert wurde.

2.2.2 BrdU-ELISA

Der BrdU-ELISA bietet die Möglichkeit, die Proliferation von Zellen zu messen, indem er die DNA-Synthese während der S-Phase des Zellzyklus nachweist (Gratzner, 1982). Dies erfolgt durch den Einbau und Nachweis des Nukleotid-Analogons Bromdesoxyuridin (BrdU) anstelle von Thymidin.

Die eingesetzten Lösungen und Puffer stammten zum größeren Teil aus dem „5'-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit III“ (Roche, Mannheim, D). An definierten Tagen nach der TMZ- und CQ-Behandlung und BrdU-Zugabe wurden die Zellen zunächst fixiert und permeabilisiert und danach die DNA für den Antikörper zugänglich gemacht. Als Antikörper diente ein muriner monoklonaler Peroxidase-gekoppelter Antikörper, der an das inkorporierte BrdU in der DNA bindet. Im letzten Schritt wurde das Substrat ABTS (2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) hinzugefügt, welches von der Peroxidase in ein grünes Radikalkation umgesetzt wird. Dessen Konzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 405$ nm im ELISA-Reader (UVM 30, Asys Hi-Tech GmbH/LKB Biochrom, Berlin, D) gemessen (Referenzwellenlänge $\lambda = 490$ nm).

Jede Zelllinie wurde an Tag d4 und Tag d6 nach Behandlung analysiert. Am Tag der Behandlung (Tag d0) wurde 4 h nach Applikation von TMZ und/oder CQ die BrdU-Lösung hinzugefügt. Das BrdU (Kit-Komponente) wurde 1:90 mit sterilem 1xPBS verdünnt. 10 µl dieser Verdünnung wurden in jede Vertiefung gegeben, sodass BrdU in einer Konzentration von 10 µM vorlag. Bis zur Analyse wurden die 96-Lochplatten bei 37°C und 5% CO₂ im Zellkulturbrutschrank inkubiert.

Am Tag der Messung wurde das Medium aus den Vertiefungen entfernt und die Zellen zweimal mit jeweils 250 μl BrdU-Waschmedium (Tab. 5) gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe von auf -20°C temperierter BrdU-Fixierlösung (Tab. 5) und eine Inkubation für 30 min bei -20°C . Danach wurde die Fixierlösung abgesaugt und die Zellen erneut dreimal mit je 250 μl BrdU-Waschmedium gewaschen. Anschließend wurden 100 μl einer Nuklease-Verdünnung (1:100 mit Inkubationspuffer) in jede Vertiefung gegeben. Es folgte eine Inkubation für 30 min bei 37°C . Die Nuklease wurde abgesaugt und die Zellen wiederum dreimal mit 250 μl BrdU-Waschmedium gewaschen. Es folgte die Zugabe von 100 μl BrdU-Antikörper-Lösung (1:100 Verdünnung mit Waschpuffer), welche erneut für 30 min bei 37°C inkubierte. Die Antikörperlösung wurde entfernt und es wurde wiederum dreimal mit 250 μl BrdU-Waschmedium gewaschen. Danach wurden je 100 μl des Peroxidasesubstrates ABTS pro Vertiefung pipettiert. Durch Oxidation bildet ABTS ein grünes Radikalkation, welches nach 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90, 120, 150 und 180 min photometrisch im ELISA-Reader unter der Verwendung der Software MikroWin 2000 (Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath, D) gemessen wurde. Die zellfreien Reihen 1 und 12 dienten als Leerwerte. Die Absorption korreliert direkt mit der Menge des inkorporierten BrdUs. Es wurde jeweils eine komplette Messserie ausgewählt und in Microsoft Excel ausgewertet. Bei der Auswertung wurde die „optische Dichte“ (OD) der DMSO- bzw. unbehandelten Kontrolle als 100% definiert und die Messwerte der behandelten Zellreihen als relative ODs darauf bezogen. Dabei wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben.

2.2.3 MTT-Test

Der MTT-Test bestimmt die Menge von NADH/NADPH, welche als Koenzyme an vielen zellulären Prozessen beteiligt sind, u.a. an den Redoxreaktionen von Glykolyse und Zellatmung und an anabolen Reaktionen wie Fettsäure- und Cholesterinsynthese (Mosmann, 1983). Der NADH/NADPH-Gehalt stellt also einen Parameter für den zellulären Stoffwechsel dar. Beim MTT-Test sind NADH/NADPH an der Reduktion des gelben Tetrazols MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid) zu dem purpurfarbenen Formazan beteiligt.

Die Vitalität wurde an Tag d4 und d6 der Behandlung bestimmt. Am Tag der Analyse wurden 10 μl der MTT-Lösung (Tab. 5) in die Vertiefungen pipettiert. Dieser Schritt erfolgte wie die folgenden Schritte in abgedunkelter Umgebung, um den Farbstoff zu schützen. Nach MTT-Zugabe folgte eine Inkubation von 4 h im Zellkulturbrutschrank. Anschließend wurde die Redoxreaktion durch Zugabe von 100 μl MTT-Stopplösung (Tab. 5) beendet und die Platte für weitere 20 min bei Raumtemperatur gehalten. Die Extinktionsmessung erfolgte nach 20 min, 40 min und 24h bei einer Wellenlänge von $\lambda = 570 \text{ nm}$ im ELISA-Reader (Referenzwellenlänge $\lambda = 655 \text{ nm}$) unter Verwendung der Mikrowin 2000 Software. Die Auswertung mit Microsoft Excel umfasste wie bei dem BrdU-ELISA die Angabe von Mittelwert und

Standardabweichung sowie die Normalisierung der Proben gegen die DMSO- bzw. unbehandelte Kontrolle.

2.2.4 Zytotoxizitätstest

Der Zytotoxizitäts-Test bestimmt die Konzentration der Laktatdehydrogenase (LDH). Die LDH ist ein ubiquitär vorhandenes Enzym und wird bei der jeglicher Schädigung von Zellen durch die defekte Membran freigesetzt (Korzeniewski und Callewaert, 1983).

Es wurde das „*CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay*“ - Kit der Firma Promega (Madison, WI, USA) verwendet. Der Test wurde am Tag d4 und d6 nach Behandlung mit TMZ und/oder CQ durchgeführt. Wie der MTT-Test beruht auch der LDH-Test auf der Konversion eines Tetrazoliumsalses in das korrespondierende Formazan und wird daher in abgedunkelter Umgebung durchgeführt. Am Tag der Messung wurde die 96-Lochplatte für 4 min bei 250 x g und 4°C zentrifugiert. Dann wurden 50 µl des Überstandes in eine neue 96-Lochplatte überführt und die Zellen verworfen. 50 µl des Substratmixes (Kit-Komponente), der das Tetrazoliumsals INT (2-(4-Iodophenyl) -3-(4-nitrophenyl) -5-phenyl-2H-tetrazoliumchlorid) enthält, wurden zu den 50 µl des Zellüberstandes pipettiert. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl einer Stopplösung (Kit-Komponente) beendet. Die Extinktion wurde sofort im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von $\lambda=490$ nm gemessen. Die Messung erfolgte unter Anwendung der Mikrowin 2000 Software und die Auswertung wie bei dem BrdU-ELISA und MTT-Test mit Microsoft Excel.

2.2.5 Proteinextraktion und Western Blot Analyse

Es wurden Western Blot Analysen durchgeführt, um die Auswirkungen von TMZ und CQ auf die Proteinexpression der SLGC-Linien zu bestimmen. Untersucht wurden Regulatoren des Zellzyklus, die Cyclin-abhängigen Kinasen 4 und 6 (CDK 4/6) und die CDK-Inhibitoren p21^{CIP1} und p27^{WAF1}.

Wie oben beschrieben wurden die Zellen in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät, mit TMZ und CQ behandelt und am Tag d4 nach der Behandlung geerntet. Um die Zellen zu ernten wurde das individuelle Wachstumsverhalten beachtet. Adhärenente Zellen wurden zweimal mit 5-10 ml kalten sterilen 1xPBS gewaschen und auf Eis gehalten. Anschließend wurde 1 ml kaltes steriles 1xTEN (Tab. 5) in die Schalen gegeben und die Zellen mithilfe eines Silikonspatels abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und für 1 min bei 1.000 x g und Raumtemperatur in der Tischzentrifuge (5415C, Eppendorf, Hamburg, D) pelletiert. Die Zellpellets wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert. Im Falle von semi-adhärenenten Kulturen oder Sphäroiden wurde das Medium mit den Zellen in Röhrchen überführt und durch Zentrifugieren pelletiert (15 min, 250 x g, 4°C). Das Pellet wurde mit

1xPBS gewaschen und in 1xTEN resuspendiert. Bei Mischkulturen wurden die durch Zentrifugieren geernteten Zellen mit der mittels Silikonspatel geernteten Zellsuspension zusammengeführt.

Zur Herstellung der Gesamtzellproteinextrakte (WCE; *whole cell extract*) wurde das Zellpellet in JLB-Lysepuffer (Tab. 5) resuspendiert. Das Volumen war von der Größe des Zellpelletes abhängig und wurde so gewählt, dass die zu erwartende Proteinkonzentration nicht unter 1 µg/µl lag. Dem Lysepuffer wurden kurz vor Gebrauch PIC (Proteinaseinhibitorcocktail; Endkonzentration 1 µl/ml Puffer) und PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid; Endkonzentration 2 µl/ml JLB-Puffer) zugesetzt. Nach Resuspendieren der Pellets in JLB-Puffer (PIC/PMSF) wurden die Zellen für 25 min auf Eis inkubiert. Die Zellbruchstücke wurden anschließend für 10 min bei 18.000 x g und 4°C pelletiert. Der Überstand mit den Proteinen wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Methode nach Bradford verwendet (siehe Maniatis et al., 1989). Dazu wurden 2 µl der WCE-Lösung in 800 µl 1x PBS pipettiert und mit 200 µl 5x Bradford Reagenz (Tab. 4) versetzt. Nach 20 min wurde die Extinktion bei $\lambda = 595$ nm gegen einen Leerwert (800 µl 1x PBS und 200 µl 5x Bradford Reagenz) gemessen. Die Proteinkonzentrationen wurden mit einer Eichkurve ermittelt, welche zuvor anhand von Serumalbuminverdünnungen erstellt wurde. Um die WCEs weiter zu charakterisieren, wurden 5 µl in einem analytischen Polyacrylamid-SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei wurde die diskontinuierliche, denaturierende Gelelektrophorese nach Laemmli angewandt (Maniatis et al., 1989). Es wurden Trenngele mit einer Acrylamidkonzentration von 10% und Sammelgele mit einer Acrylamidkonzentration von 4% verwendet (Tab. 9). Die Färbung der analytischen Gele wurde nach Standardprotokoll mit Coomassie Brilliant Blue durchgeführt (Maniatis et al., 1989).

Tab. 9: Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE

Komponente	15%-iges Trenngel	10%-iges Trenngel	4%-iges Sammelgel
H ₂ O	1,2 ml	2 ml	1,8 ml
Trenngelpuffer (Tab. 5)	1,25 ml	1,25 ml	-
Sammelgelpuffer (Tab. 5)	-	-	750 µl
Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0,8%)	2,5 ml	1,66 ml	400 µl
10% APS	50 µl	50 µl	15 µl
TEMED	3 µl	3 µl	4 µl

APS: Ammoniumpersulfat; SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*; TEMED: Tetramethylethyldiamin

Für die Western Blot Analyse wurden für alle Antikörper 15 µg WCE pro Spur eingesetzt. In Abhängigkeit des zu untersuchenden Proteins wurde ein 10%-iges (CDK4, CDK6) bzw. 15%-iges (p21^{Cip1}, p27^{WAF1}) Trenngel verwendet (Tab. 9). Als Proteinlängenstandard wurde *Spectra Multicolor Broad Range marker protein* parallel aufgetrennt.

Nach der Auftrennung wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Dazu wurde das Gel zunächst für 10 min in Transferpuffer (Tab. 5) inkubiert. Dann erfolgte der Transfer nach der „semi-dry“-Methode gemäß folgendem Aufbau: drei Blotpapiere (Schleicher und Schuell Bioscience, Dassel, D), Nitrocellulosemembran (BioRad, München, D), SDS-Gel und erneut drei Blotpapiere. Alle Komponenten wurden in Transferpuffer getränkt und luftblasenfrei über einander geschichtet. Der Transfer erfolgte für eine Stunde bei 12 V im Transblot SD (BioRad München, D). Anschließend wurde das SDS-Gel zur Kontrolle des erfolgreichen Transfers mit Coomassie gefärbt. Die Nitrocellulosemembran wurde für 15 min in 1% Blockpuffer (Tab. 5) bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (Tab. 7) erfolgte in 1% Blockpuffer (Tab. 5) über Nacht bei 4°C. Danach wurde die Antikörperlösung entfernt und die Nitrocellulosemembran dreimal für 10 min in Western Blot - Waschpuffer (Tab. 5) gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (Tab. 8) für 1 Stunde in 1% Blockpuffer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren Waschschritten für dreimal 10 min erfolgte die Detektion mit 800 µl Western Blot Detektionslösung (Tab. 4) pro Membran am ChemiDoc XRS (BioRad, München, D). Bei der Detektion setzt die Antikörper-gekoppelte Peroxidase in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid das Substrat Luminol um. Die dabei entstehende Chemilumineszenz wird von einer sensitiven Kamera detektiert und die Signalintensität mithilfe der Software QuantityOne (BioRad, München, D) gemessen. Nach der Detektion wurde die Membran nochmals dreimal mit Waschpuffer gewaschen und bis zur Weiterverwendung bei -20°C aufbewahrt. Um die Expressionslevel der veränderten Proteine zu quantifizieren wurde die Membran zunächst mit einem Antikörper gegen ein *house keeping* Protein inkubiert. Als Ladekontrolle diente hier Aktin. Die Membran wurde typischerweise am Folgetag erneut bei -4°C über Nacht mit dem pan-Aktin-Antikörper inkubiert und wie beschrieben detektiert. Es wurden die Intensitäten der Signale von Primärantikörpern und Ladekontrolle unter Subtraktion der Hintergrundintensität ermittelt. Die Werte der Antikörper-Signale wurden durch die korrespondierenden Werte der Aktin-Signale dividiert. Die gegen Aktin normalisierten Werte wurden graphisch dargestellt.

2.2.6 Durchflusszytometrische Analyse

Die Durchflusszytometrie wurde zur Analyse des Zellzyklus verwendet. Das Prinzip dieser Untersuchung beruht auf der Messung von Lichtsignalen einer Zelle während diese einen Laserstrahl passiert. Das Streulicht und Fluoreszenzemissionen werden von mehreren Detektoren gemessen, sodass verschiedene physikalische Parameter der Zelle abgeleitet werden können. Das Vorwärtsstreulicht korreliert mit der Zellgröße und das Seitwärtsstreulicht erlaubt Rückschlüsse auf Granularität und Membranstruktur (Givan, 2001). Um den Zellzyklus zu untersuchen, wurden die Zellen mit Propidiumiodid (PI) gefärbt, dessen Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von $\lambda = 575$ nm detektiert wird. Propidiumiodid

interkaliert in Nukleinsäuren und dient somit zur Messung des DNA-Gehaltes von Zellen. So können Rückschlüsse auf den Anteil toter Zellen in einer Population und auf den Zellzyklus gezogen werden. In der G₀- und G₁-Phase besitzen die Zellen einen diploiden Chromosomensatz, in der S-Phase wird die DNA verdoppelt, sodass in der darauffolgenden G₂-Phase ein tetraploider Satz vorliegt.

Die Tumorzellen wurden wie oben beschrieben in einer Dichte von 1×10^4 Zellen/cm² in T25-Zellkulturflaschen ausgesät und mit TMZ und/oder CQ behandelt. Zwei Tage nach der Behandlung wurden die Zellen durch Trypsinieren geerntet, in Reaktionsgefäße überführt und für 5 min bei 250 x g und Raumtemperatur pelletiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert, wobei sie stets auf Eis gehalten wurden. Zuerst wurde das Pellet kurz auf dem Vortexmischer (Vortex Genie 2, Bender und Hobein AG, Zürich, CH) aufgelockert, dann wurde es mit 500 µl Ethanol-Eisessig (95:5/v:v) versetzt, erneut aufgelockert und anschließend sorgfältig resuspendiert. Es folgte eine Inkubation für 5 min auf Eis. Danach wurde für 1 min bei 1.000 x g und Raumtemperatur in der Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Das Pellet wurde mit 500 µl kaltem DMEM mit 2 % FCS versetzt und vollständig resuspendiert. Danach wurde zweimal mit 500 µl 1x PBS gewaschen, wobei stets wie oben beschrieben zentrifugiert wurde. Zuletzt wurde das Zellpellet in 250 µl 1x PBS resuspendiert und über den CellTrics-Filter (Partec GmbH, Görlitz, D) von Aggregaten gereinigt. Der Filter wurde mit 250 µl 1x PBS nachgespült.

Mindestens 5 min vor der Messung wurden 10 µl der PI-Färbelösung (Tab. 5) hinzugegeben. Die Messung erfolgte im „Benchtop Analyser“ LSR II (Becton Dickinson; CAnACore-Facility, Institut für systemische Entzündungsforschung). Es wurden jeweils 10^4 Zellen gezählt. Die Auswertung erfolgte mit der Software BD FACS Diva Software Version 6.1 und die Darstellung der Daten in Punktwolkendiagrammen und Histogrammen.

2.2.7 Xenotransplantation von SLGCs und Doppelbehandlung mit TMZ/ CQ

Für die Xenotransplantation wurden die humanen Gliomzellen mithilfe von Trypsin/EDTA geerntet (siehe Seite 25). Nach der Zentrifugierung wurden die Zellen zweimal in 1 ml N-Medium gewaschen. Die Anzahl vitaler Zellen wurde mittels Trypanblau-Färbung in der Neubauerzählkammer ermittelt. Dann wurden die Zellen in einer Konzentration von 25.000 Zellen/µl in N-Medium resuspendiert und auf Eis gehalten.

Für die Inokulation der Zellen wurden die SCID-Mäuse sediert. Dazu wurde eine 0,9%-ige NaCl-Lösung angesetzt, die 120 mg Ketamin (Ketavet, Pharmacia GmbH, Berlin, D) zur Analgosedierung und 18,66 mg Xylazin (Rompun, Bayer, Leverkusen, D) zur Analgesie und Muskelrelaxation enthielt. Die sedierende Lösung wurde in einer Konzentration von 0,01 ml/g Körpergewicht intraperitoneal verabreicht. Die sedierten Mäuse wurden im stereotaktischen Rahmen (430005-S-1, TSE Systems, Steißlingen, D)

mit Stellschrauben rostral und temporal fixiert. Der Schädelknochen wurde durch eine ca. 1 cm lange mediane Sagittalinzision freigelegt und das Periost vorsichtig vom Knochen gelöst. Mithilfe einer 27G Kanüle wurde 2 mm rechts lateral der Sutura sagittalis und 1 mm occipital der Sutura coronalis ein Loch in den Schädelknochen gebohrt. Danach wurde die vertikal am stereotaktischen Rahmen angebrachte Hamilton-Pipette (Gastight 1705 RN; Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, CH) 3 mm tief in das Gehirngewebe gesenkt und vorsichtig 4 μ l der Zellsuspension injiziert. Die Pipette verblieb ca. 1 min im Gewebe, um einen Sog auf die Zellen durch zu eiliges Entfernen der Pipette zu vermeiden. Der Knochendefekt wurde mit Knochenwachs (Johnson und Johnson Intl., St. Stevens-Woluwe, BE) verschlossen und die Wunde mit 2 bis 3 Einzel-Knopf-Nähten [Ethilon*II 3-0 (Polyamid, nicht resorbierbar), Johnson und Johnson Intl., St.Stevens-Woluwe, BE) versorgt. Um eine Unterkühlung zu vermeiden, wurden die Mäuse nach der Prozedur unter eine Infrarot Wärmelampe gelegt; die Augen wurden zur Infektionsprophylaxe mit einer Dexpanthenol-Salbe (Dexpa-nasal, Nestmann Pharma GmbH, Zapfendorf, D) versehen. Die Mäuse wurden durch Ohrenmarkierungen gekennzeichnet.

Das Gewicht der Mäuse wurde alle 2 bis 3 Tage kontrolliert (Waage: 1403-C-MP7-2; Sartorius AG, Göttingen, D), um das Auftreten einer Tumorkachexie zu detektieren. Nach einigen Wochen des Tumorstadiums (abhängig von der implantierten Zelllinie) wurden die Mäuse 28 Tage lang parallel mit TMZ und CQ behandelt. Dazu wurden sie in drei Gruppen eingeteilt: Eine Gruppe erhielt TMZ und CQ, die zweite Gruppe TMZ als Monotherapie und die letzte Gruppe blieb unbehandelt. Um sicher zu gehen, dass CQ die orthotopen Tumore im Mausgehirn erreicht, wurde die Applikation über Alzet-Pumpen gewählt. Für TMZ ist bekannt, dass oral appliziertes TMZ über die Blut-Hirn-Schranke gelangt. Daher war die orale Gabe von TMZ sinnvoll.

Zur Implantation der osmotischen Alzet-Pumpen für die Applikation des CQ wurden die Mäuse wie bei der Inokulation der SLGCs analgosediert. Pumpe und Schlauch wurden luftblasenfrei mit steriler CQ-Lösung (15,2 mg/ml in H₂O dest.) gefüllt. Der Schlauch wurde mit dem Fluss-Regler und der Infusionskanüle verbunden. Anhand der Infusionskoordinaten und der Lage der Pumpe wurde die Länge des Schlauches angepasst, wobei ca. 25% mehr Länge einberechnet wurde, damit Kopf und Hals der Maus frei beweglich blieben. Zuletzt wurde die Pumpe mit dem Fluss-Regler verbunden. Der Schädelknochen wurde mit einer 2 cm langen medianen Sagittalinzision freigelegt. Die noch sichtbare Inokulationsstelle wurde aufgesucht, vom Periost befreit und trocken getupft, um einen sicheren Halt der Infusionskanüle zu gewährleisten. Anschließend wurde auf dem Rücken der Maus mithilfe einer Schere eine subkutane Tasche geformt, deren Größe so gewählt wurde, dass die Pumpe leicht beweglich war, aber nicht zur Flanke hin abgleiten konnte. Die Inokulationsstelle wurde mithilfe einer Kanüle erneut eröffnet, die Pumpe in die subkutane Tasche geschoben und die Infusionskanüle in die Inokulationsstelle gesenkt. Die Wunde wurde mit Einzel-Knopf-Nähten verschlossen und die Mäuse unter die Wärmelampe gelegt und mit Augensalbe behandelt.

Mit der TMZ-Behandlung wurde zwei Tage nach Implantation der Alzet-Pumpen begonnen, da die osmotischen Pumpen erst nach 48h ihre endgültige Förderungsrate erreichen. Es wurde eine TMZ-Lösung mit 10 mg/ml in H₂O angesetzt. Dazu wurden Temodal®-Kapseln in Leitungswasser gelöst. Wegen ihrer schlechten Löslichkeit verblieb die TMZ-Suspension für mindestens 2 h auf einem Rotator. Jede Maus erhielt pro Tag 0,2 ml der TMZ-Lösung, die oral mit einer Fütterungssonde (Knopfkanüle, gebogen; Param GmbH, Hamburg, D) verabreicht wurden.

Nach 28 Tagen Behandlung wurde das Experiment beendet und die Mäuse geopfert. Sobald eine Maus einen Gewichtsverlust von mehr als 10 % zeigte, wurde sie bereits früher aus dem Experiment genommen und nach Anleitung des Fachpersonals der Tierhaltung geopfert. Es erfolgte die sofortige Entnahme des Gehirns. Dazu wurde die Maus mit einer Hand fixiert und die Nackenmuskulatur und Schädeldecke durchtrennt. Die Kopfhaut wurde durch einen Sagittalschnitt in der Medianlinie gespalten. Anschließend wurde die Schädeldecke vorsichtig von okzipital über parietal nach rostral mit einer Schere durchgeschnitten. Mit dem Trennen der Sutura coronalis konnte die Schädeldecke komplett abgelöst und abgehoben werden. Zur vollständigen Entnahme des Gehirns wurden die Nervi Optici durchgeschnitten und das Gehirn auf Höhe des Hirnstammes vom Rückenmark getrennt. Das Gehirn wurde in 4% Formaldehyd gelegt, das nach 24 h gegen 70% Ethanol ausgetauscht wurde. Das Gehirn verblieb bis zur Paraffineinbettung in Ethanol.

2.2.8 Histologische Methoden

Die fixierten Mausgehirne wurden in Paraffin eingebettet (Labor der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie). Dazu wurden die fixierten Gehirne ca. 1 mm hinter der sichtbaren Inokulationsstelle in der Koronarebene in zwei Hälften geteilt. Die Gehirnhälften wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und anschließend in geschmolzenes Paraffin gegeben (Tab. 10). Dieser Prozess wurde automatisch von dem „ASP300 S Tissue Processor“ (Leica, Bensheim, D) durchgeführt. Nach Aushärten des Paraffins, wurden die Blöcke bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

Tab. 10: Programm des "ASP300 S Tissue Processor"

Chemischer Stoff	Temperatur	Zeit
70% Ethanol	40°C	0,5 h
80% Ethanol	40°C	1 h
96% Ethanol (2x)	40°C	1 h / 1 h
100% Ethanol (3x)	40°C	1 h / 1,5 h / 1 h
Xylen (2x)	40°C/ 45°C	1 h / 1h
Paraffin (3x)	62°C	1 h / 1 h / 1 h

Für das Schneiden der Paraffinblöcke am Mikrotom (Leica RM2245, Leica Biosystems, Nussloch, D) wurde eine Schnittdicke von 4,5 µm gewählt. Pro Region des Mausgehirns wurden mindestens 4 Objektträger mit Koronarschnitten angefertigt. Die gewählten Gehirnregionen lagen ca. 100 µm auseinander. Entsprechend der Inokulationskoordinaten wurde der Tumor in der Region erwartet, in der sich das Corpus callosum vollständig und die Ventrikel senkrecht darstellen. Die Schnitte wurden im Paraffinstreckbad (Medax GmbH und Co. KG, Neumünster, D) geglättet und auf die Objektträger gezogen. Die Präparate wurden bei Raumtemperatur getrocknet und gelagert.

Zur Analyse der Mausgehirne wurden zwei histologische Färbungen verwendet, zum einen die Hämalaun-Eosin (HE)-Färbung und zum andern die immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen Nestin und KU80 (Tab. 7).

Die HE-Färbung diente als Übersichtsfärbung, um die Präparate auf das Vorhandensein von Tumoren zu untersuchen. Hämalaun ist ein basischer Farbstoff, der saure bzw. basophile Strukturen wie DNA und Ribosomen blau anfärbt. Eosin dagegen färbt basische bzw. azidophile Zellstrukturen wie die Proteine des Zytoplasmas und Mitochondrien rot an (Culling, 1974). Zunächst wurden die Präparate entparaffiniert (Tab. 11).

Tab. 11: Entparaffinieren von Paraffinschnitten

Chemischer Stoff	Zeit
100% Xylol	10 min
100% Xylol	10x 1 Sek
100% Ethanol (2x)	10x 1 Sek / 10x 1 Sek
96% Ethanol (2x)	10x 1 Sek / 10x 1 Sek
70% Ethanol (2x)	10x 1 Sek / 10x 1 Sek
50% Ethanol (2x)	10x 1 Sek / 10x 1 Sek

Der Alkohol wurde mit deionisiertem Wasser entfernt. Anschließend folgte eine 10 min Inkubation in Hämalaun mit anschließendem „Bläuen“ für 15 min mit lauwarmem Wasser. Die Inkubation in Eosin erfolgte für 2 min. Im Anschluss wurden die Präparate dehydriert (Tab. 12) und mit Entellan eingedeckt. Die HE-Präparate wurden bei Raumtemperatur getrocknet und gelagert.

Tab. 12: Dehydratation von Paraffinschnitten

Chemischer Stoff	Zeit
70% Ethanol	1x 1 Sek
96% Ethanol (2x)	1x 1 Sek / 1x 1 Sek
100% Ethanol (2x)	1x 1 Sek / 1x 1 Sek
100% Xylol	1x 1 Sek
100% Xylol	10 min

Die immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen Nestin und KU80 diente dem Nachweis humaner Tumorzellen im Mausgehirn zur differenzialdiagnostischen Abklärung der HE-Befunde. Zu Anfang wurden die Paraffinschnitte wie bei der HE-Färbung entparaffiniert (Tab. 11). Nach dem Waschschrift in deionisiertem Wasser erfolgte die Inkubation für 10 min in 1xPBS. Anschließend wurden die Präparate durch Erhitzen demaskiert. Dazu wurden die Objektträger in einen Schnellkochtopf mit Citratpuffer (Tab. 5) gegeben und für 15 min im BIO-Modus erhitzt. Anschließend kühlten die Präparate für 30 min bei Raumtemperatur ab. Die Schnitte wurden zweimal für 5 min in 1xPBS gewaschen, bevor sie mit der Antikörperlösung (Tab. 5) mit dem Primärantikörper versetzt wurden. Die Antikörper und Verdünnungen sind Tabelle 7 und 8 zu entnehmen. Vor Zugabe der Primärantikörperlösung wurden die Gewebestücke mit einem xylolhaltigen Fettstift umrandet. Es wurden pro Schnitt 25 µl des Antikörperansatzes pipettiert, welcher über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am Folgetag erfolgten alle Arbeitsschritte zum Schutz der fluoreszierenden Sekundärantikörper in Dunkelheit. Zunächst wurden die Objektträger dreimal mit 1xPBS gewaschen. Dann wurden 25 µl des Sekundärantikörperansatzes auf die Gewebestücke pipettiert und 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Es wurde erneut dreimal mit 1xPBS gewaschen und dann 25 µl einer DAPI-Lösung pro Schnitt aufgetragen. Die folgende Inkubation wurde für 10 min bei Raumtemperatur durchgeführt. DAPI (4',6'-Diamidin-2-phenylindol) ist ein Farbstoff zur Darstellung der Nuclei. Es wurde eine 1:200 Verdünnung mit 1xPBS einer Stammlösung (10 mg/ml) eingesetzt. Die Schnitte wurden danach zweimal mit 1xPBS gewaschen und anschließend mit Fluoromount eingedeckt. Bis zum Mikroskopieren wurden die Präparate bei -20°C gelagert. Zum Mikroskopieren wurde das Fluoreszenz Mikroskop Biozero BZ 8000 (Keyence, Neu-Ilseburg, D) und die Software „BZ observation“ verwendet.

2.2.9 Auswertung und Statistik

Für alle Experimente gilt, dass die Zellqualität der Präparate variiert. Die primäre Ursache dafür ist das unterschiedliche Ausmaß der Bildung von Aggregaten und Sphäroiden. Zellen im Inneren der Aggregate tendieren aufgrund von Hypoxie zur Differenzierung und/oder Zelltod. Solche Zellen wachsen nach dem Plattieren nicht an und erzeugen keine Tochterzellen. Weiterhin ist die enzymatische und mechanische Vereinzelung von Zellen aus Aggregaten und Sphäroiden problematisch. Eine zu lange und robuste Behandlung führt zum Absterben von Zellen, eine zu kurze und vorsichtige Behandlung führt zum Verbleib von Aggregaten, die nachfolgend sowohl die Analyse als auch das zahlenmäßig genaue Plattieren von Zellen beeinflussen. Für vorwiegend adhärenente Zelllinien ist diese Tatsache wenig gravierend. Für die semi-adhärenenten und als Sphäroide wachsenden Zelllinien ist diese Problematik bedeutsam, variiert in der Relevanz jedoch von Zelllinie zu Zelllinie. Demzufolge sind immer nur die

Experimente einer Serie direkt miteinander vergleichbar. Alle Experimente wurden mindestens zweimal, in Einzelfällen bis zu fünfmal wiederholt.

Für die Auswertung von BrdU-ELISA, MTT-Test und Zytotoxizitätstest wurde eine graphische Darstellung gewählt. Es wurden die Mittelwerte aus 8 Einzelwerten einer Messreihe und die Standardabweichungen errechnet und die Werte auf Normalverteilung geprüft. Die Ermittlung statistisch signifikanter Unterschiede innerhalb von Behandlungsgruppen erfolgte mittels ANOVA (*analysis of variance*) mit anschließender „Bonferroni-Korrektur für multiples Testen“ (Simes, 1986). Weiterhin wurde für den Vergleich isolierter Messwertreihen der zweiseitige T-Test angewendet. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung sind in den Abbildungen im Ergebnisteil, sowie in Abbildungen und Tabellen im Anhang dargestellt. Weitere statistische Vergleiche werden im Text erwähnt. Es wurden die Signifikanzniveaus $p < 0,05$ (*) und $p < 0,005$ (**) angegeben.

Empirische Analysen unserer Arbeitsgruppe und anderer Labore zeigen, dass verschiedene Western Blot Filter nur vergleichbar sind, wenn sie zeitgleich geblottet, inkubiert und detektiert werden. Selbst unter diesen Umständen können Inhomogenitäten zu Abweichungen führen, sodass nur Proben auf demselben Filter direkt vergleichbar sind. Daher wurde für die Auswertung der Western Blot Analysen keine Statistik durchgeführt, sondern der empirisch ermittelte systemische Fehler angegeben. Dieser liegt für die Methode und die hier verwendeten Antikörper unter 10%.

Für die durchflusszytometrischen Analysen wurde ebenfalls der empirisch bestimmte systemische Fehler angegeben. Aufgrund der pro Ansatz zu analysierenden Zellzahl (8.000 - 10.000 Zellen) ist eine parallele Mehrfachbestimmung nicht realisierbar. Wie oben dargelegt ist der statistische Vergleich von unabhängigen, experimentellen Serien nicht sinnvoll.

Bei den *in vivo* Versuchen wurde bei Analyse von Gewichtsentwicklung und Versterben der Mäuse der Standardfehler angegeben, um Aussagen über die Genauigkeit des Mittelwerts in den Behandlungsgruppen zu treffen. Da es sich um genetisch identische Versuchstiere handelte, sollten Unterschiede zwischen den Gruppen allein auf der Versuchsanordnung beruhen. Dabei fielen besonders bei der Messung des Körpergewichtes Ungenauigkeiten auf, da sich die Mäuse je nach Agitiertheit auf der Waage bewegten und sich so z.T. Schwankungen des gemessenen Gewichts um 1 g ergaben. Bei den histologischen Auswertungen wurde auf eine statistische Analyse verzichtet, da bei den Versuchen mit TMZ und CQ nur wenige Tumore generiert werden konnten, welche zufällig innerhalb der Gruppen verteilt schienen und weil das Auftreten von Entzündungen anhand der Klinik eindeutig mit der Implantation der Alzet-Pumpen zusammenhing.

3 Ergebnisse

3.1 Effekte von Chloroquin in Einfach- und Doppelbehandlungen

Um den Einfluss von Temozolomid (TMZ) und Chloroquin (CQ) auf die Proliferation und Vitalität von stammzellähnlichen Gliomzellen (SLGCs) zu untersuchen, wurden BrdU-ELISA, MTT-Test und ein Zytotoxizitätstest angewendet. Beim BrdU-ELISA wird die Menge des während der Replikation in die DNA inkorporierten Basenanalogs BrdU (Bromdesoxyuridin) bestimmt, was indirekt Rückschlüsse auf die Proliferation erlaubt (Gratzner, 1982). Der MTT-Test nutzt den Sachverhalt, dass vitale Zellen Reduktionsäquivalente generieren und Oxidoreduktasen NAD(P)H- oder FADH₂-abhängig das Tetrazoliumsalz MTT zu einem wasserunlöslichen Formazan-Salz reduzieren (Mosmann, 1983). Der Zytotoxizitätstest misst die Freisetzung der Laktatdehydrogenase (LDH) ins umgebende Medium, wobei wiederum eine Redox-Reaktion zum Nachweis des Enzymes dient. Die LDH-Freisetzung korreliert mit dem Zelltod und ist somit ein Maß für die Zytotoxizität eines Reagenzes (Korzeniewski und Callewaert, 1983).

Um die Wirkung von CQ allein und in Anwesenheit von TMZ bzw. DMSO zu untersuchen, wurden verschiedene Behandlungsschemata angewandt (siehe unten). Ein Effekt über die Zeit wurde durch Messungen an Tag d4 und d6 nach Behandlung geprüft. Es wurden stets mehrere Serien von Experimenten durchgeführt. Da stets nur die Daten von Experimenten direkt vergleichbar sind, die mit identischen Zellen gewonnen wurden, wird in den Abbildungen eine repräsentative Serie an Experimenten gezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA Varianzanalyse. Zusätzlich wurde einzelne Messreihen untereinander mittels T-Test verglichen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit können nur einige Signifikanzniveaus in den Graphen erfasst werden. Daher werden zusätzliche Aussagen zur Statistik im Text sowie in Abbildungen und Tabellen im Anhang erläutert.

3.1.1 Chloroquin-Einfachbehandlung

Um den alleinigen Effekt von Chloroquin (CQ) auf die Proliferation und Vitalität von SLGCs zu analysieren, wurden zunächst Versuche durchgeführt, in denen die Zellen mit 5 und 10 µg CQ/ml behandelt wurden. Eine unbehandelte Probenreihe diente als Kontrolle.

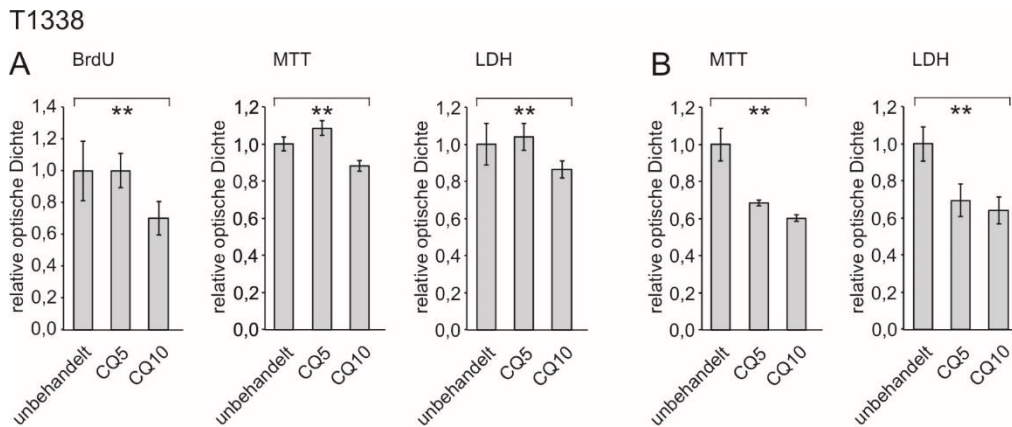


Abb. 2: Effekt steigender Chloroquinkonzentrationen auf die Proliferation (BrdU-ELISA), Vitalität (MTT-Test) und LDH-Freisetzung (Zytotoxizitätsassay) der SLGC-Linie T1338. - (A) Tag d4 nach Behandlung. (B) Tag d6 nach Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte von parallel untersuchten Proben einer Serie und die Standardabweichungen. Die relative optische Dichte der unbehandelten Kontrolle wurde als 1 definiert und alle übrigen Werte relativ dazu dargestellt. Statistisch signifikante Abweichungen innerhalb der Behandlungsgruppen wurden mittels ANOVA mit anschließender Bonferroni-Korrektur für multiples Testen ermittelt. Die Signifikanzniveaus werden klassifiziert als $p < 0,05$ (repräsentiert durch *) und $p < 0,005$ (repräsentiert durch **). - CQ5: 5 µg CQ/ml; CQ10: 10 µg CQ/ml.

Die SLGC-Linie T1338 zeigte an Tag d4 eine dosisabhängige statistisch signifikante Verminderung des BrdU-Einbaus (ANOVA, Abb. 2). Dabei wurde mit 10 µg CQ/ml eine Senkung um 30% erreicht. 5 µg CQ/ml bewirkten keine Veränderung der BrdU-Inkorporation. Beim Vergleich der beiden Messreihen mit 5 µg CQ/ml (CQ5) und 10 µg CQ/ml (CQ10) mittels T-Test wurde eine signifikante Verminderung der optischen Dichte (OD) durch die Dosissteigerung ermittelt (Abb. 28 und Tab. 25 im Anhang). Eine Messung der BrdU-Inkorporation an Tag d6 erfolgte nicht.

Die Behandlung von T1338 mit 5 und 10 µg CQ/ml führte zu einer statistisch signifikanten Änderung der Vitalität. Allerdings führte nur die Behandlung mit 10 µg CQ/ml zu einer statistisch signifikanten Reduktion der OD um 11,6% (ANOVA; Abb. 2). Die Senkung war dabei auch in Relation zur unbehandelten Kontrolle statistisch signifikant (T-Test, Abb. 28 im Anhang). Die Zugabe von 5 µg CQ/ml bewirkte eine Zunahme der OD um 8,6%. Diese war statistisch signifikant (ANOVA, Abb.2 und T-Test; Abb. 28 im Anhang), beruhte aber möglicherweise auf einem experimentellen Problem, da es nicht trivial ist, die Sphäroidaggregate von T1338-SLGCs enzymatisch zu dissoziieren ohne die Zellen durch eine „Überverdauung“ zu schädigen. Analog zum BrdU-ELISA wurde erst mit 10 µg CQ/ml eine statistisch signifikante Senkung der OD im MTT-Test beobachtet. An Tag d6 wurde eine statistisch signifikante Senkung der OD mit 10 µg CQ/ml (40%) festgestellt (ANOVA, Abb. 2). Diese war effizienter als an Tag d4. Andererseits bewirkten bereits 5 µg CQ/ml eine Reduktion der OD (31,5%) an Tag d6. Dabei waren die ODs der Werte für CQ5 und CQ10 in Relation zur Kontrolle statistisch signifikant (Abbs. 2 und 28). Zudem ergab der Vergleich der Messgruppen an den Tagen d4 und d6 einen statistisch

signifikanten Unterschied (ANOVA, Daten nicht gezeigt). Zusammen weisen die Daten auf einen zeit- und dosisabhängigen Effekt der CQ-Behandlung hin.

Eine LDH-Freisetzung wurde an Tag d4 und insbesondere an Tag d6 durch CQ reduziert. Dabei ergab der Vergleich der Behandlungsgruppe (ANOVA, Abb. 2) an Tag d4 einen statistisch signifikanten Unterschied auf hohem Signifikanzniveau. Dieser beruhte auf der Senkung der OD mit 10 µg CQ/ml (Reduktion um 13,5%), während mit 5 µg CQ/ml keine statistisch signifikante Änderung der OD auftrat (Abbs. 2 und 28). Am Tag d6 wurde die OD mit 5 µg CQ/ml um 30,5% und mit 10 µg CQ/ml um 36,0% reduziert. Die Reduktionen erwiesen sich als statistisch signifikant (Abbs. 2 und 28) und wiesen auf eine Reduktion des Zelltodes nach CQ-Behandlung hin. Weiterhin wurde zwar ein zeitabhängiger, jedoch kein eindeutiger dosisabhängiger Effekt evident (Abbs. 2 und 28; Tab. 25 im Anhang; und nicht gezeigt). Es sei angemerkt, dass sich die SLGC-Linie T1338 auch in wiederholten Analysen im LDH-Assay analog verhielt und es zu einer Senkung der LDH-Freisetzung nach CQ-Behandlung kam (Daten nicht gezeigt).

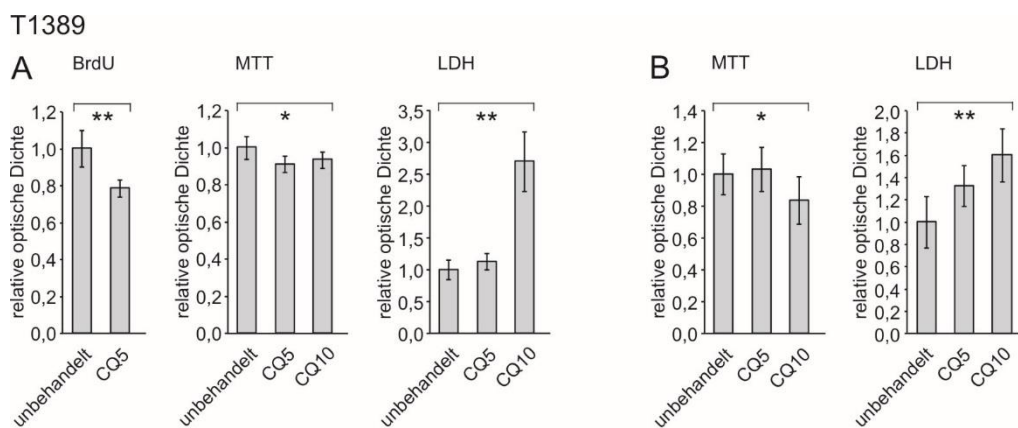


Abb. 3: Effekt steigender Chloroquinkonzentrationen auf die Proliferation (BrdU-ELISA), Vitalität (MTT-Test) und LDH-Freisetzung (Zytotoxizitätsassay) der SLGC-Linie T1389. - (A) Tag d4 nach Behandlung. (B) Tag d6 nach Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte von parallel untersuchten Proben einer Serie und die Standardabweichungen. Die relative optische Dichte der unbehandelten Kontrolle wurde als 1 definiert und alle übrigen Werte relativ dazu dargestellt. Statistisch signifikante Abweichungen innerhalb der Behandlungsgruppen wurden mittels ANOVA mit anschließender Bonferroni-Korrektur für multiples Testen ermittelt. Die Signifikanzniveaus werden klassifiziert als $p < 0,05$ (repräsentiert durch *) und $p < 0,005$ (repräsentiert durch **). - CQ5: 5 µg CQ/ml; CQ10: 10 µg CQ/ml.

Für die SLGC-Linie T1389 wurde die Wirkung von CQ auf die Proliferation (BrdU-ELISA) nur am Tag d4 untersucht. Dabei ergab bereits die Behandlung mit 5 µg CQ/ml eine statistisch signifikante Reduktion des BrdU-Einbaus um 21,5% (Abbs. 3 und 29). Eine dosisabhängige Senkung des BrdU-Einbaus wurde in einer anderen Serie von Experimenten ermittelt, die hier nicht gezeigt ist (siehe Tab. 22 in der „Diskussion“).

Die Vitalität der T1389-Linie wurde an Tag d4 und d6 statistisch signifikant durch CQ gesenkt (ANOVA, Abb. 3). Die Abnahme der OD betrug an Tag d4 9,0% für 5 µg CQ/ml und 6,7% für 10 µg CQ/ml. Beide Reduktionen waren signifikant von der unbehandelten Kontrolle verschieden (Abb. 29). An Tag d6 bewirkte die Zugabe von 5 µg CQ/ml relativ zur Kontrolle keine statistisch signifikante Senkung der Vitalität (Abb. 29). Dagegen wurde mit 10 µg CQ/ml an Tag d6 eine effizientere Reduktion der OD (16%) beobachtet als an Tag d4. Beim Vergleich der beiden CQ-Messreihen wurde lediglich an Tag d6 ein Effekt der Dosissteigerung evident (Tab. 26 im Anhang).

Im Zytotoxizitätstest zeigten sich für die T1389-Kulturen statistisch signifikante Erhöhungen der LDH-Freisetzung durch CQ (Abbs. 3 und 29). Am Tag d4 steigerte die Zugabe von 5 µg CQ/ml die LDH-Freisetzung relativ zur Kontrolle nur geringfügig um 13%, am Tag d6 dagegen um 33%. 10 µg CQ/ml erhöhten die LDH-Freisetzung relativ zu den Kontrollen an Tag d4 um 170% und an Tag d6 um 60%. T-Test Analysen zeigten, dass die Steigerung der CQ-Dosis von 5 µg CQ/ml auf 10 µg CQ/ml an Tag d4 und an Tag d6 jeweils einen statistisch signifikanten Anstieg der LDH-Freisetzung ergab (Tab. 26 im Anhang). Die Steigerung war somit dosisabhängig. Eine Steigerung abhängig von der Behandlungszeit war dagegen nicht erkennbar, da die relativen ODs (im Vergleich zur Kontrolle) an Tag d4 stärker anstiegen als an Tag d6 (Abb. 3).

T1440

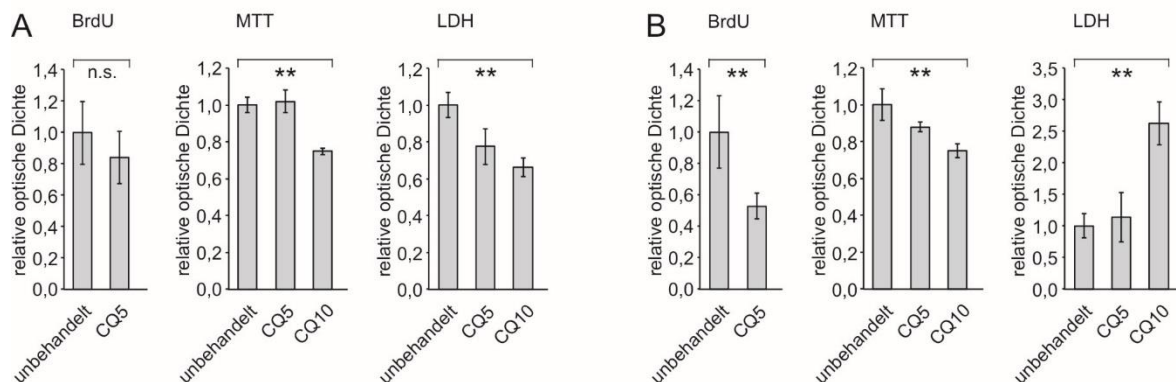


Abb. 4: Effekt steigender Chloroquinkonzentrationen auf die Proliferation (BrdU-ELISA), Vitalität (MTT-Test) und LDH-Freisetzung (Zytotoxizitätsassay) der SLGC-Linie T1440. - (A) Tag d4 nach Behandlung. (B) Tag d6 nach Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte von parallel untersuchten Proben einer Serie und die Standardabweichungen. Die relative optische Dichte der unbehandelten Kontrolle wurde als 1 definiert und alle übrigen Werte relativ dazu dargestellt. Statistisch signifikante Abweichungen innerhalb der Behandlungsgruppen wurden mittels ANOVA mit anschließender Bonferroni-Korrektur für multiples Testen ermittelt. Die Signifikanzniveaus werden klassifiziert als $p < 0,05$ (repräsentiert durch *) und $p < 0,005$ (repräsentiert durch **). - CQ5: 5 µg CQ/ml; CQ10: 10 µg CQ/ml.

