

Aus der Klinik für Neurochirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Die zielgerichtete Therapie des Glioblastoma multiforme
–
Präklinische experimentelle Studien zur Wirksamkeit
neuer Tyrosinkinase-Inhibitoren sowie epigenetisch
wirksamer Substanzen an unterschiedlichen
Glioblastom-Mausmodellen**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Tobias Kratzsch

aus Merseburg/Saale

Datum der Promotion: 11.12.2015

Meiner Familie

Zusammenfassung	III
Abstract	II
1 Einleitung	1
1.1 Die zielgerichtete Therapie von Tumorerkrankungen	1
1.2 Hirneigene Tumore - Gliome	2
1.3 Aktuelle Therapie des Glioblastoma multiforme	2
1.4 Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten therapeutischen Substanzen	3
1.4.1 Temozolomid	3
1.4.2 Bevacizumab	4
1.4.3 Sorafenib	4
1.4.4 Pazopanib	4
1.4.5 Axitinib	5
1.4.6 Everolimus	5
1.4.7 Valproat	5
1.4.8 5-Azacytidin	6
2 Material und Methoden	7
2.1 Material	7
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	7
2.1.2 Zelllinien, Medien und Zellkulturzusätze	7
2.1.3 Antikörper, Reagenzien und Primer	8
2.1.4 Narkotika und therapeutische Substanzen	9
2.1.5 Versuchstiere	9
2.1.6 Humane Tumorproben	9
2.2 Methoden	9
2.2.1 Zellkultur	9
2.2.2 Etablierung von Primärzell-Kulturen aus Patienten-Glioblastomen	10
2.2.3 Kryokonservierung von Zellen	10
2.2.4 Zellvitalitätsanalyse mit MTT-Assays	10
2.2.5 Visualisierung apoptotischer Glioblastomzellen	11
2.2.6 Migrationsanalyse humaner Glioblastomzellen mit <i>in vitro</i> -Scratch Assays	11
2.2.7 Haltung von Versuchstieren	11
2.2.8 Subkutane Tumorzell-Injektionen an Labormäusen	12
2.2.9 Intrazerebrale Tumorzell-Inokulationen an Labormäusen	12
2.2.10 Subkutane Xenotransplantation von Patienten-Glioblastomgewebe in Labormäuse	13
2.2.11 Therapeutische Tumorbehandlung der Versuchstiere	13
2.2.12 In dieser Arbeit verwendete Substanzen mit deren Dosierungen und Applikationswegen	14
2.2.13 Durchführung von Therapieversuchen	14
2.2.14 Analyse subkutaner Tumorgrößen	14
2.2.15 Analyse von intrazerebralen Tumorgrößen mittels Kresylviolett-färbung	15
2.2.16 Aufarbeitung von Tumorgewebe aus Versuchstieren	15
2.2.17 Immunhistochemische Färbeuntersuchungen	15
2.2.18 Fluorogene RT-TaqMan-PCR (Real Time-Polymerase-Kettenreaktion)	17
2.2.19 Statistische Auswertung	17
3 Ergebnisse	18
3.1 Etablierung und Charakterisierung humaner Glioblastom-Mausmodelle	18
3.1.1 Zelllinien-abgeleitete, subkutan wachsende Glioblastome	18
3.1.2 Zelllinien-abgeleitete, intrazerebral wachsende Glioblastome	18
3.1.3 Primärzellen-abgeleitete subkutane und intrazerebrale Glioblastome	19
3.1.4 Patienten-abgeleitete subkutane Glioblastom-Xenografts	20
3.2 Einfluss der Multi-Tyrosinkinase-Hemmer Sorafenib sowie Pazopanib auf die biologischen Eigenschaften humaner Glioblastome	21
3.2.1 Wachstum von subkutanen und intrazerebralen Glioblastom-Xenografts während einer Therapie mit Sorafenib sowie Pazopanib	21
3.2.2 Ki67-Proliferationsindex im Glioblastom-Gewebe nach einer Therapie mit Sorafenib sowie Pazopanib	23

3.2.3 Untersuchung der Tumor-Angiogenese im Gliomgewebe unter Sorafenib sowie Pazopanib	24
3.2.4 EGF-Rezeptorexpressionsanalyse nach einer Therapie mit Sorafenib sowie Pazopanib	26
3.3 Therapie humaner Glioblastome mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Axitinib.....	27
3.3.1 Axitinib verzögert temporär das Wachstum Bevacizumab-resistenter, Patienten-abgeleiteter Glioblastom-Xenografts	27
3.3.2 Axitinib senkt den Ki67-Proliferationsindex in Patienten-abgeleiteten Glioblastom-Xenografts.....	27
3.3.3 Axitinib reduziert die Anzahl von CD31-positiven Endothelzellen im Glioblastomgewebe	28
3.3.4 Axitinib reduziert die Anzahl von NG2-positiven Perizyten im Glioblastomgewebe.....	29
3.3.5 Verminderte Ummantelung CD31-positiver Endothelzellen mit NG2-positiven Perizyten durch Axitinib	29
3.3.6 Expressionsanalyse von VEGFR1, EGFR, PDGFR β und VEGF in mit Axitinib behandelten Glioblastom-Xenografts	30
3.3.7 Expressionsanalyse von HIF1 α in mit Axitinib behandelten Glioblastom-Xenografts.....	31
3.3.8 Verminderung der mRNA-Expression von VEGF-A und PLGF in Glioblastomen durch Axitinib	32
3.3.9 Axitinib führt zum apoptotischen Zelltod in Patienten-abgeleiteten Glioblastom-Xenografts...	32
3.4 Epigenetische Therapie humaner Glioblastome mit 5-Azacytidin sowie Valproinsäure.....	33
3.4.1 5-Azacytidin reduziert die Vitalität humaner Glioblastomzellen <i>in vitro</i>	33
3.4.2 5-Azacytidin führt zur Apoptose humaner Glioblastomzellen <i>in vitro</i>	33
3.4.3 5-Azacytidin vermindert die Migration humaner Glioblastomzellen <i>in vitro</i>	34
3.4.4 Auswirkungen einer Therapie mit 5-Azacytidin sowie Valproinsäure auf das Wachstum subkutaner und intrazerebraler Glioblastom-Xenografts	35
3.4.5 5-Azacytidin verringert den Ki67-Proliferationsindex in humanen Glioblastom-Xenografts	37
3.4.6 5-Azacytidin senkt die Anzahl von CD31-positiven Endothelzellen sowie PDGFR β -positiven Perizyten im Glioblastomgewebe	38
3.4.7 Expressionsanalyse von EGFR sowie pEGFR im Glioblastomgewebe unter einer Therapie mit 5-Azacytidin sowie Valproinsäure	40
3.5 Therapie humaner Glioblastome mit dem mTor-Inhibitor Everolimus	41
3.5.1 Everolimus reduziert die Vitalität humaner Glioblastomzellen <i>in vitro</i>	41
3.5.2 Everolimus führt zur Apoptose humaner Glioblastomzellen <i>in vitro</i>	41
3.5.3 Everolimus senkt die Migrationsrate humaner Glioblastomzellen <i>in vitro</i>	42
3.5.4 Everolimus verzögert das Wachstum subkutaner und intrazerebraler Glioblastome.....	43
3.5.5 Everolimus vermindert den Ki67-Proliferationsindex in humanen Glioblastom-Xenografts	45
3.5.6 Einfluss von Everolimus auf die Anzahl von CD31-positiven Endothelzellen sowie PDGFR β -positiven Perizyten im Glioblastomgewebe	46
3.5.7 Everolimus führt zur Apoptose humaner Glioblastomzellen <i>in vivo</i>	47
3.5.8 Everolimus führt zur Apoptose von Endothelzellen in humanen Glioblastomen <i>in vivo</i>	48
3.5.9 Everolimus vermindert die Phosphorylierung von mTOR sowie die Expression der nachgeschalteten S6-Kinase in humanen Glioblastomzellen <i>in vivo</i>	49
3.5.10 Expressionsanalyse von EGFR sowie pEGFR im Glioblastomgewebe unter einer Therapie mit Everolimus	50
4 Diskussion	51
4.1 Präklinische Glioblastom-Mausmodelle.....	51
4.2 Therapie humaner Glioblastome mit den Multikinase-Hemmern Sorafenib und Pazopanib.....	53
4.3 Therapie humaner Glioblastome mit dem Multikinase-Hemmer Axitinib.....	54
4.4 Epigenetische Therapie humaner Glioblastome mit 5-Azacytidin sowie Valproinsäure	56
4.5 Therapie humaner Glioblastome mit dem mTor-Inhibitor Everolimus	57
4.6 Der Ansatz einer zielgerichteten, personalisierten Glioblastom-Therapie	60
5 Literaturverzeichnis	63
6 Eidesstattliche Versicherung	68
7 Lebenslauf.....	69
8 Danksagung.....	70

Zusammenfassung

Die zielgerichtete Therapie von Tumorerkrankungen erhielt in den letzten Jahren immer mehr Einzug in die moderne Onkologie und zeigte dort bei vielen verschiedenen Tumorentitäten sehr gute Wirkungen. Auch für maligne Gliome stellt die *targeted therapy* eine neue Behandlungsmöglichkeit dar. In diesen experimentellen präklinischen Studien sollten unterschiedliche Glioblastom-Mausmodelle etabliert und neue zielgerichtete sowie epigenetisch wirksame Substanzen an diesen Modellen bezüglich ihrer Wirksamkeit getestet werden. Dabei kamen neben intrazerebral wachsenden Gliomen auch subkutane, Patienten-abgeleitete Xenografts zum Einsatz, die die Biologie maligner Gliome sehr gut widerspiegeln. Es wurde das während neurochirurgischer Operationen entnommene Gliomgewebe direkt in die Versuchstiere implantiert, anschließend auf weitere Labormäuse passagiert und dann die Therapieversuche durchgeführt.

In dieser Arbeit hatte der DNA-Methyltransferase-Hemmer 5-Azacytidin ein sehr gutes Wirkprofil, indem er im Gliomgewebe anti-angiogenetische Wirkungen zeigte und das Wachstum der Glioblastome verzögerte, im Gegensatz zu dem Histon-Deacetylase-Hemmer Valproinsäure, der in den Gliommodellen keine wachstumsmindernden Effekte zeigte. Die Multikinase-Hemmer Sorafenib und Pazopanib, die hauptsächlich durch eine Inhibierung der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktorrezeptoren die Tumor-Angiogenese hemmen sollen, hatten in den Glioblastom-Modellen keine deutlichen anti-angiogenen oder wachstumsverzögernden Wirkungen. Im Gegensatz dazu zeigten Glioblastom-Xenografts unter dem Multikinase-Inhibitor Axitinib eine temporäre Wachstumsverzögerung sowie eine deutliche Reduktion der Vaskularisierung. Der mTor-Inhibitor Everolimus verzögerte das Tumorwachstum in allen verwendeten Glioblastommodellen und hatte von allen getesteten Substanzen, neben Temozolomid und Bevacizumab, das vielversprechendste Wirkprofil.

Die zielgerichtete Therapie maligner Gliome ist in ihren Anfängen. Durchgeführte klinische Studien konnten bisher nicht die an sie gerichteten großen Erwartungen erfüllen, jedoch ermutigen deren Ergebnisse sowie die in dieser Arbeit gewonnenen Daten zu weiteren Analysen, um die zielgerichtete Gliom-Therapie den betroffenen Patienten als eine wirksame Therapieoption anbieten zu können.

Abstract

In recent years, the targeted therapy of tumor diseases obtained increasingly importance in modern oncology and showed very good treatment effects in many different tumor entities. For malignant gliomas, the targeted therapy represents a new treatment option. In these experimental preclinical studies, different glioblastoma mouse models should be established and new targeted as well as epigenetically active substances were tested on these glioblastoma models. In addition to intracerebrally growing gliomas, subcutaneous patient-derived xenografts, representing the biology of malignant gliomas, were used by implanting the glioma tissue directly after neurosurgical operations into mice. After increased growth, they were passaged to further mice and then therapy experiments were performed.

In this work, the DNA methyltransferase inhibitor 5-azacitidine showed anti-angiogenic effects in glioma tissue and delayed growth of glioblastomas, in contrast to the histone deacetylase inhibitor valproic acid, which did not show growth-reducing effects in the glioma models. The multi-kinase inhibitors sorafenib and pazopanib, which should mainly inhibit tumor angiogenesis by blockade of vascular endothelial growth factor receptors, showed no significant anti-angiogenic effects and did not delay growth of glioblastoma xenografts. In contrast, glioblastoma xenografts showed a temporary growth delay as well as a significant reduction of vascularization after treatment with the multi-kinase inhibitor axitinib. The mTOR inhibitor everolimus delayed tumor growth in all glioblastoma models, and among all substances used, everolimus had the most promising activity profile, comparable to temozolomide and bevacizumab.

The targeted therapy of malignant gliomas is in its infancy, and clinical studies could not fulfill the high expectations so far. Nevertheless, their results as well as data obtained in this study encourage to carry out further experiments in order to make the targeted glioma therapy an effective treatment option for patients with this devastating disease.

1 Einleitung

1.1 Die zielgerichtete Therapie von Tumorerkrankungen

Die zielgerichtete Tumorthherapie (*targeted therapy*) stellt eine wichtige Säule in der modernen Onkologie dar. Sie umfasst neben extrazellulär wirksamen monoklonalen Antikörpern sogenannte kleine Moleküle (*small molecules*), die typischerweise intrazelluläre Tyrosinkinasen blockieren¹. Die zielgerichtete Tumorthherapie ist fester Bestandteil in der Behandlung vieler hämatologischer Tumorerkrankungen (z.B. Imatinib bei chronisch myeloischer Leukämie mit Philadelphia-Chromosom²) als auch in der Therapie solider Tumorerkrankungen (z.B. Trastuzumab gegen Her2/neu³ und Tamoxifen gegen Hormonrezeptoren⁴ beim Mammakarzinom). Während die Wirkung konventioneller Chemotherapeutika auf der Zytotoxizität gegenüber sich schnell teilenden Zellen im gesamten Organismus, also im Tumor- sowie im physiologischen Gewebe, beruht, sind die Angriffspunkte der zielgerichteten Therapie bestimmte Moleküle, die selektiv auf den Tumorzellen exprimiert oder überexprimiert werden oder mutiert sind, und die für die Tumorprogression eine wichtige Rolle spielen. Damit hat man die Möglichkeit, Tumore pharmakologisch selektiv durch Neutralisierung von Rezeptorliganden (z.B. Bevacizumab gegen VEGF⁵), durch Blockade von Ligand-Rezeptor-Interaktionen, durch Blockade des Rezeptor-Signalings sowie Blockade intrazellulärer Signalmoleküle zu therapieren¹. Die zielgerichtete Tumorthherapie zeigt eine bessere Verträglichkeit mit einem günstigeren Nebenwirkungsspektrum gegenüber den typischen allgemeinen Nebenwirkungen der konventionellen Chemotherapie wie Haarausfall, Auswirkungen auf den Gastrointestinaltrakt und das Knochenmark.

Mit der *targeted therapy* wurde die Behandlung von hämatologischen Tumorerkrankungen revolutioniert (z.B. der CD20-Antikörper Rituximab⁶). Bei diesen Krankheitsbildern handelt es sich oft um monoklonale Zellpopulationen, die durch bestimmte Antigen-Expressionsmuster auf den Zelloberflächen charakterisiert sind (CD, *cluster of differentiation*) und damit ideale Angriffspunkte der zielgerichteten Therapie darstellen. Solide Tumoren jedoch, wie das Glioblastoma multiforme, stellen sich weitaus inhomogener dar, sind pharmakologisch schwerer zu erreichen und unterschiedlichste Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Zelltypen und Geweben verleihen diesen Erkrankungen eine große Variabilität und Heterogenität. Für die zielgerichtete Therapie solcher Tumore ist es notwendig, bestimmte *targets* unter Berücksichtigung der spezifischen Tumorbiologie zu identifizieren.

1.2 Hirneigene Tumore - Gliome

Gliome sind hirneigene Tumore neuroepithelialen Ursprungs und werden entsprechend der Einteilung der WHO nach histopathologischen Eigenschaften in vier Grade untergliedert⁷. Während WHO Grad I-Tumore, beispielsweise das pilozytische Astrozytom, als biologisch gutartig gelten und vom umgebenden Gewebe deutlich abgrenzbar und chirurgisch heilbar sind, wachsen niedrig-gradige (WHO Grad II) und höher-gradige Gliome (WHO Grad III und IV) diffus in das angrenzende Hirngewebe und rezidivieren immer^{8, 9}. Häufige Vertreter der WHO Grad II–Gliome sind diffuse Astrozytome, Oligodendrogliome und Oligoastrozytome, welche in ihrem natürlichen Verlauf stets in höhere WHO Grade übergehen¹⁰. Das Glioblastoma multiforme (WHO Grad IV) ist im Erwachsenenalter die am häufigsten vorkommende Entität der hirneigenen Tumore¹¹. Hierbei unterscheidet man zwischen primären Glioblastomen, welche *de novo* entstehen, und sekundären Glioblastomen, welche aus niedrig-gradigen Vorläuferläsionen hervorgehen¹². Durch die voranschreitende molekulargenetische Charakterisierung der diffusen hirneigenen Gliome erfolgt deren Einteilung immer weiter in Subgruppen mit Unterschieden bezüglich der Tumorbilogie als auch des Therapieansprechens, wobei molekulare Marker wie beispielsweise der Methylierungsstatus der Methylguanin-Methyltransferase (MGMT)¹³, die Deletion von 1p/19q¹⁴ oder die Isocitrat-Dehydrogenase¹⁵ eine Rolle spielen. Weiterhin wird angenommen, dass Grad II- und III- Gliome eher keine Vorläuferläsionen des Glioblastoma multiforme WHO Grad IV sind, sondern dass es sich dabei um unterschiedliche Gliom-Entitäten handelt¹⁶, was anhand von molekulargenetischen Untersuchungen herausgefunden werden konnte¹⁷.

Bei den malignen Gliomen handelt es sich nicht um eine scharf abgegrenzte Tumormasse, sondern um eine Tumorerkrankung, welche durch die Invasion einzelner Gliomzellen weit in das umgebende, gesunde Hirngewebe charakterisiert ist¹⁸. Eine neurochirurgische Tumorentfernung ist stets eine R1-Resektion mit im gesunden Hirngewebe verbliebenen Gliom-Restzellen, die man nicht reseziieren kann und ein Gliom-Rezidiv ist stets der klinische Verlauf der betroffenen Patienten.

1.3 Aktuelle Therapie des Glioblastoma multiforme

Die malignen Gliome WHO Grad II-IV entgehen aufgrund ihres diffusen infiltrativen Wachstums einer kurativen neurochirurgischen Tumorentfernung¹⁹. Die aktuelle

Standardtherapie des Glioblastoma multiforme umfasst die größtmögliche makroskopische neurochirurgische Tumorentfernung, dabei kann die intraoperative Visualisierung des Tumorgewebes mit 5-Aminolävulinsäure hilfreich sein²⁰. Darüber hinaus stellen die fraktionierte Radiotherapie neben der Chemotherapie mit Temozolomid Grundsäulen der validierten Behandlung von Glioblastomen dar²¹. Eine antiangiogene Behandlung mit dem monoklonalen Antikörper Bevacizumab erhielt ebenfalls Einzug in die Therapie^{22, 23}, jedoch ließ sich dadurch keine Verlängerung des Gesamtüberlebens feststellen, die progressionsfreie Zeit wurde jedoch verlängert und eine Verbesserung der Lebensqualität der Patienten wird diskutiert^{24, 25}. Ein Grund dafür könnte der Rückgang des Tumorödems unter Bevacizumab sein, jedoch beobachtete man außerdem ein vermehrt invasives Wachstumsmuster der Gliome unter Bevacizumab²⁶.

Diese und andere zielgerichtete Therapien basieren auf der selektiven Blockierung bestimmter Proteine oder Signalmoleküle durch den Einsatz von Antikörpern oder Kinase-Inhibitoren²⁷. Dennoch, trotz zahlreicher Fortschritte und Verbesserungen in der neurochirurgischen und medikamentösen Behandlung von Glioblastomen, bleibt diese Erkrankung unheilbar, mit einer durchschnittlichen Überlebenszeit der Patienten von weniger als zwei Jahren²¹.

1.4 Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten therapeutischen Substanzen

Die in diesem Projekt verwendeten und auf ihre Wirksamkeit an den Tumormodellen untersuchten Substanzen Temozolomid, Bevacizumab, Sorafenib, Pazopanib, Axitinib, Everolimus, Valproat und 5-Azacytidin werden im Folgenden näher beschrieben.

1.4.1 Temozolomid

Temozolomid (Temodal[®]) ist eine zytostatische Substanz, die durch DNA-Methylierung einen Zellzyklus-Arrest mit konsekutiver Apoptose von Tumorzellen induzieren kann²⁸. Unter allen bei Glioblastom-Patienten bisher in Studien untersuchten Chemotherapeutika wies Temozolomid als einzige Substanz eine signifikante Verlängerung des Gesamtüberlebens auf, wobei die Behandlung von Glioblastom-Patienten mit Temozolomid und gleichzeitiger postoperativer Strahlentherapie das mediane Überleben im Vergleich zur alleinigen Strahlentherapie (14,6 gegenüber 12,1 Monate) und die 2-Jahres-Überlebensrate (26,5% gegenüber 10,4%) signifikant verlängerte²¹. Bei Patienten mit Glioblastomen, die eine Methylierung des MGMT-

Promotors aufweisen, ist die Wahrscheinlichkeit, von Temozolomid zu profitieren, signifikant erhöht²⁹. Temozolomid wurde in allen durchgeführten Tierversuchen in dieser experimentellen Studie als Standardtherapie sowie Positivkontrolle betrachtet.

1.4.2 Bevacizumab

Bevacizumab (Avastin®) ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper, der gegen den zirkulierenden vascular endothelial growth factor (VEGF) gerichtet ist⁵. Die Substanz wird zur antiangiogenetischen Tumorthherapie eingesetzt, indem es an alle humanen Isoformen von VEGF-A, jedoch an keine anderen Isoformen der humanen VEGF-Genfamilie wie VEGF-B oder -C, bindet und es damit unwirksam macht^{5, 30}. Glioblastom-Patienten können mit Bevacizumab behandelt werden und es zeigten sich in klinischen Studien ein signifikanter transients Rückgang des Tumorödems sowie eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens, jedoch keine Verlängerung des Gesamtüberlebens^{22, 31} sowie ein vermehrtes diffuses Gliomwachstum³². Bevacizumab wurde in den Tierversuchen dieser Studie als die antiangiogene Standardtherapie angesehen.

1.4.3 Sorafenib

Sorafenib (Nexavar®) ist ein Multikinase-Inhibitor, der durch ein relativ breites Wirkspektrum die Tyrosin-Kinasen vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR1), VEGFR2, VEGFR3, platelet derived growth factor receptor β (PDGFR β) sowie weitere Signalproteine (c-Kit, Flt-3, RET, Raf) blockiert, die wichtige Mediatoren der Tumorzellproliferation, Tumordinvasion, Metastasierung und Tumorangioneogenese sind³³. Einige klinische Studien überprüfen die Wirksamkeit bei Glioblastompatienten³⁴. Sorafenib zeigte ein signifikantes Ansprechen in der Behandlung von Nierenzellkarzinomen³⁵ und Leberzellkarzinomen³⁶. Durch ein gutes Sicherheitsprofil und die Möglichkeit der Kombination mit anderen Substanzen gilt Sorafenib als ein Kandidat in der zielgerichteten Gliom-Therapie³⁴.

1.4.4 Pazopanib

Pazopanib (Votrient®) ist ein oral bioverfügbarer Tyrosinkinasehemmer, welcher über die Blockierung von VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PDGFR α/β sowie c-Kit das Tumorstwachstum und die Tumorangioneogenese über eine Inhibierung der durch VEGF induzierten Endothelzellproliferation inhibieren kann^{37, 38}. Pazopanib ist zur Behandlung

von Nierenzellkarzinomen und Weichteilsarkomen zugelassen^{39, 40} und ist ebenso ein Kandidat in der zielgerichteten Gliom-Therapie^{34, 41}.

1.4.5 Axitinib

Axitinib (Inlyta[®]) ist ein Hemmer der Phosphorylierung der Tyrosinkinase VEGFR1, VEGFR2 sowie VEGFR3 und hat antiangiogene Effekte im Tumorgewebe zur Folge⁴². Nierenzellkarzinome zeigen ein signifikantes Ansprechen auf eine Therapie mit Axitinib⁴³. Die Rolle von Axitinib als zielgerichtete Substanz in der Gliom-Therapie wird zur Zeit in klinischen Studien untersucht³⁴.

1.4.6 Everolimus

Everolimus (Votubia[®]) ist ein Derivat des Rapamycins und wie dieses ein Inhibitor des mammalian target of rapamycin (mTor)⁴⁴. Everolimus bildet Komplexe mit mTor-Molekülen und inaktiviert somit dieses intrazelluläre, in einer Vielzahl von Tumoren mutierte Protein⁴⁵. Da mTor über die weitere Aktivierung von Signalmolekülen den Übergang der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus aktiviert, werden die Tumorzellen in ihrer Proliferation gehemmt. Neben weiteren antitumorösen Effekten blockiert mTor den apoptotischen Zelltod, sodass durch eine Hemmung des Proteins ein größerer Anteil von Tumorzellen in Apoptose geht⁴⁵. Everolimus ist ein Kandidat in der zielgerichteten Gliom-Therapie^{34, 46}.

1.4.7 Valproat

Valproat ist eine kurzkettige Fettsäure, welche neben antiepileptischen Wirkmechanismen⁴⁷ auch epigenetische Effekte verursachen kann⁴⁸. Diese werden durch die Inhibierung von Histon-Deacetylasen (HDAC1 und 2) verursacht, wobei es zu einer Beeinflussung der Tumorzell-Transkription und -Differenzierung kommt⁴⁹. Durch diese epigenetischen Effekte ist Valproat eine Alternative in der Behandlung des myelodysplastischen Syndroms⁵⁰. Valproat ist eine Option in der antiepileptischen Therapie bei Gliompatienten, wobei eine retrospektive Studie zeigte, dass Patienten, die Valproat erhielten, länger überlebten⁵¹.

1.4.8 5-Azacytidin

5-Azacytidin (Vidaza[®]) ist ein Cytosin-Analogon, welches während der Zellreplikation in die RNA und DNA eingebaut wird⁵². Dies hat eine verminderte Aktivität von DNA-Methyltransferasen zur Folge, was zu einer Hypomethylierung des Tumorzellgenoms führt⁴⁹. In der Behandlung des myelodysplastischen Syndroms zeigte 5-Azacytidin ein signifikant verlängertes Überleben der Patienten⁵³. In der epigenetischen Gliom-Therapie ist 5-Azacytidin ein potentieller Kandidat.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tab. 1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Name	Firma	Herkunft
Sterilbank SK 1200	BDK	Genkingen, Deutschland
Inkubator	Labotect	Göttingen, Deutschland
Wasserbad	GFL	Burgwedel, Deutschland
Absaugsystem Vacusafe	Integra	Zizers, Schweiz
Zentrifugen 5403, 5417R, 5810R	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Einfrierbox Mr Frosty	Thermo Scientific	Waltham, USA
Feinwaage	Sartorius	Göttingen, Deutschland
Vortexer	IKA	Staufen, Deutschland
ELISA Reader Infinite M200	Tecan	Männedorf, Schweiz
Kryotom CM1900	Leica	Wetzlar, Germany
Objektträger Eindeckautomat	Dako	Glostrup, Dänemark
Zellkulturflaschen 25, 75, 150cm ²	Techno Plastic Products	Trasadingen, Schweiz
Fluoreszenz-Mikroskop	Zeiss	Jena, Deutschland
Lichtmikroskop mit Kamera	Leica	Wetzlar, Deutschland
Objektträger Superfrost	Thermo Scientific	Waltham, USA
Deckgläser 24mm x 60mm	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Pipetten 10,20,100,200,1000µl	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 10, 200, 1000µl	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe Pipetboy	Integra	Zizers, Schweiz
Pipetten steril 5, 10, 25ml	Greiner	Frickenhausen, Deutschland
Falcon Röhrchen 15ml, 50ml	BD Pharmingen	Heidelberg, Deutschland
Einwegspritzen 1ml, 10ml, 15ml	Braun	Melsungen, Deutschland
Eppendorf Tubes 1ml, 2ml	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Kryoröhrchen	Greiner	Frickenhausen, Deutschland
Pasteurpipetten	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Sterilfilter	Sartorius	Göttingen, Deutschland
Multiwell Platten 96well	BD Pharmingen	Heidelberg, Deutschland
Petrischalen aus Plastik, Ø 5cm, steril	Thermo Scientific	Waltham, USA
Bohrer, Bravo Portabel II	Multident	Berlin, Deutschland
Bohraufsätze aus Stahl 1,8mm	Multident	Berlin, Deutschland
Hamilton-Spritze	Hamilton	Höchst, Deutschland
Histoacryl	Braun	Melsungen, Deutschland
Knochenwachs	Ethicon	Norderstedt, Deutschland
Pinzette	Braun	Melsungen, Deutschland
Schere	Braun	Melsungen, Deutschland
Skalpell	Braun	Melsungen, Deutschland
Glaspetrischalen	Roth	Karlsruhe, Deutschland
PCR Kabinett	Backlaab	Scheerin, Deutschland
Taqman StepOnePlus	Applied Biosystems	Darmstadt, Deutschland
RT-Caps MicroAmp	Life Technologies	Carlsbad, USA
RT-Tubes MicroAmp	Applied Biosystems	Darmstadt, Deutschland
TissueLyser	Qiagen	Venlo, Niederlande
NanoDrop	Thermo Scientific	Waltham, USA

2.1.2 Zelllinien, Medien und Zellkulturzusätze

Tab. 2 Zelllinien, Medien und Zellkulturzusätze

Name	Firma	Herkunft
U87MG, humane Glioblastomzellen	ATCC	Manassas, USA
U373MG, humane Glioblastomzellen	ATCC	Manassas, USA
C1, primäre humane Glioblastomzellen		Universitätsklinikum Jena,
C2, primäre humane Glioblastomzellen		Klinik für Neurochirurgie
Minimal Essential Medium (MEM)	Gibco Life Technologies	Carlsbad, USA
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco Life Technologies	Carlsbad, USA
Sodium Pyrovate 100nM	Gibco Life Technologies	Carlsbad, USA

2 Material und Methoden

GlutaMAX	Gibco Life Technologies	Carlsbad, USA
MEM Non-Essential Amino Acids	Gibco Life Technologies	Carlsbad, USA
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma Aldrich	Schnelldorf, Deutschland
Pronase E	Serva	Heidelberg, Deutschland
Phosphate Buffered Saline (PBS), steril	Gibco Life Technologies	Carlsbad, USA
Trypsin-EDTA	Gibco Life Technologies	Carlsbad, USA
Trypanblau	Gibco Life Technologies	Carlsbad, USA
Diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma Aldrich	Schnelldorf, Deutschland
Matrigel	Sigma Aldrich	Schnelldorf, Deutschland

2.1.3 Antikörper, Reagenzien und Primer

Tab. 3 Antikörper, Reagenzien und Primer

Name	Firma	Herkunft	
Primärantikörper			
Cleaved Caspase3; anti-human, anti-mouse	1:200	Cell Signaling	Danvers, USA
CD31; anti-mouse	1:100	BD Biosciences	San Jose, USA
EGFR; anti-human, anti-mouse	1:100	Santa Cruz Biotechnology	Santa Cruz, USA
p-EGFR; anti-human, anti-mouse	1:500	Cell Signaling	Danvers, USA
GFAP; anti-human, anti-mouse	1:400	Dako	Glostrup, Dänemark
HIF1 α , anti-human	1:200	Millipore	Billerica, USA
Ki67, anti-human	1:200	Dianova	Hamburg, Deutschland
p-mTor; anti-human, anti-mouse	1:50	Cell Signaling	Danvers, USA
NG2; anti-human, anti-mouse	1:200	Millipore	Billerica, USA
PDGFR β ; anti-human, anti-mouse	1:100	Cell Signaling	Danvers, USA
PTEN; anti-human, anti-mouse	1:200	Cell Signaling	Danvers, USA
p-S6Kinase; anti-human, anti-mouse	1:100	Cell Signaling	Danvers, USA
VEGF; anti-human, anti-mouse	1:250	Abcam	Cambridge, UK
VEGFR1; anti-human, anti-mouse	1:100	Abcam	Cambridge, UK
VEGFR2; anti-human, anti-mouse	1:300	Cell Signaling	Danvers, USA
Sekundärantikörper			
Goat anti rabbit, HRP	1:500	Jackson ImmunoResearch	West Grove, USA
Goat anti rabbit, biotinyliert	1:500	Jackson ImmunoResearch	West Grove, USA
Goat anti rabbit, CY3	1:500	Jackson ImmunoResearch	West Grove, USA
Goat anti rabbit, CY2	1:500	Jackson ImmunoResearch	West Grove, USA
Goat anti rat, CY2	1:500	Jackson ImmunoResearch	West Grove, USA
Streptavidin, Peroxidase-konjugiert	1:500	Jackson ImmunoResearch	West Grove, USA
Avidin-Biotin Blocking Kit		Vector Laboratories	Burlingame, USA
Peroxidase-Block		Dako	Glostrup, Dänemark
Ziegenserum		Jackson ImmunoResearch	West Grove, USA
Triton X-100		Ferak	Berlin, Deutschland
ARK Kit for mouse primary antibodies		Dako	Glostrup, Dänemark
DAB Substrate Buffer		Dako	Glostrup, Dänemark
DAB Chromogen		Dako	Glostrup, Dänemark
AEC Impact Peroxidase Substrat		Vector Laboratories	Burlingame, USA
DAPI		Roth	Karlsruhe, Deutschland
VectaMount Mounting Medium		Vector Laboratories	Burlingame, USA
Hämatoxylin		Sigma Aldrich	Schnelldorf, Deutschland
Kresylviolett-Färbelösung		Sigma Aldrich	Schnelldorf, Deutschland
Primer			
mTor		Life Technologies	Carlsbad, USA
P ⁷⁰ S6-Kinase		Life Technologies	Carlsbad, USA
PDGFR β		Life Technologies	Carlsbad, USA
PLGF		Life Technologies	Carlsbad, USA
VEGF-A		Life Technologies	Carlsbad, USA
Rneasy Mini Kit		Quiagen	Hilden, Deutschland
DNase		Quiagen	Hilden, Deutschland
RNase-freies Wasser		Quiagen	Hilden, Deutschland

2.1.4 Narkotika und therapeutische Substanzen

Tab. 4 Narkotika und therapeutische Substanzen

Name	Firma	Herkunft
Isofluran	Baxter	Deerfield, USA
Etomidat	Asta Medica	Frankfurt, Deutschland
5-Azacytidin (Vidaza [®])	Celgene	Summit, USA
Axitinib (Inlyta [®])	Pfizer Inc.	New York City, USA
Bevacizumab (Avastin [®])	Hoffmann-La Roche AG	Basel, Schweiz
Everolimus (Votubia [®])	Novartis AG	Basel, Schweiz
Pazopanib (Votrient [®])	GlaxoSmithKline plc.	London, England
Sorafenib (Nexavar [®])	Bayer AG	Leverkusen, Deutschland
Temozolomid (Temodal [®])	Essex Pharma	München, Deutschland
Valproat	Ratiopharm	Ulm, Deutschland

2.1.5 Versuchstiere

Tab. 5 Versuchstiere

Bezeichnung	Herkunft
NMRI-nu/nu-Mäuse	eigene Zucht
NSG-Mäuse	eigene Zucht
NOD-scid IL2rg ^{-/-} -Mäuse	eigene Zucht

2.1.6 Humane Tumorproben

Tab. 6 humane Tumorproben

Anzahl und Entität	bereitgestellt durch
11 Glioblastome	Vivantes Klinikum Neukölln, Abteilung für Neurochirurgie Klinikum Ernst von Bergmann Potsdam, Klinik für Neurochirurgie Universitätsklinik für Neurochirurgie, Graz
5 Glioblastome	
3 Glioblastome	

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Werkbänken durchgeführt. Die verwendeten Zelllinien (U87MG, U373MG) sowie Primär-Glioblastomzellen (C1, C2) wuchsen adhären. Die Zusammensetzung des Mediums für diese Zellen (MEM) bestand stets aus 10% FBS, 1% Pyroval-Lösung, 1% Glutamin-Lösung und 1% nicht-essentieller Aminosäuren-Lösung. Nach spätestens 72 Stunden wurde das Kultivierungsmedium abgenommen und durch frisches ersetzt. Hatten die Zellen eine nahezu 100%ige Konfluenz erreicht, wurden sie in mehrere neue Zellkulturflaschen verteilt. Hierzu wurden die Zellen mit 0,25%igem Trypsin abgelöst, in frischem Medium mit 800rpm für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend in neuem Medium resuspendiert. Die Kultivierung erfolgte in Brutschränken bei 37°C, 5% CO₂ und 99% Luftfeuchtigkeit.

