

Aus dem Institut für experimentelle Neurochirurgie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Blockade des CXCR2/CXCL2 Signalweges als  
therapeutischer Ansatz im Glioblastoma multiforme

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Julia Zollfrank

aus Erding

Datum der Promotion: 25. November 2022

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden 2020 im European Journal of Cancer veröffentlicht:

Acker G, **Zollfrank J**, Jelgersma C, Nieminen-Kelha M, Kremenetskaia I, Mueller S, Ghori A, Vajkoczy P, Brandenburg S. The CXCR2/CXCL2 signalling pathway - An alternative therapeutic approach in high-grade glioma. Eur J Cancer. 2020;126:106-15.

Die Verwendung der publizierten Daten (einschließlich Graphen und Bilder) in einer Monographie wurde vom Verlag ausdrücklich genehmigt.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>5</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>6</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>6</b>
<b>1 Zusammenfassung / Abstract</b> .....	<b>8</b>
1.1 Zusammenfassung .....	8
1.2 Abstract .....	9
<b>2 Einleitung</b> .....	<b>11</b>
2.1 Das Glioblastoma multiforme .....	11
2.1.1 Epidemiologie .....	11
2.1.2 WHO-Klassifikation .....	12
2.2 Klinik, Diagnostik und Therapie des Glioblastoma multiforme .....	13
2.2.1 Klinik und Diagnostik.....	13
2.2.2 Etablierte Standardtherapie .....	14
2.2.3 Neue Therapieansätze in der Klinik .....	14
2.3 „Targeted therapy“ - Personalisierte Krebstherapie.....	16
2.3.1 Immunologische Therapien in Klinik und Forschung .....	16
2.3.2 Anti-angiogene Therapien in Klinik und Forschung .....	17
2.4 Chemokine regulieren Immunsystem und Angiogenese in Tumoren.....	19
2.4.1 Klassifikation und Funktion von Chemokinen .....	19
2.4.2 Der CXCR2/CXCL2 Signalweg.....	20
2.4.3 Chemokin-Signalwege als therapeutische Angriffspunkte.....	21
2.4.4 Die Rolle von CXCL2/8 und CXCR2 im ZNS und in Gliomen.....	21
2.5 Die Blockade des CXCR2-vermittelten Signalweges im Glioblastom .....	22
2.5.1 CXCR2-Blockade durch Antikörper .....	22
2.5.2 CXCR2-Blockade durch <i>small-molecule</i> Inhibitoren .....	23
2.6 Forschungsziel .....	24
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>25</b>
3.1 Tabellarische Auflistung von Materialien, Geräten und Software.....	25
3.1.1 Chemikalien, Lösungen, Materialien.....	25
3.1.2 Antikörper.....	27
3.1.3 Primer .....	28
3.1.4 Geräte und Software.....	29
3.2 Zellkultur .....	30

3.2.1 Kultivierung der Zellen .....	30
3.2.2 Vorbereitung der Tumorzellen zur intrakraniellen Implantation .....	30
3.3 Durchführung der Tierexperimente.....	31
3.3.1 Tierschutz und Tierversuchsantrag.....	31
3.3.2 Narkoseverfahren .....	31
3.3.3 Tumorzellimplantation .....	32
3.3.4 Pumpenimplantation .....	33
3.3.5 Magnetresonanztomographie .....	34
3.3.6 Kardiale Perfusion.....	35
3.4 Histologische Aufarbeitung der Gewebe .....	35
3.4.1 Immunhistochemische Fluoreszenzfärbungen .....	35
3.4.2 Fluoreszenzmikroskopie und Auswertung .....	37
3.4.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	37
3.5 Durchführung der <i>in vitro</i> Versuche.....	38
3.5.1 MTT Proliferation-Assays.....	38
3.5.2 Real Time Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	39
3.6 Statistische Auswertung .....	41
3.7 Anteilserklärung Methodenteil .....	42
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>43</b>
4.1 Reduktion des Tumorwachstums <i>in vivo</i> nach Antagonist-Therapie.....	43
4.1.1 Die Blockade des Rezeptors CXCR2 mit dem Antagonisten SB225002.....	43
4.1.2 Antagonist-Wirkung im Initialstadium des Tumorwachstums.....	43
4.1.3 Therapieansatz im Exponentialstadium des Tumorwachstums.....	45
4.1.4 Verträglichkeit und Nebenwirkungen der Antagonist-Therapie im Versuchsaufbau...	49
4.2 Immunhistochemische Untersuchungen auf Gewebsschnitten.....	51
4.2.1 CXCR2-Antagonisierung beeinflusst Glioblastomentstehung über angiogene Wege	51
4.2.2 Analyse von Gefäßen und Akteuren der Angiogenese.....	53
4.2.2.1 Mikroglia und Gefäße.....	53
4.2.2.2 Perizyten .....	56
4.2.3 Charakterisierung assoziierter Marker des CXCR2/CXCL2 Signalweges .....	57
4.2.3.1 Expressionsmuster von CXCL2 .....	57
4.2.3.2 Expressionsmuster von CXCR2 .....	61
4.2.4 Vergleich der proliferativen und apoptotischen Aktivität .....	62
4.2.4.1 Vermehrte Proliferation im Randbereich der Tumore .....	62
4.2.4.2 Unveränderte Apoptose trotz Wachstumsreduktion <i>in vivo</i> .....	63
4.3 Vergleichbares Wachstumsverhalten nach CXCR2-Blockade .....	64



4.4 Reduktion der Proliferation nach Antagonist-Therapie <i>in vitro</i> .....	65
4.4.1 Morphologische Zellveränderungen durch Antagonist-Stimulation.....	65
4.4.2 Verminderte Proliferation der Tumorzellen im Vergleich mit Endothelzellen nach Antagonist-Stimulation .....	66
4.5 Effekte des Antagonisten auf die Gene des CXCR2/CXCL2 Signalweges .....	68
4.5.1 Signifikante Hochregulation von Cxcl2, Cxcr1 und in Cxcr2 Tumorzellen .....	68
4.5.2 Signifikante Hochregulation von Cxcl2 in Endothelzellen .....	69
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>71</b>
5.1 Morphologische und molekulare Veränderungen durch die Antagonist-Therapie.....	71
5.1.1 Tumorwachstumsreduktion durch anti-angiogene Effekte der <i>in vivo</i> Therapie .....	71
5.1.2 Einfluss des Antagonisten auf Zellen der perivaskulären Nische .....	72
5.1.3 Expressionsmuster der Chemokine und Rezeptoren .....	74
5.1.4 Unveränderte Apoptose und Proliferation sprechen gegen anti-mitotischen Effekt....	76
5.1.5 <i>In vitro</i> Analysen der Signalwegveränderungen durch SB225002.....	77
5.2 Gestaltung des Versuchsaufbaus.....	78
5.2.1 Auswahl des Tumormodells.....	78
5.2.2 Umgehung der Bluthirnschranke durch lokale Therapie.....	79
5.2.3 Aktualität der Studienlage .....	79
5.3 Limitationen und Herausforderungen anti-angiogener Therapieansätze .....	81
5.3.1 Der Antagonist als Schnittpunkt immunologischer und anti-angiogener Therapien ...	81
5.3.2 Therapieresistenz durch Vaskuläre Mimikry .....	82
5.4 Kombinationsstrategien und klinische Übertragbarkeit von Antagonisten.....	84
5.4.1 Auswege aus der Resistenz durch Kombinationstherapien.....	84
5.4.2 <i>small-molecule</i> Inhibitoren der Chemokinsignalwege in der klinischen Forschung ....	85
5.5 Zusammenfassung und Ausblick.....	87
<b>6 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>88</b>
<b>7 Anhang .....</b>	<b>97</b>
7.1 Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung .....	97
7.2 Lebenslauf.....	99
7.3 Publikationsliste .....	100
7.4 Danksagung .....	101

## Abkürzungsverzeichnis

AG	Arbeitsgruppe
ANOVA	analysis of variance
ATRX	Adenosintriphosphat-abhängige Helikase
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
CAR-T	Chimären-Antigen-Rezeptor-T-Zellen Therapie
cDNA	complementary DNA
CeTeG	Isocitratdehydrogenase-1 oder -2
CSF1	Macrophage colony stimulating factor 1
CSFR1	O <sup>6</sup> -Methylguanine-DNA-Methyltransferase
CT	Computertomographie
CTLA4	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4
CXCL	C-X-C Motif Ligand
CXCR	C-X-C Motif Receptor
DC	Dendritische Zelle
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FCS	Fetal Calf Serum
FDA	U.S. Food and Drug Administration
g	Gramm
GBM	Glioblastoma multiforme
HE	Hämatoxylin-Eosin
Hif-1 $\alpha$	Hypoxie-induzierende Faktor 1 $\alpha$
i.p.	intraperitoneal
IDH1/2	Isocitratdehydrogenase-1/2
IL-8	Interleukin 8
kg	Kilogramm
LaGeSo	Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin
MAP	Mitogen Activated Protein
mg	Milligramm
MGMT	O <sup>6</sup> -Methylguanine-DNA-Methyltransferase
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MRI/MRT	Magnetresonanztomographie
N <sub>2</sub> O	Stickstoffdioxid
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PBS	Phosphate Buffered Saline

PD-L1	Programmed Death-Ligand 1
PFA	Paraformaldehyd
RNA	Ribonukleinsäure
rtPCR	real-time Polymerase Kettenreaktion
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TTF	Tumortheraiefeldern
TUNEL	terminal desoxyribonucleotidyl transferase (TdT) -mediated dUTP-biotin nick end labeling
VEGF	Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor
VEGFR	Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor Rezeptor
VM	Vaskuläre Mimikry
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZNS	Zentrales Nervensystem
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar

## Tabellenverzeichnis

- Tab. 3-1:    Verwendete Chemikalien und Lösungen
- Tab. 3-2:    Verwendete Zellkulturmedien und Zusätze
- Tab. 3-3:    Verwendete Materialien
- Tab. 3-4:    Verwendete Primärantikörper für immunhistochemische Fluoreszenzfärbungen
- Tab. 3-5:    Verwendete Sekundärantikörper für immunhistochemische Fluoreszenzfärbungen
- Tab. 3-6:    Verwendete Primer für real-time PCR
- Tab. 3-7:    Verwendete Geräte
- Tab. 3-8:    Verwendete Software
- Tab. 3-9:    Zusammensetzung der Narkose

## Abbildungsverzeichnis

- Abb. 4-1:    Schematische Darstellung des ersten Versuchsaufbaus
- Abb. 4-2:    Repräsentative MRT-Schnittbilder nach 14-tägigem Wachstum
- Abb. 4-3:    Absolute Tumolvolumina der MRT Messungen nach 14-tägiger Therapie
- Abb. 4-4:    Ergebnisse der Therapie etablierter Tumore mit dem CXCR2-Antagonisten SB225002 in einer Dosierung von 15µg pro Tag
- Abb. 4-5:    Schematische Darstellung des zweiten Versuchsaufbaus