Der Einfluss von CQ auf die Zelllinie T1440 wurde an Tag d4 und d6 analysiert. In der Abbildung 4 ist eine Serie gezeigt, bei der im BrdU-ELISA nur die Behandlung mit 5 µg CQ/ml untersucht wurde. Die Zugabe von 5 µg CQ/ml resultierte an Tag d6, nicht aber d4, in einer statistisch signifikanten Reduktion

der BrdU-Inkorporation (47% an d6, 16% an d4; Abbs. 4 und 30). Damit wurde eine Zeitabhängigkeit des Effektes evident. Eine Dosisabhängigkeit des CQ-Effektes im BrdU-ELISA wurde in weiteren Serien beobachtet (siehe Tab. 22 in Kapitel „Diskussion“).

Im MTT-Test wurde an Tag d6, nicht aber d4, mit 5 µg CQ/ml eine statistisch signifikante Reduktion der OD ermittelt (12% an d6; Abbs. 4 und 30). Demgegenüber bewirkte die Behandlung mit 10 µg CQ/ml an Tag d4 und d6 eine statistisch signifikante Senkung der Vitalität (Abb. 4). An Tag d4 betrug die Senkung relativ zur Kontrolle 25%, an Tag d6 ebenfalls 25%. Damit bewirkte CQ eine dosisabhängige Senkung der Vitalität (T-Test, Tab. 27 im Anhang), wobei der Dosiseffekt an Tag d6 deutlicher wurde. Ein Effekt der Behandlungszeit war dagegen nicht evident, da sich die Behandlungsgruppen an Tag d4 und d6 nicht statistisch signifikant voneinander unterschieden.

Hinsichtlich der LDH-Freisetzung ergab die ANOVA Varianzanalyse (Abb. 4) statistisch signifikante dosisabhängige Unterschiede durch die Behandlung mit CQ an Tag d4 und d6. Allerdings wurden an Tag d4 statistisch signifikante Senkungen der ODs um 22,5% (5 µg CQ/ml) und 34% (10 µg CQ/ml) festgestellt. An Tag d6 führte die CQ-Behandlung jedoch zu einer statistisch signifikanten Steigerung der LDH-Freisetzung um das 1,6-Fache für 10 µg CQ/ml (Abb. 4 und 30). Mit 5 µg CQ/ml wurde an Tag d6 ebenfalls eine Steigerung des Mittelwertes um 13% festgestellt, allerdings waren die Messwerte nicht signifikant von denen der Kontrolle verschieden (Abb. 30).

T1447

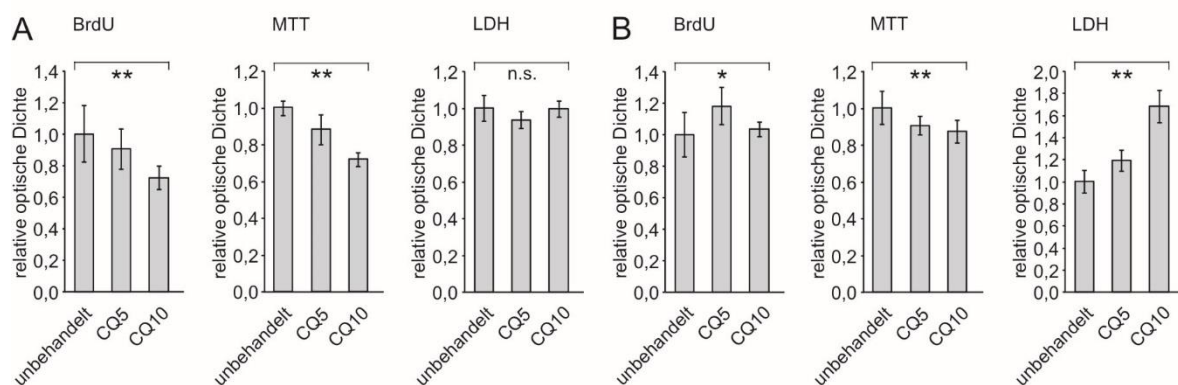


Abb. 5: Effekt steigender Chloroquinkonzentrationen auf die Proliferation (BrdU-ELISA), Vitalität (MTT-Test) und LDH-Freisetzung (Zytotoxizitätsassay) der SLGC-Linie T1447. - (A) Tag d4 nach Behandlung. (B) Tag d6 nach Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte von parallel untersuchten Proben einer Serie und die Standardabweichungen. Die relative optische Dichte der unbehandelten Kontrolle wurde als 1 definiert und alle übrigen Werte relativ dazu dargestellt. Statistisch signifikante Abweichungen innerhalb der Behandlungsgruppen wurden mittels ANOVA mit anschließender Bonferroni-Korrektur für multiples Testen ermittelt. Die Signifikanzniveaus werden klassifiziert als $p < 0,05$ (repräsentiert durch *) und $p < 0,005$ (repräsentiert durch **). - CQ5: 5 µg CQ/ml; CQ10: 10 µg CQ/ml.

Die SLGC-Linie T1447 zeigte von den eingesetzten Zelllinien die geringste Adhärenz. Im BrdU-ELISA äußerte sich dies in einer vergleichsweise hohen Standardabweichung. Daneben waren die enzymatische und mechanische Dissoziation bei dieser Zelllinie stets problematisch und führten zum Teil zu einer hohen Anzahl toter Zellen, sodass die Analysen häufig wiederholt werden mussten und nicht immer konklusive Daten erhoben werden konnten. Die Ergebnisse der hier gezeigten Serie ergaben eine Senkung des BrdU-Einbaus durch CQ an Tag d4, aber nicht an Tag d6 (Abb. 5). Die Reduktion der BrdU-Inkorporation am Tag d4 war dabei dosisabhängig und statistisch signifikant. Es wurde eine Abnahme der OD um 9,5% für 5 µg CQ/ml und um 28% für 10 µg CQ/ml gemessen (Abbs. 5 und 31; Tab. 28 im Anhang). Auch an Tag d6 waren die Unterschiede der Messwerte statistisch signifikant (Abb. 5), allerdings wies die Analyse keine dosisabhängige Senkung der BrdU-Inkorporation nach. Vielmehr war der BrdU-Einbau für die mit 5 µg CQ/ml behandelten Proben statistisch signifikant höher als bei der Kontrolle, während sich die Werte für 10 µg CQ/ml von der Kontrolle nicht signifikant unterschieden (Abb. 31). Weitere Serien ergaben Hinweise auf eine dosisabhängige Senkung der OD auch an Tag d6. Der MTT-Test wird zwar nicht durch die geringe Adhärenz von T1447, wohl aber durch die Problematik der Dissoziation der Aggregate beeinflusst. Hier wurde die OD durch Zugabe von CQ an den Tagen d4 und d6 statistisch signifikant reduziert (Abb. 5). Die Senkungen betragen an Tag d4 12% für 5 µg CQ/ml und 28% für 10 µg CQ/ml, an Tag d6 9,6% für 5 µg CQ/ml und 13% für 10 µg CQ/ml. Die Reduktionen waren signifikant von der unbehandelten Kontrolle verschieden (Abb. 31). Allerdings waren die Effekte von CQ im MTT-Test ähnlich wie im BrdU-ELISA an Tag d6 weniger stark ausgeprägt. Eine Dosisabhängigkeit von CQ wurde somit nur am Tag d4 festgestellt (Tab. 28 im Anhang). Eine Zeitabhängigkeit des vitalitätsvermindernden Effektes von CQ wurde nicht evident.

Im Zytotoxizitätsassay ergab sich ein anderes Bild. Hier wurde am Tag d4 eine geringe, aber statistisch signifikante Abnahme der OD um 6,6% in Relation zur Kontrolle ermittelt (Abbs. 5 und 31). Die Steigerung der CQ-Dosis von 5 µg/ml auf 10 µg/ml ergab einen geringen Anstieg der OD, sodass sich die Messreihe CQ10 nicht signifikant von der Kontrolle unterschied (Abbs. 5 und 31). Dagegen wurde an Tag d6 eine dosisabhängige, statistisch signifikante Steigerung der LDH-Freisetzung ermittelt (Abbs. 5 und 31; Tab. 28 im Anhang). Der Anstieg der ODs betrug 19% für 5 µg CQ/ml und 68% für 10 µg CQ/ml.

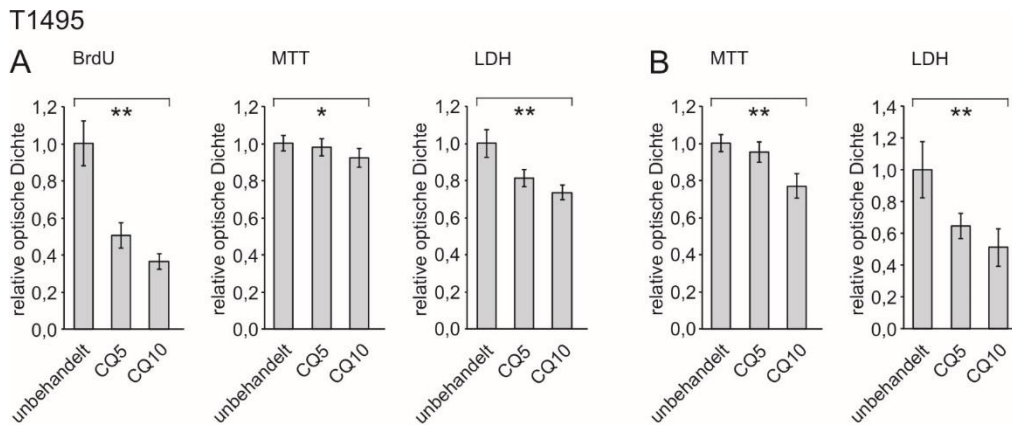


Abb. 6: Effekt steigender Chloroquinkonzentrationen auf die Proliferation (BrdU-ELISA), Vitalität (MTT-Test) und LDH-Freisetzung (Zytotoxizitätsassay) der SLGC-Linie T1495. - (A) Tag d4 nach Behandlung. (B) Tag d6 nach Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte von parallel untersuchten Proben einer Serie und die Standardabweichungen. Die relative optische Dichte der unbehandelten Kontrolle wurde als 1 definiert und alle übrigen Werte relativ dazu dargestellt. Statistisch signifikante Abweichungen innerhalb der Behandlungsgruppen wurden mittels ANOVA mit anschließender Bonferroni-Korrektur für multiples Testen ermittelt. Die Signifikanzniveaus werden klassifiziert als $p < 0,05$ (repräsentiert durch *) und $p < 0,005$ (repräsentiert durch **). - CQ5: 5 μg CQ/ml; CQ10: 10 μg CQ/ml.

Für die SLGC-Linie T1495 wurde der Einfluss von CQ auf den BrdU-Einbau in der gezeigten Serie nur am Tag d4 untersucht. Dabei ergab die Behandlung mit CQ eine dosisabhängige, statistisch signifikante Senkung der BrdU-Inkorporation (Abbs. 6 und 32; Tab. 29 im Anhang). Es wurden Reduktionen der Proliferation um 50% für 5 μg CQ/ml und 64% für 10 μg CQ/ml beobachtet.

Im MTT-Test wurden die ODs an Tag d4 und Tag d6 durch die CQ-Behandlung statistisch signifikant gesenkt (Abb. 6). Die Zugabe von 5 μg CQ/ml bewirkte an Tag d4 nur eine geringe Reduktion der OD (2,3%) und an Tag d6 eine statistisch signifikante Senkung um 4,7% (Abb. 32). Dagegen bewirkten 10 μg CQ/ml bereits an Tag d4 eine statistisch signifikante Abnahme der OD um 7,9% und an Tag d6 eine statistisch signifikante Reduktion um 23% (Abb. 32). Die Dosisabhängigkeit des CQ-Effektes wurde damit erst an Tag d6 evident (Tab. 29 im Anhang). Die CQ-Wirkung war zeitabhängig.

Im Zytotoxizitätsassay wurden an den Tagen d4 und d6 dosisabhängige, statistisch signifikante Abnahmen der LDH-Freisetzung durch CQ beobachtet (Abbs. 6 und 32; Tab. 29 im Anhang). Bereits die Behandlung mit 5 μg CQ/ml ergab eine von der Kontrolle statistisch signifikant verschiedene Reduktion der OD an Tag d4 um 19% und an Tag d6 um 36% (Abb. 32). Entsprechend senkte auch die Zugabe von 10 μg CQ/ml die LDH-Freisetzung statistisch signifikant an Tag d4 um 27% und an Tag d6 um 50% (Abb. 32). Auch hier war eine zeitabhängige Steigerung des CQ-Effektes auf die LDH-Freisetzung zu beobachten.

Fazit:

Zusammenfassend ist festzustellen, dass CQ in der Dosis von 5 µg/ml an Tag d4 häufig keinen Effekt auf die Proliferation und Vitalität von SLGC-Linien ausübte. Der Effekt von CQ nahm fast immer zeit- und dosisabhängig zu, d.h. die proliferationshemmende und vitalitätsmindernde Wirkung von 10 µg CQ/ml wurde durch die längere Inkubation (Tag d6) in der Regel effizienter. Wenn CQ einen Effekt im BrdU-ELISA zeigte, war es immer eine Senkung des BrdU-Einbaus. Ebenso wurde im MTT-Test immer eine Reduktion der Vitalität ermittelt, wenn CQ einen Effekt ausübte. Dagegen stellte sich der Effekt von CQ auf die LDH-Freisetzung als variabel heraus. Zwei Zelllinien (T1338, T1495) zeigten über die Zeit konstant eine Verminderung der LDH-Freisetzung. Bei zwei Zelllinien (T1440, T1447) wurde an Tag d4 eine Verminderung (T1440) bzw. kein Effekt auf die LDH-Freisetzung (T1447) und an Tag d6 eine Erhöhung der LDH-Freisetzung beobachtet. Eine Zelllinie (T1389) zeigte über die Zeit konstant eine Steigerung der LDH-Freisetzung.

Tab. 13: Veränderungen von Proliferation und Vitalität nach CQ-Behandlung

SLGC-Linie	Test	Tag d4		Tag d6	
		CQ5	CQ10	CQ5	CQ10
T1338	BrdU	≈	↓	n.d.	n.d.
	MTT	≈	↓	↓↓	↓↓
	LDH	≈	↓	↓↓	↓↓
T1389	BrdU	↓	n.d.	n.d.	n.d.
	MTT	≈	≈	≈	↓
	LDH	↑	↑↑	↑	↑
T1440	BrdU	↓	n.d.	↓↓	n.d.
	MTT	≈	↓	↓	↓
	LDH	↓	↓↓	↑	↑↑
T1447	BrdU	≈	↓	↑	≈
	MTT	↓	↓	↓	↓
	LDH	≈	≈	↑	↑
T1495	BrdU	↓↓	↓↓	n.d.	n.d.
	MTT	≈	≈	≈	↓
	LDH	↓	↓	↓↓	↓↓

≈ Änderungen < 10% ↓ Senkung 10-30% ↑ Steigerung 1,1- bis 1,9-fach
 ↓↓ Senkung > 30% ↑↑ Steigerung > 2,0-fach

3.1.2 Chloroquin-Behandlung in Anwesenheit von DMSO

Die Effekte von Chloroquin (CQ) sollten im Weiteren in Anwesenheit von Temozolomid (TMZ) untersucht werden. Da TMZ hydrophob ist, wurde dieses Reagenz in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst. Arbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass 1% DMSO auf die meisten Zelllinien keinen messbaren zytotoxischen Effekt hat, während bei anderen Zelllinien geringe, aber messbare Effekte auftreten. Dies ist für diverse SLGC-Linien spezifisch und muss für jede Zelllinie individuell geprüft werden. Daher wurden weitere Tests zur CQ-Behandlung in Anwesenheit von 1% DMSO durchgeführt. Weiterhin wurde ge-

prüft, ob die Wirkung von CQ durch eine Erhöhung der Dosis auf 20 µg/ml maßgeblich gesteigert werden kann. Diese Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Studenten der Arbeitsgruppe für die in Kapitel 3.1.1 beschriebenen SLGC-Linien T1338, T1389, T1440, T1447 und T1495 durchgeführt. Diese Ergebnisse werden nur in der Diskussion angesprochen. Im Folgenden werden Daten besprochen, die ich selbst mit den SLGC-Linien T1522, T1524, T1549, T1556 und T1564 gewonnen habe.

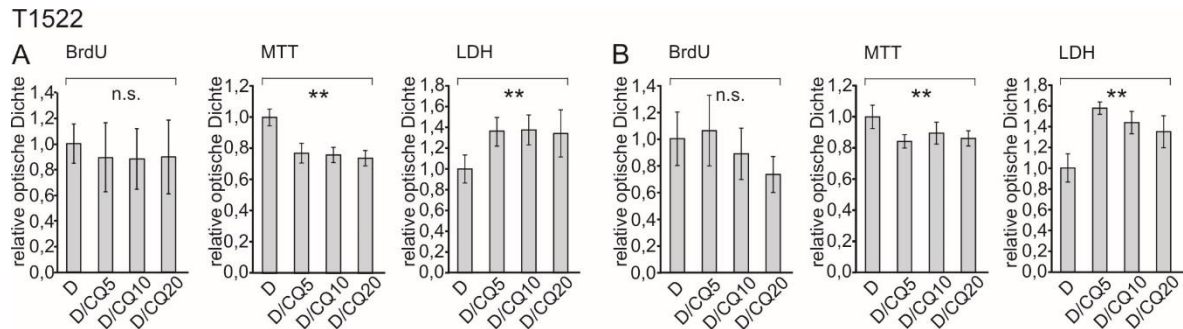


Abb. 7: Effekt steigender Chloroquinkonzentrationen auf die Proliferation (BrdU-ELISA), Vitalität (MTT-Test) und LDH-Freisetzung (Zytotoxizitätsassay) der SLGC-Linie T1522 in Anwesenheit von DMSO (Dimethylsulfoxid). - (A) Tag d4 nach Behandlung. (B) Tag d6 nach Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte von parallel untersuchten Proben einer Serie und die Standardabweichungen. Die relative optische Dichte der DMSO-Kontrolle wurde als 1 definiert und alle übrigen Werte relativ dazu dargestellt. Statistisch signifikante Abweichungen innerhalb der Behandlungsgruppen wurden mittels ANOVA mit anschließender Bonferroni-Korrektur für multiples Testen ermittelt. Die Signifikanzniveaus werden klassifiziert als $p < 0,05$ (repräsentiert durch *) und $p < 0,005$ (repräsentiert durch **). - CQ5: 5 µg CQ/ml; CQ10: 10 µg CQ/ml; CQ20: 20 µg CQ/ml; D: DMSO.

Für die SLGC-Linie T1522 wurden sehr große Messfehler im BrdU-ELISA beobachtet, die auf eine reduzierte Adhärenz zurückzuführen sind (siehe Standardabweichungen in Abb. 7). Die BrdU-Werte geben daher eher einen Trend an und weisen auf eine CQ-vermittelte Senkung der Proliferation hin. Die Unterschiede der Mittelwerte zwischen CQ-behandelten Proben und der Kontrolle sind statistisch nicht signifikant (Abb. 7). Die Behandlung mit 5 µg CQ/ml bewirkte eine Senkung der OD um 11%, mit 10 µg CQ/ml um 12% und mit 20 µg CQ/ml um 10%. Im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich an Tag d6 mit 20 µg CQ/ml eine statistisch signifikante Senkung der OD (Abbs. 7 und 33, $p < 0,05$). Eine statistisch signifikante dosisabhängige Reduktion der BrdU-Inkorporation war somit nur an Tag d6 zu beobachten. Die Vergleiche der Werte der Behandlungsgruppen an Tag d4 und d6 ergaben keinen statistisch signifikanten Effekt der Behandlungszeit. Vergleichbare Ergebnisse wurden in weiteren Serien gewonnen.

Im MTT-Test, der von reduzierter Adhärenz nicht beeinträchtigt wird, wurden statistisch signifikante Senkungen der ODs an Tag d4 um 23% (5 µg CQ/ml), 24% (10 µg CQ/ml) und 26% (20 µg CQ/ml) erreicht (Abbs. 7 und 33). Dabei wurden bereits mit 5 µg CQ/ml Reduktionen der OD festgestellt. Die Werte für 10 µg CQ/ml und 20 µg CQ/ml waren an beiden Messtagen nicht signifikant von den ODs der 5 µg

CQ/ml Messreihen verschieden (Tab. 30 im Anhang). Demnach führte CQ zwar zu einer Reduktion der ODs, eine signifikante Abhängigkeit von der Dosis oder der Behandlungszeit war aber nicht feststellbar. Die Steigerung der LDH-Freisetzung (Tag d4: 36% mit 5 µg CQ/ml, 38% mit 10 µg CQ/ml und 34% mit 20 µg CQ/ml) war relativ zur Kontrolle statistisch hochsignifikant (Abb. 33), aber nicht dosisabhängig (Tab. 30 im Anhang). An Tag d6 ergab sich tendenziell eine Dosisabhängigkeit, aber in „invertierter“ Form. D.h. mit 5 µg CQ/ml wurde die höchste OD gemessen und mit steigender CQ-Dosis sank der Mittelwert der Messreihen relativ zur niedrigeren CQ-Konzentration (Abb. 7). Dabei waren die Werte der Messreihen CQ10 und CQ20 relativ zu den Werten der CQ5-Messreihe statistisch hochsignifikant verschieden (Tab. 30 im Anhang). Die Dosissteigerung von 10 auf 20 µg CQ/ml erbrachte dagegen keinen signifikanten Unterschied der LDH-Freisetzung.

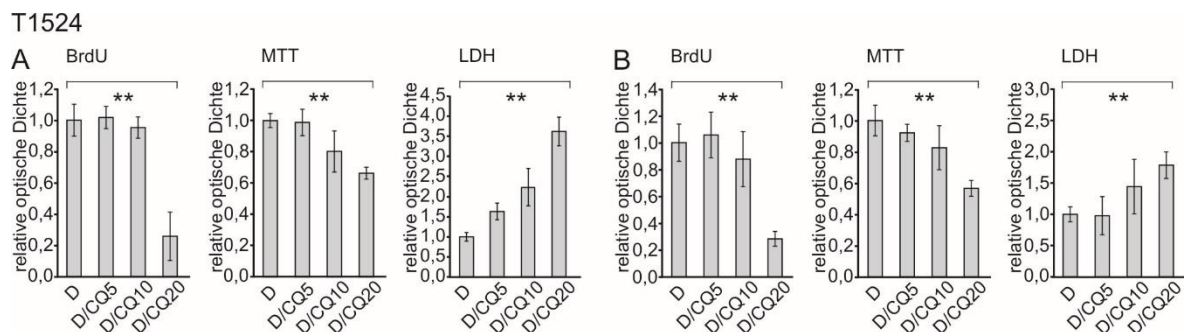


Abb. 8: Effekt steigender Chloroquinkonzentrationen auf die Proliferation (BrdU-ELISA), Vitalität (MTT-Test) und LDH-Freisetzung (Zytotoxizitätsassay) der SLGC-Linie T1524 in Anwesenheit von DMSO (Dimethylsulfoxid). - (A) Tag d4 nach Behandlung. (B) Tag d6 nach Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte von parallel untersuchten Proben einer Serie und die Standardabweichungen. Die relative optische Dichte der DMSO-Kontrolle wurde als 1 definiert und alle übrigen Werte relativ dazu dargestellt. Statistisch signifikante Abweichungen innerhalb der Behandlungsgruppen wurden mittels ANOVA mit anschließender Bonferroni-Korrektur für multiples Testen ermittelt. Die Signifikanzniveaus werden klassifiziert als $p < 0,05$ (repräsentiert durch *) und $p < 0,005$ (repräsentiert durch **). - CQ5: 5 µg CQ/ml; CQ10: 10 µg CQ/ml; CQ20: 20 µg CQ/ml; D: DMSO.

Die Behandlung der SLGC-Linie T1524 mit ansteigenden CQ-Konzentrationen ergab an Tag d4 eine statistisch signifikante Reduktion des BrdU-Einbaus mit 20 µg CQ/ml um 74% (Abbs. 8 und 34). Die Zugabe von 5 µg CQ/ml induzierte keine Senkung der BrdU-Inkorporation, 10 µg CQ/ml bewirkten eine statistisch nicht-signifikante Verminderung um 4,7%. An Tag d6 war die Senkung des BrdU-Einbaus durch 20 µg CQ/ml ähnlich stark wie an Tag d4 (72%). Tendenziell ergab sich an Tag d6 auch eine Reduktion mit 10 µg CQ/ml (12%; statistisch nicht signifikant, Abbs. 8 und 34).

Im MTT-Test resultierte die CQ-Behandlung in einer statistisch signifikanten Verminderung der ODs an Tag d4 und d6 (Abb. 8). Eine statistisch signifikante Senkung der OD relativ zur Kontrolle wurde an Tag d4 mit 10 µg CQ/ml (20%) und an Tag d6 erst mit 20 µg CQ/ml (43%) erreicht (Abb. 34). Die Messreihen

an Tag d4 und d6 waren statistisch nicht-signifikant verschieden. Somit scheint CQ die Vitalität von T1524 zwar dosisabhängig, aber nicht zeitabhängig zu vermindern (Tab. 31 im Anhang).

Im Zytotoxizitätsassay wurde an beiden Messtagen eine statistisch signifikante Erhöhung der LDH-Freisetzung nachgewiesen (Abb. 8). An Tag d4 wurden Steigerungen auf das 1,6-Fache (5 µg CQ/ml), das 2,2-Fache (10 µg CQ/ml) und das 3,6-Fache (20 µg CQ/ml) beobachtet, welche in der Varianzanalyse im Vergleich zur Kontrolle und zu den jeweils anderen Messreihen statistisch signifikant verschieden waren (Abbs. 8 und 34; Tab. 31 im Anhang). Die Effekte der Dosissteigerung waren an Messtag d6 weniger deutlich (Tab. 31 im Anhang). Zwar waren auch hier die Werte der Behandlungsgruppe statistisch signifikant verschieden (Abb. 8), allerdings wurden statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrolle erst ab 10 µg CQ/ml beobachtet (Abb. 34). Der Anstieg der LDH-Freisetzung betrug mit 10 µg CQ/ml relativ zur Kontrolle das 1,4-Fache und mit 20 µg CQ/ml das 1,8-Fache.

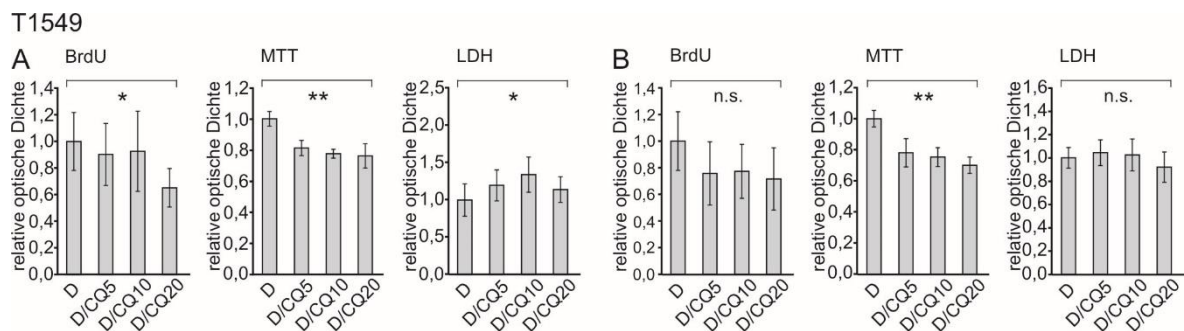


Abb. 9: Effekt steigender Chloroquinkonzentrationen auf die Proliferation (BrdU-ELISA), Vitalität (MTT-Test) und LDH-Freisetzung (Zytotoxizitätsassay) der SLGC-Linie T1549 in Anwesenheit von DMSO (Dimethylsulfoxid). - (A) Tag d4 nach Behandlung. (B) Tag d6 nach Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte von parallel untersuchten Proben einer Serie und die Standardabweichungen. Die relative optische Dichte der DMSO-Kontrolle wurde als 1 definiert und alle übrigen Werte relativ dazu dargestellt. Statistisch signifikante Abweichungen innerhalb der Behandlungsgruppen wurden mittels ANOVA mit anschließender Bonferroni-Korrektur für multiples Testen ermittelt. Die Signifikanzniveaus werden klassifiziert als $p < 0,05$ (repräsentiert durch *) und $p < 0,005$ (repräsentiert durch **). - CQ5: 5 µg CQ/ml; CQ10: 10 µg CQ/ml; CQ20: 20 µg CQ/ml; D: DMSO.

Die SLGC-Linie T1549 war durch eine reduzierte Adhärenz gekennzeichnet, was zu großen experimentellen Abweichungen im BrdU-ELISA führte (siehe Standardabweichungen in Abb. 9). An Tag d4 ergab die Behandlung mit 20 µg CQ/ml eine statistisch signifikante Reduktion der BrdU-Inkorporation um 35% (Abbs. 9 und 35). Mit niedrigeren CQ-Konzentrationen wurden relativ zur Kontrolle statistisch nicht-signifikante Senkungen der ODs um 9,7% (5 µg CQ/ml) und 7,3% (10 µg CQ/ml) beobachtet (Abb. 35). An Tag d6 wurde keine dosisabhängige Reduktion des BrdU-Einbaus durch CQ evident. Es wurden zwar Senkungen der ODs ermittelt, jedoch waren die Unterschiede der Mittelwerte innerhalb der Messreihen statistisch nicht signifikant (Abbs. 9 und 35; Tab. 32 im Anhang). Ein Effekt durch die Behandlungszeit wurde ebenfalls nicht nachgewiesen.

Im MTT-Test zeigte sich an Tag d4 und d6 eine statistisch signifikante Senkung der OD durch die CQ-Behandlung (Abbs. 9 und 35). An Tag d4 wurden die ODs statistisch signifikant um 19% (5 µg CQ/ml), 23% (10 µg CQ/ml) und 24% (20 µg CQ/ml) reduziert (Abb. 35). Eine Dosisabhängigkeit des CQ-Effektes wurde an Tag d4 nicht evident (Tab. 32 im Anhang). Ähnlich verhielt es sich an Tag d6. Hier wurde ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kontrolle und den Messreihen von CQ5, CQ10 und CQ20 ermittelt. Ein zeitabhängiger Effekt wurde nicht festgestellt.

Die LDH-Freisetzung wurde an beiden Messtagen nur geringfügig durch die CQ-Behandlung erhöht. Dabei ergab sich nur an Tag d4 eine statistische Signifikanz des Anstiegs der ODs innerhalb der Behandlungsgruppe, die geringen Unterschiede der Mittelwerte an Tag d6 waren statistisch nicht signifikant (Abb. 9). Der größte Anstieg der OD (34%) wurde an Tag d4 mit 10 µg CQ/ml beobachtet und war relativ zur Kontrolle statistisch signifikant (Abb. 35). Dagegen führte die Zugabe von 5 µg CQ/ml und 20 µg CQ/ml nicht zu statistisch signifikanten Zunahmen der ODs. Somit wurde weder eine dosis- noch eine zeitabhängige Induktion der LDH-Freisetzung durch CQ erkennbar (Tab. 32 im Anhang und nicht gezeigt).

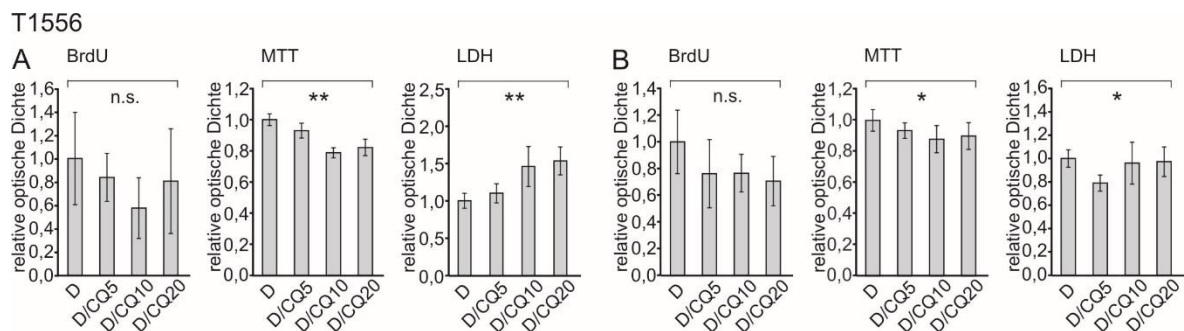


Abb. 10: Effekt steigender Chloroquinkonzentrationen auf die Proliferation (BrdU-ELISA), Vitalität (MTT-Test) und LDH-Freisetzung (Zytotoxizitätsassay) der SLGC-Linie T1556 in Anwesenheit von DMSO (Dimethylsulfoxid). - (A) Tag d4 nach Behandlung. (B) Tag d6 nach Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte von parallel untersuchten Proben einer Serie und die Standardabweichungen. Die relative optische Dichte der DMSO-Kontrolle wurde als 1 definiert und alle übrigen Werte relativ dazu dargestellt. Statistisch signifikante Abweichungen innerhalb der Behandlungsgruppen wurden mittels ANOVA mit anschließender Bonferroni-Korrektur für multiples Testen ermittelt. Die Signifikanzniveaus werden klassifiziert als $p < 0,05$ (repräsentiert durch *) und $p < 0,005$ (repräsentiert durch **). - CQ5: 5 µg CQ/ml; CQ10: 10 µg CQ/ml; CQ20: 20 µg CQ/ml; D: DMSO.

Auch bei der SLGC-Linie T1556 war eine reduzierte Adhärenz der Zellen festzustellen, die zu sehr großen Messfehlern im BrdU-ELISA führte. Die Unterschiede innerhalb der Messreihen waren weder an Tag d4 noch an d6 statistisch signifikant (Abb. 10). Die BrdU-Werte geben daher nur einen Trend an. An Tag d4 wurden Senkungen der ODs um 16% (5 µg CQ/ml), 43% (10 µg CQ/ml) und 20% (20 µg CQ/ml) festgestellt. Dabei war nur die Reduktion des BrdU-Einbaus durch 10 µg CQ/ml im Vergleich

zur Kontrolle statistisch signifikant (Abb. 36). An beiden Messtagen war somit keine Dosisabhängigkeit feststellbar (Tab. 33 im Anhang). Ein Effekt der Behandlungszeit wurde ebenfalls nicht evident.

Die CQ-Behandlung der T156-Zellen ergab im MTT-Test an Tag d4 und d6 statistisch signifikante Senkungen der ODs (Abbs. 10 und 36). Relativ zur Kontrolle nahmen die ODs an Tag d4 mit 5 µg CQ/ml um 7,1%, mit 10 µg CQ/ml um 21% und mit 20 µg CQ/ml um 18% ab. Die statistische Auswertung zeigte, dass an beiden Messtagen die Dosissteigerung keinen statistisch signifikanten Effekt auf die Vitalität hatte (Tab. 33 im Anhang). Die ODs der Behandlungsgruppen an Tag d4 und d6 wiesen ebenfalls keinen statistisch signifikanten Unterschied auf.

Im Zytotoxizitätsassay wurden dagegen dosis- und zeitabhängige Unterschiede ermittelt. So wurden an Tag d4 statistisch signifikante Erhöhungen der LDH-Freisetzung beobachtet (Abbs. 10 und 36), wobei die Behandlungen die LDH-Freisetzung auf das 1,1-Fache (5 µg CQ/ml) bzw. das 1,5-Fache (10 µg CQ/ml und 20 µg CQ/ml) steigerten. Dabei wurde ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Messreihen CQ5 und CQ10, jedoch nicht zwischen den Messreihen CQ10 und CQ20 festgestellt (Tab. 33 im Anhang). An Tag d6 war eine dosisabhängige Freisetzung von LDH dagegen nicht evident. Hier wurde mit 5 µg CQ/ml sogar eine um 21% geringere LDH-Freisetzung ermittelt (Abbs. 10 und 36). Die Messwerte der mit 10 µg CQ/ml und 20 µg CQ/ml behandelten Proben waren statistisch nicht-signifikant von der Kontrolle verschieden.

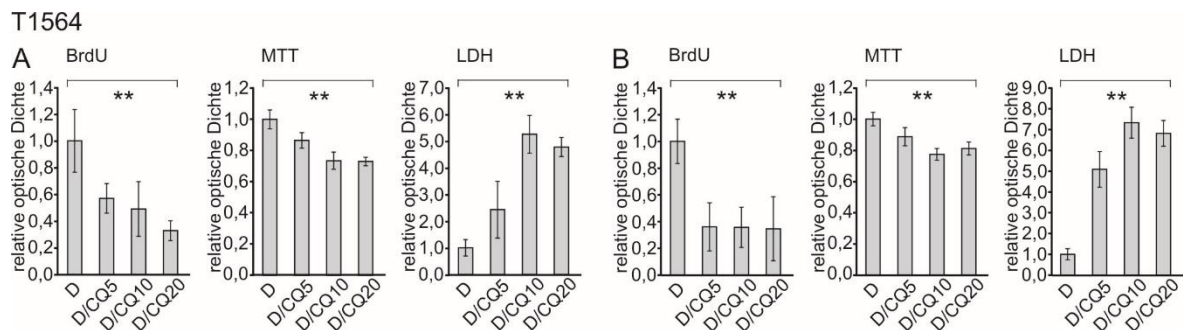


Abb. 11: Effekt steigender Chloroquinkonzentrationen auf die Proliferation (BrdU-ELISA), Vitalität (MTT-Test) und LDH-Freisetzung (Zytotoxizitätsassay) der SLGC-Linie T1564 in Anwesenheit von DMSO (Dimethylsulfoxid). - (A) Tag d4 nach Behandlung. (B) Tag d6 nach Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte von parallel untersuchten Proben einer Serie und die Standardabweichungen. Die relative optische Dichte der DMSO-Kontrolle wurde als 1 definiert und alle übrigen Werte relativ dazu dargestellt. Statistisch signifikante Abweichungen innerhalb der Behandlungsgruppen wurden mittels ANOVA mit anschließender Bonferroni-Korrektur für multiples Testen ermittelt. Die Signifikanzniveaus werden klassifiziert als $p < 0,05$ (repräsentiert durch *) und $p < 0,005$ (repräsentiert durch **). - CQ5: 5 µg CQ/ml; CQ10: 10 µg CQ/ml; CQ20: 20 µg CQ/ml; D: DMSO.

Die Behandlung der SLGC-Linie T1564 mit ansteigenden CQ-Konzentrationen ergab an Tag d4 und d6 statistisch signifikante Reduktionen des BrdU-Einbaus (Abbs. 11 und 37). An Tag d4 zeigte sich eine Dosisabhängigkeit des CQ-Effektes. Es wurden Senkungen der ODs um 43% (5 µg CQ/ml), 51% (10 µg

CQ/ml) und 67% (20 µg CQ/ml) ermittelt. Dabei ergaben die Analysen einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Messreihen CQ5 und CQ20, nicht aber CQ5 und CQ10 (Tab. 34 im Anhang). An Tag d6 wurden in allen Fällen stärkere Reduktionen der BrdU-Inkorporation gemessen als an Tag d4 (5 µg CQ/ml: 64%; 10 µg CQ/ml: 64%; 20 µg CQ/ml: 66%), wobei jedoch kein dosisabhängiger Effekt evident wurde (Abb. 11; Tab. 34 im Anhang). Ein statistisch signifikanter Effekt der Behandlungszeit war nicht feststellbar.

Der MTT-Test zeigte sowohl an Tag d4 als auch d6 statistisch signifikante Abnahmen der ODs nach Behandlung mit CQ (Abbs. 11 und 37). An Tag d4 bewirkte die CQ-Behandlung Reduktionen der OD um 14% (5 µg CQ/ml), 27% (10 µg CQ/ml) und 27% (20 µg CQ/ml). Dabei wurde ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Messreihen 5 µg CQ/ml und 10 µg CQ/ml evident. Die weitere Steigerung der CQ-Dosis auf 20 µg CQ/ml bewirkte dagegen keine statistisch signifikante Verminderung der Vitalität (Tab. 34 im Anhang). An Tag d6 zeigte sich ein ähnliches Bild. Auch hier war die Reduktion der ODs mit 10 µg CQ/ml (23%) und 20 µg CQ/ml (20%) ähnlich (Abb. 11). Eine zusätzliche Verminderung der Vitalität durch eine zwei Tage längere Behandlung wurde nicht evident.

Die LDH-Freisetzung wurde an beiden Messtagen durch CQ deutlich und zunächst dosisabhängig gesteigert (Abbs. 11 und 37). So wurden an Tag d4 Zunahmen der ODs um das 2,4-Fache (5 µg CQ/ml), 5,3-Fache (10 µg CQ/ml) und 4,8-Fache (20 µg CQ/ml) beobachtet. Die Dosissteigerung von 5 auf 10 µg CQ/ml, nicht aber von 10 auf 20 µg CQ/ml ergab einen statistisch signifikanten Anstieg der LDH-Freisetzung (Tab. 34 im Anhang). An Tag d6 war Erhöhung der LDH-Freisetzung ebenfalls mit 10 µg CQ/ml (um das 7,3-Fache) am stärksten und war insgesamt effizienter als an Tag d4.

Fazit:

Die Ergebnisse zeigen, dass CQ auch in Anwesenheit von DMSO eine proliferationshemmende und vitalitätsmindernde Wirkung auf SLGC-Linien hat. Analog zu den Experimenten der CQ-Einfachbehandlung wurden in BrdU-ELISAs und MTT-Tests immer Reduktionen der ODs beobachtet. Bei SLGC-Linien mit geringer Adhärenz (T1522, T1549, T1556) waren die Senkungen im BrdU-ELISA aufgrund der hohen experimentellen Abweichungen häufig nur als Trend zu erkennen, da statistisch nicht signifikant. Im Zytotoxizitätsassay wurden nur teilweise Erhöhungen der LDH-Freisetzung festgestellt. Allerdings waren die Effekte auf die LDH-Freisetzung in zwei Fällen (T1549, T1556) nur an Tag d4 evident. Eine zeitabhängige Zunahme der LDH-Freisetzung war nur im Fall von T1549 feststellbar. Hinsichtlich der Steigerung der proliferationshemmenden Effekte durch Erhöhung der CQ-Dosis ergaben sich verschiedene Beobachtungen. Im Fall von T1522 war bereits mit 5 µg CQ/ml der maximale Effekt auf die Proliferation feststellbar. Die Steigerung von 5 auf 10 µg CQ/ml brachte in den Fällen von T1556 und T1564 eine Zunahme des Effektes. Die weitere Steigerung der Dosis von 10 auf 20 µg CQ/ml bewirkte nur noch in den Fällen von T1524 und T1549 einen Effekt. Auch bezüglich der Vitalitätsminderung bewirkte die

Dosissteigerung unterschiedliche Effekte. Bei T1522 und T1549 war die maximale CQ-Wirkung bereits mit 5 µg CQ/ml erreicht. In den Fällen von T1524, T1556 und T1564 bewirkte die Steigerung von 5 auf 10 µg CQ/ml eine Zunahme des Effektes. Die weitere Steigerung der Dosis von 10 auf 20 µg CQ/ml ergab nur noch im Fall von T1524 einen zusätzlichen Effekt. Die Behandlungszeit übte insgesamt keinen deutlichen Effekt auf Proliferation und Vitalität aus. Nur in den Fällen von T1524, T1549 und T1564 zeigte sich eine geringe Zunahme der Proliferationshemmung durch eine zwei Tage längere Behandlung.

Tab. 14: Veränderungen von Proliferation und Vitalität nach CQ-Behandlung (Anwesenheit von DMSO)

Zelllinie	Test	Tag d4			Tag d6		
		CQ5	CQ10	CQ20	CQ5	CQ10	CQ20
T1522	BrdU	↓	↓	↓	≈	↓	↓
	MTT	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	LDH	↑	↑	↑	↑	↑	↑
T1524	BrdU	≈	≈	↓↓↓	≈	↓	↓↓↓
	MTT	≈	↓	↓↓	≈	↓	↓↓
	LDH	↑	↑↑	↑↑	↑	↑	↑
T1549	BrdU	≈	≈	↓↓	↓	↓	↓
	MTT	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	LDH	↑	↑	↑	≈	≈	≈
T1556	BrdU	↓	↓↓	↓	↓	↓	↓
	MTT	≈	↓	↓	≈	↓	↓
	LDH	↑	↑	↑	↓	≈	≈
T1564	BrdU	↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓
	MTT	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	LDH	↑↑	↑↑↑	↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑

≈ Änderungen < 10% ↓ Senkung 10-30% ↑ Steigerung 1,1- bis 1,9-fach
 ↓↓ Senkung > 30% ↑↑ Steigerung 2,0-fach bis 5-fach
 ↓↓↓ Senkung > 50% ↑↑↑ Steigerung > 5-fach

3.1.3 TMZ und CQ-Doppelbehandlung

Im nächsten Schritt wurden die SLGC-Linien einer Kombinationsbehandlung mit CQ und TMZ ausgesetzt. Ziel dieser Experimente war es zu untersuchen, ob CQ die Sensibilität von SLGCs gegenüber TMZ steigern kann. In diesem Teil der Arbeit fokussierte ich mich wieder auf die SLGC-Linien T1522, T1524, T1549, T1556 und T1564. Um den Effekt hinsichtlich der CQ-Dosis zu analysieren, wurden verschiedene CQ-Konzentrationen eingesetzt. Als Kontrolle diente eine DMSO-behandelte Probe, da TMZ in einer DMSO-Lösung appliziert werden musste. Das zytotoxische Reagenz TMZ wurde in den 96-Lochplatten in einem geringen Volumen an Medium analysiert, sodass die finale Konzentration an DMSO 1% betrug. Um eine direkte Vergleichbarkeit der Experimente zu erlauben, wurden in allen Analysen 100 µM TMZ eingesetzt.

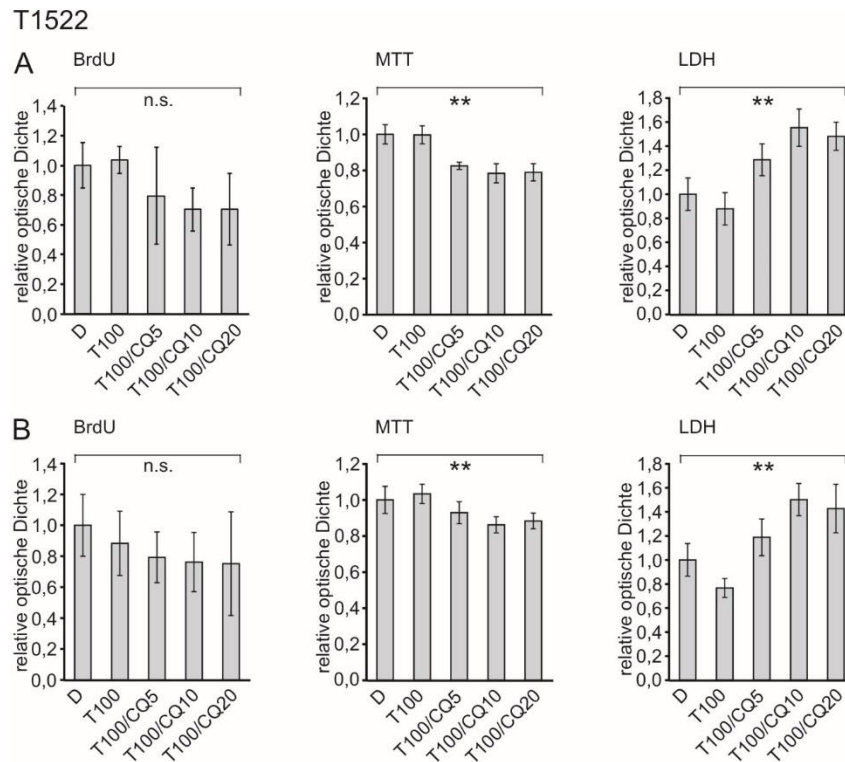


Abb. 12: Effekt steigender Chloroquinkonzentrationen auf die Proliferation (BrdU-ELISA), Vitalität (MTT-Test) und LDH-Freisetzung (Zytotoxizitätsassay) der SLGC-Linie T1522 in Anwesenheit von Temozolomid (TMZ). - (A) Tag d4 nach Behandlung. (B) Tag d6 nach Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte von parallel untersuchten Proben einer Serie und die Standardabweichungen. Die relative optische Dichte der DMSO-Kontrolle wurde als 1 definiert und alle übrigen Werte relativ dazu dargestellt. Statistisch signifikante Abweichungen innerhalb der Behandlungsgruppen wurden mittels ANOVA mit anschließender Bonferroni-Korrektur für multiples Testen ermittelt. Die Signifikanzniveaus werden klassifiziert als $p < 0,05$ (repräsentiert durch *) und $p < 0,005$ (repräsentiert durch **). - CQ5: 5 µg CQ/ml; CQ10: 10 µg CQ/ml; CQ20: 20 µg CQ/ml; D: DMSO.; T100: 100µM TMZ.

Die Behandlung der SLGC-Linie T1522 mit 100µM TMZ ergab an Tag d4 und d6 keine statistisch signifikante Senkung des BrdU-Einbaus (Abb. 38). Die Koapplikation von CQ senkte an Tag d4 die OD um 21% (T100/CQ5), 30% (T100/CQ10) bzw. 30% (T100/CQ20). Aufgrund der geringen Adhärenz der Zelllinie kam es zu hohen Abweichungen der Messwerte in allen, inklusive der gezeigten Serie (Abb. 12). Tendenziell konnte die Doppelbehandlung mit TMZ und CQ den TMZ-vermittelten Effekt verbessern, allerdings waren die Werte der Behandlungsgruppen nicht statistisch signifikant verschieden (Abb. 12). Bei Einzelvergleich individueller Messreihen ergab sich eine statistisch signifikante Differenz zwischen der DMSO-Kontrolle und der Probe T100/CQ10 an Tag d4 und d6 (Abb. 38). Eine Dosisabhängigkeit des CQ-Effektes wurde nicht evident (Tab. 35 im Anhang). Im Vergleich zur CQ-Einfachbehandlung zeigte sich keine statistisch signifikante Steigerung des CQ-Effektes durch TMZ (Tab. 40 im Anhang), obwohl die Mittelwerte der TMZ/CQ-Proben stets unter denen der korrespondierenden CQ-Werte lagen. Lediglich an Tag d6 ergab sich ein statistisch signifikant niedrigerer BrdU-Einbau durch CQ5 mit TMZ im Vergleich zu CQ5 ohne TMZ (Abbs. 7 und 12; Tab. 40 im Anhang).