2.2.2 Etablierung von Primärzell-Kulturen aus Patienten-Glioblastomen

Das direkt aus dem neurochirurgischen Operationssaal gelieferte Patienten-Tumormaterial wurde nach Sendungseingang sofort verarbeitet. Das Gewebe wurde steril entnommen und zweimal mit PBS gespült. Anschließend wurde es auf einer sterilen Petrischale mit Skalpell in circa 2mm x 2mm messende Stücke verkleinert. Diese wurden dann eine Stunde bei 37°C in 5,0ml Enzym-Mix inkubiert, welcher Kollagenase (50U/ml) und Pronase (30U/ml) beinhaltet. Es folgte eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 4°C und 800rpm. Das Pellet wurde dann in frischem Medium aufgenommen, resuspendiert und in Zellkulturflaschen verteilt. Am nächsten Tag erfolgte ein Waschschriff und ein Mediumwechsel. Die Zellen wurden nach Erreichen von 80-90% Konfluenz mit 0,25%igem Trypsin abgelöst, 10 Minuten bei 4°C und 800rpm zentrifugiert und anschließend in frischem Medium auf mehrere neue Zellkulturflaschen verteilt.

2.2.3 Kryokonservierung von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden die Zelllinien oder die Primärzellen aus den Kulturflaschen abgelöst, zentrifugiert, in 1ml Medium mit 10% DMSO aufgenommen, in der Einfrierbox „Mr Frosty“ langsam im -80°C-Kühlschrank gefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Das Auftauen von kryokonservierten Zellen erfolgte rasch in einem 37°C warmen Wasserbad und die Zellen wurden anschließend mit frischem Medium in Zellkulturflaschen überführt. Nach dem Anhaften der Zellen erfolgte ein Mediumwechsel, um zelltoxisches DMSO zu entfernen.

2.2.4 Zellvitalitätsanalyse mit MTT-Assays

Mit 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Assays wurde *in vitro* die Zellvitalität humaner Glioblastomzellen bestimmt. Hierfür wurden 5×10^4 Zellen mit Standardmedium in jedes Well von 96-Well-Platten gegeben und nach 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen von 5-Azacytidin (0,1; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 25; 50µg/ml) oder Everolimus (10; 20; 25; 30; 35; 40; 50µg/ml) über eine Zeitdauer von exakt 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde in jedes Well 0,5 mg/ml MTT-Reagent pipettiert und nach genau vier Stunden wurden die Formazan-Kristalle mit Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgelöst. Die optische Dichte jedes Wells wurde bei 540nm und einem Referenz-Filter bei 620nm im Plate-Reader gemessen. Alle Experimente

wurden dreimal wiederholt und die Mittelwerte sowie Standardabweichungen mit SPSS errechnet und statistisch ausgewertet.

2.2.5 Visualisierung apoptotischer Glioblastomzellen

Glioblastom-Zelllinien sowie Primärzellen wurden auf Glasplättchen in 24-Well-Platten mit Standardmedium kultiviert. Es folgte eine 24-stündige Inkubation mit 5-Azacytidin (1,0 und 25,0µg/ml) sowie Everolimus (20,0 und 30,0µg/ml). Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, für 15 Minuten mit 4%igem Formalin fixiert, für 10 Minuten mit 1%iger Triton-Lösung permeabilisiert, mit 20%igem Ziegen Serum in PBS blockiert und für eine Stunde mit einem Caspase3-Primärantikörper (1:400 in PBS) inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für 20 Minuten mit einem Cy3-Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert (1:500 in PBS). Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt und die Anfärbungen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet.

2.2.6 Migrationsanalyse humaner Glioblastomzellen mit *in vitro*-Scratch Assays

U373MG-Glioblastomzellen wurden in sterilen Plastik-Petrischalen bis zu einer 90%igen Konfluenz kultiviert. Mit einer kleinen Pipettenspitze wurden drei identische scratches in den Zell-Monolayer pro Petrischale eingebracht und die Zellen anschließend gründlich mit PBS gewaschen. Mit einer Mikroskop-Kamera wurden je Petrischale 18 Bilder in definierten Bereichen der scratches aufgenommen und die Zellen jeweils in Standardmedium sowie in Standardmedium zugesetzt mit 5,0µg/ml 5-Azacytidin oder 20µg/ml Everolimus kultiviert. Um den Einfluss der Zellproliferation auszuschließen, wurde ein Zeitfenster von vier Stunden gewählt. Nach exakt vier Stunden Inkubationszeit wurden neue Bilder an den vorher definierten Bereichen der scratches angefertigt. Alle Experimente wurden dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Die migrierten Zellen auf den angefertigten Bildern wurden mit der Software ImageJ (NIH, Bethesda, USA) manuell gezählt und die Auswertung erfolgte mit der Software SPSS (IBM, Armonk, USA).

2.2.7 Haltung von Versuchstieren

Die Haltung der Labormäuse sowie die Tierversuche wurden gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz von 1998⁵⁴, nach Richtlinien zur Durchführung von Tierversuchen⁵⁵ sowie mit der Genehmigung der entsprechenden Behörden (A0452/08, 28.11.2012)

durchgeführt. Alle Versuchstiere wurden in sterilen Tierställen mit steriler Luft unter standardisierten Bedingungen ($22\pm 2^\circ\text{C}$ Raumtemperatur, $50\pm 10\%$ relative Luftfeuchtigkeit, 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus) gehalten.

In jeden Käfig wurden maximal sechs Versuchstiere des gleichen Stammes und der gleichen Behandlungsart untergebracht und mittels kleinen Inzisionen der Ohren markiert. Die Tiere wurden sofort abgetötet, wenn eine deutliche Abmagerung oder aufgrund des intrazerebralen Tumorwachstums Paresen, Verhaltensstörungen oder ein Durchwachsen der Schädeldecke auftraten. Hierzu wurden die Mäuse in eine mit Isofluran begaste Box gelegt und die dann narkotisierten Mäuse durch Genickbruch abgetötet.

2.2.8 Subkutane Tumorzell-Injektionen an Labormäusen

Glioblastomzellen wurden, verteilt auf mehrere Zellkulturflaschen, zum konfluenten Wachstum gebracht. Anschließend wurden die Zellen mit 0,25%igem Trypsin abgelöst und 10 Minuten bei 4°C und 800rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in PBS resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Danach wurde die Zellzahl auf $5,0 \times 10^7$ Zellen je 1ml PBS eingestellt. Den Labormäusen wurden 200 μl der Zellsuspension unter die Haut der linken Flanke injiziert. Nach Entfernen der Nadel wurde die Einstichstelle mit den Fingern zusammengedrückt, um sie dicht zu verschließen.

2.2.9 Intrazerebrale Tumorzell-Inokulationen an Labormäusen

Für die intrazerebrale Inokulation von Glioblastomzellen wurden nude-Mäuse mit 350-450 μl intraperitonealem Etomidat in eine Kurzzeitnarkose versetzt. Anschließend wurde der Kopf in einen Stereotaxie-Halteapparat eingespannt. Nach Desinfektion der Kopfhaut wurde diese mit einer sterilen Schere eröffnet. Das Bregma wurde aufgesucht und mit einer 23G-Kanüle wurde, 3,0mm parasagittal rechts und 1,0mm hinter der Koronarnaht, vorsichtig ein Loch durch die knöchernen Schädeldecke gebohrt. Es wurden $2,5 \times 10^4$ U87MG-Glioblastomzellen oder $2,0 \times 10^5$ U373MG-Glioblastomzellen mit einer Hamilton-Spritze in einem Volumen von 2,0 μl PBS aufgenommen. Die gefüllte Spritze wurde in den Stereotaxie-Halteapparat eingebracht und die Zellsuspension zwei Minuten lang injiziert. Nach 60 Sekunden Wartezeit wurde die Kanüle 2mm heraus gezogen und nach weiteren 60 Sekunden ganz entfernt. Es erfolgte ein dichter Knochen- und Hautverschluss mit Histoacryl. Die operierten Mäuse wurden unter

Beobachtung bis zum Aufwachen in vorgewärmte Haltekästen gelegt. Die postoperative Überlebensrate betrug nach diesem Verfahren nahezu 100%.

2.2.10 Subkutane Xenotransplantation von Patienten-Glioblastomgewebe in Labormäuse

Die Genehmigung der Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin für die Verwendung von humanem Glioblastomgewebe und die Erstellung aller Glioblastom-Xenografts wurde eingeholt. Im Operationssaal wurde während neurochirurgischer Glioblastom-Resektionen vitales Glioblastomgewebe in sterile, mit Medium befüllte Röhrchen gegeben. Diese wurden noch am selben Tag in das Labor geschickt und verarbeitet oder längstens über Nacht bei 4°C gelagert. Das Medium wurde unter sterilen Bedingungen abgenommen und das Glioblastomgewebe mit PBS gewaschen. Ein Teil des Gewebes wurde sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und kryokonserviert. Mit sterilen Skalpellens wurden circa 0,5x0,5cm messende Tumorstücke herausgeschnitten. Für ein erfolgreiches Engraftment wurden NSG- oder NOD/SCID-Mäuse verwendet. Diese erhielten eine circa 0,7cm lange Inzision in die Haut der linken Flanke. Die Tumorstücke wurden zusammen mit Matrigel, versetzt mit VEGF-/FGF-Wachstumsfaktoren, unter die Haut eingebracht. Danach wurden die Hautfalten dicht mit Hautklammern verschlossen und diese nach erfolgter Wundheilung wieder entfernt. Das Tumorstück wurde in einer wöchentlichen Visite beurteilt und die Tumorstückvolumina wurden gemessen. Bei einer Tumorstückgröße von circa 0,75cm³ wurden die Mäuse abgetötet, ein Teil des Tumors zur Kryokonservierung schockgefroren und das restliche Gewebe auf weitere Mäuse subkutan verteilt (erste Passage). Ab der zweiten Passage wurden die Xenotransplantate für Therapieversuche verwendet.

2.2.11 Therapeutische Tumorbehandlung der Versuchstiere

Die Medikamente wurden den Labormäusen oral, intraperitoneal oder intravenös zugeführt. Für die orale Gabe wurde die aufbereitete Substanz mit einer Pipette in das Maul der Labormäuse verabreicht. Für die intraperitoneale Gabe wurden die Substanzen mit einer Kanüle in den rechten Unterbauch in die Peritonealhöhle injiziert. Für intravenöse Injektionen wurden die Schwanzvenen der Labormäuse punktiert.

2.2.12 In dieser Arbeit verwendete Substanzen mit deren Dosierungen und Applikationswegen

In Tabelle 7 sind alle verwendeten Substanzen mit deren Dosierungen, Behandlungsschemata sowie Applikationswegen aufgeführt. Diese wurden für jeden durchgeführten Therapieversuch standardisiert durchgeführt. Für die jeweiligen Kontrollgruppen wurde immer PBS über die jeweils angegebenen Applikationswege als Placebo-Therapie verwendet.

Tab. 7 Verwendete Substanzen mit deren Dosierungen, Applikationswegen und Behandlungsschemata

	<i>Applikations- weg</i>	<i>Behandlungs- schema</i>	<i>Dosis [mg/kg]</i>	<i>Behandlungen pro Tag</i>
5-Azacytidin	i.v.	Tag 1-5	90	1x täglich
Axitinib	p.o.	Tag 1-9	30	2x täglich
Bevacizumab	i.p.	Tag 1,3,5,8,10,12	5	1x täglich
Everolimus	p.o.	Tag 1-5, 8-12	5	1x täglich
Pazopanib	p.o.	Tag 1-5, 8-12	60	1x täglich
Sorafenib	p.o.	Tag 1-5, 8-12	80	1x täglich
Temozolamid	p.o.	Tag 1-5	90	1x täglich
Valproat	i.p.	Tag 1-5, 8-12	200	2x täglich

i.v.=intravenös, p.o.=per os, i.p.=intraperitoneal.

2.2.13 Durchführung von Therapieversuchen

Eine Behandlungsgruppe bestand stets aus sechs bis acht Labormäusen, welche immer zusammen in separaten Haltekästen untergebracht wurden. Nach der Operation der Versuchstiere wurden diese randomisiert in die jeweiligen Therapiegruppen verteilt. Zur Messung der subkutanen Tumorumfänge wurde ein Messschieber verwendet (Formel: Tumorumfang = (Breite² x Länge) x 0,5; als Breite galt immer der kleinere gemessene Wert). In jedem Therapieversuch wurden die Tumorumfänge aller Behandlungsgruppen 2 bis 3 mal in jeder Woche bestimmt. Gleichzeitig zu jeder Messung wurden die Körpergewichte der Versuchstiere ermittelt. Bestand für die Tiere mit intrazerebral wachsenden Tumoren zwischen drei und vier Wochen nach der Tumorumfängung ein Abfall des Körpergewichts von mehr als drei Gramm über drei Tage, wurden sie abgetötet und der Therapieversuch beendet.

2.2.14 Analyse subkutaner Tumorumfänge

Jeder Therapieversuch wurde ausschließlich von einer Person betreut, um untersucherabhängige Messabweichungen zu verhindern. Die Tumorumfänge der subkutan wachsenden Glioblastome wurden für jedes einzelne Versuchstier bestimmt und die Werte der einzelnen Tiere einer Behandlungsgruppe zu bestimmten

Zeitpunkten gemittelt. Hier wurde der Standardfehler des Mittelwertes verwendet. Die T/C-Werte (treatment to control-Werte) wurden aus dem Verhältnis der gemittelten Tumorumfänge aus der jeweiligen Behandlungsgruppe zur Kontrollgruppe an einem bestimmten Zeitpunkt ermittelt und geben an, wieviel Prozentpunkte die Verminderung der Tumormasse relativ zur Kontrollgruppe beträgt.

2.2.15 Analyse von intrazerebralen Tumormassen mittels Kresylviolett-Färbung

Die in 2-Methylbutan schockgefrorenen Gehirne mit den intrazerebralen Tumoren wurden mit einem Kryotom und einer Dicke von 6µm komplett geschnitten. Dabei wurde im Abstand von jeweils 40µm je ein Gehirnschnitt auf Objektträger aufgebracht. Anschließend erfolgte die Anfärbung der Kryoschnitte mit Kresylviolett, um das Tumorgewebe darzustellen. Dafür wurden die Objektträger in einer Färbereihe für eine Minute in Kresylviolettlösung inkubiert, anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 90%, 99%, 100%) entfärbt, für eine Minute in Xylol inkubiert und dann mit Deckgläsern versiegelt. Die größte angeschnittene Tumormasse jedes Tumors wurde bestimmt und die Fläche unter dem Mikroskop mit der Software EasyMeasure (Inteq[®] GmbH) ausgemessen. Aus den größten Tumormassen aller Tumore aus einer Behandlungsgruppe wurde der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

2.2.16 Aufarbeitung von Tumorgewebe aus Versuchstieren

Subkutan wachsende Tumore wurden nach Abtöten der Versuchstiere mit Pinzette und Skalpell aus der umgebenden Haut herausgeschnitten, in Röhrchen überführt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Für die Gewinnung der intrazerebral gewachsenen Glioblastome wurden die Gehirne der abgetöteten Versuchstiere durch Einschneiden der Kopfhaut sowie des Schädelknochens herauspräpariert. Anschließend wurden sie in -20°C kaltes 2-Methylbutan überführt und bei -80°C gefroren und gelagert. Die subkutanen Tumore sowie die Gehirne wurden dann mittels Kryostat und einer Dicke von 6µm geschnitten, auf Objektträger aufgebracht und bei -20°C gelagert.

2.2.17 Immunhistochemische Färbungsuntersuchungen

Für die Immunhistochemie wurden Kryoschnitte für 15 Minuten mit 4%igem Formaldehyd fixiert. Nach einem fünfminütigen Waschschriff in PBS wurde die

endogen vorhandene Peroxidase mit 3%igem H_2O_2 blockiert. Nach fünf minütigem Waschen wurden die Kryoschnitte mit 20%igem Ziegenerum für 15 Minuten inkubiert und danach der Primärantikörper, mit der entsprechenden Verdünnung in PBS (siehe Tab. 3), für eine Stunde auf die Gewebeschnitte in einer feuchten Kammer gegeben. Anschließend erfolgte ein zehn minütiger Waschschrift in PBS und der Sekundärantikörper, verdünnt 1:500 in PBS, wurde für eine Stunde in einer feuchten Kammer, bei mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten Antikörpern zusätzlich im Dunkeln, aufgetragen. Danach wurden die Objektträger zehn Minuten in PBS gewaschen. Bei mit immunfluoreszierenden Farbstoffen gekoppelten Sekundärantikörpern erfolgte nach Auftragen von DAPI-Eindeckmedium unmittelbar die Auswertung der Signale unter dem Fluoreszenzmikroskop. Für die Anfärbung apoptotischer Endothelzellen wurden die Kryoschnitte nach der Inkubation mit dem Caspase3-Primärantikörper und einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper (1:500) für eine Stunde mit 20%igem Ziegenerum blockiert und es folgte die Inkubation mit dem CD31-Primärantikörper und einem CY2-gekoppelten Sekundärantikörper (1:500) und die Objektträger wurden mit DAPI-Eindeckmedium versiegelt. Bei Verwendung von biotinylierten Sekundärantikörpern erfolgte zusätzlich eine 30minütige Inkubation mit Streptavidin-horseradish peroxidase (HRP). Bei einer direkten Kopplung des Sekundärantikörpers mit HRP entfiel dieser Schritt. Dann wurden die Gewebsschnitte fünf Minuten mit dem Substrat Diaminobenzidin (DAB) inkubiert, was eine Braunfärbung der darzustellenden Antigene zur Folge hatte. Mit dem Substrat Aminoethylcarbazol (AEC) wurde maximal 30 Minuten inkubiert und es resultierte eine rote Färbung der Zielantigene. Anschließend erfolgte eine blaue Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämatoxylin, wobei die Objektträger für eine Minute in Hämatoxylinlösung und für zehn Minuten in Leistungswasser eingebracht und anschließend eingedeckelt wurden.

Die Werte der Expressionsdichten (EGFR, phospho-EGFR, VEGF, VEGFR1, PDGFR β , PTEN, phospho-mTor, phospho-S6-Kinase) wurden lichtmikroskopisch ermittelt. Dabei wurden zufällig zehn Gesichtsfelder (400fache Vergrößerung) je Tumorschnitt und Behandlungsgruppe ausgewählt und je Gesichtsfeld die Intensität der Anfärbung in keine (0), schwach (1), moderat (2) und stark (3) sowie der Anteil des angefärbten Tumorgewebes (0%, 25%, 50%, 75% oder 100%) bestimmt und diese beiden Werte dann multipliziert und aus allen Werten die Mittelwerte gebildet.

Für die Bestimmung der Anzahl von CD31-positiven Endothelzellen sowie PDGFR β -positiven Perizyten wurden diese unter dem Lichtmikroskop (400fache Vergrößerung)

auf zehn zufällig gewählten Gesichtsfeldern je Tumorschnitt und Behandlungsgruppe manuell ausgezählt und die jeweiligen Mittelwerte gebildet.

2.2.18 Fluorogene RT-TaqMan-PCR (Real Time-Polymerase-Kettenreaktion)

Die Ribonukleinsäure (RNA) aus 2 x 2 x 2mm messenden, kryokonservierten Glioblastom-Xenograft-Gewebestücken aus drei Tumoren je Behandlungsgruppe wurde mittels RNA-Isolations-Kit gewonnen. Dabei wurde zu der Gewebeprobe 600µl Lysis-Buffer hinzugegeben, diese in einem TissueLyser fünf Minuten lysiert und nach Zugabe von DNase-Lösung sowie nach mehreren Waschschritten die RNA durch eine Säulenmembran in RNase-freiem Wasser gewonnen, deren Konzentration mittels NanoDrop bestimmt und bei -20°C gelagert. Mit dem TaqMan-Reverse-Transcription-Reagent wurde anschließend die gesamte RNA transkribiert und die PCR-Reaktionen wurden mit 2µl komplementärer Desoxyribonukleinsäure (cDNA, 38ng/µl) korrespondierend zu 20ng messenger-RNA (mRNA) durchgeführt. Es wurden human-spezifische Primer und der TaqMan-Fast-Mastermix verwendet und die Amplifikationen im StepOne-Plus-Real-Time-PCR-System durchgeführt. Die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurde als Referenzgen genutzt. Die normalisierten ΔC_T -Werte (cycle threshold) wurden durch Subtraktion der GAPDH- C_T -Werte vom jeweils untersuchten Gen errechnet. Jede Probe wurde zweimal gemessen und die relativen Expressionsunterschiede mit der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode errechnet⁵⁶.

2.2.19 Statistische Auswertung

Statistisch signifikante Unterschiede der subkutanen Tumorgrößen wurden mittels Two-Way Analysis of Variance (ANOVA) und der Software GraphPadPrism (La Jolla, USA) ermittelt. Der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test wurde für die Signifikanztestung der intrazerebralen Tumorgrößen angewendet, die statistische Analyse von Glioblastomzell-Viabilität, -Metabolismus und -Migration wurde mit dem Student's t-Test und dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test sowie der Software SPSS (IBM, Armonk, USA) durchgeführt. Alle ermittelten p-Werte kleiner als 0.05 galten als statistisch signifikant. p-Werte <0,05 sind mit * , p-Werte <0,01 mit ** und p-Werte <0,001 mit *** markiert.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung und Charakterisierung humaner Glioblastom-Mausmodelle

3.1.1 Zelllinien-abgeleitete, subkutan wachsende Glioblastome

Als Glioblastom-Zelllinien wurden U87MG- und U373MG-Linien verwendet. Nach der subkutanen Injektion der Zellen in nude-Mäuse lag die Tumoranwachsrates bei 100% und die Mortalität des Eingriffs bei 0%. Beide Zelltypen zeigten ein sehr frühes Tumorstadium, sodass eine Messung der Tumorstadien sowie ein Therapiebeginn ab dem vierten Tag nach der Zellimplantation durchgeführt werden konnte. Durchschnittlich zehn Tage nach der Tumorzell-Injektion erreichten U87MG- als auch U373MG-Tumore eine Größe von 0,1cm³. Nach durchschnittlich 30 Tagen erreichten U87MG-Tumore eine Größe von 0,5cm³ und U373-Tumore eine Größe von 1,0 cm³. Damit ergab sich ein maximal nutzbarer Therapie-Zeitraum von drei Wochen.

Makroskopisch waren die U87MG-Tumore von harter Konsistenz sowie scharf gegenüber der Umgebung abgekapselt. Es zeigten sich kein invasives Wachstum in das umgebende Gewebe, keine Einblutungen und keine nekrotischen Areale (Abb. 1C).

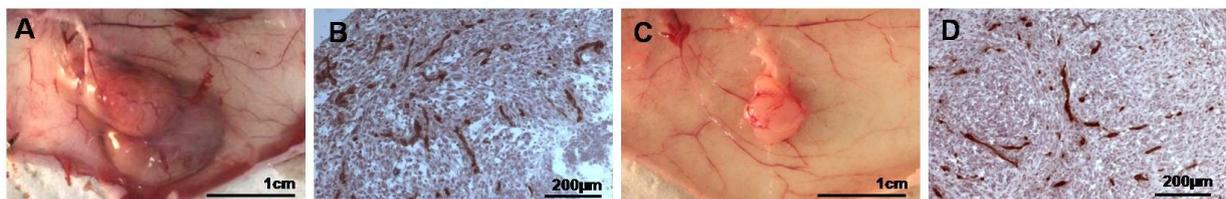


Abb. 1 Zelllinien-abgeleitete, subkutan wachsende Glioblastome. (A) Makroskopisch imponieren U373MG-Tumore durch Zystenbildung, U87MG-Tumore (C) haben eine kompakte Struktur. Die Blutgefäßdichte ist, dargestellt durch Anfärbung gegen CD31-positive Endothelzellen, jeweils sehr hoch (B, U373MG, D, U87MG).

Die U373MG-Tumore zeigten ebenso ein abgekapseltes, nicht-invasives Wachstum. Diese Tumore wuchsen stets zystisch (Abb. 1A), Einblutungen in den Tumor sowie nekrotische Areale waren gehäuft vorhanden. Beide Tumorarten zeigten eine hohe Blutgefäßdichte (Abb. 1B,D).

3.1.2 Zelllinien-abgeleitete, intrazerebral wachsende Glioblastome

U87MG- als auch U373MG-Glioblastomzellen wurden in die Gehirne von nude-Mäusen mittels der im Abschnitt 2.2.6 beschriebenen Operationstechnik inokuliert. Die Therapie der Versuchstiere begann aufgrund des sehr frühen Tumorstadiums ab dem dritten postoperativen Tag. Nach durchschnittlich 24 Tagen wurden alle Versuche beendet, es ergab sich damit ein Therapiefenster von drei Wochen.

Mikroskopisch zeigte sich ein differentes Wachstumsmuster: während U87MG-Tumore vom umgebenden gesunden Hirngewebe scharf abgegrenzt wachsen (Abb. 2A), zeigten U373MG-Tumore ein invasiveres Wachstumsmuster (Abb. 2C). Die Blutgefäßdichte war in beiden Zelllinien-abgeleiteten intrazerebralen Glioblastomen hoch (Abb. 2B, D).

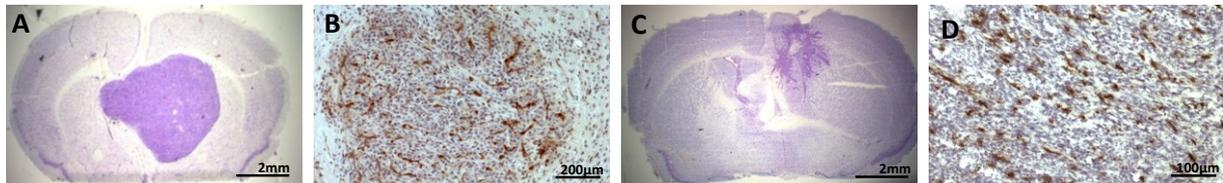


Abb. 2 Zelllinien-abgeleitete, intrazerebral wachsende U87MG- und U373MG-Tumore. U87MG-Tumore wachsen vom umgebenden gesunden Hirngewebe deutlich abgekapselt (A), U373MG-Zellen wachsen invasiver in das umgebende Gewebe (C). Die Blutgefäßdichte ist in beiden Tumorentitäten hoch (B, U87MG, D, U373MG).

3.1.3 Primärzellen-abgeleitete subkutane und intrazerebrale Glioblastome

Die *in vitro*-kultivierten Glioblastom-Primärzellen C1 und C2 wurden subkutan als auch intrazerebral in nude-Mäuse eingebracht. Subkutan wachsende Glioblastome (CX1 und CX2) hatten eine harte Konsistenz und wuchsen vom umgebenden Gewebe abgekapselt (Abb. 3A, B). Durchschnittlich 20 Tage nach der Zellinjektion hatten die Tumore eine Größe von 0,1cm³ erreicht, nach 40 Tagen lag diese bei durchschnittlich 0,5cm³. Die Gefäßdichte war, verglichen mit Zelllinien-abgeleiteten Xenografts, deutlich geringer (Abb. 3D).

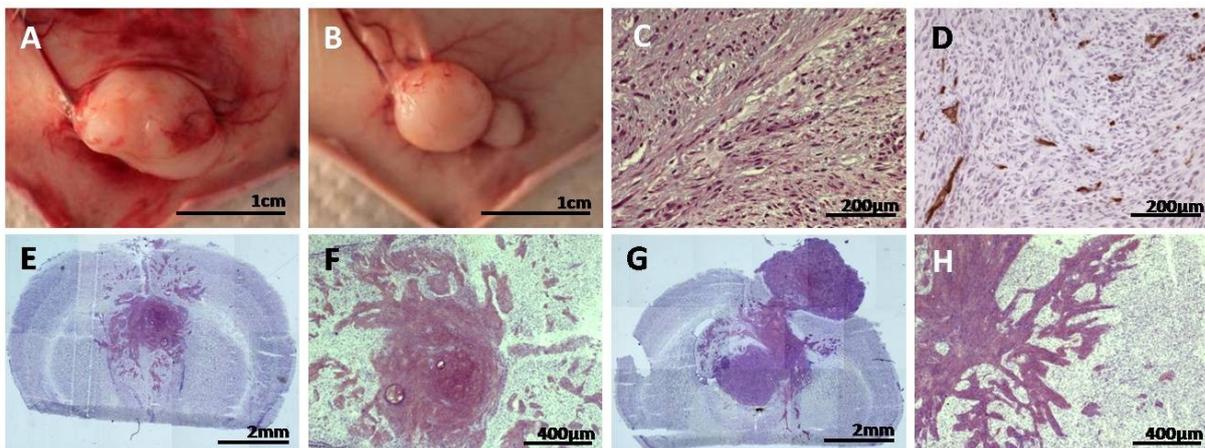


Abb. 3 Primärzell-abgeleitete Glioblastom-Xenografts. Subkutanes Wachstum von C1- (A) und C2-Zellen (B). HE-Färbung (C) sowie Darstellung von CD31-positiven Endothelzellen (D) in einem subkutanen C1-Tumor. Intrazerebrales Wachstum von C1-Zellen (E, F) sowie von C2-Zellen (H). (G) zeigt einen C2-Tumor, der intra- sowie extrazerebral gewachsen ist.

Die intrazerebral inokulierten Glioblastom-Primärzellen zeigten ein im Vergleich zu den Zelllinien-abgeleiteten intrazerebral wachsenden Tumoren langsames Wachstum. Der Zeitraum zwischen der Operation und dem Abtöten der Versuchstiere betrug 60 Tage bei C1-Tumoren und 90 Tage bei C2-Tumoren. Das intrazerebrale Wachstum der

Glioblastom-Primärzellen zeigte sich häufig invasiv in das umgebende Hirngewebe (Abb. 3E-H), Einblutungen oder nekrotische Areale fanden sich dagegen nicht.

3.1.4 Patienten-abgeleitete subkutane Glioblastom-Xenografts

Insgesamt wurden 19 Patienten-Glioblastome direkt nach der neurochirurgischen Entfernung subkutan in Labormäuse transplantiert. Davon zeigten 7 Glioblastome (36,8%) eine Größenprogression und konnten weiter auf Versuchstiere subkutan transplantiert und dann für Therapieversuche verwendet werden (TX1, TX2). Die durchschnittliche Zeit von der Tumortransplantation bis zur Durchführung der ersten Tumorpassage betrug 118 Tage. Bis zur Durchführung eines ersten Therapieversuchs wurden zwei Passagen der Tumore benötigt, wobei die Zeit bis zur zweiten Passage in der Regel kürzer als bis zur ersten war. Die für die Therapieversuche transplantierten Xenografts waren nach durchschnittlich 22 Tagen fest subkutan angewachsen und zeigten darüber hinaus makroskopisch eine deutliche Blutgefäßbildung, sodass die Therapieversuche begonnen werden konnten. Nach durchschnittlich 36 Tagen wurden die Therapieversuche beendet, sodass sich ein möglicher Therapiezeitraum von zwei Wochen ergab.