- Abb. 4-6: Ergebnisse der Therapie etablierter Tumore in einer Dosierung von 30µg pro Tag
- Abb. 4-7: Absolute Volumenwerte und Wachstumsfaktoren der Glioblastome der einzelnen Versuchstiere Tag 14 und Tag 21
- Abb. 4-8: Tumorödem der Kontroll- und Therapiegruppe
- Abb. 4-9: CXCR2 Färbung nach 14-tägiger Antagonist-Therapie in der Entstehungsphase des Glioblastoms
- Abb. 4-10: Mikroglia und Gefäßfärbung nach 14-tägiger Therapie in der Entstehungsphase des Glioblastoms
- Abb. 4-11: Verringerte Anzahl an (A) Mikrogliazellen und (B) Gefäße nach CXCR2-Therapie etablierter Tumore
- Abb. 4-12: Gefäßanalyse der kontralateralen Hemisphären
- Abb. 4-13: Unveränderte Perizyten-Aktivität nach CXCR2-Blockade
- Abb. 4-14: CXCL2 Färbung nach CXCR2 Blockade etablierter Glioblastome
- Abb. 4-15: Übersichtsaufnahme des Übergangs von Tumor- zu Normalgewebe
- Abb. 4-16: Repräsentative CXCL2-Färbung des Tumorzentrums
- Abb. 4-17: Mikroglia exprimieren CXCL2
- Abb. 4-18: CXCR2 Färbung nach CXCR2 Blockade etablierter Glioblastome
- Abb. 4-19: Proliferation nach CXCR2 Blockade etablierter Glioblastome
- Abb. 4-20: Apoptose nach CXCR2 Blockade etablierter Glioblastome
- Abb. 4-21: Vergleichbar infiltratives Wachstumsverhalten der Glioblastome nach CXCR2-Blockade
- Abb. 4-22: Morphologische Zellveränderungen durch Antagonist-Stimulation
- Abb. 4-23: Verminderte Proliferation nach in vitro Stimulation mit SB225002
- Abb. 4-24: Expression CXCR2- und VEGF-Signalweg-assoziiierter Gene nach CXCR2 Blockade in Tumorzellen
- Abb. 4-25: Expression CXCR2- und VEGF-Signalweg-assoziiierter Gene nach CXCR2 Blockade in Endothelzellen

# 1 Zusammenfassung / Abstract

## 1.1 Zusammenfassung

**EINLEITUNG** Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist ein extrem wandlungsfähiger und aggressiver Tumor und stellt Forscher immer wieder vor Herausforderungen. Es existieren bereits zahlreiche Ansätze zur Therapie dieses Hirntumors. Die derzeit etablierte Standardtherapie verlängert das mittlere Überleben der PatientInnen bisher aber nur um wenige Monate. Neue experimentelle Ansätze rücken deshalb immunologische und anti-angiogene Therapien in den Vordergrund. Die über Chemokine vermittelte Chemotaxis ist unter anderem Teil des Immunsystems, Chemokine können aber auch angiogene Wirkung entfalten. Die Signalachse über CXCR2/CXCL2 stellt einen alternativen Angiogenesesignalweg im Glioblastom dar. Ziel dieser Arbeit ist die Erforschung eines neuen therapeutischen Ansatzes zur Verlangsamung des Tumorwachstums durch die Blockade des CXCR2-Signalwegs über den *small-molecule* Inhibitor SB225002.

**METHODEN** GL261 Glioblastomzellen wurden intrakraniell in ein syngenes Mausmodell implantiert. Der Antagonist wurde mittels osmotischer Minipumpen direkt in den Ventrikel appliziert. Der 14- bzw. 7-tägige Behandlungszeitraum wurde am Tag der Tumorzellimplantation bzw. nach 14-tägiger Tumorwachstumsphase begonnen. Die Tumorumfänge wurden mittels MRT vor Therapiestart und am Ende des Behandlungszeitraumes gemessen. Anschließend wurden die Gewebeproben immunhistochemisch gefärbt und Moleküle des Signalweges, Gefäße, Zellen der perivaskulären Nische und Proliferations- und Apoptosemarker ausgewertet und verglichen. GL261 wurden außerdem *in vitro* mit SB225002 inkubiert und anschließend in Proliferationsassays analysiert. Die Expression der Gene des Signalweges wurden nach Antagonisttherapie mittels real time-PCR ausgewertet.

**ERGEBNISSE** Die Therapie mit SB225002 führte zu signifikant reduzierten Tumorumfängen um 51% nach Tumorzellimplantation mit simultanem Therapiebeginn. Nach CXCR2-Blockade der etablierten Tumore im zweiten Versuchsaufbau waren die Tumorumfänge um 47% reduziert. Die Anzahl der Mikroglia und Gefäße war nach CXCR2-Blockade durch den Antagonisten signifikant reduziert wohingegen CXCR2, CXCL2, Proliferations- und Apoptose-Marker keine Veränderungen zeigten. Die Proliferation von Tumor- und Endothelzellen war *in vitro* nach Behandlung mit dem CXCR2-Antagonisten signifikant reduziert, bei den Glioblastomzellen war der beobachtete Effekt größer. Die Behandlung der Tumorzellen mit dem *small-molecule* Inhibitor veränderte außerdem die Expression der Gene des CXCR2-Signalweges in Tumor- und Endothelzellen.

**SCHLUSSFOLGERUNG** Die Blockade des CXCR2/CXCL2 Signalweges im GBM-Mausmodell resultiert in einer reduzierten Tumorgröße, sowohl im Anfangsstadium als auch in der exponentiellen Tumorwachstumsphase. Der *small-molecule* Antagonist SB225002 repräsentiert somit einen erfolgsversprechenden neuen Therapieansatz. Tiefere Untersuchungen des Signalweges und Studien zu Kombinationstherapien sind nötig, um die Etablierung einer lebenszeitverlängernden Therapie des Glioblastoma multiforme voranzutreiben.

## 1.2 Abstract

**INTRODUCTION** Glioblastoma multiforme (GBM) is one of the most aggressive and heterogeneous tumor entities and is still a challenge for clinicians and scientists in the development of new therapy strategies. Under current standard therapies, patients' overall survival improves only for a few months. New approaches in GBM therapy relate to immunological and anti-angiogenic strategies. The chemokine system and its receptors are part of the immune system but can also act as an alternative angiogenic mediator. Specifically, CXCL2 and its receptor CXCR2 could be identified as an alternative signaling pathway regulating angiogenesis in GBM. This study investigated the blockage of the CXCR2/CXCL2 signaling axis using the small-molecule inhibitor SB225002 as a new therapeutic approach in GBM.

**METHODS** GL261 glioma cells were implanted intracranially into a syngeneic mouse model. Small-molecule antagonist SB225002 was applied to the ventricle system via osmotic mini pumps. Treatment started either on the day of tumor cell implantation and was administered for 14 days or after two weeks of tumor growth with a shorter treatment period of 7 days. MRI measurements of the tumor volumes were carried out before and after treatment period. Immunofluorescence analysis were conducted focusing on therapy induced changes of the signaling pathway, the tumor vasculature and its perivascular niche with accumulation of tumor associated microglia and macrophages (TAMs) as well as the proliferation and apoptosis behavior. In vitro, MTT-proliferation assay as well as gene expression studies were carried out using GL261 glioma cells and endothelial cells.

**RESULTS** Tumor volumes were reduced by 51% when CXCR2 antagonist were administered in the initial growth phase and by 47% starting administration after two weeks of tumor growth. The tumor vasculature was impaired by significantly reduced vessel counts accompanied by reduced accumulation of TAMs, whereas CXCL2/CXCR2 as well as proliferation and apoptosis were unaffected in vivo. CXCR2 antagonization in vitro showed reduced proliferation in MTT-assay of GL261 tumor cells and endothelial cells. Altered gene expression of CXCR1, CXCR2 and CXCL2 could be detected as well.

**CONCLUSION** The blocking of chemokine receptor CXCR2 resulted in significantly reduced tumor volume *in vivo* along with diminished vasculature. SB225002, a small-molecule CXCR2 inhibitor, may represent a new and promising treatment strategy in fighting glioblastoma multiforme. Now, further studies and combination strategies are needed to establish effective and life prolonging therapy in GBM.

## **2 Einleitung**

### **2.1 Das Glioblastoma multiforme**

#### **2.1.1 Epidemiologie**

Das Glioblastoma multiforme (GBM) gehört zu den am schlechtesten differenzierten hirneigenen Tumoren. Rund 70% aller bösartigen Hirntumore werden in diese Gruppe der Gliome eingeteilt (1). Die maligne Neoplasie des Gehirns weist eine hohe Mitoserate und ein hohes Rezidivrisiko auf und geht mit einer deutlichen Verringerung der Lebenserwartung einher (2). Für bösartige Hirntumore im Allgemeinen liegt die relative 5-Jahres-Überlebensrate für Frauen bei 24%, für Männer bei 21% (1). Die relative 5-Jahres-Überlebensrate von Glioblastomkranken beträgt hingegen nur 9% bei Frauen und 6% bei Männern (1).

Bösartige Tumore des Zentralen Nervensystems (ZNS) treten in jedem Lebensalter auf. Für 2020 geht das Zentrum für Krebsregisterdaten von 3500 (Frauen) bzw. 4400 (Männer) Neuerkrankungen in Deutschland aus (1). Die höchste Erkrankungsrate liegt bei beiden Geschlechtern in der Altersgruppe von 75 – 79 Jahren (1). Das mediane Erkrankungsalter liegt bei 66 (Frauen) bzw. 62 (Männer) Jahren (3).

Obwohl Glioblastome meist spontan auftreten, gibt es eine Häufung von Fällen unter Kaukasiern und Menschen aus industriell geprägten Regionen. Familiär auftretende Formen betreffen mit 1% aller Fälle nur einen geringen Anteil der Erkrankten. Dazu zählen zum Beispiel das Li-Fraumeni- und das Lynchsyndrom (4). Außer einer starken Exposition durch ionisierende Strahlung, wie zum Beispiel bei einer Ganzkopfbestrahlung, gibt es keine eindeutigen Risikofaktoren, die die Wahrscheinlichkeit, an einem Glioblastom zu erkranken, deutlich erhöhen (2). Interessanterweise wird ein Zusammenhang zwischen Autoimmunerkrankungen wie Atopie, Allergien und einer erniedrigten Erkrankungswahrscheinlichkeit vermutet. Die Grundlagen dieser protektiven Mechanismen sind bisher nicht geklärt (5).

Rund 90% der Glioblastome entstehen als Primärtumor. Nur 10% der diagnostizierten Glioblastome sind Sekundärtumore, haben sich also aus einer weniger aggressiven Vorstufe entwickelt (6). Die primäre Form des GBM wächst schnell und aggressiv in nur circa drei Monaten zu einer Größe heran, die durch ihre raumfordernden Eigenschaften



Symptome verursacht. Nach aktueller Datenlage unterscheiden sich primäre und sekundäre Gliome morphologisch nicht voneinander (7).