Im MTT-Test bewirkte die TMZ-Einfachbehandlung am Messtag d4 und d6 keine signifikante Reduktion der OD in Relation zur DMSO-Kontrolle (Abb. 38). Die zusätzliche Applikation von CQ ergab an Tag d4 Verminderungen der ODs um 18% (T100/CQ5), 22% (T100/CQ10) und 21% (T100/CQ20) relativ zur TMZ-Einfachbehandlung. Die Reduktionen erwiesen sich in der ANOVA Varianzanalyse als statistisch signifikant (MTT; Abb. 12). Die Dosissteigerung von 5 auf 10 μg CQ/ml bzw. von 10 auf 20 μg CQ/ml ergab jedoch keine zusätzlich signifikante Senkung der ODs (Tab. 35 im Anhang). Am Messtag d6 wurden sehr ähnliche Werte gewonnen, die sich von denen an Tag d4 statistisch nicht unterschieden (Abb. 12). Relativ zur Gruppe der CQ-Einfachbehandlungen zeigte sich analog zum BrdU-ELISA kein zusätzlicher Effekt durch die Koapplikation von TMZ mit Ausnahme der statistisch signifikanten Differenz zwischen den Proben CQ5/TMZ und CQ5/- an Tag d6 (Tab. 40 im Anhang). Dabei wurde für die Proben CQ5/- eine geringere OD gemessen als für die Proben CQ5/TMZ (Abbs. 7 und 12).

Auch im Zytotoxizitätstest wurden an beiden Messtagen ähnliche Werte gemessen, wobei auch die CQ-vermittelte Steigerung der LDH-Freisetzung an Tag d4 und d6 vergleichbar war. So wurde an Tag d4 in Anwesenheit von TMZ die LDH-Freisetzung relativ zur Kontrolle auf das 1,3- (T100/CQ5), 1,5- (T100/CQ10) und 1,5-Fache (T100/CQ20) erhöht. Am Tag d6 betrug die Steigerung das 1,2- (T100/CQ5), 1,5- (T100/CQ10) und 1,4-Fache (T100/CQ20). Mit 100 μM TMZ allein wurde die OD geringfügig, aber statistisch signifikant gesenkt (Abb. 38). Damit schien CQ in allen Konzentrationen die durch TMZ-vermittelte Senkung der LDH-Freisetzung aufzuheben und stattdessen eine Erhöhung der LDH zu bewirken. Somit ergab sich in Anwesenheit von TMZ anders als in Abwesenheit von TMZ ein Dosiseffekt für CQ5 und CQ10 (Abbs. 7 und 12; Tabs. 30 und 35 im Anhang). Mit CQ20 waren in An- und Abwesenheit von TMZ die Mittelwerte niedriger als für die entsprechenden CQ10-Messreihen, allerdings ohne statistische Signifikanz.

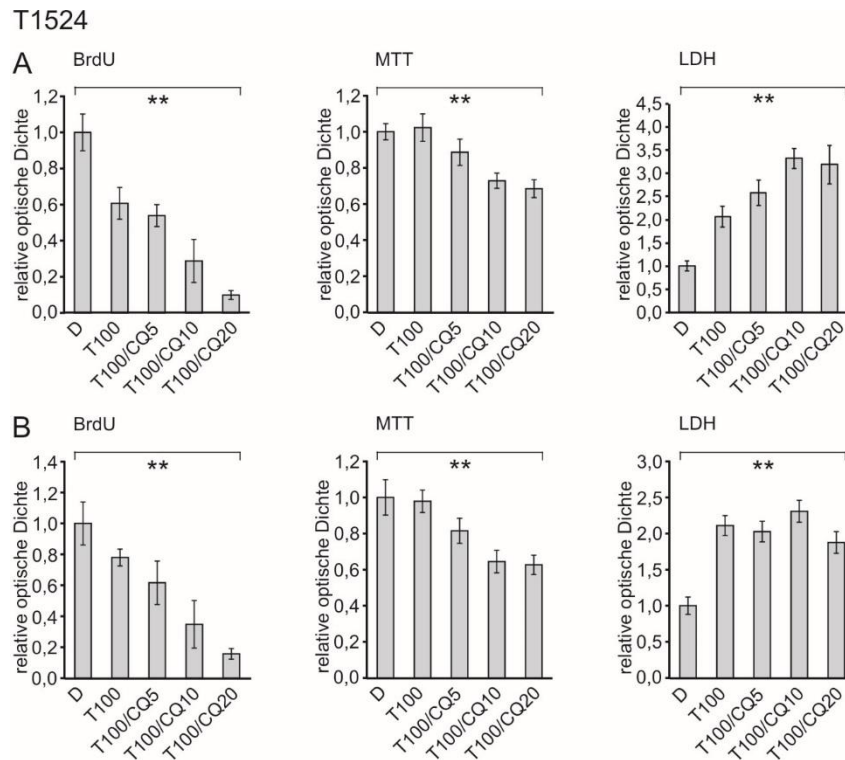


Abb. 13: Effekt steigender Chloroquinkonzentrationen auf die Proliferation (BrdU-ELISA), Vitalität (MTT-Test) und LDH-Freisetzung (Zytotoxizitätsassay) der SLGC-Linie T1524 in Anwesenheit von Temozolomid (TMZ). - (A) Tag d4 nach Behandlung. (B) Tag d6 nach Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte von parallel untersuchten Proben einer Serie und die Standardabweichungen. Die relative optische Dichte der DMSO-Kontrolle wurde als 1 definiert und alle übrigen Werte relativ dazu dargestellt. Statistisch signifikante Abweichungen innerhalb der Behandlungsgruppen wurden mittels ANOVA mit anschließender Bonferroni-Korrektur für multiples Testen ermittelt. Die Signifikanzniveaus werden klassifiziert als $p < 0,05$ (repräsentiert durch *) und $p < 0,005$ (repräsentiert durch **). - CQ5: 5 μg CQ/ml; CQ10: 10 μg CQ/ml; CQ20: 20 μg CQ/ml; D: DMSO.; T100: 100 μM TMZ.

Die Behandlung der SLGC-Linie T1524 mit 100 μM TMZ ergab an Tag d4 und d6 eine deutliche, statistisch signifikante Reduktion des BrdU-Einbaus. Die Koapplikation von CQ führte an beiden Messtagen zu einer Verstärkung des TMZ-vermittelten Effektes (Abb. 13). So wurden die ODs durch TMZ an Tag d4 um 40% relativ zur Kontrolle gesenkt. Die zusätzliche Applikation von CQ führte zu einer stärkeren Verminderung der ODs um 46% (T100/CQ5), 71% (T100/CQ10) bzw. 90% (T100/CQ20). Die Senkungen der ODs durch die CQ-Einfach- und die CQ/TMZ-Doppelbehandlung waren statistisch signifikant verschieden (Abbs. 13 und 39). Relativ zur TMZ-Einfachbehandlung waren die Mittelwerte der Messreihen CQ10 und CQ20 ebenfalls statistisch signifikant verschieden. Weiterhin ergab die Dosissteigerung von 5 auf 10 μg CQ/ml sowie von 10 auf 20 μg CQ/ml in Anwesenheit von TMZ eine zusätzliche statistisch signifikante Senkung der ODs (Tab. 36 im Anhang). Damit war im Vergleich zur CQ-Einfachbehandlung der CQ-Effekt auf die BrdU-Inkorporation in Anwesenheit von TMZ deutlich effizienter (Abb. 43).

Im MTT-Test waren die Unterschiede zwischen Einfach- und Doppelbehandlung nur gering. Erstens wurde an den Messtagen d4 und d6 kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den ODs der

mit 100 μM TMZ behandelten Proben in Relation zur DMSO-Kontrolle beobachtet (Abb. 39). Zweitens wurden zwar durch die zusätzliche Behandlung mit CQ statistisch signifikante Reduktionen der ODs um 11% (T100/CQ5), 27% (T100/CQ10) bzw. 32% (T100/CQ20) erreicht (Abbs. 13 und 39). Im Vergleich mit der CQ-Einfachbehandlung ergab sich jedoch nur in Einzelfällen eine statistisch signifikant niedrigere OD durch die CQ/TMZ-Doppelbehandlung. Dies war z.B. an Tag d4 mit CQ5/TMZ relativ zu CQ5/- und an Tag d6 mit CQ5/TMZ und CQ10/TMZ relativ zu CQ5/- bzw. CQ10/- der Fall. Mit CQ20 wurden an Tag d6 sogar statistisch signifikant höhere ODs in Anwesenheit von TMZ gemessen (Abb. 43 und Tab. 40 im Anhang). Der CQ-Effekt erwies sich in allen Fällen als dosisabhängig (Tab. 36 im Anhang).

Im Zytotoxizitätsassay bewirkte die Doppelbehandlung mit TMZ und CQ an Tag d4 und d6 statistisch signifikante Erhöhungen der LDH-Freisetzung (Abbs. 13 und 39). Bereits mit 100 μM TMZ allein wurde die LDH-Freisetzung an Tag d4 auf das 2,1-Fache gesteigert. Die Koapplikation von TMZ und CQ ergab an Tag d4 Steigerungen der LDH-Freisetzung auf das 2,6-Fache (T100/CQ5), das 3,3- (T100/CQ10) und 3,2-Fache (T100/CQ20). Dabei wurden in Anwesenheit von TMZ statistisch signifikante Zunahmen der ODs durch Erhöhung der CQ-Dosis von 0 auf 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sowie von 5 auf 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ermittelt, nicht aber bei Erhöhung der Dosis von 10 auf 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CQ/ml (Tab. 36 im Anhang). An Tag d6 dagegen bewirkte relativ zur TMZ-Einfachbehandlung lediglich die Koapplikation von 10 μg CQ/ml eine zusätzliche statistisch signifikante Steigerung der LDH-Freisetzung, während 20 μg CQ/ml sogar zu einer statistisch signifikanten Abnahme der ODs führten (Abb. 13; Tab. 36 im Anhang). Bei Vergleich mit der CQ-Einfachbehandlung zeigten sich an beiden Messtagen nur in Einzelfällen statistisch signifikant höhere LDH-Freisetzungen in Anwesenheit von TMZ. Dies war im Falle der Doppelbehandlungen mit CQ5/TMZ und CQ10/TMZ zu beobachten, nicht aber mit CQ20/TMZ (Abb. 43 und Tab. 40 im Anhang).

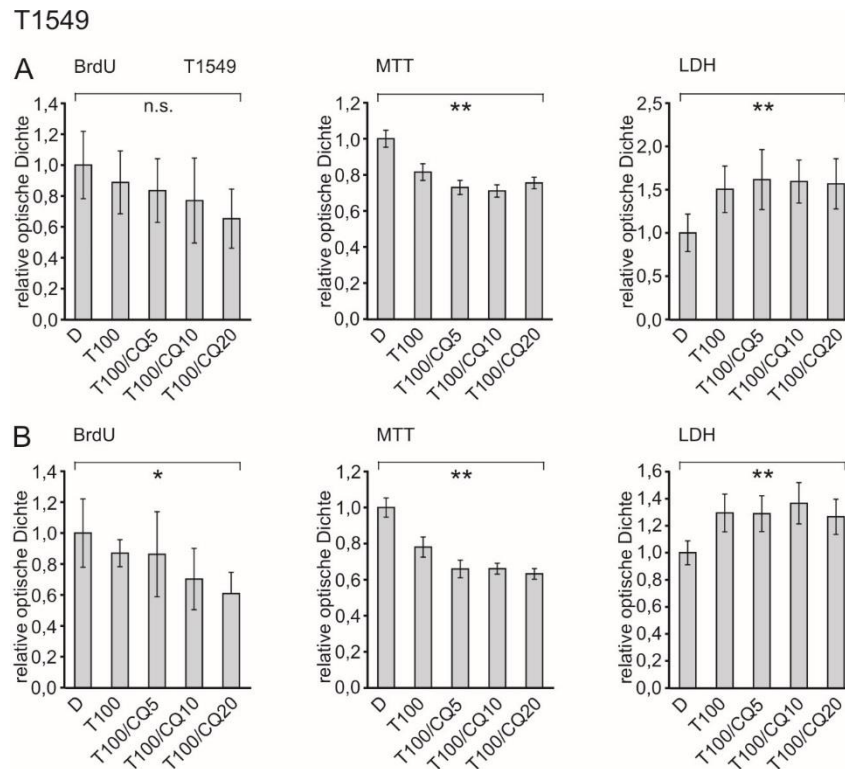


Abb. 14: Effekt steigender Chloroquinkonzentrationen auf die Proliferation (BrdU-ELISA), Vitalität (MTT-Test) und LDH-Freisetzung (Zytotoxizitätsassay) der SLGC-Linie T1549 in Anwesenheit von Temozolomid (TMZ). - (A) Tag d4 nach Behandlung. (B) Tag d6 nach Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte von parallel untersuchten Proben einer Serie und die Standardabweichungen. Die relative optische Dichte der DMSO-Kontrolle wurde als 1 definiert und alle übrigen Werte relativ dazu dargestellt. Statistisch signifikante Abweichungen innerhalb der Behandlungsgruppen wurden mittels ANOVA mit anschließender Bonferroni-Korrektur für multiples Testen ermittelt. Die Signifikanzniveaus werden klassifiziert als $p < 0,05$ (repräsentiert durch *) und $p < 0,005$ (repräsentiert durch **). - CQ5: 5 μg CQ/ml; CQ10: 10 μg CQ/ml; CQ20: 20 μg CQ/ml; D: DMSO.; T100: 100 μM TMZ.

Wie zuvor bei der CQ-Einfachbehandlung waren die BrdU-ELISAs der Zelllinie T1549 durch die geringe Adhärenz der Zellen beeinträchtigt. Dennoch wurde nach Behandlung 100 μM TMZ an Tag d4 und d6 eine statistisch nicht-signifikante Senkung des BrdU-Einbaus um 11% (d4) bzw. 9% (d6) beobachtet (Abb. 40). Die zusätzliche Behandlung mit CQ führte an Tag d4 zu verstärkten Reduktionen der ODs um 17% (T100/CQ5), 23% (T100/CQ10) und 35% (T100/CQ20). An Tag d6 wurde ebenfalls eine mit steigender CQ-Dosis zunehmende Senkung der Mittelwerte festgestellt. Wegen der hohen Standardabweichungen waren nur einige Unterschiede statistisch signifikant, sodass die Werte des BrdU-ELISAs tendenziell anzeigen, dass die Doppelbehandlung mit TMZ und CQ die TMZ-vermittelte Senkung der Proliferation verbessern könnte. Relativ zur DMSO-Kontrolle waren lediglich die Messreihen T100/CQ20/d4 und T100/CQ20/d6 statistisch signifikant verschieden (Abb. 40). Im Vergleich zur CQ-Einfachbehandlung wurde keine statistisch signifikante Wirkung durch die Doppelbehandlung evident (Tab. 40 im Anhang).

Im MTT-Test führte die Behandlung mit TMZ und CQ an den Messtagen d4 und d6 zu statistisch signifikanten Abnahmen der ODs (Abbs. 14 und 40). Die TMZ-Einfachbehandlung senkte die OD an Tag d4 bereits um 19%, an Tag d6 um 22%. Die Koapplikation von CQ ergab an Tag d4 Senkungen der ODs um 27% (T100/CQ5), 29% (T100/CQ10) und 25% (T100/CQ20). An Tag d6 zeigte sich ein ähnliches Bild, wobei die Reduktionen relativ zur Kontrolle und zur TMZ-Einfachbehandlung stärker ausgeprägt waren als an Tag d4. Die CQ/TMZ-behandelten Messreihen waren an beiden Messtagen von den Messreihen der TMZ-Einfachbehandlung statistisch signifikant verschieden. Eine Abhängigkeit von der CQ-Dosis wurde allerdings an beiden Messtagen nicht evident (Tab. 37 im Anhang). Im Vergleich zur CQ-Einfachbehandlung wurden für alle CQ-Konzentrationen an beiden Tagen statistisch signifikant niedrigere ODs in Anwesenheit von TMZ als in Abwesenheit von TMZ (Abbs. 9 und 14; Tab. 40 im Anhang) ermittelt.

Im Zytotoxizitätstest zeigten sich an Tag d4 und d6 statistisch signifikante Erhöhungen der LDH-Freisetzung durch TMZ allein und die TMZ/CQ-Doppelbehandlung (Abbs. 14 und 40). TMZ steigerte die LDH-Freisetzung an Tag d4 auf das 1,5-Fache der Kontrolle, an Tag d6 auf das 1,3-Fache. Die zusätzliche Gabe von CQ führte an Tag d4 unabhängig von der eingesetzten CQ-Dosis zu Erhöhungen der LDH-Freisetzung auf das 1,6-Fache der Kontrolle. Tag d6 ergab ein ähnliches Bild, wobei die maximale OD nur das 1,4-Fache der Kontrolle erreichte. Damit wurde an beiden Messtagen keine statistisch signifikante Steigerung der LDH-Freisetzung durch die CQ/TMZ-Doppelbehandlung im Vergleich zur TMZ-Einfachbehandlung ermittelt (Tab. 37 im Anhang). Allerdings zeigte sich in der TMZ/CQ-Doppelbehandlung im Vergleich zur CQ-Einfachbehandlung in allen Proben eine statistisch signifikante Zunahme der LDH-Freisetzung, die somit auf der Anwesenheit von TMZ zu beruhen scheint (Abbs. 9 und 14; Tab. 40 im Anhang).

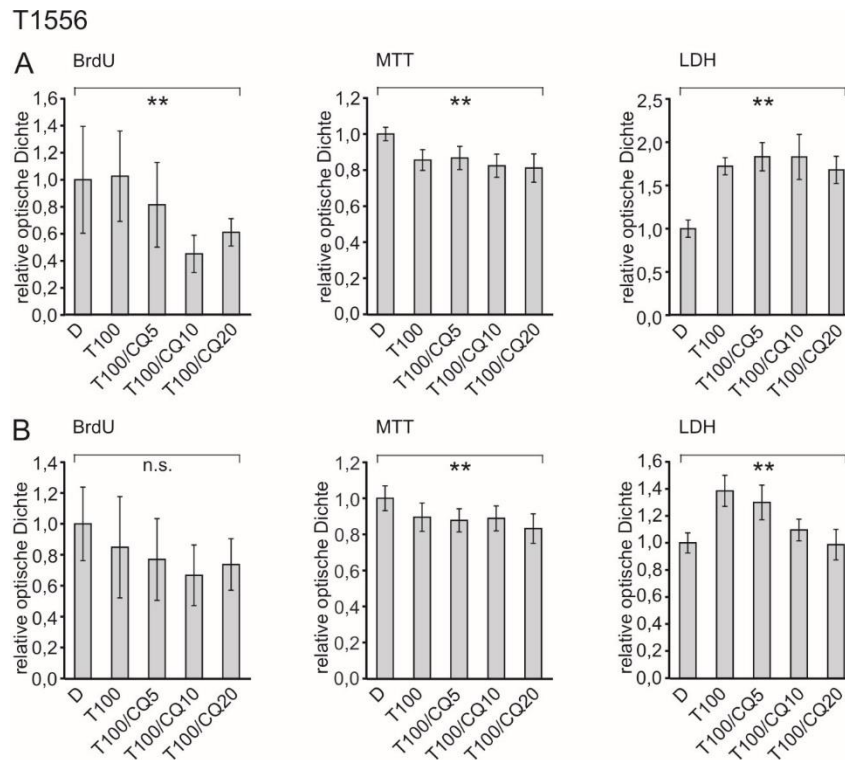


Abb. 15: Effekt steigender Chloroquinkonzentrationen auf die Proliferation (BrdU-ELISA), Vitalität (MTT-Test) und LDH-Freisetzung (Zytotoxizitätsassay) der SLGC-Linie T1556 in Anwesenheit von Temozolomid (TMZ). - (A) Tag d4 nach Behandlung. (B) Tag d6 nach Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte von parallel untersuchten Proben einer Serie und die Standardabweichungen. Die relative optische Dichte der DMSO-Kontrolle wurde als 1 definiert und alle übrigen Werte relativ dazu dargestellt. Statistisch signifikante Abweichungen innerhalb der Behandlungsgruppen wurden mittels ANOVA mit anschließender Bonferroni-Korrektur für multiples Testen ermittelt. Die Signifikanzniveaus werden klassifiziert als $p < 0,05$ (repräsentiert durch *) und $p < 0,005$ (repräsentiert durch **). - CQ5: 5 μg CQ/ml; CQ10: 10 μg CQ/ml; CQ20: 20 μg CQ/ml; D: DMSO.; T100: 100 μM TMZ.

Wie zuvor erwähnt, führte die geringe Adhärenz und das Sphärenwachstum der SLGC-Linie T1556 im BrdU-ELISA zu großen Messfehlern. Somit ist die statistisch signifikante Differenz innerhalb der Behandlungsgruppe am Messtag d4 mit Vorsicht zu interpretieren (Abb. 15). Die Behandlung mit 100 μM TMZ zeigte an beiden Messtagen keine statistisch signifikante Wirkung auf den BrdU-Einbau (Abb. 41). Durch die zusätzliche Applikation von CQ wurden an Tag d4 Senkungen der Mittelwerte der ODs um 19% (T100/CQ5), 55% (T100/CQ10) und 39% (T100/CQ20) gemessen. Dabei waren die Messreihen T100/CQ10 und T100/CQ20 von der Kontrolle und der TMZ-Einfachbehandlung statistisch signifikant verschieden (Abb. 41 und Tab. 38 im Anhang). Eine statistisch signifikante Reduktion des BrdU-Einbaus durch Steigerung der CQ-Dosis kann nicht abgeleitet werden, da der Mittelwert der Proben T100/CQ10 unter dem von T100/CQ20 liegt (Abb. 15). Beim Vergleich mit der CQ-Einfachbehandlung wurde keine statistisch signifikante Steigerung des CQ-Effektes durch TMZ nachgewiesen (Tab. 40 im Anhang). Im MTT-Test ergab die Behandlung mit TMZ und CQ an den Messtagen d4 und d6 statistisch signifikante Senkungen der ODs (Abbs. 15 und 41). TMZ bewirkte an Tag d4 eine Abnahme der OD um 15%,

an Tag d6 um 10%. Die Doppelbehandlung mit CQ führte zu Reduktionen um 13% (T100/CQ5), 18% (T100/CQ10) und 19% (T100/CQ20). An Tag d6 zeigte sich ein ähnliches Bild, wobei die maximale Senkung des Mittelwertes 17% betrug (T100/CQ20). Damit konnte die CQ/TMZ-Doppelbehandlung die TMZ-vermittelte Senkung der Vitalität an beiden Messtagen nicht verbessern. Die Steigerung der CQ-Dosis ergab keinen statistisch signifikanten Effekt hinsichtlich der Abnahme der ODs (Tab. 38 im Anhang). Im Vergleich zur CQ-Einfachbehandlung zeigten sich ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede der Messreihen in An- und Abwesenheit von TMZ (Tab. 40 im Anhang).

Im Zytotoxizitätstest zeigten sich an Tag d4 und d6 statistisch signifikante Erhöhungen der LDH-Freisetzung durch die Behandlungen mit TMZ und CQ (Abbs. 15 und 41), wobei an Tag d4 kein CQ-Effekt erkennbar war und an Tag d6 CQ die TMZ-Wirkung aufzuheben schien. So steigerte TMZ an Tag d4 die LDH-Freisetzung auf das 1,7-Fache der Kontrolle. Die Koapplikation von CQ bewirkte Steigerungen auf das 1,6- bis 1,8-Fache. Somit konnte die zusätzliche Gabe von steigenden CQ-Konzentrationen die TMZ-vermittelte Wirkung auf die LDH-Freisetzung nicht verstärken (Tab. 38 im Anhang). Im Vergleich zur CQ-Einfachbehandlung ergaben sich allerdings statistisch signifikant höhere LDH-Freisetzungen durch CQ5 und CQ10 in Anwesenheit von TMZ relativ zur Abwesenheit von TMZ. (Abbs. 10 und 15; Tab. 40 im Anhang). An Tag d6 wurde dagegen für die TMZ/CQ-Proben eine CQ- Dosisabhängigkeit in „invertierter“ Form beobachtet. D.h. mit TMZ und 5 µg CQ/ml wurde die höchste LDH-Freisetzung gemessen, die allerdings geringer als die LDH-Freisetzung mit TMZ allein war (T100: 1,4-Fach, T100/CQ5: 1,3-Fach). Mit steigender CQ-Konzentration sanken die Mittelwerte der ODs relativ zu derjenigen der nächstniedrigeren CQ-Konzentration (Abb. 15). Dabei waren die Unterschiede zwischen den Messreihen CQ5 und CQ10 sowie zwischen CQ10 und CQ20 statistisch signifikant verschieden (Tab. 38 im Anhang). Im Vergleich zur CQ-Einfachbehandlung wich lediglich der Mittelwert für die Messreihe T100/CQ5 statistisch signifikant ab, wobei eine höhere LDH-Freisetzung als in Abwesenheit von TMZ gemessen wurde (Tab. 40 im Anhang).

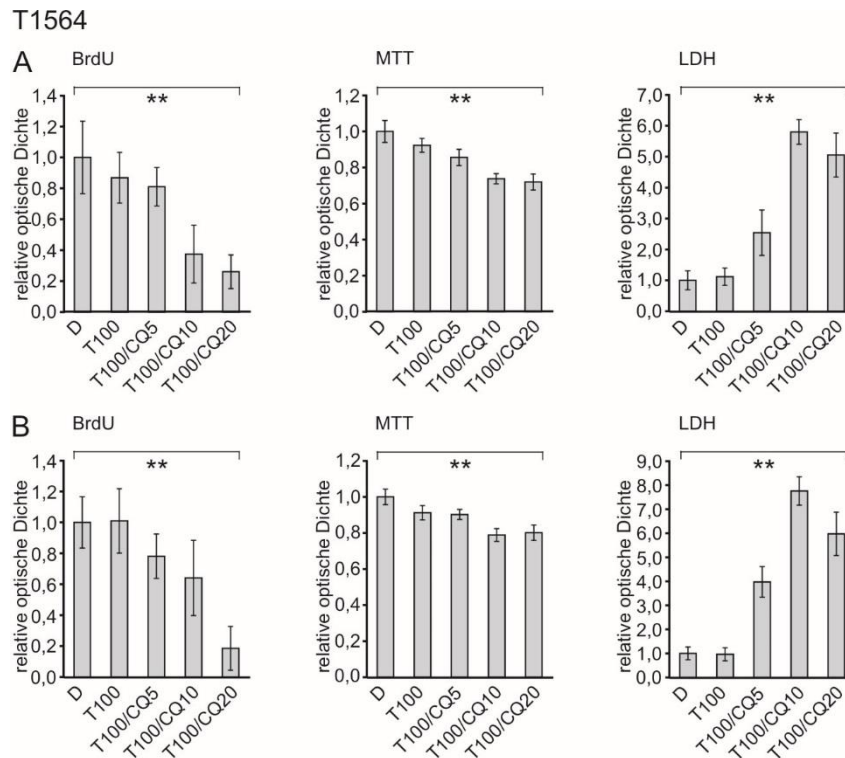


Abb. 16: Effekt steigender Chloroquinkonzentrationen auf die Proliferation (BrdU-ELISA), Vitalität (MTT-Test) und LDH-Freisetzung (Zytotoxizitätsassay) der SLGC-Linie T1564 in Anwesenheit von Temozolomid (TMZ). - (A) Tag d4 nach Behandlung. (B) Tag d6 nach Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte von parallel untersuchten Proben einer Serie und die Standardabweichungen. Die relative optische Dichte der DMSO-Kontrolle wurde als 1 definiert und alle übrigen Werte relativ dazu dargestellt. Statistisch signifikante Abweichungen innerhalb der Behandlungsgruppen wurden mittels ANOVA mit anschließender Bonferroni-Korrektur für multiples Testen ermittelt. Die Signifikanzniveaus werden klassifiziert als $p < 0,05$ (repräsentiert durch *) und $p < 0,005$ (repräsentiert durch **). - CQ5: 5 μg CQ/ml; CQ10: 10 μg CQ/ml; CQ20: 20 μg CQ/ml; D: DMSO.; T100: 100 μM TMZ.

Die SLGC-Linie T1564 zeigte an Tag d4 und d6 statistisch signifikante Reduktionen der BrdU-Inkorporation nach Doppelbehandlung mit TMZ und CQ (Abb. 16). Dagegen konnten die ODs nach alleiniger Behandlung mit 100 μM TMZ an beiden Tagen nicht statistisch signifikant gesenkt werden (Abb. 42). Dabei senkte TMZ an Tag d4 den BrdU-Einbau relativ zur Kontrolle um 13%, während die Mittelwerte von Kontroll- und T100-Proben am Tag d6 fast identisch waren. An Tag d4 ergab die Doppelbehandlung mit TMZ und CQ eine zusätzliche Reduktion der ODs. Relativ zur Kontrolle nahmen die ODs um 19% (T100/CQ5), 63% (T100/CQ10) und 74% (T100/CQ20) ab. Dabei wurde eine statistisch signifikante Senkung der ODs relativ zur Kontrolle erst für die Messreihe T100/CQ10 erreicht (Abb. 42). An Tag d6 wurde eine statistisch signifikante Senkung bereits für die Proben T100/CQ5 beobachtet (Abb. 42). Mit Ausnahme von CQ5 an Tag d4 konnte CQ in jeder der Doppelbehandlungen die TMZ-vermittelte Senkung des BrdU-Einbaus statistisch signifikant verbessern. Dabei wurde insbesondere an Tag d6 die Abhängigkeit von der CQ-Dosis evident (Tab. 39 im Anhang). Im Vergleich zur CQ-Einfachbehandlung wur-

den jedoch nur zum Teil statistisch signifikant niedrigere ODs in Anwesenheit von TMZ ermittelt. Insbesondere bei niedrigen CQ-Konzentrationen lagen die ODs der Messreihen in Abwesenheit von TMZ statistisch signifikant unter den in Anwesenheit von TMZ (Abb. 11 und 16, Tab. 40 im Anhang). Damit ist eine CQ-dosisabhängige Reduktion der Proliferation von T1564 wahrscheinlich, ein proliferationsinhibierender Effekt von 100 μ M TMZ aber auszuschließen.

Im MTT-Test ergab die Behandlung mit TMZ und CQ an beiden Messtagen statistisch signifikante Senkungen der ODs (Abbs. 16 und 42). TMZ reduzierte die OD an Tag d4 statistisch signifikant um 7,7%, an Tag d6 um 8,8% (Abb. 42). Die Koapplikation von TMZ und CQ reduzierte die Vitalität relativ zur Kontrolle um 14% (T100/CQ5), 26% (T100/CQ10) und 28% (T100/CQ20). Somit senkte die Doppelbehandlung die Vitalität statistisch signifikant stärker als TMZ allein (Tab. 39 im Anhang). An Tag d6 zeigte sich ein ähnliches Bild, wobei die maximale Senkung der ODs 20% relativ zur Kontrolle betrug. An beiden Tagen war ein Trend zu einem von der CQ-Dosis abhängigen Effekt feststellbar, da jeweils die Steigerung von 5 auf 10 μ g CQ/ml, nicht aber von 10 auf 20 μ g CQ/ml eine zusätzliche statistisch signifikante Reduktion der ODs ermöglichte (Tab. 39 im Anhang). Im Vergleich zur CQ-Einfachbehandlung wurde keine Steigerung des CQ-Effektes in Anwesenheit von TMZ evident (Tab. 40 im Anhang).

Im Zytotoxizitätsassay zeigte die TMZ-Einfachbehandlung an Tag d4 und d6 keine Wirkung auf die LDH-Freisetzung (Abb. 16). Die Koapplikation von CQ ergab an beiden Messtagen statistisch signifikante und dosisabhängige Steigerungen der LDH-Freisetzung (Abbs. 16 und 42). So wurde der LDH-Spiegel an Tag d4 auf das 2,5-Fache (T100/CQ5), 5,8-Fache (T100/CQ10) und das 5,0-Fache (T100/CQ20) relativ zur Kontrolle erhöht. An Tag d6 zeigte sich ein ähnliches Bild, jedoch mit stärkeren Erhöhungen. Die maximale LDH-Freisetzung wurde für T100/CQ10 gemessen und betrug das 7,8-Fache. Im Vergleich zur CQ-Einfachbehandlung zeigten sich an Tag d4 keine statistisch signifikanten Unterschiede. An Tag d6 wurden statistisch signifikant niedrigere LDH-Freisetzungen in Anwesenheit von TMZ gemessen, jedoch nur für die mit 5 μ g/ml CQ und 20 μ g/ml CQ behandelten Proben (Abbs. 11 und 16; Tab. 40 im Anhang). Auffallend ist, dass die ODs für die Messreihen T100/CQ20 an Tag d4 und d6 sehr deutlich und statistisch signifikant unter denen der T100/CQ10-Proben lagen (Abb. 16, Tab. 39 im Anhang). Diese überraschende Beobachtung wurde in An- und Abwesenheit von TMZ gemacht, war aber in Abwesenheit von TMZ geringer und statistisch nicht signifikant (Abb. 11, Tab. 34 im Anhang).

Fazit:

Die Ergebnisse zeigen, dass 100 μ M TMZ allein häufig keinen Effekt auf die Proliferationsrate oder die Vitalität von SLGC-Linien ausübte, während es in drei von fünf Fällen zu einer Zunahme der LDH-Freisetzung führte (Tab. 15). Im Fall der Zelllinie T1522 senkte TMZ allein sogar die LDH-Freisetzung. Die Doppelbehandlung mit TMZ und CQ führte relativ zur DMSO-Kontrolle immer zu einer Abnahme der BrdU-Inkorporation und einer Senkung der Vitalität sowie zu einer Steigerung der LDH-Freisetzung. Im

Unterschied zur CQ-Einfachbehandlung ergab die TMZ/CQ-Doppelbehandlung eine stärkere Erhöhung der LDH-Freisetzung. Dies war in den Fällen zu beobachten, in denen TMZ allein bereits eine Steigerung induzierte sowie in der Zelllinie T1564, in der TMZ allein keinen Effekt ausübte. Im Fall der Zelllinie T1522 führte die TMZ/CQ-Doppelbehandlung ebenfalls zu einer gesteigerten LDH-Freisetzung, deren Maximum jedoch im Gegensatz zur CQ-Einfachbehandlung erst mit 10 µg CQ/ml und nicht bereits mit 5 µg CQ/ml erreicht wurde. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der Effekt auf die LDH-Freisetzung am ehesten durch CQ und nicht durch TMZ bedingt wurde. Bezüglich der Steigerung der proliferationshemmenden Effekte durch Erhöhung der CQ-Dosis ergaben sich verschiedene Beobachtungen. Im Fall von T1522 waren sowohl bei der CQ-Einfach- als auch bei der TMZ/CQ-Doppelbehandlung die maximalen Effekte auf die Proliferation bereits mit 5 µg CQ/ml feststellbar. Die Steigerung von 5 auf 10 µg CQ/ml erbrachte in den Fällen von T1524, T1549, T1556 und T1564 eine Zunahme des Effektes. Die weitere Steigerung der Dosis von 10 auf 20 µg CQ/ml bewirkte nur noch im Fall von T1524 und T1564 einen eindeutigen Effekt. Insgesamt fiel auf, dass der maximale proliferationshemmende Effekt bei der TMZ/CQ-Doppelbehandlung im Gegensatz zur CQ-Einfachbehandlung zum Teil erst durch höhere CQ-Konzentrationen erreicht wurde. Auch hinsichtlich der Vitalitätsminderung erzielte die Dosissteigerung unterschiedliche Effekte. Bei der Zelllinie T1522 wurde die maximale CQ-Wirkung in Einfach- sowie Doppelbehandlung mit 5 µg CQ/ml erreicht. Auch in T1549 und T1556 trat der stärkste Effekt auf die Vitalität bei der TMZ/CQ-Doppelbehandlung bereits mit 5 µg CQ/ml auf. Dabei wurde bei der CQ-Einfachbehandlung in diesen beiden Zelllinien der maximale Effekt erst mit 10 µg CQ/ml festgestellt. Die Steigerung von 5 auf 10 µg CQ/ml bewirkte in den Fällen von T1524 und T1564 eine Zunahme des Effektes in Einfach- und Doppelbehandlung. Die weitere Steigerung der Dosis von 10 auf 20 µg CQ/ml ergab nur noch im Fall von T1524 einen zusätzlichen Effekt. Die Behandlungszeit hatte insgesamt keinen Effekt auf Proliferation und Vitalität.

Tab. 15: Effekte von Chloroquin und TMZ Einfach- und Doppelbehandlungen auf Proliferation und Vitalität von SLGC-Linien

		Tag d4			Tag d6		
		CQ	TMZ	TMZ/CQ	CQ	TMZ	TMZ/CQ
T1522	BrdU	↓ (5)	≈	↓ (5)	↓(20)	≈	↓(5)
	MTT	↓ (5)	≈	↓ (5)	↓(5)	≈	↓(10)
	LDH	1,4x↑ (5)	↓	1,5x↑ (10)	1,6x↑ (5)	↓	1,5x↑ (10)
T1524	BrdU	↓↓↓(20)	↓↓	↓↓↓(20)	↓↓↓(20)	↓	↓↓↓(20)
	MTT	↓↓(20)	≈	↓↓(20)	↓↓(20)	≈	↓↓(20)
	LDH	3,6x↑(20)	2,1x↑	3,3x↑(10)	1,8x↑(20)	2,1x↑	2,3x↑(10)
T1549	BrdU	↓↓(20)	≈	↓↓(20)	↓(5)	↓	↓↓(20)
	MTT	↓(10)	↓	↓(5)	↓(5)	↓	↓(5)
	LDH	1,3x↑(10)	1,5x↑	1,6x↑(5)	≈	1,3x↑	1,4x↑(10)
T1556	BrdU	↓↓(10)	≈	↓↓(10)	↓(5)	↓	↓↓(10)
	MTT	↓(10)	↓	↓(5)	↓(10)	↓	↓(5)
	LDH	1,5x↑(10)	1,7x↑	1,8x↑(5)	≈	1,4x↑	1,3x↑
T1564	BrdU	↓↓↓(20)	≈	↓↓↓(20)	↓↓↓(5)	≈	↓↓↓(20)
	MTT	↓(10)	≈	↓(10)	↓(10)	≈	↓(10)
	LDH	5,3x↑(10)	≈	5,8x↑(10)	7,3x↑(10)	≈	7,8x↑(10)

≈ Änderungen < 10%

↓ Senkung 10-30%
 ↓↓ Senkung 30-50%
 ↓↓↓ Senkung > 50%

3.2 Zellzyklusanalyse selektierter SLGC-Linien

3.2.1 Verteilung der Zellen im Zellzyklus

Um die Frage nach dem Einfluss der TMZ/CQ- Einfach- und Doppelbehandlung auf die Verteilung der Zellen im Zellzyklus zu klären, wurden Propidiumiodid-markierte SLGCs durchflusszytometrisch untersucht. Der Farbstoff Propidiumiodid (PI) interkaliert in die DNA und erlaubt mittels Durchflusszytometrie die Messung des DNA-Gehaltes von Zellen und damit eine Bestimmung der Zellzyklusphasen. Von den in den vorherigen Analysen untersuchten Zelllinien wurden drei SLGC-Linien für die weiteren Untersuchungen in Betracht gezogen. Zusätzlich wurde die etablierte GBM-Linie U87MG analysiert, da diese in den späteren *in vivo* Analysen als Kontrolle diente, sowie eine weitere SLGC-Linie (T1371), deren TMZ/CQ-Rezeptivität in einer früheren Masterarbeit untersucht worden war (siehe Diskussion). Im Gegensatz zu den vorherigen Analysen wurde in den folgenden Experimenten die TMZ-Konzentration dem MGMT-Status der Zelllinien angepasst, der von Kollegen im Labor bestimmt worden war. Die DMSO-Konzentration betrug hier stets 0,2%, da die TMZ-Zugabe in ein größeres Volumen an Medium erfolgen konnte.

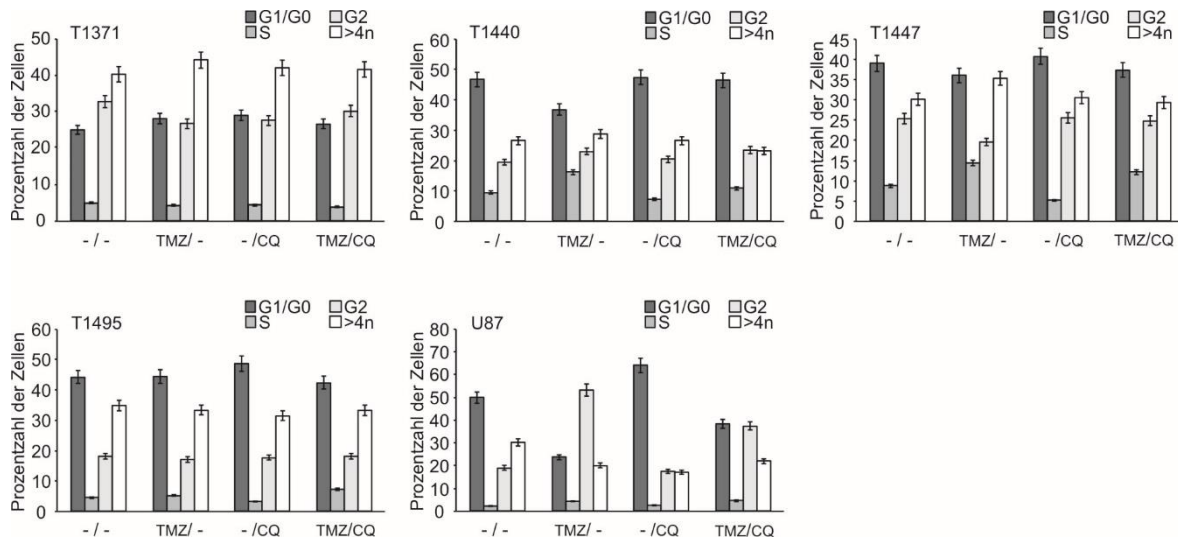


Abb. 17: Durchflusszytometrische Analyse Propidiumiodid-markierter Zellen. - Die Graphen zeigen den Effekt von Temozolomid und Chloroquin auf die Verteilung der Zellen im Zellzyklus an Tag d2 nach Behandlung. Alle Proben enthielten 0,2% DMSO, das als Lösungsmittel für das hydrophobe TMZ diente. Die TMZ-Konzentration orientierte sich am MGMT-Status der Zelllinien und betrug 200 μM für T1371, 200 μM für T1440, 100 μM für T1447, 50 μM für T1495 und 200 μM für U87. CQ wurde stets in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt. Der systematische Fehler wurde mit 5% angegeben.

In der Kontrolle der SLGC-Linie T1371 befanden sich an Tag d2 nach Behandlung 25,1% der Zellen in der G0/G1-Phase, 5,0% in der S-Phase und 32,8% in der G2-Phase (Abb. 17). Ein Anteil von 40,3% wies ein DNA-Gehalt von $> 4n$ auf, was als Hinweis für eine Poly- bzw. Aneuploidie gilt. Die Behandlungen mit 200 μM TMZ und 10 $\mu\text{g/ml}$ CQ übten nur einen geringen Einfluss auf die Verteilung der Zellen in den Zellzyklusphasen aus. Durch die TMZ-Behandlung kam es zu einer sehr geringen Zunahme an Zellen in der G0/G1-Phase um 3,1% und in der $>4n$ Fraktion um 4%. Der Anteil der Zellen in der S-Phase blieb gleich, während der Anteil in G2 um 6,0% abnahm. Nach Behandlung mit 10 $\mu\text{g/ml}$ CQ wurde wieder eine geringe Zunahme an Zellen in der G0/G1-Phase (3,9%) beobachtet. Der Anteil der Zellen in der S-Phase blieb unverändert und der Anteil der $>4n$ Fraktion stieg um 1,8%. Die Zunahme in G0/G1 erfolgte wiederum auf Kosten des Anteils der Zellen in G2 (5,1% Abnahme). Die Doppelbehandlung mit 200 μM TMZ und 10 $\mu\text{g/ml}$ CQ bewirkte einen geringeren Anstieg der Zellen in der G0/G1-Phase (1,5%) als die Einzelbehandlungen. Der Anteil der Zellen in der S-Phase blieb nahezu unverändert, der Anteil der Zellen in G2 nahm ab (2,6%) und die $>4n$ Fraktion änderte sich minimal (1,4% Zunahme).

Die SLGC-Linie T1440 zeigte an Tag d2 in der Kontrolle einen Anteil von 46,7% in G0/G1, 9,5% in S und 19,4% in G2 (Abb. 17). Daneben wies ein Anteil von 26,6% der Zellen einen DNA-Gehalt von $>4n$ auf. Nach der Behandlung mit 50 μM TMZ sank der Anteil an Zellen in der G0/G1-Phase deutlich (9,9%) zugunsten des Anteils von Zellen in der S-Phase (6,7% Zunahme). Auch der Anteil von Zellen in der G2-Phase und der $>4n$ Fraktion nahm leicht um 3,6% bzw. 2,2% zu. Dagegen blieb nach CQ-Behandlung die Verteilung der Zellen im Zellzyklus im Vergleich zur Kontrolle nahezu unverändert (Abb. 17). Es

zeigte sich eine Verteilung von 47,4% in G0/G1, 7,2% in S, 20,5% in G2 und 26,5% in der Fraktion >4n. Die Behandlung mit 50 μ M TMZ und 10 μ g/ml CQ wirkte sich kaum auf die G0/G1-Phase aus (TMZ/CQ: 46,4%; Kontrolle: 46,7%), sondern resultierte in einer leichten Zunahme der Zellen in der S-Phase um 1,5% und der G2-Phase um 4,0%. Der Anteil der Zellen mit einem DNA-Gehalt > 4n sank dabei um 3,3%. Somit führte TMZ zu einer Verschiebung der Zellen im Zellzyklus (geringe Anreicherung in S und G2), die durch die Koapplikation von CQ weitgehend aufgehoben wurde.

An Tag d2 zeigte die Kontrolle der T1447-Zellen eine Zellzyklusverteilung von 39,0% in der G0/G1-Phase, 8,8% in der S-Phase und 25,3% in der G2-Phase (Abb. 17). Weiterhin wurde ein Anteil von 30,1% an Zellen mit einem DNA-Gehalt von > 4n ermittelt. Durch die TMZ-Behandlung (100 μ M) kam es vor allem zu einer Anreicherung der Zellen in der >4n Fraktion (5,2%). Diese wurde begleitet von einer geringen Abnahme von Zellen in G1/G0 (2,9%), einem Anstieg in der S-Phase (5,6%) und eine Senkung der Zellen in der G2-Phase (5,7%) Nach Behandlung mit 10 μ g/ml CQ wurde dagegen fast kein Unterschied relativ zur Kontrolle beobachtet (G0/G1-Phase 40,7%, S-Phase: 5,2%, G-Phase: 25,5%, >4n Fraktion: 30,5%). Die Doppelbehandlung mit 100 μ M TMZ und 10 μ g/ml CQ bewirkte tendenziell ähnliche Veränderungen wie 100 μ M TMZ allein, d.h. eine leichte Abnahme an Zellen in G1/G0 (1,6%) und eine Zunahme in der S-Phase um 3,4%. Andererseits unterblieb die mit alleiniger TMZ-Behandlung beobachtete Senkung des Anteils in G2 (24,8%) und Steigerung in der >4n Fraktion (29,4%).

Die Behandlung der Zelllinie T1495 mit 50 μ M TMZ und 10 μ g/ml CQ in der Einfach- und Doppelbehandlung hatte nur geringe Auswirkungen auf die Verteilung der Zellen im Zellzyklus (Abb. 17). Die Kontrolle zeigte an Tag d2 eine Verteilung von 44,3% der Zellen in G0/G1, 4,5% in S, 18,1% in G2 sowie 34,8% in der Fraktion > 4n. Nach TMZ-Behandlung befanden sich 44,5% in G0/G1, 5,2% in S, 17,2% in G2 sowie 33,4% in der > 4n Fraktion. Unter alleiniger CQ- Behandlung kam es zu einer minimalen Zunahme an Zellen in G0/G1 um 4,3%. 1,2% weniger Zellen befanden sich in der S-Phase. Der Anteil der Zellen in der G2-Phase blieb unverändert und der Anteil an Zellen mit einem DNA-Gehalt von > 4n wurde um 3,3% vermindert. Die Doppelbehandlung mit 50 μ M TMZ und 10 μ g/ml CQ bewirkte eine Abnahme der Zellen in der G0/G1-Phase um 2,0%. Der Anteil an Zellen in der S-Phase stieg um 2,8%, während der Anteil der Zellen in G2 unverändert blieb. 1,4% weniger Zellen hatten ein DNA-Gehalt von > 4n. Somit induzierten weder 50 μ M TMZ oder 10 μ g/ml CQ noch die Doppelbehandlung eine relevante Umverteilung der Zellen im Zellzyklus.

Anders als die SLGC-Linien reagierte die etablierte GBM-Zelllinie U87MG mit deutlichen Umverteilungen der Zellen in den Zyklusphasen. An Tag d2 zeigte die U87MG-Linie in der Kontrolle eine Verteilung der Zellen von 49,9% in G0/G1, 2,3% in S und 19,0% in der G2-Phase (>4n Fraktion: 30,3%; Abb. 17). Nach TMZ-Behandlung kam es zu einem deutlichen G2-Arrest. So sank der Anteil an Zellen in G0/G1 nach Behandlung mit 200 μ M TMZ um 26,2% unter gleichzeitiger Zunahme des Anteils an Zellen in G2 um 34,2%. Der Anteil an Zellen mit einem DNA-Gehalt > 4n nahm dabei um 10,2% ab, während der

Anteil in der S-Phase nahezu unverändert blieb (Kontrolle: 2,3%; TMZ: 4,5%). Die CQ-Einfachbehandlung ergab dagegen eine Zunahme des Anteils an Zellen in G0/G1 um 14,1%, während der Anteil an Zellen in der S- und G2-Phase unverändert blieb (S: 2,5%; G2: 17,4%). Der Anstieg der Zellen in G1/G0 erfolgte vor allem aus der Reduktion der Zellen mit einem Chromosomensatz $> 4n$ um 13%. Die Behandlung mit 200 μM TMZ und 10 $\mu\text{g/ml}$ CQ resultierte in einer Abnahme der Zellen in G1/G0 um 11,5%. Der Anteil an Zellen in G2 nahm um 18,5% zu. Der Anteil der Zellen mit einem DNA-Gehalt $> 4n$ sank dabei leicht um 8,3%, während der Anteil in S leicht anstieg (2,3%). Damit induzierten die TMZ- und CQ- Einfach- und Doppelbehandlung einzig bei der GBM-Zelllinie U87MG einen G2-Arrest (TMZ) und partiellen G1-Arrest (CQ).

Fazit:

Zusammenfassend (Tab. 16) ist festzustellen, dass CQ in SLGC-Linien keinen Effekt auf die Verteilung der Zellen im Zellzyklus ausübte, während in Kulturen der etablierten U87MG-Linie ein G1-Arrest durch CQ bewirkt wurde. TMZ erzeugte in SLGC-Linien mit Ausnahme von T1495 eine Umverteilung der Zellen im Zellzyklus. Dabei kam es meist zu einer Zunahme an poly- bzw. aneuploiden Zellen auf Kosten der Zellen in G2 (Ausnahme T1440). In U87MG-Kulturen dagegen verursachte TMZ einen G2-Arrest. Nach Doppelbehandlung ließ sich in SLGC-Linien meist ein intermediärer und ähnlicher Effekt wie durch CQ allein beobachten. Bei Doppelbehandlung von U87MG übten sowohl TMZ als auch CQ einen Effekt aus.