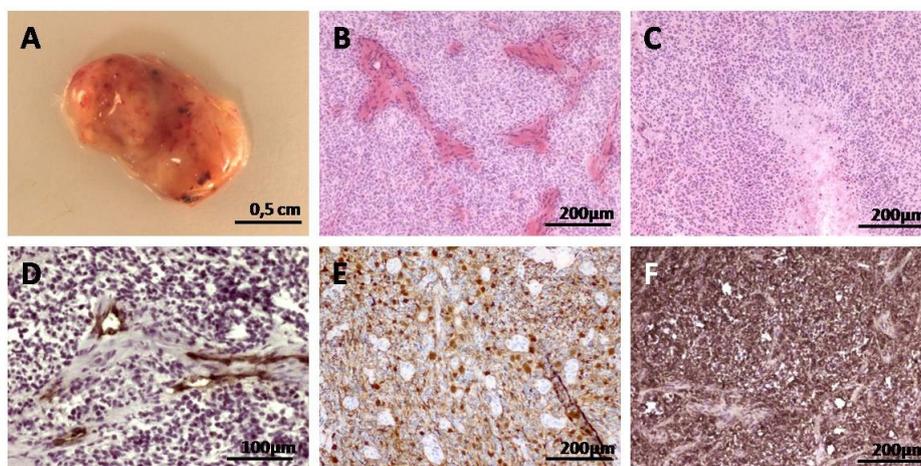


Abb. 4 An einem Patienten-abgeleiteten Glioblastom-Xenograft sind makroskopisch Einblutungen im Tumorgewebe erkennbar (A). Charakteristische Gefäßproliferationen (B) sowie Strichnekrosen (C) sind in den Patienten-abgeleiteten Xenografts zu finden. Die Färbung gegen murines CD31 zeigt, dass die Blutgefäße im Xenograft murinen Ursprungs sind (D). Anfärbung gegen GFAP im Patiententumor (E) sowie im Patienten-abgeleiteten Xenograft (F).

Histologisch zeigten die transplantierten Patienten-Glioblastome für die WHO Grad IV-Tumore charakteristische Gefäßproliferationen sowie nekrotische Tumorareale (Abb. 4E, F). Weiterhin wurde häufig ein festes Einwachsen der Patienten-abgeleiteten Xenografts in das umgebende Bindegewebe beobachtet.

3.2 Einfluss der Multi-Tyrosinkinase-Hemmer Sorafenib sowie Pazopanib auf die biologischen Eigenschaften humaner Glioblastome

3.2.1 Wachstum von subkutanen und intrazerebralen Glioblastom-Xenografts während einer Therapie mit Sorafenib sowie Pazopanib

Die Multi-Tyrosinkinase-Inhibitoren Sorafenib sowie Pazopanib wurden bezüglich ihrer Wirkung auf das Wachstum von subkutanen U87MG-, U373MG, CX1- und CX2-Tumoren sowie von Patienten-abgeleiteten Xenografts TX1 und TX2 analysiert (Tab. 8, Abb. 5). Sorafenib verzögerte das Wachstum subkutaner U373MG-Tumore signifikant zur PBS-Kontrollgruppe (T/C=63,9%, $p < 0,05$, Abb. 5A), in den anderen subkutanen Modellen hatte Sorafenib keinen signifikanten wachstumsverzögernden Effekt. Pazopanib verzögerte das Tumorwachstum in subkutanen U373MG-Tumoren (T/C=48,2%, $p < 0,001$, Abb. 5B), in CX2-Tumoren (T/C=62,1%, $p < 0,05$, Abb. 5D) und in Patienten-abgeleiteten TX2-Glioblastom-Xenografts (T/C=19,6%, $p < 0,001$, Abb. 5F). Temozolomid verhinderte das Gliomwachstum in allen subkutanen Modellen (Tab. 8, Abb. 5A-F). Bevacizumab verzögerte das Tumorwachstum signifikant in subkutanen U87MG-Tumoren (T/C=41,7%, $p < 0,001$, Abb. 5A), U373MG-Tumoren (T/C=7,7%, $p < 0,001$, Abb. 5B), CX2-Tumoren (T/C=40,8%, $p < 0,05$, Abb. 5D) sowie in TX2-Patienten-Glioblastomen (T/C=14,0%, $p < 0,001$, Abb. 5F).

Tab. 8 Versuchsdaten der Tierexperimente mit Sorafenib und Pazopanib an subkutanen Glioblastommodellen

subkutanes Tumormodell	Substanz	optimaler T/C [%]	Körpergewichts-änderung [%]	toxische Sterbefälle / total	p-Werte zu PBS	subkutanes Tumormodell	Substanz	optimaler T/C [%]	Körpergewichts-änderung [%]	toxische Sterbefälle / total	p-Werte zur PBS-Gruppe
U87MG (nude)	PBS		+4	0/9		U373MG (nude)	PBS		+6	0/10	
	Sorafenib	157,8	0	0/8	>0,05		Sorafenib	63,9	+3	1/8 ¹	<0,05
	Pazopanib	83,1	+1	0/8	>0,05		Pazopanib	48,2	+2	0/8	<0,001
	Temozolomid	7,9	+1	0/8	<0,001		Temozolomid	4,0	0	0/8	<0,001
	Bevacizumab	41,7	-2	0/8	<0,001		Bevacizumab	7,7	+7	0/8	<0,001
CX1 (nude)	PBS		+2	0/8		CX2 (nude)	PBS		+3	0/7	
	Sorafenib	114,4	-5	0/6	>0,05		Sorafenib	81,9	-3	0/7	>0,05
	Pazopanib	107,7	-2	0/7	>0,05		Pazopanib	62,1	-2	0/8	<0,05
	Temozolomid	20,7	-7	0/8	<0,001		Temozolomid	35,8	-4	0/8	<0,001
	Bevacizumab	61,8	0	0/8	>0,05		Bevacizumab	40,8	-1	0/6	<0,05
TX1 (NSG)	PBS		+14	0/6		TX2 (NSG)	PBS				
	Sorafenib	71,0	+4	0/6	>0,05		Sorafenib	107,6	-8	0/6	>0,05
	Pazopanib	110,5	+8	0/6	>0,05		Pazopanib	19,6	+6	0/6	<0,001
	Temozolomid	16,3	+9	0/6	<0,001		Temozolomid	0,7	-6	1/6 ¹	<0,001
	Bevacizumab	83,2	+13	0/6	>0,05		Bevacizumab	14,0	-2	0/6	<0,001

Des weiteren wurden nude-Mäuse mit intrazerebral wachsenden U87MG- sowie U373MG-Tumoren mit Sorafenib als auch Pazopanib therapiert (Abb. 6). Die U87MG-Tumore hatten in der PBS-Behandlungsgruppe nach 27 Tagen eine durchschnittliche

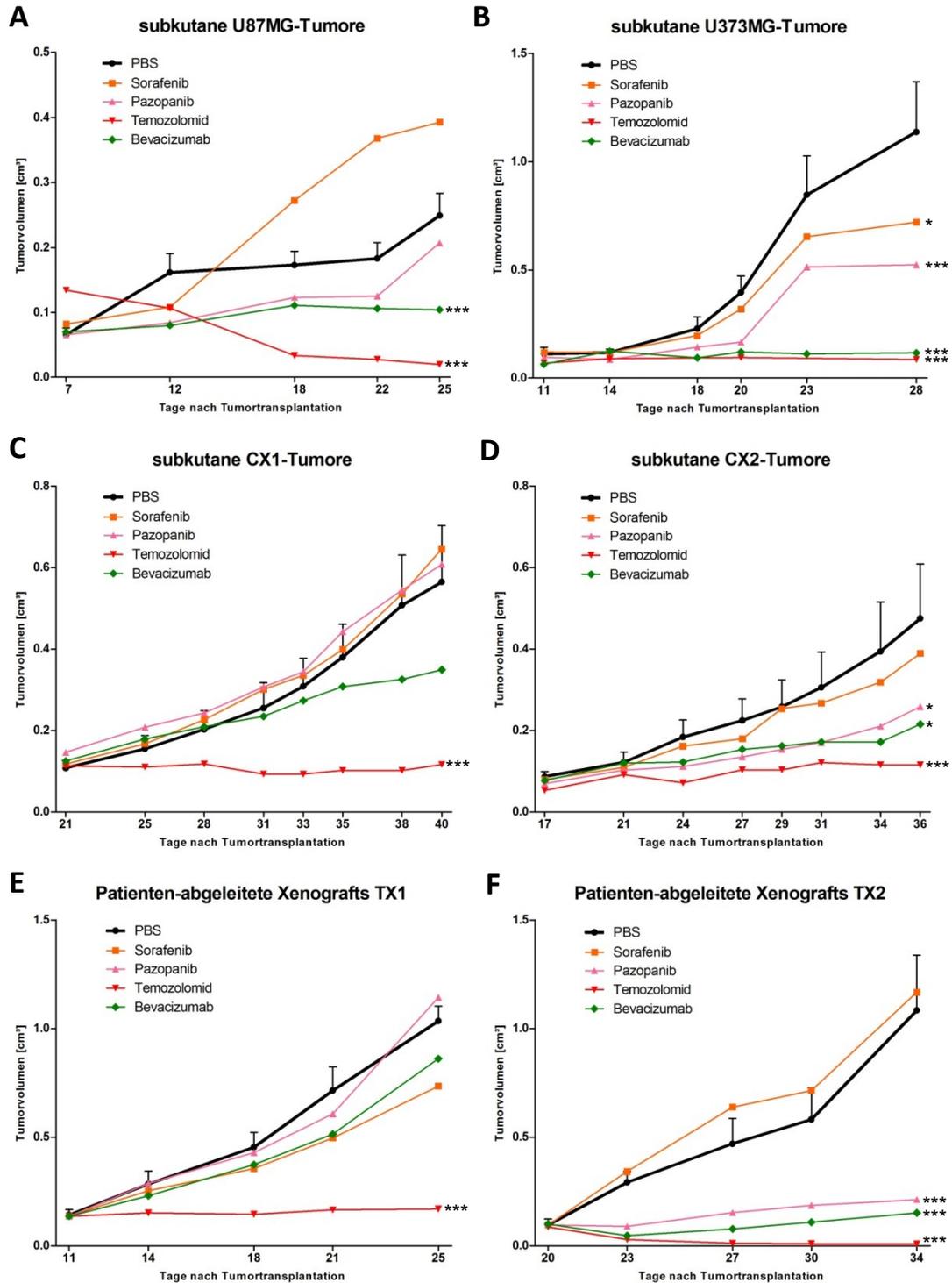


Abb. 5 Therapievorsuche mit Sorafenib sowie Pazopanib in subkutanen U87MG- (A), U373MG- (B), CX1- (C), CX2- (D), TX1- (E) und TX2-Glioblastom-Modellen (F). Jeder Versuch bestand aus Kontrollgruppen mit PBS sowie Temozolomid und Bevacizumab. Die Fehlerbalken geben die Standardfehler des Mittelwerts (SEM) an.

Größe von $9,0 \pm 5,7\text{mm}^2$ (Abb. 6A,C). Die U87MG-Gliome in der Sorafenib-Gruppe hatten eine Größe von $16,2 \pm 5,9\text{mm}^2$ ($p > 0,05$; Abb. 6A,D), die in der Pazopanib-Gruppe $8,9 \pm 6,4\text{mm}^2$ ($p > 0,05$; Abb. 6A,E) und die in der Bevacizumab-Gruppe $2,7 \pm 1,5\text{mm}^2$ ($p < 0,05$; Abb. 6A,F). Die durchschnittliche Größe der intrazerebralen U373MG-

Gliome betrug 33 Tage nach der Zellimplantation $2,6 \pm 2,1\text{mm}^2$ in der PBS-Gruppe (Abb. 6B,G), $3,1 \pm 1,6\text{mm}^2$ in der Sorafenib-Gruppe (Abb. 6B,H), $1,3 \pm 0,4\text{mm}^2$ in der Pazopanib-Gruppe (Abb. 6B,J) und $0,9 \pm 0,4\text{mm}^2$ in der Bevacizumab-Gruppe ($p < 0,05$; Abb. 6B,K).

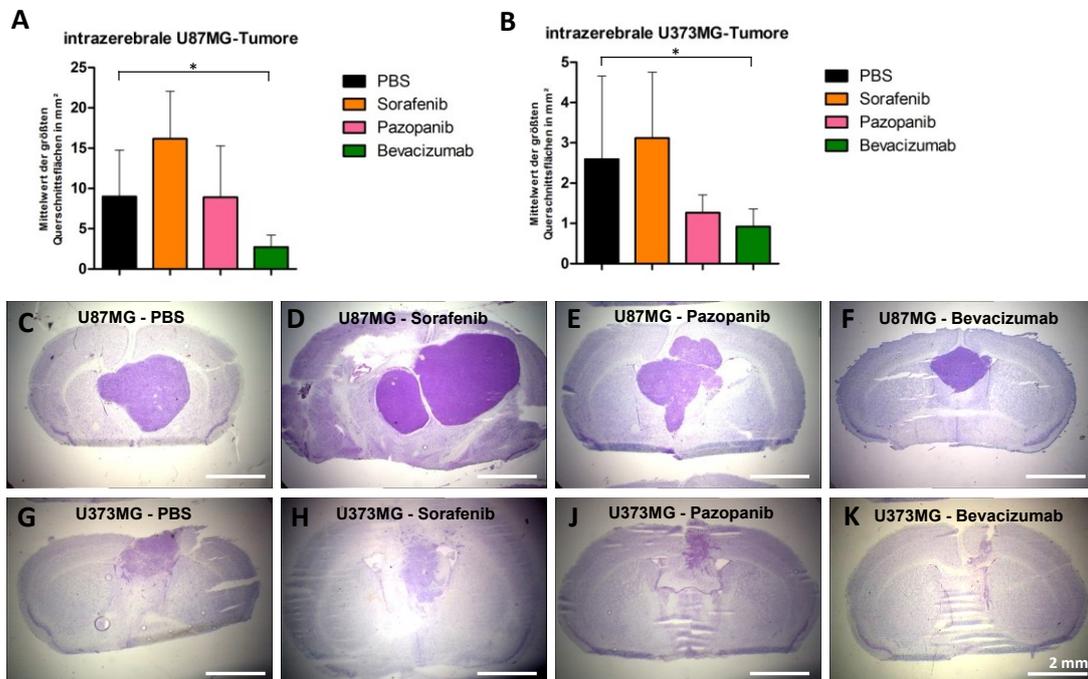


Abb. 6 Intrazerebrales Wachstum von U87MG- (A) und U373MG-Tumoren (B) unter einer Therapie mit Sorafenib sowie Pazopanib. Abbildungen der größten Querschnittsflächen der U87MG- (C-F) und U373MG-Gliome (G-K) in der jeweiligen Behandlungsgruppe.

3.2.2 Ki67-Proliferationsindex im Glioblastom-Gewebe nach einer Therapie mit Sorafenib sowie Pazopanib

Um zu untersuchen, ob sich die jeweilige Therapie mit Sorafenib oder Pazopanib auf die Tumorphiliferationsrate auswirkt, wurde im Gliomgewebe der Ki67-Proliferationsindex bestimmt (Abb. 7). Unter einer Sorafenib-Therapie verminderte er sich im Vergleich zur PBS-Gruppe von $10,1 \pm 1,9\%$ auf $7,7 \pm 2,0\%$ ($p < 0,001$; Abb. 7C,N,O) und war in subkutanen U87MG-Tumoren, CX1-Tumoren und intrazerebralen U87MG-Tumoren nicht signifikant zur PBS-Kontrollgruppe verändert ($p > 0,05$; Abb. 7A-D). Nach einer Pazopanib-Therapie verminderte sich der Ki67-Proliferationsindex in CX1-Glioblastomen im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe von $2,4 \pm 0,6\%$ auf $1,7 \pm 0,5\%$ ($p < 0,001$; A. 7B,J,L) und in intrazerebralen U87MG-Tumoren von $11,6 \pm 3,1\%$ auf $9,6 \pm 3,2\%$ ($p < 0,05$; Abb. 7D,R,T). Die Bevacizumab-Therapie verminderte den Ki67-Proliferationsindex in subkutanen U87MG-Tumoren von $13,2 \pm 4,3\%$ auf $7,5 \pm 2,6\%$ ($p < 0,001$; Abb. 7A,E,H) und in intrazerebralen U87MG-Tumoren von $11,6 \pm 3,1\%$ auf $3,9 \pm 1,5\%$ ($p < 0,001$; Abb. 7D,R,U). In Patienten-abgeleiteten Xenografts TX1 wurde

der Ki67-Proliferationsindex zusätzlich in der Temozolomid-Gruppe ermittelt und dieser verringerte sich von $10,1 \pm 1,9\%$ auf $3,9 \pm 1,4\%$ ($p < 0,001$; Abb. 7C).

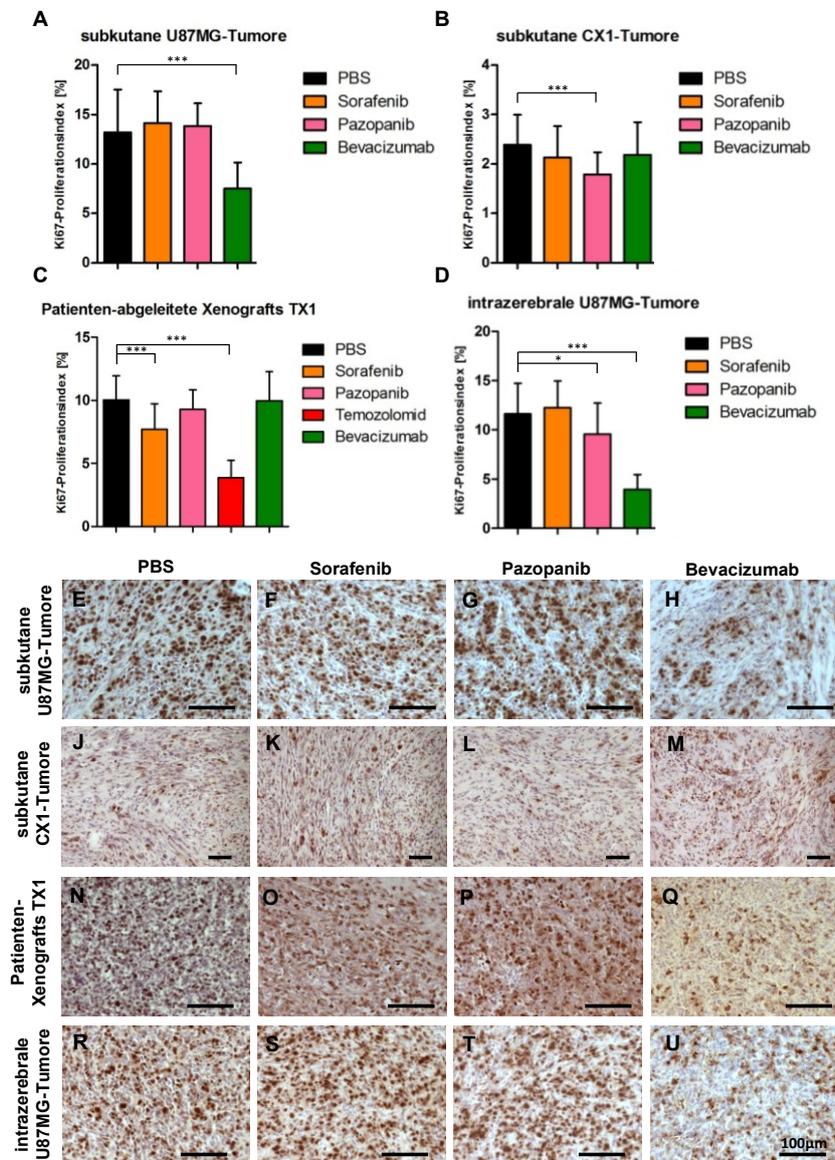


Abb. 7 Analyse des Ki67-Proliferationsindex nach einer Therapie mit Sorafenib sowie Pazopanib und den Kontrollen PBS und Bevacizumab in subkutanen U87MG-Tumoren (A), subkutanen CX1-Tumoren (B), Patienten-abgeleiteten Glioblastom-Xenografts TX1 (C) und intrazerebralen U87MG-Tumoren (D) mit jeweils repräsentativen Abbildungen der Anfärbungen gegen Ki67 unter PBS (E, J, N, R), Sorafenib (F, K, O, S), Pazopanib (G, L, P, T) und Bevacizumab (H, M, Q, U).

3.2.3 Untersuchung der Tumor-Angioneogenese im Gliomgewebe unter Sorafenib sowie Pazopanib

Um die Glioblastom-Angioneogenese zu analysieren, wurden im Tumorgewebe CD31-positive Endothelzellen mittels immunhistochemischer Anfärbung dargestellt (Abb. 8). Nach einer Sorafenib-Therapie sank die mittlere Anzahl von Endothelzellen je Gesichtsfeld in subkutanen U87MG-Tumoren von $47,1 \pm 11,4$ in der PBS-Gruppe auf $38,4 \pm 6,8$ ($p < 0,001$; Abb. 8A), auch in intrazerebralen U87MG-Tumoren war die Anzahl

3 Ergebnisse

der Endothelzellen unter Sorafenib (von $47,2 \pm 13,4$ auf $43,1 \pm 10,1$; $p < 0,001$; Abb. 8C,J,K) signifikant vermindert. Eine Pazopanib-Therapie veränderte die Anzahl von Endothelzellen in keinem der aufgeführten Gliom-Modelle signifikant (Abb. 8A-C, G,L). Die Bevacizumab-Therapie verminderte die Anzahl der Endothelzellen in jedem Tumormodell signifikant ($p < 0,001$; Abb. 8A-C,H,M). Des weiteren wurde die Anzahl von PDGFR β -positiven Perizyten analysiert und es zeigte sich ein signifikanter Abfall von $20,7 \pm 4,4$ in der PBS-Gruppe auf $18,5 \pm 4,6$ in der Sorafenib-Gruppe ($p < 0,05$; Abb. 8D,N,O) sowie auf $10,9 \pm 7,2$ in der Bevacizumab-Gruppe ($p < 0,001$; Abb. 8Q).

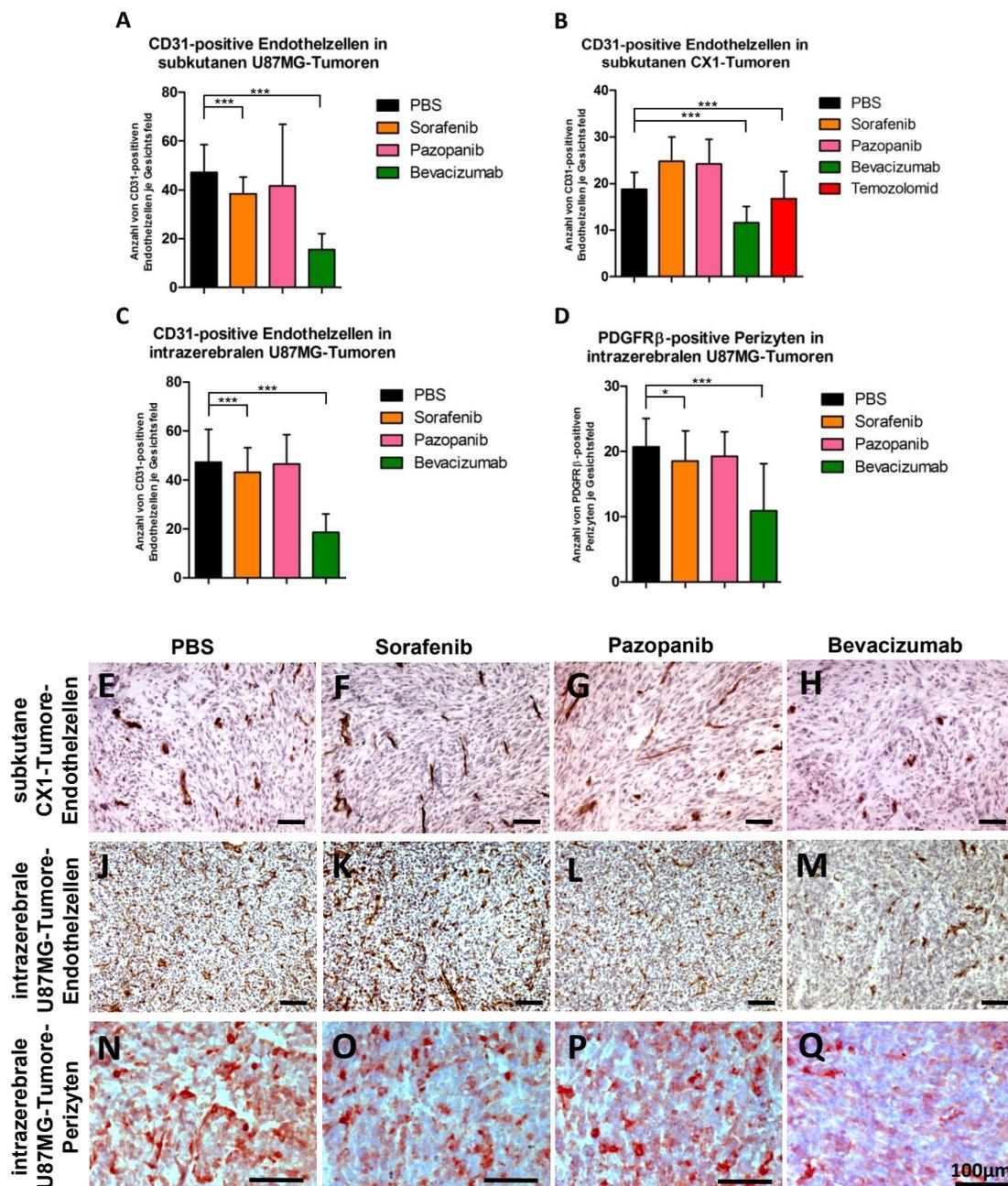


Abb. 8 Analyse der Glioblastom-Angiogenese mittels Anfärbung von CD31-positiven Endothelzellen in subkutanen U87MG-Tumoren (A), subkutanen CX1-Tumoren (B) und intrazerebralen U87MG-Tumoren (C) sowie Anfärbung von PDGFR β -positiven Perizyten in intrazerebralen U87MG-Tumoren (D). Repräsentative Abbildungen der immunhistochemischen Anfärbungen sind in (E bis Q) dargestellt.

3.2.4 EGF-Rezeptorexpressionsanalyse nach einer Therapie mit Sorafenib sowie Pazopanib

Mit immunhistochemischen Expressionsanalysen wurde die Expression des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) sowie dessen Phosphorylierung (phospho-EGFR) im Tumorgewebe intrazerebraler U87MG-Tumore ermittelt. Die mittlere Expressionsdichte von EGFR (Abb. 9A) betrug in der PBS-Gruppe $121,7 \pm 36,4$ (Abb. 9C), in der Sorafenib-Gruppe $20,0 \pm 23,6$ ($p < 0,001$; Abb. 9D), in der Pazopanib-Gruppe $42,5 \pm 28,2$ ($p < 0,001$; Abb. 9E) und in der Bevacizumab-Gruppe $32,9 \pm 21,9$ ($p < 0,001$; Abb. 9F). Die mittlere Expressionsdichte des phosphorylierten EGFR (Abb. 9B) betrug in der PBS-Gruppe $134,2 \pm 13,8$ (Abb. 9G), in der Sorafenib-Gruppe $64,2 \pm 46,4$ ($p < 0,001$; Abb. 9H), in der Pazopanib-Gruppe $111,3 \pm 26,9$ ($p < 0,001$; Abb. 9J) und in der Bevacizumab-Gruppe $79,6 \pm 30,3$ ($p < 0,001$; Abb. 9K).

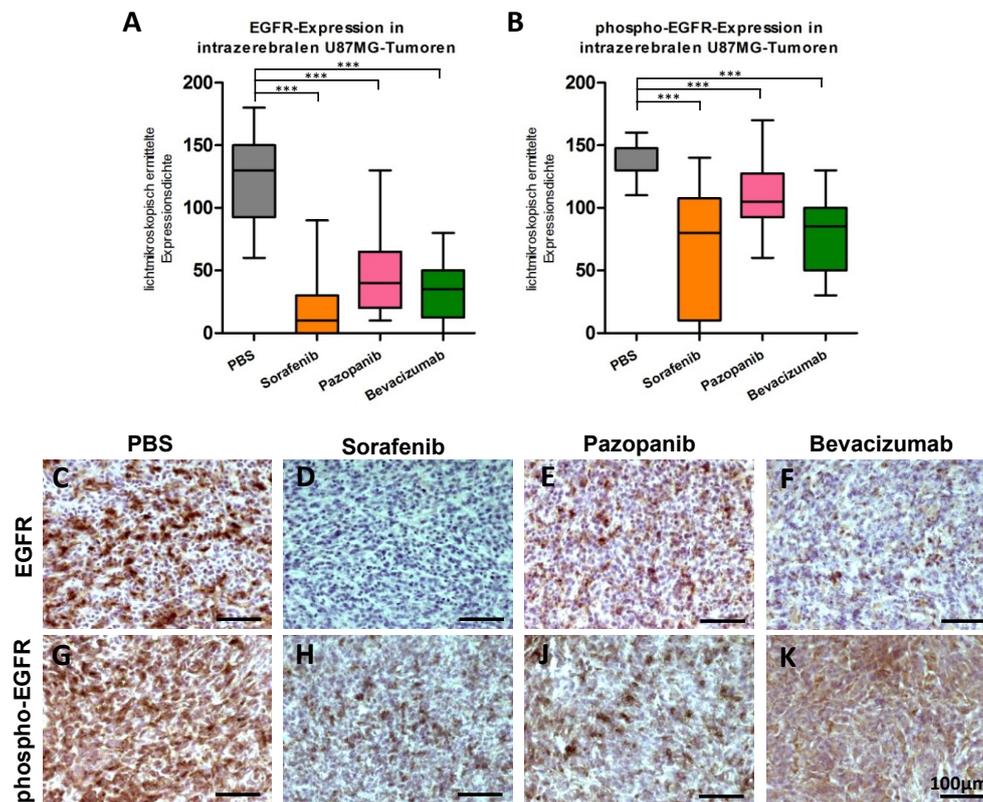


Abb. 9 Analyse der Expression von EGFR- (A) sowie phospho-EGFR (B) im Tumorgewebe intrazerebral wachsender U87MG-Gliome. Es sind repräsentative Abbildungen der immunhistochemischen Anfärbungen von EGFR in der PBS-Gruppe (C), der Sorafenib-Gruppe (D), der Pazopanib-Gruppe (E) und der Bevacizumab-Gruppe (F) sowie von phospho-EGFR in der PBS-Gruppe (G), der Sorafenib-Gruppe (H), der Pazopanib-Gruppe (J) und der Bevacizumab-Gruppe (K) dargestellt.

3.3 Therapie humaner Glioblastome mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Axitinib

3.3.1 Axitinib verzögert temporär das Wachstum Bevacizumab-resistenter, Patienten-abgeleiteter Glioblastom-Xenografts

Patienten-abgeleitete Xenografts TX1 wurden mit Axitinib, Bevacizumab sowie Temozolomid therapiert. Die TX1-Glioblastome verringerten unter Axitinib ihre mittlere Tumorgöße vom 8. bis 16. postoperativen Tag deutlich, im Bezug zur PBS-Kontrollgruppe am 16. postoperativen Tag statistisch aber nicht signifikant ($T/C=73,1\%$, $p>0,05$; Abb. 10A,C). Anschließend nahm die Tumorgöße wieder zu und es zeigte sich am 23. postoperativen Tag kein signifikanter Unterschied der Tumorgößen zwischen der Axitinib- und der PBS-Gruppe ($T/C=88,7\%$, $p>0,05$; Abb. 10A,C).

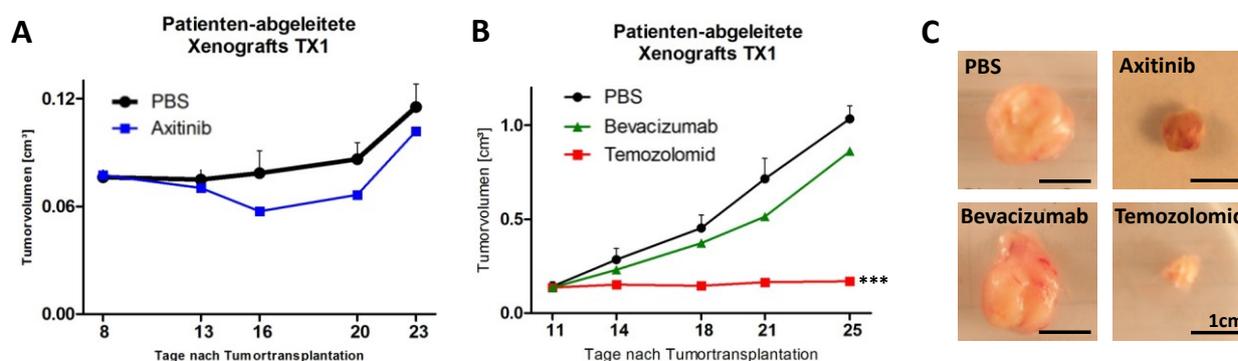


Abb. 10 Darstellung der Wachstumskurven der subkutanen Patienten-abgeleiteten Xenografts TX1 unter PBS, Axitinib (A), Bevacizumab sowie Temozolomid (B). Repräsentative Abbildungen der Tumorgößen sind in (C) dargestellt.