### **2.1.2 WHO-Klassifikation**

Primäre ZNS-Tumore entstehen aus hirneigenen Zellen. Über die Pathogenese von Hirntumoren ist insgesamt wenig bekannt. Maligne ZNS-Tumoren werden nach der jeweiligen Ausgangszellpopulation eingeteilt (8). Bei Erwachsenen finden sich, wie oben beschrieben, überwiegend Gliome. Diese werden nach den entarteten Ursprungszellen, aus denen sie hervorgehen, benannt. Sie entstehen aus Gliazellen, benannt von Rudolf Virchow nach dem griechischen Wort für Leim, *Glia* (9). Gliazellen bilden das Stützgewebe des Nervensystems und sind im Zellverband des ZNS an vielfältigen Funktionen wie der Bildung von Myelinscheiden um Axone oder an Entzündungs- und Reparaturprozessen beteiligt (9). Aufgrund der Beteiligung an Proliferationsprozessen sind Gliazellen im Gegensatz zu Nervenzellen flexibel und besonders teilungsfähig. Diese Eigenschaft macht sie anfällig für eine maligne Entartung (9).

Die größte Gruppe innerhalb der durch die Weltgesundheitsorganisation (WHO) etablierten Klassifikation der Gliome bilden die Astrozytome (10). Es erfolgt eine weitere Einteilung in niedriggradige Astrozytomen in Grad I und II mit sehr guter bis guter Prognose, hin zu den höhergradigen Astrozytomen in Grad III und IV mit schlechter bis sehr schlechter Prognose (7). Das Glioblastom entspricht einem Astrozytom Grad IV und damit der bösartigsten Form der hirneigenen Gliome (11).

Im Jahr 2016 wurde die Klassifikation der Gliome durch die WHO aktualisiert und im Rahmen dessen eine neue Leitlinie zur Diagnostik und Therapie veröffentlicht (12). In der Klassifikation geht die WHO besonders auf molekulare Parameter ein, welche die neuropathologische Diagnostik verbessert und eine genauere Differenzierung bei der Einteilung der Gliome erlaubt (13). Die wichtigsten molekularen Marker, welche implementiert wurden, werden im Folgenden kurz aufgeführt und erläutert.

Die Isocitratdehydrogenase-1 oder -2 (IDH-1/-2) ist ein Enzym, das DNA-Methylierungen stimuliert (14). Eine Punktmutation in diesem Gen (IDH-mutiert) spricht für ein Astrozytom (15). Bei Glioblastomen deutet eine IDH-Mutation auf die Genese aus einem niedrig gradigeren Gliom hin, also auf ein sekundäres Glioblastom. Die meisten Glioblastome sind primäre Glioblastome und damit nicht IDH-mutiert, sogenannte IDH-Wildtypen (11). Die Identifizierung der IDH-Mutation ist in der neuen WHO-Klassifikation von

diagnostischer Relevanz. Für die Therapie spielt die Einteilung keine Rolle, die Prognose IDH-mutierter Glioblastomen ist aber besser als die der IDH-Wildtyp Tumoren (11).

Das Gen der O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) codiert für ein DNA-Reparaturenzym (14). Eine Methylierung des Promotors des MGMT-Gens senkt dessen Expression und erlaubt damit einen verbesserten Angriff DNA-schädigender Substanzen auf Tumorzellen, wie zum Beispiel durch Medikamente aus der Gruppe der Alkylantien (11). Die Einteilung in MGMT-methyliert und MGMT-nicht-methyliert hat somit klinische Relevanz. Eine Methylierung ist ein positiver Prädiktor für das Ansprechen auf eine Therapie mit Temozolomid, einem Alkylanz und Standardmedikament in der Therapie von Gliomen, und geht mit einer besseren Prognose einher (11).

Die 1p/19q Kodeletion ist eine unbalancierte Translokation zwischen Chromosom 1 und 19, welche charakteristisch für Oligodendrogliome ist. Ist keine Deletion vorhanden, weist dies auf eine astrozytäre Herkunft hin (14). Als weitere Kriterien der neuen WHO Klassifikation zu nennen sind die Histon 3 K27M Mutation und die Adenosintriphosphat-abhängige Helikase (ATRX) Mutation (14).

Die WHO Klassifikation setzt den Fokus auf aktuelle Forschungsergebnisse der molekularen Marker und rückt damit die pathologische Diagnostik bei Hirntumoren weiter in den Vordergrund. Trotz molekularer Charakterisierung und differenzierter Diagnostik gibt es bisher keine nachhaltige Therapie des GBM.

## **2.2 Klinik, Diagnostik und Therapie des Glioblastoma multiforme**

### **2.2.1 Klinik und Diagnostik**

Glioblastome werden aufgrund ihres schnellen Wachstums früh symptomatisch. Häufig treten fokale oder generalisierte Krampfanfälle sowie fokale neurologische Ausfälle auf (16). Frühsymptome können, bedingt durch den erhöhten Hirndruck, Kopfschmerzen sowie Übelkeit und Erbrechen sein (17).

Die Magnetresonanztomographie (MRT) ist in der Diagnostik die bildgebende Methode der Wahl. Eine Kontrastmittelaufnahme im Tumorareal weist auf das Vorhandensein einer Schrankenstörung hin und gilt als hinweisend auf ein Gliom Grad III oder IV (12).

Klassischerweise stellt sich das GBM mit girlandenförmiger Kontrastmittelaufnahme, Nekrosearealen im Zentrum und einer vaskularisierten Außenzone dar (18).

### **2.2.2 Etablierte Standardtherapie**

Der erste Schritt der Standardtherapie ist die chirurgische Resektion. Es sollte dabei eine Entfernung von über 98% des Tumorgewebes angestrebt werden (19). Eine vollständige Resektion ist durch das infiltrierende Wachstum nahezu unmöglich (20). Der Versuch einer kompletten Resektion ist trotzdem die primäre und sofortige Therapie der Wahl nach Diagnosestellung (12). Hilfsmittel zur möglichst genauen Tumorsektion ohne Verletzung intakter Gehirnanareale während der Operation sind Neuromonitoring, eine Darstellung der Tumorränder oder die Durchführung intraoperativer MRTs oder Computertomographien (CT) (12). Die Auswahl der perioperativen Hilfsmittel zur möglichst genauen Resektion ist immer abhängig vom Patienten und der Erfahrung der Klinik und des Teams. Die alleinige Resektion reicht allerdings als Therapie nicht aus. Erster großer Meilenstein in der Verbesserung der Therapie des GBM war die 2005 von Stupp et al. veröffentlichte Studie zur Modifizierung der bis dahin etablierten Standardtherapie (21). Das Goldstandard Therapieschema baut bis heute auf dieser Arbeit auf. Die weiter als Erstlinientherapie geltende chirurgische Resektion wurde durch eine Kombination aus adjuvanter Strahlentherapie mit systemischer Temozolomid-Gabe ergänzt (21). Dadurch konnte das mediane Überleben weiterhin nur von 12,1 auf 14,6 Monaten verlängert werden (21).

### **2.2.3 Neue Therapieansätze in der Klinik**

Das Glioblastom stellt durch seine speziellen biologischen Faktoren wie der veränderten Blut-Hirn-Schranke, dem einzigartigen Tumormikromilieu und den Besonderheiten des lokalen Immunsystems des ZNS eine besondere Herausforderung für die Entwicklung neuer Therapiekonzepte dar (2). Durch das bunte Bild molekularer Profile wie den IDH-1/2 Mutationen und dem MGMT-Methylierungsstatus gibt es neben der Goldstandard Therapie nach dem Stupp-Schema bereits Strategien, die je nach Alter, Gesundheitszustand und Genotyp als ergänzende Optionen zum Einsatz kommen. In der Therapie neu diagnostizierter Gliome kommen außerdem verschiedene experimentelle Ansätze zum Einsatz, die in Form von Studien getestet werden.

Beispiel eines vielversprechenden Ansatzes ist die CeTeG-Studie, welche die Kombination von Temozolomid mit Lomustine bei MGMT-methylierten Tumoren

untersucht. Die Ergebnisse der Studie zeigten ein verlängertes medianes Gesamtüberleben von 31,4 Monaten bei einfacher Temozolomid Therapie auf 48,1 Monaten bei Kombination mit Lomustine (22). Der Ansatz ergab aufgrund von Nebenwirkungen und der Kohortenauswahl keine klinisch ableitbare Relevanz, sodass Lomustine nicht in die routinemäßige Therapie des Glioblastoms übernommen wurde.

In einem kürzlich erschienenen Review präsentieren Marenco-Hillebrand et al. eine Zusammenfassung und Evaluation neuer Therapieansätze, welche in den letzten Jahren in klinischen Studien getestet wurden (23). Aufgrund der bisweilen unübersichtlichen Studienlage und der Vielzahl der experimentellen Therapieoptionen und -kombinationen verglichen sie das mediane Überleben der PatientInnen in den verschiedenen Therapieprotokollen. Die Therapie mit der höchsten Tendenz im medianen Überleben war eine adjuvante Behandlung mit Tumortheraiefeldern (TTF), zusätzlich zu den etablierten Standardtherapien (23). Bei der TTF-Therapie werden von extern Elektroden auf der Kopfhaut befestigt, über die elektromagnetische Wechselfelder aufgebaut werden. Die erzeugte Oszillation der Moleküle induziert eine Mitosehemmung im verbliebenen Resttumorgewebe und hemmt damit das Wachstum (24). Das Review verglich das deutlich erhöhte mediane Überleben unter TTF-Therapie von 20,7 Monaten mit dem durchschnittlichen medianen Überleben aller ausgewerteten Studien der verschiedenen Therapien von nur 13,5 Monaten (23). Die wichtigste Limitation der TTF Therapie ist die lange Tragedauer von 18 Stunden pro Tag, welche die Lebensqualität der PatientInnen teilweise stark beeinträchtigt und die Compliance reduzieren könnte. Auch wenn die TTF Daten nur auf einer einzigen großen randomisierten Phase III Interventionsstudie von Stupp et al. basieren, wurde die Therapie aufgrund des geringen Nebenwirkungsprofils sowie des vielversprechenden Effekts von der FDA (U.S. Food and Drug Administration) bereits vor einigen Jahren als zusätzliche Therapieoption bei neu diagnostizierten Glioblastomen in den USA genehmigt (25-27). Seit Anfang 2020 wird die Therapie auch in Deutschland von den gesetzlichen Krankenkassen übernommen (28).

Trotz großer Fortschritte in der Erforschung des Glioblastoms, einem enormen Wissenszugewinn und zahlreichen neuen Therapieansätze konnte das mittlere Gesamtüberleben in den letzten Jahrzehnten nur wenig gesteigert werden (29). Vor diesem Hintergrund werden weiterhin neue Therapieansätze benötigt. Strategien der personalisierten Medizin in Form von „targeted therapy“, Immuntherapien, anti-angiogenen Therapeutika und Kombinationstherapien erwiesen sich in anderen

aggressiven Tumorentitäten bereits als vielversprechend und sind aktuell in das Zentrum der Aufmerksamkeit gerückt.