Tab. 16: Primäre Effekte von CQ, TMZ und CQ/TMZ auf die Verteilung von Zellen in Zellzyklusphasen

Zelllinie	CQ (10 $\mu\text{g/ml}$)	TMZ (50-200 μM)	CQ + TMZ
T1371	$\uparrow >4n$ \downarrow G2	$\uparrow >4n$ \downarrow G2	$\uparrow >4n$ \downarrow G2
T1440	\approx	\uparrow G2 \downarrow G1	\approx intermediär
T1447	\approx	$\uparrow >4n$ \downarrow G2	\approx
T1495	\approx	\approx	\approx
U87MG	\uparrow G1	\uparrow G2	\uparrow G2 \downarrow G1

\uparrow : Steigerung; \downarrow : Senkung; \approx : keine Veränderung; G1: G1-Phase; G2: G2-Phase, $>4n$: DNA-Gehalt von $>4n$ (Poly- /Aneuploidie)

3.2.2 Expression der Zellzyklusregulatoren CDK4/6, p21^{CIP1} und p27^{WAF1}

Um weitere Erkenntnisse über den möglichen Einfluss von TMZ und CQ auf den Zellzyklus zu erhalten, wurden die SLGC-Linien mittels Western Blot Analysen hinsichtlich ihrer Expressionen der beiden Cyclin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6 sowie der CDK-Inhibitoren p21^{CIP1} und p27^{WAF1} untersucht. Zusätzlich wurden die Zelllinien auf die Anwesenheit des Transporters ABCG2 und des DNA-Reparaturproteins O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) geprüft. Die strukturell miteinander verwandten Kinasen CDK4 und CDK6 bilden Komplexe mit D-Typ Cyclinen in der G1-Phase des Zellzyklus und vermitteln eine Zellzyklusprogression (Bates et al., 1994). Die CDK-Inhibitoren p21^{CIP1} und p27^{WAF1} vermitteln einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase (Sherr und Roberts, 1995). Sowohl CDK4 und CDK6 als auch die Zellzyklusinhibitoren könnten in den SLGC-Linien differenziell reguliert sein und in ihrer Expression durch die CQ und/oder TMZ Behandlung beeinflusst werden. Eine theoretisch mögliche Modulation der Expression von ABCG2 und MGMT wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

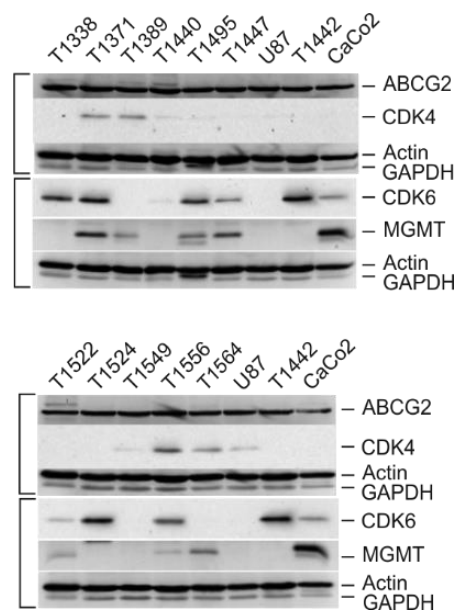


Abb. 18: Expression der Cyclin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6, der O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) und des ABC-Transporters ABCG2 in SLGC-Linien. – Western Blot Analysen mit Antikörpern gegen CDK4, CDK6, MGMT und ABCG2. Als Ladekontrollen dienten Antikörper gegen Aktin und die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).

In der Tat konnten die Kinasen CDK4 und CDK6 nicht in allen untersuchten SLGC-Linien mittels Western Blot Analysen nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Da nur Proben auf demselben Filter direkt vergleichbar sind, wurden Western Blot Analysen durchgeführt, welche die Basislevel der CDK4 und CDK6 untersuchten. Dabei wurde die aufgetrennte Menge an Proteinextrakt auf 25 µg pro Spur erhöht. Hierbei (Abb. 18) zeigte sich, dass CDK4 und CDK6 in nahezu allen SLGCs nachweisbar sind, die Signale aber

zum Teil an der Nachweisgrenze liegen (siehe z.B. T1440, T1495 in Abb. 18, oberer Blot). Die SLGC-Linien konnten somit in Gruppen mit geringen, mittleren und hohen Leveln an CDK4 bzw. CDK6 eingeteilt werden. Bezüglich der CDK4-Expression zeigten die SLGC-Linien T1371, T1389, T1556 sowie T1564 ein mittleres Basislevel und die Zelllinien T1440, T1495 sowie U87MG ein geringes Basislevel. Hinsichtlich der CDK6-Expression wurde in den SLGC-Linien T1338, T1371, T1495, T1442 sowie T1524 ein hohes Basislevel festgestellt. In T1447 sowie T1556 wurde ein mittleres und in T1440 sowie T1522 ein geringes CDK6-Level nachgewiesen. Hinsichtlich der Expression der Transferase MGMT zeigten sich deutliche Unterschiede in der Expression. Zelllinien, die MGMT exprimieren, weisen eine relative Resistenz gegenüber TMZ auf (siehe Kapitel 1.4). SLGC-Linien mit hohen MGMT-Leveln sind T1371 und T1447. Mittlere MGMT-Expressionslevel wurden in T1389, T1495 sowie T1564 festgestellt. Die Zelllinien T1522 und T1556 exprimierten nur sehr geringe MGMT-Level. Von ABC-Transportern, insbesondere ABCG2, wird vermutet, dass sie zur Chemoresistenz von Tumorzellen und Tumorstammzellen (CSCs) beitragen (Mo und Zhang, 2012). Die Western Blot Analysen zeigten, dass ABCG2 in allen untersuchten SLGC-Linien in ähnlich hohen Leveln exprimiert wird (Abb. 18; Tab. 17).

Tab. 17: Expression der CDK4 und CDK6 sowie MGMT und ABCG2 in SLGC-Linien

Zelllinie	CDK4	CDK6	MGMT	ABCG2
T1338	-	+++	-	+++
T1371	++	+++	+++	+++
T1389	++	-	++	+++
T1440	(+/-)	(+/-)	-	+++
T1447	(+/-)	++	+++	+++
T1495	(+/-)	+++	++	+++
T1522	-	+	+	+++
T1524	-	+++	-	+++
T1549	(+/-)	-	-	+++
T1556	++	++	+	+++
T1564	+	-	++	+++
U87MG	(+/-)	-	-	+++

+++ : hohes Expressionslevel; ++ : mittlerers Expressionslevel; + : niedriges Expressionslevel; (+/-) : Signal liegt an der Nachweisgrenze; - : keine Expression; ABC: ATP-binding cassette; CDK: cyclin-dependent kinase; MGMT: O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase.

Für die Untersuchung des Einflusses der Einfach- und Doppelbehandlung mit TMZ und CQ auf die Expression von CDK4/6, p21^{CIP1} und p27^{WAF1} in SLGC-Linien wurden in Hinsicht auf weitere, auch *in vivo*, Experimente solche Zelllinien gewählt, welche effektiv Tumore erzeugten. Dabei waren T1389, T1440, T1447 und T1495 so effektiv, dass im Labor von makroskopisch sichtbaren Tumoren neue Zelllinien angelegt werden konnten. Für T1447 und T1495 gelangen sogar mehrere Passagen durch die Mäuse. Die SLGC-Linie T1371 wurde wegen ihrer TP53 *gain of function* (GOF)-Mutation und aufgrund ihrer Fähigkeit zur Erzeugung invasiver Tumore gewählt. Die etablierte GBM-Zelllinie U87MG diente zum einen als positive Kontrolle, zum andern sollten die damit gewonnenen Ergebnisse einen Vergleich zur

Literatur ermöglichen. Bei den Western Blot Analysen wurden wie zuvor stets Extrakte einer Serie verglichen, die Experimente aber mit weiteren Serien von Extrakten wiederholt. Eine repräsentative Serie ist dargestellt.

Für CDK4 und CDK6 werden nur die Blots besprochen, die deutliche und quantifizierbare Signale für CDK4 bzw. CDK6 aufwiesen. In den Abbildungen 19 und 20 zeigt sich, dass die Behandlungen in der Mehrzahl der SLGC-Linien nur geringe Effekte auf das Expressionslevel von CDK4 und CDK6 hatten.

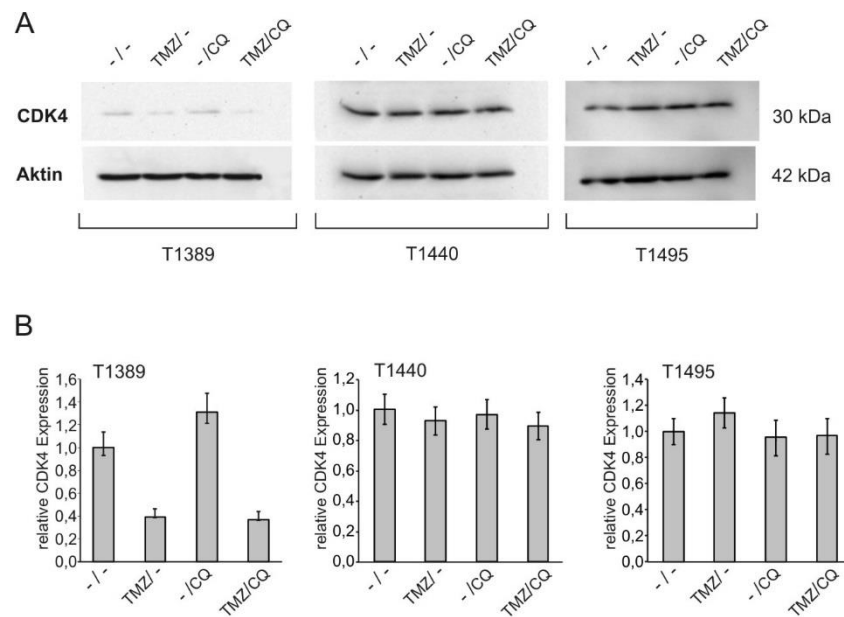


Abb. 19: Relative Expression der Cyclin-abhängigen Kinase 4 (CDK4) in SLGC-Linien nach Einfach- und Doppelbehandlung mit Temozolomid (TMZ) und Chloroquin (CQ). - (A) Western Blot Analyse nach Behandlung mit DMSO (Dimethylsulfoxid; Kontrolle), TMZ, 10 µg/ml CQ und TMZ mit CQ. Alle Proben enthielten 0,2% DMSO. Die Konzentration von TMZ richtete sich nach dem MGMT-Status der Zelllinien und betrug 200 µM für T1389 und T1440 sowie 50 µM für T1495. Unter den CDK4-Banden befindet sich die zugehörige Aktin-Ladekontrolle. (B) Graphische Darstellung der relativen Expressionslevel. Die Signale der CDK4-Banden wurden gegen die Signale der Aktinbanden normalisiert. Die Fehlerbalken geben den systematischen Fehler von 10% an. - kDa: Kilodalton.

Relativ zur DMSO-Kontrolle kam es in der Zelllinie T1389 nach Behandlung mit 200 µM TMZ zu einer Reduktion des CDK4-Levels (61%, Abb. 19). Nach Einfachbehandlung mit 10 µg CQ/ml wurde eine Steigerung des CDK4-Levels (31%) beobachtet. Die Behandlung mit beiden Reagenzien führte zu einer Reduktion des CDK4-Levels um 63% relativ zur DMSO-Kontrolle. Damit war die Reduktion durch die Doppelbehandlung ähnlich der Reduktion des CDK4-Levels durch TMZ allein. Es ist zu vermuten, dass TMZ das CDK4-Level senkte und dabei den Effekt von CQ auf CDK4 aufhob.

In der Zelllinie T1440 kam es in wiederholten Experimenten nur zu geringen Auswirkungen der Behandlungen auf das CDK4-Level. Die Behandlung mit 50 µM TMZ reduzierte die Expression von CDK4 um maximal 7 % in Relation zur Kontrolle, während die Einfachbehandlung mit 10 µg CQ/ml in einer

Reduktion des CDK4-Levels um maximal 5% resultierte. Nach Koapplikation von TMZ und CQ nahm das CDK4-Levels um maximal 10% relativ zur DMSO-Kontrolle ab. Damit bewirkten TMZ und CQ nur geringe Änderungen des CDK4-Levels in T1440 und es wurden weder additive noch synergistische Effekte der Reagenzien festgestellt.

Das CDK4-Level wurde in der Zelllinie T1495 in der hier dargestellten Serie durch die TMZ-Behandlung (50 μ M) relativ zur DMSO-Kontrolle leicht erhöht. Nach Einfachbehandlung mit 10 μ g CQ/ml lag das CDK4-Level im Bereich der Expression der Kontrollprobe (Abb. 19). Die Behandlung mit TMZ und CQ führte entsprechend zu keiner klaren reproduzierbaren Veränderung des CDK4-Levels.

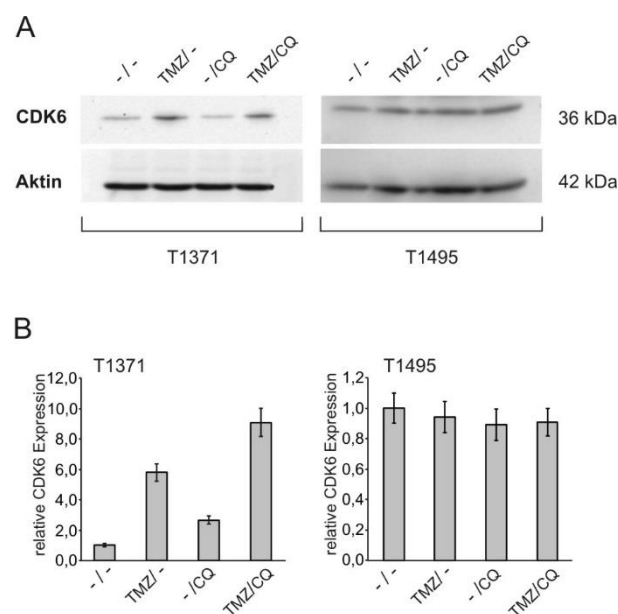


Abb. 20: Relative Expression der Cyclin-abhängigen Kinase 6 (CDK6) in SLGC-Linien nach Einfach- und Doppelbehandlung mit Temozolomid (TMZ) und Chloroquin (CQ). - (A) Western Blot Analyse nach Behandlung mit DMSO (Dimethylsulfoxid; Kontrolle), TMZ, 10 μ g/ml CQ und TMZ mit CQ. Alle Proben enthielten 0,2% DMSO. Die Konzentration von TMZ richtete sich nach dem MGMT-Status der Zelllinien und betrug 200 μ M für T1371 und 50 μ M für T1495. Unter den CDK6-Banden befindet sich die zugehörige Aktin-Ladekontrolle. (B) Graphische Darstellung der relativen Expressionslevel. Die Signale der CDK6-Banden wurden gegen die Signale der Aktinbanden normalisiert. Die Fehlerbalken geben den systematischen Fehler von 10% an. - kDa: Kilodalton.

Im Fall der Zelllinien T1371 und T1495 hatten die Behandlungen ausgeprägte (T1371) bzw. sehr geringe (T1495) Effekte auf das CDK6-Level. Dagegen konnte die Behandlung mit TMZ und/oder CQ die Expression von CDK6 in T1389, T1440 und T1447-Kulturen nicht erhöhen, d.h. die Signale lagen für alle Proben an der Nachweisgrenze (nicht gezeigt) und wurden daher nicht quantifiziert. In der Zelllinie T1371 kam es nach Behandlung mit 200 μ M TMZ zu einer deutlichen Zunahme des CDK6-Levels auf das 5,8-Fache der DMSO-Kontrolle. Die Behandlung mit 10 μ g CQ/ml führte ebenfalls zu einer Erhöhung des CDK6-

Levels auf das 2,6-Fache der Kontrolle. Durch die TMZ und CQ-Doppelbehandlung wurde eine Steigerung des CDK6-Levels auf das 9,1-Fache beobachtet. Damit führte die TMZ/CQ-Koapplikation zu einer stärkeren Wirkung auf das CDK6-Level als die Behandlung mit TMZ bzw. CQ allein. Der Blot weist darauf hin, dass die Steigerung von CDK6 primär auf dem Effekt von TMZ beruhte.

In der Zelllinie T1495 kam es nach weder nach TMZ- noch nach CQ-Einfachbehandlung zu deutlichen Veränderungen des CDK6-Levels. Auch die Doppelbehandlung mit TMZ und CQ beeinflusste das CDK6-Level nur minimal (Abb. 20).

Der Antikörper gegen den CDK-Inhibitor p21^{CIP1} erkannte in Proteinextrakten proliferierender SLGC-Linien sehr schwache (T1440) bis schwache (T1371, T1389, T1495) Banden, welche der erwarteten Größe des Proteins von 21 kDa entsprach (Abb. 21). In Kulturen der Zelllinie T1447 konnte p21^{CIP1} nicht nachgewiesen werden. In der etablierten GBM-Zelllinie U87MG wurden ebenfalls schwache Banden erhalten (Tab. 18). Der CDK-Inhibitor p27^{WAF1} wurde von allen untersuchten SLGC-Linien sowie von U87MG exprimiert (Tab. 18).

Tab. 18: Expression von p21^{CIP1} und p27^{WAF1} in SLGC-Linien

Zelllinie	p21 ^{CIP1}	p27 ^{WAF1}
T1371	+	+
T1389	+	+
T1440	+	+
T1447	-	+
T1495	+	+
U87MG	+	+

+: Protein exprimiert; -: Protein nicht exprimiert.

Der mögliche Einfluss der TMZ und/oder CQ-Behandlung wurde für die Zelllinien T1371, T1389, T1440, T1447, T1495 sowie U87MG ermittelt (Abbs. 21 und 22). Dabei wurden sowohl für die Induktion von p21^{CIP1} als auch für die Regulierung von p27^{WAF1} zwischen den Zelllinien deutliche Unterschiede beobachtet.

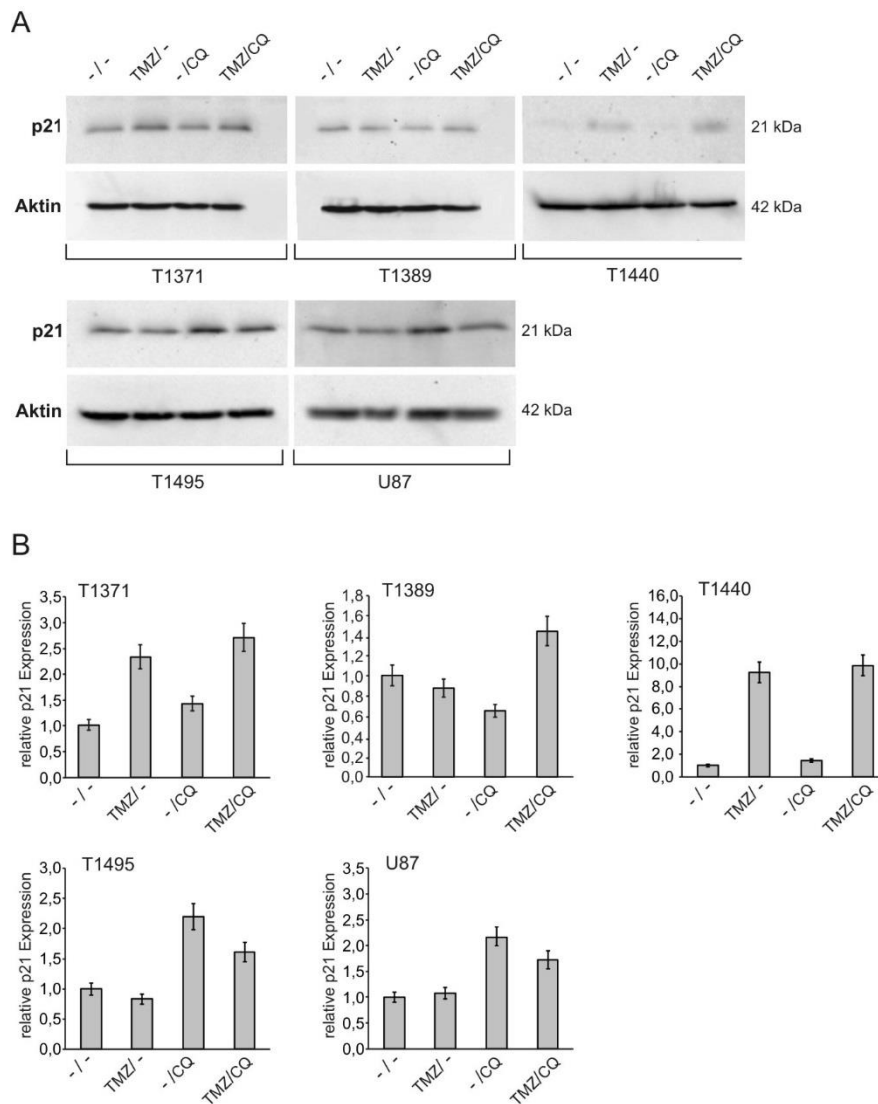


Abb. 21: Relative p21^{CIP1}-Expression in SLGC-Linien nach Einfach- und Doppelbehandlung mit Temozolomid (TMZ) und Chloroquin (CQ). - (A) Western Blot Analyse nach Behandlung mit DMSO (Dimethylsulfoxid; Kontrolle), TMZ, 10 µg/ml CQ und TMZ mit CQ. Alle Proben enthielten 0,2% DMSO. Die TMZ-Konzentration richtete sich nach dem MGMT-Status der Zelllinien und betrug 200 µM für T1371, T1389, T1440, U87MG sowie 50 µM für T1495. Unter den p21^{CIP1}-Banden befindet sich die Aktin-Ladekontrolle. (B) Graphische Darstellung der relativen Expressionslevel. Die Signale der p21^{CIP1}-Banden wurden gegen die Signale der Aktinbanden normalisiert. Die Fehlerbalken geben den systematischen Fehler von 10% an. - kDa: Kilodalton.

In der Zelllinie T1371 induzierte die TMZ-Behandlung (200 µM) eine Steigerung des niedrigen p21^{CIP1}-Levels relativ zur Kontrolle, welche das 2,3-Fache betrug. Nach CQ-Einfachbehandlung (10 µg/ml) wurde ebenfalls eine geringe Erhöhung des p21^{CIP1}-Levels beobachtet (1,4-Fach in Relation zur Kontrolle). Nach Doppelbehandlung mit TMZ und CQ kam es zu einer deutlichen Zunahme des p21^{CIP1}-Levels relativ zu den Einfachbehandlungen. Die Erhöhung durch die Doppelbehandlung war dabei ähnlich der Summe der Erhöhungen durch TMZ und CQ allein, was auf einen additiven Effekt hinweist (Abb. 21).

Das p21^{CIP1}-Level wurde in der Zelllinie T1389 durch die TMZ-Behandlung (200µM) relativ zum schwachen Signal in der Kontrolle nicht erhöht (Senkung um 13%). Die Behandlung mit 10 µg CQ/ml bewirkte eine Reduktion des p21^{CIP1}-Levels um 35% im Vergleich zur Kontrolle. Die Behandlung mit beiden Reagenzien führte dagegen zu einer geringen Erhöhung auf das 1,4-Fache im Vergleich zur Kontrolle. Dies deutet darauf hin, dass die Doppelbehandlung mit TMZ und CQ im Gegensatz zu den Einfachbehandlungen zur Induktion von p21^{CIP1} führen kann.

Die SLGC-Linie T1440 wies in der Kontrolle und in der CQ-behandelten Probe nur sehr geringe, nahezu identische p21^{CIP1}-Level auf (Abb. 21). Mit 50 µM TMZ kam es zu einer deutlichen Steigerung auf das 9,3-Fache relativ zur Kontrolle. Eine identische Steigerung wurde nach der Doppelbehandlung ermittelt. Somit konnte in T1440-Zellen lediglich TMZ die Expression von p21^{CIP1} induzieren.

Die Zelllinie T1495 zeigte bereits in der Kontrolle eine deutliche p21^{CIP1}-Expression (Abb. 21). Nach Behandlung mit 50 µM TMZ blieb das p21^{CIP1}-Level nahezu unverändert, während die Behandlung mit 10 µg CQ/ml eine deutliche Zunahme des Signals um das 2,3-Fache bewirkte. Die Doppelbehandlung mit TMZ und CQ ergab ein intermediäres Bild. So war die Steigerung durch die Doppelbehandlung zwar stärker als mit TMZ allein, aber weniger effizient als mit CQ allein, was darauf hinweist, dass TMZ in T1495-Zellen dem CQ-Effekt entgegenwirkte.

Die TMZ-Behandlung (200 µM) der GBM-Zelllinie U87MG ergab relativ zur DMSO-Kontrolle keine Zunahme des p21^{CIP1}-Levels. Nach CQ-Behandlung (10 µg/ml) wurde eine Verdopplung des p21^{CIP1}-Levels beobachtet. Die Behandlung mit beiden Reagenzien zeigte ähnlich zu T1495 ein intermediäres Bild. D.h. die Doppelbehandlung führte zu einer Zunahme des p21^{CIP1}-Levels, welche weniger effizient als mit CQ allein war. Somit übte vor allem CQ einen Effekt auf das p21^{CIP1}-Level in U87MG-Zellen aus.

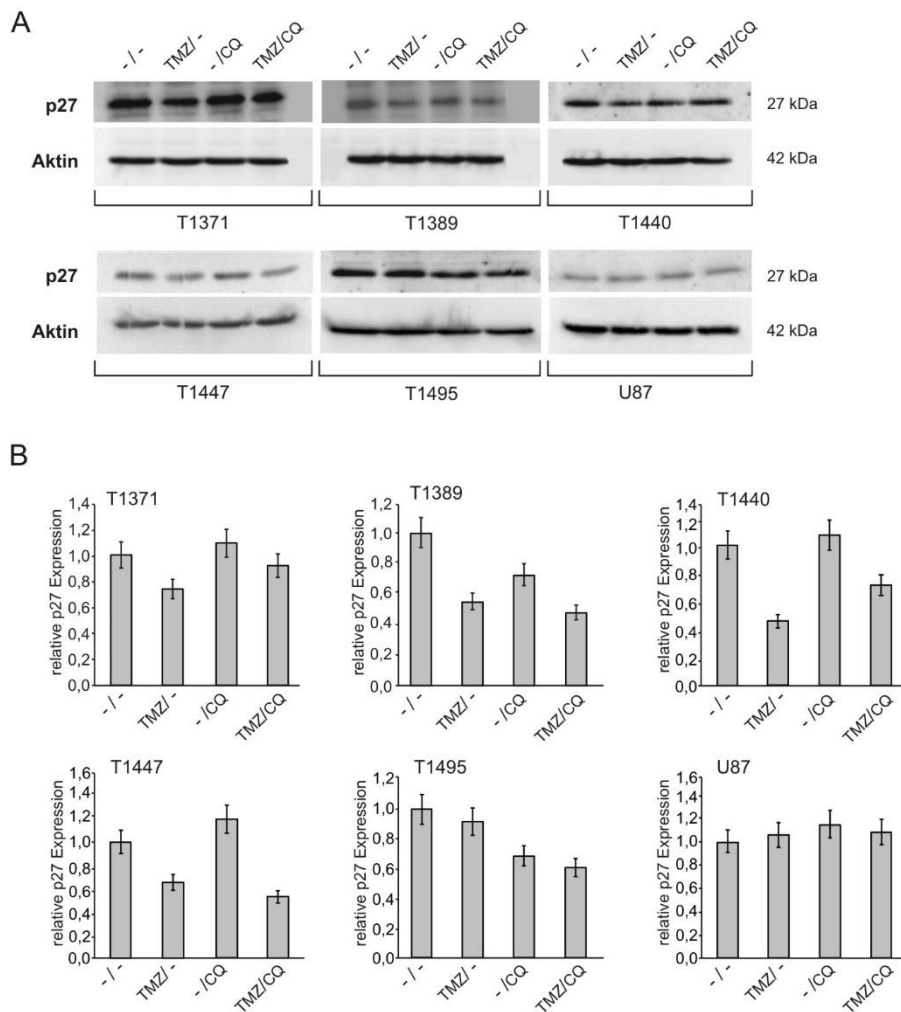


Abb. 22: Relative p27^{WAF1}-Expression in SLGC-Linien nach Einfach- und Doppelbehandlung mit Temozolomid (TMZ) und Chloroquin (CQ) - (A) Western Blot Analyse nach Behandlung mit DMSO (Dimethylsulfoxid; Kontrolle), TMZ, 10 µg/ml CQ und TMZ mit CQ. Alle Proben enthielten 0,2% DMSO. Die Konzentration von TMZ richtete sich nach dem MGMT-Status der Zelllinien und betrug 200 µM für T1371, T1389, T1440 und U87MG, 100 µM für T1447 sowie 50 µM für T1495. Unter den p27^{WAF1}-Banden befindet sich die zugehörige Aktin-Ladekontrolle. (B) Graphische Darstellung der relativen Expressionslevel. Die Signale der p27^{WAF1}-Banden wurden gegen die Signale der Aktinbanden normalisiert. Die Fehlerbalken geben den systematischen Fehler von 10% an. - kDa: Kilodalton.

In der SLGC-Linie T1371 (Abb. 22) reduzierte die Behandlung mit 200 µM TMZ das p27^{WAF1}-Level in Relation zur Kontrolle (26%). Nach alleiniger CQ-Behandlung (10 µg/ml) lag das p27^{WAF1}-Level geringfügig über dem der Kontrolle. Die Koapplikation von TMZ und CQ resultierte in einem p27^{WAF1}-Level, welches geringfügig unter dem der Kontrolle lag. Damit scheint CQ partiell der durch TMZ bedingten Senkung des p27^{WAF1}-Levels entgegen zu wirken.

Die Zelllinie T1389 wies in der Kontrolle ein deutliches p27^{WAF1}-Signal auf, das mit 200 µM TMZ um nahezu die Hälfte gesenkt wurde. Die Behandlung mit 10 µg/ml CQ allein führte ebenfalls zu einer Reduktion des p27^{WAF1}-Levels, welche jedoch mit 28% nicht so stark ausgeprägt war wie mit TMZ. Die Doppelbehandlung mit TMZ und CQ ergab eine ähnliche Abnahme des p27^{WAF1}-Levels wie mit TMZ

allein. Dies deutet darauf hin, dass in dieser SLGC-Linie vor allem TMZ eine Wirkung auf den Zellzyklus über p27^{WAF1} ausüben könnte.

Die Behandlung der SLGC-Linie T1440 mit 50 µM TMZ ergab eine Abnahme des p27^{WAF1}-Levels um die Hälfte in Relation zur Kontrolle. Die Behandlung mit 10 µg/ml CQ bewirkte dagegen keine Veränderung des p27^{WAF1}-Levels. Die Doppelbehandlung mit TMZ und CQ führte zu einer Abnahme des p27^{WAF1}-Levels, welche jedoch weniger effizient war als die Reduktion durch TMZ allein. TMZ hatte demnach auch in T1440-Zellen die stärkste Wirkung auf das p27^{WAF1}-Level.

Auch in der Zelllinie T1447 kam es nach Behandlung mit 100 µM TMZ zu einer Reduktion des p27^{WAF1}-Levels um 32 % im Vergleich zur Kontrolle. Die Behandlung mit CQ (10 µg/ml) ergab in der Quantifizierung zwar eine diskrete Erhöhung des p27^{WAF1}-Levels, jedoch sind diese Werte durch Defekte der Banden bedingt, sodass das p27^{WAF1}-Level der CQ-behandelten Probe eher dem der Kontrolle entspricht. Durch die TMZ und CQ-Doppelbehandlung wurde eine ähnliche Senkung des p27^{WAF1}-Levels wie mit TMZ allein beobachtet. Somit wurde der stärkste Effekt auf das p27^{WAF1}-Level in T1447-Zellen ebenfalls durch TMZ festgestellt.

Die Zelllinie T1495 zeigte bereits in der Kontrollprobe ein starkes p27^{WAF1}-Signal (Abb. 22). Nach TMZ-Behandlung (100 µM) kam es bestenfalls zu einer geringen Reduktion des p27^{WAF1}-Levels (maximal 10%). Mit der CQ-Einfachbehandlung wurde dagegen eine reproduzierbare Senkung des p27^{WAF1}-Levels um 31% beobachtet. Eine ebensolche Reduktion des p27^{WAF1}-Levels wurde auch durch die Behandlung mit beiden Reagenzien erreicht. Damit war die Reduktion des p27^{WAF1}-Levels im Fall von T1495-Zellen mit CQ, nicht aber mit TMZ möglich.

In der Zelllinie U87MG kam es weder mit 200 µM TMZ noch mit 10 µg CQ/ml zu reproduzierbaren Veränderungen des p27^{WAF1}-Levels (Abb. 22).

Fazit:

Die Behandlung mit TMZ und CQ übte unterschiedliche Effekte auf die beiden CDK-Inhibitoren aus. Wenn die TMZ/CQ-Behandlungen eine Wirkung auf p21^{CIP1} hatten (vier von fünf Zelllinien), bewirkten sie in der Regel eine Erhöhung des p21^{CIP1}-Levels. Dagegen bewirkten die TMZ/CQ-Behandlungen in den Fällen, wo sie einen Effekt auf p27^{WAF1} ausübten, stets Reduktionen des p27^{WAF1}-Levels.

Die Doppelbehandlung mit TMZ und CQ ergab in allen SLGC-Linien eine Erhöhung von p21^{CIP1}. In zwei von fünf SLGC-Linien (T1371, T1440) war dabei die Wirkung durch TMZ bedingt, während in zwei anderen Zelllinien (T1495, U87MG) die Induktion von p21^{CIP1} durch CQ bedingt war. Eine Ausnahme bildete T1389, da hier die Doppelbehandlung eine geringe Steigerung des p21^{CIP1}-Levels induzierte, während die Einfachbehandlungen in geringen Reduktionen von p21^{CIP1} resultierten.

In 4 von 6 SLGC-Linien führte die Doppelbehandlung mit TMZ und CQ zu einer Abnahme des p27^{WAF1}-Levels. Dabei war der Effekt auf das p27^{WAF1}-Level in 3 Zelllinien (T1389, T1440, T1447) durch TMZ

bedingt. Auch im Fall von T1371 führte TMZ zu einer Reduktion des p27^{WAF1}-Levels, wobei die Koapplikation von CQ diesem Effekt entgegenwirkte. Lediglich in T1495 war die Senkung des p27^{WAF1}-Levels durch CQ bedingt. In U87MG übte keine der Behandlungen einen Effekt auf p27^{WAF1} aus.

Tab. 19: Primäre Effekte von CQ, TMZ und CQ/TMZ auf die Expression von p21^{CIP1} und p27^{WAF1}

Zelllinie	p21 ^{CIP1}			p27 ^{WAF1}		
	TMZ	CQ	TMZ + CQ	TMZ	CQ	TMZ + CQ
T1371	↑	≈	↑	↓	≈	≈
T1389	≈	↓	(↑)	↓	(↓)	↓
T1440	↑	≈	↑	↓	≈	(↓)
T1447	-	-	-	↓	≈	↓
T1495	≈	↑	↑	≈	↓	↓
U87MG	≈	↑	(↑)	≈	≈	≈

↑: Steigerung; ↓ Senkung; ≈: keine Veränderung; -: Protein nicht exprimiert.

3.3 TMZ und CQ im Mausmodell

Für die Untersuchung der Wirkung von TMZ und CQ auf SLGCs im Mausmodell erfolgte die orthotope Xenotransplantation von SLGCs in immundefiziente Nacktmäuse (SCID; *Severe Combined Immune Deficiency*). Alle der oben beschriebenen Zelllinien waren im Mausmodell tumorigen (siehe Tab. 1, S. 20). Die Gliosarkom-Zelllinie T1447 und die Glioblastom-Zelllinie T1495 generierten dabei in wenigen Wochen große orthotope Tumore (siehe Abb. 44 im Anhang), von denen einige sogar aufgrund ihres aggressiven Wachstums die Schädelkalotte der Mäuse durchbrachen. Diese beiden Zelllinien wurden daher für die Tierexperimente ausgewählt.

Die *in vivo* Experimente mit TMZ und CQ wurden insgesamt zweimal für T1447 und T1495 durchgeführt. Dabei wurden den SCID-Mäusen in zwei Serien T1447- bzw. T1495-Zellen xenotransplantiert; als Positivkontrolle für die experimentelle Durchführung wurden parallel Mäuse mit der im Mausmodell aggressiv wachsenden, etablierten Zelllinie U87MG transplantiert. Die Aussagekraft der Ergebnisse der ersten Experimentserie war aufgrund von Komplikationen erheblich eingeschränkt (siehe unten und Diskussion). Nach Optimierung der Versuchsbedingungen konnten repräsentativere Ergebnisse gewonnen werden. Doch auch im zweiten Anlauf traten, insbesondere mit T1495, gehäuft zerebrale Entzündungen auf, die eine Tumordiagnose unmöglich machten. Die Daten der Experimente mit T1495-Zellen wurden daher nicht in diese schriftliche Arbeit aufgenommen.

In vivo Analyse der Wirkung von TMZ und CQ auf die SLGC-Linie T1447

Jede experimentelle Serie umfasste ein Kollektiv von 30 SCID-Mäusen. Zur Induktion eines Tumors wurden 27 Mäusen Zellen der Zelllinie T1447 inokuliert. Zwei Mäuse erhielten die stark tumorigene GBM-Zelllinie U87MG im Sinne einer positiven Kontrolle und eine Maus diente als Negativkontrolle,

indem lediglich N-Medium inokuliert wurde. In dem T1447-Kollektiv wurden 12 Mäuse sowohl mit TMZ als auch CQ behandelt, 10 Mäuse erhielten eine TMZ-Monotherapie und 5 Mäuse blieben unbehandelt. Auf eine CQ-Monotherapie wurde verzichtet. Zum einen, weil die Grenzen der experimentellen Durchführbarkeit mit 30 Versuchstieren erreicht waren. Zum andern wurde das Experiment durch den hohen Kostenaufwand für die osmotischen Alzet-Pumpen für die CQ-Applikation begrenzt. Die Behandlung startete an Tag 35 nach Inokulation und wurde für 28 Tage durchgeführt. Das Körpergewicht wurde alle 2 bis 3 Tage ermittelt. Sobald die Mäuse einen Gewichtsverlust von 10% oder körperliche Schwäche zeigten, wurden sie geopfert und die Gehirne mittels HE- und immunhistologischer Färbung untersucht.

a) Klinische Beobachtungen

53% der Mäuse verstarben vor Ende des Behandlungszeitraumes. Sie wurden entweder geopfert oder tot aufgefunden. Fluktuationen des Körpergewichtes von 1 bis 2 Gramm wurden regelhaft beobachtet. Einige Mäuse verzeichneten einen rapiden Gewichtsverlust innerhalb weniger Tage. So verlor zum Beispiel eine Maus aus der TMZ-Gruppe 28,6% ihres Körpergewichtes in 24 Stunden.

Tab. 20: Gewichtsverlauf und Versterben der SCID-Mäuse in den Versuchsgruppen

Gruppe	Mäuse	Maximalgewicht (g)	Gewichtsverlust (%*)	Tod **
TMZ + CQ	12	23,9 ± 0,6	14,8 ± 3,3	44 ± 3,15
TMZ	10	25,2 ± 0,74	18,1 ± 3,32	57 ± 2,77
Unbehandelt	5	26,2 ± 0,66	6,9 ± 1,42	63 ± 0
U87MG	2	22,5 ± 1,5	21,4 ± 1,35	21 ± 0
N-Medium	1	28,0	7,1	63

* Prozentwert vom Maximalgewicht; ** Tag nach Inokulation der Gliomzellen; Statistik: ± Standardfehler.

Die beiden Positivkontrollen U87MG/SCID zeigten einen starken Gewichtsverlust von 22,7 % bzw. 20% in 8 Tagen und wurden an Tag d21 geopfert. Die als Negativkontrolle dienende Maus zeigte eine stabile Gewichtsentwicklung, erreichte ein maximales Körpergewicht von 28 g und überlebte den gesamten experimentellen Zeitraum von 63 Tagen. Die mit TMZ und CQ doppelbehandelte Gruppe enthielt die physisch am schwächsten Mäuse mit einem durchschnittlichen Maximalgewicht von 23,9 ± 0,6 g und einem durchschnittlichen Gewichtsverlust von 14,8 ± 3,3 %. Nur 17% der Mäuse dieser Gruppe überlebten die gesamte Dauer des Experimentes. Der Todestag war im Durchschnitt Tag d44 ± 3,15. Die TMZ-Gruppe zeigte ein Maximalgewicht von 25,2 ± 0,74 g und einen Gewichtsverlust von 18,1 ± 3,32 %. Im TMZ-Kollektiv überlebten 60% der Mäuse das Experiment, der durchschnittliche Todestag war Tag d57 ± 2,77. Die 5 Mäuse aus der Gruppe ohne Behandlung waren mit einem Maximalgewicht von

26,2 ± 0,66 g und einem Gewichtsverlust von 6,9 ± 1,42 % physisch am kräftigsten. Alle 5 Mäuse überlebten die gesamte Dauer des Experimentes. Die graphisch dargestellten Gewichtsverläufe finden sich im Anhang (Abb. 45).

b) Hämatoxylin-Eosin (HE) - Färbungen

Entsprechend der Inokulationsstelle wurde bei der Auswahl der Paraffinschnitte für die histologischen Färbungen die septale Region des Dienzephalons aufgesucht. Die HE-Übersichtsfärbung diente der Prüfung auf das Vorhandensein von Raumforderungen. 50% der untersuchten Mausgehirne wiesen eine Raumforderung im Bereich der Inokulationsstelle auf. Bereits in der HE-Färbung wurde anhand histologischer Kriterien zwischen maligner und entzündlicher Raumforderung unterschieden.

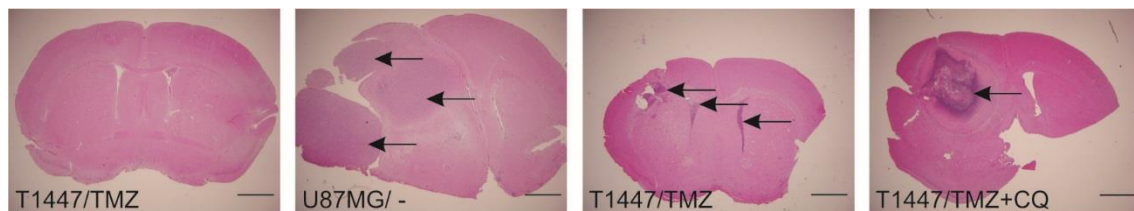


Abb. 23: Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbungen von xenotransplantierten Mausgehirnen. - SCID-Mäuse wurden 9 Wochen nach Xenotransplantation mit SLGC-Linien geopfert und die Gehirne in Formalin fixiert. Es folgten Fixierung in 70% Ethanol, das Einbetten in Paraffin und die Färbung von Mikrometerschnitten mit HE. Die Abbildung zeigt eine Auswahl von HE-Färbungen von 4,5 µM Schnitten. Die inokulierten Zelllinien sind in den Mikrofotografien angegeben. **T1447/TMZ, kein Tumornachweis; U87MG/-, großer Tumor rechts parietal; T1447/TMZ, Tumorzellen im Ventrikel; T1447/TMZ+CQ, zerebraler Abszess nach Implantation einer Alzetpumpe.** – Die Pfeile zeigen auf Raumforderungen. Balken, 50 µM.

Abbildung 23 zeigt exemplarisch einige HE-Befunde. Bild (1) zeigt einen negativen Befund. Leitstrukturen, die dem Auffinden der Inokulationsstelle dienen, waren ein vollständig dargestelltes Corpus callosum und senkrecht verlaufende Seitenventrikel (Ventriculi laterales). Im rechten Seitenventrikel sind Plexi choroidei sichtbar. Bild (2) zeigt einen orthotopen Tumor der etablierten GBM-Zelllinie U87MG. Der Tumor ist sehr groß und wächst stark verdrängend, sodass es zum Verlegen des linken Seitenventrikels und zum Verschieben der Mittellinie kommt. Der Tumor ist scharf begrenzt, was ein typischer Befund für die Monolayerzelllinie U87MG ist (Hu et al., 2003; Lee et al., 2006). Bild (3) zeigt intraventrikuläre Tumorzellen der Zelllinie T1447. Dieser Befund könnte auf einer leichten Verschiebung der Nadel während der Inokulation beruhen oder durch eine Migration der Tumorzellen bedingt sein. Bild (4) zeigt einen Hirnabszess nach Implantation der Alzet-Pumpe. Histologisch zeigen sich massenhaft Granulozyten mit Zelldetritus. Fibrosiertes Granulationsgewebe bildet die Abszesskapsel. Außerhalb der Kapsel findet sich eine starke Astrogliareaktion.

Tab. 21: Ergebnisse der HE- und IHC-Färbungen in den Versuchsgruppen

Gruppe	Mäuse	Durch HE-Färbung identifizierte Tumore	Durch IHC-Färbung bestätigte Tumore
TMZ + CQ	12	9, davon 4: tumorverdächtig 5: entzündlich	1
TMZ	10	1	1
Unbehandelt	5	3	3
U87MG	2	2	2
N-Medium	1	-	-

- : keine Raumforderung; HE: Hämatoxylin-Eosin; IHC: Immunhistochemisch.

Eine statistische Auswertung bezüglich des Auftretens von Tumoren bzw. intrazerebralen Entzündungen wurde nicht durchgeführt. Einerseits, weil die einzelnen Versuchsgruppen mit jeweils 12, 10 und 5 Versuchstieren vergleichsweise klein waren. Andererseits, weil die Anzahl nachgewiesener Tumore (5 Tumore in 27 mit T1447-Zellen inokulierten Mausgehirnen) sehr niedrig war und die Verteilung innerhalb der Gruppen dabei zufällig erschien. Und zuletzt, weil das Auftreten von zerebralen Entzündungen anhand klinischer Zeichen wie Rötung, Schwellung und Eiterbildung an der Infusionskanüle eindeutig der Implantation der Alzet-Pumpen zuzuordnen war.

c) Immunhistologische Färbung

Um eindeutig zwischen malignen und entzündlichen Raumforderungen zu unterscheiden, wurden im Anschluss an die HE-Färbung immunhistochemische Untersuchungen der Gehirnschnitte durchgeführt. Zum Nachweis humaner Zellen wurde ein Antikörper eingesetzt, der spezifische humane Proteine detektiert sowie ein Antikörper gegen ein Protein, das ubiquitär in SLGCs exprimiert wird. Dazu wurden α KU80 und α Nestin ausgewählt. Das humane Protein KU80 wird nachweislich in T1447- und Z1495-Zellen ubiquitär exprimiert.

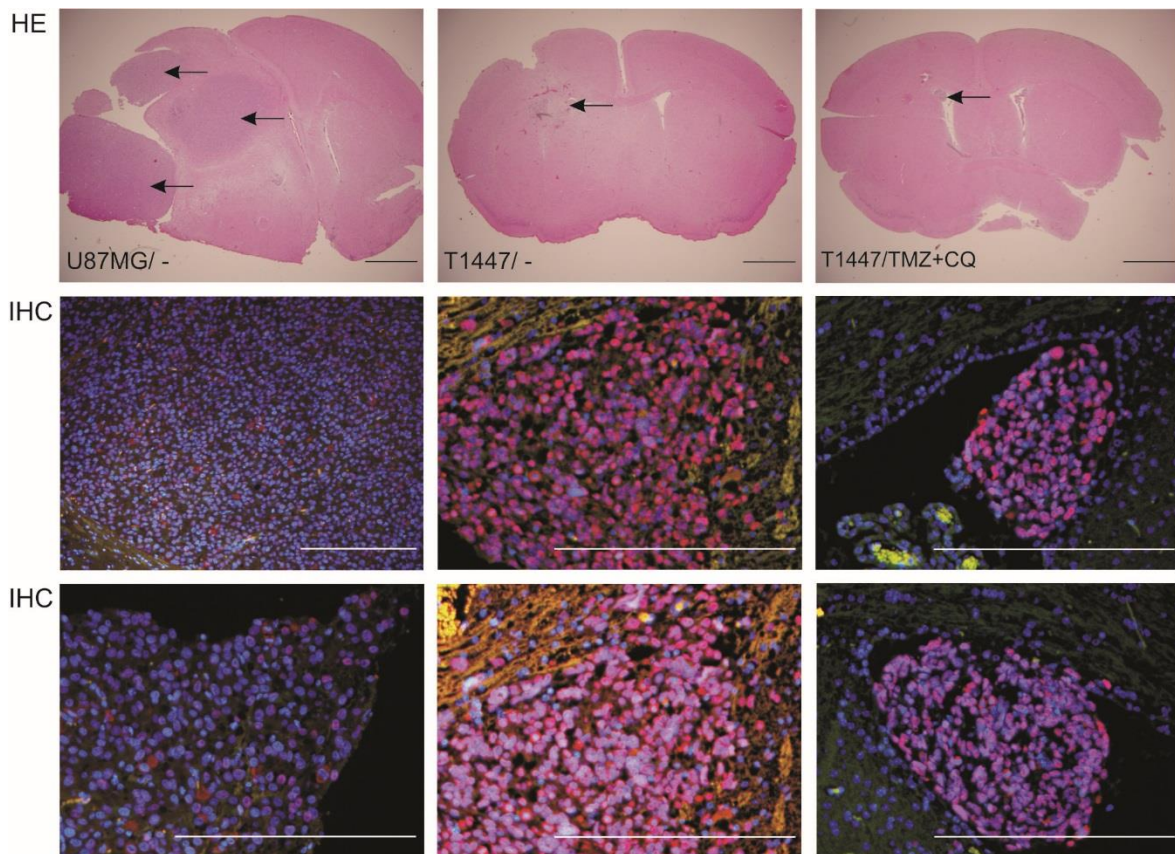


Abb. 24: Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung und immunhistologische Analyse von xenotransplantierten SCID-Maus Gehirnen (1). - Die Färbungen zeigen orthotope Tumore, die sich von T1447 und U87MG Zellen ableiten. Die Analyse erfolgte 9 Wochen nach Inokulation. Oben: HE-Färbungen von 4,5 μM Schnitten. Mitte: Immunhistologische Analyse mit den Antikörperpaaren $\alpha\text{Nestin/Dylight}$ (grün) und $\alpha\text{KU 80/Cy3}$ (rot), sowie Kernfärbung mit DAPI. Die Pfeile zeigen auf Tumore. – DAPI: 4', 6-Diamidin-2-phenylindol; HE: Hämatoxylin-Eosin-Färbung; IHC: Immunhistochemische Färbung. Balken, 50 μM .