Tab. 9 Versuchsdaten der Tierexperimente mit Axitinib an Patienten-abgeleiteten Xenografts

subkutanes Tumormodell	Substanz	optimaler T/C [%]	Körpergewichtsänderung [%]	Sterbefälle / total	p-Werte zu PBS
TX1 (NSG)	PBS		+12	0/8	
	Axitinib	73,1	+5	0/8	>0,05
	Temozolomid	16,3	+9	0/6	<0,001
	Bevacizumab	83,2	+13	0/6	>0,05

Des weiteren wurden TX1-Xenografts mit Bevacizumab therapiert und hierbei zeigte sich im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe keine signifikante Verzögerung des Tumorwachstums ($T/C=83,3\%$, $p>0,05$; Abb. 10B,C). Die Temozolomid-Therapie verzögerte das Glioblastomwachstum signifikant ($T/C=16,3\%$, $p<0,001$; Abb. 10B,C).

3.3.2 Axitinib senkt den Ki67-Proliferationsindex in Patienten-abgeleiteten Glioblastom-Xenografts

In den Therapiegruppen mit Axitinib, Bevacizumab sowie Temozolomid wurde der Ki67-Proliferationsindex in Patienten-abgeleiteten Xenografts TX1 bestimmt (Abb. 11).

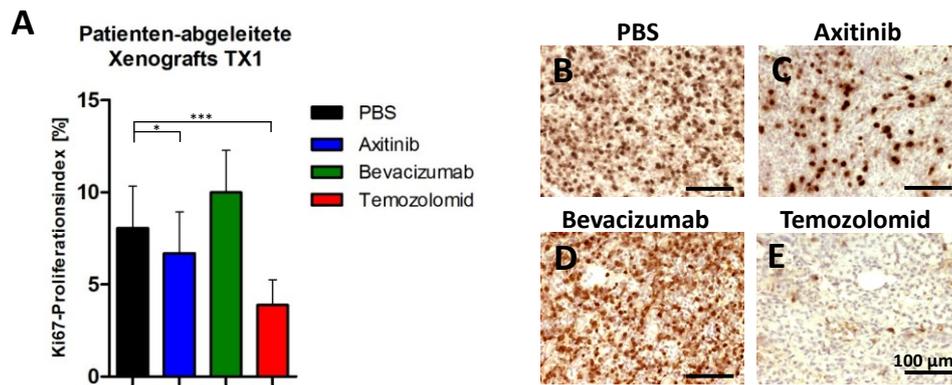


Abb. 11 Analyse der Ki67-Proliferationsindices im Tumorgewebe Patienten-abgeleiteter Xenografts TX1 (A) unter PBS (B), Axitinib (C), Bevacizumab (D) sowie Temozolomid (E).

In der PBS-Gruppe betrug dieser $8,1 \pm 2,3\%$ (Abb. 11A,B) und in der Axitinib-Gruppe verringerte er sich statistisch signifikant auf $6,7 \pm 2,3\%$ ($p < 0,05$; Abb. 11A,C). In der Bevacizumab-Gruppe veränderte sich der Ki67-Proliferations-Index nicht signifikant zur PBS-Kontrollgruppe (Abb. 11A,D), in der Temozolomid-Gruppe sank er auf $3,9 \pm 1,4\%$ ($p < 0,001$; Abb. 11A,E).

3.3.3 Axitinib reduziert die Anzahl von CD31-positiven Endothelzellen im Glioblastomgewebe

Im Gewebe der Patienten-abgeleiteten Xenografts TX1 wurde die Blutgefäßdichte unter einer Axitinib-Therapie mittels Anfärbung CD31-positiver Endothelzellen bestimmt (Abb. 12A).

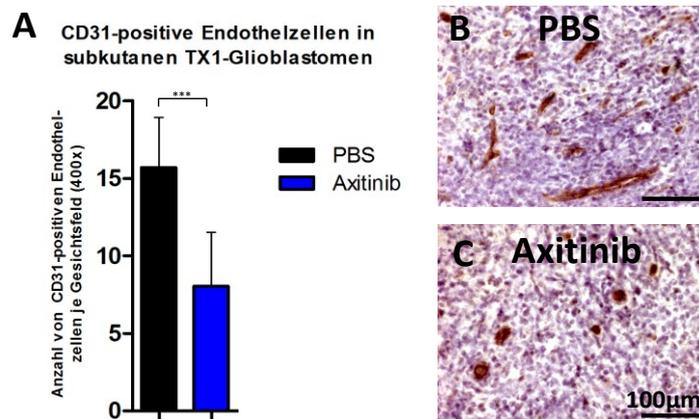


Abb. 12 Analyse der Glioblastom-Angiogenese mittels Bestimmung der Anzahl von CD31-positiven Endothelzellen im Glioblastomgewebe Patienten-abgeleiteter Xenografts TX1 (A) mit repräsentativen Abbildungen der Anfärbungen in der PBS-Gruppe (B) sowie in der Axitinib-Gruppe (C).

In der PBS-Gruppe betrug die mittlere Gefäßdichte $15,7 \pm 3,2$ je Gesichtsfeld (Abb. 12A,B). In der Axitinib-Therapiegruppe reduzierte sich die durchschnittliche Blutgefäßdichte statistisch signifikant auf $8,0 \pm 3,5$ je Gesichtsfeld ($p < 0,001$; Abb. 12A,C). Des weiteren wurde lichtmikroskopisch beobachtet, dass die Endothelzellen im

Glioblastomgewebe der mit Axitinib behandelten Labormäuse eine im Vergleich zur PBS-Gruppe verminderte Größe sowie eine deutlich vermehrt abgerundete Morphologie aufwiesen (Abb. 12B,C).

3.3.4 Axitinib reduziert die Anzahl von NG2-positiven Perizyten im Glioblastomgewebe

In den Patienten-abgeleiteten Xenografts TX1 wurden die Gefäß-Perizyten im Glioblastomgewebe mittels immunhistochemischer Anfärbung gegen den Perizytenmarker NG2 unter einer Axitinib-Therapie analysiert.

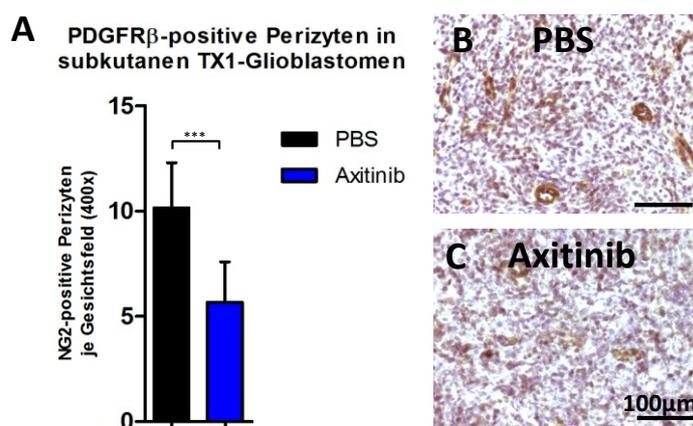


Abb. 13 Immunhistochemische Analyse von PDGFR β -positiven Gefäßperizyten im Glioblastomgewebe Patienten-abgeleiteter TX1-Xenografts (A) mit repräsentativen Abbildungen der Anfärbungen in der PBS-Kontrollgruppe (B) sowie in der Axitinib-Therapiegruppe (C).

Die mittlere Anzahl von Gefäß-Perizyten betrug in der PBS-Gruppe $10,2 \pm 2,2$ je Gesichtsfeld (Abb. 13A,B). Demgegenüber war die Perizyten-Dichte im Glioblastomgewebe der mit Axitinib therapierten Labormäuse auf $5,7 \pm 1,9$ je Gesichtsfeld statistisch signifikant vermindert ($p < 0,001$; Abb. 13A,C).

3.3.5 Verminderte Ummantelung CD31-positiver Endothelzellen mit NG2-positiven Perizyten durch Axitinib

Es wurde die Lagebeziehung zwischen CD31-positiven Endothelzellen und NG2-positiven Perizyten im Tumorgewebe Patienten-abgeleiteter Xenografts TX1 analysiert (Abb. 14). Hierfür wurden mittels einer Fluoreszenz-Dreifachfärbung die Zellkerne blau, die Endothelzellen grün und die Perizyten rot markiert. Im Glioblastomgewebe der PBS-Kontrollgruppe war eine im Vergleich zur Axitinib-Gruppe höhere Anzahl von Gefäßen vorhanden (Abb. 12A), welche zu $87,7 \pm 9,0\%$ aus CD31-positiven Endothelzellen sowie aus NG2-positiven Perizyten bestanden (Abb. 14A,J). 12,3% der Gefäße bestanden nur aus CD31-positiven Endothelzellen (Abb. 14A). In der Axitinib-Gruppe

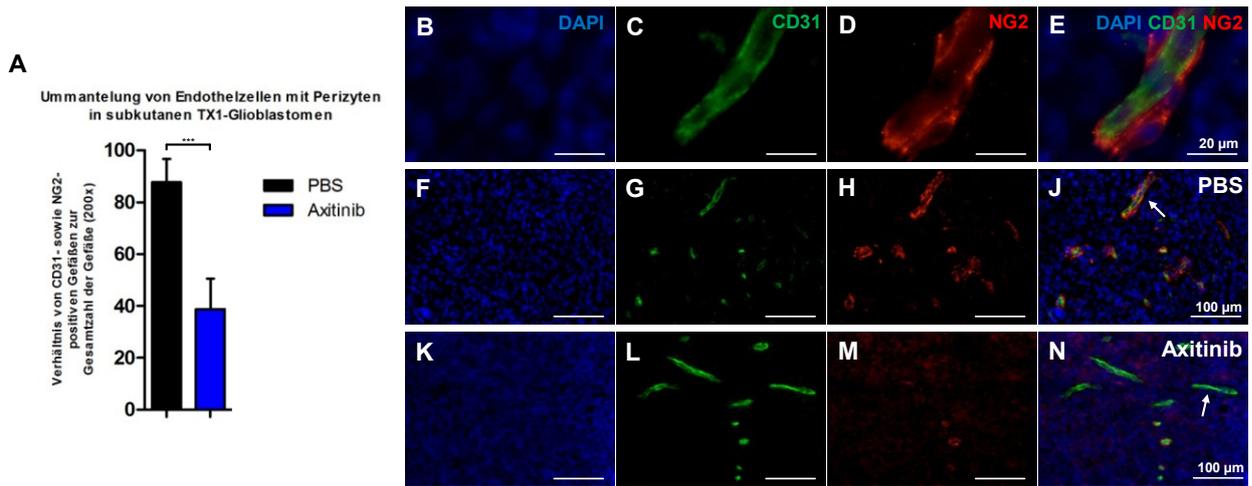


Abb. 14 Immunohistochemische Fluoreszenz-Dreifach-Färbung zur Darstellung der Lagebeziehung zwischen CD31-positiven Endothelzellen und NG2-positiven Perizyten im Tumorgewebe Patienten-abgeleiteter Xenografts TX1 mit Analyse des Anteils der mit Perizyten ummantelten Endothelzellen in der PBS- und Axitinib-Gruppe (A). Die Zellkerne sind mit DAPI blau angefärbt (B,F,K), die CD31-positiven Endothelzellen erscheinen grün (C,G,L) und die NG2-positiven Perizyten rot (D,H,M). Es sind fusionierte Abbildungen in einer großen Vergrößerung dargestellt (E) sowie repräsentative fusionierte Bilder in der PBS-Gruppe (J), der Pfeil zeigt auf ein Gefäß mit Endothelzellen und Perizyten, und in der Axitinib-Gruppe (N), der Pfeil zeigt auf ein Gefäß ohne Perizyten.

waren im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe insgesamt weniger Gefäße vorhanden (Abb. 12A). Diese bestanden zu $38,8 \pm 11,8\%$ aus CD31-positiven Endothelzellen und NG2-positiven Perizyten, statistisch signifikant weniger zur PBS-Kontrollgruppe ($p < 0,001$; Abb. 14A). Zu $61,2\%$ bestanden die Gefäße im Glioblastomgewebe ausschließlich aus CD31-positiven Endothelzellen (Abb. 14A,M,N).

3.3.6 Expressionsanalyse von VEGFR1, EGFR, PDGFR β und VEGF in mit Axitinib behandelten Glioblastom-Xenografts

Mittels immunohistochemischen Expressionsanalysen wurde untersucht, ob sich eine Axitinib-Therapie auf die Expression von VEGFR1, EGFR, PDGFR β oder VEGF im Tumorgewebe Patienten-abgeleiteter Xenografts TX1 auswirkt (Abb. 15). Der VEGFR1 und der PDGFR β wurden von den Tumorzellen membranständig exprimiert (Abb. 15B,C,H,J), der EGFR zeigte zusätzlich eine zytoplasmatische Anfärbung (Abb. 15E,F). Der VEGF zeigte ein Expressionsmuster in den Gliomzellen als auch in den Endothelzellen (Abb. 15L,M). Die ermittelte Expressionsdichte von VEGFR1 betrug $158,8 \pm 32,8$ in der PBS-Gruppe und $146,3 \pm 34,8$ in der Axitinib-Gruppe ($p > 0,05$; Abb. 15A,B,C), die von EGFR $177,5 \pm 12,9$ in der PBS-Gruppe und $178,3 \pm 14,7$ in der Axitinib-Gruppe ($p > 0,05$; Abb. 15D,E,F), die von PDGFR β $230,8 \pm 12,4$ in der PBS-Gruppe und $236,2 \pm 9,6$ in der Axitinib-Gruppe ($p > 0,05$; Abb. 15G,H,J) und die von VEGF $144,3 \pm 30,8$ in der PBS-Gruppe und $152,1 \pm 28,6$ in der Axitinib-Gruppe ($p > 0,05$; Abb. 15K,L,M).

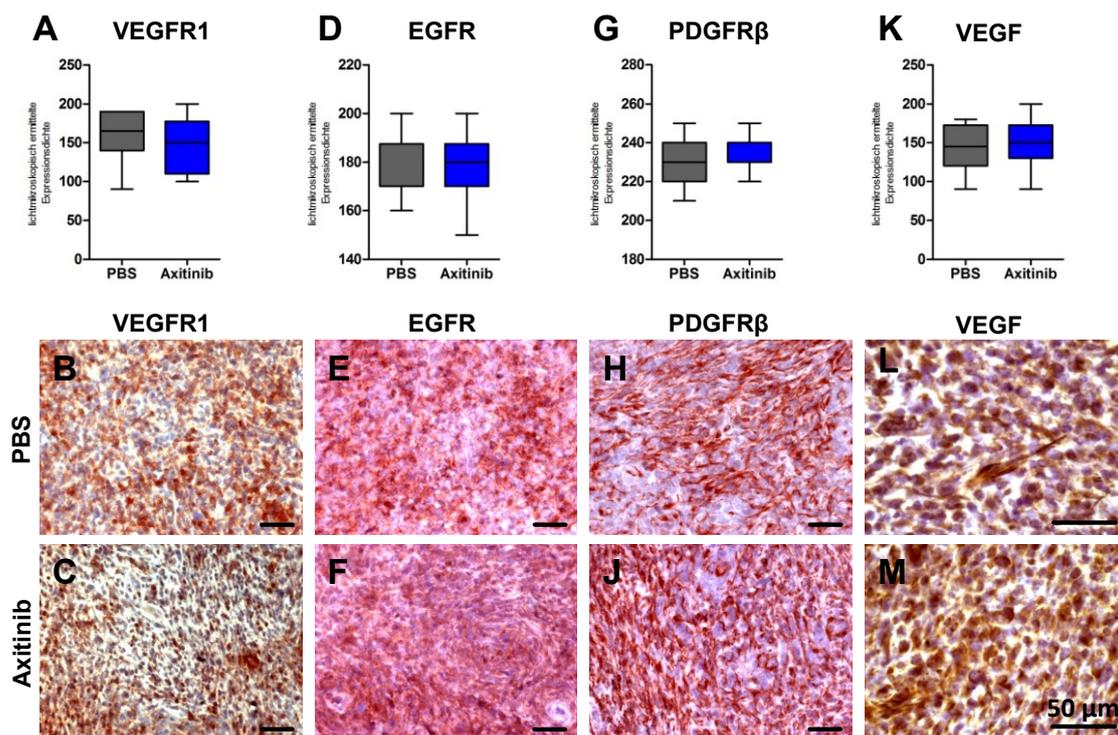


Abb. 15 Immunhistochemische Analyse der Expression von VEGFR1 (A-C), EGFR (D-F), PDGFRβ (G-I) und VEGF (K-M) unter einer Therapie mit Axitinib. In der mit PBS behandelten Kontrollgruppe bestehen im Vergleich zur Axitinib-Therapiegruppe keine Unterschiede in der Expressionsdichte der untersuchten Proteine.

3.3.7 Expressionsanalyse von HIF1α in mit Axitinib behandelten Glioblastom-Xenografts

Der Hypoxie-induzierte Faktor 1α (HIF1α) wurde immunhistochemisch im Glioblastomgewebe Patienten-abgeleiteter Xenografts TX1 angefärbt. Es wurde beobachtet, dass im Tumorgewebe der Glioblastome in der mit PBS behandelten Kontrollgruppe nur vereinzelt HIF1α-positive Tumorzellen zu finden sind (Abb. 16A,B). In den mit Axitinib therapierten Glioblastomen findet man hingegen mehrere Areale mit deutlich HIF1α-positiven Glioblastomzellen (Abb. 16C,D).

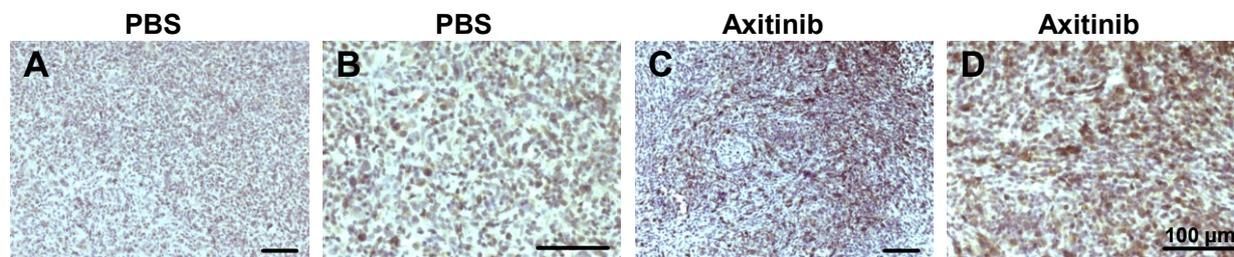


Abb. 16 Immunhistochemische Anfärbung von HIF1α im Glioblastomgewebe Patienten-abgeleiteter Xenografts TX1. Aufgrund des Expressionsmusters mit nur teilweise angefärbten Tumorealen konnte die Expressionsdichte lichtmikroskopisch nicht bestimmt werden. In der Kontrollgruppe (A,B) sind nur vereinzelt HIF1α-positive Tumorzellen zu finden, in der Axitinib-Gruppe sind mehrere Tumoreale HIF1α positiv (C,D).

3.3.8 Verminderung der mRNA-Expression von VEGF-A und PLGF in Glioblastomen durch Axitinib

Es wurde mittels PCR die Expression der mRNA von VEGF-A sowie PLGF im Gewebe von Patienten-abgeleiteten Xenografts TX1 untersucht. Die mittleren ΔCT -Werte für die Expression von VEGF-A waren $6,9 \pm 0,2$ in der PBS-Gruppe und $10,1 \pm 0,1$ in der Axitinib-Gruppe und für die Expression von PLGF $14,4 \pm 0,3$ in der PBS-Gruppe und $17,0 \pm 0,1$ in der Axitinib-Gruppe. Die relativen Veränderungen der mRNA-Expression wurden mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode bestimmt. Die mRNA-Expression von VEGF-A war unter Axitinib im Vergleich zur PBS-Gruppe auf das $0,11 \pm 0,17$ fache erniedrigt (Abb. 17A). Die mRNA-Expression von PLGF war unter Axitinib im Vergleich zur PBS-Gruppe auf das $0,17 \pm 0,29$ fache vermindert (Abb. 17A).

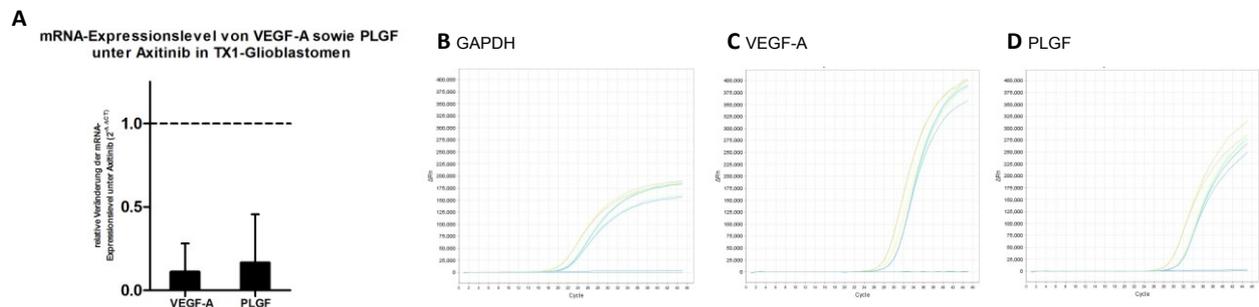


Abb. 17 Analyse der Expression der mRNA von VEGF-A und PLGF im Glioblastomgewebe aus mit PBS sowie Axitinib behandelten Labormäusen mit TX1-Xenografts. Darstellung der relativen Änderung der mRNA-Expression von VEGF-A sowie PLGF in der Axitinib-Gruppe relativ zur Kontrollgruppe (A). Die Amplifikations-Plots der PCR-Reaktionen mit GAPDH (B), VEGF-A (C) und PLGF (D) zeigen jeweils exponentielle Kurvenanstiege mit funktionierenden PCR-Reaktionen an.

3.3.9 Axitinib führt zum apoptotischen Zelltod in Patienten-abgeleiteten Glioblastom-Xenografts

Anhand der immunhistochemischen Anfärbung von Caspase3 wurden im Tumorgewebe Patienten-abgeleiteter Xenografts TX1 apoptotische Zellen dargestellt. In den mit PBS behandelten Glioblastomen waren vereinzelt apoptotische Tumorzellen zu finden (Abb. 18A,B). In den Xenografts der Axitinib-Gruppe wurden deutlich vermehrt apoptotische Glioblastomzellen angefärbt (Abb. 18C,D).

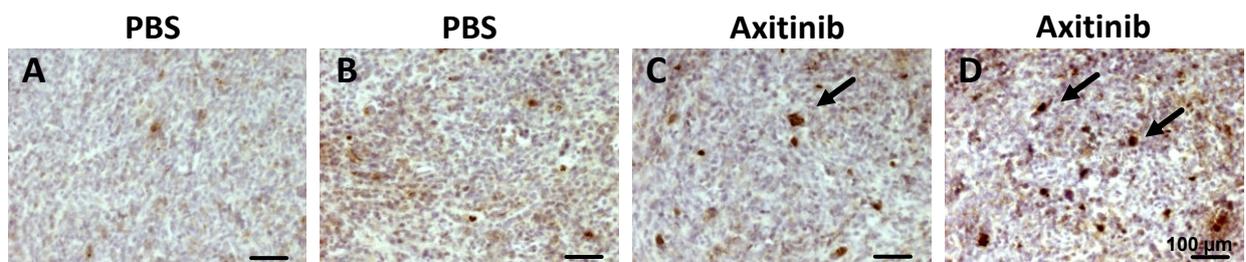


Abb. 18 Immunhistochemische Darstellung der Caspase3 in Patienten-abgeleiteten Glioblastom-Xenografts TX1 in der PBS-Kontrollgruppe (A,B) sowie in der Axitinib-Gruppe (C,D). Die Pfeile markieren die in der Axitinib-Gruppe vermehrt vorliegenden apoptotischen Glioblastomzellen.

3.4 Epigenetische Therapie humaner Glioblastome mit 5-Azacytidin sowie Valproinsäure

3.4.1 5-Azacytidin reduziert die Vitalität humaner Glioblastomzellen *in vitro*

Mit MTT-Assays wurde die Vitalität humaner Glioblastom-Zelllinien als auch humaner Glioblastom-Primärzellen analysiert (Abb. 19). In den Zelllinien U87MG und U373MG zeigte sich eine graduelle, statistisch signifikante Abnahme der Zellvitalität im Vergleich zur Kontrolle korrelierend zu ansteigenden Konzentrationen von 5-Azacytidin herunter bis auf jeweils $55,7 \pm 14,1\%$ und $58,2 \pm 25,5\%$ bei einer Konzentration von $50,0\mu\text{g/ml}$ 5-Azacytidin ($p < 0,05$; Abb. 19). Primäre Glioblastomzellen C1 und C2 zeigten ebenfalls einen graduellen, statistisch signifikanten Abfall der Zellvitalität unter ansteigender Konzentration von 5-Azacytidin mit einer reduzierten Zellvitalität auf jeweils $75,4 \pm 19,4\%$ und $79,6 \pm 11,0\%$ nach Inkubation mit $50,0\mu\text{g/ml}$ 5-Azacytidin ($p < 0,05$; Abb. 19).

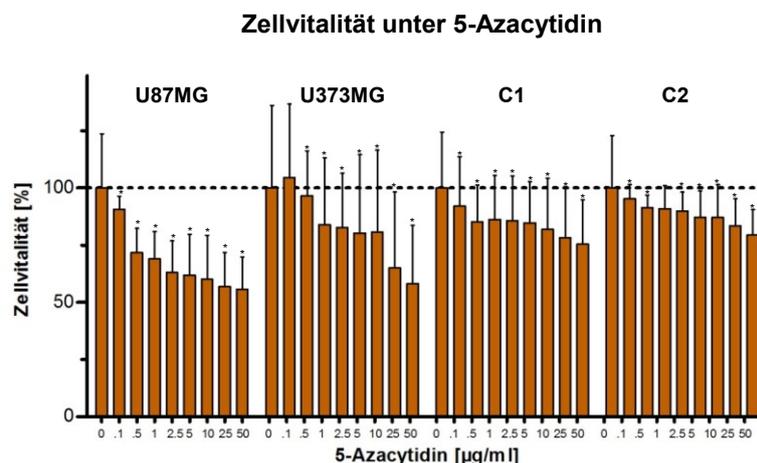


Abb. 19 Darstellung der Zellvitalität von humanen Glioblastom-Zelllinien U87MG und U373MG sowie primären Glioblastomzellen C1 und C2 unter ansteigenden Konzentrationen von 5-Azacytidin (0,1 bis $50,0\mu\text{g/ml}$). Die mittleren Absorptionswerte sind relativ zu den Werten unter Kontrollbedingungen (0 $\mu\text{g/ml}$; jeweils 100%) angegeben.

3.4.2 5-Azacytidin führt zur Apoptose humaner Glioblastomzellen *in vitro*

Nach der Inkubation von U87MG-, U373MG- und C1-Glioblastomzellen mit 1,0 sowie $25,0\mu\text{g/ml}$ 5-Azacytidin wurde beobachtet, dass sich im Vergleich zur Kontrolle unter Standardbedingungen eine deutlich abgerundete Zellmorphologie herausbildete und die charakteristischen Zellausläufer sehr häufig nicht mehr vorhanden waren (Abb. 20A,B,C). Weiterhin wurde der Apoptose-Marker Caspase3 in den Glioblastomzellen immunchemisch angefärbt und es zeigten sich unter 1,0 sowie $25,0\mu\text{g/ml}$ 5-Azacytidin deutlich vermehrt positiv angefärbte, apoptotische Glioblastomzellen (Abb. 20D,E,F).

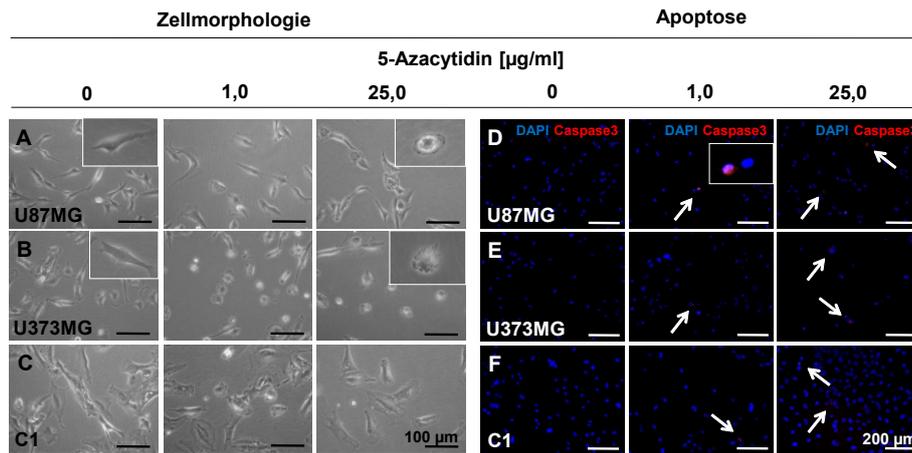


Abb. 20 Lichtmikroskopische Abbildungen von U87MG- (A), U373MG- (B) sowie C1-Glioblastomzellen (C) unter der Einwirkung von 0, 1,0 sowie 25,0 $\mu\text{g/ml}$ 5-Azacytidin. Abbildungen von immunchemischen Fluoreszenz-Färbungen gegen den Apoptose-Marker Caspase3 (rot) von U87MG- (D), U373MG- (E) und C1-Zellen (F) sowie Blaufärbung der Zellkerne mit DAPI. Zur Verdeutlichung der charakteristischen Zellmorphologie sind einzelne Zellen in den weißen Kästen zusätzlich vergrößert dargestellt. Die Pfeile zeigen auf apoptotische, Caspase3-positive Glioblastomzellen.

3.4.3 5-Azacytidin vermindert die Migration humaner Glioblastomzellen *in vitro*

Mittels *in vitro*-scratch Assays wurde untersucht, ob die Migrationsrate humaner U373MG-Glioblastomzellen durch 5-Azacytidin beeinflusst wird (Abb. 21). Nach vier Stunden Migrationszeit waren unter Kontrollbedingungen durchschnittlich $48,9 \pm 12,4$ Zellen (Abb. 21A,B,C) und nach Gabe von $5,0 \mu\text{g/ml}$ 5-Azacytidin durchschnittlich $35,7 \pm 13,8$ Zellen (Abb. 21A,D,E) je scratch-Bereich in die freien Flächen migriert. Die Abnahme der Migrationsrate unter 5-Azacytidin war statistisch signifikant ($p < 0,001$; Abb. 21A). Die verminderte Migration der U373MG-Zellen unter 5-Azacytidin ist anhand größerer zellfreier Flächen zwischen den Migrationsfronten deutlich zu erkennen (Abb. 21C,E).

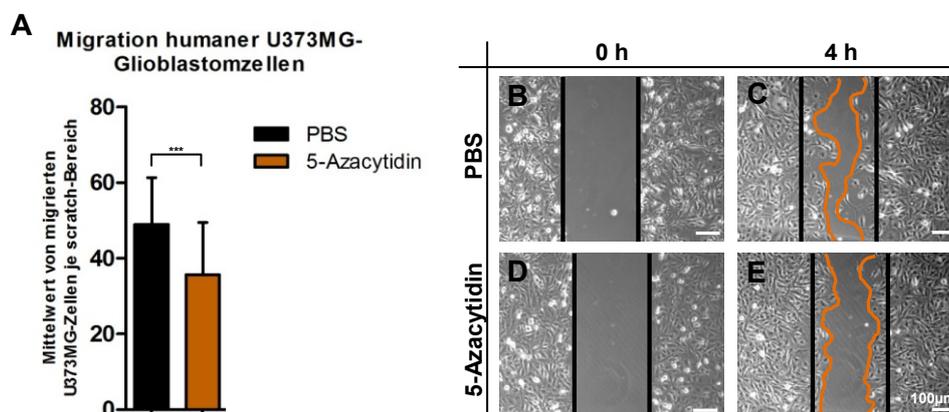


Abb. 21 Analyse der Migration von humanen U373MG-Zellen unter dem Einfluss von PBS als Kontrolle sowie 5-Azacytidin (A). Abbildungen von repräsentativen Bereichen der scratch-Assays unmittelbar nach Setzen des scratches unter Kontrollbedingungen mit PBS (B) sowie 5-Azacytidin (D) und nach vier Stunden Inkubationszeit unter PBS (C) sowie 5-Azacytidin (E). Die schwarzen Balken verdeutlichen die Randbereiche des jeweiligen scratches. Die farbigen Markierungen in (C) und (E) verdeutlichen die Migrationsfronten der Gliomzellverbände.

3.4.4 Auswirkungen einer Therapie mit 5-Azacytidin sowie Valproinsäure auf das Wachstum subkutaner und intrazerebraler Glioblastom-Xenografts

Der Einfluss der epigenetisch wirksamen Substanzen 5-Azacytidin sowie Valproinsäure auf das Wachstum von subkutanen U87MG-, U373MG, CX1- und CX2-Tumoren sowie von Patienten-abgeleiteten Xenografts TX1 und TX2 wurde untersucht (Tab. 8 10, Abb. 22). 5-Azacytidin verzögerte das Wachstum subkutaner U87MG-Tumore (T/C=66,1%, Abb. 22A), Patienten-abgeleiteter Xenografts TX1 (T/C=42,6%, Abb. 22E) sowie in TX2-Glioblastomen (T/C=27,6%, Abb. 22F), jeweils signifikant zur PBS-Kontrollgruppe ($p < 0,001$, Tab. 10). Valproinsäure verzögerte das Tumorwachstum in subkutanen U373MG-Tumoren (T/C=46,5%, $p < 0,01$, Abb. 22B). Eine Therapie der Labormäuse mit Temozolomid verhinderte signifikant das Gliomwachstum in allen subkutanen Modellen ($p < 0,001$; Tab. 810, Abb. 22A-F). In den Bevacizumab-Therapiegruppen war das Tumorwachstum signifikant in subkutanen U87MG-Tumoren (T/C=41,7%, $p < 0,001$, Tab. 10), U373MG-Tumoren (T/C=7,7%, $p < 0,001$, Tab. 10), CX2-Tumoren (T/C=40,8%, $p < 0,05$, Tab. 10) sowie in TX2-Patienten-Glioblastomen (T/C=14,0%, $p < 0,001$, Tab. 10) vermindert.