## **2.3 „Targeted therapy“ - Personalisierte Krebstherapie in der Glioblastomforschung**

### **2.3.1 Immunologische Therapien in Klinik und Forschung**

Immunologische Therapien zielen auf eine Verstärkung der Immunantwort des Körpers gegen Tumorzellen ab (30). Die Immunevasion, also das Verstecken der Tumorzellen vor dem Immunsystem, stellt eine wichtige Strategie in der Tumorgenese dar (31). Durch die Heterogenität innerhalb des Tumors ist die Immunevasion im Glioblastom besonders ausgeprägt und damit ein möglicher Angriffspunkt in der Tumorbekämpfung (31). Aktuell gibt es in dem weiten Feld der Tumorforschung viele immuntherapeutische Ansätze, unter anderem kommen die im Folgenden vorgestellten Checkpoint-Inhibitoren und Tumorimpfstoffe bei anderen Krebsarten bereits klinisch zum Einsatz. In der Therapie des Glioblastoma multiforme gibt es bisher keine etablierte und zugelassene Immuntherapie, mehrere klinische Phase III Studien ergaben keine erfolgversprechenden Ergebnisse im Vergleich zu den Standardtherapien (30). Im Folgenden werden die wichtigsten Wirkprinzipien vorgestellt, um einen Einblick in das Prinzip immunmodulierender Therapien zu geben.

Checkpoint-Inhibitoren modulieren Strukturen auf Immunzellen, die zuvor im Rahmen der Tumorgenese von Tumorzellen außer Kraft gesetzt wurden (32). Durch Checkpoint Inhibitoren wird das Immunsystem wieder reaktiviert und greift Tumorzellen an. Angriffspunkte für Checkpoint-Inhibitoren, die auch schon in klinischen Tumorstudien zum Einsatz kamen, sind u.a. der Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) und das Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4 (CTLA4) (32). Cloughesy et al. zeigten 2019 in einer klinischen Studie mit 35 PatientInnen mit rezidiviertem Glioblastom, dass eine neoadjuvante Gabe von Pembrolizumab, einem Checkpoint Inhibitor, im Vergleich zu einer adjuvanten Gabe das Überleben der PatientInnen signifikant verlängerte (33).

Eine weitere immunologische Therapiestrategie ist die der Tumorimpfstoffe (30). Impfstoffe vermitteln über die Stimulation des körpereigenen Immunsystems eine spezifische Immunantwort gegen Antigene auf Tumorzellen (34). Die Idee der

Tumorimpfstoffen und erste experimentelle Versuche gehen bis in die 1970er Jahre zurück (35). Die bekannteste Impfstherapie bei Krebserkrankungen ist BCG (Bacillus Calmette-Guérin), ein Tuberkulose Impfstoff, der bei lokal begrenztem Urothelkarzinom in der Blase eingesetzt wird (36). Seit der Entdeckung von BCG ist ein weiterer Impfstoff gegen Prostatakrebs zugelassen worden (37). In der experimentellen Glioblastom-Forschung gibt es derzeit mehrere laufende Studien zu individualisierten Impfungen mit Antigen-bestückten dendritischen Zellen (DCs) (38). DCs sind die effektivsten Antigen-präsentierenden Zellen im menschlichen Immunsystem (39). Sie können dem Immunsystem Epitope aus Tumorlysat präsentieren und initiieren dadurch eine Immunreaktion gegen Tumorzellen (38). Vorexperimente zu einer großen noch laufenden klinischen Phase II/III Studie aus Oslo mit DC-Impfung zeigten ein 2,9-fach längeres Überleben der sieben geimpften GlioblastompatientInnen im Vergleich zu entsprechend zugeordneten KontrollpatientInnen sowie eine gute Verträglichkeit der Therapie (34). Eine weitere große Studie aus Kalifornien mit DC-Impfung bei Glioblastom startete bereits 2006 mit insgesamt 331 eingeschlossenen PatientInnen (40). Die Ergebnisse der Studie sind noch immer unter Verschluss. 2018 veröffentlichte Vorergebnisse weisen auf ein mögliches verlängertes Überleben der geimpften PatientInnen hin (40).

Eine weitere Immuntherapie ist die Chimären-Antigen-Rezeptor-T-Zellen Therapie (CAR-T), welche vor allem bei bestimmten B-Zell-Lymphomen und Leukämien erfolgreich eingesetzt wird (41). Außerdem gibt es Ansätze, Tumorzellen mit Viren zu infizieren, um eine Tumorlyse durch das von den Viren aktivierte Immunsystem auszulösen (42). Weder CAR-T- noch Impfstherapien brachten bisher nennenswerte klinische Erfolge beim Glioblastom. In der Therapie anderer Tumorerkrankungen nehmen sie allerdings bereits einen hohen Stellenwert ein (30). Vor allem bei Melanomen und nicht-kleinzelligen Lungentumoren haben Therapien mit Checkpoint Inhibitoren oder Chimären-Antigen-Rezeptor T-Zellen ihren Platz in der Therapie bestimmter Mutationsträger gefunden (43).

### **2.3.2 Anti-angiogene Therapien in Klinik und Forschung**

Bösartige Gliome wachsen schnell und unkontrolliert. Um eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff für das schnell wachsende Tumorgewebe zu gewährleisten, müssen die Tumorzellen ein neues Netzwerk aus Blutgefäßen aufbauen. Die Aussprossung neuer Blutgefäße aus bereits vorhandenen Gefäßen nennt man Angiogenese (44). Die Angiogenese ist im Körper ein streng regulierter Vorgang, der nur durch pathologische Veränderungen wie Neoplasien oder in der Wundheilung ausgelöst

wird und, zum Beispiel im Menstruationszyklus, in sehr begrenztem Umfang auch als physiologischer Prozess abläuft (44). Charakteristischerweise verläuft die Tumorangiogenese unkontrolliert und chaotisch. Neu entstandene Gefäße haben oft große Kaliberschwankungen und eine erhöhte Permeabilität, sodass sie den Tumor stellenweise nur unzureichend versorgen können und es in hypoxischen Arealen zu Nekrosen kommt (45).

Durch die dynamische und schnelle Proliferation des Glioblastoms kann die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff über die Blutbahn nicht mehr mithalten. Dadurch entstehen innerhalb des Tumorareals hypoxische Bereiche und nekrotische Zonen (46). Die Hypoxie induziert unter anderem die Ausschüttung des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) (47). Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor und der zugehörige Rezeptor VEGFR bilden die zentrale und bisher am besten erforschte Signalachse der Gefäßneubildung, -proliferation und -modulation. Anti-angiogene Therapieansätze setzen an der veränderten Gefäßarchitektur des Tumors als Angriffspunkt zur Reduktion des Tumorwachstums an (48). Es werden verschiedene Strategien genutzt, um in die Signalwege der Angiogenese einzugreifen und diese zu verändern oder zu unterbinden.

Der Antikörper Bevacizumab inhibiert die Gefäßneubildung im Tumor, indem er an VEGF bindet und die Aktivierung der Zelle durch den Liganden verhindert (49). Der Antikörper hat aktuell eine Zulassung in der Schweiz für die Monotherapie von Glioblastom-Rezidiven (50). Ein systematisches Review der Cochrane Datenbank aus 2018 zeigte, dass Bevacizumab zwar das rezidivfreie Intervall bei neu diagnostizierten Glioblastomen verlängert, die Therapie aber zu keinem verlängerten allgemeinen Überleben führt (51). Ameratunga et al. stützten sich dabei vor allem auf die Ergebnisse von zwei Studien, die beide 2014 im New England Journal of Medicine veröffentlicht wurden. Sowohl Chinot et al. mit der AVAglio-Studie als auch Gilbert et al. untersuchten in großen randomisierten klinischen Phase III Studien den Nutzen einer Bevacizumab Gabe zusätzlich zur bis dahin etablierten Standardtherapie (52, 53). In einer klinischen Phase III Studie zur Rezidivtherapie des Glioblastoms wurde durch Bevacizumab ebenfalls das rezidivfreie Intervall postoperativ verlängert, aber nicht die mittlere Überlebenszeit (54). Neben einem fehlenden positiven Therapieoutcome in der Bevacizumab-Gruppe wiesen die therapierten PatientInnen zusätzlich eine deutlich erhöhte Rate an Nebenwirkungen wie Thrombosen, Blutungen und arterieller Hypertonie auf (54).

Dieser und weitere Ansätze sind Fragestellung der gegenwärtigen Forschung. Aufgrund langjähriger Erfahrung mit Bevacizumab und dem dafür geringen Fortschritt in der Glioblastomtherapie mit dem Antikörper wurde in den letzten Jahrzehnten nach alternativen Signalwegen gesucht. Chemotaktische Enzyme und Rezeptoren bilden ein wichtiges zelluläres Kommunikationssystem. Indem sie sowohl in das lokale Immunsystem des Tumors als auch in die Gefäßentwicklung eingreifen, stellen sie einen attraktiven Angriffspunkt für die Tumorthherapie dar.

## **2.4 Chemokine regulieren Immunsystem und Angiogenese in Tumoren**

### **2.4.1 Klassifikation und Funktion von Chemokinen**

Chemotaktische Enzyme (Chemokine) sind Proteine, die von Zellen zur Kommunikation untereinander ausgeschüttet werden (55). Aktuell sind mehr als 50 Chemokine und 19 Chemokin-Rezeptoren im menschlichen Organismus beschrieben (56-58). Bei der zielgerichteten Wanderung von Zellen, der Chemotaxis, bewegen sich die Zellen entlang eines Konzentrationsgradienten von Chemokinen innerhalb des Gewebes oder migrieren aus der Blutbahn zu ihrem Zielort (55). Chemokine können sowohl homöostatisch als auch inflammatorisch agieren und regulieren die Migration, Adhäsion, Phagozytose, Zytokinsekretion, Proliferation und Apoptose von Zellen (59). Je nach Anordnung der Cystein-Motive im molekularen Aufbau der Chemokine werden diese in XC-, CC-, CXC- und CX3C-Chemokine eingeteilt (60). Die Untergruppe der CXC-Chemokine greift neben allgemeinen chemotaktischen Effekten auch in die Regulation der Angiogenese ein (61).

Chemokine der CXC-Familie werden in ELR-positiv (ELR+) und ELR-negativ (ELR-) eingeteilt, je nachdem, ob eine Abfolge der Aminosäuren Glutamat-Leucin-Arginin als Motiv zu finden ist (61). CXCL1, 2, 3, 5, 6, 7 und 8 gehören zu den ELR-positiven CXC-Chemokinen (62). Im Gegensatz zu den ELR-negativen Chemokinen CXCL4 und 14 sind ELR-positive Liganden pro-angiogen (63).

Chemokine binden an Chemokin-Rezeptoren auf Zelloberflächen und aktivieren Signalkaskaden in den Zellen. Ligand und Rezeptor sind in der Regel nicht spezifisch, sondern können jeweils an unterschiedliche Partner binden. Der Chemokinrezeptor CXCR2 wird von allen ELR-positiven CXC-Chemokinen aktiviert und nimmt damit eine besondere Rolle in den durch Chemokinen induzierten Angiogenese-Signalwegen ein



(61). CXCR2 wurde erstmals 1991 von Murphy et al. beschrieben und zeigt eine 77%ige Übereinstimmung der Aminosäuren mit CXCR1 (64-66). An CXCR1 binden aber ausschließlich CXCL6 und 8 (67, 68). Bezogen auf die Aktivierungsachsen der Chemokine für Chemotaxis, Angiogenese und die Transdifferenzierung von Zellen zu stammzellähnlichen Zuständen ist maßgeblich CXCR2 und nicht CXCR1 beteiligt (45, 61, 69). Im zentralen Nervensystem wird CXCR2 vor allem von Granulozyten, Oligodendrozyten, T-Lymphozyten und Endothelzellen exprimiert (66).