Sieben von den 15 in der HE-Färbung identifizierten Raumforderungen exprimierten Nestin und KU80 und konnten somit als humane Tumore bestätigt werden (Tab. 21, Abbs. 24 und 25). Zwei Tumore wurden dabei in den Gehirnen der beiden mit U87MG inokulierten Mäuse nachgewiesen. Fünf Tumore stammten aus der mit T1447-Zellen inokulierten Gruppe. Die mit N-Medium inokulierte Maus wies, wie erwartet, keinen Tumor auf.

Tumore, welche von U87MG gebildet wurden, waren groß und zeigten ein begrenztes homogenes Wachstum (Abb. 24, Bild 1). Die Tumore, die sich von der Gliosarkom-Zelllinie T1447 ableiteten, wiesen ein diffuses Wachstum auf und zeigten eine Invasion von Zellen in das benachbarte Gehirnparenchym (Abbs. 24 und 25). Es traten auch intraventrikuläre Tumore (Abb. 24, Bild 3) sowie dem Gehirnparenchym aufsitzende Tumore (Abb. 25, Bild 3) auf. Insgesamt waren die durch T1447-Zellen erzeugten Tumore kleiner und durch das diffuse Wachstum in der HE-Färbung nicht immer klar zu erkennen. Aus diesem Grund kam der immunhistochemischen Färbung bei der Untersuchung der T1447-Tumore eine besondere Bedeutung zu.

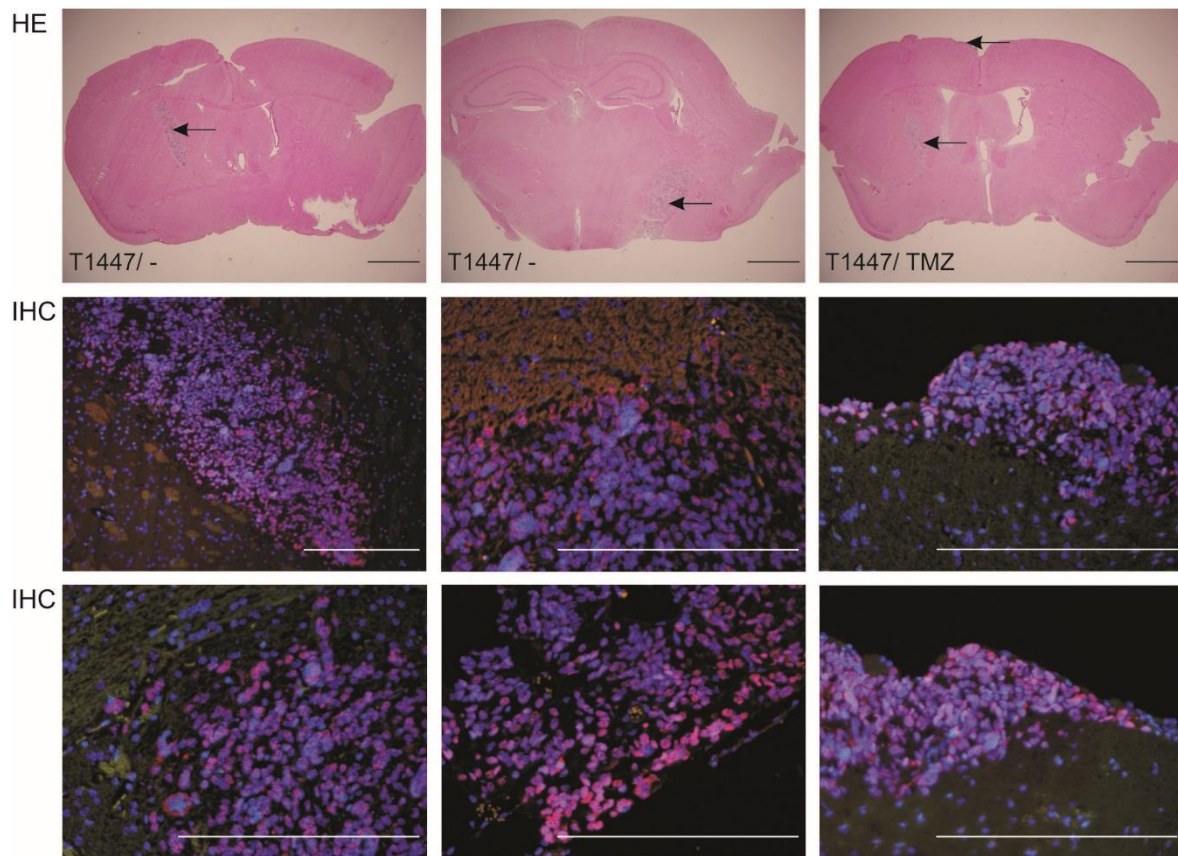


Abb. 25: Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung und immunhistologische Analyse von xenotransplantierten SCID-Maus Gehirnen (2). - Die Färbungen zeigen orthotope Tumore, die sich von T1447 Zellen ableiten. Die Analyse erfolgte 9 Wochen nach Inokulation. Oben: HE-Färbungen von 4,5 μ M Schnitten. Mitte: Immunhistologische Analyse mit den Antikörperpaaren α Nestin/Dylight (grün) und α KU 80/Cy3 (rot), sowie Kernfärbung mit DAPI. Die Pfeile zeigen auf Tumore. – DAPI: 4', 6-Diamidin-2-phenylindol; HE: Hämatoxylin-Eosin-Färbung; IHC: Immunhistochemische Färbung. Balken, 50 μ M.

Die übrigen 8 in der HE-Färbung identifizierten Raumforderungen waren negativ für Nestin und KU80 (Abb. 26). Damit waren diese Zellansammlungen sehr wahrscheinlich murinen Ursprungs. Bild (1) und (4) lassen zerebrale Abszesse erkennen. In der HE-Färbung zeigte sich eine starke Basophilie aufgrund von zerfallenen dichten Infiltraten, welche vermutlich überwiegend aus neutrophilen Granulozyten bestehen. Die DAPI-Färbung zeigte polymorphkernige Infiltrate mit Kernveränderungen in Form von Pyknose (Kernschrumpfung), Karyorrhesis (Kernfragmentierung) und Karyolyse. Immunhistochemisch bestätigt sich der in der HE-Färbung gestellter Verdacht auf zentrale Nekrosen mit Zelldetritus. Bild (2) zeigt in der HE-Färbung einen Defekt in Bereich der Inokulationsstelle. Dieser ist a.e. durch das Ablösen einer Nekrose während der histologischen Aufarbeitung des Gehirns verursacht. Nekrosen könnten tumor- oder entzündlich bedingt sein. Die Ansammlung von murinen, Nestin- und KU80-negativen, Zellen in der Umgebung des Defektes lassen jedoch auf eine entzündliche Genese schließen. Bild (4) zeigt multiple dichte polymorphkernige Infiltrate mit Zelltrümmern. Außerdem stellt sich hier der Verdacht auf disseminierte Einblutungen im Rahmen der Cerebritis.

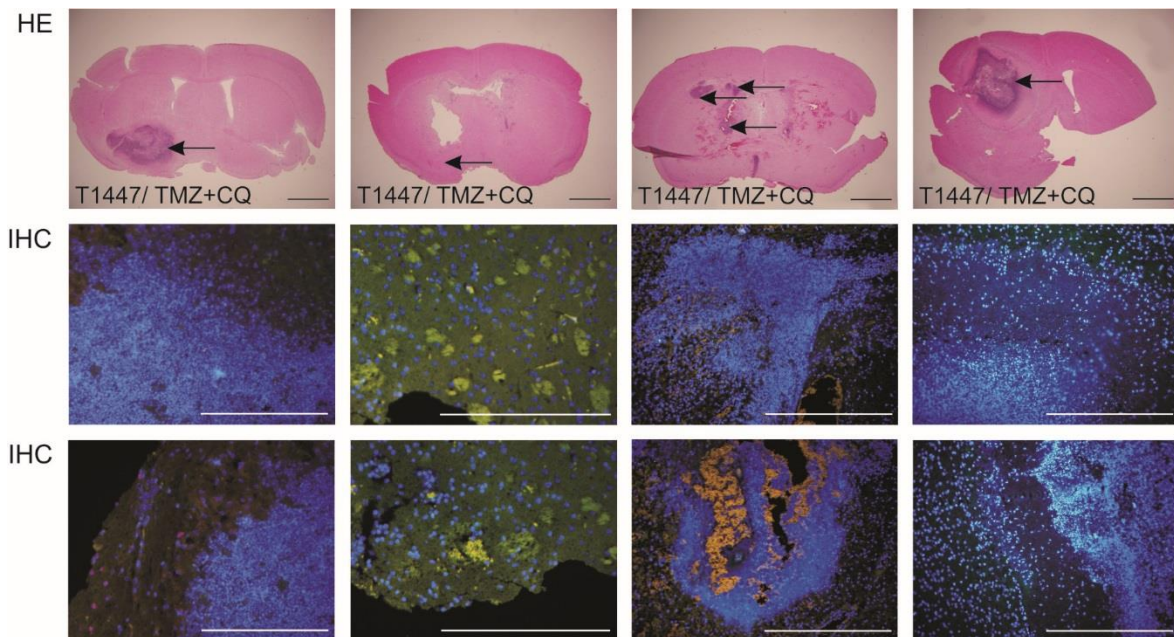


Abb. 26: Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung und immunhistologische Analyse von xenotransplantierten SCID-Maus Gehirnen (3). - Die Färbungen zeigen Zellansammlungen, die sich von T1447 Zellen ableiten. Die Analyse erfolgte 9 Wochen nach Inokulation. Oben: HE-Färbungen von 4,5 μ M Schnitten. Mitte: Immunhistologische Analyse mit den Antikörperpaaren α Nestin/Dylight (grün) und α KU 80/Cy3 (rot), sowie Kernfärbung mit DAPI. Die Pfeile zeigen auf entzündliche Zellansammlungen. – DAPI: 4', 6-Diamidin-2-phenylindol; HE: Hämatoxylin-Eosin-Färbung; IHC: Immunhistochemische Färbung. Balken, 50 μ M

Fazit:

Es wurden die beiden stark tumorigenen SLGC-Linien T1447 und T1495 im Mausmodell untersucht. Allerdings wies die Befundung des T1495-Kollektivs ausnahmslos auf Entzündungen statt auf Tumore hin. Bei dem T1447-Kollektiv konnten Erkenntnisse gewonnen werden. Dabei wiesen jedoch ein Viertel aller Mäuse eine nicht-maligne Raumforderung auf. Diese Art der Raumforderung fand sich ausschließlich in der TMZ- und CQ-behandelten Gruppe. Viele dieser Mäuse zeigten einen schlechten klinischen Zustand mit niedrigem Körpergewicht, ausgeprägter körperlicher Schwäche und Entzündungszeichen in Form von Rötungen, Schwellungen und Eiter an der Infusionskanüle der Alzet-Pumpen. Die immunhistochemischen Befunde ergaben Hinweise auf Ansammlungen muriner neutrophiler Granulozyten sowie Zelldetritus. Die Raumforderungen waren demnach wahrscheinlich durch eitrige Entzündungen nach Implantation der Alzet-Pumpen bedingt. Von den vorzeitig verstorbenen Mäusen wiesen ca. 60% einen Tumor oder eine Entzündung auf. Demnach sind 40% vorzeitig verstorben, ohne dass eine klare Ursache nachgewiesen wurde. 57% der Mäuse mit Gehirntumoren haben den Behandlungszeitraum überlebt, darunter die 3 Mäuse aus der unbehandelten Gruppe.

4 Diskussion

Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist der häufigste maligne primäre Tumor des Zentralen Nervensystems und weist eine infauste Prognose auf (Wen und Kesari, 2008). Trotz aggressiver Therapie aus maximaler chirurgischer Resektion, adjuvanter Bestrahlung und oraler Chemotherapie beträgt die mittlere Überlebenszeit vom Zeitpunkt der Diagnosestellung lediglich 14,6 Monate (Stupp et al., 2005). Die Chemotherapie des GBMs ist seit Jahrzehnten Gegenstand präklinischer und klinischer Studien. Seit den 1970ern wurden alkylierende Substanzen wie Nimustin, Carmustin und Lomustin verwendet. Im Jahr 2005 wurde die systemische Therapie mit dem alkylierenden Zytostatikum Temozolomid (TMZ) als neuer Goldstandard für die Chemotherapie des GBMs etabliert. Dennoch bleibt der Therapieerfolg begrenzt, da auch TMZ die mittlere Überlebenszeit nur um zwei bis drei Monate verlängert (Stupp et al., 2005) und die Entwicklung von Resistenzen und Rezidivbildung unausweichlich sind (Bao et al., 2006; Bleau et al., 2009; Chen et al., 2012; Singh et al., 2004). Ursachen für die Therapieresistenz sind die Aktivität des DNA-Reparaturproteins O⁶-Methylguanin-Methyltransferase (MGMT) und die Anwesenheit von ABC-Transportern (Beier et al., 2011; Bleau et al., 2009; Schonberg et al., 2013). Eine Möglichkeit zur Verbesserung der Therapie ist der Einsatz von Chemosensibilisatoren, welche Tumorzellen empfindlicher für die Wirkung von Chemotherapie machen. Unter den Chemosensibilisatoren scheint Chloroquin (CQ) als besonders vielversprechend, da es keine signifikanten Nebenwirkungen verursacht und effektiv die tumorzellvernichtende Wirkung von genotoxischen Reagenzien sensibilisiert (Solomon und Lee, 2009). Die Hypothese wird durch drei klinische randomisierte kontrollierte GBM-Studien aus Mexiko gestützt, die deutliche Verlängerungen der Überlebenszeit in der CQ-Gruppe relativ zur Kontrollgruppe ergaben (Briceño et al., 2003, 2007; Sotelo et al., 2006). Der genaue molekulare Mechanismus von CQ ist nicht geklärt. Insbesondere stellt sich die Frage, ob CQ auf die stammzellähnlichen Gliomzellen (SLGCs) wirkt, von denen vermutet wird, dass sie die Standardtherapie überleben und zur Therapieresistenz beitragen (Huse und Holland, 2010; Schonberg et al., 2013; Van Meir et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde an mehreren in unserer Arbeitsgruppe etablierten primären SLGC-Linien überprüft, ob CQ ein potentieller Chemosensibilisator für die TMZ-Therapie sein könnte. Die betreffenden Zelllinien exprimierten Marker für Stammzellen und neurale Proteine, hatten die Fähigkeit zur Bildung von Kolonien in verschiedenen Assays, zeigten Selbsterneuerung und generierten Tumore in Gehirnen von SCID-Mäusen (Choschzick et al., 2014; Raju et al., 2015). Im ersten Teil der Arbeit wurde der Einfluss von CQ und TMZ auf die Proliferation und Vitalität der SLGC-Linien analysiert. Im Weiteren wurde untersucht, ob die Einfach- und Doppelbehandlungen einen Einfluss auf den Zellzyklus der SLGC-Linien haben. Im zweiten Teil der Arbeit wurden SLGCs und eine Referenzzelllinie, zu der *in vivo* Daten existieren, in die Gehirne von SCID-Mäusen xenotransplantiert und die Tiere nach einer definierten Zeit mit TMZ bzw. TMZ/CQ behandelt.

4.1 *In vitro* Responsivität

In dieser Arbeit wurden SLGC-Linien eingesetzt, die aus Glioblastom- (T1338, T1389, T1440, T1495, T1522, T1524, T1549, T1556, T1564) und Gliosarkom- (T1371, T1447) Biopsien angelegt wurden (Choschick et al., 2014; Raju et al., 2015). Der Stammzellcharakter dieser Zelllinien war über 50 Passagen stabil und wurde in der Arbeitsgruppe durch regelmäßige immunologische und molekularbiologische Analysen überprüft. Die Tumorigenität wurde ebenfalls durch die Kollegen nachgewiesen (Dissertation Choschick, 2014; Dissertation Loy 2017; Dissertation Hirsland 2017). Im Gegensatz zur Mehrzahl der publizierten Arbeiten wurde in dieser Arbeit nicht mit der CD133-positiven Fraktion der betreffenden SLGC-Linien gearbeitet, obwohl auch der Anteil an CD133-positiven Zellen regelmäßig überprüft wurde. Basierend auf den Arbeiten von Chen und Kollegen (Chen et al., 2010) und den Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe ist die Tumorstammzelle CD133-negativ und erst ein aus dieser Zelle durch Differenzierung hervorgegangener Progenitor exprimiert CD133. Da dieser Progenitor nach Chen et al. (2010) wiederum einen weiter differenzierten CD133-negativen Progenitor generiert, kann eine Klassifizierung in CD133-positive und CD133-negative Zellen keine eindeutigen Aussagen darüber leisten, ob die Gliomstammzelle oder ein Gliomprogenitor vorliegt. In jeder SLGC-Kultur entwickelt sich zudem eine zelluläre Hierarchie (C. Zechel, persönliche Mitteilung). Eine Beurteilung zur Selektion bestimmter Differenzierungsstadien in SLGCs ist aufwendig und sollte erfolgen, wenn gesichert ist, dass CQ bzw. CQ/TMZ einen Effekt auf die SLGC-Linien haben.

4.1.1 Die CQ-Monotherapie reduziert dosisabhängig die Proliferation von SLGCs

In der Literatur wurde der Einfluss von CQ auf etablierte GBM-Zelllinien wie U87MG beschrieben, während über SLGCs nichts bekannt ist. Die U87MG-Zelllinie, die in der Arbeit als Referenzzelllinie mitgeführt wurde, wird in serumhaltigen Medium expandiert und weist keinen Stammzellcharakter auf (Lee et al., 2006). Entsprechend der publizierten Daten konnte ich eine Verminderung der Proliferation von U87MG feststellen, die mit einem G1-Arrest assoziiert war.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von CQ auf SLGC-Linien aus GBMs und GSarcs untersucht. Einige der Analysen zur CQ-Wirkung wurden in Anwesenheit von 1% DMSO durchgeführt, da dieses als Lösungsmittel für die Behandlung mit dem hydrophoben TMZ verwendet wird. Aus früheren Experimenten im Labor ist bekannt, dass einige SLGC-Linien, z.B. T1447 und T1389 empfindlich auf DMSO-Konzentrationen > 1% reagieren können. Entscheidender ist jedoch, dass die Zellen durch die mechanische und enzymatische Dissoziation während des Plattierens gestresst werden und dass Zellen im Inneren von Aggregaten weniger lebensfähig sind.

In dieser Arbeit wurde an 9 GBM- und 1 GSarc-SLGC-Linie (T1447) eine Senkung der Proliferation nach CQ-Monotherapie beobachtet. Weitere zwei GBM- (T1442, T1454) sowie eine GSarc-Zelllinie (T1371)

zeigten ebenfalls eine Responsivität gegenüber CQ. Die SLGC-Linien wurden hinsichtlich ihrer Expression der Tumorsuppressoren p21^{CIP1} und p27^{WAF1} untersucht und, sofern bekannt, mit dem p53- und PTEN- (*Phosphatase and Tensin homolog*) Status der entsprechenden SLGC-Linie in Relation gesetzt. Die Proteine p53, p21^{CIP1} und p27^{WAF1} sind an dem durch genotoxische Substanzen induzierten Zellzyklusarrest beteiligt (Lapenna und Giordano, 2009; Mhaidat et al., 2007; Sato et al., 2009). Die Phosphatase PTEN inhibiert die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges (Gary und Mattson, 2002), welcher zu Zellzyklusprogression und Zellproliferation führt. In Tabelle 22 ist die Responsivität der SLGC-Linien in Relation zum p53- und PTEN-Status dargestellt. Im Folgenden wird bei der Besprechung der einzelnen SLGC-Linien, sofern bekannt, gleichzeitig der p53-Status angegeben. Unter den Zelllinien befinden sich drei (T1371, T1442, T1495) mit einer sogenannten *gain of function*- (GOF) Mutation und eine (T1447) mit einer TP53 *missense* - Mutation. Die Anwesenheit einer p53-GOF Mutation resultiert in einer Zunahme onkogener Funktionen wie Proliferation, Invasion, Migration, Angiogenese, Metastasierung, die Expansion von Stammzellen sowie eine verstärkte Chemoresistenz (Muller und Vousden, 2013).

Tab. 22: Einfluss von CQ auf Proliferation und Expression von p21^{CIP1} und p27^{WAF1} von SLGC-Linien

Zelllinie	CQ _{d4}	CQ _{d6}	p21 ^{CIP1}	p27 ^{WAF1}	p53-Status*	PTEN-Expression*
T1338	↓	n.u.	n.u.	n.u.	WT/mut	-
T1389	↓	↓*	↓	(↓)	WT	-
T1440	↓	↓	≈	≈	WT	+
T1442*	↓	↓	n.u.	n.u.	R248W	-
T1454*	↓	↓	n.u.	n.u.	WT	+
T1495	↓	n.u.	↑	↓	R273H	+
T1522	↓ [#]	↓ [#]	n.u.	n.u.	WT	-
T1524	↓	↓	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
T1549	↓	↓ [#]	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
T1556	↓ [#]	↓ [#]	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
T1564	↓	↓ [#]	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
T1371*	↓ [#]	↓ [#]	≈	≈	R175H	-
T1447	↓	↓*	-	≈	N239D	-

CQ_{d4}/CQ_{d6}: Effekt von CQ an Tag d4 bzw. d6; #: nicht eindeutig dosisabhängig; *: Daten von Kollegen im Labor; WT: Wildtyp; WT/mut: eine Subpopulation von Zellen trägt heterozygot eine p53-Mutation; ↑: Steigerung; ↓: Senkung; ≈: keine Veränderung; +: Protein exprimiert; -: Protein nicht exprimiert; n.u.: nicht untersucht.

CQ senkte in allen SLGC-Linien die Proliferation (Tab. 22). Dabei reagierten die SLGC-Linien unterschiedlich stark auf die CQ-Behandlung. Die höchste CQ-Responsivität zeigte sich in den Zelllinien T1495-R273H und T1564. In T1338-WT/mut und T1447-N239D kam es ebenfalls zu effektiven Senkungen der Proliferation. Schwächere, aber noch immer deutliche CQ-Effekte wurden in T1389-WT und T1440-WT beobachtet. In den Zelllinien T1524, T1549 und T1556 wurden moderate Reduktionen durch CQ beobachtet und in T1522-WT waren Senkungen vorhanden, jedoch nicht signifikant.

Es wird angenommen, dass die Expression des Tumorsuppressors p53 einen wichtigen Faktor für die Sensitivität von Gliomzellen gegenüber CQ darstellt (Kim et al., 2010). Die Arbeitsgruppe von Kim und

Kollegen zeigte, dass etablierte GBM-Zelllinien mit Wildtyp-p53 besser auf eine CQ-Therapie ansprechen als Zelllinien mit mutiertem *TP53*-Status. Der Tumorsuppressor p53 ist der wichtigste „*up stream*“ Regulator des Zellzyklusinhibitors p21^{CIP1}, ein anderer ist z. B. HOXA10 (Abukhdeir und Park, 2009; Abbas und Dutta, 2009). Die G1-Checkpoint CDK-Inhibitoren p21^{CIP1} und p27^{WAF1} verhindern die Replikation geschädigter DNA durch einen G1-Arrest und ermöglichen eine DNA-Reparatur. Wenn eine Reparatur nicht möglich ist, induzieren sie Apoptose (Abukhdeir und Park, 2009).

Die potenziellen Einflüsse von p53- und PTEN-Status auf die CQ-Responsivität werden im Folgenden zunächst anhand p53-GOF T1495-R273H diskutiert. T1495 weist die R273H- *gain of function* (GOF) Mutation des *TP53*-Genes auf, welche häufig in Tumoren vorkommt (Muller und Vousden, 2013). T1495-R273H exprimiert ein hohes Level von p53-R273H, da der negative *feedback loop* über MDM2 (*mouse double minute 2 homolog*) weitgehend inaktiv ist (Joerger und Fersht, 2007). Nach CQ-Behandlung kam es in T1495-R273H zu einer Induktion von p21^{CIP1}. Die Expression von p21^{CIP1} wird direkt durch den Transkriptionsfaktor p53 über dessen Bindung an den Promotor des p21^{CIP1}-Gens aktiviert (Westfall et al., 2003). Für T1495-R273H wurde jedoch eine veränderte transkriptionelle Aktivität mit eingeschränkter Bindung an den p21^{CIP1}-Promotor beschrieben (Joerger und Fersht et al., 2007; Soussi et al., 2005). Somit könnte die Induktion von p21^{CIP1} durch p53-R273H oder aber durch HOXA10 oder andere Faktoren induziert werden. Auch Kim und Kollegen beobachteten eine p21^{CIP1}-Induktion durch CQ, allerdings in der etablierten Gliomzelllinie U87MG, die über Wildtyp p53 verfügt, aber keinen Stammzellcharakter besitzt (Kim et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde für die Zelllinie U87MG ebenfalls eine Induktion von p21^{CIP1} durch CQ festgestellt, die mit einem G1-Arrest assoziiert war. CQ führte auch in Brustkrebszellen zu einem G1-Arrest, der mit einer Zunahme von p21^{CIP1} verbunden war (Zhou et al., 2002). In der SLGC-Linie T1495 zeigte CQ jedoch keinen Einfluss auf die Verteilung der Zellen im Zellzyklus. Dagegen führte die Behandlung mit CQ unerwarteterweise zu einer Abnahme des p27^{WAF1}-Levels. Die Literatur bietet Hinweise, dass p21^{CIP1} positiv im Sinne einer Apoptose reguliert und p27^{WAF1} für die Induktion von Autophagie verantwortlich ist. Während die Behandlung von embryonalen Maus-Fibroblasten mit C₂-Ceramid in p21^{CIP1}-positiven Zellen zur Induktion von Apoptose führte, bewirkte es in p21^{CIP1}-defizienten Zellen die Induktion von Autophagie (Fujiwara et al., 2008). Dagegen erwies sich p27^{WAF1} als fähig zur Induktion von Autophagie und ein Knockdown von p27^{WAF1} resultierte in der Induktion von Apoptose (Liang et al., 2007). So könnten hohe p21^{CIP1}-Level und niedrige p27^{WAF1}-Level mit der Induktion von Apoptose einhergehen.

Des Weiteren wurde in der Zelllinie T1495-R273H die Expression von PTEN nachgewiesen. Die Phosphatase PTEN ist nicht nur ein negativer Regulator des PI3K/Akt-Signalweges, sondern inhibiert auch den MAPK (mitogenaktivierte Proteinkinase) - Signalweg, welcher wie der PI3K/Akt-Signalweg essentiell für Zellproliferation und Differenzierung ist (Waite und Eng, 2002). Die Aktivierung dieser Signalwege ist mit einer reduzierten Sensitivität gegenüber Apoptose-induzierender Substanzen

assoziiert (Steelman et al., 2011). Demzufolge könnte in der Zelllinie T1495-R273H die Expression von PTEN, welche sowohl den PI3K/Akt- als auch den MAPK-Signalweg inaktiviert, die Sensitivität von T1495-Zellen gegenüber CQ steigern. PTEN wird auch in der SLGC-Linie T1440-WT exprimiert. Es lassen sich zwar deutliche Effekte von CQ auf die Proliferation von T1440-WT erkennen, allerdings ist die Aussagekraft vor allem an Tag d4 durch experimentelle Abweichungen eingeschränkt. Die Kollegen im Labor beobachteten für die Zelllinie T1440 Senkungen der Proliferation von 88% bzw. 95% durch 5 µg CQ/ml bzw. 10 µg CQ/ml. Das Vorhandensein eines funktionellen PTENs ist nur für die SLGC-Linien T1440-WT, T1454-WT und T1495-R273H gesichert; die SLGC-Linien T1338-WT/mut, T1371-R175H, T1389-WT, T1442-WT, T1447-N239D und T1522-WT besitzen kein funktionelles PTEN. Der Verlust eines funktionellen PTENs ist in GBMs häufig und führt zur Zunahme von Zellüberleben und zu Zellproliferation (The Cancer Genome Atlas, 2008; Hu et al., 2005).

Wie oben erwähnt, liefert die Literatur Hinweise darauf, dass etablierte GBM-Zelllinien, die ein Wildtyp p53 exprimieren, eine höhere CQ-Sensitivität aufweisen als Zelllinien mit mutiertem p53 (Kim et al., 2010). In vier der SLGC-Linien, der bereits besprochenen Zelllinie T1495-R273H, aber auch in T1371-R175H, T1442-R248W und T1447-N239D wurden *TP53*-Mutationen nachgewiesen (Tab. 22). Obwohl diese vier Zelllinien eine Überexpression von p53 aufweisen, ist dieses p53-Protein mehr oder weniger dysfunktional. Die Fehlfunktionen betreffen die Aktivierung der Transkription des *MDM2*-Gens, des *p21^{CIP1}*-Gens, aber auch von Genen, die für Reparatur-assoziierte Proteine oder Apoptoseregulatoren kodieren (Soussi et al., 2005). Die vier genannten SLGC-Linien zeigten, unabhängig vom Typ der *TP53*-Mutation, eine hohe (T1371) bis sehr hohe CQ-Responsivität (T1442, T1447, T1495). Allerdings wurden in zwei Zelllinien mit Wildtyp-p53 (T1338, T1440) ebenfalls deutliche Senkungen der Proliferation nach CQ-Behandlung beobachtet. Zwei andere p53-Wildtyp-SLGC-Linien (T1454 und T1522) zeigten dagegen eine vergleichsweise geringe CQ-Responsivität. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen *TP53*-Status und dem Ansprechen der SLGC-Linien auf CQ wurde also nicht festgestellt. Somit scheint eine gute CQ-Responsivität der SLGC-Linien nicht erkennbar mit dem p53-Status assoziiert zu sein. Zu ähnlichen Schlussfolgerungen kamen Geng und Kollegen, die zeigten, dass der CQ-vermittelte Zelltod in Gliomzellen p53-unabhängig ist (Geng et al., 2010).

Die Reduktion der Proliferation der SLGC-Linien erwies sich entsprechend publizierter Daten in der Mehrzahl der Zelllinien als abhängig von der CQ-Dosis. In einigen Zelllinien (T1371, T1522, T1549, T1556) konnte keine eindeutige Dosisabhängigkeit festgestellt werden (Tab. 22). Das galt vor allem für SLGC-Linien mit reduzierter Adhärenz, bei denen es im BrdU-ELISA zu erheblichen experimentellen Abweichungen kam (T1371, T1522, T1549, T1556).

Eine Zunahme des CQ-Effektes auf die Proliferation von SLGC-Linien mit der Behandlungszeit wurde in 6 von 11 untersuchten Zelllinien (T1371, T1440, T1454, T1524, T1549, T1564) beobachtet. Somit war der maximale CQ-Effekt in der Hälfte der SLGC-Linien bereits an Tag d4 erreicht.

Wie oben erklärt, induzierte CQ im Fall der etablierten GBM-Zelllinie U87MG einen G1-Arrest, nicht aber in den SLGC-Linien. Insgesamt übte CQ auch anderweitigen Einfluss auf die Verteilung der Zellen im Zellzyklus aus, obwohl CQ die Expression von p21^{CIP1} und p27^{WAF1} beeinflusste. Dabei wurde vor allem eine Induktion von p21^{CIP1} (T1495-R273H, U87MG) sowie eine Reduktion von p27^{WAF1} (T1495-R273H, T1389-WT) beobachtet. Die Hemmung der Proliferation der untersuchten SLGC-Linien ist also nicht mit einem CQ-vermittelten Zellzyklusarrest erklärbar.

4.1.2 Die CQ-Monotherapie reduziert dosisabhängig die Vitalität von SLGCs

Der Effekt von CQ auf die Vitalität von SLGC-Linien wurde an neun GBM-Zelllinien und einer GSarc-Zelllinie (T1447) mittels MTT-Test analysiert. Zur Untersuchung der Induktion von Zelltod durch CQ wurde die Freisetzung der Laktatdehydrogenase (LDH) nach CQ-Behandlung bestimmt. Bei der Besprechung der Daten soll wiederum auf den p53-Status eingegangen werden, sofern dieser bekannt ist.

Tab. 23: Einfluss von CQ auf Vitalität und LDH-Freisetzung von SLGC-Linien

Zelllinie- p53 Status	MTT _{d4}	MTT _{d6}	LDH _{d4}	LDH _{d6}
T1338-WT/mut	↓	↓	↓	↓
T1389-WT	≈	↓	↑	↑
T1440-WT	↓	↓	↓	↑
T1447-N239D	↓	↓	≈	↑
T1495-R273H	≈	↓	↓	↓
T1522-WT	↓ [#]	↓ [#]	↑ [#]	↑ [#]
Zelllinie- unbekannter p53 Status				
T1524	↓	↓	↑	↑
T1549	↓ [#]	↓ [#]	↑ [#]	≈
T1556	↓ [#]	↓ [#]	↑	↓ [#]
T1564	↓	↓	↑	↑

d4/d6: Effekt von CQ an Tag d4 bzw. d6 auf Vitalität (MTT) und LDH-Freisetzung (LDH); ↑: Steigerung; ↓: Senkung; ≈: keine Veränderung; #: nicht eindeutig dosisabhängig; WT: Wildtyp; WT/mut: eine Subpopulation von Zellen trägt heterozygot eine p53-Mutation.

Die Behandlung mit CQ führte in allen untersuchten SLGC-Linien zu einer Verminderung der Vitalität. Hierbei wurde für die Zelllinie T1338-WT/mut eine der effektivsten Reduktionen der Vitalität festgestellt. Die Zelllinien T1440-WT, T1447-N239D und T1522-WT zeigten eine schwächere, jedoch noch deutliche CQ-Responsivität. Deutlich geringer war die Responsivität von T1389-WT und T1495-R273H. Damit korrelierte die Effektivität der CQ-vermittelten Reduktion der Vitalität wiederum nicht mit dem p53-Status. Für die SLGC-Linien ohne Sequenzinformation zum p53-Status wurde Folgendes ersichtlich: In T1524-Kulturen war die CQ-vermittelte Senkung der Vitalität am deutlichsten. Weniger effizient waren die Reduktionen in den Zelllinien T1549 und T1564 und im Fall der SLGC-Linie T1556 war die Reduktion der Vitalität durch CQ am wenigsten stark ausgeprägt.

In der Literatur wird ebenfalls eine dosisabhängige Verminderung der Vitalität durch CQ beschrieben; diese Daten wurden jedoch mit etablierten GBM-Zelllinien ohne Stammzellcharakter gewonnen (Geng

et al., 2010; Kim et al., 2010). Ein dosisabhängiger Effekt von CQ auf die Vitalität von SLGC-Linien wurde in allen Zelllinien mit Ausnahme von T1522, T1549 und T1556 festgestellt.

In vier von zehn untersuchten SLGC-Linien (T1338-WT/mut, T1389-WT, T1440-WT, T1495-R273H) zeigte sich weiterhin eine Zunahme des CQ-Effektes auf die Vitalität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Dagegen ergaben sich für die Zelllinie T1447-N239D im Vitalitätstest an Tag d6 deutlich geringere Effekte als an Tag d4. Auch in T1522-WT waren die Effekte auf die Vitalität an Tag d6 geringfügig schwächer als an Tag d4. Dies könnte auf eine Erholung der Zellen mit der Zeit hinweisen.

Da der MTT-Test die metabolische Aktivität der Zellen als Grundlage für die Bestimmung der Vitalität nutzt, wäre es denkbar, dass Änderungen im Metabolom Änderungen in der Vitalität suggerieren. Daher wurde zusätzlich ein Zytotoxizitätsassay eingesetzt, der die Freisetzung der Laktatdehydrogenase als Indiz für den Beginn von Zelltod nutzt. Bezüglich der LDH-Freisetzung ergaben sich unterschiedliche Beobachtungen in den SLGC-Linien. Erstens zeigten die Proben in Anwesenheit von DMSO (T1522-WT, T1524, T1549, T1556 und T1564) stets Steigerungen der LDH-Freisetzung durch CQ, was in Abwesenheit von DMSO nicht generell der Fall war. Zweitens resultierte die CQ-Behandlung in zwei Zelllinien (T1338-WT/mut, T1495-R273H) an beiden Messtagen d4 und d6 in einer statistisch signifikanten Reduktion der LDH-Freisetzung. Drittens wurden für zwei weitere Zelllinien (T1440-WT, T1447-N239D) an Tag d4 keine Effekte bzw. Reduktionen und an Tag d6 Steigerungen der LDH-Freisetzung beobachtet. Nur in einer Zelllinie (T1389-WT) führte CQ an beiden Behandlungstagen zu einer Erhöhung der LDH-Freisetzung. Damit könnte vermutet werden, dass CQ das Absterben von SLGCs induzieren kann, dies aber vom Genom und Epigenom der jeweiligen SLGC-Linie abhängt. Dies würde sich einerseits in der Zeitdauer widerspiegeln, die nötig ist, bevor der Effekt auftritt. Andererseits würde die Induktion von Zelltod erst dann erfolgen, wenn zusätzliche Stressoren, wie z.B. DMSO, appliziert werden.

Die Reaktionen von Tumorzellen auf zellulären Stress lassen sich anhand morphologischer und biochemischer Kriterien in drei Arten von Zelltod einteilen: Apoptose, Autophagie und Nekrose (Kroemer et al., 2005). Charakteristisch für nekrotischen Zelltod ist die Ruptur der Plasmamembran mit dem Austritt intrazellulärer Proteine, welche eine Immunantwort des Wirtsorganismus aktivieren (Zeh und Lotze, 2005). Der Nachweis einer LDH-Freisetzung könnte somit primär als Nachweis von einsetzender Nekrose dienen (Chan et al., 2013), während die Induktion apoptotischer Prozesse weitgehend undetektiert bliebe. Die Behandlung mit 32 bis 64 μM CQ für 3 Tage induzierte Nekrose in Lungenkrebszellen, wobei höhere Konzentrationen von CQ (64 bis 128 μM) zu Apoptose führten (Fan et al., 2006). Die hier eingesetzte CQ-Dosis von 10 μg CQ/ml entspricht 32 μM und würde dementsprechend unter der kritischen Dosis liegen. Allerdings ist zu beachten, dass Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften durchaus anders reagieren als Zellen ohne solche Eigenschaften. So zeigten Gliomstammzellen deutlich höhere Resistenzen gegenüber Bestrahlung als differenziertere Gliomzellen (Bao et al., 2006, *Nature*).

Aussagen zur Induktion von Apoptose durch CQ lassen sich in dieser Arbeit nicht machen. Dies erfordert zum Beispiel die Durchführung immunzytologischer Färbungen mit Antikörpern gegen aktivierte Caspase-3 oder den Nachweis apoptotisch fragmentierter DNA mittels TUNEL (*TdT-mediated dUTP nick-end labeling*) Analysen. Zudem ist fraglich, ob CQ Apoptose in den Kulturen induzieren würde. CQ verursacht über Hemmung lysosomaler Autophagie eine mitochondriale Dysfunktion (Amaravadi und Thompson, 2007; Boya et al., 2003). Außerdem scheint CQ oxidativen Stress in metabolisch aktiven Zellen zu steigern sowie Sauerstoffradikale in humanen Astrogliazellen zu generieren (Pari und Murugavel, 2004; Park et al., 2004; Toler, 2004). Nekrose als programmierter Zelltod wird sowohl durch Hemmung zellulärer Energieproduktion als auch durch die Generierung von Sauerstoffradikalen induziert (Ricci und Zong, 2006), sodass diese Effekte von CQ mögliche Mechanismen für die Induktion von Nekrose in SLGC-Linien wären. Weitere zytotoxische Effekte von CQ sind die nicht-katalytische Hemmung der Topoisomerase II (Langer et al., 1999) sowie die Inhibierung der NADH-Dehydrogenase (Kwiek et al., 2004). Die Inhibierung der NADH-Dehydrogenase könnte zudem über eine verminderte Substratumsetzung zu einer falsch-niedrigen Messung der LDH-Aktivität führen. Dieser Effekt wurde bereits für CQ im Zytotoxizitätsassay beschrieben (Weyermann et al., 2005).

Interessant ist vor allem die mögliche Funktion von CQ als Chemo- und Radiosensibilisator. Dabei scheinen die synergistischen Effekte von Kombinationsbehandlungen auf der Induktion von Autophagie (durch genotoxische Substanzen) und der Inhibierung der Autophagie (durch CQ) zu beruhen (Amaravadi et al., 2011; Kanzawa et al., 2004). Es gibt Hinweise, dass CQ die Sensitivität von Gliomzellen gegenüber TMZ (Golden et al., 2014; Hori et al., 2015; Lee et al., 2015) und gegenüber Radiotherapie (Firat et al., 2012; Ye et al., 2016) durch Hemmung von Autophagie steigern kann. Diese Daten wurden mit etablierten GBM-Zelllinien gewonnen. In den genannten Arbeiten wurde eine verstärkte Induktion von Apoptose beobachtet. Eine andere Publikation führt die verstärkte Zytotoxizität von Radiotherapie in Anwesenheit von CQ auf eine Radiotherapie-vermittelte Apoptose und eine CQ-vermittelte Nekrose zurück (Zhao et al., 2005). Ob CQ einen Effekt auf die Wirkung von TMZ auf Proliferation und Vitalität von SLGC-Linien hat, war bis dato unklar.

4.1.3 CQ als möglicher Chemosensibilisator für die TMZ-Behandlung

Für die Untersuchung der Effekte von CQ auf Proliferation und Vitalität von SLGCs in Anwesenheit von TMZ wurde eine konstante TMZ-Konzentration von 100 μM eingesetzt, damit eine Vergleichbarkeit der Daten zwischen verschiedenen SLGC-Linien gewährleistet ist. Diese Konzentration liegt jedoch fast 10-fach über dem Liquorspiegel bei GBM-Patienten. Nach den Messungen von Ostermann und Kollegen erreichen GBM-Patienten TMZ-Plasmaspiegel von 0,1 bis 13,99 $\mu\text{g/ml}$ und Liquorspiegel von 0,16 bis 1,93 $\mu\text{g/ml}$ (Ostermann et al., 2004). 100 μM entsprechen 19,415 $\mu\text{g/ml}$ TMZ, sodass die hier eingesetzte Dosis deutlich darüber lag. Allerdings erfolgte die TMZ-Zugabe im *in vitro* Experiment nur

einmal, während die TMZ-Spiegel im Patienten durch die tägliche Einnahme des Medikamentes über die Behandlungszeit erzielt werden. Auch die Metabolisierung und Ausscheidung der Abbauprodukte sind zwischen dem humanen Organismus und dem *in vitro* Modell nicht vergleichbar. So bestand primär nicht der Anspruch, die *in vivo* Situation zu simulieren, vielmehr sollte die TMZ-Konzentration so gewählt werden, dass additive oder inhibitorische Effekte durch CQ nachweisbar würden.

Zwei von fünf untersuchten SLGC-Linien (T1522, T1564) wiesen eine relative Resistenz gegenüber 100 μM TMZ auf. In diesen Fällen wurden keine Effekte von TMZ auf Proliferation, Vitalität oder LDH-Freisetzung beobachtet. In T1522-Kulturen kam es nach TMZ-Behandlung sogar zu einer Senkung der LDH-Freisetzung. Die relative TMZ-Resistenz von T1522 und T1564 beruhte auf der Expression der O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT). Publierte Arbeiten zeigen, dass die Anwesenheit von MGMT in einem bis zu 10-fachen Anstieg der TMZ-Resistenz resultiert (Beier et al., 2008; Hermisson et al., 2006). Dagegen erwiesen sich die SLGC-Linien T1524, T1549 und T1556 gegenüber 100 μM TMZ sensitiv. In T1524 bzw. T1549 sank die Proliferation nach Behandlung mit 100 μM TMZ am Tag d4 um 39% (Tag d6: 22%) bzw. 12% (Tag d6: 13%). Aufgrund experimenteller Abweichungen, die auf dem Sphärenwachstum und der geringen Adhärenz beruhten, war für T1556 nur ein Trend erkennbar, der eine Abnahme der Proliferation anzeigte. In T1524-Kulturen kam es zwar zu keiner TMZ-verursachten Veränderung im MTT-Assay, allerdings wurde eine Verdoppelung der LDH-Freisetzung beobachtet. Im Fall der SLGC-Linie T1549 wurde die OD im MTT-Assay an Tag d4 um 18% (Tag d6: 22%) gesenkt und die LDH-Freisetzung auf das 1,5-Fache (Tag d6: 1,3-Fach) gesteigert, was eine Senkung der Vitalität anzeigt. In T1556-Kulturen senkte TMZ ebenfalls die Vitalität, was durch den MTT-Assay (Senkung Tag d4: 14%; d6: 10%) und die erhöhte LDH-Freisetzung (Tag d4: 1,7-Fach; d6: 1,4-Fach) belegt wurde.

Bei den Zelllinien mit relativer TMZ-Resistenz (T1522, T1564) wurden nach den TMZ/CQ-Doppelbehandlungen zwar Senkungen von Proliferation und Vitalität sowie Erhöhungen der LDH-Freisetzung beobachtet, allerdings waren diese Effekte den Effekten identisch, die mit CQ allein beobachtet wurden. Von den drei TMZ-sensitiven Zelllinien wurde einzig in T1524-Kulturen eine Steigerung des Effektes von 100 μM TMZ auf Proliferation, Vitalität und LDH-Freisetzung durch die Koapplikation von bereits 5 $\mu\text{g/ml}$ CQ evident. Dabei war die Wirkung der TMZ/CQ-Doppelbehandlungen stärker als die Effekte durch CQ allein. In T1549-Kulturen ergab die Koapplikation von CQ eine Zunahme des Effektes von TMZ allein auf die Proliferation nur bei hohen CQ-Konzentrationen (20 $\mu\text{g CQ/ml}$), dabei entsprach die Senkung der Proliferation der mit CQ allein. Somit konnte CQ die TMZ-Sensitivität hinsichtlich der Inhibierung der Proliferation nicht steigern. Effektiver erschien die Koapplikation von TMZ und CQ hinsichtlich der Senkung der Vitalität. So wurden die ODs im MTT-Assay für T1549-Zellen durch die TMZ/CQ-Doppelbehandlungen effektiver gesenkt als durch TMZ oder CQ allein. Die LDH-Freisetzung wurde durch die Doppelbehandlung effektiver gesteigert als durch CQ allein, allerdings war die Steigerung ähnlich derjenigen durch TMZ allein. In T1556-Kulturen

konnte der TMZ-Effekt auf die Proliferation mit höheren (10 µg/ml), nicht aber niedrigen (5 µg/ml) CQ-Konzentrationen gesteigert werden, dabei entsprach der Effekt allerdings der Wirkung durch CQ allein. In den MTT-Assays und Messungen zur LDH-Freisetzung wurde keine Veränderung des TMZ-Effektes durch die Koapplikation von CQ evident. Allerdings wurden höhere LDH-Freisetzungen durch die TMZ/CQ-Doppelbehandlung beobachtet als durch CQ allein.

Auch bei anderen in der Arbeitsgruppe verfügbaren SLGC-Linien (siehe Tab. 24) wurden unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der TMZ/CQ-Sensitivität festgestellt. Die von den Kollegen durchgeführten Analysen ergaben proliferationshemmende Effekte von CQ (5-20 µg/ml) und TMZ (25 µM) für alle untersuchten SLGC-Linien, wobei sich T1389 und T1371 als relativ resistent gegenüber TMZ erwiesen. Die Doppelbehandlung mit CQ und TMZ führte in drei SLGC-Linien (T1371, T1389, T1447) zu einer effektiveren Senkung der Proliferation als mit TMZ allein; dabei waren die Effekte von TMZ/CQ wie in den Fällen von T1522, T1549, T1556 und T1564 identisch denjenigen mit CQ allein. Wie in meinen Analysen wurde nur in einer Minderheit der SLGC-Linien eine effektivere Hemmung der Proliferation durch die CQ/TMZ-Doppelbehandlung als durch CQ oder TMZ allein beobachtet. Bei diesen zwei SLGC-Linien (T1442, T1454) wurde bereits mit 5 µg CQ/ml die Wirkung von TMZ auf die Proliferation so effektiv gesteigert, dass durch eine weitere Dosissteigerung keine weitere Zunahme des Effektes ersichtlich wurde. In einer Zelllinie (T1440) war der Effekt auf die Proliferation durch die CQ/TMZ-Doppelbehandlung durch TMZ und nicht durch CQ bedingt.

Tab. 24: Einfach- bzw. Doppelbehandlung mit effektivster Wirkung auf SLGC-Linien

Zelllinie	MGMT Protein	TP53 Status*	Proliferation		MTT	LDH
			d4	d6		
T1389*	++	wt	CQ5	CQ5	<i>n.u.</i>	<i>n.u.</i>
T1440*	-	wt	T25	T25	<i>n.u.</i>	<i>n.u.</i>
T1442*	-	mut (R248W) [#]	T25 / CQ5	T25 / CQ5	<i>n.u.</i>	<i>n.u.</i>
T1454*	<i>n.u.</i>	wt	T25 / CQ5	T25 / CQ5	<i>n.u.</i>	<i>n.u.</i>
T1522	+	wt	CQ5	CQ5	CQ5	T100 / CQ10
T1524	-	<i>n.u.</i>	T100 / CQ20	T100 / CQ20	T100 / CQ20	T100 / CQ10
T1549	-	<i>n.u.</i>	CQ20	CQ20	CQ5	T100 / CQ10
T1556	+	<i>n.u.</i>	CQ10	CQ10	CQ5	T100 / CQ5
T1564	++	<i>n.u.</i>	CQ20	CQ20	CQ10	CQ10
T1371*	+++	mut (R175H) [#]	CQ20	CQ20	<i>n.u.</i>	<i>n.u.</i>
T1447*	+++	mut (N239D) [§]	CQ20	CQ10	<i>n.u.</i>	<i>n.u.</i>

*: Daten von Kollegen im Labor; +++: hohes Expressionslevel; ++: mittleres Expressionslevel; +: niedriges Expressionslevel; -: keine Expression; wt: Wildtyp; mut: Mutation; #: *gain of function* (GOF) - Mutation; §: Missense-Mutation; CQ5: 5 µg CQ/ml; CQ10: 10 µg CQ/ml; CQ20: 20 µg CQ/ml; T25: 25 µM TMZ; T100: 100 µM TMZ; *n.u.*: nicht untersucht.