Tab. 10 Versuchsdaten der Tierexperimente mit 5-Azacytidin und Valproinsäure an subkutanen Glioblastommodellen

subkutanes Tumormodell	Substanz	optimaler T/C [%]	Körpergewichts-änderung [%]	Sterbefälle / total	p-Werte zu PBS	subkutanes Tumormodell	Substanz	optimaler T/C [%]	Körpergewichts-änderung [%]	Sterbefälle / total	p-Werte zur PBS-Gruppe
U87MG (nude)	PBS		+4	0/9		U373MG (nude)	PBS		+6	0/10	
	5-Azacytidin	22,8	-7	0/8	<0,001		5-Azacytidin	66,1	+6	0/8	>0,05
	Valproinsäure	68,6	+5	0/8	>0,05		Valproinsäure	46,4	+7	0/8	<0,01
	Temozolomid	7,9	+1	0/8	<0,001		Temozolomid	4,0	0	0/8	<0,001
	Bevacizumab	41,7	-2	0/8	<0,001		Bevacizumab	7,7	+7	0/8	<0,001
CX1 (nude)	PBS		+12	0/8		CX2 (nude)	PBS		+14	0/7	
	5-Azacytidin	114,3	+10	0/7	>0,05		5-Azacytidin	107,5	+14	0/6	>0,05
	Valproinsäure	128,8	+10	0/8	>0,05		Valproinsäure	84,6	+17	0/6	>0,05
	Temozolomid	20,7	+6	0/8	<0,001		Temozolomid	35,8	+4	0/8	<0,001
	Bevacizumab	61,8	+5	0/8	>0,05		Bevacizumab	40,8	+15	0/6	<0,05
TX1 (NSG)	PBS		+3	0/6		TX2 (NSG)	PBS		+8	0/6	
	5-Azacytidin	42,6	-3	1/6	<0,001		5-Azacytidin	27,6	-3	0/6	<0,001
	Valproinsäure	121,5	0	0/6	>0,05		Valproinsäure	97,5	0	0/6	>0,05
	Temozolomid	16,3	+2	0/6	<0,001		Temozolomid	0,7	-6	1/6 ¹	<0,001
	Bevacizumab	83,2	+4	0/6	>0,05		Bevacizumab	14,0	-2	0/6	<0,001

Weiterhin wurden nude-Mäuse mit intrazerebralen U87MG- sowie U373MG-Gliomen mit 5-Azacytidin als auch Valproinsäure therapiert (Abb. 23). Die U87MG-Tumore wiesen 27 Tage nach der Zellinokulation in der PBS-Behandlungsgruppe eine durchschnittliche Größe von $9,0 \pm 5,7 \text{mm}^2$ auf (Abb. 23A,C). Die U87MG-Tumore in der 5-Azacytidin-Gruppe hatten eine Größe von $3,9 \pm 2,7 \text{mm}^2$ ($p < 0,05$; Abb. 23A,D), die in

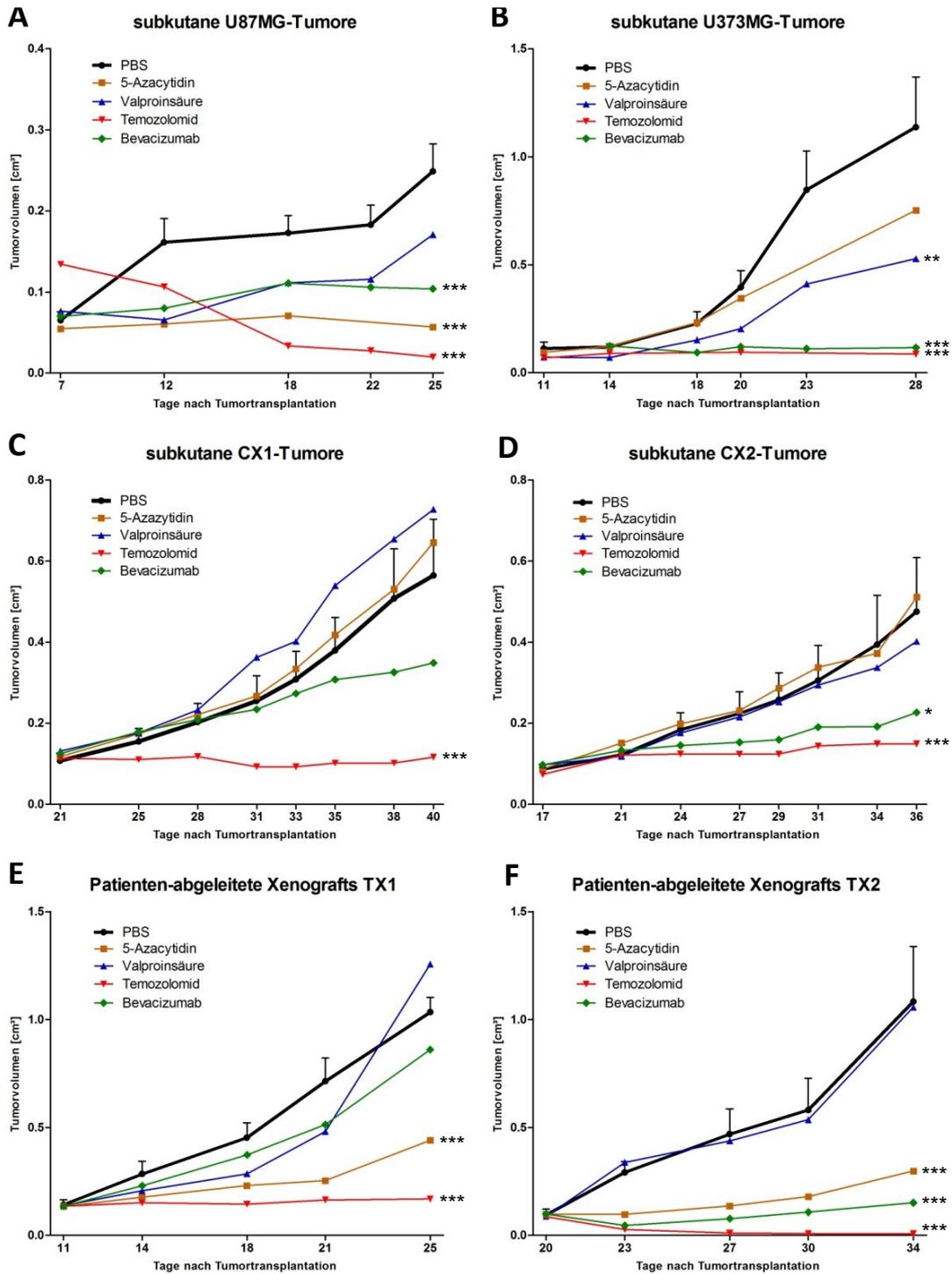


Abb. 22 Therapieversuche mit 5-Azacytidin sowie Valproinsäure in subkutanen U87MG- (A), U373MG- (B), CX1- (C), CX2- (D), TX1- (E) und TX2-Glioblastom-Modellen (F). Jeder Versuch bestand außerdem aus Kontrollgruppen mit PBS sowie Temozolomid als auch Bevacizumab.

der Valproinsäure-Gruppe $7,0 \pm 3,3\text{mm}^2$ ($p > 0,05$; Abb. 23A,E) und die in der Bevacizumab-Gruppe $2,7 \pm 1,5\text{mm}^2$ ($p < 0,05$; Abb. 23A,F). Der durchschnittliche Tumor-Querschnitt der intrazerebralen U373MG-Gliome betrug 33 Tage nach der Zellimplantation $2,6 \pm 2,1\text{mm}^2$ in der PBS-Gruppe (Abb. 23B,G), $0,7 \pm 0,3\text{mm}^2$ in der 5-

Azazytidin-Gruppe ($p < 0,05$; Abb. 23B,H), $2,1 \pm 1,3 \text{ mm}^2$ in der Valproinsäure-Gruppe (Abb. 23B,J) und $0,9 \pm 0,4 \text{ mm}^2$ in der Bevacizumab-Gruppe ($p < 0,05$; Abb. 23B,K).

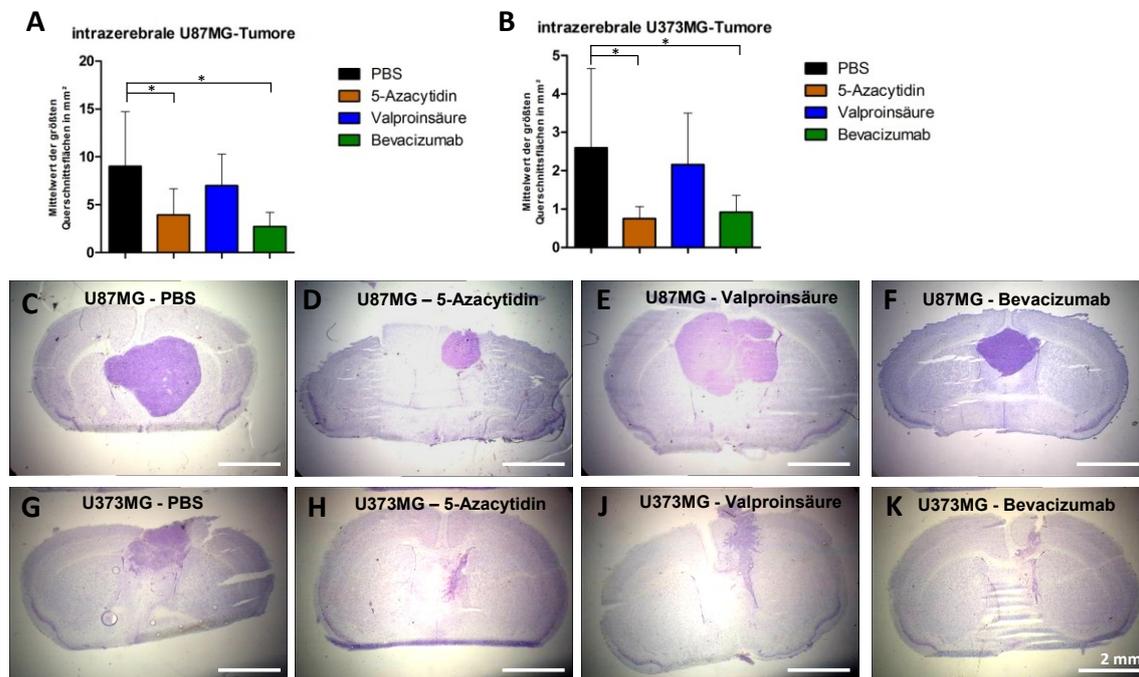


Abb. 23 Therapieversuche mit 5-Azacytidin sowie Valproinsäure in intrazerebralen U87MG- (A) und U373MG-Gliomen (B). Die größten Querschnittsflächen der intrazerebralen Tumore der U87MG-Tumore (C-F) und U373MG-Tumore (G-K) sind dargestellt.

3.4.5 5-Azacytidin verringert den Ki67-Proliferationsindex in humanen Glioblastom-Xenografts

Unterschiedliche Glioblastom-Modelle wurden mit 5-Azacytidin sowie Valproinsäure behandelt und der Proliferationsindex der Tumorzellen nach immunhistochemischer Anfärbung des Ki67-Proliferationsmarkers bestimmt (Abb.24). Unter 5-Azacytidin verminderte sich der Proliferationsindex im Vergleich zur jeweiligen PBS-Gruppe in subkutanen U87MG-Tumoren von $13,2 \pm 4,3\%$ auf $8,9 \pm 3,3\%$ ($p < 0,001$; Abb. 24A,E,F), in Patienten-abgeleiteten Xenografts TX1 von $10,1 \pm 1,8\%$ auf $6,7 \pm 1,9\%$ ($p < 0,001$; Abb. 24C,N,O) und in intrazerebralen U87MG-Tumoren von $11,6 \pm 3,1\%$ auf $8,7 \pm 4,6\%$ ($p < 0,05$; Abb. 24D,R,S). Nach einer Behandlung mit Valproinsäure verminderte sich der Ki67-Proliferationsindex in CX1-Tumoren von $2,3 \pm 0,6\%$ in der PBS-Gruppe auf $1,8 \pm 0,4\%$ ($p < 0,001$; Abb. 24B,J,L). In der Bevacizumab-Gruppe verminderte sich der Ki67-Proliferationsindex in subkutanen U87MG-Tumoren von $13,2 \pm 4,3\%$ auf $7,5 \pm 2,6\%$ ($p < 0,001$; Abb. 24A,E,H) und in intrazerebralen U87MG-Tumoren von $11,6 \pm 3,1\%$ auf $3,9 \pm 1,5\%$ ($p < 0,001$; Abb. 24D,R,U). In Patienten-abgeleiteten Xenografts TX1 verminderte Temozolomid den Ki67-Proliferationsindex von $10,1 \pm 1,9\%$ auf $3,9 \pm 1,4\%$ ($p < 0,001$; Abb. 24C).

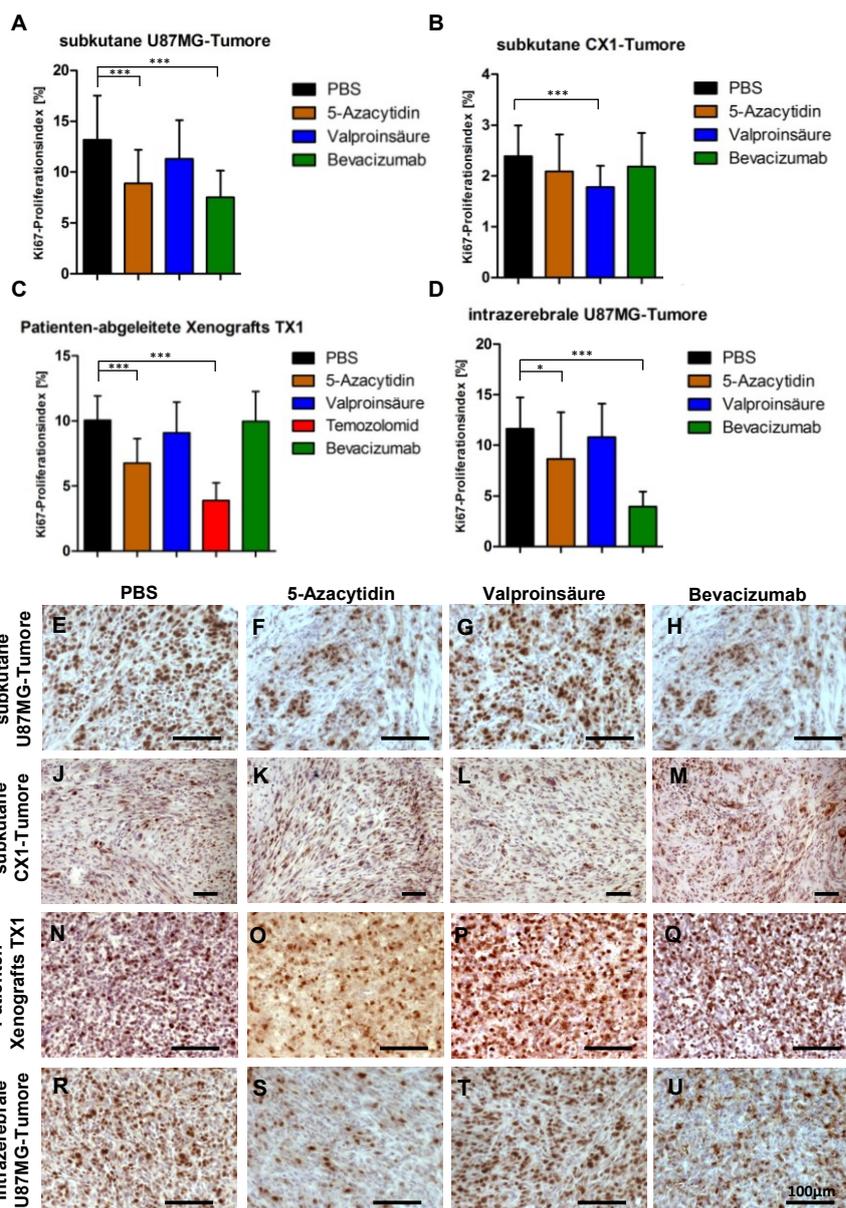


Abb. 24 Unter Kontrollbedingungen mit PBS wurde das Tumorgewebe gegen Ki67 in intrazerebralen U87MG- (A), subkutanen J1- (C) und subkutanen KDW-Tumoren (E) angefärbt. Die korrespondierenden Färbungen der mit Azacytidin therapierten Xenografts (B, D, F) zeigen deutlich weniger positiv angefärbte Tumorzellkerne (G).

3.4.6 5-Azacytidin senkt die Anzahl von CD31-positiven Endothelzellen sowie PDGFR β -positiven Perizyten im Glioblastomgewebe

Die Tumor-Angioneogenese wurde in den unterschiedlichen Glioblastom-Modellen durch immunhistochemische Färbungen untersucht (Abb. 25). Nach einer 5-Azacytidin-Therapie verringerte sich die mittlere Anzahl von CD31-positiven Endothelzellen je Gesichtsfeld in subkutanen U87MG-Tumoren signifikant von $47,1 \pm 11,4$ in der PBS-Gruppe auf $35,3 \pm 7,3$ ($p < 0,001$; Abb. 25A,E,F) und in intrazerebralen U87MG-Tumoren von $47,2 \pm 13,4$ auf $39,4 \pm 11,3$ ($p < 0,001$; Abb. 25C,J,K). In der Valproinsäure-Gruppe veränderte sich die Anzahl von Endothelzellen signifikant in

3 Ergebnisse

intrazerebralen U87MG-Tumoren von $47,2 \pm 13,4$ auf $43,6 \pm 10,8$ (Abb. 25C,J,L). Eine Bevacizumab-Therapie verringerte die Anzahl von Endothelzellen in allen Tumormodellen signifikant ($p < 0,001$; Abb. 25A-C,H,M). Nach der Analyse von PDGFR β -positiven Perizyten zeigte sich eine Abnahme der mittleren Anzahl von $20,7 \pm 4,4$ in der PBS-Gruppe auf $19,4 \pm 4,2$ in der 5-Azacytidin-Gruppe ($p < 0,05$; Abb. 25D,N,O) sowie auf $10,9 \pm 7,2$ in der Bevacizumab-Gruppe ($p < 0,001$; Abb. 25D,Q).

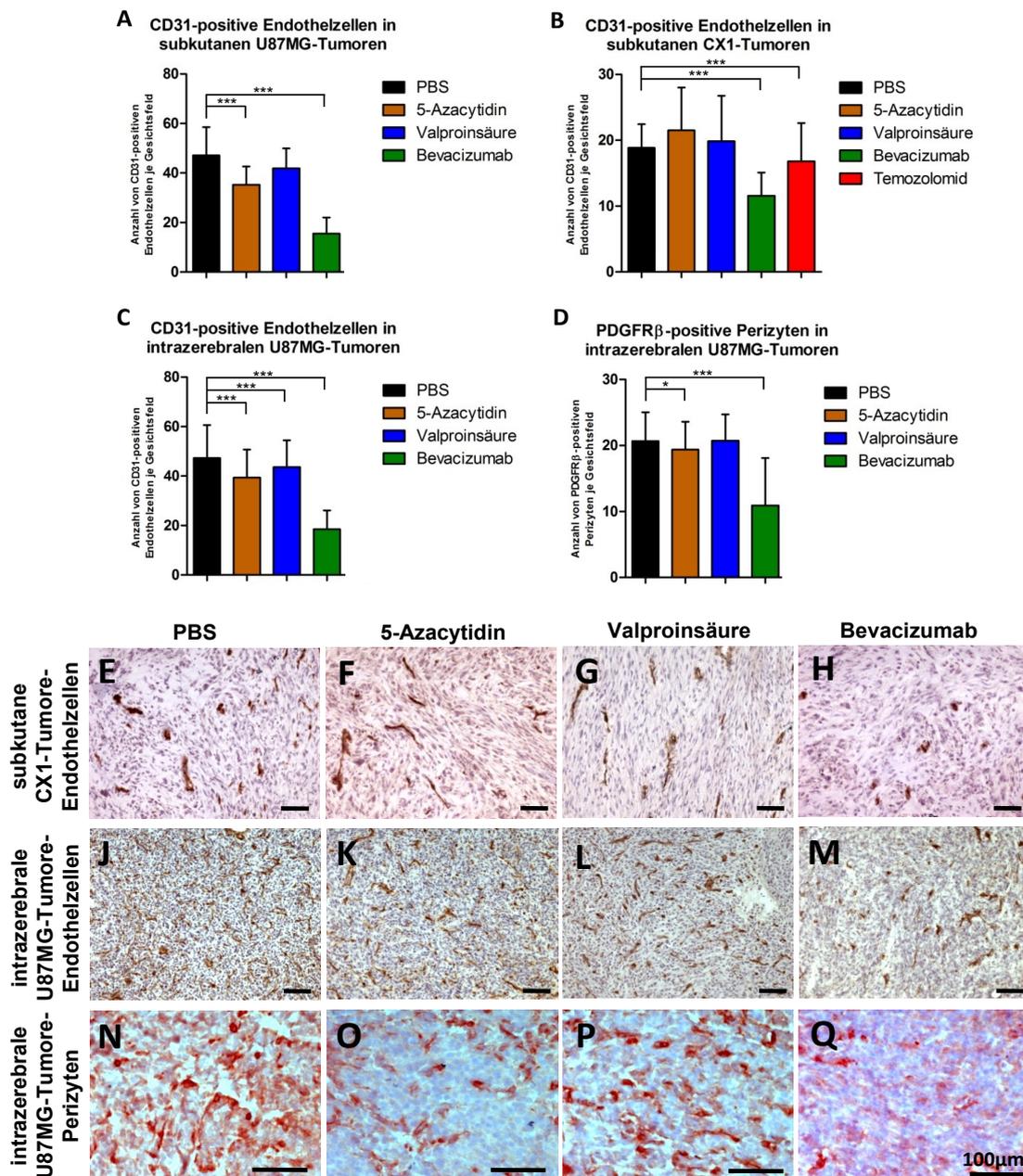


Abb. 25 Immunohistochemische Färbearbeiten von CD31-positiven Endothelzellen im Gewebe subkutaner U87MG-Tumore (A), subkutaner CX1-Tumore (B) und intrazerebraler U87MG-Tumore (C). Immunohistochemische Färbearbeit PDGFR β -positiver Perizyten im Gewebe intrazerebraler wachsender U87MG-Tumore (D). Repräsentative Abbildungen der Anfärbungen sind dargestellt (E-Q).

3.4.7 Expressionsanalyse von EGFR sowie pEGFR im Glioblastomgewebe unter einer Therapie mit 5-Azacytidin sowie Valproinsäure

Durch immunhistochemische Expressionsanalysen wurde die Expressionsdichte des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) sowie dessen Phosphorylierung (phospho-EGFR) im Tumorgewebe intrazerebraler U87MG-Tumore ermittelt. Die mittlere Expressionsdichte von EGFR betrug in der PBS-Gruppe $121,7 \pm 36,4$ (Abb. 26A,C), in der 5-Azacytidin-Gruppe $71,3 \pm 42,6$ ($p < 0,001$; Abb. 26A,D), in der Valproinsäure-Gruppe $62,9 \pm 39,4$ ($p < 0,001$; Abb. 26A,E) und in der Bevacizumab-Gruppe $32,9 \pm 21,9$ ($p < 0,001$; Abb. 26A,F). Die mittlere Expressionsdichte des phosphorylierten EGFR betrug in der PBS-Gruppe $134,2 \pm 13,8$ (Abb. 26B,G), in der 5-Azacytidin-Gruppe $110,0 \pm 28,9$ ($p < 0,001$; Abb. 26B,H), in der Valproinsäure-Gruppe $95,2 \pm 47,3$ ($p < 0,001$; Abb. 26B,J) und in der Bevacizumab-Gruppe $79,6 \pm 30,3$ ($p < 0,001$; Abb. 26B,K).

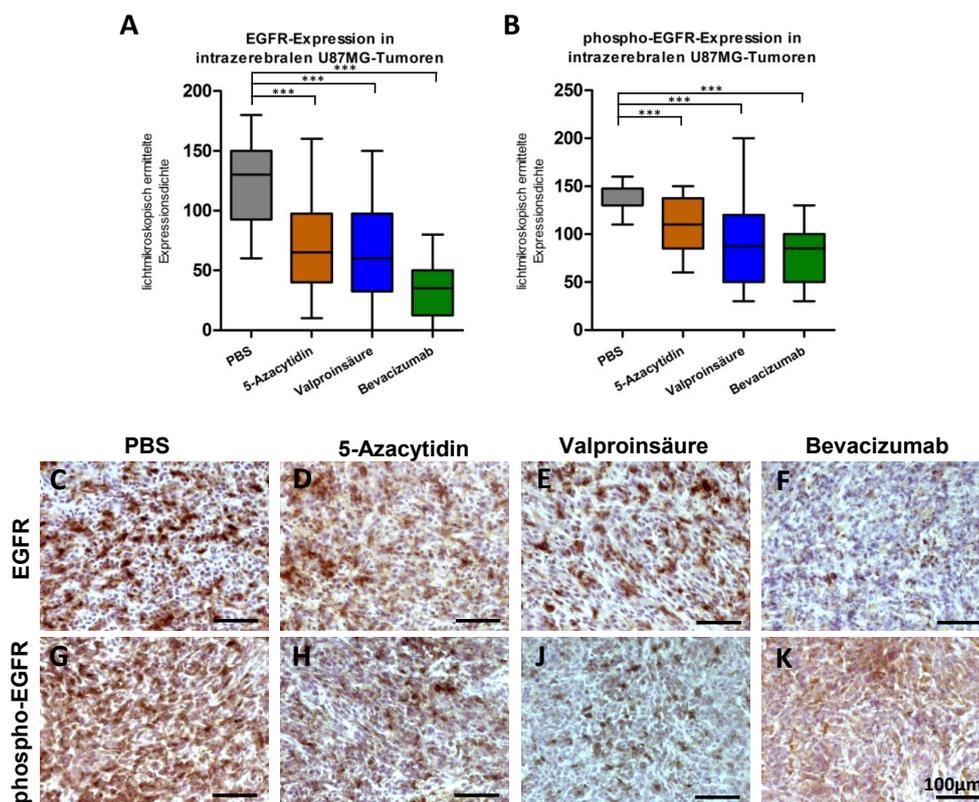


Abb. 26 Immunhistochemische Expressionsanalyse von EGFR (A) und phospho-EGFR (B) in intrazerebralen U87MG-Gliomen. Repräsentative mikroskopische Abbildungen der Anfärbungen gegen EGFR und pEGFR unter Kontrollbedingungen (C,G) sowie unter 5-Azacytidin (D,H), Valproinsäure (E,J) und Bevacizumab (F,K).

3.5 Therapie humaner Glioblastome mit dem mTor-Inhibitor Everolimus

3.5.1 Everolimus reduziert die Vitalität humaner Glioblastomzellen *in vitro*

Mit Hilfe von MTT-Assays wurde die Vitalität humaner Glioblastom-Zelllinien als auch humaner Glioblastom-Primärzellen untersucht (Abb. 27). In den Zelllinien U87MG und U373MG zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle eine graduelle, statistisch signifikante Abnahme der Zellvitalität korrelierend zu ansteigenden Konzentrationen von Everolimus bis auf jeweils $13,7 \pm 24,2\%$ und $27,8 \pm 15,5\%$ bei einer Konzentration von $50,0\mu\text{g/ml}$ Everolimus ($p < 0,05$; Abb. 27). Primäre Glioblastomzellen C1, C2 und T1 zeigten ebenfalls eine graduelle, statistisch signifikante Abnahme der Zellvitalität unter ansteigender Konzentration von Everolimus mit einer reduzierten Zellvitalität auf jeweils $25,8 \pm 10,1\%$, $9,6 \pm 14,4\%$ und $13,8 \pm 28,1\%$ nach Inkubation mit $50,0\mu\text{g/ml}$ Everolimus ($p < 0,05$; Abb. 27).

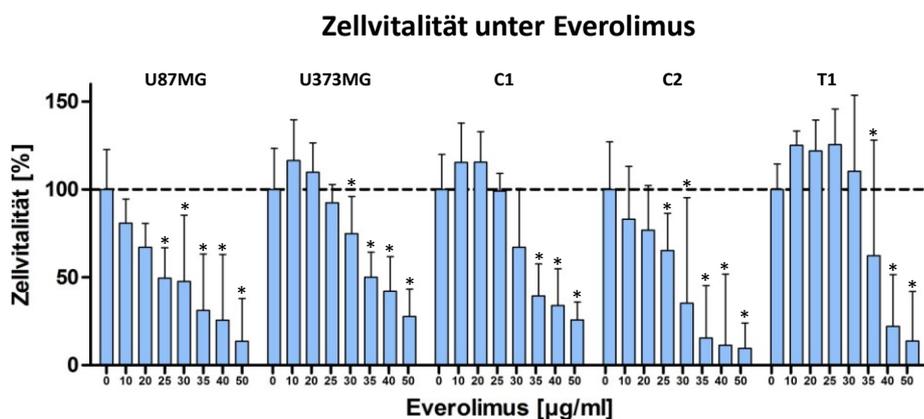


Abb. 27 Darstellung der Zellvitalität von humanen Glioblastom-Zelllinien U87MG und U373MG sowie primären Glioblastomzellen C1, C2 und T1 unter ansteigenden Konzentrationen von Everolimus (10,0 bis $50,0\mu\text{g/ml}$). Die Balken repräsentieren die mittleren Absorptionswerte relativ zu Kontrollbedingungen (0 $\mu\text{g/ml}$; jeweils als 100% angegeben).

3.5.2 Everolimus führt zur Apoptose humaner Glioblastomzellen *in vitro*

Nach Inkubation von U87MG-, U373MG-, C1-, C2 und T1-Glioblastomzellen mit $20,0$ sowie $30,0\mu\text{g/ml}$ Everolimus wurde beobachtet, dass sich im Vergleich zur Kontrolle unter Standardbedingungen eine deutlich abgerundete Morphologie der Glioblastomzellen herausbildete und die charakteristischen Zellausläufer sehr häufig nicht mehr vorhanden waren (Abb. 28A,C,E,G,J). Der Apoptose-Marker Caspase3 wurde in den Glioblastomzellen immunchemisch dargestellt und es zeigten sich unter $20,0$ sowie $30,0\mu\text{g/ml}$ Everolimus deutlich vermehrt apoptotische Glioblastomzellen (Abb. 28B,D,F,H,K).

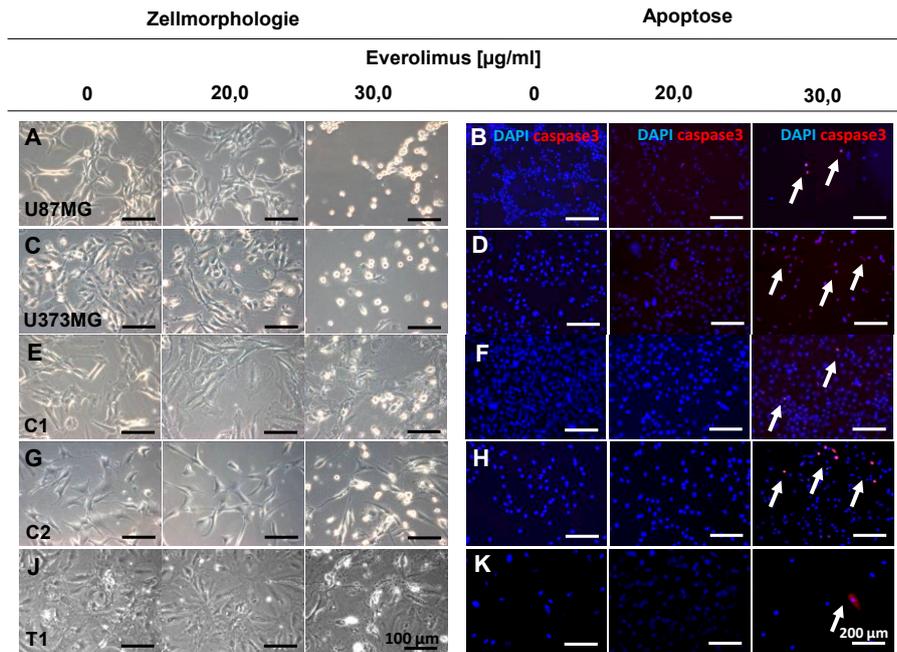


Abb. 28 Lichtmikroskopische Abbildungen von U87MG- (A), U373MG- (C), C1- (E), C2- (G) und T1-Glioblastomzellen (J) nach Inkubation mit 0, 20,0 sowie 30,0µg/ml Everolimus. Abbildungen von immunchemischen Fluoreszenz-Färbungen gegen den Apoptose-Marker Caspase3 (rot) von U87MG- (B), U373MG- (D), C1- (F), C2- (H) und T1-Zellen (K). Die Zellkerne sind mit DAPI blau gefärbt. Die Pfeile zeigen auf Caspase3-positive, apoptotische Glioblastomzellen.

3.5.3 Everolimus senkt die Migrationsrate humaner Glioblastomzellen *in vitro*

Um die Migrationsrate humaner U373MG-Glioblastomzellen und deren Beeinflussung durch Everolimus zu untersuchen, wurden *in vitro*-scratch Assays angefertigt (Abb. 29).