#### **2.4.2 Der CXCR2/CXCL2 Signalweg**

CXCL8 ist im humanen Glioblastom einer der prominentesten pro-angiogenen CXC-Liganden und bildet gemeinsam mit CXCR2 die wichtigste Chemokin-Signalachse der Angiogenese (70). Synonym wird CXCL8 als Interleukin-8 (IL-8) bezeichnet, da es durch seine pro-inflammatorischen Eigenschaften auch zur Familie der Interleukine zählt (56).

Die vorliegende Arbeit basiert auf tierexperimentellen Arbeiten an Mäusen. Da Mäuse kein CXCL8 exprimieren, liegt der experimentelle Schwerpunkt auf CXCL2, einem bisher weniger gut erforschten CXCR2-Liganden. CXCL2 ist von allen CXC-Liganden in seiner Expression und Signaltransduktion am Rezeptor CXCR2 dem Liganden CXCL8 am nächsten (71-74). Aufgrund der Ähnlichkeit von CXCL2 und CXCL8 in Bezug auf die Interaktion mit CXCR2 und der lückenhaften Forschungslage zu CXCL2 wird der Signalweg hier anhand von CXCL8 besprochen. Dies kann nach bisherigem Forschungsstand analog auf CXCL2 übertragen werden (71).

Der Schlüsselrezeptor CXCR2 ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor, dessen biologische Funktionen die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, die Akkumulation von Makrophagen und die Angiogenese einschließen (44). Als Folge der Aktivierung des heterotrimeren kleinen G-Proteins durch Phosphorylierung starten zwei wichtige Signalkaskaden (61).

Zum einen wird über die Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinasen, der Phospholipase C und weiterer Kinasen und Phosphorylasen Calcium mobilisiert und/oder der Mitogen Activated Protein (MAP)-Kinase-Weg initiiert (61). Am Ende der jeweiligen Signalwege folgt die Aktivierung von Promotoren und Transkriptionsfaktoren, welche wiederum die Proteintranslation regulieren. Die aktivierten Transkriptionsfaktoren des CXCR2/CXCL8 Signalweges regulieren ausschließlich proliferativ wirkende Gene. Diese fördern unter

anderem das Zellwachstum und die Angiogenese, sichern das Überleben der Zelle und aktivieren die Invasion der Zelle in den Blutkreislauf (75).

Die zweite wichtige Signalkaskade, die durch die Aktivierung von CXCR2 startet, resultiert in einer Aktin-Polymerisation. Aktin ist Bestandteil des Zytoskeletts der Zelle. Durch den Umbau des Zytoskeletts wird die Zelle motil und kann sich zielgerichtet bewegen. Dies fördert die Migration, Invasion und die Metastasierung der Tumorzelle (75).

### **2.4.3 Chemokin-Signalwege als therapeutische Angriffspunkte**

Chemokine und ihre Rezeptoren bilden aufgrund der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten potentielle therapeutische Ansatzpunkte für eine Vielzahl von entzündlichen Erkrankungen wie der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung, Asthma, akutem Lungenversagen und Autoimmunerkrankungen (76). Tumorgenese, Tumorangiogenese und Metastasierung in verschiedenen Tumorentitäten wie Melanom, Lungen-, Prostata-, Leber- und Pankreaskarzinom zeigten ebenfalls eine Korrelation mit der Hochregulation von CXCR2 in den Tumorzellen (77). Aufgrund der hohen Relevanz von CXCR2 in der Vermittlung der pro-angiogenen Effekte von ELR+ Chemokinen nimmt der Rezeptor eine tragende Rolle in der Tumor- und Krebsforschung ein (61). CXCR2-defiziente Mäuse im Lungenkarzinom-Modell zeigten in Studien beispielsweise ein verlangsamtes Tumorwachstum durch reduzierte Angiogenese (78). Diese Erkenntnisse fordern eine weitere Exploration der Chemokin-Signalwege und eine Übertragung auf andere Tumorentitäten, um neue therapeutische Ansätze zu etablieren.

### **2.4.4 Die Rolle von CXCL2/8 und CXCR2 im ZNS und in Gliomen**

In der Entwicklung von Gliomen spielen Chemokine eine wichtige Rolle in der Tumor-assoziierten Entzündungsreaktion, der Angiogenese, dem Tumorwachstum und der Metastasierung (63). Die perivaskuläre Nische, bestehend aus Gefäßen, Gliom-Stammzellen, Mikrogliazellen bzw. Tumor-assoziierten Makrophagen (TAMs), Perizyten und weiteren gewebsspezifischen Komponenten ist Dreh- und Angelpunkt der Tumorangiogenese (79). ELR-positive Chemokine induzieren die Angiogenese, indem sie pro-angiogene hämatopoetische Zellen und Immunzellen sowie endotheliale Vorläuferzellen in neu entstandene perivaskuläre Nischen rekrutieren (45). Im zentralen Nervensystem werden CXCL2 und CXCL8 von aktivierten Mikroglia und Astrozyten sowie Endothelzellen und infiltrierenden neutrophilen Granulozyten exprimiert (74).

CXCL2 und CXCL8 mit den Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 gehören zu den für die Angiogenese im GBM relevantesten und am besten erforschten Signalwegen. In humanen Gliomen konnte eine Hochregulation von CXCL8 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden (44, 80). Studien ergaben eine vermehrte Tumorprogression bei erhöhten CXCL8 Levels in humanem GBM Gewebe und zeigten somit die Relevanz hochregulierter CXCL8 Expression auf (44, 81, 82). Des Weiteren nehmen sowohl die CXCL8 als auch CXCR2 Expression mit höheren Tumorgraden in Gliomen zu, sodass in Stadium IV (GBM) und in Rezidiv-Tumoren die höchste Expression zu sehen war (83).

Durch ihre Schlüsselposition in der Tumorangiogenese stellt die CXCR2 Signalachse mit den Liganden CXCL2 und CXCL8 einen attraktiven Angriffspunkt für Therapiekonzepte dar. Ein Eingriff in den Signalweg könnte Einfluss auf sowohl immunologische als auch angiogene Effekte im Tumormilieu haben und die Wachstumsdynamik verändern.

## **2.5 Die Blockade des CXCR2-vermittelten Signalweges im Glioblastom**

### **2.5.1 CXCR2-Blockade durch Antikörper**

Die Inhibierung des CXCR2/CXCL8 bzw. CXCL2 Signalwegs wird als Ansatzpunkt in der Therapie von Glioblastomen diskutiert. Versuche, CXCR2 mit spezifischen monoklonalen Antikörpern zu blockieren und somit die Angiogenese zu inhibieren, wurden bereits erfolgreich in einigen Modellen anderer Tumorentitäten *in vivo* durchgeführt, unter anderem in Weichteilsarkom- und Pankreaskarzinom-Modellen (84, 85). Die CXCR2-Blockade mittels Antikörper wurde bisher *in vitro* an Glioblastom- sowie Astrozytomzellen mit vielversprechenden Ergebnissen getestet (86, 87). Überdies konnte in vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die lokale Antikörper-vermittelte Blockade von CXCR2 zu verminderter Tumorgröße im Glioblastom-Modell führt (88). Antikörper sind allerdings relativ große Moleküle. Sie können in aller Regel auf Grund ihrer Größe die Blut-Hirn-Schranke nicht von alleine überwinden und nur begrenzt in solides Tumorgewebe eindringen. Des Weiteren haben sie ein hohes Nebenwirkungspotential, unter anderem durch Kreuzreaktionen mit unbeteiligten Zellen und Akteuren des Immunsystems (89). Die Übertragung der Medikamente aus dem experimentellen Rahmen in die Klinik ist somit häufig limitiert. Hinzu kommen hohe Produktions- und damit auch Therapiekosten durch aufwendige Herstellungsprozesse (89).

### 2.5.2 CXCR2-Blockade durch *small-molecule* Inhibitoren

Eine Alternative zu Antikörpern stellen die *small-molecule* Antagonisten dar. Bekannte, in der Klinik bereits regulär eingesetzte Beispiele sind Tyrosinkinaseinhibitoren wie Imatinib bei chronisch myeloischer Leukämie oder Sorafenib beim hepatozellulären Karzinom (90). *Small-molecule* Antagonisten sind niedermolekulare organische Verbindungen, die an Oberflächenproteine wie Chemokin-Rezeptoren binden und deren Konfiguration verändern (91). Schon 2003 konnten Rubin et al. zeigen, dass ein Antagonist des Chemokinrezeptors CXCR4 *in vivo* im Mausmodell das Wachstum von primären Hirntumoren hemmt (92). Yang et al. präsentierten 2015 eine Studie, in der sie sowohl einen Zusammenhang zwischen vermehrter CXCR2 Expression und hohem Gliom-Grad aufzeigten als auch eine reduzierte Gliomzellmigration nach Applikation des CXCR2 *small-molecule* Antagonisten SB225002 *in vitro* beobachteten (83).

SB225002 wurde Mitte der 1990er entwickelt und gilt als der erste *non-peptide small-molecule* CXCR2 Inhibitor (93). Der Antagonist verändert die Aminosäuren der Bindungsstellen für Chemokine an CXCR2, sodass Liganden nicht mehr an den Rezeptor binden können (91). Dies führt zu einer Unterbrechung der Signaltransduktion, zu verminderter Angiogeneseaktivierung und Leukozytenrekrutierung (94). SB225002 inhibiert die Bindung von CXCL8 an CXCR2 mit sehr hoher Affinität ( $IC_{50} = 22\text{nM}$ ) und weist eine 150fach höhere Selektivität zu CXCR2 gegenüber CXCR1 auf (95). Der Antagonist wurde bereits in zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Experimenten eingesetzt und zeigte neben einer hohen anti-inflammatorischen Potenz auch Effekte in der experimentellen Tumorthherapie (96-100). Auch eine Kombinationstherapie mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Sorafenib und dem Antagonisten SB225002 im experimentellen Ovarialkrebsmodell ergab eine verbesserte anti-angiogene Antwort (96). Im Gehirn reduzierte der Antagonist die endotheliale Aktivierung und die Leukozytenrekrutierung in zerebralen Gefäßen *in vitro* und verringerte die Infiltration neutrophiler Granulozyten in ischämischem Hirngewebe *in vivo* (94, 101).

Derzeit gibt es fünf CXCR2 *small-molecule* Antagonisten (Danirixin, AZD5069, Reparixin, Ladarixin und SX-682), welche bereits in klinischen Studien getestet werden (102). SB225002 wurde bisher noch nicht klinisch eingesetzt. Durch seine Stellung als ältester bekannter CXCR2 Antagonist ist er in vielen Tiermodellen, vor allem auch in verschiedenen Mausmodellen, etabliert und getestet. Der Antagonist wurde bereits in experimentellen neurologischen Modellen wie der Schlaganfallforschung und zerebralen

Ischämien in Mäusen eingesetzt und in einer Publikation zu *in vitro* Versuchen an zerebralen Gehirnzellen verwendet (94, 101, 103). Die langjährige experimentelle Erfahrung mit SB225002 qualifiziert den CXCR2 Inhibitor als erfolgsversprechenden Kandidaten in der Gliom-Forschung.