Aus den Ergebnissen der Proliferationsanalysen sowie MTT-Assays und Messungen der LDH-Freisetzung (Tab. 24) kann geschlossen werden, dass CQ nicht als Chemosensibilisator für die TMZ-Behandlung geeignet ist. In sieben von zehn SLGC-Linien bewirkten 5 bis 20 µg/ml CQ weniger eine Verstärkung des TMZ-Effektes. Vielmehr war die Reduktion von Proliferation und Vitalität in der Doppelbehandlung allein durch CQ bedingt, wobei in fünf von sieben Fällen bereits 5 µg CQ/ml ausreichten,

um einen messbaren Effekt zu erzielen. Unter diesen SLGC-Linien waren vier mit einer relativen TMZ-Resistenz (T1371, T1389, T1522, T1564) und nur eine mit einer relativen TMZ-Sensitivität (T1447). Nur in drei SLGC-Linien (T1442, T1454, T1524) könnte eine Sensibilisierung für TMZ durch CQ erreicht worden sein. So wurde in Kulturen der Zelllinie T1524 an Tag d6 mit 100 μM TMZ und 10 μg CQ/ml eine Senkung der Proliferation um 65% beobachtet, während die TMZ-Einfachbehandlung eine Reduktion der Proliferation um 22% und die CQ-Einfachbehandlung eine Senkung um 12% induzierte. Die Behandlung von T1524-Zellen mit 100 μM TMZ und 10 μg CQ/ml führte außerdem zu jeweils statistisch signifikanten Reduktionen der Vitalität (TMZ/CQ10: 35%; TMZ: 2%; CQ10: 17%) und Erhöhungen der LDH-Freisetzung (TMZ/CQ10: 2,3-Fach; TMZ: 2,1-Fach; CQ10: 1,4-Fach). Für die T1442-Kulturen war der Effekt der TMZ/CQ-Doppelbehandlung auf die Proliferation ebenfalls stärker als mit TMZ oder CQ allein. Während der BrdU-Einbau mit 25 μM TMZ um 50% und mit 5 μg CQ/ml um 78% gesenkt wurde, führte die Koapplikation von 25 μM TMZ und 5 μg CQ/ml zu einer Senkung der Proliferation um 90%. Die drei SLGC-Linien, in denen CQ als Chemosensibilisator für TMZ wirken könnte, wiesen hinsichtlich des p53-Status Unterschiede auf. So handelt es sich bei T1442 um die *gain of function* Mutante R248W und bei T1454 um eine SLGC-Linie mit Wildtyp p53; das *TP53*-Gen von T1524 wurde bisher nicht sequenziert. Damit widerspricht dieses Ergebnis den Interpretationen von Lee und Kollegen, die postulieren, dass die Expression von Wildtyp-p53 für die Sensibilisierung des TMZ-Effektes durch CQ erforderlich ist (Lee et al., 2015). In dieser Publikation wurde zudem beschrieben, dass die Überexpression von mutiertem p53 den Kombinationseffekt von TMZ und CQ aufhob (Lee et al., 2015). Es erscheint somit wahrscheinlicher, dass nicht der p53-, sondern eher der MGMT-Status für die Effektivität der Doppelbehandlung entscheidend ist. Dabei ist zu beachten, dass die unterschiedlichen SLGC-Linien „MGMT-Dosiseffekte“ aufweisen, die auf die Heterogenität des MGMT-Status zurückgehen. So gibt es neben SLGC-Linien, die entweder nur methylierte (m; z.B. T1440, T1495) oder nur unmethylierte (u; z.B. T1371, T1389) MGMT-Promotoren aufweisen, solche mit einem Mischstatus (m/u; z.B. T1447, T1522). Entsprechend variabel ist das Level der MGMT-Protein-Expression (Tabs. 1 und 24).

Sechs der SLGC-Linien (T1371, T1389, T1447, T1522, T1556, T1564) exprimierten MGMT. Davon zeigten vier Zelllinien (T1371, T1389, T1522, T1564) gegenüber 100 μM TMZ eine relative Resistenz. In diesen SLGC-Linien wurde jedoch eine gute CQ-Responsivität beobachtet, sodass CQ vor allem in TMZ-resistenten SLGC-Linien eine vielversprechende Therapieoption darstellen könnte. Golden und Kollegen fanden sogar Hinweise dafür, dass TMZ-resistente Zelllinien empfindlicher gegenüber CQ waren als TMZ-sensitive Zelllinien (Golden et al., 2014). Wie oben erläutert, kann eine CQ-bedingte Sensibilisierung gegenüber TMZ bestenfalls für drei SLGC-Linien (T1442, T1454, T1524) vermutet werden. Somit unterscheiden sich die Befunde für SLGC-Linien von denen für etablierte GBM-Zelllinien. Für solche etablierte Gliomzelllinien, die keinen Stammzellcharakter aufweisen, wurde eine Chemosensibilisierung für TMZ durch CQ beobachtet (Golden et al., 2014). Dabei trat dieser Effekt für U251 und LN229

bei 3,2 µg/ml bzw. 6,4 µg/ml CQ und bei 20 µM TMZ auf. In der vorliegenden Arbeit wurden höhere Konzentrationen von CQ (10 µg/ml) und TMZ (100 µM) eingesetzt, ohne dass ein vergleichbarer Effekt evident wurde.

Für einige der Zelllinien wurde der Effekt der CQ und TMZ Einfach- bzw. Doppelbehandlung auf den Zellzyklus bestimmt. Dabei ergab sich nur für die Referenzzelllinie U87MG ein eindeutiger Zellzyklusarrest, was zu den Beobachtungen passt, dass etablierte GBM-Linien, nicht aber SLGC-Linien effizient auf die TMZ/CQ-Doppelbehandlung reagieren (siehe oben). In U87MG-Kulturen beobachtete ich mit 10 µg/ml CQ einen Zellzyklusarrest in G1 und mit 100 µM TMZ einen Zellzyklusarrest in G2. In der Literatur wird ebenfalls ein G2-Arrest in etablierten Gliomzellen durch TMZ beschrieben (Hirose et al., 2001; Kanzawa et al., 2004). In SLGC-Linien übten CQ und TMZ nur sehr geringe Effekte auf den Zellzyklus aus. Wenn Effekte auftraten, so handelte es sich um eine Zunahme der Anzahl an poly- bzw. aneuploiden Zellen auf Kosten der Zellen in G2. Eine Ausnahme bildete die Zelllinie T1440, bei der durch TMZ ein G2-Arrest auf Kosten der Zellen in G1 beobachtet wurde. Deutlicher waren die Effekte auf die Zellzyklusregulatoren p21^{CIP1} und p27^{WAF1}. Es fiel auf, dass sich für p21^{CIP1} in den Western Blot Analysen nur schwache Banden ergaben, obwohl einige Literaturstellen behaupten, dass p21^{CIP1} in 50% der Gliome, insbesondere in höhergradigen Gliomen, überexprimiert wird (Korkolopoulou et al., 1998). Von den in dieser Arbeit untersuchten SLGC-Linien ist dies nur für T1440 bekannt (Choschzick et al., 2014). In der Zelllinie T1447 konnte p21^{CIP1} nicht nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen könnten u.a. mit dem Vorhandensein der TP53 *missense* Mutation N239D in T1447-Zellen zusammenhängen (Tab. 24). Dagegen wurde p27^{WAF1} in allen SLGC-Linien bereits in den proliferierenden unbehandelten Kontrollen in hohen Leveln nachgewiesen, was die frühere Beobachtung unserer Arbeitsgruppe bestätigt (Choschzick et al., 2014). Die Behandlung mit TMZ führte in T1371 und T1440, nicht aber in T1389, T1495 und U87MG zu einer Induktion des p21^{CIP1}-Levels. CQ induzierte in T1495 und U87MG eine Steigerung des p21^{CIP1}-Levels. Die Effekte der TMZ/CQ-Doppelbehandlung auf das p21^{CIP1}-Level ergaben mit Ausnahme von T1389 eine Summe der Einzeleffekte. Überraschenderweise induzierte TMZ in T1371, T1389, T1440 und T1447 Senkungen des p27^{WAF1}-Levels; für T1495- und U87MG-Kulturen waren keine eindeutigen Effekte durch TMZ erkennbar. Die Einfachbehandlung mit 10 µg/ml CQ hatte nur geringe Effekte und bewirkte lediglich im Fall von T1389 und T1495 eine leichte Senkung des p27^{WAF1}-Levels. Die Effekte der TMZ/CQ-Doppelbehandlung entsprachen weitgehend der Summe der jeweiligen Einzeleffekte.

Die in der Literatur beschriebene Induktion von p21^{CIP1} durch CQ in Gliomzellen (Kim et al., 2010) lässt sich somit bestenfalls teilweise reproduzieren. Auch für TMZ wird in der Literatur eine Induktion von p21^{CIP1} in Gliomzellen beschrieben, welche zu Zellzyklusarrest und Apoptose führt. Dabei wird von p53-abhängigen und unabhängigen Effekten berichtet (Bocangel et al., 2002; Roos et al., 2007; Sato et al., 2009). Die beiden Zelllinien (T1371, T1440), in denen eine p21^{CIP1}-Induktion nach Einfachbehandlung

mit 100 μ M TMZ und Doppelbehandlung beobachtet wurde, wiesen ein Wildtyp-p53 (T1440) bzw. eine GOF-Mutation des *TP53*-Gens (T1371-R175H) auf. Somit wurde in dieser Arbeit kein Zusammenhang zwischen dem *TP53*-Status und der p21^{CIP1}-Induktion durch TMZ festgestellt. Wie zuvor erwähnt, wird p21^{CIP1} auch über p53-unabhängige Wege reguliert (Abukhdeir und Park, 2009). In vier von sechs SLGC-Linien kam es nach Einfachbehandlung mit TMZ und TMZ/CQ-Doppelbehandlung zu Senkungen des p27^{WAF1}-Levels. Eine Senkung des p27^{WAF1}-Levels nach TMZ-Behandlung wurde auch für Stammzellen aus Ependymomen beschrieben (Meco et al., 2014), allerdings kam es in der Analyse von Meco und Kollegen auch zu TMZ-vermittelten Reduktionen des p21^{CIP1}-Levels. In dem Zusammenhang erscheint interessant, dass die Zellzyklusregulatoren p21^{CIP1} und p27^{WAF1} auch onkogene Eigenschaften besitzen können (Coqueret, 2003). Nach dieser Hypothese könnten niedrige p27^{WAF1}-Level apoptotische Prozesse begünstigen. Tatsächlich beobachteten Meco und Kollegen, dass die Level von p21^{CIP1} und p27^{WAF1} negativ mit den Levels apoptotischer Marker korrelierten (Meco et al., 2014). Wie oben beschrieben, gibt es Hinweise dafür, dass p21^{CIP1} die Induktion von Apoptose und p27^{WAF1} die Induktion von Autophagie begünstigt. So könnten die hier beobachteten hohen p21^{CIP1}- und niedrigen p27^{WAF1}-Level nach CQ/TMZ-Behandlung mit der Induktion von Apoptose und Inhibierung von Autophagie einhergehen. Von einigen Autoren wird angenommen, dass die Sensibilisierung für TMZ durch CQ über Hemmung von Autophagie erfolgt (Golden et al., 2014; Hori et al., 2015; Lee et al., 2015).

Ein weiterer Faktor, der die Resistenz der untersuchten SLGC-Linien gegenüber Chemotherapeutika bedingen könnte, ist die Expression von ABC-Transportern, insbesondere ABCG2 (Dean et al., 2005). ABC-Transporter transportieren aktiv Medikamente, einschließlich Chemotherapeutika, aus der Zelle hinaus (Donnenberg und Donnenberg, 2005). In der vorliegenden Arbeit wurden hohe Expressionslevel des ABC-Transporters ABCG2 in allen SLGC-Linien festgestellt. Auch Bleau und Kollegen beobachteten eine hohe Expression von ABCG2 in SLGC-Linien (Bleau et al., 2009). Kürzlich ergaben sich Hinweise, dass CQ als Inhibitor des ABCG2-Transporters den Efflux von antimykobakteriellen Wirkstoffen aus Makrophagen hemmt (Matt et al., 2017). Ob CQ auch den Efflux von TMZ über den ABCG2-Transporter hemmen könnte, ist bis dato unbekannt. Die ABCG2-Expressionslevel waren in allen SLGC-Linien annähernd gleich. In sieben SLGC-Linien war die Wirkung von CQ und TMZ ähnlich dem Effekt von CQ allein. Eine Zunahme des TMZ-Effektes durch die zusätzliche Gabe von CQ wurde nicht beobachtet. In diesem Zusammenhang ist wichtig, dass TMZ möglicherweise kein Substrat des ABCG2-Transporters ist (Bleau et al., 2009; Chua et al., 2008). Eine abschließende Klärung hierzu steht aus; ebenso ist die Möglichkeit der Beeinflussung von ABCG2 durch CQ keinwegs geklärt. So wurden z.B. bei der Doppelbehandlung von Lungenkrebszellen mit CQ und Topotecan keine Hinweise dafür gefunden, dass CQ die Effektivität von Topotecan über Hemmung von dessen Efflux aus der Zelle steigerte, obwohl Topotecan ein ABCG2-Substrat ist (Wang et al., 2011). Vielmehr wurde auch in dieser Arbeit die Steigerung des Effektes von Topotecan durch CQ auf dessen Hemmung von Autophagie zurückgeführt.

4.2 *In vivo* GBM-Modell

Von den *in vitro* getesteten SLGC-Linien wurden zwei Zelllinien für die *in vivo* Analysen ausgewählt. Dabei stand jedoch weniger im Vordergrund, welche Zelllinie in den *in vitro* Analysen den sensitivsten Phänotyp hinsichtlich der CQ/TMZ-Kombinationsbehandlung zeigte. Vielmehr war entscheidend, dass die Zelllinien vergleichsweise schnell und mit hoher Reproduzierbarkeit aggressive Tumore im SCID-Mausmodell erzeugten. Damit schieden die SLGC-Linien T1522, T1524, T1549, T1556 und T1564 aus. Weiterhin generierte die T1338-Zelllinie im Mausmodell keine Tumore, da diese Zelllinie Retinsäure-abhängig differenzierte (Choschick et al., 2014). Von den übrigen Zelllinien schienen T1447 und T1495 am vielversprechendsten. Die T1447-Zelllinie generierte im SCID-Mausmodell aggressive Tumore, die teilweise die Schädelkalotte durchbrachen (M. Loy, L. Bähr, C. Zechel. Persönliche Mitteilung). Die Zelllinie T1495 konnte mehrfach „durch das Mausgehirn passagiert“ werden, d.h. nach Xenotransplantation entstanden makroskopisch sichtbare Tumore, die erfolgreich in Zellkultur genommen wurden. Dies war auch mit der T1447-Zelllinie möglich. Die etablierte U87MG-Referenzzelllinie wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Westphal/Lamszus ebenfalls mehrfach „durch das Mausgehirn passagiert“. Entsprechend effizient generierte U87MG orthotope Tumore in den SCID-Mäusen. Die Versuche mit U87MG ergaben in allen Mäusen so schnell wachsende Tumore, dass die Mäuse z.T. nach 3 Wochen verstarben. Die Ergebnisse mit T1447 und T1495 waren dagegen weniger effizient.

Die Experimente mit T1447 und T1495 wurden insgesamt zweimal für jede Zelllinie durchgeführt. Im ersten Ansatz mit je 30 Mäusen befanden sich 10 Tiere in jeder Behandlungsgruppe. Diese Tiere litten alle unter Augeninfektionen und bildeten keine Tumore, einschließlich der U87MG-Kontrollgruppe. Somit lag die Vermutung nahe, dass die Mäuse eine partielle Aktivierung des Immunsystems durchliefen, welche das Tumorstadium verhinderte. Die Wiederholung des Experimentes erfolgte wegen der im Tierantrag begrenzten Anzahl an Versuchstieren nur mit einer TMZ- und einer TMZ/CQ-Gruppe.

Das experimentelle Verfahren wurde basierend auf einer Masterarbeit (E. Dei Anane, 2014) vor Wiederholung der Versuche optimiert. So wurden die Zellen in einer Konzentration von 25.000/ μ l inokuliert und in N-Medium statt PBS resuspendiert. Dabei wurde experimentell geprüft, dass das N-Medium keine Immunantwort in den Mäusen provoziert und für das Überleben der Zellen günstiger ist.

Trotz der Optimierungen waren nicht in allen inokulierten Mäusen Tumore nachweisbar. Da alle Mäuse Zellen identischer Präparation erhielten, ist davon auszugehen, dass nicht die Zellqualität die Ursache war. Eine mögliche Ursache könnte in der Anlieferung der Mäuse bestehen. Die Nacktmäuse sind immundefizient (SCID-Mäuse; *Severe Combined Immunodeficiency*), jedoch nicht vollständig immuninkompetent. Der Transport vom Züchter in die Tierhaltung der Universität zu Lübeck könnte über die Induktion von Stress das noch vorhandene Immunsystem aktivieren und so das Anwachsen der SLGCs in einigen Tieren vermindern oder sogar verhindern (Charles River Forschungslabor, persönliche Mit-

teilung). Da andere Arbeitsgruppen (z.B. Kim et al., 2010) bei der orthotopen Transplantation die gleiche Inokulationstechnik mit den gleichen stereotaktischen Koordinaten wie in dieser Arbeit verwendeten, sollte ein konzeptionelles Problem auszuschließen sein. Allerdings besteht bei der Nutzung des stereotaktischen Rahmens das Problem, dass der Kopf der Tiere neben zwei Ohrschienen mittels Schneidezahnschiene fixiert wird. Somit kann es aufgrund von anatomischen Gegebenheiten zu kleinen Variationen in der Inokulationsstelle kommen. Ein weiteres experimentelles Problem ist der Unterdruck, der bei Entfernen der Kanüle aus der Inokulationsstelle entsteht. Zwar wurde darauf geachtet, dass die Kanüle für mindestens eine Minute im Gewebe verblieb, doch es ist nicht auszuschließen, dass bei Entfernen der Kanüle eine relevante Menge an SLGCs herausgelöst wurde.

Das T1495-Kollektiv zeigte im Wiederholungsansatz ähnlich wie im ersten Durchlauf das Auftreten von zerebralen Entzündungen (siehe unten). Außerdem waren in dem T1495-Kollektiv kaum Tumore nachzuweisen. Die histologische Auswertung der Gehirne ergab überwiegend Defekte im Bereich der Inokulationsstelle, ohne dass eindeutig zu eruieren war, ob der Defekt durch das Herauslösen einer Tumornekrose oder eines Abszesses bedingt wurde. Diese Beobachtung legte eine weitere Ursache für das fehlende Anwachsen von Tumoren nahe, und zwar dass die osmotisch wirkenden Alzet-Pumpen zum Ablösen loser Tumorzellverbände geführt haben könnten. Die aggressivere SLGC-Linie T1447 ergab konklusivere Daten, welche im Folgenden genauer besprochen werden.

Nach Inokulation mit T1447-Zellen wurden die Mäuse unter sterilen Bedingungen gehalten, bevor nach 35 Tagen die vierwöchige Behandlung mit TMZ und CQ begann. Die Kontrolle des Gewichtsverlaufes der Tiere zeigte, dass stets einige Tiere in allen Behandlungsgruppen einen starken Gewichtsverlust aufwiesen. Dabei waren die mit TMZ/CQ-doppeltbehandelten Mäuse physisch am schwächsten und verstarben am frühesten. Die unbehandelte Kontrollgruppe beinhaltete die kräftigsten Tiere, die zudem alle den Behandlungszeitraum überlebten. Die histologischen Untersuchungen der Gehirne zeigten, dass der Gewichtsverlust nicht mit der Entstehung eines Tumors korrelierte. So wurden bei den Mäusen mit starkem Gewichtsverlust sowohl Tiere mit als auch ohne Tumor beobachtet. Demnach müssen andere Erklärungen für den starken Gewichtsverlust der behandelten Mäuse herangezogen werden. Mittels immunhistologischer Methoden wurde nachgewiesen, dass sich in etwa der Hälfte der Gehirne der mit TMZ und CQ behandelten Mäuse Infiltrate aus murinen polymorphkernigen Zellen zusammen mit Zelltrümmern an der Inokulationsstelle fanden. Zusammen mit dem klinischen Erscheinungsbild der Mäuse und den HE-Befunden legten diese Beobachtungen die Vermutung nahe, dass diese Tiere Entzündungen in Form zerebraler Abszesse aufwiesen. Dies könnte durch eine unsterile Operationstechnik oder durch unsteril verpackte Alzet-Pumpen bedingt worden sein. Andere Arbeitsgruppen wählten andere CQ-Applikationsformen. So wurde CQ intrakraniell injiziert (Kim et al., 2010) oder simultan mit TMZ oral appliziert (Golden et al., 2014). Beide Verfahren sind weniger traumatisch für die

Tiere und bergen weniger Infektionsgefahr als die hier verwendete Methode der subkutanen Pumpenimplantation. Allerdings ist die zugeführte CQ-Dosis in diesen Ansätzen nicht präzise nachzuverfolgen. Es wäre jedoch auch denkbar, dass CQ selbst für die entzündlichen Prozesse verantwortlich war. So ist bekannt, dass CQ die terminalen Schritte der Autophagie inhibiert und so zur Akkumulation von Autophagosomen führt, was wiederum möglicherweise in einer Nekroptose oder Nekrose resultiert.

Der Gewichtsverlust könnte auch durch eine wiederholte Stressinduktion durch die orale Applikation von TMZ verursacht worden sein. Um die orale Aufnahme einer konstanten TMZ-Konzentration zu gewährleisten, wurde die TMZ-Lösung mithilfe einer Fütterungssonde direkt in den Ösophagus appliziert, was einige Tiere nicht gut tolerierten. Bei Golden und Kollegen erfolgte die orale Applikation von TMZ ebenfalls mit einer Fütterungssonde, allerdings nur über einen Zeitraum von 48 Stunden, sodass die Mäuse insgesamt erheblich weniger Stress ausgesetzt waren.

Die Kontrollgruppe, in der die Tiere weder eine Alzet-Pumpe mit CQ implantiert bekamen noch täglich mit TMZ gefüttert wurden, zeigte einen stabilen Gewichtsverlauf. Die Gewichtsentwicklung von immundefizienten Nacktmäusen wird demnach stärker von Infektionen und von traumatischen Behandlungen beeinflusst als von der Entwicklung eines Tumors. Mit Gewichtsverlust und körperlicher Schwäche war außerdem ein verfrühtes Versterben der Mäuse assoziiert, was die Aussagekraft der *in vivo* Experimente weiter limitierte.

Zusammenfassend muss geschlussfolgert werden, dass die Versuche im Mausmodell keine fundierten Aussagen zu den *in vivo* Wirkungen von TMZ und CQ auf von SLGC-Linien generierte Tumore zulassen. Mit der Referenzzelllinie U87MG wurden bereits *in vivo* Daten gewonnen. Kim und Kollegen zeigten, dass mit CQ behandelte Tumore eine Reduktion des Tumolvolumens mit einer geringeren Anzahl mitotischer Zellen sowie einer größeren Anzahl apoptotischer Zellen aufwiesen (Kim et al., 2010). Golden und Kollegen beobachteten im ektopen Mausmodell, dass mit CQ und TMZ behandelte Tumore höhere Level eines Apoptose-assoziierten Proteins exprimierten als unbehandelte oder mit CQ bzw. TMZ allein behandelte Tumore (Golden et al., 2014). Die Relevanz von etablierten Zelllinien als Modell für humane Gliome wurde jedoch infrage gestellt, da von U87MG stammende Xenotransplantate bezüglich ihrer Genexpressionsprofile wenig Ähnlichkeiten mit primären humanen Gliomen aufweisen (Li et al., 2008). Demzufolge sollten für den Gewinn weiterer *in vivo* Daten vor allem SLGC-Linien eingesetzt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen einerseits auf die Empfindlichkeit der Tiere gegenüber Stress hin und lassen andererseits vermuten, dass eine Immunantwort durch die Manipulation provoziert wurde. Demnach sollte ein anderes Mausmodell für eine erneute Analyse in Erwägung gezogen werden. Bei der Xenotransplantation von GBM-Biopsaten konnte z.B. eine Anwachsrate von 96% erreicht werden, wobei es jedoch 125 Tage dauerte, bis Symptome auftraten (Wang et al., 2009). Statt der SCID-Mäuse könnten auch immunkompetente Mäuse eingesetzt werden. Dieses Modell wurde von Garcia und Kollegen verwendet, wobei eine größere Menge an SLGCs für die Inokulation benötigt wurde (Garcia et

al., 2014). Diese Mäuse wären durch das vorhandene Immunsystem weniger empfindlich gegenüber Infektionen und anderen Komplikationen. Frese und Tuveson suggerieren sogar, dass das Xenotransplantationsmodell nicht mehr als Mausmodell für Tumoren verwendet werden sollte. Einerseits weil die zelluläre Zusammensetzung des Tumors aufgrund eines Selektionsdruckes in der Zellkultur falsch wiedergegeben wird (Kang et al., 2003). Andererseits werden wichtige Merkmale der Mikroumgebung des Tumors im Xenotransplantat falsch dargestellt oder fehlen; dies betrifft Stromazellen, Blut- und Lymphgefäße sowie Immunzellen (Becher und Holland, 2006; Sikder et al., 2003). So erscheinen genetisch manipulierte Modelle als die besten Modelle für humane Tumoren, da sie die pathophysiologischen und molekularen Merkmale humaner Malignome gut widerspiegeln (Frese und Tuveson, 2007). Das Ziel ist letztendlich die klinische Überprüfung, ob die TMZ/CQ-Kombinationsbehandlung eine verbesserte Therapieoption für GBM-Patienten darstellt. Vorher müssen eindeutige *in vivo* Evidenzen gewonnen werden, um die Voraussetzung für den Beginn einer solchen klinischen Studie zu erfüllen.

4.3 Konklusion und Ausblick

Die gängige Hypothese zur GBM-Rezidivbildung geht davon aus, dass die Subpopulation der stammzellähnlichen Gliomzellen (SLGCs) resistenter gegenüber Radio- und Chemotherapie ist als schneller proliferierende Vorläuferzellen oder differenzierte Tumorzellen und daher die Standardtherapie überlebt (Reya et al., 2001). Ein experimenteller Beweis dafür wurde bisher nur für TMZ in einem genetisch modifizierten Mausmodell gewonnen (Chen et al., 2012, *Nature*). Hinsichtlich der Effekte des Chemotherapeutikums TMZ auf SLGCs herrscht allerdings kein Konsens. So wurden Daten publiziert, die eine TMZ-vermittelte Reduktion von SLGCs befürworten und solche, welche das Gegenteil vermuten lassen (Beier et al., 2008; Schonberg et al., 2013). Es steht allerdings fest, dass die Resistenz des GBMs und der SLGCs gegenüber TMZ viel komplexer ist als erwartet (Beier et al., 2011). Dies macht die Erforschung neuer Therapiestrategien erforderlich. In dieser Arbeit wurden daher die Effekte von Chloroquin (CQ) und TMZ in Mono- und Kombinationstherapie *in vitro* und *in vivo* untersucht.

Die vorliegende Arbeit konnte klar belegen, dass CQ allein in allen untersuchten SLGC-Kulturen zu einer Reduktion der Proliferation führte, wobei dies unabhängig vom p53-Status war. Eine Verringerung der Vitalität durch CQ konnte ebenfalls in allen SLGC-Linien mittels MTT-Assay und/oder Messung der LDH-Freisetzung belegt werden. In der Regel war der Effekt mit steigender CQ-Dosis höher, während eine zwei Tage längere Behandlung nur gelegentlich eine Zunahme des CQ-Effektes ergab. Die Effekte der CQ/TMZ-Doppelbehandlungen waren in sieben von zehn SLGC-Linien durch CQ bedingt und bestenfalls in drei von zehn Fällen konnte der TMZ-Effekt durch CQ gesteigert werden. Daher erscheint es problematisch, CQ als Chemosensibilisator für die TMZ-Behandlung zu klassifizieren. In der vorliegenden Ar-

beit erfolgte die Applikation von CQ und TMZ gleichzeitig. Es stellt sich somit die Frage, ob eine sukzessive Applikation von CQ und TMZ deutlichere Effekte auf Proliferation und Vitalität von SLGC-Linien haben könnte. Einzig bei der etablierten GBM-Linie U87MG wurde ein G2-Arrest durch TMZ und ein partieller G1-Arrest durch CQ induziert, womit Literaturdaten bestätigt wurden. Das unterschiedliche Verhalten der SLGC-Linien und etablierten GBM-Linien verdeutlicht die Notwendigkeit, genau zu differenzieren, ob etablierte GBM-Linien Aussagen über das Verhalten von primären Gliomzellen zulassen. Es könnte durchaus sein, dass mit U87MG gewonnene Daten keine Evidenzen für das GBM darstellen. Weiterführende Analysen sollten Untersuchungen zur Induktion von Zelltod beinhalten, zumal der hier verwendete Zytotoxizitätsassay lediglich die Freisetzung der LDH misst und kein geeigneter Test für die Untersuchung von Apoptose oder Nekrose ist. Da Kim und Kollegen Hinweise dafür fanden, dass CQ in etablierten GBM-Zelllinien Apoptose induziert (Kim et al., 2010), sollten die SLGC-Linien z. B. mittels TUNEL-Methode (*TdT-mediated dUTP-biotin nick-end labeling*) oder immunzytologischer Färbungen mit Antikörpern gegen aktivierte Caspase-3 untersucht werden. Hilfreich wären auch Western Blot Analysen zum Nachweis pro-apoptotischer Proteine (PARP, aktiviertes PARP, Bax, Bak oder PUMA) oder anti-apoptotischer Proteine (BCL-2). Weiterhin wird vermutet, dass CQ über Inhibierung von Autophagie den zytotoxischen Effekt von TMZ verstärkt (Golden et al., 2014; Hori et al., 2015; Lee et al., 2015), wobei diese Daten ausnahmslos Experimenten mit etablierten GBM-Zelllinien wie U87MG entstammen. Der Einfluss von TMZ und CQ auf die Expression der Autophagie-assoziierten Proteine Beclin1 und LC3B in SLGC-Linien wird gegenwärtig von Kollegen unserer Arbeitsgruppe erforscht. Wie oben erläutert, können die *in vitro* Analysen an SLGC-Linien die pharmakologische Wirkung von TMZ und/oder CQ im humanen Organismus nicht nachstellen. Die Optimierung des *in vivo* Modells stellt somit einen wichtigen Schritt dar. Dabei stellt sich die Frage, ob die relative Empfindlichkeit der SCID-Mäuse und die mit diesem Modell verbundenen hohen Kosten eine erneute Analyse der Koapplikation von TMZ und CQ an orthotopen Tumoren rechtfertigen. In meiner Analyse wurden 160 Mäuse ohne eindeutige Aussagekraft eingesetzt. Daher sollte überlegt werden, ob der Einsatz von genetisch manipulierten Mäusen mit genetisch induzierter Gliombildung nicht vielversprechender wäre.

Anhang

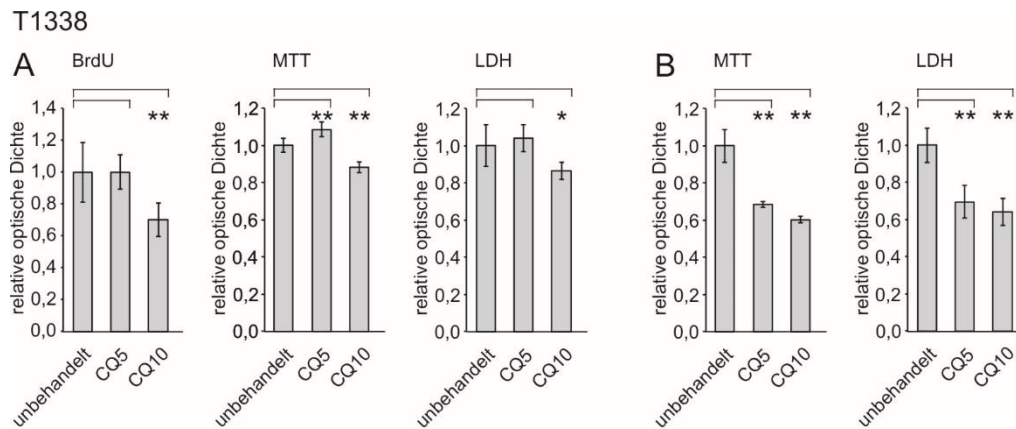


Abb. 27: Effekt steigender Chloroquinkonzentrationen auf die Proliferation (BrdU-ELISA), Vitalität (MTT-Test) und LDH-Freisetzung (Zytotoxizitätsassay) der SLGC-Linie T1338. - (A) Tag d4 nach Behandlung. (B) Tag d6 nach Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte von parallel untersuchten Proben einer Serie und die Standardabweichungen. Die relative optische Dichte der unbehandelten Kontrolle wurde als 1 definiert und alle übrigen Werte relativ dazu dargestellt. Statistisch signifikante Abweichungen von der Kontrolle wurden mit * = $p < 0,05$ und ** = $p < 0,005$ markiert (T-Test). CQ5: 5 μg CQ/ml; CQ10: 10 μg CQ/ml.

Tab. 25: T-Test Analysen der Dosissteigerung von Chloroquin in der SLGC-Linie T1338

T1338		Tag d4		Tag d6	
		CQ5	CQ10	CQ5	CQ10
BrdU	CQ0	n.s.	$p < 0,005$	-	-
	CQ5		$p < 0,005$		-
MTT	CQ0	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$
	CQ5		$p < 0,005$		$p < 0,005$
LDH	CQ0	n.s.	$p < 0,05$	$p < 0,005$	$p < 0,005$
	CQ5		$p < 0,005$		$p < 0,005$

BrdU: 5-Brom-2'-desoxyuridin; LDH: Laktatdehydrogenase; MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-iphenyltetrazoliumbromid; CQ5: 5 μg Chloroquin/ml; CQ10: 10 μg Chloroquin/ml; n.s.: nicht signifikant.

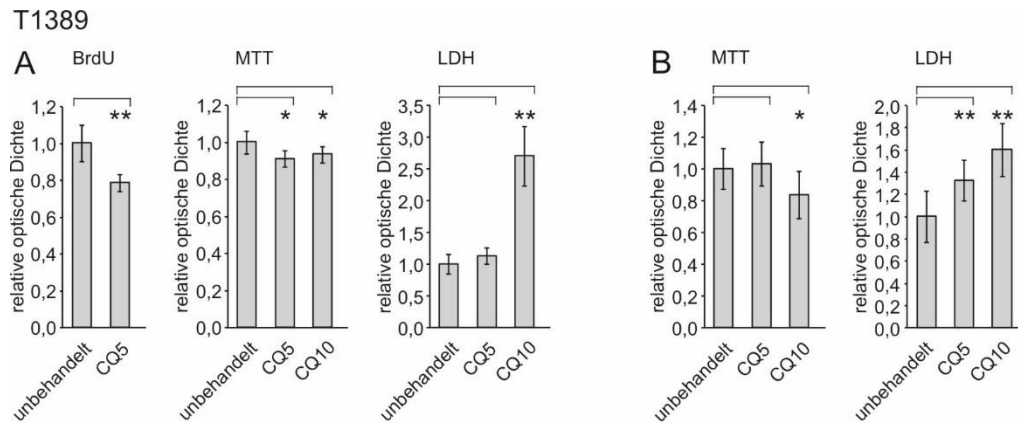


Abb. 28: Effekt steigender Chloroquinkonzentrationen auf die Proliferation (BrdU-ELISA), Vitalität (MTT-Test) und LDH-Freisetzung (Zytotoxizitätsassay) der SLGC-Linie T1389. - (A) Tag d4 nach Behandlung. (B) Tag d6 nach Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte von parallel untersuchten Proben einer Serie und die Standardabweichungen. Die relative optische Dichte der unbehandelten Kontrolle wurde als 1 definiert und alle übrigen Werte relativ dazu dargestellt. Statistisch signifikante Abweichungen von der Kontrolle wurden mit * = $p < 0,05$ und ** = $p < 0,005$ markiert (T-Test). CQ5: 5 µg CQ/ml; CQ10: 10 µg CQ/ml.

Tab. 26: T-Test Analysen der Dosissteigerung von Chloroquin in der SLGC-Linie T1389

T1389		Tag d4		Tag d6	
		CQ5	CQ10	CQ5	CQ10
BrdU	CQ0	$p < 0,005$	-	-	-
	CQ5	-	-	-	-
MTT	CQ0	$p < 0,05$	$p < 0,05$	n.s.	$p < 0,05$
	CQ5	-	n.s.	-	$p < 0,05$
LDH	CQ0	n.s.	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$
	CQ5	-	$p < 0,005$	-	$p < 0,005$

BrdU: 5-Brom-2'-desoxyuridin; LDH: Laktatdehydrogenase; MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-iphenyltetrazoliumbromid; CQ5: 5 µg Chloroquin/ml; CQ10: 10 µg Chloroquin/ml; n.s.: nicht signifikant.

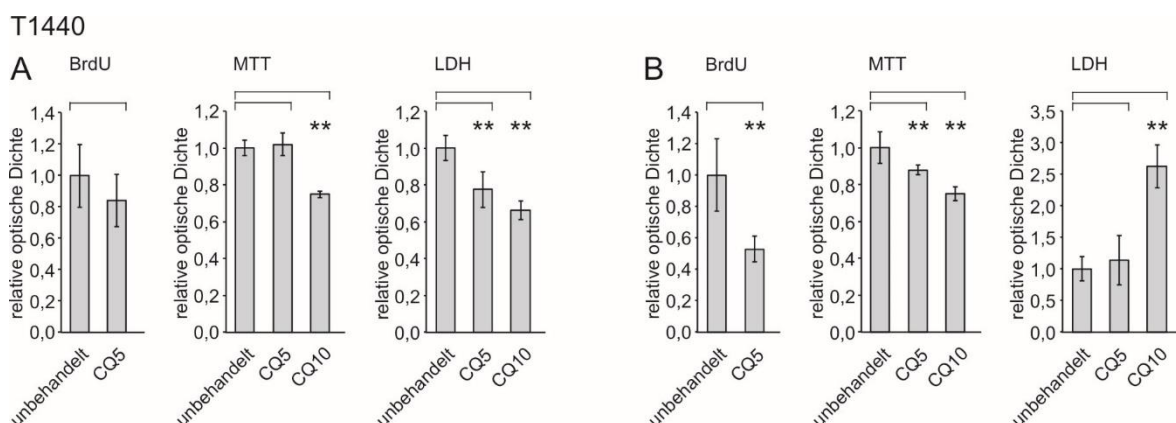


Abb. 29: Effekt steigender Chloroquinkonzentrationen auf die Proliferation (BrdU-ELISA), Vitalität (MTT-Test) und LDH-Freisetzung (Zytotoxizitätsassay) der SLGC-Linie T1440. - (A) Tag d4 nach Behandlung. (B) Tag d6 nach Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte von parallel untersuchten Proben einer Serie und die Standardabweichungen. Die relative optische Dichte der unbehandelten Kontrolle wurde als 1 definiert und alle übrigen Werte relativ dazu dargestellt. Statistisch signifikante Abweichungen von der Kontrolle wurden mit * = $p < 0,05$ und ** = $p < 0,005$ markiert (T-Test). CQ5: 5 µg CQ/ml; CQ10: 10 µg CQ/ml.

Tab. 27: T-Test Analysen der Dosissteigerung von Chloroquin in der SLGC-Linie T1440

T1440		Tag d4		Tag d6	
		CQ5	CQ10	CQ5	CQ10
BrdU	CQ0	n.s.	-	$p < 0,005$	-
	CQ5		-		-
MTT	CQ0	n.s.	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$
	CQ5		$p < 0,005$		$p < 0,005$
LDH	CQ0	$p < 0,005$	$p < 0,005$	n.s.	$p < 0,005$
	CQ5		$p < 0,05$		$p < 0,005$

BrdU: 5-Brom-2'-desoxyuridin; LDH: Laktatdehydrogenase; MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-phenyltetrazoliumbromid; CQ5: 5 µg Chloroquin/ml; CQ10: 10 µg Chloroquin/ml; n.s.: nicht signifikant.

T1447

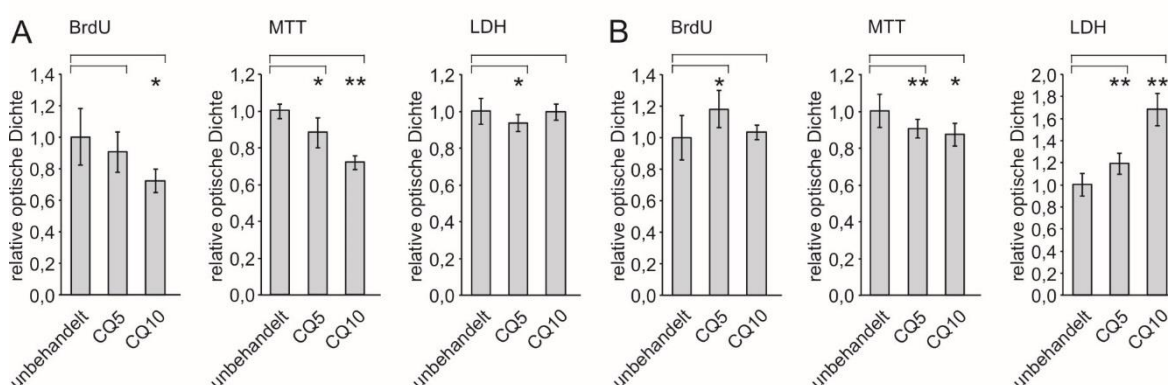


Abb. 30: Effekt steigender Chloroquinkonzentrationen auf die Proliferation (BrdU-ELISA), Vitalität (MTT-Test) und LDH-Freisetzung (Zytotoxizitätsassay) der SLGC-Linie T1447. - (A) Tag d4 nach Behandlung. (B) Tag d6 nach Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte von parallel untersuchten Proben einer Serie und die Standardabweichungen. Die relative optische Dichte der unbehandelten Kontrolle wurde als 1 definiert und alle übrigen Werte relativ dazu dargestellt. Statistisch signifikante Abweichungen von der Kontrolle wurden mit * = $p < 0,05$ und ** = $p < 0,005$ markiert (T-Test). CQ5: 5 µg CQ/ml; CQ10: 10 µg CQ/ml.

Tab. 28: T-Test Analysen der Dosissteigerung von Chloroquin in der SLGC-Linie T1447

T1447		Tag d4		Tag d6	
		CQ5	CQ10	CQ5	CQ10
BrdU	CQ0	n.s.	$p < 0,05$	$p < 0,05$	n.s.
	CQ5		$p < 0,05$		$p < 0,05$
MTT	CQ0	$p < 0,05$	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,05$
	CQ5		$p < 0,005$		n.s.
LDH	CQ0	$p < 0,05$	n.s.	$p < 0,005$	$p < 0,005$
	CQ5		$p < 0,05$		$p < 0,005$

BrdU: 5-Brom-2'-desoxyuridin; LDH: Laktatdehydrogenase; MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-phenyltetrazoliumbromid; CQ5: 5 µg Chloroquin/ml; CQ10: 10 µg Chloroquin/ml; n.s.: nicht signifikant.

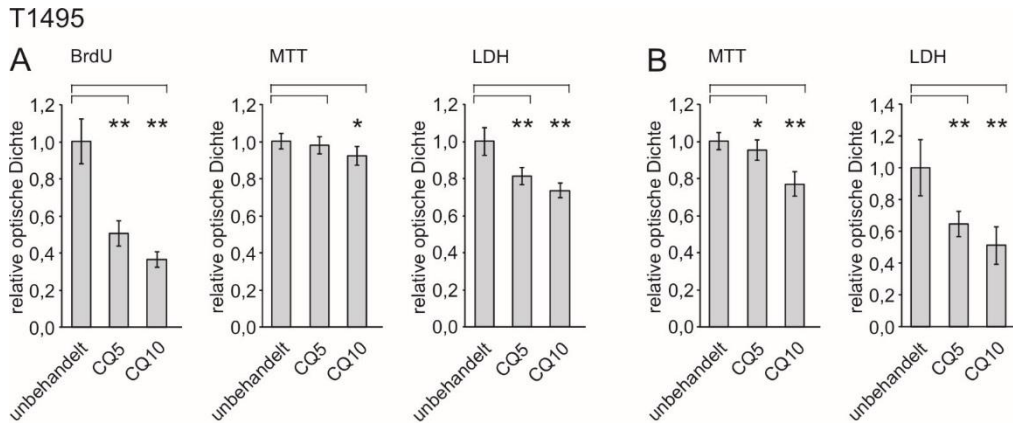


Abb. 31: Effekt steigender Chloroquinkonzentrationen auf die Proliferation (BrdU-ELISA), Vitalität (MTT-Test) und LDH-Freisetzung (Zytotoxizitätsassay) der SLGC-Linie T1495. - (A) Tag d4 nach Behandlung. (B) Tag d6 nach Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte von parallel untersuchten Proben einer Serie und die Standardabweichungen. Die relative optische Dichte der unbehandelten Kontrolle wurde als 1 definiert und alle übrigen Werte relativ dazu dargestellt. Statistisch signifikante Abweichungen von der Kontrolle wurden mit * = $p < 0,05$ und ** = $p < 0,005$ markiert (T-Test). CQ5: 5 µg CQ/ml; CQ10: 10 µg CQ/ml.

Tab. 29: T-Test Analysen der Dosissteigerung von Chloroquin in der SLGC-Linie T1495

T1495		Tag d4		Tag d6	
		CQ5	CQ10	CQ5	CQ10
BrdU	CQ0	$p < 0,005$	$p < 0,005$	-	-
	CQ5		$p < 0,005$		-
MTT	CQ0	n.s.	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,005$
	CQ5		n.s.		$p < 0,005$
LDH	CQ0	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$
	CQ5		$p < 0,05$		$p < 0,05$

BrdU: 5-Brom-2'-desoxyuridin; LDH: Laktatdehydrogenase; MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-iphenyltetrazoliumbromid; CQ5: 5 µg Chloroquin/ml; CQ10: 10 µg Chloroquin/ml; n.s.: nicht signifikant.

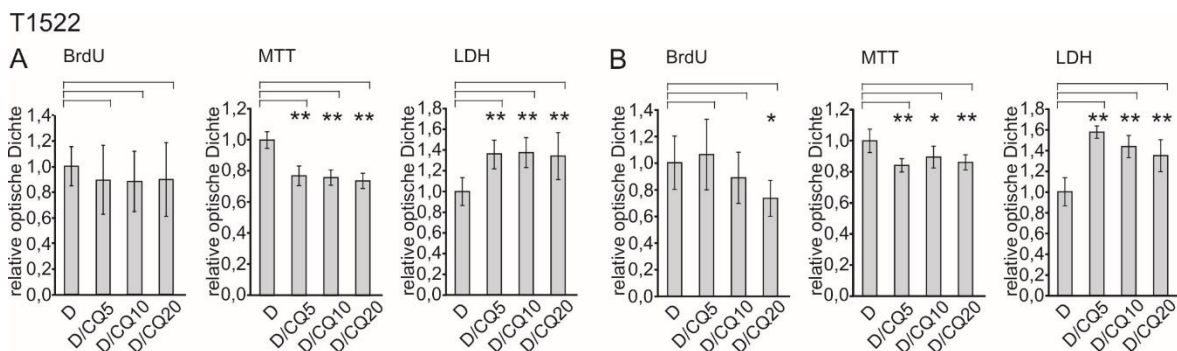


Abb. 32: Effekt steigender Chloroquinkonzentrationen auf die Proliferation (BrdU-ELISA), Vitalität (MTT-Test) und LDH-Freisetzung (Zytotoxizitätsassay) der SLGC-Linie T1522 in Anwesenheit von DMSO (Dimethylsulfoxid). - (A) Tag d4 nach Behandlung. (B) Tag d6 nach Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte von parallel untersuchten Proben einer Serie und die Standardabweichungen. Die relative optische Dichte der DMSO-Kontrolle wurde als 1 definiert und alle übrigen Werte relativ dazu dargestellt. Statistisch signifikante Abweichungen von der Kontrolle wurden mit * = $p < 0,05$ und ** = $p < 0,005$ markiert (T-Test). CQ5: 5 µg CQ/ml; CQ10: 10 µg CQ/ml; CQ20: 20 µg CQ/ml; D: DMSO.

Tab. 30: T-Test Analyse der Dosissteigerung von CQ in Anwesenheit von DMSO in der SLGC-Linie T1522

T1522		Tag d4			Tag d6		
		CQ5	CQ10	CQ20	CQ5	CQ10	CQ20
BrdU	CQ0	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	$p < 0,05$
	CQ5		n.s.	n.s.		n.s.	n.s.
	CQ10			n.s.			n.s.
MTT	CQ0	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,05$	$p < 0,005$
	CQ5		n.s.	n.s.		n.s.	n.s.
	CQ10			n.s.			n.s.
LDH	CQ0	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,05$
	CQ5		n.s.	n.s.		$p < 0,005$	$p < 0,005$
	CQ10			n.s.			n.s.

BrdU: 5-Brom-2'-desoxyuridin; LDH: Laktatdehydrogenase; MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-iphenyltetrazoliumbromid; CQ5: 5 µg Chloroquin/ml; CQ10: 10 µg Chloroquin/ml; CQ20: 20 µg Chloroquin/ml; n.s.: nicht signifikant.

T1524

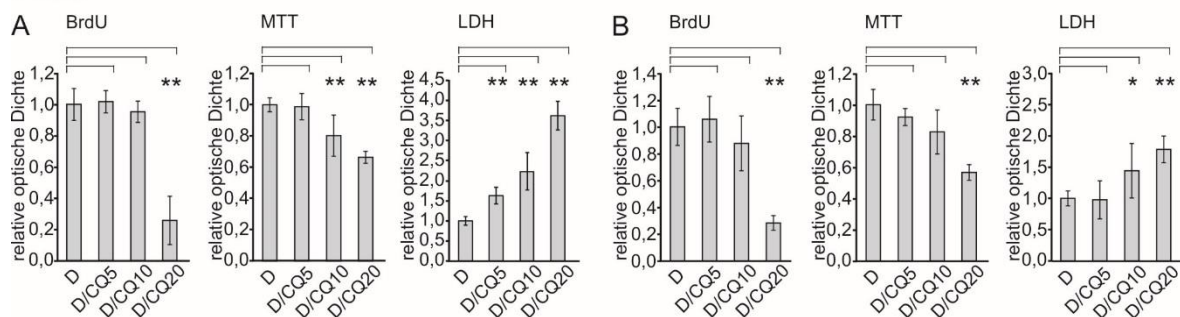


Abb. 33: Effekt steigender Chloroquinkonzentrationen auf die Proliferation (BrdU-ELISA), Vitalität (MTT-Test) und LDH-Freisetzung (Zytotoxizitätsassay) der SLGC-Linie T1524 in Anwesenheit von DMSO (Dimethylsulfoxid). - (A) Tag d4 nach Behandlung. (B) Tag d6 nach Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte von parallel untersuchten Proben einer Serie und die Standardabweichungen. Die relative optische Dichte der DMSO-Kontrolle wurde als 1 definiert und alle übrigen Werte relativ dazu dargestellt. Statistisch signifikante Abweichungen von der Kontrolle wurden mit * = $p < 0,05$ und ** = $p < 0,005$ markiert (T-Test). CQ5: 5 µg CQ/ml; CQ10: 10 µg CQ/ml; CQ20: 20 µg CQ/ml; D: DMSO.