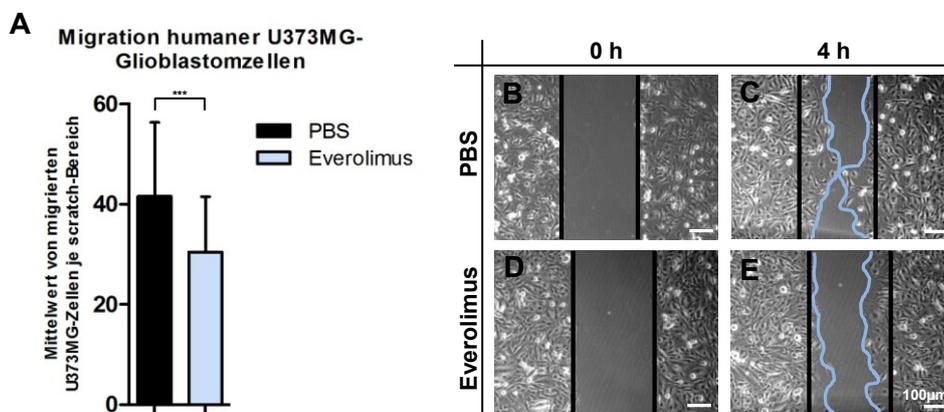


Abb. 29 U373MG-Glioblastomzellen wurden mittels *in vitro*-scratch Assays auf deren Migrationsrate unter PBS sowie Everolimus untersucht (A). Die Abbildungen zeigen repräsentative Bereiche der scratch-Assays unmittelbar nach Setzen des scratches unter Kontrollbedingungen mit PBS (B) sowie Everolimus (D) sowie nach vier Stunden Inkubationszeit unter PBS (C) sowie Everolimus (E). Die schwarzen Balken verdeutlichen die Randbereiche des jeweiligen scratches. Die farbigen Markierungen in (C) und (E) verdeutlichen die Migrationsfronten der Glioblastomzellen.

Unter Kontrollbedingungen waren nach vier Stunden Migrationszeit durchschnittlich $41,5 \pm 14,7$ Zellen (Abb. 29A,B,C) und nach Inkubation mit $30,0\mu\text{g/ml}$ Everolimus durchschnittlich $30,4 \pm 11,4$ Zellen (Abb. 29A,D,E) in die freien Flächen migriert. Die verminderte Migrationsrate unter Everolimus im Vergleich zu Kontrollbedingungen war

statistisch signifikant ($p < 0,001$; Abb. 29A). Die abnehmende Migration der U373MG-Zellen unter Everolimus ist anhand der größeren zellfreien Flächen zwischen den Migrationsfronten gut zu erkennen (Abb. 29C,E).

3.5.4 Everolimus verzögert das Wachstum subkutaner und intrazerebraler Glioblastome

Es wurde der Einfluss von Everolimus auf was Wachstum subkutaner U87MG-, U373MG, CX1- und CX2-Tumoren sowie von Patienten-abgeleiteten Xenografts TX1 und TX2 untersucht (Tab. 8 11, Abb. 22). Everolimus verzögerte das Wachstum subkutaner U87MG-Tumoren signifikant zur PBS-Kontrollgruppe ($p < 0,001$; T/C=19,7%, Abb. 30A). In subkutanen U373MG-Glioblastomen waren die Tumore in der Everolimus-Gruppe signifikant kleiner im Vergleich zur PBS-Gruppe ($p < 0,001$; T/C=41,8%, Abb. 30B). Die Everolimus-Therapie verzögerte das Wachstum subkutaner CX1-Tumore ($p < 0,05$; T/C=55,2%, Abb. 30C) sowie subkutaner CX2-Tumore ($p < 0,001$; T/C=30,3%, Abb. 30D) signifikant zur PBS-Kontrollgruppe. In Patienten-abgeleiteten Xenografts TX1 waren die Glioblastome in der Everolimus-Gruppe im Vergleich zur PBS-Gruppe signifikant kleiner ($p < 0,001$; T/C=34,6%. Abb. 30E). Everolimus verzögerte das Wachstum Patienten-abgeleiteter Xenografts TX2 ebenfalls signifikant zur Kontrollgruppe ($p < 0,001$; T/C=26,5%, Abb. 30F).

Tab. 11 Versuchsdaten der Tierexperimente mit 5-Azacytidin und Valproinsäure an subkutanen Glioblastommodellen

subkutanes Tumormodell	Substanz	optimaler T/C [%]	Körpergewichts-änderung [%]	Sterbefälle / total	p-Werte zu PBS	subkutanes Tumormodell	Substanz	optimaler T/C [%]	Körpergewichts-änderung [%]	Sterbefälle / total	p-Werte zur PBS-Gruppe
U87MG (nude)	PBS		+4	0/9		U373MG (nude)	PBS		+6	0/10	
	Everolimus	19,7	+5	0/8	<0,001		Everolimus	41,8	+5	0/8	<0,001
	Temozolomid	7,9	+1	0/8	<0,001		Temozolomid	4,0	0	0/8	<0,001
	Bevacizumab	41,7	-2	0/8	<0,001		Bevacizumab	7,7	+7	0/8	<0,001
CX1 (nude)	PBS		+12	0/8		CX2 (nude)	PBS		+14	0/7	
	Everolimus	55,2	+11	0/7	<0,05		Everolimus	30,2	+15	0/7	<0,001
	Temozolomid	20,7	+6	0/8	<0,001		Temozolomid	35,8	+4	0/8	<0,001
	Bevacizumab	61,8	+5	0/8	>0,05		Bevacizumab	40,8	+15	0/6	<0,05
TX1 (NSG)	PBS		+3	0/6		TX2 (NSG)	PBS		+8	0/6	
	Everolimus	34,6	-1	0/6	<0,001		Everolimus	26,5	-6	0/6	<0,001
	Temozolomid	16,3	+2	0/6	<0,001		Temozolomid	0,7	-6	1/6 ¹	<0,001
	Bevacizumab	83,2	+4	0/6	>0,05		Bevacizumab	14,0	-2	0/6	<0,001

Weiterhin wurde der Einfluss von Everolimus auf intrazerebrale U87MG- sowie U373MG-Gliome untersucht (Abb. 31). Intrazerebrale U87MG-Tumore hatten 27 Tage nach der Zellinokulation in der PBS-Gruppe eine Größe von $9,0 \pm 5,7 \text{ mm}^2$ (Abb. 31A,C)

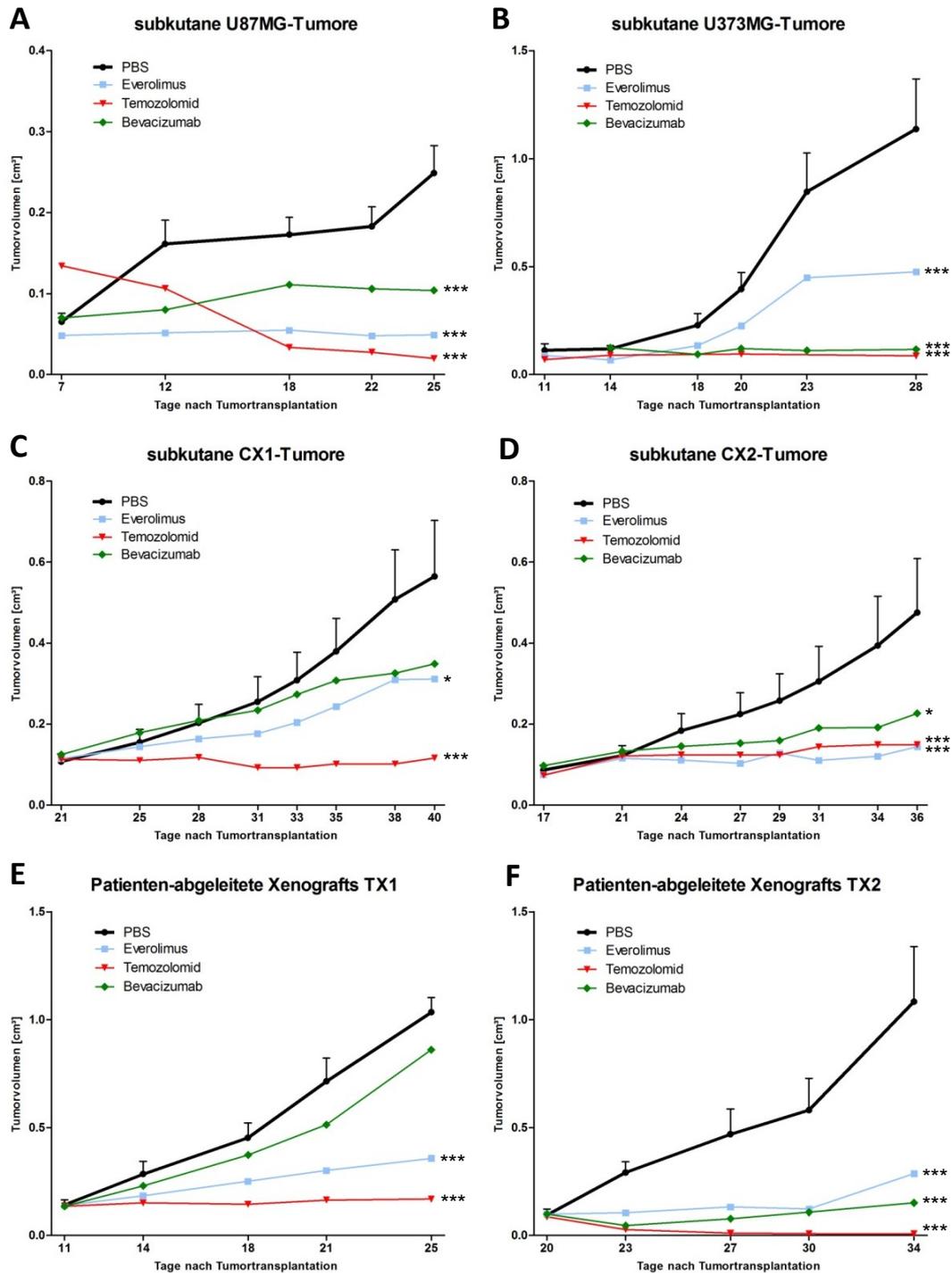


Abb. 30 Therapieversuche mit Everolimus, PBS, Temozolomid sowie Bevacizumab in subkutanen U87MG- (A), U373MG- (B), CX1- (C), CX2- (D), TX1- (E) und TX2-Glioblastomen (F).

und in der Everolimus-Gruppe eine signifikant kleinere Größe von $2,1 \pm 0,9\text{mm}^2$ (Abb. 31A,D). Die Größe der U87MG-Tumore war unter Bevacizumab mit $2,7 \pm 1,5\text{mm}^2$ ebenfalls signifikant kleiner ($p < 0,05$; Abb. 31A,E). In intrazerebralen U373MG-Tumoren betrug der durchschnittliche Tumor-Querschnitt 33 Tage nach der Zellimplantation in der PBS-Gruppe $2,6 \pm 2,1\text{mm}^2$ (Abb. 31B,F) und er verkleinerte sich unter Everolimus

deutlich auf $1,9 \pm 1,0 \text{ mm}^2$ ($p > 0,05$; Abb. 31B,G). In der Bevacizumab-Gruppe hatten die U373MG-Tumore eine signifikant kleinere Größe von $0,9 \pm 0,4 \text{ mm}^2$ ($p < 0,05$; Abb. 31B,H).

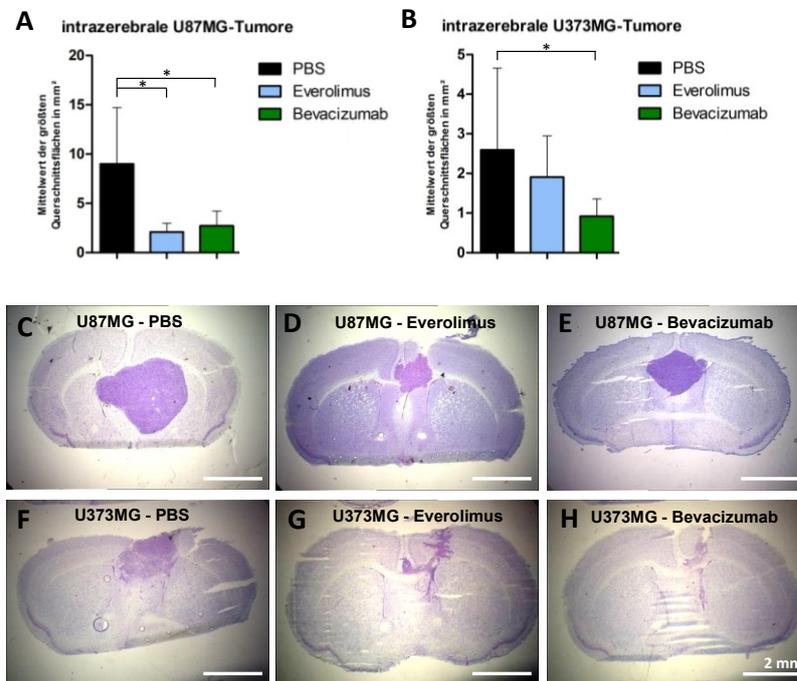


Abb. 31 Therapieversuche mit Everolimus sowie PBS und Bevacizumab mit intrazerebralen U87MG- (A) und U373MG-Gliomen (B). Die größten Querschnittsflächen der intrazerebralen U87MG-Tumore (C-E) und U373MG-Tumore (F-H) sind abgebildet.

3.5.5 Everolimus vermindert den Ki67-Proliferationsindex in humanen Glioblastom-Xenografts

Es wurde der Ki67-Proliferationsmarker im Tumorgewebe unterschiedlicher Glioblastom-Modelle immunhistochemisch angefärbt und der Ki67-Proliferationsindex unter Everolimus, PBS sowie Bevacizumab bestimmt (Abb. 32). In der Everolimus-Gruppe verminderte sich der Ki67-Proliferationsindex im Vergleich zur jeweiligen PBS-Gruppe in subkutanen U87MG-Tumoren von $13,2 \pm 4,3\%$ auf $9,1 \pm 3,2\%$ ($p < 0,001$; Abb. 32A,E,F), in subkutanen CX1-Tumoren von $2,3 \pm 0,6\%$ auf $1,9 \pm 0,5\%$ ($p < 0,001$; Abb. 32B,H,J), in Patienten-abgeleiteten Xenografts TX1 von $10,1 \pm 1,8\%$ auf $7,2 \pm 2,1\%$ ($p < 0,001$; Abb. 32C,L,M) und in intrazerebralen U87MG-Tumoren von $11,6 \pm 3,1\%$ auf $8,1 \pm 2,9\%$ ($p < 0,001$; Abb. 32D,O,P). In der Bevacizumab-Gruppe verminderte sich der Ki67-Proliferationsindex in subkutanen U87MG-Tumoren von $13,2 \pm 4,3\%$ auf $7,5 \pm 2,6\%$ ($p < 0,001$; Abb. 32A,E,G) und in intrazerebralen U87MG-Tumoren von $11,6 \pm 0,8\%$ auf $3,9 \pm 0,4\%$ ($p < 0,001$; Abb. 32D,O,Q). In den Patienten-abgeleiteten Xenografts TX1 verminderte Temozolomid den Ki67-Proliferationsindex von $10,1 \pm 1,9\%$ auf $3,9 \pm 1,4\%$ ($p < 0,001$; Abb. 32C).

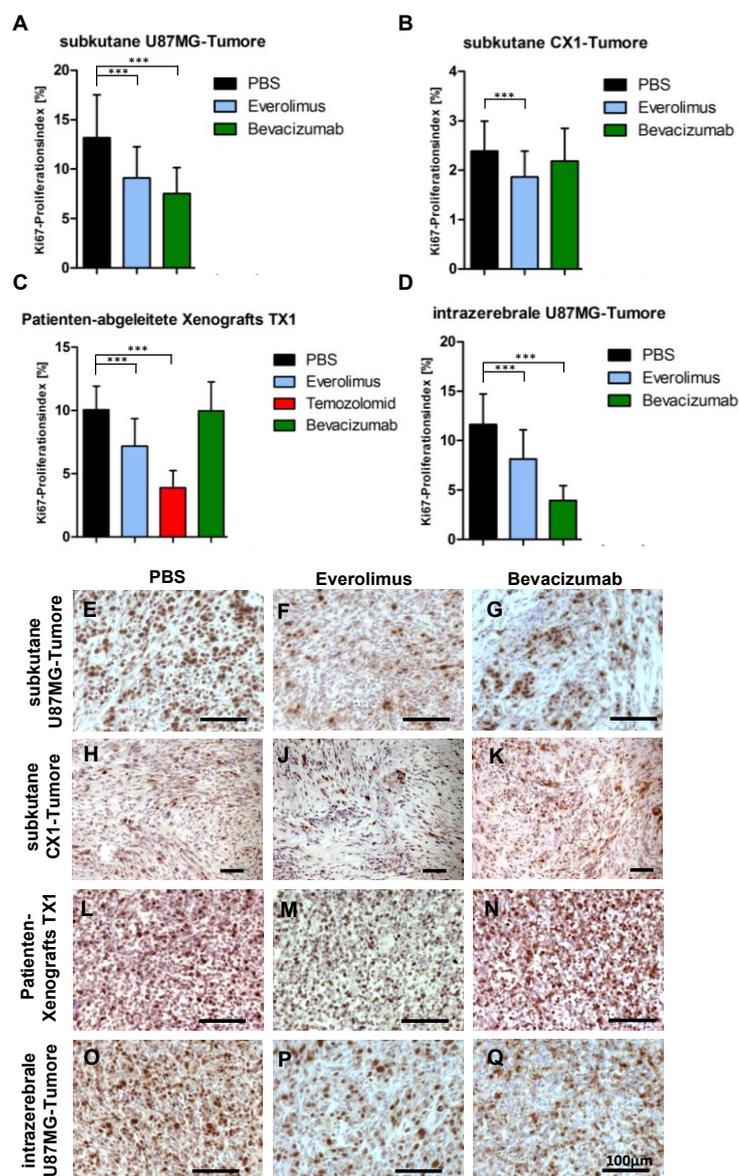


Abb. 32 Analyse der Ki67-Proliferationsindices im Tumorgewebe subkutaner U87MG- (A), CX1- (B) und TX1-Glioblastomen (C) sowie in intrazerebralen U87MG-Tumoren (D). Es sind repräsentative Bilder der Anfärbungen gegen Ki67 der jeweiligen Glioblastom-Modelle unter PBS (E,H,L,O), Everolimus (F,J,M,P) und Bevacizumab (G,K,N,Q) dargestellt.

3.5.6 Einfluss von Everolimus auf die Anzahl von CD31-positiven Endothelzellen sowie PDGFR β -positiven Perizyten im Glioblastomgewebe

Mit immunhistochemischen Färbungen wurde die Tumor-Angiogenese in unterschiedlichen Glioblastom-Modellen nach einer Everolimus-Therapie untersucht (Abb. 33). Nach der Everolimus-Therapie verringerte sich die mittlere Anzahl von CD31-positiven Endothelzellen je Gesichtsfeld in intrazerebralen U87MG-Tumoren signifikant von $47,2 \pm 13,4$ in der PBS-Gruppe auf $38,8 \pm 11,8$ ($p < 0,001$; Abb. 33A,H,J). Eine Bevacizumab-Therapie verringerte die Anzahl von Endothelzellen in allen Tumormodellen signifikant ($p < 0,001$; Abb. 33A-C,G,K). Weiterhin wurden PDGFR β -positive Perizyten analysiert und es zeigte sich eine signifikante Abnahme der mittleren

Anzahl von Perizyten von $20,7 \pm 4,4$ in der PBS-Gruppe auf $13,8 \pm 3,9$ in der Everolimus-Gruppe ($p < 0,001$; Abb. 33D,L,M) sowie auf $10,9 \pm 7,2$ in der Bevacizumab-Gruppe ($p < 0,001$; Abb. 33D,N).

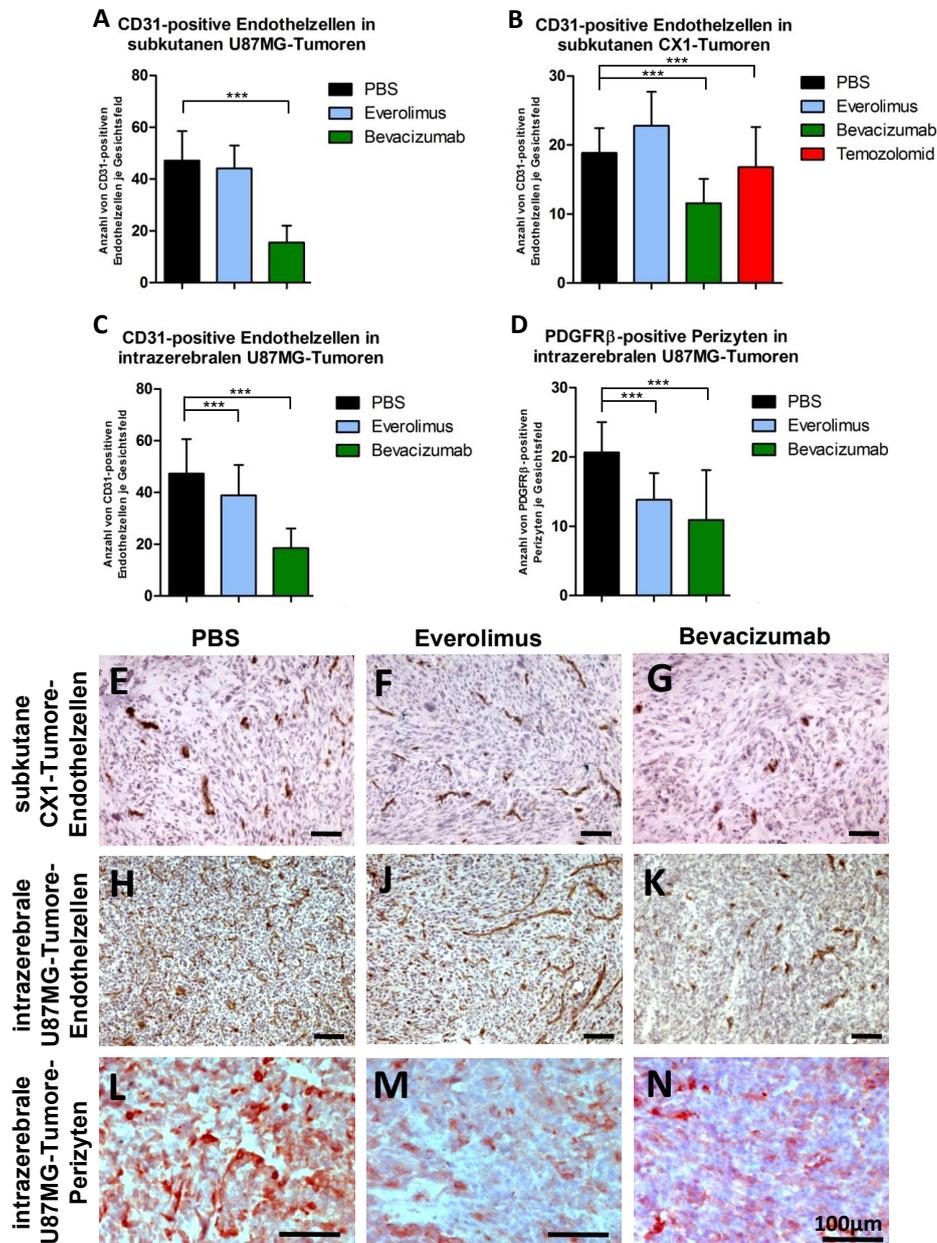


Abb. 33 Analyse der Tumorangiogenese mittels Anfärbung von CD31-positiven Endothelzellen in subkutanen U87MG-Tumoren (A), subkutanen CX1-Tumoren (B) und intrazerebralen U87MG-Tumoren (C) sowie Anfärbung von PDGFRβ-positiven Perizyten in intrazerebralen U87MG-Tumoren (D). Dargestellt sind repräsentative Abbildungen der immunhistochemischen Anfärbungen (E-N).

3.5.7 Everolimus führt zur Apoptose humaner Glioblastomzellen *in vivo*

In intrazerebralen U87MG-Tumoren wurden apoptotische Tumorzellen mit Hilfe des Apoptose-Markers Caspase3 immunhistochemisch dargestellt. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme des Apoptose-Scores unter Everolimus im Vergleich zur PBS-

Kontrollgruppe von $0,7 \pm 0,6$ auf $1,7 \pm 0,8$ ($p < 0,01$; Abb. 34A-C) und unter Bevacizumab auf $1,5 \pm 0,7$ ($p < 0,01$; Abb. 34A,D).

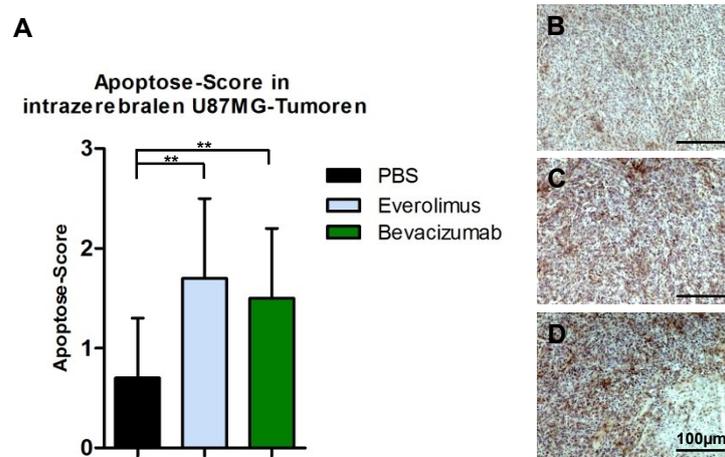


Abb. 34 Analyse von Caspase3-positiven, apoptotischen Glioblastomzellen in intrazerebralen U87MG-Tumoren (A) mit repräsentativen Abbildungen der Anfärbungen unter PBS (B), Everolimus (C) sowie Bevacizumab (D).

3.5.8 Everolimus führt zur Apoptose von Endothelzellen in humanen Glioblastomen *in vivo*

Es wurde der Einfluss von Everolimus auf den apoptotischen Zelltod von Endothelzellen im Glioblastomgewebe intrazerebraler U87MG-Tumore mit immunhistochemischen Fluoreszenz-Färbungen untersucht (Abb. 35). In der Kontrollgruppe mit PBS zeigte sich im Gliomgewebe ein relativer Anteil von $1,3 \pm 1,1\%$ apoptotischer Endothelzellen, unter

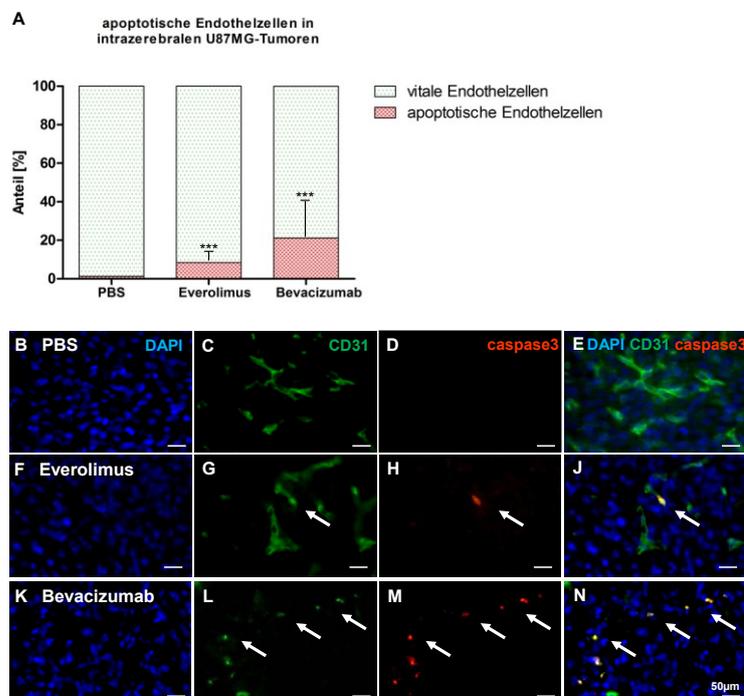


Abb. 35 Immunhistochemische Fluoreszenz-Färbungen zur Analyse apoptotischer Endothelzellen im Gewebe intrazerebraler U87MG-Gliome (A). In den Behandlungsgruppen mit PBS, Everolimus und Bevacizumab sind die Zellkerne mit DAPI blau (B,F,K), CD31-positive Endothelzellen grün (C,G,L) und Caspase3-positive apoptotische Zellen rot angefärbt (D,H,M). Abbildungen mit doppelt-positiven, CD31- und Caspase3-positiven Zellen sind dargestellt (E,J,N) und mit Pfeilen markiert.

3 Ergebnisse

Everolimus nahm der Anteil statistisch signifikant auf $8,4 \pm 4,1\%$ zu ($p < 0,001$; Abb. 35A,J). In der Bevacizumab-Gruppe lag der Anteil apoptotischer Endothelzellen bei $21,2 \pm 16,4\%$ ($p < 0,001$; Abb. 35A,N).

3.5.9 Everolimus vermindert die Phosphorylierung von mTOR sowie die Expression der nachgeschalteten S6-Kinase in humanen Glioblastomzellen *in vivo*

Mit immunhistochemischen Expressionsanalysen wurde die Expression von PTEN, p-mTor sowie der p-S6-Kinase in verschiedenen Glioblastom-Modellen untersucht (Abb. 36). In intrazerebralen U87MG-Tumoren betrug die mittlere Expressionsdichte von PTEN $10,7 \pm 12,5$ in der PBS-Gruppe und $8,0 \pm 10,6$ in der Everolimus-Gruppe (Abb. 36A). Die Expressionsdichte von p-mTor sowie der p-S6-Kinase verminderte sich jeweils signifikant von $140,0 \pm 34,7$ und $225,1 \pm 33,7$ in der PBS-Gruppe (Abb. 36B,C,D,F) auf jeweils $61,5 \pm 27,1$ und $161,0 \pm 35,7$ in der Everolimus-Gruppe ($p < 0,001$; Abb. 36B,C,E,G). In den Patienten-abgeleiteten Xenografts TX1 betrug die

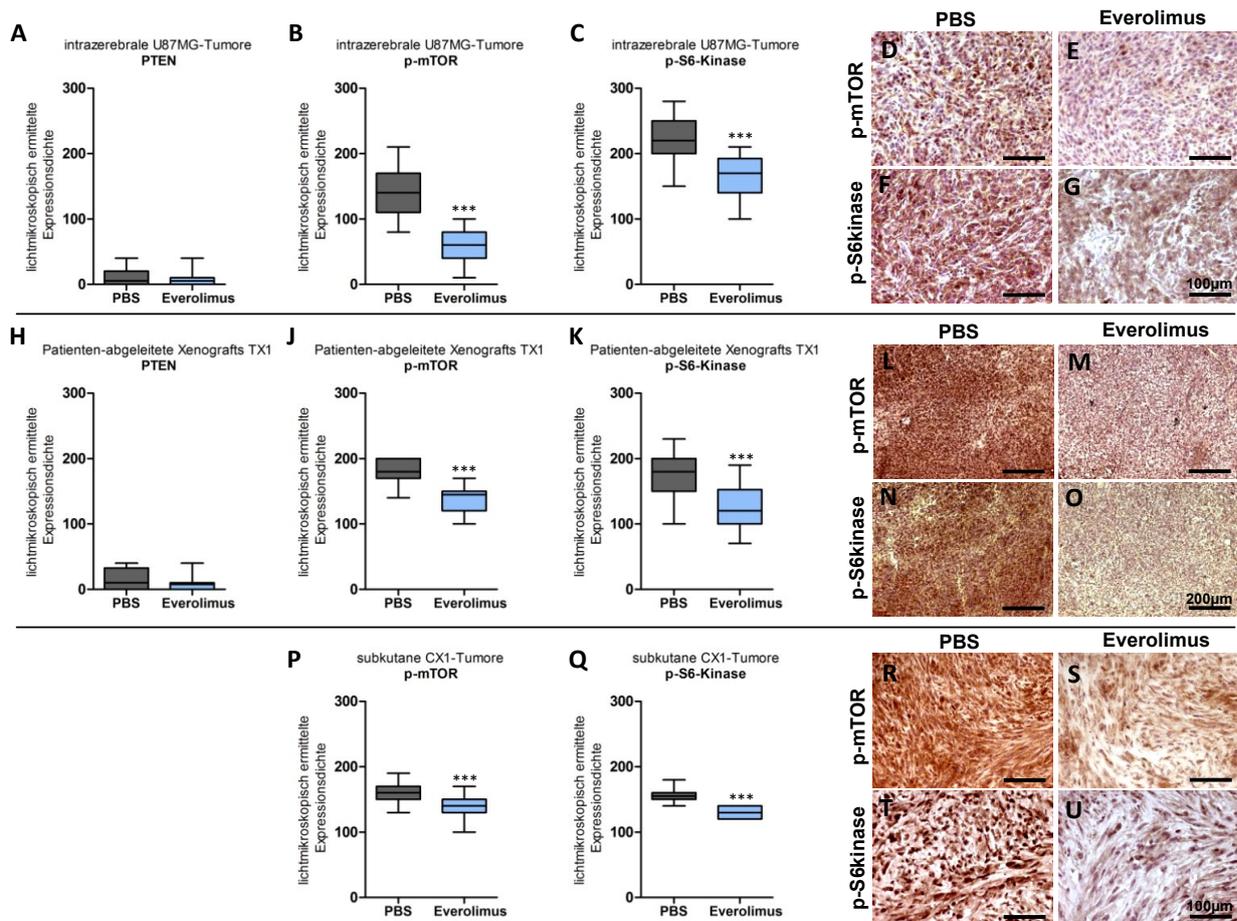
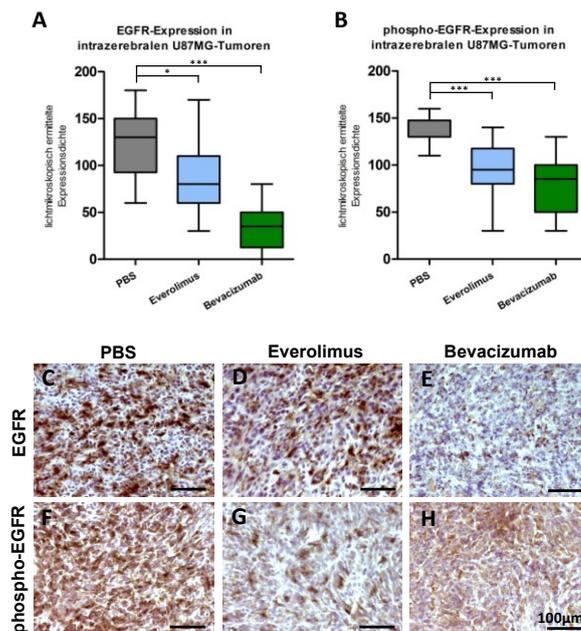


Abb. 36 Immunhistochemische Färbanalyse von PTEN, p-mTor und p-S6-Kinase verschiedener Glioblastom-Mausmodelle. Darstellung der Expressionsdichte anhand von Boxplots mit repräsentativen Abbildungen der Anfärbungen von PTEN, p-mTor und der p-S6-Kinase in intrazerebralen U87MG-Tumoren (A-G), Patienten-abgeleiteten Xenografts TX1 (H-O) sowie subkutanen CX1-Tumoren (P-U) jeweils in der PBS-Kontrollgruppe und in der Everolimus-Gruppe.

mittlere Expressionsdichte von PTEN $15,7 \pm 16,7$ in der PBS-Gruppe und $9,3 \pm 10,9$ in der Everolimus-Gruppe (Abb. 36H). Die Expressionsdichte von p-mTor sowie der p-S6-Kinase verminderte sich jeweils signifikant von $180,7 \pm 18,2$ und $173,0 \pm 31,9$ in der PBS-Gruppe (Abb. 36J,K,L,N) auf jeweils $138,3 \pm 19,1$ und $123,3 \pm 34,5$ in der Everolimus-Gruppe ($p < 0,001$; Abb. 36J,K,M,O). In subkutanen CX1-Tumoren zeigte sich eine jeweils signifikant verminderte Expressionsdichte von p-mTor sowie der p-S6-Kinase von $157,9 \pm 15,6$ und $155,8 \pm 11,0$ in der PBS-Gruppe (Abb. 36P,Q,R,T) auf jeweils $137,1 \pm 19,7$ und $129,6 \pm 8,1$ unter einer Everolimus-Therapie ($p < 0,001$; Abb. 36P,Q,S,U).