## 2.6 Forschungsziel

In der Glioblastomtherapie mangelt es an vielversprechenden therapeutischen Ansätzen. Die Strategie der Blockade des Chemokinsignalweges über CXCR2 zielt unter anderem auf verminderte Nähr- und Sauerstoffversorgung durch eine Inhibierung der Tumorangiogenese und dadurch auf ein reduziertes Tumorstadium ab. Ziel dieser Arbeit war es, durch die Nutzung eines GBM-Mausmodells den Einfluss eines *small-molecule* CXCR2-Inhibitors auf das Wachstum der Tumore, die Tumorstadium und die Zellen der perivaskulären Nische zu untersuchen. Hierfür wurde ein neuer therapeutischer Ansatz mit dem CXCR2 Antagonisten SB225002 während verschiedener Tumorstadiumsphasen etabliert. Außerdem wurde der Einfluss des Antagonisten auf die Proliferation und Genexpression in Tumor- und Endothelzellen untersucht. Zusammenfassend soll ein besseres Verständnis für die Rolle des Chemokinrezeptors CXCR2 in der Gliom-Biologie und das therapeutische Potential der spezifischen Inhibition des Rezeptors durch einen *small-molecule* Antagonisten in der Primärtherapie des Glioblastoms hergestellt werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Tabellarische Auflistung von Materialien, Geräten und Software

##### 3.1.1 Chemikalien, Lösungen, Materialien

Tab. 3-1: Verwendete Chemikalien und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung	Firma
Antagonist SB225002	N-(2-Hydroxy-4-nitrophenyl)- N'-(2-bromophenyl)urea	Tocris
ApopTag® Red In Situ Apoptosis Detection Kit		Merck Millipore
β-Mercapto-ethanol		Sigma Aldrich
Casein 0,5/1 %	5g/10g Casein aus Kuhmilch in 1 Liter PBS	Sigma Life Science
DAPI	IS Mounting Medium DAPI	Dianova
Eindeckelmedium	Shandon Immu-Mount	Thermo Scientific
Eosin	0,5% in H <sub>2</sub> O	Carl Roth
Ethanol	70/80/96/100% in H <sub>2</sub> O	Merck Millipore
Saccharose Lösungen	10g/20g/30g D(+)-Saccharose in H <sub>2</sub> O	Carl Roth
Gelatine	Gelatine from cold water fish skin	Sigma Life Science
Haemalaun		Carl Roth
Magnevist Kontrastmittel	0,05 mmol/ml (1:4 verdünnt in NaCl)	Bayer
Methanol		Carl Roth
MTT Cell Proliferation Assay Kit		Cayman
NaCl	Natriumchlorid 0,9%	Braun
PBS, unsteril	Phosphate Buffered Saline, eine Tablette / 500ml H <sub>2</sub> O	Gibco by life technologies
PFA 4%	Paraformaldehyd	Sigma Aldrich
PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser		TaKaRa

PureLink RNA Mini Kit		Ambion
SYBR Premix Ex Taq		TaKaRa
Triton	Triton 100nM	Sigma Aldrich
Xylol		Carl Roth

**Tab. 3-2: Verwendete Zellkulturmedien und Zusätze**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Firma</b>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium + D-Glucose + L-Glutamine + Pyruvate + Phenolrot	Gibco by life technologies
DMEM ohne Phenolrot	Dulbecco's Modified Eagle Medium + D-Glucose	Gibco by life technologies
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	Sigma Aldrich
FCS	Fetal Calf Serum	PAA Laboratories
GlutaMax	Glutamat (100nM)	Gibco by life technologies
PBS, steril	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Gibco by life technologies
Pen/Strep	Penicillin Streptomycin Lösung	PAA Laboratories
Pyruvat	Natriumpyruvat (100nM)	Gibco by life technologies
Trypsin	Trypsin in EDTA (1:10)	Thermo Scientific
Trypanblau	Trypan Blue Stain 0,4%	Gibco by life technologies

**Tab. 3-3: Verwendete Materialien**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma</b>
ben-u-ron Paracetamolsaft	Bene Arzneimittel
Bepanthen Augensalbe	Bayer
Brain Infusion Kit 3, Schlauchmaterial	Alzet
Cryotube	Thermo Scientific
Cyanacrylatklebstoff Contact Pen-System	WEICON
DAKO Fettstift	DAKO Agilent

Deckgläser	Carl Roth
Hamilton 1µl Spritze	Carl Roth
Kanülen (Sterican)	Braun
Konische Röhrchen	Falcon
MicroAmp Fast 96-Well Reaction Plate for real-time PCR	Applied biosystems by life technologies
Mini-osmotische Pumpen Model 2001/2002	Alzet
Nahtmaterial	Johnson & Johnson (Ethicon, Prolene)
Neubauer Improved Zählkammer	Carl Roth
Pipetten	Eppendorf
Stereotaksie Rahmen	Stoelting
SuperFrost Plus Objektträger	R. Langenbrinck
Xylocain Gel 2%	AstraZeneca
Zellkulturflaschen	Falcon
Zellkulturplatte 96-Well	Sarstedt

### 3.1.2 Antikörper

**Tab. 3-4: Verwendete Primärantikörper für immunhistochemische Fluoreszenzfärbungen**

<b>Antikörper</b>	<b>Wirt</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Firma/Kat.-Nr.</b>
Anti-CD3	rat	1:50	BD Pharmingen (550274)
Anti-CXCL2	goat	1:100	R&D Systems (AF-452-NA)
Anti-CXCR2	rabbit	1:200	Abcam (ab14935)
Anti-Desmin	rabbit	1:100	Abcam (ab15200)
Anti-Iba1	rabbit	1:250	Wako (019-19741)
Anti-Ki67	rabbit	1:100	Thermo Scientific (RM-9106)



**Tab. 3-5: Verwendete Sekundärantikörper für immunhistochemische Fluoreszenzfärbungen**

Fluoreszenzmarker	Antigen	Verdünnung	Firma
Cy3	anti-goat	1:200	Dianova
Cy3	anti-rabbit	1:200	Dianova
Cy3	anti-rat	1:200	Dianova
Cy5	anti-rabbit	1:200	Dianova
FITC	anti-rabbit	1:200	Dianova

### 3.1.3 Primer

**Tab. 3-6: Verwendete Primer für real-time PCR**

Gen		Primersequenz 5'-3'	Firma	Quelle
18S	forward	AACCCGTTGAACCCATT	TibMolBiol Berlin	(88)
	reverse	CCATCCAATCGGTAGTAGCG		
CXCL2	forward	CGCTGTCAATGCCTGAAG		(88)
	reverse	GGCGTCACACTCAAGCTCT		
CXCR1	forward	AATCTGTTGTGGCTTCACCCA		(104)
	reverse	GCTATCTTCCGCCAGGCATAT		
CXCR2	forward	AGCAAACACCTCTACTACCCTCTA		(105)
	reverse	GGGCTGCATCAATTCAAATACCA		
Hif-1 $\alpha$	forward	GCTTACACACAGAAATGGC		(88)
	reverse	ATCGTCCTCCCCGGCTTGT		
mTor	forward	CCATCCAATCTGATGCTGGA		(106)
	reverse	GGTGTGGCATGTGGTTCTGT		
Stat3	forward	GAAGGGAGGCAAAGGGGAACA		(107)

	reverse	ACTTGTCTAACAACCAACCCCC		
VEGF	forward	GAAGAAGAGGCCTGGTAATGG		(88)
	reverse	AAGCCACTCACACACACAGC		
VEGFR 1	forward	CTAATGACGATGGCAACAGG		(88)
	reverse	GCTAGCATGCTCTGCTCTCC		
VEGFR 2	forward	TGGAGGAAGAGGAAGTGTGC		(88)
	reverse	TCAGCTCTTCTGATGCAAGG		

### 3.1.4 Geräte und Software

**Tab. 3-7: Verwendete Geräte**

Gerät	Firma
Fluoreszenzmikroskop Axio Observer Z1	Carl Zeiss
Inkubator Heraeus BBD 6220	Thermo Scientific
Kryostat MICROM HM 650	MICROM
Lichtmikroskop	Nikon
Magnetrührer Yellowline	MSH
PharmaScan 7.0 Tesla MRT	Bruker Biospin MRI
Plate Reader inifite M200	Tecan
StepOne™ Real-Time PCR System	Thermo Scientific
Sterilwerkbank Hera Safe	Thermo Scientific
Thermocycler	VWR
Thermomixer Comfort	Eppendorf
VortexGenie II	Scientific Industries
Wippe Shaker DRS-12	NeoLab
Zentrifuge Heraeus Fresco	Thermo Scientific
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0 R	Thermo Scientific

**Tab. 3-8: Verwendete Software**

<b>Programm</b>	<b>Firma</b>
Analyze 10.0	AnalyzeDirect
Axio Vision 4	Carl Zeiss
Excel 20X	Microsoft
Graphpad Prism 6	Statcon
i-Control	Tecan
ImageJ	ImageJ
Magellan	Tecan
Para Vision 4.0	Bruker
Primer3web v4.1.0	© by A. Untergasser
StepOne™ Software v2.3	Thermo Scientific

## **3.2 Zellkultur**

### **3.2.1 Kultivierung der Zellen**

Die GL261 Tumorzellen wurden in DMEM (4,5g/L Glucose + 10% FCS + 5% Penicillin/Streptomycin + L-Glutamin + Pyruvat) in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert.

Die bEnd.4 Endothelzellen wurden in DMEM (4,5g/L Glucose + 10% FCS + 5% Penicillin/Streptomycin + L-Glutamin, ohne Pyruvat) in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert.

Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen zu je 1 Millionen pro ml in einer Gefrierlösung bestehend aus 10% DMSO in FCS in einem Stickstofftank gelagert. Das Wiederauftauen der Zellen erfolgte dann zügig im Wasserbad bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen aus der DMSO-haltigen Gefrierlösung in DMEM überführt.

Die Zellen wurden 7min mit 1300 U/min bei RT zentrifugiert, das Medium bis auf das Zellpellet abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml DMEM resuspendiert, in eine Zellkulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) mit 15ml DMEM überführt und im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Splitten der Zellen erfolgte immer bei circa 80% Konfluenz.

### **3.2.2 Vorbereitung der Tumorzellen zur intrakraniellen Implantation**

Bei 80%iger Konfluenz der GL261 Zellen wurde das Medium in der Zellkulturflasche abgesaugt. Die Zellen wurden mit 10ml PBS gewaschen, dieses wurde abgesaugt. Zur

Lösung der am Flaschenboden adhärenen Zellen wurden 3ml einer 1%ige Trypsin in PBS Lösung auf die Zellen gegeben. Nach fünf Minuten im Inkubator bei 37°C wurde mikroskopisch die Lösung der Zellen kontrolliert. Sollten noch einzelne Zellen am Flaschenboden sitzen wurden diese durch leichtes Klopfen gelöst. Die Trypsinierung wurde anschließend mit 8ml Medium gestoppt, die Zellen in ein Falcontube überführt und 7min mit 1300 U/min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Absaugen des Mediums wurde das Zellpellet mit 1ml PBS resuspendiert. Anschließend erfolgte das Zählen der Zellen, um eine Zellzahl von 20.000 Zellen/ $\mu$ l bei der Implantation zu erreichen.