Tab. 31: T-Test Analyse der Dosissteigerung von CQ in Anwesenheit von DMSO in der SLGC-Linie T1524

T1524		Tag d4			Tag d6		
		CQ5	CQ10	CQ20	CQ5	CQ10	CQ20
BrdU	CQ0	n.s.	n.s.	$p < 0,005$	n.s.	n.s.	$p < 0,005$
	CQ5		n.s.	$p < 0,005$		n.s.	$p < 0,005$
	CQ10			$p < 0,005$			$p < 0,005$
MTT	CQ0	n.s.	$p < 0,005$	$p < 0,005$	n.s.	n.s.	$p < 0,005$
	CQ5		$p < 0,05$	$p < 0,005$		n.s.	$p < 0,005$
	CQ10			$p < 0,05$			$p < 0,005$
LDH	CQ0	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$	n.s.	$p < 0,05$	$p < 0,005$
	CQ5		$p < 0,005$	$p < 0,005$		$p < 0,05$	$p < 0,005$
	CQ10			$p < 0,005$			n.s.

BrdU: 5-Brom-2'-desoxyuridin; LDH: Laktatdehydrogenase; MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-iphenyltetrazoliumbromid; CQ5: 5 µg Chloroquin/ml; CQ10: 10 µg Chloroquin/ml; CQ20: 20 µg Chloroquin/ml; n.s.: nicht signifikant.

T1549

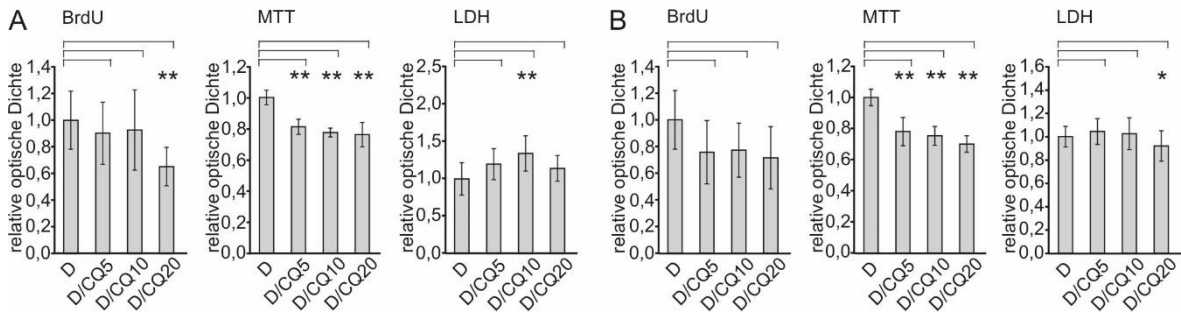


Abb. 34: Effekt steigender Chloroquinkonzentrationen auf die Proliferation (BrdU-ELISA), Vitalität (MTT-Test) und LDH-Freisetzung (Zytotoxizitätsassay) der SLGC-Linie T1549 in Anwesenheit von DMSO (Dimethylsulfoxid). - (A) Tag d4 nach Behandlung. (B) Tag d6 nach Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte von parallel untersuchten Proben einer Serie und die Standardabweichungen. Die relative optische Dichte der DMSO-Kontrolle wurde als 1 definiert und alle übrigen Werte relativ dazu dargestellt. Statistisch signifikante Abweichungen von der Kontrolle wurden mit * = $p < 0,05$ und ** = $p < 0,005$ markiert (T-Test). CQ5: 5 μg CQ/ml; CQ10: 10 μg CQ/ml; CQ20: 20 μg CQ/ml; D: DMSO.

Tab. 32: T-Test Analyse der Dosissteigerung von CQ in Anwesenheit von DMSO in der SLGC-Linie T1549

T1549		Tag d4			Tag d6		
		CQ5	CQ10	CQ20	CQ5	CQ10	CQ20
BrdU	CQ0	n.s.	n.s.	$p < 0,005$	n.s.	n.s.	n.s.
	CQ5		n.s.	n.s.		n.s.	n.s.
	CQ10			n.s.			n.s.
MTT	CQ0	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$
	CQ5		n.s.	n.s.		n.s.	n.s.
	CQ10			n.s.			$p < 0,005$
LDH	CQ0	n.s.	$p < 0,005$	n.s.	n.s.	n.s.	$p < 0,05$
	CQ5		n.s.	n.s.		n.s.	n.s.
	CQ10			$p < 0,05$			n.s.

BrdU: 5-Brom-2'-desoxyuridin; LDH: Laktatdehydrogenase; MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-phenyltetrazoliumbromid; CQ5: 5 μg Chloroquin/ml; CQ10: 10 μg Chloroquin/ml; CQ20: 20 μg Chloroquin/ml; n.s.: nicht signifikant.

T1556

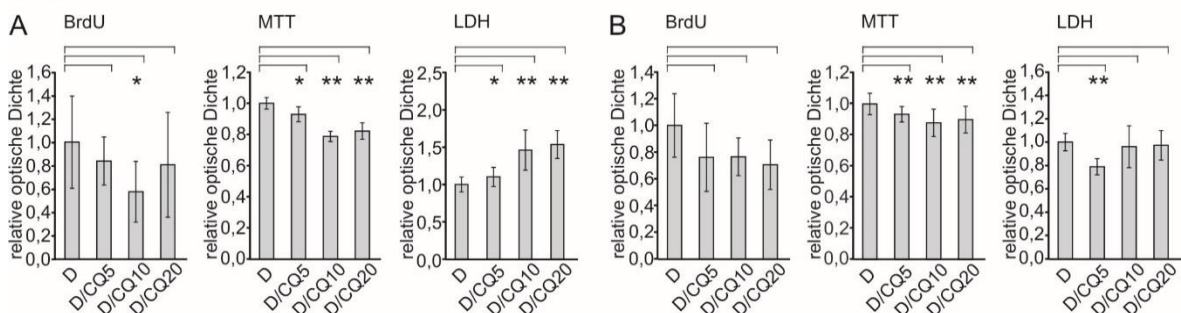


Abb. 35: Effekt steigender Chloroquinkonzentrationen auf die Proliferation (BrdU-ELISA), Vitalität (MTT-Test) und LDH-Freisetzung (Zytotoxizitätsassay) der SLGC-Linie T1556 in Anwesenheit von DMSO (Dimethylsulfoxid). - (A) Tag d4 nach Behandlung. (B) Tag d6 nach Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte von parallel untersuchten Proben einer Serie und die Standardabweichungen. Die relative optische Dichte der DMSO-Kontrolle wurde als 1 definiert und alle übrigen Werte relativ dazu dargestellt. Statistisch signifikante Abweichungen von der Kontrolle wurden mit * = $p < 0,05$ und ** = $p < 0,005$ markiert (T-Test). CQ5: 5 μg CQ/ml; CQ10: 10 μg CQ/ml; CQ20: 20 μg CQ/ml; D: DMSO.

Tab. 33: T-Test Analyse der Dosissteigerung von CQ in Anwesenheit von DMSO in der SLGC-Linie T1556

T1556		Tag d4			Tag d6		
		CQ5	CQ10	CQ20	CQ5	CQ10	CQ20
BrdU	CQ0	n.s.	$p < 0,05$	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	CQ5		n.s.	n.s.		n.s.	n.s.
	CQ10			n.s.			n.s.
MTT	CQ0	$p < 0,05$	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$
	CQ5		$p < 0,005$	$p < 0,005$		$p < 0,05$	n.s.
	CQ10			n.s.			n.s.
LDH	CQ0	$p < 0,05$	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$	n.s.	n.s.
	CQ5		$p < 0,005$	$p < 0,005$		$p < 0,05$	$p < 0,005$
	CQ10			n.s.			n.s.

BrdU: 5-Brom-2'-desoxyuridin; LDH: Laktatdehydrogenase; MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-iphenyltetrazoliumbromid; CQ5: 5 µg Chloroquin/ml; CQ10: 10 µg Chloroquin/ml; CQ20: 20 µg Chloroquin/ml; n.s.: nicht signifikant.

T1564

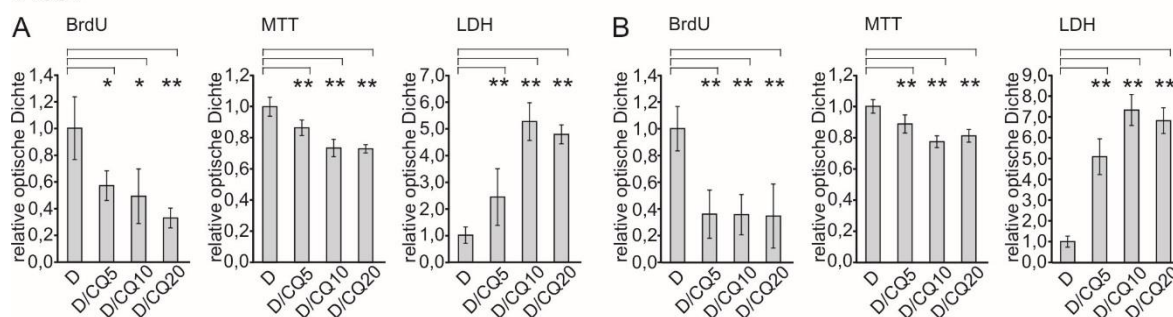


Abb. 36: Effekt steigender Chloroquinkonzentrationen auf die Proliferation (BrdU-ELISA), Vitalität (MTT-Test) und LDH-Freisetzung (Zytotoxizitätsassay) der SLGC-Linie T1564 in Anwesenheit von DMSO (Dimethylsulfoxid). - (A) Tag d4 nach Behandlung. (B) Tag d6 nach Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte von parallel untersuchten Proben einer Serie und die Standardabweichungen. Die relative optische Dichte der DMSO-Kontrolle wurde als 1 definiert und alle übrigen Werte relativ dazu dargestellt. Statistisch signifikante Abweichungen von der Kontrolle wurden mit * = $p < 0,05$ und ** = $p < 0,005$ markiert (T-Test). CQ5: 5 µg CQ/ml; CQ10: 10 µg CQ/ml; CQ20: 20 µg CQ/ml; D: DMSO.

Tab. 34: T-Test Analyse der Dosissteigerung von CQ in Anwesenheit von DMSO in der SLGC-Linie T1564

T1564		Tag d4			Tag d6		
		CQ5	CQ10	CQ20	CQ5	CQ10	CQ20
BrdU	CQ0	$p < 0,005$	$p < 0,05$	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$
	CQ5		n.s.	$p < 0,005$		n.s.	n.s.
	CQ10			n.s.			n.s.
MTT	CQ0	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$
	CQ5		$p < 0,005$	$p < 0,005$		$p < 0,005$	$p < 0,05$
	CQ10			n.s.			$p < 0,05$
LDH	CQ0	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$
	CQ5		$p < 0,005$	$p < 0,005$		$p < 0,005$	$p < 0,005$
	CQ10			n.s.			n.s.

BrdU: 5-Brom-2'-desoxyuridin; LDH: Laktatdehydrogenase; MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-iphenyltetrazoliumbromid; CQ5: 5 µg Chloroquin/ml; CQ10: 10 µg Chloroquin/ml; CQ20: 20 µg Chloroquin/ml; n.s.: nicht signifikant.

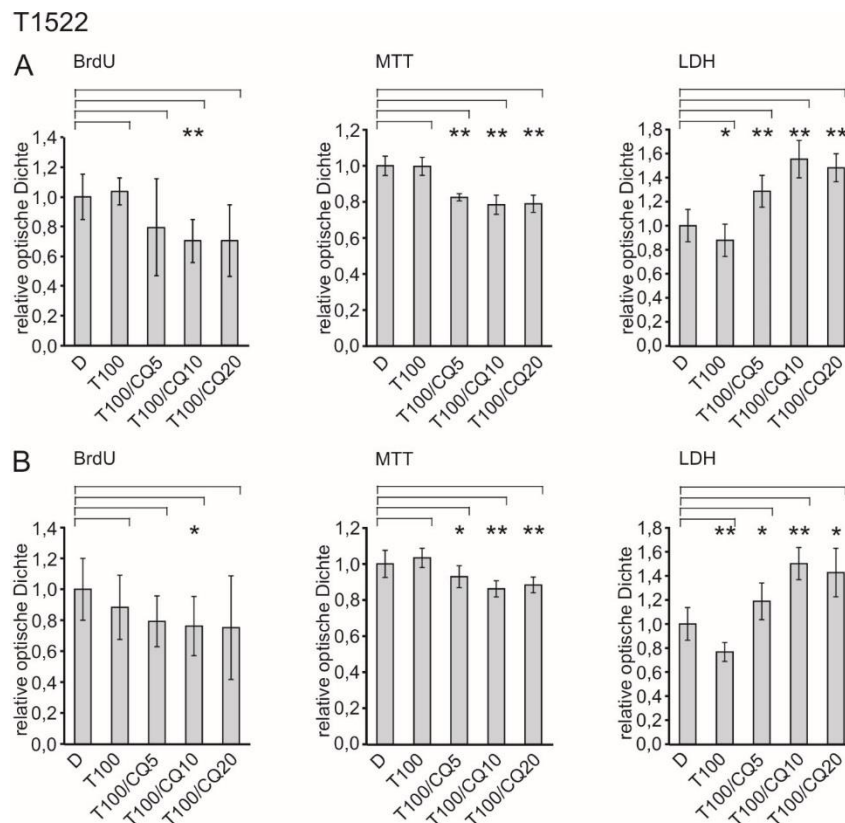


Abb. 37: Effekt steigender Chloroquinkonzentrationen auf die Proliferation (BrdU-ELISA), Vitalität (MTT-Test) und LDH-Freisetzung (Zytotoxizitätsassay) der SLGC-Linie T1522 in Anwesenheit von Temozolomid (TMZ). - (A) Tag d4 nach Behandlung. (B) Tag d6 nach Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte von parallel untersuchten Proben einer Serie und die Standardabweichungen. Die relative optische Dichte der DMSO-Kontrolle wurde als 1 definiert und alle übrigen Werte relativ dazu dargestellt. Statistisch signifikante Abweichungen von der Kontrolle wurden mit * = $p < 0,05$ und ** = $p < 0,005$ markiert (T-Test). CQ5: 5 µg CQ/ml; CQ10: 10 µg CQ/ml; CQ20: 20 µg CQ/ml; D: DMSO; T100: 100 µM TMZ.

Tab. 35: T-Test Analyse der Dosissteigerung von CQ in Anwesenheit von TMZ in der SLGC-Linie T1522

T1522		Tag d4			Tag d6		
		CQ5	CQ10	CQ20	CQ5	CQ10	CQ20
BrdU	CQ0	n.s.	$p < 0,005$	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	CQ5		n.s.	n.s.		n.s.	n.s.
	CQ10			n.s.			n.s.
MTT	CQ0	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$
	CQ5		n.s.	n.s.		$p < 0,05$	n.s.
	CQ10			n.s.			n.s.
LDH	CQ0	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$
	CQ5		$p < 0,05$	$p < 0,05$		$p < 0,05$	n.s.
	CQ10			n.s.			n.s.

BrdU: 5-Brom-2'-desoxyuridin; LDH: Laktatdehydrogenase; MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-iphenyltetrazoliumbromid; CQ5: 5 µg Chloroquin/ml; CQ10: 10 µg Chloroquin/ml; CQ20: 20 µg Chloroquin/ml; n.s.: nicht signifikant.

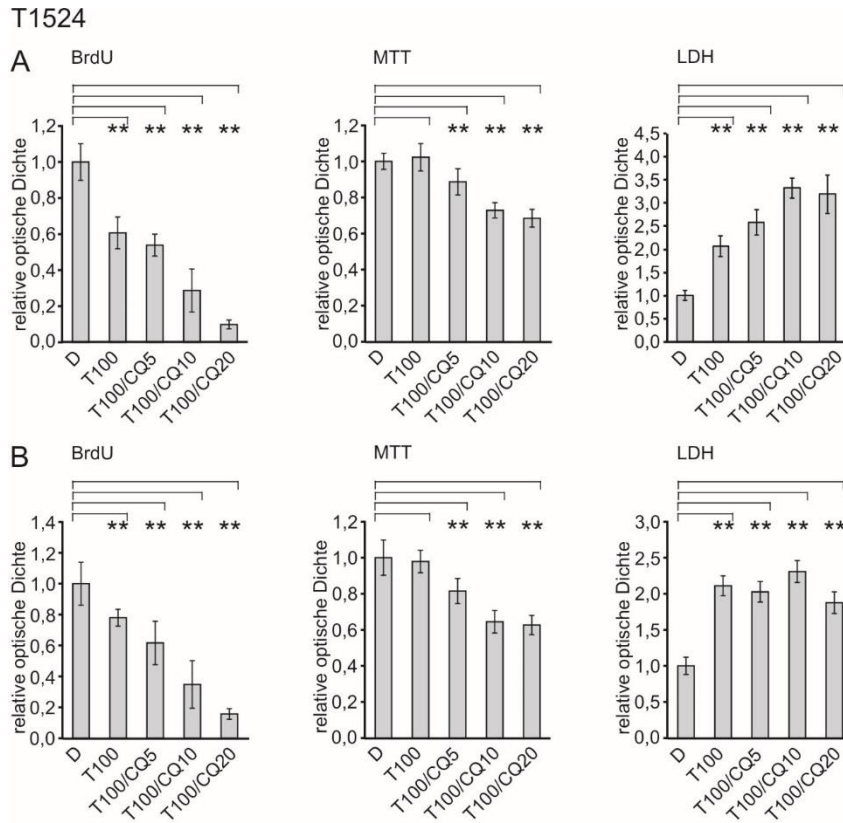


Abb. 38: Effekt steigender Chloroquinkonzentrationen auf die Proliferation (BrdU-ELISA), Vitalität (MTT-Test) und LDH-Freisetzung (Zytotoxizitätsassay) der SLGC-Linie T1524 in Anwesenheit von Temozolomid (TMZ). - (A) Tag d4 nach Behandlung. (B) Tag d6 nach Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte von parallel untersuchten Proben einer Serie und die Standardabweichungen. Die relative optische Dichte der DMSO-Kontrolle wurde als 1 definiert und alle übrigen Werte relativ dazu dargestellt. Statistisch signifikante Abweichungen von der Kontrolle wurden mit * = $p < 0,05$ und ** = $p < 0,005$ markiert (T-Test). CQ5: 5 μg CQ/ml; CQ10: 10 μg CQ/ml; CQ20: 20 μg CQ/ml; D: DMSO; T100: 100 μM TMZ.

Tab. 36: T-Test Analyse der Dosissteigerung von CQ in Anwesenheit von TMZ in der SLGC-Linie T1524

T1524		Tag d4			Tag d6		
		CQ5	CQ10	CQ20	CQ5	CQ10	CQ20
BrdU	CQ0	n.s.	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,05$	$p < 0,005$	$p < 0,005$
	CQ5		$p < 0,005$	$p < 0,005$		$p < 0,05$	$p < 0,005$
	CQ10			$p < 0,05$			n.s.
MTT	CQ0	$p < 0,05$	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$
	CQ5		$p < 0,005$	$p < 0,005$		$p < 0,005$	$p < 0,005$
	CQ10			$p < 0,05$			n.s.
LDH	CQ0	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$	n.s.	$p < 0,05$	$p < 0,05$
	CQ5		$p < 0,005$	$p < 0,05$		$p < 0,005$	n.s.
	CQ10			n.s.			$p < 0,005$

BrdU: 5-Brom-2'-desoxyuridin; LDH: Laktatdehydrogenase; MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-iphenyltetrazoliumbromid; CQ5: 5 μg Chloroquin/ml; CQ10: 10 μg Chloroquin/ml; CQ20: 20 μg Chloroquin/ml; n.s.: nicht signifikant.

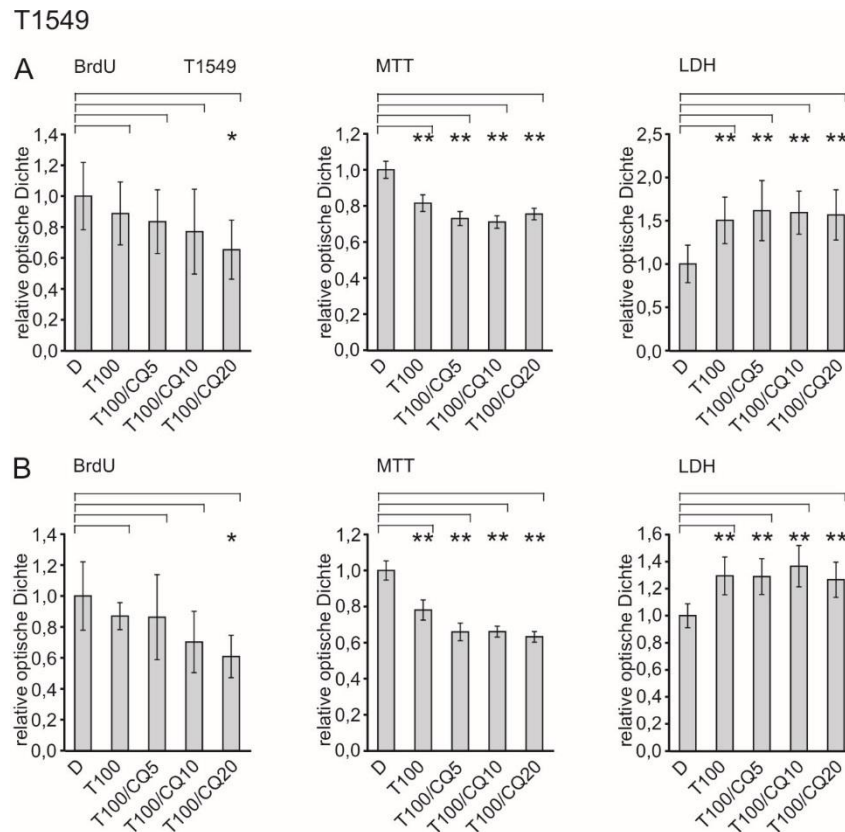


Abb. 39: Effekt steigender Chloroquinkonzentrationen auf die Proliferation (BrdU-ELISA), Vitalität (MTT-Test) und LDH-Freisetzung (Zytotoxizitätsassay) der SLGC-Linie T1549 in Anwesenheit von Temozolomid (TMZ). - (A) Tag d4 nach Behandlung. (B) Tag d6 nach Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte von parallel untersuchten Proben einer Serie und die Standardabweichungen. Die relative optische Dichte der DMSO-Kontrolle wurde als 1 definiert und alle übrigen Werte relativ dazu dargestellt. Statistisch signifikante Abweichungen von der Kontrolle wurden mit * = $p < 0,05$ und ** = $p < 0,005$ markiert (T-Test). CQ5: 5 µg CQ/ml; CQ10: 10 µg CQ/ml; CQ20: 20 µg CQ/ml; D: DMSO; T100: 100 µM TMZ.

Tab. 37: T-Test Analyse der Dosissteigerung von CQ in Anwesenheit von TMZ in der SLGC-Linie T1549

T1549		Tag d4			Tag d6		
		CQ5	CQ10	CQ20	CQ5	CQ10	CQ20
BrdU	CQ0	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	$p < 0,05$
	CQ5		n.s.	n.s.		n.s.	$p < 0,05$
	CQ10			n.s.			n.s.
MTT	CQ0	$p < 0,05$	$p < 0,005$	$p < 0,05$	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$
	CQ5		n.s.	n.s.		n.s.	n.s.
	CQ10			$p < 0,005$			n.s.
LDH	CQ0	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	CQ5		n.s.	n.s.		n.s.	n.s.
	CQ10			n.s.			n.s.

BrdU: 5-Brom-2'-desoxyuridin; LDH: Laktatdehydrogenase; MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-phenyltetrazoliumbromid; CQ5: 5 µg Chloroquin/ml; CQ10: 10 µg Chloroquin/ml; CQ20: 20 µg Chloroquin/ml; n.s.: nicht signifikant.

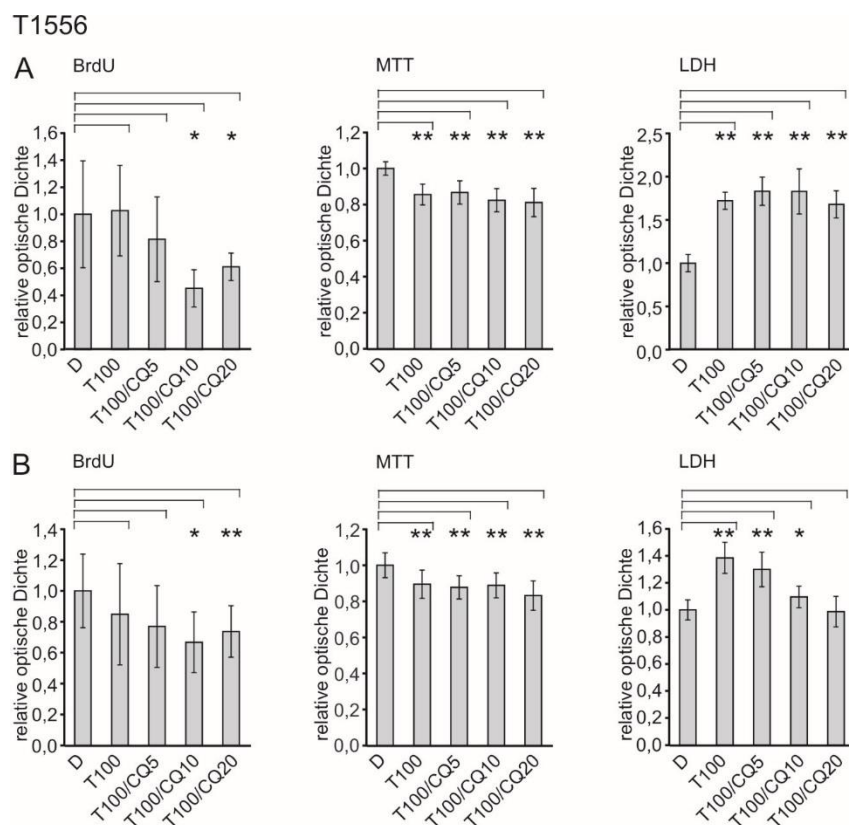


Abb. 40: Effekt steigender Chloroquinkonzentrationen auf die Proliferation (BrdU-ELISA), Vitalität (MTT-Test) und LDH-Freisetzung (Zytotoxizitätsassay) der SLGC-Linie T1556 in Anwesenheit von Temozolomid (TMZ). - (A) Tag d4 nach Behandlung. (B) Tag d6 nach Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte von parallel untersuchten Proben einer Serie und die Standardabweichungen. Die relative optische Dichte der DMSO-Kontrolle wurde als 1 definiert und alle übrigen Werte relativ dazu dargestellt. Statistisch signifikante Abweichungen von der Kontrolle wurden mit * = $p < 0,05$ und ** = $p < 0,005$ markiert (T-Test). CQ5: 5 µg CQ/ml; CQ10: 10 µg CQ/ml; CQ20: 20 µg CQ/ml; D: DMSO; T100: 100 µM TMZ.

Tab. 38: T-Test Analyse der Dosissteigerung von CQ in Anwesenheit von TMZ in der SLGC-Linie T1556

T1556		Tag d4			Tag d6		
		CQ5	CQ10	CQ20	CQ5	CQ10	CQ20
BrdU	CQ0	n.s.	$p < 0,05$	$p < 0,05$	n.s.	n.s.	n.s.
	CQ5		n.s.	n.s.		n.s.	n.s.
	CQ10			$p < 0,005$			n.s.
MTT	CQ0	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	$p < 0,005$
	CQ5		n.s.	$p < 0,05$		n.s.	$p < 0,05$
	CQ10			n.s.			$p < 0,05$
LDH	CQ0	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	$p < 0,005$	$p < 0,005$
	CQ5		n.s.	n.s.		$p < 0,05$	$p < 0,005$
	CQ10			n.s.			$p < 0,05$

BrdU: 5-Brom-2'-desoxyuridin; LDH: Laktatdehydrogenase; MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-iphenyltetrazoliumbromid; CQ5: 5 µg Chloroquin/ml; CQ10: 10 µg Chloroquin/ml; CQ20: 20 µg Chloroquin/ml; n.s.: nicht signifikant.

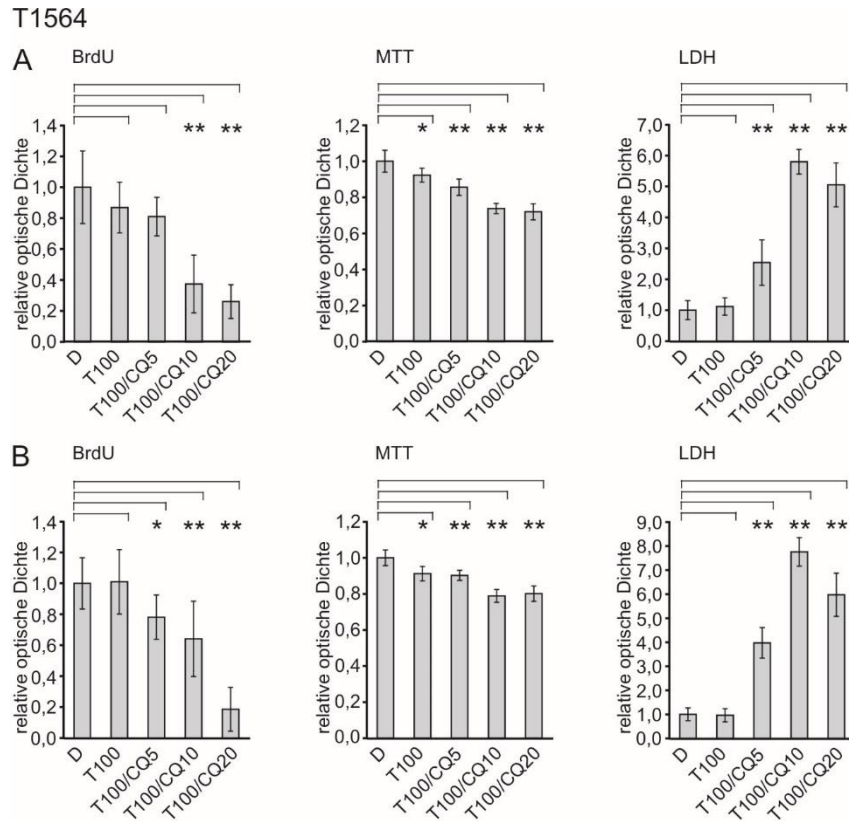


Abb. 41: Effekt steigender Chloroquinkonzentrationen auf die Proliferation (BrdU-ELISA), Vitalität (MTT-Test) und LDH-Freisetzung (Zytotoxizitätsassay) der SLGC-Linie T1564 in Anwesenheit von Temozolomid (TMZ). - (A) Tag d4 nach Behandlung. (B) Tag d6 nach Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte von parallel untersuchten Proben einer Serie und die Standardabweichungen. Die relative optische Dichte der DMSO-Kontrolle wurde als 1 definiert und alle übrigen Werte relativ dazu dargestellt. Statistisch signifikante Abweichungen von der Kontrolle wurden mit * = $p < 0,05$ und ** = $p < 0,005$ markiert (T-Test). CQ5: 5 µg CQ/ml; CQ10: 10 µg CQ/ml; CQ20: 20 µg CQ/ml; D: DMSO; T100: 100 µM TMZ.

Tab. 39: T-Test Analyse der Dosissteigerung von CQ in Anwesenheit von TMZ in der SLGC-Linie T1564

T1564		Tag d4			Tag d6		
		CQ5	CQ10	CQ20	CQ5	CQ10	CQ20
BrdU	CQ0	n.s.	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,005$
	CQ5		$p < 0,05$	$p < 0,005$		$p < 0,05$	$p < 0,005$
	CQ10			n.s.			$p < 0,005$
MTT	CQ0	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$	n.s.	$p < 0,005$	$p < 0,005$
	CQ5		$p < 0,005$	$p < 0,005$		$p < 0,005$	$p < 0,005$
	CQ10			n.s.			n.s.
LDH	CQ0	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$
	CQ5		$p < 0,005$	$p < 0,005$		$p < 0,005$	$p < 0,05$
	CQ10			$p < 0,05$			$p < 0,005$

BrdU: 5-Brom-2'-desoxyuridin; LDH: Laktatdehydrogenase; MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-iphenyltetrazoliumbromid; CQ5: 5 µg Chloroquin/ml; CQ10: 10 µg Chloroquin/ml; CQ20: 20 µg Chloroquin/ml; n.s.: nicht signifikant.

T1524

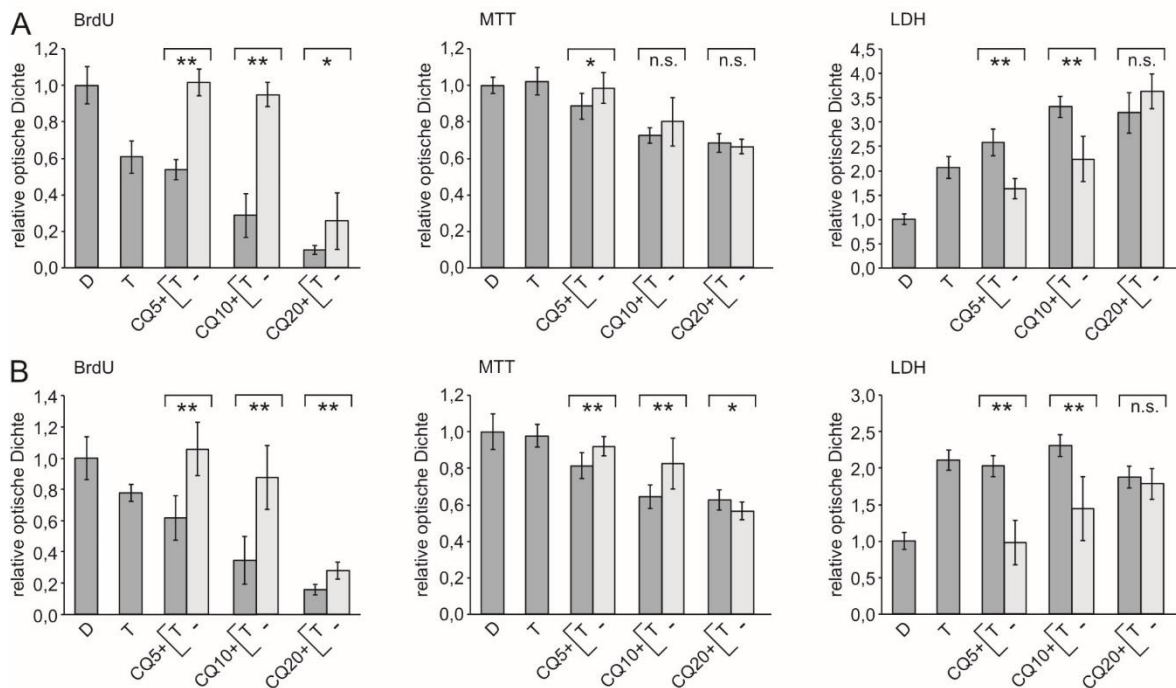


Abb. 42: Vergleich des Chloroquineffektes auf Proliferation (BrdU-ELISA), Vitalität (MTT-Test) und LDH-Freisetzung (Zytotoxizitätsassay) von SLGC-Linien in An- und Abwesenheit von Temozolomid (TMZ). - Graphische Darstellung am Beispiel der Zelllinie T1524. **(A)** Tag 4 nach Behandlung. **(B)** Tag 6 nach Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte behandelten Proben und die Standardabweichungen. Statistisch signifikante Abweichungen zwischen den CQ-behandelten Proben mit TMZ (CQ/T) und ohne TMZ (CQ/-) wurden mit * = $p < 0,05$ und ** = $p < 0,005$ markiert (T-Test). CQ5: 5 μg CQ/ml; CQ10: 10 μg CQ/ml; CQ20: 20 μg CQ/ml; D: DMSO; n.s.: nicht signifikant; T: TMZ.

Tab. 40: T-Test Analyse des CQ-Effektes in SLGC-Linien in An- und Abwesenheit von TMZ

TMZ +/-		Tag d4			Tag d6		
		CQ5	CQ10	CQ20	CQ5	CQ10	CQ20
T1522	BrdU	n.s.	n.s.	n.s.	$p < 0,05$	n.s.	n.s.
	MTT	n.s.	n.s.	n.s.	$p < 0,05$	n.s.	n.s.
	LDH	n.s.	$p < 0,05$	n.s.	$p < 0,005$	n.s.	n.s.
T1524	BrdU	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,05$	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$
	MTT	$p < 0,05$	n.s.	n.s.	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,05$
	LDH	$p < 0,005$	$p < 0,005$	n.s.	$p < 0,005$	$p < 0,005$	n.s.
T1549	BrdU	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	MTT	$p < 0,005$	$p < 0,005$	n.s.	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$
	LDH	$p < 0,05$	n.s.	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$	$p < 0,005$
T1556	BrdU	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	MTT	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	LDH	$p < 0,005$	$p < 0,05$	n.s.	$p < 0,005$	n.s.	n.s.
T1564	BrdU	$p < 0,005$	n.s.	n.s.	$p < 0,005$	$p < 0,05$	n.s.
	MTT	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	LDH	n.s.	n.s.	n.s.	$p < 0,05$	n.s.	$p < 0,05$

BrdU: 5-Brom-2'-desoxyuridin; LDH: Laktatdehydrogenase; MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-iphentyltetrazoliumbromid; CQ5: 5 μg Chloroquin/ml; CQ10: 10 μg Chloroquin/ml; CQ20: 20 μg Chloroquin/ml; n.s.: nicht signifikant.

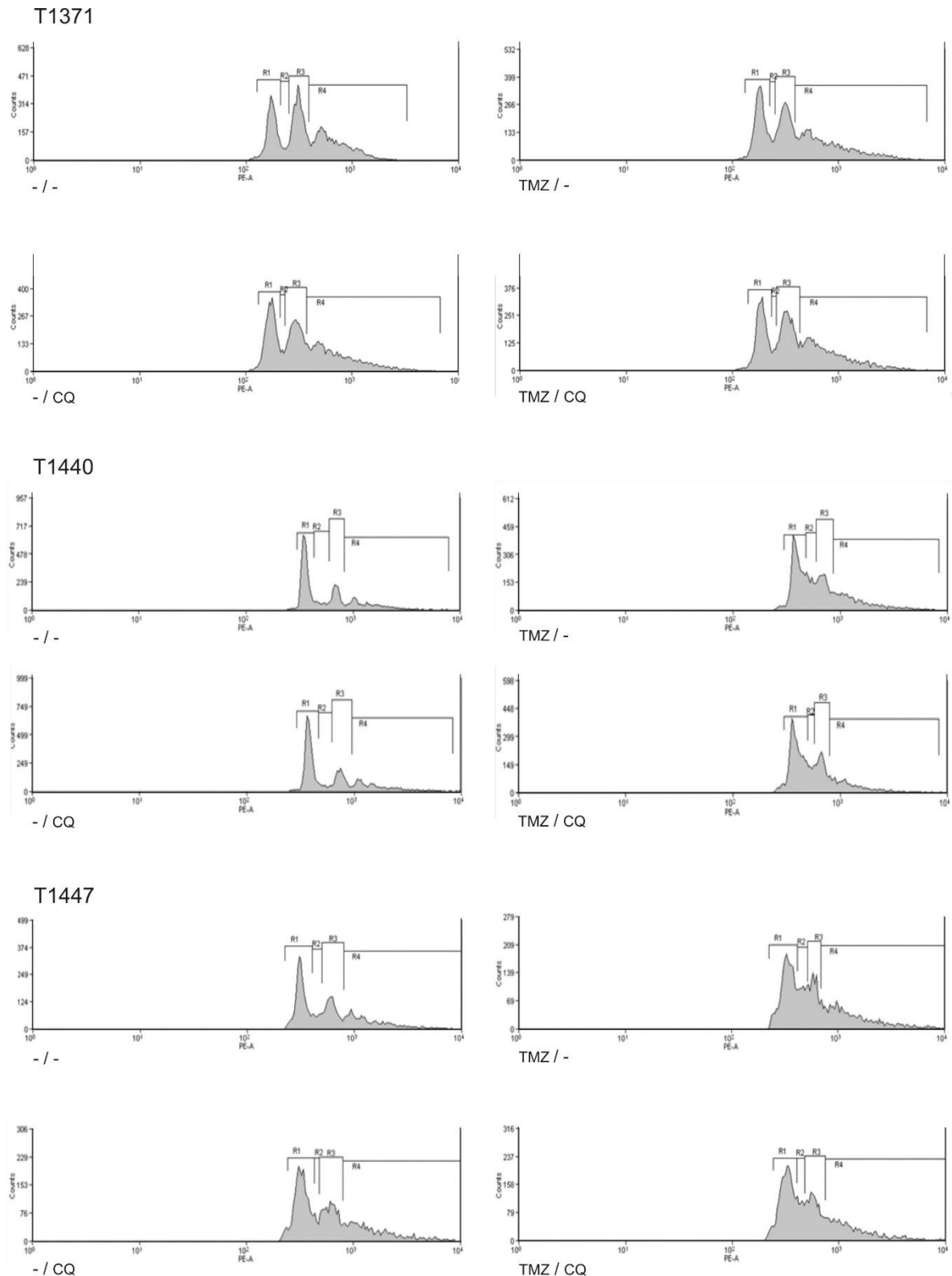


Abb. 43: Beispiele für Punktwolkendiagramme der Durchflusszytometrischen Analysen von SLGC-Linien. - Die Zellen wurden mit dem DNA-Interkalator Propidiumiodid (PI) markiert und durchflusszytometrisch aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte mit der Software Summit v4.3. Die Darstellung in Histogrammen zeigt eine M-förmige Konfiguration. Der erste Peak repräsentiert Zellen mit einem diploiden Chromosomensatz ($2n$) in der G0/G1-Phase des Zellzyklus. Zwischen dem ersten und zweiten Peak liegt die S-Phase mit Zellen mit einem Chromosomensatz von $2n/4n$. Der zweite Peak repräsentiert Zellen mit einem Chromosomensatz von $4n$ in der G2-Phase. Rechts davon sind polypleide/aneuploide Zellen mit einem Chromosomensatz $>4n$ dargestellt.

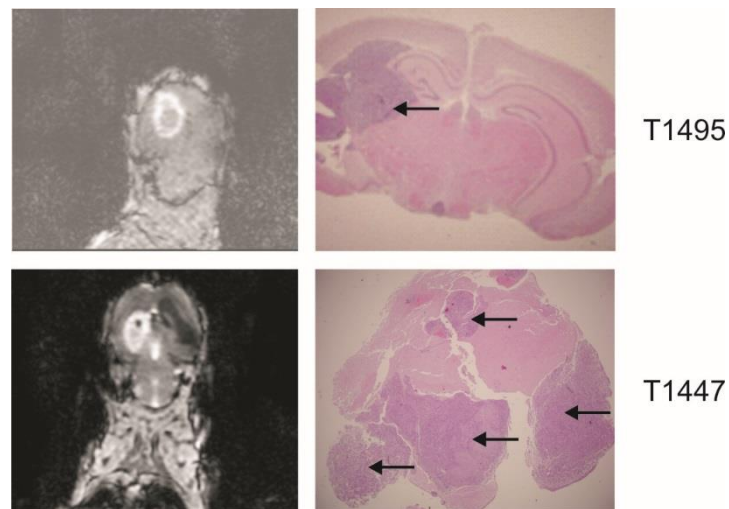


Abb. 44: Tumorigenität der SLGC-Linien T1447 und T1495. – Magnetresonanztomographische und histologische Darstellung von durch T1447 und T1495 generierten Tumoren in SCID-Mausgehirnen. T1447 und T1495 wurden für die Experimente mit TMZ und CQ ausgewählt. Die Pfeile zeigen auf Raumforderungen [Quelle: M. Loy, L. Bähr, C.Zechel].

Abbildung 44 zeigt SCID-Mausgehirne nach Inokulation der aggressiv wachsenden SLGC-Linien T1495 und T1447. Die MRT-Aufnahmen lassen unregelmäßig geformte Tumore der rechten Großhirnhemisphäre mit randständig starker Kontrastmittelaufnahme erkennen. Dieses ringförmige bis girlandenartige Enhancement stellt einen typischen MRT-Befund für das Glioblastom dar. Aussparungen sind durch zystische Anteile, Blutungen und Nekrosen bedingt. Auch die HE-Färbungen zeigen große solide Tumore, die das benachbarte Gehirnparenchym infiltrieren. Durch die aggressiven Tumormassen kam es zur Zerstörung von Gehirnparenchym, sodass im dargestellten Beispiel von T1447 keine physiologischen Gehirnstrukturen mehr erkennbar waren.

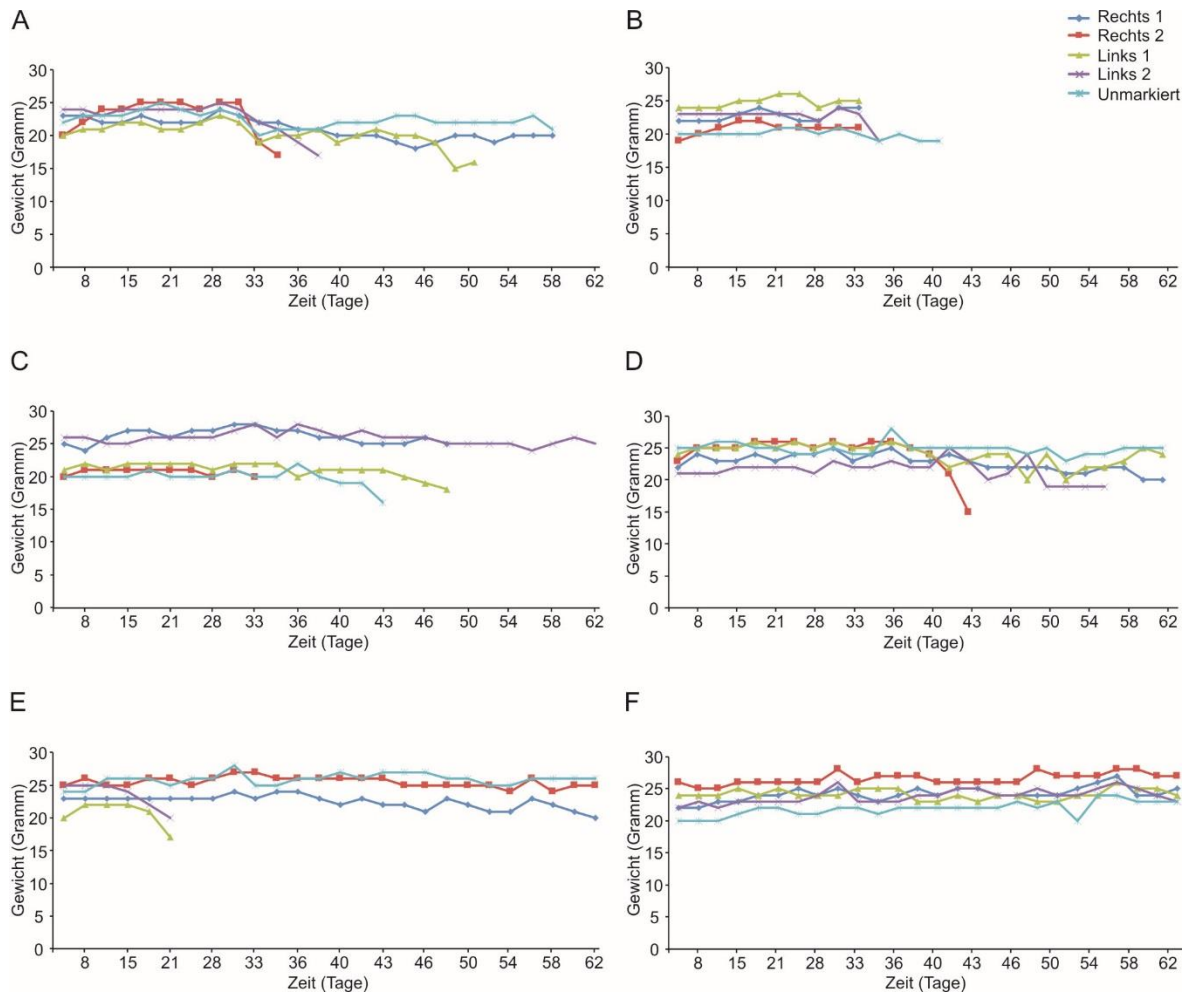


Abb. 45: Gewichtsentwicklung der Versuchstiere über den Behandlungszeitraum. - Die Versuchstiere wurden am Tag der Inokulation der SLGC-Zellen und im Folgenden alle 2 bis 3 Tage gewogen. Die Tiere wurden mittels Lochzange an den Ohren markiert. Jede graphische Darstellung zeigt mehrere Versuchstiere einer Serie, die mit 1 bzw. 2 Löchern am rechten (R1a-f, R2a-f) oder linken Ohr (L1a-f, L2a-f) oder nicht markiert waren. Es wurden maximal 4 Tiere pro Käfig gehalten.



Universität zu Lübeck

Eingang
9.9.08

Medizinische Fakultät - Der Vorsitzende der Ethikkommission

Dekanat der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160, D-23538 Lübeck

Frau
Dr. med. Zechel
Klinik für Neurochirurgie

Bearbeiter: Frau Erdmann
Telefon: (0451) 500- 4639
Fax: (0451) 500- 3026
email:
janine.erdmann@medizin.uni-luebeck.de

im Hause

Datum: 27.06.2008
Aktenzeichen: **08-070**
(immer angeben !)

nachrichtlich:
Herrn Prof. Tronnier
Direktor der Klinik für Neurochirurgie

Ihr Antrag an die Ethik-Kommission 20. Mai 2008 – Ihr Schreiben vom 20. Juni 2008
Antragsteller: Frau Dr. Zechel / Herr Prof. Tronnier
Titel: Zell- und molekularbiologische Untersuchungen an Hirntumoren und davon abgeleiteten Zellkulturen

Sehr geehrte Frau Dr. Zechel,

der Antrag wurde unter berufsethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und berufsrechtlichen Gesichtspunkten geprüft.

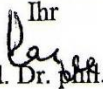
Die Kommission hat keine Bedenken mehr.

Bei Änderung des Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden. Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, muß die Kommission umgehend benachrichtigt werden.

Nach Abschluß des Projektes bitte ich um Übersendung eines knappen Schlussberichtes (unter Angabe unseres Aktenzeichens), aus dem der Erfolg/Misserfolg der Studie sowie Angaben darüber, ob die Studie abgebrochen oder geändert bzw. ob Regressansprüche geltend gemacht wurden, ersichtlich sind.