3.5.10 Expressionsanalyse von EGFR sowie pEGFR im Glioblastomgewebe unter einer Therapie mit Everolimus

Es wurde die Expressionsdichte des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) sowie dessen Phosphorylierung (phospho-EGFR) im Tumorgewebe intrazerebraler U87MG-Tumore unter einer Therapie mit Everolimus ermittelt. Die mittlere Expressionsdichte von EGFR betrug in der PBS-Gruppe $121,7 \pm 36,4$ (Abb. 37A,C), in der Everolimus-Gruppe $89,6 \pm 39,6$ ($p < 0,05$; Abb. 37A,D) und in der Bevacizumab-Gruppe $32,9 \pm 21,9$ ($p < 0,001$; Abb. 37A,E). Die mittlere Expressionsdichte des phosphorylierten EGFR betrug in der PBS-Gruppe $134,2 \pm 13,8$ (Abb. 37B,F), in der Everolimus-Gruppe $91,3 \pm 29,9$ ($p < 0,001$; Abb. 37B,G) und in der Bevacizumab-Gruppe $79,6 \pm 30,3$ ($p < 0,001$; Abb. 37B,H).



Expressionsanalyse von EGFR- (A) sowie phospho-EGFR (B) im Tumorgewebe intrazerebral wachsender U87MG-Gliome mit repräsentativen Abbildungen der Anfärbungen unter PBS (C,F), Everolimus (D,G) und Bevacizumab (E,H).

4 Diskussion

4.1 Präklinische Glioblastom-Mausmodelle

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche präklinische Glioblastom-Mausmodelle etabliert und für die experimentellen Studien verwendet. Zelllinien-abgeleitete, subkutane U87MG und U373MG-Tumore sind häufig verwendete Modelle, die auch in dieser Arbeit genutzt wurden. Histologisch zeigte sich jedoch, dass diese Tumore sehr homogen sind und charakteristische histopathologische Charakteristiken der Glioblastome wie diffuses Wachstum, Endothelzellproliferationen und nekrotische Tumorareale fehlen. Die Vaskularisierung ist in diesen Angiogenese-abhängigen Tumoren sehr stark ausgeprägt (Abb. 1B,D). Diese etablierten Zelllinien haben den Nachteil, dass sie über lange Zeit *in vitro* kultiviert wurden und dadurch genetisch und morphologisch stark verändert sind⁵⁷.

Um diese Variationen gering zu halten, wurden aus Patienten-Glioblastomen Einzelzellsuspensionen (C1- und C2-Primärzellen) hergestellt, diese kurzzeitig *in vitro* kultiviert und anschließend subkutan in Labormäuse eingebracht. Diese subkutanen, Primärzell-abgeleiteten Xenografts CX1 und CX2 sind ebenfalls deutlich abgekapselte Tumore, die histopathologisch nicht allen Kriterien des Glioblastoma multiforme entsprechen. Des Weiteren sind im Tumorgewebe relativ wenig Blutgefäße vorhanden (Abb. 3D) und es lässt sich auf von der Tumor-Angiogenese unabhängige Wachstumseigenschaften schließen.

Die etablierten Zelllinien U87MG und U373MG wurden ebenso wie die Glioblastom-Primärzellen intrazerebral eingebracht, aber auch in der nun pathophysiologisch repräsentativen Mikroumgebung wachsen U87MG-Tumore deutlich abgekapselt, U373MG-Tumore sowie Glioblastom-Primärzellen zeigen dagegen ein invasives Wachstumsmuster, Gefäßproliferationen sowie nekrotische Tumorareale fehlen aber auch hier ganz.

Bei der Herstellung von Primärzell-Suspensionen wurde zwar Patienten-Glioblastomgewebe verwendet, jedoch werden dabei die Gliomzellen aus ihrem Tumorzellverband und ihrer Mikroumgebung herausgelöst. Interaktionen mit der extrazellulären Matrix sowie mit anderen Zelltypen wie Neuronen, Astrozyten oder Mikroglia werden dadurch aufgehoben. Um die Biologie humaner Glioblastome besser erhalten zu können, wurden Patienten-abgeleitete Xenografts (TX1, TX2) etabliert. Hierfür wurde das Glioblastomgewebe direkt nach der neurochirurgischen Entfernung

als Gewebestückchen subkutan in NSG-Mäuse transplantiert. Dadurch repräsentieren diese Modelle in frühen Tumorpässagen die Biologie maligner Gliome am besten^{58, 59}, aber auch nach mehreren Passagen, das heißt nach der Verteilung der Xenotransplantate auf weitere Mäuse, bleiben in diesen Modellen einige wichtige primär vorhandene Tumorcharakteristika, wie beispielsweise die EGFR-Amplifikation oder die MGMT-Promotormethylierung, erhalten⁶⁰. Diese Patienten-abgeleiteten Xenografts zeigen histologisch Endothelzellproliferationen sowie nekrotische Tumorareale und sind histopathologisch mit dem Ausgangsgewebe vergleichbar. Auch konnte ein festes Einwachsen in das subkutane Bindegewebe festgestellt werden.

Tab. 12 Histopathologische Charakteristiken der verwendeten Glioblastommodelle

Tumormodell	subkutane, Zelllinien-abgeleitete Gliome U87MG, U373MG	subkutane, Primärzellen-abgeleitete Gliome CX1, CX2	subkutane, Patienten-abgeleitete Xenografts TX1, TX2	intrazerebrale, Zelllinien-abgeleitete Gliome U87MG	intrazerebrale, Zelllinien-abgeleitete Gliome U373MG
Vaskularisierung	hoch	gering	hoch	hoch	hoch
Endothelproliferationen	nein	nein	ja	nein	nein
invasives Wachstum	nein	nein	ja (subkutan)	nein	ja
nekrotische Tumorareale	nein	nein	ja	nein	nein

Subkutane Glioblastom-Modelle eignen sich gut für die Testung von Substanzen an vielen Versuchstieren, da die Tumorgrößen bei Therapiebeginn einheitlich sind und potentielle Effekte auf das Tumorwachstum somit an größeren Therapiegruppen valide festgestellt und statistisch ausgewertet werden können. Außerdem sind die Tumore jederzeit für Größenmessungen zugänglich. Im Gegensatz dazu repräsentieren intrazerebrale Gliom-Modelle die Mikroumgebung des zentralen Nervensystems und der Einfluss der Blut-Hirn-Schranke auf die Tumortherapie bleibt berücksichtigt. Mit diesen Modellen kann überprüft werden, ob die verwendeten Substanzen trotz intakter Blut-Hirn-Schranke auch einen intrazerebral wachsenden Tumor erreichen können. Der Nachteil von Zell-abgeleiteten intrazerebralen Gliomen ist das Fehlen von charakteristischen histopathologischen Eigenschaften der Glioblastome und sie sind daher für Untersuchungen der speziellen Gliom-Biologie weniger geeignet. Diese sind zwar nach intrazerebralem Einbringen von Glioblastom-Gewebestückchen^{61, 62}, nach intrazerebraler Implantation von Tumor-Sphäroiden⁶³ sowie in genetischen Gliommodellen⁶⁴ auszumachen, jedoch kann man solche Modelle nicht für die Testung von Substanzen auf das Tumorwachstum an einer ausreichend hohen Fallzahl mit identischen Tumorgrößen standardisieren.

Von den in dieser Arbeit verwendeten präklinischen Glioblastom-Mausmodellen sind histopathologisch die Patienten-abgeleiteten Xenografts die repräsentativsten Modelle. Sie spiegeln die Gliom-Biologie, insbesondere Endothelzellproliferationen und nekrotische Areale, wider und es können aussagekräftige Ergebnisse gewonnen werden, ob eine bestimmte Therapie das Wachstum humaner Glioblastome beeinflusst. Die Nachteile dieser Modelle sind, dass nur ein bestimmter Teil des Patienten-Tumors in die Versuchstiere transplantiert wird, ohne weitere andere, für das Tumorwachstum relevante Eigenschaften des verbliebenen Resttumors mit zu berücksichtigen. Der Ansatz einer individuellen Vorhersage des Ansprechens der Patienten-Tumore auf eine bestimmte Therapie mit einer Substanz wird dadurch sowie durch eine niedrige Anwachsrate der Patienten-Glioblastome von 36,7% und einer langen Zeitdauer (im Durchschnitt 118 Tage) bis zu einem möglichen ersten Therapieversuch erschwert. Jedoch hat man mit den Patienten-abgeleiteten Glioblastom-Xenografts ein sehr gutes Modell zur Verfügung, um für das Therapieansprechen von Therapeutika potentielle Biomarker zu identifizieren, da man die Patienten-Xenografts vor sowie nach einer bestimmten Therapie untersuchen kann.

Insgesamt gesehen gibt es kein ideales präklinisches Glioblastom-Modell, jedes Einzelne hat bestimmte Vor- und Nachteile (Tab. 12). Für die Evaluierung eines präklinischen neuroonkologischen Wirkprofils einer Substanz empfiehlt es sich, verschiedene Glioblastom-Modelle zu verwenden und die Resultate aus diesen Modellen zusammen zu betrachten, um die häufig zu beobachtende Diskrepanz der Ergebnisse präklinischer und klinischer Studien zu vermindern.

4.2 Therapie humaner Glioblastome mit den Multikinase-Hemmern Sorafenib und Pazopanib

In dieser Arbeit wurden die Effekte der Multikinase-Hemmer Sorafenib sowie Pazopanib auf humane Glioblastome in unterschiedlichen Mausmodellen untersucht. Sorafenib verzögerte signifikant das Wachstum subkutaner U373MG-Tumore, jedoch ließ sich kein wachstumsverzögernder Effekt in anderen Glioblastom-Modellen, insbesondere in den Primärzellen- und Patienten-abgeleiteten Xenografts, feststellen. Die Sorafenib-Therapie hatte sogar eine Größenzunahme von subkutanen U87MG-Tumoren sowie intrazerebralen U87MG- und U373MG-Tumoren zur Folge. Eine Pazopanib-Therapie löste zwar eine signifikante Wachstumsverzögerung in subkutanen U373MG-Tumoren, CX2-Tumoren sowie TX2-Tumoren aus, jedoch zeigte sich ebenfalls keine

Größenabnahme intrazerebraler Gliome. Sorafenib als auch Pazopanib blockieren unter anderem vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor-Rezeptoren (VEGFRs) und beide Substanzen sollen damit die Tumor-Angiogenese vermindern^{33, 37}. In der Analyse der Tumor-Vaskularisierung zeigte sich unter Sorafenib eine signifikante Abnahme der Anzahl von Endothelzellen im Gewebe stark vaskularisierter subkutaner sowie intrazerebraler U87MG-Tumore, jedoch nicht in wenig vaskularisierten CX1-Xenografts. Darüber hinaus nahm unter Sorafenib die Anzahl von Gefäß-Perizyten in intrazerebralen U87MG-Tumoren ab. Unter Pazopanib ließ sich in keinem der untersuchten Tumormodelle einen Einfluss auf die Vaskularisierung feststellen.

Aus diesen Resultaten lässt sich insgesamt ableiten, dass eine Therapie mit Sorafenib oder Pazopanib das Wachstum humaner Glioblastome in Labormäusen nicht signifikant vermindern kann. Dennoch sind unter Sorafenib deutliche Effekte auf die Tumor-Angiogenese durch eine Verminderung der Anzahl von Endothelzellen sowie Gefäß-Perizyten festzustellen. Es lässt sich vermuten, dass durch eine Blockade der VEGFRs die Glioblastom-Angiogenese zwar beeinflusst wird, dies scheint jedoch nicht auszureichen, um zu einem signifikant vermindertem Tumorwachstum zu führen. Interessanterweise ergaben die Expressionsanalysen des epidermalen Wachstumsfaktors (EGFR) in intrazerebralen U87MG-Tumoren eine signifikante Abnahme der Rezeptor-Expression als auch -Phosphorylierung, sodass intrazerebrale Gliome trotz ausbleibender Größenabnahme scheinbar auf eine Sorafenib- oder Pazopanib-Therapie reagieren und durch An- oder Abschalten anderer Signalwege eine Therapie-Resistenz und eine weitere Tumorprogression ausbilden könnten. Die Neutralisierung von VEGF durch Bevacizumab ist einer Monotherapie mit Sorafenib oder Pazopanib in präklinischen Glioblastom-Modellen hinsichtlich der Auswirkungen auf das Tumorwachstum deutlich überlegen. Auch in klinischen Studien zur Behandlung des Glioblastoma multiforme^{41, 65} zeigten sich keine überlebensverlängernden Effekte beider Substanzen. Es bleibt Gegenstand zukünftiger Untersuchungen, ob bestimmte Untergruppen von Glioblastom-Patienten doch durch Sorafenib oder Pazopanib, eventuell in Form einer Kombinationstherapie, profitieren könnten.

4.3 Therapie humaner Glioblastome mit dem Multikinase-Hemmer Axitinib

Es wurden die Effekte des VEGFR-Tyrosinkinase-Hemmers Axitinib auf das Wachstum Patienten-abgeleiteter Glioblastom-Xenografts untersucht. Es zeigte sich eine deutliche, temporäre Abnahme der subkutanen Tumorgrößen in den ersten zwei Wochen einer

Axitinib-Therapie gegenüber der Kontrollgruppe, wobei das Glioblastomwachstum danach unter der Axitinib-Therapie wieder zunahm und nach drei Wochen nur noch geringe Unterschiede der Tumorzellvolumina zwischen der PBS- und der Axitinib-Gruppe bestanden. Es war jedoch zu diesem Zeitpunkt der Ki67-Proliferationsindex im Glioblastomgewebe unter Axitinib signifikant vermindert, im Gegensatz zu einer Bevacizumab-Therapie, die auf die Tumorzellgrößen als auch auf den Ki67-Proliferationsindex der Patienten-Xenografts keinen Effekt zeigte.

Weiterhin wurde die Wirkung von Axitinib auf die Tumor-Angiogenese in diesen Bevacizumab-resistenten Xenografts analysiert und es zeigte sich eine starke Abnahme der Anzahl von Endothelzellen auf 51% im Vergleich zur Kontrollgruppe, wobei dieser Betrag der Verminderung nur unter einer wirksamen Bevacizumab-Therapie in den jeweiligen Bevacizumab-sensiblen Glioblastom-Modellen beobachtet werden konnte. Die Anzahl von Perizyten nahm unter Axitinib ebenfalls signifikant ab, sodass sich ein direkter oder indirekter Einfluss von Axitinib auch auf diese Zelltypen vermuten lässt. Die Lagebeziehung von Endothelzellen und Perizyten war unter Axitinib nahezu aufgehoben, was durch eine Abnahme der Ummantelung von Endothelzellen mit Gefäß-Perizyten dargestellt werden konnte.

Weiterhin zeigte sich unter Axitinib eine vermehrte Expression des Hypoxie-Markers HIF1 α im Glioblastomgewebe und es waren unter Axitinib vermehrt apoptotische Glioblastomzellen im Vergleich zur Kontrollgruppe zu finden. Auslösend für den apoptotischen Zelltod lässt sich weniger ein direkter Effekt von Axitinib auf die Tumorzellen als ein Folgeeffekt der antiangiogenen Wirkungen von Axitinib mit konsekutiver eingeschränkter Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Glioblastomzellen vermuten.

Es wurde anhand immunhistochemischer Expressionsanalysen die Expressionsdichte von VEGF im Tumorgewebe der PBS- und der Axitinib-Gruppe untersucht. Dabei fanden sich keine Unterschiede in der Expressionsdichte, sodass die antiangiogene Wirkung von Axitinib ursächlich scheinbar nicht auf einer Veränderung der Menge an produziertem VEGF beruht. Es zeigte sich jedoch in den Glioblastomzellen eine Abnahme der mRNA-Expression von VEGF-A sowie des pro-angiogenen placentären Wachstumsfaktors PLGF, sodass von potentiellen Effekten einer Axitinib-Therapie auf die angiogenen Signalwege in den Gliomzellen ausgegangen werden kann, da die Glioblastomzellen in den Xenografts den VEGFR1 exprimierten. Dessen Expressionsdichte als auch die Expressionsdichte von PDGFR β und EGFR war im

Glioblastomgewebe der Kontroll- und der Axitinib-Gruppe gleich. Eine direkte Inhibierung der VEGF-Rezeptoren auf den Endothelzellen unter Axitinib ist auch hier als der wahrscheinlichste antiangiogene Wirkmechanismus anzunehmen⁴².

Da die in diesen Therapieversuchen verwendeten TX1-Glioblastome eine vollständige Therapie-Resistenz gegenüber Bevacizumab aufwiesen, jedoch zumindest temporär auf Axitinib angesprochen haben, könnte diese Substanz eine Alternative bei Patienten mit Bevacizumab-resistenten Glioblastomen sein. Es wird die Aufgabe zukünftiger präklinischer Experimente sein herauszufinden, welche Faktoren unter Axitinib in den Glioblastomen reaktiv vermehrt produziert werden und damit die Tumorprogression aufrecht erhalten könnten. Des Weiteren werden bereits laufende klinische Studien zeigen, welche Rolle Axitinib als Therapieoption bei Glioblastompatienten spielen könnte³⁴.

4.4 Epigenetische Therapie humaner Glioblastome mit 5-Azacytidin sowie Valproinsäure

Das Cytosin-Analogon 5-Azacytidin galt bereits vor mehr als 40 Jahren als ein Kandidat in der Onkologie⁵². Die Substanz führt durch Inhibierung von DNA-Methyltransferasen zu einer Hypomethylierung des Tumorzell-Genoms⁶⁶ und wird klinisch bereits erfolgreich in der Behandlung des myelodysplastischen Syndroms eingesetzt⁵³. Valproinsäure ist, neben einer antiepileptischen Wirkung⁴⁷, ebenfalls eine epigenetisch wirkende Substanz, die durch Inhibierung von Histon-Deacetylasen zu einer Histon-Hyperacetylierung führt und somit die Transkription und Differenzierung von Tumorzellen beeinflussen kann⁴⁸. Beide Substanzen wurden in dieser Arbeit verwendet und sollten in den verschiedenen Xenograft-Modellen auf deren potentielle antigliomatösen Effekte untersucht werden.

Neben einer Verminderung der Zellvitalität und Zellmigration sowie dem Auslösen von apoptotischem Zelltod humaner Glioblastomzellen *in vitro* verzögerte 5-Azacytidin signifikant das Glioblastom-Wachstum in subkutanen U87MG-Tumoren und in den Patienten-abgeleiteten Xenografts TX1 und TX2. Weiterhin führte eine Therapie mit 5-Azacytidin zu kleineren Tumorgrößen intrazerebraler U87MG und U373MG-Gliome. Der Ki67-Proliferationsindex war in den untersuchten Xenograft-Modellen unter 5-Azacytidin, korrelierend zu den jeweils kleineren Tumorgrößen, signifikant vermindert. In den stark vaskularisierten subkutanen sowie intrazerebralen U87MG-Tumoren verringerte 5-Azacytidin signifikant die Anzahl von Endothelzellen im Tumorgewebe.

Interessant ist die Beobachtung, dass 5-Azacytidin keinen Einfluss auf das Wachstum von gering vaskularisierten subkutanen CX1- und CX2-Tumoren zeigte. Auch ließen sich in diesen Modellen keine Effekte auf die Tumorzellproliferation oder die Gliom-Angiogenese feststellen. Daraus lässt sich ableiten, dass sich die epigenetischen Effekte einer 5-Azacytidin-Therapie entscheidend auf die Gliom-Angiogenese auswirken könnten und aus diesem Grund die Tumorprogression in den wenig vaskularisierten, Angiogenese-unabhängigeren CX-Xenografts nicht beeinflusst wurde. Die Wirkweise von 5-Azacytidin ist nicht gegen ein definiertes Molekül gerichtet, sondern durch ein breiteres Wirkspektrum charakterisiert, wobei die Ziele zukünftiger Untersuchungen darin bestehen, die genauen an- oder abgeschalteten Gene durch 5-Azacytidin in den Gliomzellen zu identifizieren, dabei die Rolle des „Glioma CpG island methylator phenotype“ (G-CIMP)⁶⁷ zu berücksichtigen und um damit die Möglichkeit einer zielgerichteten Therapie von Gliom-Subgruppen zu erhalten.

Im Gegensatz zu einer Therapie mit 5-Azacytidin verzögerte die Valproinsäure-Therapie lediglich das Wachstum subkutaner U373MG-Tumore und zeigte in keinem anderen subkutanen oder intrazerebralen Tumormodell eine signifikante Verkleinerung der Tumorgrößen. Auch hatte die Valproinsäure-Therapie weder einen Einfluss auf die Tumorzellproliferation, noch auf die Gliom-Angiogenese. Es konnte in den hier durchgeführten Studien kein signifikanter antitumoröser Effekt von Valproinsäure auf humane Glioblastome gefunden werden. Dennoch ist die Tatsache, dass Glioblastom-Patienten länger lebten, wenn sie Valproinsäure erhalten haben⁵¹, eine interessante Beobachtung, wobei dafür anhand der hier durchgeführten Studien weniger direkte Effekte von Valproinsäure auf die Gliomzellen, als vielmehr potentielle additive Effekte zu einer alkylierenden Temozolomid-Chemotherapie ursächlich sein könnten.

4.5 Therapie humaner Glioblastome mit dem mTor-Inhibitor Everolimus

Eine *targeted therapy* durch Blockade des mTor-Signalmoleküls in Tumorzellen ist ein vielversprechender Ansatz in der Onkologie, der bereits Einzug in die Klinik, beispielsweise zur Behandlung des Nierenzellkarzinoms⁶⁸, des Mammakarzinoms⁶⁹ oder des Pankreaskarzinoms⁷⁰, erhalten hat. Das Signalmolekül mTor nimmt in Tumorzellen eine zentrale Stellung in der Koordination zwischen Zellwachstum, Zellmetabolismus sowie Zellproliferation und nutritiven Elementen sowie dem Einfluss von Wachstumsfaktoren ein⁷¹. Die Aktivierung von mTor erfolgt hauptsächlich durch

den Signalweg PI3K-Akt-mTor mit der S6-Kinase als eine wichtige nachgeschaltete Effektorkinase und mit PTEN als Suppressor des gesamten Signalwegs⁷¹.

Die zielgerichtete Therapie des Glioblastoma multiforme durch Inhibierung von mTor mit Everolimus wurde in dieser Arbeit, bei bisher nur wenig vorhandenen präklinischen Daten⁷²⁻⁷⁵, weiter untersucht und die antitumorösen Wirkungen dieser Substanz anhand von in dieser Studie verwendeten Glioblastom-Xenograft-Modellen weiter untersucht. In den vorangestellten *in vitro* – Experimenten ergab sich nach Inkubation mit Everolimus eine konzentrationsabhängige Abnahme der Zellvitalität von Glioblastom-Zelllinien als auch Glioblastom-Primärzellen. Weiterhin zeigten die Glioblastom-Zellen nach Everolimus-Gabe eine vermehrt abgerundete Morphologie und die Gabe der Substanz führte zum apoptotischen Zelltod. Ebenfalls war die Zellmigration *in vitro* unter Everolimus signifikant vermindert. *In vivo* führte eine Everolimus-Therapie zu einer Wachstumsverzögerung in allen subkutanen Glioblastom-Modellen, in den Zelllinien- und Primärzellen-abgeleiteten Xenografts als auch in den Patienten-abgeleiteten Xenografts. Von allen in dieser Arbeit verwendeten Substanzen verzögerte Everolimus als einzige Substanz das Wachstum in allen subkutanen Gliom-Modellen. Die Tumorgrößen intrazerebraler U373MG-Tumore waren im Vergleich zur Kontrollgruppe ebenfalls deutlich kleiner, auch das Tumorwachstum der intrazerebralen U87MG-Tumore war unter Everolimus signifikant vermindert, hier waren die Tumore sogar kleiner als die in der Bevacizumab-Gruppe.

Mit immunhistochemischen Färbeanalysen sollte der Wirkmechanismus der Everolimus-Therapie in den Xenograft-Modellen überprüft werden. Hier zeigte sich in subkutanen Primärzell-abgeleiteten sowie Patienten-abgeleiteten Xenografts als auch in intrazerebralen U87MG-Tumoren eine deutliche und statistisch signifikante Abnahme der Expressionsdichte von phosphoryliertem und damit aktiviertem mTor. Die im mTor-Signalweg nachgeschaltete S6-Kinase wurde ebenfalls immunhistochemisch dargestellt und die phosphorylierte S6-Kinase war unter der Everolimus-Therapie in den Glioblastomzellen ebenfalls signifikant geringer exprimiert. Der mTor-Supressor PTEN war im Glioblastomgewebe nicht exprimiert, was ein konstitutives mTor-Signaling in den Gliomzellen wahrscheinlich macht, das durch die Everolimus-Therapie in den Glioblastom-Xenografts unterbunden werden konnte.

Der Ki67-Proliferationsindex war in allen untersuchten Tumormodellen statistisch signifikant zur PBS-Kontrollgruppe vermindert. Weiterhin ergab sich, verglichen mit der Kontrollgruppe, ein signifikant erhöhter Apoptose-Score der Gliomzellen im

Tumorgewebe intrazerebraler U87MG-Tumore. In diesen Tumoren ergab die Analyse der Expression des epidermalen Wachstumsfaktors eine verminderte Expression von EGFR und phospho-EGFR unter der Everolimus-Therapie. Die Untersuchung des Einflusses einer Everolimus-Therapie auf die Tumor-Angiogenese ergab in den untersuchten Xenograft-Modellen nicht in den subkutanen Modellen, aber in intrazerebralen U87MG-Tumoren eine Verminderung der Anzahl von Endothelzellen sowie von Gefäß-Perizyten. Hierbei wurde festgestellt, dass im Vergleich zur PBS-Gruppe eine höhere Rate an apoptotischen Endothelzellen vorlag, diese jedoch deutlich niedriger als der Anteil unter Bevacizumab war. Eine Möglichkeit, dass sich die potentiellen anti-angiogenen Effekte durch Everolimus^{76, 77} hier nur in den intrazerebralen U87MG-Tumoren nachweisen lassen konnten ist, dass das umgebende Maus-Hirngewebe eine besondere Rolle für die Biologie dieser intrazerebralen Gliome spielt und angiogene Signalwege durch eine mTor-Blockade nur in dieser speziellen, pathophysiologisch relevanten Mikroumgebung betroffen sind.

Es gibt kaum klinische Studien mit meist nur kleinen Fallserien zu einer mTor-inhibierenden Therapie bei Glioblastom-Patienten⁷⁸⁻⁸⁰. In einer durchgeführten klinischen Studie mit dem mTor-Inhibitor Temsirolimus bei rezidierten Glioblastomen zeigte sich bei guter Verträglichkeit dieser Substanz ein neuroradiologisches Ansprechen dieser Therapie bei einem Drittel der Patienten mit einer deutlich verlängerten Zeit bis zur erneuten Tumorprogression, wobei die Glioblastome der Responder vor Therapiebeginn eine höhere Expression der phosphorylierten S6-Kinase aufwiesen⁴⁶. Dieser Zusammenhang konnte auch in anderen Studien nachgewiesen werden⁷⁹⁻⁸¹ und deutet darauf hin, dass die Blockade von mTor insbesondere dann wirksam ist, wenn der mTor-Signalweg, beispielsweise durch ein verstärktes und konstitutiv aktives Signaling von Wachstumsfaktorrezeptoren wie EGFR^{82, 83}, besonders stark aktiv ist.

Aber auch dem Tumorsuppressor PTEN kommt eine Bedeutung zu. PTEN ist in humanen Glioblastomen häufig deletiert⁸⁴, was zu einem konstitutiven mTor-Signaling führt⁸⁵. Es zeigte sich, dass in nahezu 90% der Glioblastome ein konstitutiv aktives Signaling des PI3K-Akt-mTor-Signalwegs vorliegt⁸⁶ und dies mit dem WHO-Grad der Gliome und dem Überleben der Patienten korreliert⁸⁷. Jedoch wurde nachgewiesen, dass der Funktionsstatus von PTEN in den Glioblastomzellen das Ansprechen einer Everolimus-Therapie nicht vorhersagen kann und PTEN damit als prädiktiver Marker keine Bedeutung zu haben scheint⁷⁴.

In der Neuroonkologie erwies sich die Everolimus-Therapie mit der Inhibierung des mTor-Moleküls in subependymalen Riesenzellastrozytomen als die erste erfolgreiche Anwendung einer zielgerichteten Therapie von intrazerebral wachsenden Tumoren⁸⁸. Bei Patienten mit subependymalen Riesenzellastrozytomen, die im Rahmen der tuberösen Sklerose vorkommen und durch die Hochregulierung der mTor-Signalwege charakterisiert sind, erwies sich Everolimus in einer klinischen Studie als wirksam und wurde für die Behandlung dieser Tumore zugelassen⁸⁹. Aber auch in Gliomen konnte ein Ansprechen einer mTor-Inhibierung, jedoch nur für eine kurze Zeitdauer, beobachtet werden⁹⁰, sodass es vielversprechend ist, in zukünftigen Untersuchungen genau zu analysieren, welche besonderen molekularen Eigenschaften der Gliome zu einem Ansprechen oder zu einer Resistenzentwicklung einer Everolimus-Therapie führen. Die Analyse weiterer prädiktiver Biomarker ist für eine Einteilung der Patienten in Subgruppen, die dann von der mTor-Inhibierung profitieren können, notwendig.