Zum Zählen der Zellen wurde ein Ansatz von 10 $\mu$ l Zellen in PBS mit 90 $\mu$ l Trypanblau hergestellt. Tote Zellen werden aufgrund der Zerstörung ihrer Zellintegrität durch das Trypanblau angefärbt und können dadurch von den vitalen Zellen abgegrenzt werden. Die Zählung erfolgte unter dem Lichtmikroskop mit einer *Neubauer Zählkammer*. In diese Zählkammer wurden 10 $\mu$ l des Ansatzes aus Trypanblau und Zellen gegeben, unter dem Lichtmikroskop konnten dann mit Hilfe eines Rasters die Zellen gezählt werden und anschließend entsprechend mit PBS auf eine Zellzahl von 20.000/ $\mu$ l verdünnt werden. Dieser Schritt erfolgte möglichst zeitnah zur Implantation, die Zellen wurden bis zur weiteren Verarbeitung durchgehend auf Eis gelagert.

### **3.3 Durchführung der Tierexperimente**

#### **3.3.1 Tierschutz und Tierversuchsantrag**

Alle Experimente wurden in Übereinstimmung mit dem Tierschutzgesetz durchgeführt. Die Genehmigung vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (LaGeSo) liegt in Form des Tierversuchsantrages G0281/14 vor. Die Qualifikation für die Versuchsdurchführung erfolgte durch Teilnahme am Grundkurs Tierschutz und Versuchstierkunde, Kompetenzstufe A.

#### **3.3.2 Narkoseverfahren**

Für die Operationen und die Gewebeentnahme wurden die Mäuse mit einem Narkosegemisch betäubt. Die Narkose wurde kurz vor der Operation vorbereitet und den Mäusen je nach Körpergewicht ca. 180 $\mu$ l intraperitoneal (8 ml pro kg Körpergewicht) verabreicht.

**Tab. 3-9: Zusammensetzung der Narkose**

<b>Wirkstoff/Bestandteile</b>	<b>Volumen</b>	<b>Name/Hersteller</b>
Esketamin	340µl	Ketanest 100 mg/ml ( <i>Pfizer</i> )
Xylazin	120µl	Rompun 2% ( <i>Bayer</i> )
Kochsalzlösung	1620µl	NaCl 0,9% ( <i>Braun</i> )

### **3.3.3 Tumorzellimplantation**

Die Tumorzellimplantation erfolgte mit Hilfe eines stereotaktischen Rahmens. Sobald die tiefe Narkose mittels eines Schmerzreizes überprüft war, wurde den Tieren Bepanthen Augensalbe zum Schutz der Augen aufgetragen und die Kopfhaut rasiert. Anschließend erfolgte das Auftragen von Xylocain Gel auf die Schädelhaut. Diese wurde mit einer Schere eröffnet und die Maus in den Rahmen eingespannt. Die Tumorzellimplantation wurde standardmäßig 2mm rechts lateral und 1mm kranial des Bregmas durchgeführt. Nach Bestimmung und Markierung der Implantationsstelle wurde mit Hilfe einer 23G Kanüle manuell ein Loch in den Schädelknochen gebohrt. Die Tumorzellsuspension wurde direkt vor der Implantation vom Eis genommen, kurz mit einem Vortexschüttler gemischt, und in eine 1µl Hamilton Spritze aufgezogen. Die Spritze wurde daraufhin in den Rahmen eingespannt und über dem vorgebohrten Loch platziert. Die Implantation erfolgte anschließend durch das Senken der Spritze um 4mm in das Gehirngewebe, anschließend wurde die Nadel um 1mm gehoben, sodass sie sich für die Implantation 3mm tief im Schädel befand und darunter 1mm Platz für die Zellen geschaffen wurde. Das Senken der Spritze erfolgte langsam und regelmäßig über einen Zeitraum von fünf Minuten. Der Spritzenkolben wurde dann über fünf Minuten heruntergedrückt belassen, damit sich die Zellsuspension im Gewebe verteilen kann. Auch das Heben der Nadel erfolgte langsam und gleichmäßig über fünf Minuten. Diese langsame Implantation über einen Zeitraum von insgesamt 15 Minuten ist notwendig, um Schäden an Gewebe und den Tumorzellen zu minimieren. Außerdem soll so eine gleichmäßige Ausbreitung der Tumorzellen im Gewebe gewährleistet werden. Nach dem Ausspannen der Maus wurde die Haut mit 3-0 Prolene genäht, 10µl Penicillin intramuskulär als Infektionsprophylaxe verabreicht und die Maus anschließend in einem Käfig auf einer Wärmeplatte überwacht, bis sie vollständig wach war. Postoperativ wurde den Tieren für zwei Tage Paracetamol saft über das Trinkwasser verabreicht.

### 3.3.4 Pumpenimplantation

Aufgrund der unterschiedlichen Applikationszeit wurde mit unterschiedlichen Pumpenmodellen gearbeitet, die sich zwar in der Fördermenge aber weder in Größe noch Handhabung unterschieden.

Je nach Versuchsaufbau wurden die Pumpen am gleichen Tag oder 14 Tage nach der Tumorzellimplantation eingesetzt.

Das Füllen der Pumpen erfolgte am Abend vor der Implantation. Der Antagonist wurde mit einer Konzentration von 100mM in sterilem DMSO gelöst und diese Suspension anschließend wiederum mit NaCl bis zur gewünschten Konzentration titriert. Für die Kontrolltiere wurden Pumpen mit derselben Menge DMSO und NaCl ohne Antagonisten gefüllt. Die Konzentration von 15µg Antagonist pro Tag lehnten wir an die Protokolle anderer Studien an. Der Antagonist war zum Zeitpunkt der Versuche in keinem Tumormodell intrathekal zur Anwendung gekommen, weshalb wir uns an Studien zur intraperitonealen Applikation anderer Tumorentitäten und der intrathekalen Applikation bei neuropathischen Schmerzen orientierten (108). In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu erwähnen, dass die maximale Tagesdosis durch die Löslichkeit und Fördermenge der Pumpen beschränkt war. Für den ersten Versuchsaufbau zur Hemmung der Tumorentstehung war eine Konzentration von 15µg ausreichend. Für den zweiten Teil zur Blockade des Tumorwachstums in der exponentiellen Wachstumsphase musste die Konzentration auf 30µg Antagonist pro Tag verdoppelt werden. Dies konnte nur durch den Einsatz neuer Pumpen mit doppelter Laufrate erfolgen, da die Löslichkeitsgrenze des Antagonisten in DMSO/NaCl bereits erreicht war.

Nach Befüllen und Zusammensetzen der Pumpen nach Maßgaben des Herstellers wurde der Flüssigkeitsstand im konnektierten Schlauch markiert und die Pumpen über Nacht in NaCl im Inkubator bei 37°C gelagert. Durch die Markierung konnte am nächsten Tag die Funktionsfähigkeit der Pumpe überprüft werden. Bei einwandfreier Förderung sollte sich der Flüssigkeitsspiegel zum Implantationszeitpunkt einige Zentimeter über der Markierung befinden.

Um keine Temperaturschwankungen innerhalb der Pumpe zu riskieren, wurden diese jeweils erst kurz vor der Implantation aus dem Inkubator genommen, der Schlauch gekürzt und das Kopfteil mit dem Schlauch verbunden. Es wurde dabei akribisch darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen im Schlauch befanden, da dies die Funktion der Pumpe beeinträchtigen könnte.

Die Vorbereitung der Tiere erfolgte in den gleichen Schritten wie bei der Tumorzellimplantation. Zusätzlich wurde unter Zuhilfenahme eines Nadelhalters die Rückenhaut leicht vom Unterhautgewebe abgelöst, um eine Tasche für die Pumpe zu bilden. Nach Einspannen der Maus in den stereotaktischen Rahmen wurde die Implantationsstelle 0,5mm links lateral des Bregmas markiert und mit einer 27G Kanüle ein Loch in den Schädelknochen gebohrt. Die Pumpe wurde in die Rückentasche eingesetzt. Mit Hilfe des Stereotaksie-Rahmens wurde das Kopfteil in die Trepanationsstelle eingesetzt und mit Gewebekleber am Schädelknochen befestigt. Nach Trocknung des Klebers wurde die Maus ausgespannt und die Hautnaht mit zusätzlichen Stichen um den Pumpenkopf gesichert. Die Nachbereitung erfolgte analog zur Tumorzellimplantation.

### **3.3.5 Magnetresonanztomographie**

Für die Bildgebung wurde das *Bruker PharmaScan 7.0Tesla MRT* im Neurowissenschaftlichen Forschungsinstitut auf dem Campus Charité Mitte, Berlin, genutzt. Wegen zwischenzeitlicher Reparaturarbeiten musste für einige Versuchsrunden auf das *Bruker BioSpec 7.0Tesla MRT* ausgewichen werden. Das Messprotokoll inklusive aller Einstellung konnte übertragen werden, sodass eine Vergleichbarkeit der Messungen garantiert werden kann. Es wurde außerdem darauf geachtet, dass zusammengehörige Runden stets an demselben MRT-Gerät durchgeführt wurden.

Von jedem Tier wurden Aufnahmen sowohl in T1- als auch T2-Wichtung angefertigt. In der T1-Wichtung erfolgte die Abgrenzung des Tumors durch das Kontrastmittel Magnevist, welches den Tieren kurz vor der Messung verabreicht wurde.

In der T2-Wichtung ist die Ödematisierung des Tumors zu erkennen, dadurch kann der Tumor auch ohne Kontrastmittel gut von gesundem Gewebe abgegrenzt werden.

Die Untersuchung wurde in einer 1.5-2% Isofluran / 30% N<sub>2</sub>O / 70% O<sub>2</sub> Inhalationsnarkose durchgeführt, um Bewegungsartefakte zu vermeiden. Eine Elektrode auf dem Rücken gewährleistete eine kontinuierliche Überwachung der Vitalparameter.

Die Messungen wurden mit dem Programm *Para Vision 4.0* von *Bruker* aufgenommen.

Die anschließende Auswertung der MRTs erfolgte verblindet und mit dem Programm *Analyze 10.0*.

### **3.3.6 Kardiale Perfusion**

Zur histologischen Aufarbeitung wurden die Gehirne nach der MRT Messung am letzten Versuchstag entnommen. Dazu wurden die Tiere mit 100µl pro 10g Körpergewicht in eine tiefe Narkose versetzt und anschließend mit einer 4%igen PFA-Lösung perfundiert. Um eine Verteilung des Konservierungsmittels im gesamten Gehirn zu ermöglichen, wurde der Brustkorb eröffnet und 10ml PFA mit einer 30G Kanüle in den schlagenden linken Ventrikel injiziert. Dabei wurde zuvor mit einer Schere die venöse Blutzufuhr zum Herzen durchtrennt, um eine Auswaschung des Blutes zu ermöglichen. Nach Entnahme der Gehirne aus dem Schädel wurden diese bei 4°C für 24 Stunden in 4%iger PFA Lösung gelagert. Um das Gewebe zu dehydrieren wurden die Proben nacheinander für jeweils 24 Stunden in einer 30, dann 20, dann 10%igen Saccharose Lösung gelagert. Am vierten Tag nach Probenentnahme wurden die Gehirne schonend, auf einem in flüssigem Stickstoff schwimmenden Aludeckel tiefgefroren und dann bei -80°C gelagert.