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Studie und der an der Studie teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß und besten Wünschen
für den weiteren Verlauf Ihrer Forschung bin ich

Ihr

Prof. Dr. med. Dr. H. Raspe
Vorsitzender

anwesende Kommissionsmitglieder:

Prof. Dr. Dr. H.-H. Raspe
(Sozialmedizin, Vorsitzender der EK)
 Prof. Dr. Schweiger
(Psychiatrie)
 Prof. Dr. Dendorfer
(Pharmakologie)
 Frau Prof. E. Stubbe
(Theologin)
 Prof. Dr. Borck
(Medizin- und Wissenschaftsgeschichte)

Frau H. Müller
(Pflege)
 Prof. Wessel
(Kinderchirurgie, Stellv. Vorsitzender der EK)
 Herr Dr. Fieber
(Richter am Landgericht Ahrensburg)
 Prof. Schwinger
(Humangenetik)

Herr Prof. Dr. Klein
(Medizinische Klinik I)
 Frau Prof. Dr. M. Schrader
(Plastische Chirurgie)
Herr Dr. Schultz
(Pädiatrie)
 Herr D. Stojan
(Präsident des Amtsgerichtes Lübeck)



In Form des Lebens
Universität zu Lübeck

Medizinische Fakultät

Ethik-Kommission

Vorsitzender:

Herr Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe

Stellv. Vorsitzende

Frau Prof. Dr. med. M. Schrader

Universität zu Lübeck

Ratzeburger Allee 160

23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Frau Janine Erdmann

Tel.: +49 451 500 4639

Fax: +49 451 500 3026

janine.erdmann@medizin.uni-luebeck.de

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Frau

PD Dr. C. Zechel

Klinik für Neurochirurgie

im Hause

Aktenzeichen: 08-070

Datum 18.03.2009

Zell- und molekularbiologische Untersuchungen an Hirntumoren und davon abgeleiteten Zellkulturen

Hier: Optimierte Aufklärung – Ihr Schreiben vom 12.03.2009

Sehr geehrte Frau Dr. Zechel,

die optimierte Aufklärung habe ich zustimmend zur Kenntnis genommen.

Es bedarf keiner weiteren Begutachtung durch die Kommission.

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Prüfung und der an der Prüfung teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß und besten Wünschen
für den weiteren Verlauf Ihrer Forschung bin ich

Ihr

Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe
Vorsitzender

Literaturverzeichnis

- Abukhdeir, A. M., und Park, B. H. (2009). p21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 1, 1–18.
- Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F. B., und Starke, K.: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. München, 11. Auflage, 2013.
- Amaravadi, R. K., Lippincott-Schwartz, J., Yin, X. M., Weiss, W. A., Takebe, N., Timmer, W., ... White, E. (2011). Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. *Clinical Cancer Research*, 17(4), 654–666.
- Amaravadi, R. K., und Thompson, C. B. (2007). The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. *Clinical Cancer Research*, 13(24), 7271–7279.
- Auffinger, B., Tobias, A. L., Han, Y., Lee, G., Guo, D., Dey, M., ... Ahmed, A. U. (2014). Conversion of differentiated cancer cells into cancer stem-like cells in a glioblastoma model after primary chemotherapy. *Cell Death and Differentiation*, 21(7), 1119–1131.
- Bach, F. (2011). Current status of a phase III trial of nimotuzumab (ti-EGF-R) in newly diagnosed glioblastoma. *Journal of Clinical Oncology*, 29(15), 2059-2059.
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R. E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A. B., ... Rich, J. N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, 444, 756–760.
- Bao, S., Wu, Q., Sathornsumetee, S., Hao, Y., Li, Z., Hjelmeland, A. B., ... Rich, J. N. (2006). Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer Research*, 66(16), 7843–7848.
- Becher, O. J., und Holland, E. C. (2006). Genetically engineered models have advantages over xenografts for preclinical studies. *Cancer Research*, 66(7), 3355–3358.
- Beier, D., Hau, P., Proescholdt, M., Lohmeier, A., Wischhusen, J., Oefner, P. J., ... Beier, C. P. (2007). CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Research*, 67(9), 4010–4015.
- Beier, D., Röhr, S., Pillai, D. R., Schwarz, S., Kunz-Schughart, L., Leukel, P., ... Beier, C. P. (2008). Temozolomide preferentially depletes cancer stem cells in glioblastoma. *Cancer Research*, 68(14), 5706–5715.

- Beier, D., Schulz, J. B., und Beier, C. P. (2011). Chemoresistance of glioblastoma cancer stem cells-- much more complex than expected. *Molecular Cancer*, *10*(1), 128.
- Bianco, R., Shin, I., Ritter, C. A., Yakes, F. M., Basso, A., Rosen, N., ... Arteaga, C. L. (2003). Loss of PTEN/MMAC1/TEP in EGF receptor-expressing tumor cells counteracts the antitumor action of EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene*, *22*, 2812–2822.
- Bjerkvig, R., Tønnesen, A., Laerum, O., und Backlund, E.-O. (1990). Multicellular tumor spheroids from human gliomas maintained in organ culture. *Journal of Neurosurgery*, *72*(3), 463–475.
- Blazek, E. R., Foutch, J. L., und Maki, G. (2007). Daoy medulloblastoma cells that express CD133 are radioresistant relative to CD133– cells, and the CD133+ sector is enlarged by hypoxia. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* *67*(1), 1-5.
- Bleau, A. M., Hambardzumyan, D., Ozawa, T., Fomchenko, E. I., Huse, J. T., Brennan, C. W., und Holland, E. C. (2009). PTEN/PI3K/Akt Pathway Regulates the Side Population Phenotype and ABCG2 Activity in Glioma Tumor Stem-like Cells. *Cell Stem Cell*, *4*(3), 226–235.
- Blough, M. D., Westgate, M. R., Beauchamp, D., Kelly, J. J., Stechishin, O., ... Cairncross, J. G. (2010). Sensitivity to temozolomide in brain tumor initiating cells. *Neuro-Oncology*, *9*, 1–5.
- Bocangel, D. B., Finkelstein, S., Schold, S. C., Bhakat, K. K., Mitra, S., und Kokkinakis, D. M. (2002). Multifaceted Resistance of Gliomas to Temozolomide. *Clinical Cancer Research*, *8*, 2725–2734.
- Boya, P., Gonzalez-Polo, R.-A., Poncet, D., Andreau, K., Vieira, H. LA, Roumier, T., ... Kroemer, G. (2003). Mitochondrial membrane permeabilization is a critical step of lysosome-initiated apoptosis induced by hydroxychloroquine. *Oncogene*, *22*(25), 3927–3936.
- Brat, D. J., und Van Meir, E. G. (2004). Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma. *Laboratory Investigation*; *84*(4), 397–405.
- Briceño, E., Calderon, A., und Sotelo, J. (2007). Institutional experience with chloroquine as an adjuvant to the therapy for glioblastoma multiforme. *Surgical Neurology*, *67*(4), 388–391.
- Briceno, E., Reyes, S., und Sotelo, J. (2003). Therapy of glioblastoma multiforme improved by the antimutagenic chloroquine. *Neurosurgical Focus*, *14*(2), 2–7.
- Cahill, D. P., Levine, K. K., Betensky, R. A., Codd, P. J., Romany, C. A., ... Louis, D. N. (2007). Loss of the mismatch repair protein MSH6 in human glioblastomas is associated with tumor progression during temozolomide treatment. *Clinical Cancer Research*, *13*(7), 2038–2045.

- Calabrese, C., Poppleton, H., Kocak, M., Hogg, T. L., Fuller, C., Hamner, B., ... Gilbertson, R. J. (2007). A Perivascular Niche for Brain Tumor Stem Cells. *Cancer Cell*, *11*(1), 69–82.
- Campisi, J., und d’Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *8*(9), 729–740.
- Cerami, E., Demir, E., Schultz, N., Taylor, B. S., und Sander, C. (2010). Automated network analysis identifies core pathways in glioblastoma. *PLoS One*, *5*(2), e8918.
- Chakravarti, A., Erkinen, M. G., Nestler, U., Stupp, R., Mehta, M., Aldape, K., ... Loeffler, J. S. (2006). Temozolomide-mediated radiation enhancement in glioblastoma: a report on underlying mechanisms. *Clinical Cancer Research*, *12*(15), 4738–4746.
- Chan, F. K.-M., Moriwaki, K., und José De Rosa, M. (2013). Detection of Necrosis by Release of Lactate Dehydrogenase (LDH) Assay. *Methods in Molecular Biology*, *979*, 8–12.
- Chang, S. M., Parney, I. F., Anderson, F. A., Asher, A. L., Bernstein, M., ... Laws, E. R. (2005). Patterns of Care for Adults With Newly Diagnosed Malignant Glioma. *JAMA*, *293*(5), 557–564.
- Charles, N., und Holland, E. C. (2010). The perivascular niche microenvironment in brain tumor progression. *Cell Cycle*, *9*(15), 3012–3021.
- Chatterjee, T., Mukhopadhyay, A., Khan, K. A., und Giri, A. K. (1998). Comparative mutagenic and genotoxic effects of three antimalarial drugs, chloroquine, primaquine and amodiaquine. *Mutagenesis*, *13*(6), 619–624.
- Chen, J., Li, Y., Yu, T.-S., McKay, R. M., Burns, D. K., Kernie, S. G., und Parada, L. F. (2012). A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature*, *488*, 522–526.
- Chen, J., McKay, R. M., und Parada, L. F. (2012). Malignant glioma: Lessons from genomics, mouse models, and stem cells. *Cell*, *149*(1), 36–47.
- Chen, R., Nishimura, M. C., Bumbaca, S. M., Kharbanda, S., Forrest, W. F., Kasman, I. M., ... Phillips, H. S. (2010). A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma. *Cancer Cell*, *17*(4), 362–375.
- Cheon, D.-J., und Orsulic, S. (2011). Mouse Models of Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, *6*(1), 95–119.
- Chinot, O. L., Wick, W., Mason, W., Henriksson, R., Saran, F., Nishikawa, R., ... Cloughesy, T. (2014). Bevacizumab plus Radiotherapy–Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, *370*(8), 709–722.

- Choschzick, I., Hirseland, E., Cramer, H., Schultz, S., Leppert, J., Tronnier, V., und Zechel, C. (2014). Responsiveness of stem-like human glioma cells to all-trans retinoic acid and requirement of retinoic acid receptor isotypes α , β and γ . *Neuroscience*, 279, 44–64.
- Chow, L. M. L., Endersby, R., Zhu, X., Rankin, S., Qu, C., Zhang, J., ... Baker, S. J. (2011). Cooperativity within and among Pten, p53, and Rb Pathways Induces High-Grade Astrocytoma in Adult Brain. *Cancer Cell*, 19(3), 305–316.
- Chua, C., Zaiden, N., Chong, K.-H., See, S.-J., Wong, M.-C., Ang, B.-T., und Tang, C. (2008). Characterization of a side population of astrocytoma cells in response to temozolomide. *Journal of Neurosurgery*, 109(5), 856–866.
- Coqueret, O. (2003). New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends in Cell Biology*, 13(2), 65–70.
- Culling, C. F. A. (1974). *Handbook of Histopathological and Histochemical Techniques, 3rd Edition*.
- Dalerba, P., Cho, R. W., und Clarke, M. F. (2007). Cancer stem cells: models and concepts. *Annual Review of Medicine*, 58, 267–284.
- Dean, M., Fojo, T., und Bates, S. (2005). Tumour stem cells and drug resistance. *Nature Reviews Cancer*, 5(4), 275–284.
- De Witt Hamer, P. C. (2010). Small molecule kinase inhibitors in glioblastoma: a systematic review of clinical studies. *Neuro-Oncology*, 12(3), 304–316.
- Decker, T., und Lohmann-Matthes, M.-L. (1988). A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *Journal of Immunological Methods*, 115(1), 61–69.
- Dirks, P. B. (2008). Brain Tumor Stem Cells: Bringing Order to the Chaos of Brain Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 26(17), 2916–2924.
- Dirks, P. B. (2010). Brain tumor stem cells: the cancer stem cell hypothesis writ large. *Molecular Oncology*, 4(5), 420–430.
- Donnenberg, V. S., und Donnenberg, A. D. (2005). Multiple Drug Resistance in Cancer Revisited: The Cancer Stem Cell Hypothesis. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 45(8), 872–877.
- Esteller, M., Garcia-Foncillas, J., Andion, E., Goodman, S. N., Hidalgo, O. F., Vanaclocha, V., ... Herman, J. G. (2000). Inactivation of the DNA-Repair Gene *MGMT* and the Clinical Response of Gliomas to Alkylating Agents. *New England Journal of Medicine*, 343(19), 1350–1354.

- Fan, C., Wang, W., Zhao, B., Zhang, S., und Miao, J. (2006). Chloroquine inhibits cell growth and induces cell death in A549 lung cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *14*(9), 3218–3222.
- Fan, X., Khaki, L., Zhu, T. S., Soules, M. E., Talsma, C. E., Gul, N., ... Eberhart, C. G. (2009). Notch Pathway Blockade Depletes CD133-Positive Glioblastoma Cells and Inhibits Growth of Tumor Neurospheres and Xenografts. *Stem Cells*, *28*(1), 5-16.
- Firat, E., Weyerbrock, A., Gaedicke, S., Grosu, A.-L., und Niedermann, G. (2012). Chloroquine or chloroquine-PI3K/Akt pathway inhibitor combinations strongly promote γ -irradiation-induced cell death in primary stem-like glioma cells. *PLoS One*, *7*(10), e47357.
- Frese, K. K., und Tuveson, D. a. (2007). Maximizing mouse cancer models. *Nature Reviews Cancer*, *7*(9), 654–658.
- Friedman, H. S., Kerby, T., und Calvert, H. (2000). Temozolomide and Treatment of Malignant Glioma. *Clinical Cancer Research*, *6*, 2585–2597.
- Fujiwara, K., Daido, S., Yamamoto, A., Kobayashi, R., Yokoyama, T., Aoki, H., ... Kondo, S. (2008). Pivotal role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 in apoptosis and autophagy. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(1), 388–97.
- Furnari, F. B., Fenton, T., Bachoo, R. M., Mukasa, A., Stommel, J. M., Stegh, A., ... Cavenee, W. K. (2007). Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes & Development*, *21*, 2683–2710.
- Galli, R., Binda, E., Orfanelli, U., Cipelletti, B., Gritti, A., Vitis, S. De, ... Vescovi, A. (2004). Isolation and Characterization of Tumorigenic, Stem-like Neural Precursors from Human Glioblastoma. *Cancer Research*, *64*, 7011–7021.
- Gangemi, R. M. R., Griffero, F., Marubbi, D., Perera, M., Capra, M. C., Malatesta, P., ... Corte, G. (2009). SOX2 Silencing in Glioblastoma Tumor-Initiating Cells Causes Stop of Proliferation and Loss of Tumorigenicity. *Stem Cells*, *27*(1), 40–48.
- Garcia, C., Dubois, L., Xavier, A., Geraldo, L., da Fonseca, A. C., Correia, A., ... Lima, F. R. (2014). The orthotopic xenotransplant of human glioblastoma successfully recapitulates glioblastoma-microenvironment interactions in a non-immunosuppressed mouse model. *BMC Cancer*, *14*(1), 923-934.
- Gary, D. S., und Mattson, M. P. (2002). PTEN Regulates Akt Kinase Activity in Hippocampal Neurons and Increases Their Sensitivity to Glutamate and Apoptosis. *NeuroMolecular Medicine*, *2*(3), 261–270.

- Geng, Y., Kohli, L., Klocke, B. J., und Roth, K. A. (2010). Chloroquine-induced autophagic vacuole accumulation and cell death in glioma cells is p53 independent. *Neuro-Oncology*, 12(5), 473–481.
- Gerson, S. L. (2002). Clinical relevance of MGMT in the treatment of cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 20(9), 2388–2399.
- Gerstner, E. R., und Batchelor, T. T. (2009). Clinical agents for the targeting of brain tumor vasculature. In *CNS Cancer: Models, Markers, Prognostic Factors, Targets and Therapeutic Approaches*, 731–747.
- Gilbertson, R. J., und Rich, J. N. (2007). Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche. *Nature Reviews. Cancer*, 7(10), 733–736.
- Givan, A. L. (2001). *Flow Cytometry: First Principles, 2nd Edition*.
- Godlewski, J., Nowicki, M. O., Bronisz, A., Williams, S., Otsuki, A., Nuovo, G., ... Lawler, S. (2008). Targeting of the Bmi-1 Oncogene/Stem Cell Renewal Factor by MicroRNA-128 Inhibits Glioma Proliferation and Self-Renewal. *Cancer Research*, 68(22), 9125-9130.
- Golden, E. B., Cho, H.-Y., Jahanian, A., Hofman, F. M., Louie, S. G., Schönthal, A. H., und Chen, T. C. (2014). Chloroquine enhances temozolomide cytotoxicity in malignant gliomas by blocking autophagy. *Neurosurgical Review*, 37(6), 1–11.
- Gratzner, H. (1982). Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science*, 218(4571), 474-475.
- Grossman, S. A., und Batarra, J. F. (2004). Current management of glioblastoma multiforme. *Seminars in Oncology*, 31(5), 635–644.
- Günther, H. S., Schmidt, N. O., Phillips, H. S., Kemming, D., Kharbanda, S., Soriano, R., ... Lamszus, K. (2008). Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria. *Oncogene*, 27(20), 2897–2909.
- Hadjipanayis, C. G., und Van Meir, E. G. (2009). Tumor initiating cells in malignant gliomas: biology and implications for therapy. *Journal of Molecular Medicine*, 87(4), 363–374.
- Han, S. J., Rolston, J. D., Molinaro, A. M., Clarke, J. L., Prados, M. D., Chang, S. M., ... Butowski, N. A. (2014). Phase II trial of 7 days on/7 days off temozolomide for recurrent high-grade glioma. *Neuro-Oncology*, 16(9), 1255–1262.
- Han, S. J., Yang, I., Ahn, B. J., Otero, J. J., Tihan, T., McDermott, M. W., ... Parsa, A. T. (2010). Clinical characteristics and outcomes for a modern series of primary gliosarcoma patients. *Cancer*,

116(5), 1358–1366.

Hanahan, D., und Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(3), 57–70.

Hanahan, D., und Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674.

Hardee, M. E., und Zagzag, D. (2012). Mechanisms of Glioma-Associated Neovascularization. *The American Journal of Pathology*, 181(4), 1126–1141.

Hegi, M. E., Diserens, A.-C., Gorlia, T., Hamou, M.-F., de Tribolet, N., Weller, M., ... Stupp, R. (2005). MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 352(10), 997–1003.

Hegi, M. E., Liu, L., Herman, J. G., Stupp, R., Wick, W., Weller, M., ... Gilbert, M. R. (2008). Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *Journal of Clinical Oncology*, 26(25), 4189–4199.

Hermisson, M., Klumpp, A., Wick, W., Wischhusen, J., Nagel, G., Roos, W., ... Weller, M. (2006). O6-methylguanine DNA methyltransferase and p53 status predict temozolomide sensitivity in human malignant glioma cells. *Journal of Neurochemistry*, 96(3), 766–776.

Hirose, Y., Berger, M. S., und Pieper, R. O. (2001). p53 Effects Both the Duration of G₂ / M Arrest and the Fate of Temozolomide-treated Human Glioblastoma Cells. *Cancer Research*, 61, 1957–1963.

Hjelmeland, A. B., Wu, Q., Heddleston, J. M., Choudhary, G. S., MacSwords, J., Lathia, J. D., ... Rich, J. N. (2011). Acidic stress promotes a glioma stem cell phenotype. *Cell Death and Differentiation*, 18(5), 829–840.

Hori, Y. S., Ryusuke, H., Akiyama, Y., Rio, S., Wanibuchi, M., Mikami, T., ... Kuno, A. (2015). Chloroquine potentiates temozolomide cytotoxicity by inhibiting mitochondrial autophagy in glioma cells. *Neuro Oncology*, 122, 11–20.

Hu, B., Guo, P., Fang, Q., Tao, H.-Q., Wang, D., Nagane, M., ... Cheng, S.-Y. (2003). Angiopoietin-2 induces human glioma invasion through the activation of matrix metalloproteinase-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(15), 8904–8909.

Hu, X., Pandolfi, P. P., Li, Y., Koutcher, J. A., Rosenblum, M., und Holland, E. C. (2005). mTOR Promotes Survival and Astrocytic Characteristics Induced by Pten/Akt Signaling in Glioblastoma 1. *Neoplasia*, 7, 356–368.

- Huse, J. T., und Holland, E. C. (2010). Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nature Reviews. Cancer*, 10(5), 319–331.
- Huszthy, P. C., Daphu, I., Niclou, S. P., Stieber, D., Nigro, J. M., Sakariassen, P. Ø., ... Bjerkvig, R. (2012). Pitfalls and Perspectives. *Neuro-Oncology*, 14(8), 979–993.
- Iacob, G., und Dinca, E. B. (2009). Current data and strategy in glioblastoma multiforme. *Journal of Medicine and Life*, 2(4), 386–393.
- Ignatova, T. N., Kukekov, V. G., Laywell, E. D., Suslov, O. N., Vrionis, F. D., und Steindler, D. (2002). Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia*, 39(3), 193–206.
- Ikushima, H., Todo, T., Ino, Y., Takahashi, M., Miyazawa, K., und Miyazono, K. (2009). Autocrine TGF- β Signaling Maintains Tumorigenicity of Glioma-Initiating Cells through Sry-Related HMG-Box Factors. *Cell Stem Cell*, 5(5), 504–514.
- Ishii, N., Maier, D., Merlo, A., Tada, M., Sawamura, Y., Diserens, A. C., und Van Meir, E. G. (1999). Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. *Brain Pathology*, 9(3), 469–479.
- Joerger, A. C., und Fersht, A. R. (2007). Structure–function–rescue: the diverse nature of common p53 cancer mutants. *Oncogene*, 26(15), 2226–2242.
- Johnson, J. D., und Young, B. (1996). Demographics of brain metastasis. *Neurosurgery Clinics of North America*, 7(3), 337–344.
- Jones, T. R., Bigner, S. H., Schold, S. C., Eng, L. F., und Bigner, D. D. (1981). Anaplastic human gliomas grown in athymic mice. Morphology and glial fibrillary acidic protein expression. *The American Journal of Pathology*, 105(3), 316–327.
- Kang, Y., Siegel, P. M., Shu, W., Drobnjak, M., Kakonen, S. M., Cordon-Cardo, C., ... Massagué, J. (2003). A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell*, 3(6), 537–549.
- Kanzawa, T., Germano, I. M., Komata, T., Ito, H., Kondo, Y., und Kondo, S. (2004). Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death and Differentiation*, 11(4), 448–457.
- Karow, T. und Lang, R.: Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Köln, 24. Auflage, 2016.
- Kim, E. L., Wüstenberg, R., Rübsam, A., Schmitz-Salue, C., Warnecke, G., Bücken, E. M., ... Giese, A.

- (2010). Chloroquine activates the p53 pathway and induces apoptosis in human glioma cells. *Neuro-Oncology*, 12(4), 389–400.
- Korkolopoulou, P., Kouzelis, K., Christodoulou, P., Papanikolaou, A., und Thomas-Tsagli, E. (1998). Expression of retinoblastoma gene product and p21 (WAF1/Cip 1) protein in gliomas: correlations with proliferation markers, p53 expression and survival. *Acta Neuropathologica*, 95(6), 617–624.
- Korzeniewski, C., und Callewaert, D. M. (1983). An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods*, 64(3), 313–320.
- Kozak, K. R., Mahadevan, A., und Moody, J. S. (2009). Adult gliosarcoma: epidemiology, natural history, and factors associated with outcome. *Neuro-Oncology*, 11, 183–191.
- Kroemer, G., El-Deiry, W., Golstein, P., Peter, M., Vaux, D., Vandenabeele, P., ... Melino, G. (2005). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death and Differentiation*, 12, 1463–1467.
- Kwiek, J. J., Haystead, T. A., und Rudolph, J. (2004). Kinetic Mechanism of Quinone Oxido reductase 2 and Its Inhibition by the Antimalarial Quinolines. *Biochemistry*, 43, 4538–4547.
- Langer, S. W., Schmidt, G., Sørensen, M., Sehested, M., und Jensen, P. B. (1999). Inhibitors of Topoisomerase II as pH-dependent Modulators of Etoposide-mediated Cytotoxicity. *Clinical Cancer Research*, 5(10), 2899–2907.
- Lapenna, S., und Giordano, A. (2009). Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(7), 547–566.
- Lathia, J. D., Gallagher, J., Heddleston, J. M., Wang, J., Eyler, C. E., MacSwords, J., ... Rich, J. N. (2010). Integrin Alpha 6 Regulates Glioblastoma Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 6(5), 421–432.
- Lathia, J. D., Heddleston, J. M., Venere, M., und Rich, J. N. (2011). Deadly teamwork: neural cancer stem cells and the tumor microenvironment. *Cell Stem Cell*, 8(5), 482–485.
- Lee, J., Kotliarova, S., Kotliarov, Y., Li, A., Su, Q., Donin, N. M., ... Fine, H. A. (2006). Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell*, 9(5), 391–403.
- Lee, S. W., Kim, H.-K., Lee, N.-H., Yi, H.-Y., Kim, H.-S., Hong, S. H., ... Joe, Y. A. (2015). The synergistic effect of combination temozolomide and chloroquine treatment is dependent on autophagy formation and p53 status in glioma cells. *Cancer Letters*, 360(2), 195–204.
- Levine, A. J. (1997). p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell*, 88(3), 323–331.

- Li, A., Walling, J., Kotliarov, Y., Center, A., Steed, M. E., Ahn, S. J., ... Fine, H. A. (2008). Genomic changes and gene expression profiles reveal that established glioma cell lines are poorly representative of primary human gliomas. *Molecular Cancer Research : MCR*, *6*(1), 21–30.
- Li, B., Yuan, M., Kim, I.-A., Chang, C.-M., Bernhard, E. J., und Shu, H.-K. G. (2004). Mutant epidermal growth factor receptor displays increased signaling through the phosphatidylinositol-3 kinase/AKT pathway and promotes radioresistance in cells of astrocytic origin. *Oncogene*, *23*(26), 4594–4602.
- Li, Z., Bao, S., Wu, Q., Wang, H., Eyler, C., Sathornsumetee, S., ... Rich, J. N. (2009). Hypoxia-Inducible Factors Regulate Tumorigenic Capacity of Glioma Stem Cells. *Cancer Cell*, *15*(6), 501–513.
- Liang, J., Shao, S. H., Xu, Z.-X., Hennessy, B., Ding, Z., Larrea, M., ... Mills, G. B. (2007). The energy sensing LKB1–AMPK pathway regulates p27kip1 phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nature Cell Biology*, *9*(2), 218–224.
- Liu, G., Yuan, X., Zeng, Z., Tunici, P., Ng, H., Abdulkadir, I. R., ... Yu, J. S. (2006). Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Molecular Cancer*, *5*, 67.
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvett, A., ... Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathologica*, *114*(2), 97–109.
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., ... Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*, *131*(6), 1–18.
- Mahesparan, R., Read, T.-A., Lund-Johansen, M., Skaftnesmo, K., Bjerkvig, R., und Engebraaten, O. (2003). Expression of extracellular matrix components in a highly infiltrative in vivo glioma model. *Acta Neuropathologica*, *105*(1), 49–57.
- Malanchi, I., Santamaria-Martínez, A., Susanto, E., Peng, H., Lehr, H.-A., Delaloye, J.-F., und Huelsken, J. (2011). Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature*, *481*(7379), 85–89.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., und Sambrook, J. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Matt, U., Selchow, P., Dal Molin, M., Strommer, S., Sharif, O., Schilcher, K., ... Nemeth, J. (2017). Chloroquine enhances the antimycobacterial activity of isoniazid and pyrazinamide by reversing

- inflammation-induced macrophage efflux. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 50(1), 55–62.
- Meco, D., Servidei, T., Lamorte, G., Binda, E., Arena, V., und Riccardi, R. (2014). Ependymoma stem cells are highly sensitive to temozolomide in vitro and in orthotopic models. *Neuro Oncology*, 16(8), 1067–1077.
- Mellinghoff, I. K., Wang, M. Y., Vivanco, I., Haas-Kogan, D. A., Zhu, S., Dia, E. Q., ... Mischel, P. S. (2005). Molecular Determinants of the Response of Glioblastomas to EGFR Kinase Inhibitors. *New England Journal of Medicine*, 353(19), 2012–2024.
- Mhaidat, N. M., Zhang, X. D., Allen, J., Avery-Kiejda, K. A., Scott, R. J., und Hersey, P. (2007). Temozolomide induces senescence but not apoptosis in human melanoma cells. *British Journal of Cancer*, 97(9), 1225–1233.
- Mo, W., und Zhang, J.-T. (2012). Human ABCG2: structure, function, and its role in multidrug resistance. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 3(1), 1–27.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1), 55–63.
- Muller, P. A. J. und Vousden, K. H. (2013). p53 mutations in cancer. *Nature Cell Biology*, 15(1), 2-8.
- Munshi, A. (2009). Chloroquine in glioblastoma - new horizons for an old drug. *Cancer*, 115(11), 2380–2383.
- Newlands, E. S., Stevens, M. F. G., Wedge, S. R., Wheelhouse, R. T., und Brock, C. (1997). Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. *Cancer Treatment Reviews*, 23(1), 35–61.
- Norden, A. D., und Wen, P. Y. (2006). Glioma therapy in adults. *The Neurologist*, 12(6), 279–292.
- Ogden, A. T., Waziri, A. E., Lochhead, R. A., Fusco, D., Lopez, K., ... Bruce, J. N. (2008). Identification of A2B5+CD133- tumor-initiating cells in adult human gliomas. *Neurosurgery*, 62(2), 505–515.
- Ohgaki, H., Dessen, P., Jourde, B., Horstmann, S., Nishikawa, T., Patre, P. Di, ... Kleihues, P. (2004). Genetic Pathways to Glioblastoma : A Population-Based Study. *Cancer Research*, 64, 6892–6899.
- Ohgaki, H., und Kleihues, P. (2007). Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *The American Journal of Pathology*, 170(5), 1445–1453.
- Ohgaki, H., und Kleihues, P. (2009). Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of

- gliomas. *Cancer Science*, 100(12), 2235–2241.
- Ohka, F., Natsume, A., und Wakabayashi, T. (2012). Current trends in targeted therapies for glioblastoma multiforme. *Neurology Research International*, 2012, Artikel Nr. 878425.
- Olsson, M., und Lindahl, T. (1980). Repair of alkylated DNA in *Escherichia coli*. Methyl group transfer from O6-methylguanine to a protein cysteine residue. *The Journal of Biological Chemistry*, 255(22), 10569–10571.
- Ostermann, S., Csajka, C., Buclin, T., Leyvraz, S., Lejeune, F., Decosterd, L. A., und Stupp, R. (2004). Plasma and Cerebrospinal Fluid Population Pharmacokinetics of Temozolomide in Malignant Glioma Patients. *Clinical Cancer Research*, 10, 3728–3736.
- Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Fulop, J., Liu, M., Blanda, R., Kromer, C., ... Barnholtz-Sloan, J. S. (2015). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro-Oncology*, 17, iv1-iv62.
- Ozawa, T., Riester, M., Cheng, Y. K., Huse, J., Squatrito, M., Helmy, K., ... Holland, E. C. (2014). Most human non-GCIMP glioblastoma subtypes evolve from a common proneural-like precursor glioma. *Cancer Cell*, 26(2), 288–300.
- Pari, L., und Murugavel, P. (2004). Protective effect of α -lipoic acid against chloroquine-induced hepatotoxicity in rats. *Journal of Applied Toxicology*, 24(1), 21–26.
- Park, B. C., Park, S. H., Paek, S.-H., Park, S.-Y., Kwak, M.-K., Choi, H. G., ... Kim, J.-A. (2008). Chloroquine-induced nitric oxide increase and cell death is dependent on cellular GSH depletion in A172 human glioblastoma cells. *Toxicology Letters*, 178(1), 52–60.
- Park, J., Choi, K., Jeong, E., Kwon, D., Benveniste, E. N., und Choi, C. (2004). Reactive oxygen species mediate chloroquine-induced expression of chemokines by human astroglial cells. *Glia*, 47(1), 9–20.
- Parsons, D. W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J. C., Leary, R. J., Angenendt, P., ... Kinzler, K. W. (2008). An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. *Science*, 321(5897), 1-15.
- Patel, M., McCully, C., Godwin, K., und Balis, F. M. (2003). Plasma and Cerebrospinal Fluid Pharmacokinetics of Intravenous Temozolomide in Non-human Primates. *Journal of Neuro-Oncology*, 61(3), 203–207.
- Persano, L., Rampazzo, E., Della Puppa, A., Pistollato, F., und Basso, G. (2011). The three-layer concentric model of glioblastoma: cancer stem cells, microenvironmental regulation, and

- therapeutic implications. *The Scientific World Journal*, *11*, 1829–1841.
- Phillips, H. S., Kharbanda, S., Chen, R., Forrest, W. F., Soriano, R. H., Wu, T. D., ... Aldape, K. (2006). Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell*, *9*(3), 157–173.
- Piccirillo, S. G. M., Combi, R., Cajola, L., Patrizi, A., Redaelli, S., Bentivegna, A., ... Vescovi, A. L. (2009). Distinct pools of cancer stem-like cells coexist within human glioblastomas and display different tumorigenicity and independent genomic evolution. *Oncogene*, *28*(15), 1807–1811.
- Preusser, M., Charles Janzer, R., Felsberg, J., Reifenberger, G., Hamou, M.-F., Diserens, A.-C., ... Hegi, M. (2008). Anti-O6-Methylguanine-Methyltransferase (MGMT) Immunohistochemistry in Glioblastoma Multiforme: Observer Variability and Lack of Association with Patient Survival Impede Its Use as Clinical Biomarker. *Brain Pathology*, *18*(4), 520–532.
- Raju, E. N. S., Kuchler, J., Behling, S., Sridhar, S., Hirseland, E., Tronnier, V., und Zechel, C. (2015). Maintenance of Stemlike Glioma Cells and Microglia in an Organotypic Glioma Slice Model. *Neurosurgery*, *77*(4), 629–643.
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., und Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, *414*, 105–111.
- Ricci-Vitiani, L., Pallini, R., Biffoni, M., Todaro, M., ... De Maria, R. (2010). Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature*, *468*, 824–828.
- Ricci, M. S., und Zong, W.-X. (2006). Chemotherapeutic Approaches for Targeting Cell Death Pathways. *Oncologist*, *11*(4), 342–357.
- Rich, J. N., Reardon, D. A., Peery, T., Dowell, J. M., Quinn, J. A., Penne, K. L., ... Friedman, H. S. (2004). Phase II trial of gefitinib in recurrent glioblastoma. *Journal of Clinical Oncology*, *22*(1), 133-142.
- Richmond, A., und Su, Y. (2008). Mouse xenograft models vs GEM models for human cancer therapeutics. *Disease Models & Mechanisms*, *1*(2–3), 78–82.
- Roos, W. P., Batista, L. F. Z., Naumann, S. C., Wick, W., Weller, M., Menck, C. F. M., und Kaina, B. (2007). Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine. *Oncogene*, *26*(2), 186–197.
- Sakariassen, P. O., Prestegarden, L., Wang, J., Skaftnesmo, K.-O., Mahesparan, R., Molthoff, C., ... Enger, P. O. (2006). Angiogenesis-independent tumor growth mediated by stem-like cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(44), 16466–16471.

- Salmaggi, A., Boiardi, A., Gelati, M., Russo, A., Calatozzolo, C., Ciusani, E., ... De Rossi, M. (2006). Glioblastoma-derived tumorspheres identify a population of tumor stem-like cells with angiogenic potential and enhanced multidrug resistance phenotype. *Glia*, *54*(8), 850–860.
- Sanai, N., Tramontin, A. D., Quiñones-Hinojosa, A., Barbaro, N. M., Gupta, N., Kunwar, S., ... Alvarez-Buylla, A. (2004). Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature*, *427*, 740–744.
- Sato, Y., Kurose, A., Ogawa, A., Ogasawara, K., Traganos, F., Darzynkiewicz, Z., und Sawai, T. (2009). Diversity of DNA damage response of astrocytes and glioblastoma cell lines with various p53 status to treatment with etoposide and temozolomide. *Cancer Biology & Therapy*, *8*(5), 452–457.
- Schonberg, D. L., Bao, S., und Rich, J. N. (2013). Genomics informs glioblastoma biology. *Nature Genetics*, *45*(10), 1105–1107.
- Schulte, A., Günther, H. S., Phillips, H. S., Kemming, D., Martens, T., Kharbanda, S., ... Lamszus, K. (2011). A distinct subset of glioma cell lines with stem cell-like properties reflects the transcriptional phenotype of glioblastomas and overexpresses CXCR4 as therapeutic target. *Glia*, *59*(4), 590–602.
- Shen, Q., Goderie, S. K., Jin, L., Karanth, N., Sun, Y., ... Temple, S. (2004). Endothelial Cells Stimulate Self-Renewal and Expand Neurogenesis of Neural Stem Cells. *Science*, *304*(5675), 1338-1340.
- Sherr, C. J., und McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*, *2*, 103–112.
- Sikder, H., Huso, D. L., Zhang, H., Wang, B., Ryu, B., Hwang, S. T., ... Alani, R. M. (2003). Disruption of Id1 reveals major differences in angiogenesis between transplanted and autochthonous tumors. *Cancer Cell*, *4*(4), 291–299.
- Silber, J., Lim, D. A., Petritsch, C., Persson, A. I., Maunakea, A. K., Yu, M., ... Hodgson, J. G. (2008). miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC Medicine*, *6*(14).
- Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J., und Dirks, P. B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Research*, *63*(18), 5821–8.
- Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J., Bayani, J., Hide, T., ... Dirks, P. B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, *432*(7015), 396–401.
- Sizoo, E. M., Braam, L., Postma, T. J., Pasman, H. R. W., Heimans, J. J., Klein, M., ... Taphoorn, M. J. B. (2010). Symptoms and problems in the end-of-life phase of high-grade glioma patients. *Neuro-Oncology*, *12*(11), 1162–1166.

- Soeda, A., Park, M., Lee, D., Mintz, A., Androutsellis-Theotokis, A., McKay, R. D., ... Park, D. M. (2009). Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1 α . *Oncogene*, 28(45), 3949–3959.
- Solomon, V. R., und Lee, H. (2009). Chloroquine and its analogs: a new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. *European Journal of Pharmacology*, 625(1–3), 220–233.
- Sotelo, J., Briceno, E., und Lopez-Gonzales, M. A. (2006). Adding Chloroquine to Conventional Treatment for Glioblastoma Multiforme: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Annals of Internal Medicine*, 144(5), 337–343.
- Soussi, T., Kato, S., Levy, P. P., und Ishioka, C. (2005). Reassessment of the TP53 mutation database in human disease by data mining with a library of TP53 missense mutations. *Human Mutation*, 25(1), 6–17.
- Steelman, L. S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Kempf, R. C., Long, J., Laidler, P., ... McCubrey, J. A. (2011). Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging*, 3(3), 192–222.
- Stojic, L., Brun, R., und Jiricny, J. (2004). Mismatch repair and DNA damage signalling. *DNA Repair*, 3(8), 1091–1101.
- Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J. B., ... Mirimanoff, R. O. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*, 352(10), 987–996.
- Stupp, R., und Weber, D. C. (2005). The role of radio- and chemotherapy in glioblastoma. *Onkologie*, 28(6–7), 315–317.
- Sundar, S. J., Hsieh, J. K., Manjila, S., Lathia, J. D., und Sloan, A. (2014). The role of cancer stem cells in glioblastoma. *Neurosurgical Focus*, 37,, 1–9.
- Tabatabai, G., Wick, W., Steinbach, J. P., Wick, A., Schnell, O., Hau, P., und Baehr, O. (2014). MGMT promoter methylation as a prognostic biomarker for benefit from dose-intensified temozolomide rechallenge in progressive glioblastoma: First results from the randomized phase II DIRECTOR trial. *Journal of Clinical Oncology*, 32(15), 2015-2015.
- Taphoorn, M. J. B., Sizoo, E. M., und Bottomley, A. (2010). Review on quality of life issues in patients with primary brain tumors. *The Oncologist*, 15(6), 618–626.
- The Cancer Genome Atlas (2008). Comprehensive genomic characterization defines human

- glioblastoma genes and core pathways. *Nature*, 455(7216), 1061–1068.
- Toler, S. M. (2004). Oxidative Stress Plays an Important Role in the Pathogenesis of Drug-Induced Retinopathy. *Experimental Biology and Medicine*, 229(7), 607-615.
- Toler, S. M., Noe, D., und Sharma, A. (2006). Selective enhancement of cellular oxidative stress by chloroquine: implications for the treatment of glioblastoma multiforme. *Neurosurgical Focus*, 21(6), 1–4.
- Trivedi, R. N., Almeida, K. H., Fornsglio, J. L., Schamus, S., und Sobol, R. W. (2005). The Role of Base Excision Repair in the Sensitivity and Resistance to Temozolomide-Mediated Cell Death Resistance to Temozolomide-Mediated Cell Death. *Cancer Research*, 65(14), 6394–6400.
- van den Bent, M. J., Brandes, A. A., Rampling, R., Kouwenhoven, M. C. M., Kros, J. M., Carpentier, A. F., ... Gorlia, T. (2009). Randomized Phase II Trial of Erlotinib Versus Temozolomide or Carmustine in Recurrent Glioblastoma: EORTC Brain Tumor Group Study 26034. *Journal of Clinical Oncology*, 27(8), 1268–1274.
- Van Meir, E. G., Hadjipanayis, C. G., Norden, A. D., Shu, H.-K., Wen, P. Y., und Olson, J. J. (2010). Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 60(3), 166–193.
- Verhaak, R. G. W., Hoadley, K. A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M. D., ... Hayes, D. N. (2010). Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*, 17(1), 98–110.
- Veselska, R., Kuglik, P., Cejpek, P., Svachova, H., Neradil, J., Loja, T., und Relichova, J. (2006). Nestin expression in the cell lines derived from glioblastoma multiforme. *BMC Cancer*, 6, 32.
- Visvader, J. E., und Lindeman, G. J. (2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nature Reviews. Cancer*, 8(10), 755–768.
- Waite, K. A., und Eng, C. (2002). Protean PTEN: Form and Function. *Am. J. Hum. Genet*, 70, 829–844.
- Wang, J., Miletic, H., Sakariassen, P. Ø., Huszthy, P. C., Jacobsen, H., Brekkå, N., ... Moutier, R. (2009). A reproducible brain tumour model established from human glioblastoma biopsies. *BMC Cancer*, 9(1), 465.
- Wang, J., Sakariassen, P. Ø., Tsinkalovsky, O., Immervoll, H., Bøe, S. O., Svendsen, A., ... Enger, P. Ø. (2008). CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *International Journal of Cancer*, 122(4), 761–768.

- Wang, Y., Peng, R.-Q., Li, D.-D., Ding, Y., Wu, X.-Q., Zeng, Y.-X., ... Zhang, X.-S. (2011). Chloroquine enhances the cytotoxicity of topotecan by inhibiting autophagy in lung cancer cells. *Chinese Journal of Cancer*, 30(10), 690–700.
- Wen, P. Y., und Kesari, S. (2008). Malignant Gliomas in Adults. *New England Journal of Medicine*, 359(5), 492–507.
- Weyermann, J., Lochmann, D., und Zimmer, A. (2005). A practical note on the use of cytotoxicity assays. *International Journal of Pharmaceutics*, 288, 369–376.
- Ye, H., Chen, M., Cao, F., Huang, H., Zhan, R., und Zheng, X. (2016). Chloroquine, an autophagy inhibitor, potentiates the radiosensitivity of glioma initiating cells by inhibiting autophagy and activating apoptosis. *BMC Neurology*, 16, 1–8.
- Ye, X. -Z., Xu, S. -I., Xin, Y. -H., Yu, S. -C., Ping, Y. -F., Chen, L., ... Bian, X. -W. (2012). Tumor-Associated Microglia/Macrophages Enhance the Invasion of Glioma Stem-like Cells via TGF-1 Signaling Pathway. *The Journal of Immunology*, 189(1), 444–453.
- Yip, S., Miao, J., Cahill, D. P., Iafrate, J., Aldape, K., Nutt, C. L., und Louis, D. N. (2009). MSH6 mutations arise in glioblastomas during temozolomide therapy and mediate temozolomide resistance. *Clinical Cancer Research*, 15(14), 4622–4629.
- Yuan, X., Curtin, J., Xiong, Y., Liu, G., Wachsmann-Hogiu, S., Farkas, D. L., ... Yu, J. S. (2004). Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene*, 23(58), 9392–9400.
- Zacharoulis, S., und Kieran, M. W. (2004). Treatment of low-grade gliomas in children: an update. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 4(6), 1005–1014.
- Zeh, H. J., und Lotze, M. T. (2005). Addicted to death: invasive cancer and the immune response to unscheduled cell death. *Journal of Immunotherapy*, 28(1), 1–9.
- Zhao, H., Cai, Y., Santi, S., Lafrenie, R., und Lee, H. (2005). Chloroquine-Mediated Radiosensitization is due to the Destabilization of the Lysosomal Membrane and Subsequent Induction of Cell Death by Necrosis. *Radiation Research*, 164(3), 250–257.
- Zhou, Q., McCracken, M. A., und Strobl, J. S. (2002). Control of Mammary Tumor Cell Growth in Vitro by Novel Cell Differentiation and Apoptosis Agents. *Breast Cancer Research and Treatment*, 75(2), 107–117.

Danksagungen

An erster Stelle gilt mein Dank Frau PD Dr. rer. nat. Christina Zechel für die Überlassung des interessanten Themas und für ihre engagierte wissenschaftliche und methodische Unterstützung meiner Dissertation. Jede Phase dieser Arbeit wurde von ihr intensiv, professionell und warmherzig betreut. Ich danke ihr für die Anregung zum wissenschaftlichen Denken und für ihre konstruktive Kritik während der Entwicklung dieser Arbeit, was maßgeblich zu deren Gelingen beitrug.

Frau Edith Pawlak sei herzlich für ihre Unterstützung bei der Arbeit in der Zellkultur und für ihre zahlreichen praktischen Ratschläge und Anmerkungen gedankt.

Großer Dank gebührt Frau Elsie die-Anane und Frau Susanne Behling für ihre Hilfe bei der Betreuung der Mäuse, dem Präparieren der Mausgehirne sowie dem Anfertigen der Mikrotomschnitte.

Auch danke ich Herrn Dr. Jan Leppert für die Einweisung in die praktische Handhabung der Mäuse.

Ich bedanke mich bei den Mitarbeitern der Gemeinsamen Tierhaltung (GTH) der Universität zu Lübeck und bei Dr. med. vet. Barthel Schmelting für die Betreuung der Tiere.

Mein Dank geht auch an die Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie von Prof. Dr. med. Detlef Zillikens für die Möglichkeit der Paraffineinbettung der Mausgehirne.

Prof. Dr. med. Manfred Westphal und Prof. Dr. med. Katrin aus der Neurochirurgie des UKE Hamburg sei für die freundliche Bereitstellung der Zelllinie U87MG gedankt.

Vielen Dank an Prof. Dr. med. Jörg Köhl für die Möglichkeit der Nutzung der CAAnaCore-Facility des Instituts für systemische Entzündungsforschung.

Ein ganz besonderer Dank geht an alle Mitarbeiter des Labors für Neuroonkologie und Molekularbiologie für die herzliche Aufnahme in ihr Team und die konstruktive und angenehme Zusammenarbeit. Dabei gilt mein Dank vor allem Frau Isabell Choschick und Frau Eileen Hirseland, die mich mit großer Unterstützung und Geduld in die Methoden einarbeiteten.

Weiterhin danke ich der Werner und „Klara Kreitz“ - Stiftung für die Unterstützung des Projektes zur Erforschung der Tumorstammzellen in Glioblastomen durch Fördermittel.

Zuletzt möchte ich besonders meinen lieben Eltern Simone und Jens Limpert und meiner Schwester Eva Kästner danken, die mich auf dem gesamten Weg bis zur Fertigstellung der Arbeit unterstützten. Sie waren stets meine Quelle der Stärkung und Motivation und hatten immer ein offenes Ohr für meine Gedanken und Sorgen, vor allem in schwereren Phasen.

Lebenslauf

Anna Maria Limpert,
geb. 20.10.1989, Halberstadt (Sachsen-Anhalt)



Schulische Ausbildung

1996–2000	Grundschule Miriam-Lundner, Halberstadt
2000–2002	Orientierungsstufe an der Walter-Gemm Sekundarstufe, Halberstadt
2002–2009	Gymnasium Martineum, Halberstadt; Abitur 2009
2006/2007	Auslandsschuljahr Chamblee Charter High School, Atlanta, USA

Akademische Laufbahn

2009–2016	Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
08/2011	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2015	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2015/2016	Praktisches Jahr
	1. Terial: Neurologie, Hôpital Gui de Chauliac, Montpellier, Frankreich
	2. Terial: Chirurgie, General Hospital Singapore, Singapur und UKSH Lübeck
	3. Terial: Innere Medizin, Segeberger Kliniken, Bad Segeberg
05/2016	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Berufserfahrung

seit 01/2017	Facharztausbildung Innere Medizin, Ev. Krankenhaus Alsterdorf, Hamburg
--------------	--

Abstracts

Limpert, A., Leppert, J., Kerstein, A., Alkanan, Y., Bähr, L., Tronnier, V., und Zechel, C. *Approach to sensitize glioma stem cells to standard chemotherapy*. - Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Stammzellforschung, Rostock, 6. Sept. 2013

Schneider, K., Limpert, A., Göppert, J., Hernandez, L., und Zechel, C. *Autophagie und Apoptose in humanen stammzellähnlichen Gliomzellen unter Behandlung mit Chloroquin und Temozolomid*. - 90. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, Leipzig, 20. - 23. Sept 2017

Hernandez Cabrera, L., Wever, N., Limpert, A., Kügler, A., Pawlak, E., Rades, D., Tronnier, V., und Zechel, C. *Combined Treatment of Glioma Stem Cells with Temozolomide, Chloroquine and Ionizing Beams: I. Effects on Stemness*. - Tagung der Gesellschaft für Signaltransduktion, Weimar, 08. – 10. Nov 2017

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich diese Dissertation selbstständig ohne Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Alle den benutzten Quellen wörtlich oder sinngemäß entnommenen Stellen sind als solche einzeln kenntlich gemacht.

Diese Arbeit ist bislang keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt worden und auch nicht veröffentlicht worden.

Ich bin mir bewusst, dass eine falsche Erklärung rechtliche Folgen haben wird.

Ort, Datum, Unterschrift