4.6 Der Ansatz einer zielgerichteten, personalisierten Glioblastom-Therapie

Über viele Jahrzehnte konnte man die Prognose von Patienten mit Glioblastomen nicht verbessern, die sehr kurze mittlere Überlebenszeit von etwa einem Jahr konnte auch durch viele Fortschritte im neurochirurgischen, neuroonkologischen und pharmakologischen Bereich nicht verlängert werden. Mit dem Einzug von Temozolomid in die Therapie des Glioblastoma multiforme konnte erstmals das Überleben der Glioblastompatienten durch eine Chemotherapie verlängert werden, wobei sich die durchschnittliche Überlebenszeit der Patienten von 12,1 Monaten nach Operation und unter alleiniger Radiotherapie auf 14,6 Monate bei zusätzlicher Gabe von Temozolomid signifikant verlängerte²¹. Mit molekulargenetischen Analysen des Glioblastomgewebes stellte man fest, dass durch eine Therapie mit dieser alkylierenden Substanz eine Subgruppe der Glioblastompatienten mit methyliertem und damit inaktiviertem MGMT-Promotor besonders von Temozolomid profitiert, da das MGMT-Enzym die Alkylgruppen wieder entfernt und die Wirkung von Temozolomid somit einschränken kann²⁹. Dies zeigt, dass auch bei den histologisch und molekulargenetisch sehr komplexen Glioblastomen eine Subgruppierung möglich ist, die die Patientenpopulation in Responder und Nonresponder einteilen kann. Zwar war die Verlängerung der Überlebenszeit der Glioblastompatienten mit einer Temozolomid-Therapie um durchschnittlich zwei Monate ein Fortschritt in der Neuroonkologie, jedoch bleibt die sehr schlechte Prognose dieser Tumorerkrankung bestehen und die Erkrankung

Glioblastoma multiforme unheilbar. Aus den Erfahrungen, dass konventionelle Chemotherapien bei malignen Gliomen nur kaum bis gar nicht wirken, ist die *targeted therapy* ein vielversprechender neuroonkologischer Ansatz. Das Prinzip ist, ganz bestimmte Moleküle, die ausschließlich von den Gliomzellen exprimiert werden oder in den Gliomzellen überexprimiert oder mutiert vorliegen, pharmakologisch zu blockieren. Diese gezielte Therapie soll hauptsächlich auf das Gliomgewebe fokussieren, damit den Tumor gezielt therapieren und Nebenwirkungen auf den Gesamtorganismus verringern. Insgesamt entsprechen die Ergebnisse der bisher durchgeführten klinischen Studien mit zielgerichteten Therapien für das Glioblastoma multiforme nicht den in sie gesetzten Erwartungen bezüglich einer Verlängerung des Patienten-Überlebens. Trotz ihrer nachgewiesenen sehr guten Wirksamkeit bei anderen Tumorentitäten kann man etablierte pharmakologische Therapien nicht ohne weiteres auf maligne Gliome übertragen, da beispielsweise die Blut-Hirn-Schranke den Übertritt vieler Substanzen aus der peripheren Zirkulation in das zentrale Nervensystem verhindert⁹¹. Die Wirksamkeit von Therapien mit zielgerichteten Substanzen bei nur bestimmten Glioblastomen mit bestimmten molekulargenetischen Eigenschaften könnte durch die bisher fehlende Subgruppierung der Patientenpopulationen in den klinischen Studien nicht erkannt werden. Jedoch wird häufig über ein temporäres, radiologisches Ansprechen der jeweiligen Therapie berichtet, was zu weiteren Studien, insbesondere über Resistenzentwicklungen sowie Kombinationstherapien, ermutigt.

Die malignen Gliome sind besonders bösartige Tumorentitäten, deren Pathogenese nicht vollständig erforscht ist. Bisher ist unter anderem bekannt, dass Mutationen in der Isocitrat-Dehydrogenase (IDH) eine Rolle in der frühen Gliomentstehung spielen und dass dadurch bestimmte Onko-Metaboliten in den Gliomzellen akkumulieren, die epigenetische Veränderungen wie den sogenannten „Glioma CpG island methylator phenotype“ (G-CIMP) induzieren^{67, 92}. Das Glioblastoma multiforme ist eine sehr heterogene Tumormasse, die nicht, soweit bisher bekannt, durch ein universell exprimiertes und pharmakologisch blockierbares Protein charakterisiert und dadurch in ihrem Wachstum einzuschränken ist. Weitere zukünftige Untersuchungen sind notwendig, um die Gliomzellen weiter molekulargenetisch zu charakterisieren und um relevante *targets* für die zielgerichtete Therapie zu identifizieren. Eine molekulargenetische Einteilung der malignen Gliome in die Untergruppen proneural, neural, klassisch und mesenchymal anhand Mutationsanalysen von PDGFR, IDH1, EGFR und NF1 ist ein erster und vielversprechender Ansatz⁹³. Es gilt darüber hinaus

noch weiter herauszufinden, wie diese molekulargenetischen Subtypen der Glioblastome charakterisiert sind, wie sie auf bestimmte Therapien reagieren und um dann mit diesem Wissen den jeweiligen Gliom-Typ bei den betroffenen Patienten zu ermitteln. Dadurch könnte man die spezifischen und relevanten Signalwege in den Gliomzellen gezielt blockieren und die Therapie maligner Gliome erfolgreich erweitern. Jede weitere Therapieoption, die die Lebensqualität oder das Überleben der Erkrankten verbessert, gilt als sehr wertvoll für die mit dieser hochmalignen Erkrankung betroffenen Patienten.

5 Literaturverzeichnis

1. GERBER DE. Targeted therapies: a new generation of cancer treatments. *Am Fam Physician* 2008;77:311-9.
2. DRUKER BJ, TALPAZ M, RESTA DJ, PENG B, BUCHDUNGER E, FORD JM, LYDON NB, KANTARJIAN H, CAPDEVILLE R, OHNO-JONES S, SAWYERS CL. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2001;344:1031-7.
3. SLAMON DJ, LEYLAND-JONES B, SHAK S, FUCHS H, PATON V, BAJAMONDE A, FLEMING T, EIERMANN W, WOLTER J, PEGRAM M, BASELGA J, NORTON L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344:783-92.
4. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005;365:1687-717.
5. FERRARA N, HILLAN KJ, GERBER HP, NOVOTNY W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:391-400.
6. MCLAUGHLIN P, GRILLO-LOPEZ AJ, LINK BK, LEVY R, CZUCZMAN MS, WILLIAMS ME, HEYMAN MR, BENCE-BRUCKLER I, WHITE CA, CABANILLAS F, JAIN V, HO AD, LISTER J, WEY K, SHEN D, DALLAIRE BK. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol* 1998;16:2825-33.
7. LOUIS DN, OHGAKI H, WIESTLER OD, CAVENEE WK, BURGER PC, JOUVET A, SCHEITHAUER BW, KLEIHUES P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007;114:97-109.
8. LOUIS D, OHGAKI H, WIESTLER O, CAVANEE W. Astrocytic Tumours. In: WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System: Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2007.
9. WILSON CB. Glioblastoma: the past, the present, and the future. *Clin Neurosurg* 1992;38:32-48.
10. OHGAKI H, KLEIHUES P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol* 2005;109:93-108.
11. OHGAKI H. Epidemiology of brain tumors. *Methods Mol Biol* 2009;472:323-42.
12. BURGER P, SCHEITHAUER B. Astrocytic Neoplasms. In: Tumors of the Central Nervous System: Washington, DC: American Registry of Pathology, 2007.
13. STUPP R, HEGI ME, MASON WP, VAN DEN BENT MJ, TAPHOORN MJ, JANZER RC, LUDWIN SK, ALLGEIER A, FISHER B, BELANGER K, HAU P, BRANDES AA, GIJTENBEEK J, MAROSI C, VECHT CJ, MOKHTARI K, WESSELING P, VILLA S, EISENHAUER E, GORLIA T, WELLER M, LACOMBE D, CAIRNCROSS JG, MIRIMANOFF RO. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 2009;10:459-66.
14. JENKINS RB, BLAIR H, BALLMAN KV, GIANNINI C, ARUSELL RM, LAW M, FLYNN H, PASSE S, FELTEN S, BROWN PD, SHAW EG, BUCKNER JC. A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. *Cancer Res* 2006;66:9852-61.
15. YAN H, PARSONS DW, JIN G, MCLENDON R, RASHEED BA, YUAN W, KOS I, BATINIC-HABERLE I, JONES S, RIGGINS GJ, FRIEDMAN H, FRIEDMAN A, REARDON D, HERNDON J, KINZLER KW, VELCULESCU VE, VOGELSTEIN B, BIGNER DD. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* 2009;360:765-73.
16. OHGAKI H, KLEIHUES P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 2007;170:1445-53.
17. PARSONS DW, JONES S, ZHANG X, LIN JC, LEARY RJ, ANGENENDT P, MANKOO P, CARTER H, SIU IM, GALLIA GL, OLIVI A, MCLENDON R, RASHEED BA, KEIR S, NIKOLSKAYA T, NIKOLSKY Y, BUSAM DA, TEKLEAB H, DIAZ LA, JR., HARTIGAN J, SMITH DR, STRAUSBERG RL, MARIE SK, SHINJO SM, YAN H, RIGGINS GJ, BIGNER DD, KARCHIN R, PAPADOPOULOS N, PARMIGIANI G, VOGELSTEIN B, VELCULESCU VE, KINZLER KW. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 2008;321:1807-12.
18. GIESE A, BJERKVIG R, BERENS ME, WESTPHAL M. Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *J Clin Oncol* 2003;21:1624-36.
19. BURGER PC, VOGEL FS, GREEN SB, STRIKE TA. Glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. Pathologic criteria and prognostic implications. *Cancer* 1985;56:1106-11.
20. STUMMER W, PICHLMEIER U, MEINEL T, WIESTLER OD, ZANELLA F, REULEN HJ. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol* 2006;7:392-401.
21. STUPP R, MASON WP, VAN DEN BENT MJ, WELLER M, FISHER B, TAPHOORN MJ, BELANGER K, BRANDES AA, MAROSI C, BOGDAN U, CURSCHMANN J, JANZER RC, LUDWIN SK, GORLIA T, ALLGEIER A, LACOMBE D, CAIRNCROSS JG, EISENHAUER E, MIRIMANOFF RO. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;352:987-96.

22. FRIEDMAN HS, PRADOS MD, WEN PY, MIKKELSEN T, SCHIFF D, ABREY LE, YUNG WK, PALEOLOGOS N, NICHOLAS MK, JENSEN R, VREDENBURGH J, HUANG J, ZHENG M, CLOUGHESY T. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* 2009;27:4733-40.
23. CHINOT OL, DE LA MOTTE ROUGE T, MOORE N, ZEAITER A, DAS A, PHILLIPS H, MODRUSAN Z, CLOUGHESY T. AVAglio: Phase 3 trial of bevacizumab plus temozolomide and radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Adv Ther* 2011;28:334-40.
24. CHINOT OL, WICK W, MASON W, HENRIKSSON R, SARAN F, NISHIKAWA R, CARPENTIER AF, HOANG-XUAN K, KAVAN P, CERNEA D, BRANDES AA, HILTON M, ABREY L, CLOUGHESY T. Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med* 2014;370:709-22.
25. GILBERT MR, DIGNAM JJ, ARMSTRONG TS, WEFEL JS, BLUMENTHAL DT, VOGELBAUM MA, COLMAN H, CHAKRAVARTI A, PUGH S, WON M, JERAJ R, BROWN PD, JAECKLE KA, SCHIFF D, STIEBER VW, BRACHMAN DG, WERNER-WASIK M, TREMONT-LUKATS IW, SULMAN EP, ALDAPE KD, CURRAN WJ, JR., MEHTA MP. A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med* 2014;370:699-708.
26. PAEZ-RIBES M, ALLEN E, HUDOCK J, TAKEDA T, OKUYAMA H, VINALS F, INOUE M, BERGERS G, HANAHAN D, CASANOVAS O. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell* 2009;15:220-31.
27. THAKER NG, POLLACK IF. Molecularly targeted therapies for malignant glioma: rationale for combinatorial strategies. *Expert Rev Neurother* 2009;9:1815-36.
28. FRIEDMAN HS, KERBY T, CALVERT H. Temozolomide and treatment of malignant glioma. *Clin Cancer Res* 2000;6:2585-97.
29. HEGI ME, DISERENS AC, GORLIA T, HAMOU MF, DE TRIBOLET N, WELLER M, KROS JM, HAINFELLNER JA, MASON W, MARIANI L, BROMBERG JE, HAU P, MIRIMANOFF RO, CAIRNCROSS JG, JANZER RC, STUPP R. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;352:997-1003.
30. JAIN RK, DI TOMASO E, DUDA DG, LOEFFLER JS, SORENSEN AG, BATCHELOR TT. Angiogenesis in brain tumours. *Nat Rev Neurosci* 2007;8:610-22.
31. SEYSTAHL K, WIESTLER B, HUNDSBERGER T, HAPPOLD C, WICK W, WELLER M, WICK A. Bevacizumab Alone or in Combination with Irinotecan in Recurrent WHO Grade II and Grade III Gliomas. *Eur Neurol* 2012;69:95-101.
32. NORDEN AD, YOUNG GS, SETAYESH K, MUZIKANSKY A, KLUFAS R, ROSS GL, CIAMPA AS, EBBELING LG, LEVY B, DRAPPATZ J, KESARI S, WEN PY. Bevacizumab for recurrent malignant gliomas: efficacy, toxicity, and patterns of recurrence. *Neurology* 2008;70:779-87.
33. WILHELM S, CARTER C, LYNCH M, LOWINGER T, DUMAS J, SMITH RA, SCHWARTZ B, SIMANTOV R, KELLEY S. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:835-44.
34. <http://www.clinicaltrials.gov>
35. ESCUDIER B, EISEN T, STADLER WM, SZCZYLIK C, OUDARD S, SIEBELS M, NEGRIER S, CHEVREAU C, SOLSKA E, DESAI AA, ROLLAND F, DEMKOW T, HUTSON TE, GORE M, FREEMAN S, SCHWARTZ B, SHAN M, SIMANTOV R, BUKOWSKI RM. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007;356:125-34.
36. LLOVET JM, RICCI S, MAZZAFERRO V, HILGARD P, GANE E, BLANC JF, DE OLIVEIRA AC, SANTORO A, RAOUL JL, FORNER A, SCHWARTZ M, PORTA C, ZEUZEM S, BOLONDI L, GRETEN TF, GALLE PR, SEITZ JF, BORBATH I, HAUSSINGER D, GIANNARIS T, SHAN M, MOSCOVICI M, VOLIOTIS D, BRUIX J. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008;359:378-90.
37. SONPAVDE G, HUTSON TE. Pazopanib: a novel multitargeted tyrosine kinase inhibitor. *Curr Oncol Rep* 2007;9:115-9.
38. KUMAR R, KNICK VB, RUDOLPH SK, JOHNSON JH, CROSBY RM, CROUTHAMEL MC, HOPPER TM, MILLER CG, HARRINGTON LE, ONORI JA, MULLIN RJ, GILMER TM, TRUESDALE AT, EPPERLY AH, BOLOOR A, STAFFORD JA, LUTTRELL DK, CHEUNG M. Pharmacokinetic-pharmacodynamic correlation from mouse to human with pazopanib, a multikinase angiogenesis inhibitor with potent antitumor and antiangiogenic activity. *Mol Cancer Ther* 2007;6:2012-21.
39. PICK AM, NYSTROM KK. Pazopanib for the treatment of metastatic renal cell carcinoma. *Clin Ther* 2012;34:511-20.
40. VAN DER GRAAF WT, BLAY JY, CHAWLA SP, KIM DW, BUI-NGUYEN B, CASALI PG, SCHOFFSKI P, AGLIETTA M, STADDON AP, BEPPU Y, LE CESNE A, GELDERBLUM H, JUDSON IR, ARAKI N, OUALI M, MARREAUD S, HODGE R, DEWJI MR, COENS C, DEMETRI GD, FLETCHER CD, DEI TOS AP, HOHENBERGER P. Pazopanib for metastatic soft-tissue sarcoma (PALETTE): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* 2012;379:1879-86.
41. IWAMOTO FM, LAMBORN KR, ROBINS HI, MEHTA MP, CHANG SM, BUTOWSKI NA, DEANGELIS LM, ABREY LE, ZHANG WT, PRADOS MD, FINE HA. Phase II trial of pazopanib (GW786034), an oral multi-targeted

- angiogenesis inhibitor, for adults with recurrent glioblastoma (North American Brain Tumor Consortium Study 06-02). *Neuro Oncol* 2010;12:855-61.
42. HU-LOWE DD, ZOU HY, GRAZZINI ML, HALLIN ME, WICKMAN GR, AMUNDSON K, CHEN JH, REWOLINSKI DA, YAMAZAKI S, WU EY, MCTIGUE MA, MURRAY BW, KANIA RS, O'CONNOR P, SHALINSKY DR, BENDER SL. Nonclinical antiangiogenesis and antitumor activities of axitinib (AG-013736), an oral, potent, and selective inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases 1, 2, 3. *Clin Cancer Res* 2008;14:7272-83.
 43. RINI BI, ESCUDIER B, TOMCZAK P, KAPRIN A, SZCZYLIK C, HUTSON TE, MICHAELSON MD, GORBUNOVA VA, GORE ME, RUSAKOV IG, NEGRIER S, OU YC, CASTELLANO D, LIM HY, UEMURA H, TARAIZI J, CELLA D, CHEN C, ROSBROOK B, KIM S, MOTZER RJ. Comparative effectiveness of axitinib versus sorafenib in advanced renal cell carcinoma (AXIS): a randomised phase 3 trial. *Lancet* 2011;378:1931-9.
 44. SABATINI DM. mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat Rev Cancer* 2006;6:729-34.
 45. FAIVRE S, KROEMER G, RAYMOND E. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:671-88.
 46. GALANIS E, BUCKNER JC, MAURER MJ, KREISBERG JI, BALLMAN K, BONI J, PERALBA JM, JENKINS RB, DAKHIL SR, MORTON RF, JAECKLE KA, SCHEITHAUER BW, DANCEY J, HIDALGO M, WALSH DJ. Phase II trial of temsirolimus (CCI-779) in recurrent glioblastoma multiforme: a North Central Cancer Treatment Group Study. *J Clin Oncol* 2005;23:5294-304.
 47. MATTSON RH, CRAMER JA, COLLINS JF. A comparison of valproate with carbamazepine for the treatment of complex partial seizures and secondarily generalized tonic-clonic seizures in adults. The Department of Veterans Affairs Epilepsy Cooperative Study No. 264 Group. *N Engl J Med* 1992;327:765-71.
 48. GOTTLICHER M, MINUCCI S, ZHU P, KRAMER OH, SCHIMPF A, GIAVARA S, SLEEMAN JP, LO COCO F, NERVI C, PELICCI PG, HEINZEL T. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J* 2001;20:6969-78.
 49. YOO CB, JONES PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:37-50.
 50. KUENDGEN A, STRUPP C, AIVADO M, BERNHARDT A, HILDEBRANDT B, HAAS R, GERMING U, GATTERMANN N. Treatment of myelodysplastic syndromes with valproic acid alone or in combination with all-trans retinoic acid. *Blood* 2004;104:1266-9.
 51. WELLER M, GORLIA T, CAIRNCROSS JG, VAN DEN BENT MJ, MASON W, BELANGER K, BRANDES AA, BOGDAHN U, MACDONALD DR, FORSYTH P, ROSSETTI AO, LACOMBE D, MIRIMANOFF RO, VECHT CJ, STUPP R. Prolonged survival with valproic acid use in the EORTC/NCIC temozolomide trial for glioblastoma. *Neurology* 2011;77:1156-64.
 52. CAREN H, POLLARD SM, BECK S. The good, the bad and the ugly: epigenetic mechanisms in glioblastoma. *Mol Aspects Med* 2013;34:849-62.
 53. SILVERMAN LR, DEMAKOS EP, PETERSON BL, KORNBLITH AB, HOLLAND JC, ODCHIMAR-REISSIG R, STONE RM, NELSON D, POWELL BL, DECASTRO CM, ELLERTON J, LARSON RA, SCHIFFER CA, HOLLAND JF. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol* 2002;20:2429-40.
 54. Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Fassung vom 25. Mai 1998 (BGBl I S. 1105).
 55. WORKMAN P, ABOAGYE EO, BALKWILL F, BALMAIN A, BRUDER G, CHAPLIN DJ, DOUBLE JA, EVERITT J, FARNINGHAM DA, GLENNIE MJ, KELLAND LR, ROBINSON V, STRATFORD IJ, TOZER GM, WATSON S, WEDGE SR, ECCLES SA. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *Br J Cancer* 2010;102:1555-77.
 56. LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402-8.
 57. LI A, WALLING J, KOTLIAROV Y, CENTER A, STEED ME, AHN SJ, ROSENBLUM M, MIKKELSEN T, ZENKLUSEN JC, FINE HA. Genomic changes and gene expression profiles reveal that established glioma cell lines are poorly representative of primary human gliomas. *Mol Cancer Res* 2008;6:21-30.
 58. TAILLANDIER L, ANTUNES L, ANGIOI-DUPREZ KS. Models for neuro-oncological preclinical studies: solid orthotopic and heterotopic grafts of human gliomas into nude mice. *J Neurosci Methods* 2003;125:147-57.
 59. CARLSON BL, POKORNY JL, SCHROEDER MA, SARKARIA JN. Establishment, maintenance and in vitro and in vivo applications of primary human glioblastoma multiforme (GBM) xenograft models for translational biology studies and drug discovery. *Curr Protoc Pharmacol* 2011;Chapter 14:Unit 14 16.
 60. KITANGE GJ, CARLSON BL, MLADEK AC, DECKER PA, SCHROEDER MA, WU W, GROGAN PT, GIANNINI C, BALLMAN KV, BUCKNER JC, JAMES CD, SARKARIA JN. Evaluation of MGMT promoter methylation status and correlation with temozolomide response in orthotopic glioblastoma xenograft model. *J Neurooncol* 2009;92:23-31.

61. GIANNINI C, SARKARIA JN, SAITO A, UHM JH, GALANIS E, CARLSON BL, SCHROEDER MA, JAMES CD. Patient tumor EGFR and PDGFRA gene amplifications retained in an invasive intracranial xenograft model of glioblastoma multiforme. *Neuro Oncol* 2005;7:164-76.
62. FEI XF, ZHANG QB, DONG J, DIAO Y, WANG ZM, LI RJ, WU ZC, WANG AD, LAN Q, ZHANG SM, HUANG Q. Development of clinically relevant orthotopic xenograft mouse model of metastatic lung cancer and glioblastoma through surgical tumor tissues injection with trocar. *J Exp Clin Cancer Res* 2010;29:84.
63. WANG J, MILETIC H, SAKARIASSEN P, HUSZTHY PC, JACOBSEN H, BREKKA N, LI X, ZHAO P, MØRK S, CHEKENYA M, BJERKVIK R, ENGER P. A reproducible brain tumour model established from human glioblastoma biopsies. *BMC Cancer* 2009;9:465. A reproducible brain tumour model established from human glioblastoma biopsies. *doi: 10.1186/1471-2407-9-465*.
64. DAI C, HOLLAND EC. Glioma models. *Biochim Biophys Acta* 2001;1551:M19-27.
65. HAINSWORTH JD, ERVIN T, FRIEDMAN E, PRIEGO V, MURPHY PB, CLARK BL, LAMAR RE. Concurrent radiotherapy and temozolomide followed by temozolomide and sorafenib in the first-line treatment of patients with glioblastoma multiforme. *Cancer* 2010;116:3663-9.
66. JONES PA, TAYLOR SM. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell* 1980;20:85-93.
67. TURCAN S, ROHLE D, GOENKA A, WALSH LA, FANG F, YILMAZ E, CAMPOS C, FABIUS AW, LU C, WARD PS, THOMPSON CB, KAUFMAN A, GURYANOVA O, LEVINE R, HEGUY A, VIALE A, MORRIS LG, HUSE JT, MELLINGHOFF IK, CHAN TA. IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature* 2012;483:479-83.
68. MOTZER RJ, ESCUDIER B, OUDARD S, HUTSON TE, PORTA C, BRACARDA S, GRUNWALD V, THOMPSON JA, FIGLIN RA, HOLLAENDER N, URBANOWITZ G, BERG WJ, KAY A, LEBWOHL D, RAVAUD A. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet* 2008;372:449-56.
69. CHAN S, SCHEULEN ME, JOHNSTON S, MROSS K, CARDOSO F, DITTRICH C, EIERMANN W, HESS D, MORANT R, SEMIGLAZOV V, BORNER M, SALZBERG M, OSTAPENKO V, ILLIGER HJ, BEHRINGER D, BARDY-BOUXIN N, BONI J, KONG S, CINCOTTA M, MOORE L. Phase II study of temsirolimus (CCI-779), a novel inhibitor of mTOR, in heavily pretreated patients with locally advanced or metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:5314-22.
70. YAO JC, SHAH MH, ITO T, BOHAS CL, WOLIN EM, VAN CUTSEM E, HOBDAV TJ, OKUSAKA T, CAPDEVILA J, DE VRIES EG, TOMASSETTI P, PAVEL ME, HOOSSEN S, HAAS T, LINCY J, LEBWOHL D, OBERG K. Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med* 2011;364:514-23.
71. WULLSCHLEGER S, LOEWITH R, HALL MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 2006;124:471-84.
72. CHAUMEIL MM, OZAWA T, PARK I, SCOTT K, JAMES CD, NELSON SJ, RONEN SM. Hyperpolarized ¹³C MR spectroscopic imaging can be used to monitor Everolimus treatment in vivo in an orthotopic rodent model of glioblastoma. *Neuroimage* 2012;59:193-201.
73. GOUDAR RK, SHI Q, HJELMELAND MD, KEIR ST, MCLENDON RE, WIKSTRAND CJ, REESE ED, CONRAD CA, TRAXLER P, LANE HA, REARDON DA, CAVENEE WK, WANG XF, BIGNER DD, FRIEDMAN HS, RICH JN. Combination therapy of inhibitors of epidermal growth factor receptor/vascular endothelial growth factor receptor 2 (AEE788) and the mammalian target of rapamycin (RAD001) offers improved glioblastoma tumor growth inhibition. *Mol Cancer Ther* 2005;4:101-12.
74. YANG L, CLARKE MJ, CARLSON BL, MLADEK AC, SCHROEDER MA, DECKER P, WU W, KITANGE GJ, GROGAN PT, GOBLE JM, UHM J, GALANIS E, GIANNINI C, LANE HA, JAMES CD, SARKARIA JN. PTEN loss does not predict for response to RAD001 (everolimus) in a glioblastoma orthotopic xenograft test panel. *Clinical Cancer Research* 2008;14:3993-4001.
75. ARCELLA A, BIAGIONI F, ANTONIETTA OLIVA M, BUCCI D, FRATI A, ESPOSITO V, CANTORE G, GIANGASPERO F, FORNAI F. Rapamycin inhibits the growth of glioblastoma. *Brain Res* 2013;1495:37-51.
76. LANE HA, WOOD JM, MCSHEEHY PMJ, ALLEGRI PR, BOULAY A, BRUEGGEN J, LITTLEWOOD-EVANS A, MAIRA SM, MARTINY-BARON G, SCHNELL CR, SINI P, O'REILLY T. mTOR Inhibitor RAD001 (Everolimus) Has Antiangiogenic/Vascular Properties Distinct from a VEGFR Tyrosine Kinase Inhibitor. *Clinical Cancer Research* 2009;15:1612-1622.
77. MABUCHI S, ALTOMARE DA, CHEUNG M, ZHANG L, POULIKAKOS PI, HENSLEY HH, SCHILDER RJ, OZOLS RF, TESTA JR. RAD001 inhibits human ovarian cancer cell proliferation, enhances cisplatin-induced apoptosis, and prolongs survival in an ovarian cancer model. *Clin Cancer Res* 2007;13:4261-70.
78. KREISL TN, LASSMAN AB, MISCHER PS, ROSEN N, SCHER HI, TERUYA-FELDSTEIN J, SHAFFER D, LIS E, ABREY LE. A pilot study of everolimus and gefitinib in the treatment of recurrent glioblastoma (GBM). *J Neurooncol* 2009;92:99-105.
79. SARKARIA JN, GALANIS E, WU W, PELLER PJ, GIANNINI C, BROWN PD, UHM JH, MCGRAW S, JAECKLE KA, BUCKNER JC. North Central Cancer Treatment Group Phase I trial N057K of everolimus (RAD001) and

- temozolomide in combination with radiation therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011;81:468-75.
80. HAINSWORTH JD, SHIH KC, SHEPARD GC, TILLINGHAST GW, BRINKER BT, SPIGEL DR. Phase II study of concurrent radiation therapy, temozolomide, and bevacizumab followed by bevacizumab/everolimus as first-line treatment for patients with glioblastoma. *Clin Adv Hematol Oncol* 2012;10:240-6.
81. CLOUGHESY TF, YOSHIMOTO K, NGHIEMPHU P, BROWN K, DANG J, ZHU S, HSUEH T, CHEN Y, WANG W, YOUNGKIN D, LIAU L, MARTIN N, BECKER D, BERGSNEIDER M, LAI A, GREEN R, OGLESBY T, KOLETO M, TRENT J, HORVATH S, MISCHEL PS, MELLINGHOFF IK, SAWYERS CL. Antitumor activity of rapamycin in a Phase I trial for patients with recurrent PTEN-deficient glioblastoma. *PLoS Med* 2008;5:e8.
82. WANG MY, LU KV, ZHU S, DIA EQ, VIVANCO I, SHACKLEFORD GM, CAVENEE WK, MELLINGHOFF IK, CLOUGHESY TF, SAWYERS CL, MISCHEL PS. Mammalian target of rapamycin inhibition promotes response to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors in PTEN-deficient and PTEN-intact glioblastoma cells. *Cancer Res* 2006;66:7864-9.
83. DOHERTY L, GIGAS DC, KESARI S, DRAPPATZ J, KIM R, ZIMMERMAN J, OSTROWSKY L, WEN PY. Pilot study of the combination of EGFR and mTOR inhibitors in recurrent malignant gliomas. *Neurology* 2006;67:156-8.
84. LI J, YEN C, LIAW D, PODSYSPANINA K, BOSE S, WANG SI, PUC J, MILIARESIS C, RODGERS L, MCCOMBIE R, BIGNER SH, GIOVANELLA BC, ITTMANN M, TYCKO B, HIBSHOOSH H, WIGLER MH, PARSONS R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 1997;275:1943-7.
85. CHOE G, HORVATH S, CLOUGHESY TF, CROSBY K, SELIGSON D, PALOTIE A, INGE L, SMITH BL, SAWYERS CL, MISCHEL PS. Analysis of the phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathway in glioblastoma patients in vivo. *Cancer Res* 2003;63:2742-6.
86. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 2008;455:1061-8.
87. CHAKRAVARTI A, ZHAI G, SUZUKI Y, SARKESH S, BLACK PM, MUZIKANSKY A, LOEFFLER JS. The prognostic significance of phosphatidylinositol 3-kinase pathway activation in human gliomas. *J Clin Oncol* 2004;22:1926-33.
88. FRANZ DN, BELOUSOVA E, SPARAGANA S, BEBIN EM, FROST M, KUPERMAN R, WITT O, KOHRMAN MH, FLAMINI JR, WU JY, CURATOLO P, DE VRIES PJ, WHITTEMORE VH, THIELE EA, FORD JP, SHAH G, CAUWEL H, LEBWOHL D, SAHMOUD T, JOZWIAK S. Efficacy and safety of everolimus for subependymal giant cell astrocytomas associated with tuberous sclerosis complex (EXIST-1): a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* 2013;381:125-32.
89. KRUEGER DA, CARE MM, HOLLAND K, AGRICOLA K, TUDOR C, MANGESHKAR P, WILSON KA, BYARS A, SAHMOUD T, FRANZ DN. Everolimus for subependymal giant-cell astrocytomas in tuberous sclerosis. *N Engl J Med* 2010;363:1801-11.
90. CHANG SM, WEN P, CLOUGHESY T, GREENBERG H, SCHIFF D, CONRAD C, FINK K, ROBINS HI, DE ANGELIS L, RAIZER J, HESS K, ALDAPE K, LAMBORN KR, KUHN J, DANCEY J, PRADOS MD, CONSORTIUM NABT, INST NC. Phase II study of CCI-779 in patients with recurrent glioblastoma multiforme. *Investigational New Drugs* 2005;23:357-361.
91. OBERMEIER B, DANEMAN R, RANSOHOFF RM. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med* 2013;19:1584-96.
92. KLOOSTERHOF NK, BRALTEN LB, DUBBINK HJ, FRENCH PJ, VAN DEN BENT MJ. Isocitrate dehydrogenase-1 mutations: a fundamentally new understanding of diffuse glioma? *Lancet Oncol* 2011;12:83-91.
93. VERHAAK RG, HOADLEY KA, PURDOM E, WANG V, QI Y, WILKERSON MD, MILLER CR, DING L, GOLUB T, MESIROV JP, ALEXE G, LAWRENCE M, O'KELLY M, TAMAYO P, WEIR BA, GABRIEL S, WINCKLER W, GUPTA S, JAKKULA L, FEILER HS, HODGSON JG, JAMES CD, SARKARIA JN, BRENNAN C, KAHN A, SPELLMAN PT, WILSON RK, SPEED TP, GRAY JW, MEYERSON M, GETZ G, PEROU CM, HAYES DN. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 2010;17:98-110.

6 Eidesstattliche Versicherung

Ich, Tobias Kratzsch, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die zielgerichtete Therapie des Glioblastoma multiforme – Präklinische experimentelle Studien zur Wirksamkeit neuer Tyrosinkinase-Inhibitoren sowie epigenetisch wirksamer Substanzen anhand unterschiedlicher Glioblastom-Mausmodelle“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum:

Unterschrift:

Alle Tierversuche sowie sämtliche in vitro-Experimente wurden am Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin in Berlin-Buch in der Arbeitsgruppe Experimentelle Pharmakologie und Onkologie durchgeführt.

7 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

8 Danksagung

Ich bedanke mich bei Frau Dr. Iduna Fichtner und Herrn Dr. Jens Hoffmann aus dem MDC in Berlin für die Bereitstellung des Themas, für die stets große Unterstützung der Durchführung der experimentellen Arbeiten und für die Weitergabe der vielen wertvollen wissenschaftlichen Erfahrungen.

Ich bedanke mich bei Herrn Professor Dr. med. Peter Vajkoczy für seine Unterstützung als betreuender Hochschullehrer.

Ich danke allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Experimentelle Pharmakologie und Onkologie“ am MDC für die ständige Hilfsbereitschaft und die sehr nette Arbeitsatmosphäre. Insbesondere danke ich Frau Carsta Werner für ihre Hilfe und ich danke Frau Margit Lemm für ihre große Hilfsbereitschaft, für ihren großen Einsatz und für die vielen interessanten Gespräche.

Ich danke Susanne für ihre uneingeschränkte Unterstützung, für die vielen anregenden wissenschaftlichen Diskussionen, für motivierende sowie aufmunternde Worte und für ihre Freundschaft.

Ich danke meiner Familie, ohne deren Liebe und Rückhalt nicht nur diese Arbeit, sondern ebenso der Weg dahin sowie viele andere wichtige Dinge in meinem Leben nicht möglich gewesen wären.