Die Gehirne wurden in eine 2%ige Gelatinelösung eingebettet. Bei -30°C wurden an einem Kryostat-Gerät 10µm dünne Gewebsschnitte angefertigt. Dabei wurde darauf geachtet, dass auf jedem Objektträger Schnitte aus drei unterschiedlichen Regionen des Tumors aufgenommen wurden, je einer aus dem rostralen, dem mittleren und dem okzipitalen Drittel des Tumors. Die Objektträger wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

## **3.4 Histologische Aufarbeitung der Gewebe**

### **3.4.1 Immunhistochemische Fluoreszenzfärbungen**

Immunhistochemischen Färbungen liegt ein Primär- und Sekundärantikörper-Prinzip zugrunde. Der Primärantikörper bindet antigenspezifisch an das darzustellende Molekül. Anschließend wird ein Sekundärantikörper appliziert, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist und wiederum spezifisch an den Primärantikörper bindet. Dadurch ist dann die Darstellung der Moleküle in einem Fluoreszenzmikroskop möglich.

Die Schnitte auf den Objektträgern wurden zunächst aufgetaut, für 30min an der Luft getrocknet und anschließend für 30min in 1% Casein in PBS mit 0,3% Triton bei Raumtemperatur inkubiert. Das Casein bewirkt eine Blockade der Bindungsstellen und verhindert eine unspezifische Antikörperbindung an Strukturen im Gewebe. Triton öffnet die Zellmembran, sodass die Antikörper in die Zellen eindringen und auch Strukturen



innerhalb der Zelle markiert werden können. Bei der Färbung von extrazellulären Strukturen kann das Triton weggelassen werden. Nach 30min Blockierungszeit wurde die Flüssigkeit vorsichtig von den Schnitten abgeschüttelt und die einzelnen Schnitte, insgesamt drei pro Objektträger, mit einem *DAKO*<sup>®</sup> Fettstift umrandet, um später das Vermischen und Verlaufen der Antikörperlösungen zu vermeiden.

Von der Primärantikörperlösung wurden 80µl pro Schnitt aufgetragen und in einer feuchten Dunkelkammer bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach der Inkubationszeit folgte zweimal fünfminütiges Waschen der Schnitte in einer Küvette in 0,5% Casein in PBS. Anschließend wurde die Sekundärantikörperlösung aufgetragen. Die Sekundärantikörper haben fluoreszierende Eigenschaften und verlieren unter Lichteinstrahlung an Leuchtkraft, sodass von nun an stets unter abdunkelnder Alufolie gearbeitet wurde. Die Inkubationszeit betrug 90 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurden die Schnitte noch dreimal für jeweils fünf Minuten in PBS und zweimal in destilliertem Wasser gewaschen und anschließend mit *DAPI Mounting Medium* eingedeckt. In dem *Mounting Medium* befindet sich ein fluoreszierender DAPI Antikörper, der die Zellkerne anfärbt. Ein eigener Schritt für die Zellkern Färbung ist somit nicht mehr nötig. Die Schnitte können bei Aufbewahrung im Kühlschrank (4°C) circa drei Tage mikroskopiert werden, danach verlieren sie an Leuchtkraft.

In jeder Färberunde wurde ein Objektträger ohne die Applikation von Primärantikörpern als Negativkontrolle mitgefärbt, um unspezifische Bindungen der Sekundärantikörper auszuschließen. Eine Liste der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper mit der jeweiligen Verdünnung in 0,5% Casein findet sich in Tab. 3-4 und 3-5.

Die Apoptose-Färbung wurde mittels *ApopTag*<sup>®</sup> *Red In Situ Apoptosis Detection Kit* nach Herstelleranleitung der Firma *Merck Millipore* durchgeführt. Die Funktionsweise des Kits basiert auf der TUNEL (terminal desoxyribonucleotidyl transferase (TdT) -mediated dUTP-biotin nick end labeling) - Methode. Im Gegensatz zu nekrotischen Vorgängen werden bei der Apoptose von Zellen DNA-Stränge systematisch fragmentiert. Die Enden dieser Spaltprodukte können mittels Antikörper detektiert werden. Nach der Anwendung des Kits können weitere Fluoreszenzmarker auf den Schnitten nach o.g. Art und Weise gefärbt werden.

### **3.4.2 Fluoreszenzmikroskopie und Auswertung**

Die Darstellung der immunhistochemischen Fluoreszenzfärbungen erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop mit dem Programm *Axio Vision 4*. Es wurden Aufnahmen mit 10facher und 20facher Vergrößerung angefertigt und diese mit dem Programm *ImageJ* ausgewertet. Zur Quantifizierung von Strukturen wurde der *ImageJ Cell Counter* genutzt. Von jedem Tier wurde ein Objektträger mit zwei bis drei Bildern pro Schnitt ausgewertet. Es wurde darauf geachtet, dass die ausgewerteten Bilder aus vergleichbaren Tumorregionen stammten, zum Beispiel zwei aus dem Randbereich und eines aus dem Tumorzentrum. Für die statistische Auswertung wurden die einzelnen Datenpunkte jedes Tieres zu einem Mittelwert zusammengefasst (*mean-of-the-mean-Prinzip*).

Die Auswertung der CXCL2-positiven Fläche wurde mit *ImageJ* durchgeführt. Die Quantifizierung der CXCR2 Färbung erfolgte über eine Intensitätsmessung. Auch diese Intensitätsmessung erfolgte mit *ImageJ*.

Bei beiden Färbungen wurde akribisch darauf geachtet, die Bilder während des Mikroskopierens mit gleichbleibender Belichtungszeit aufzunehmen. Des Weiteren wurden alle Gewebeschnitte in kurzen Zeitintervallen nach Anfärben der Moleküle mikroskopiert, um Messabweichungen durch ein Abblenden der Schnitte zu minimieren.

### **3.4.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Die HE-Färbung erfolgte nach einem standardisierten Protokoll unseres Labors. Zunächst wurden die Schnitte auf den Objektträgern für 5min in Methanol fixiert, anschließend für 3min in Haemalaun gefärbt. Dieses wurde dann für 2-3min unter laufendem Wasser ausgewaschen. Für den zweiten Teil der Färbung wurden die Schnitte für 30 Sekunden in Eosin gefärbt, anschließend für 15 Sekunden in Wasser gewaschen. Die Entwässerung der Schnitte erfolgte für 20 Sekunden in 70% Ethanol, dann für jeweils 1-2min in 80%, 96% und 100% Ethanol und zuletzt für jeweils 1min in einer Xylol Lösung. Abschließend wurden die Schnitte in Eindeckmedium gebettet und mit Deckgläsern versehen. Die Objektträger wurden unter dem Lichtmikroskop hinsichtlich Hyperzellularität, nekrotischer Areale und Wachstumsverhalten betrachtet. Die Tumorränder wurden zur deskriptiven Beurteilung des infiltrativen Wachstums begutachtet.

### 3.5 Durchführung der *in vitro* Versuche

Zusätzlich zu den GL261 Tumorzellen wurden alle *in vitro* Versuche auch an bEnd.4 Endothelzellen durchgeführt. Diese wurden im Gegensatz zu den GL261 in DMEM ohne Pyruvat kultiviert.

Die Endothelzellen wurden nach den gleichen Protokollen wie die GL261 Zellen kultiviert, gesplittet und gezählt.

#### 3.5.1 MTT Proliferation-Assays

Die GL261 Tumorzellen wurden in DMEM ohne Phenolrot (4,5g/L Glucose + 10% FCS + 5% Penicillin/Streptomycin + L-Glutamin + Pyruvat) in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert. Die bEnd.4 Endothelzellen wurden in DMEM ohne Phenolrot (4,5g/L Glucose + 10% FCS + 5% Penicillin/Streptomycin + L-Glutamin, ohne Pyruvat) in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert.

Um die dosisabhängige Reduktion der Proliferation nach Zugabe des Antagonisten SB225002 in der Zellkultur zu evaluieren, wurden *MTT Cell Proliferation Assays* mit GL261 Tumorzellen und bEnd.4 Endothelzellen durchgeführt. Hierfür wurde das *MTT Cell Proliferation Assay Kit* verwendet und das Protokoll des Herstellers *Cayman* befolgt. Die Zellen wurden mit einer Multikanalpipette in 96-Well Platten ausplattiert und anschließend für 16-18 Stunden bis zu einer Konfluenz von 80% bei 37°C im Inkubator inkubiert. Um den Effekt des Antagonisten zu untersuchen, wurde nun eine Abstufung verschiedener Konzentrationen des Antagonisten gesucht, die von einer maximalen Reduktion der Proliferation bis zu einer Konzentration ohne signifikante Verminderung in der Zellzahl reichte. Nach Literaturrecherche wurden zunächst Konzentrationen des Antagonisten von 4µM bis 0,25µM getestet (83, 96, 109). Keine der aufgeführten Publikationen hatte mit GL261 Zellen gearbeitet und die Konzentrationen mussten stark reduziert werden, um das gewünschte Spektrum von maximaler Reduktion der Proliferation bis zu einer Konzentration ohne Effekt zu erreichen. Nach mehreren Versuchen wurden die Konzentrationen von 0,5µM, 0,25µM, 0,125µM, 0,06µM, 0,03µM etabliert. Durch die Vorversuche konnten wir 0,5µM als Startpunkt mit absoluter Reduktion festlegen, da selbst die achtfache Dosis von 4µM in unseren Experimenten keinen größeren Effekt auf die Proliferation hatte. Da der Antagonist zur Verwendung in DMSO gelöst sein musste, wurde eine Referenzreihe mit der höchsten verwendeten

DMSO Konzentration (0,5µM) ohne Zugabe des Antagonisten behandelt. Diese DMSO Reihe wurde wiederum mit Zellen ohne jeglichen Zusatz verglichen, um einen alleinigen Effekt des DMSO auf die Proliferation auszuschließen.

Die 80% konfluenten Zellen wurden nach dem etablierten Versuchsaufbau für 24 Stunden mit dem Antagonisten SB225002 und DMSO behandelt, anschließend wurden die Reagenzien des *MTT Cell Proliferation Assay Kits* nach Protokoll der Firma *Cayman* hinzugegeben. Die Funktionsweise des Assays beruht dabei auf der Fähigkeit von vitalen Zellen, den namensgebenden MTT Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid in bläulich violette Formazan umzuwandeln. Diese Farbreaktion wird mit zunehmender Zellzahl intensiver und kann bei 570nm in einem Plattenleser mit Absorptionmessung der Firma *Tecan* und dem dazugehörigen Programm *Magellan* detektiert werden. Die visuell sichtbaren Unterschiede in der Zellzahl wurden außerdem am Lichtmikroskop dokumentiert. Zur statistischen Auswertung wurde bei jedem Versuch ein Mittelwert aus den Einzelwerten von acht Wells pro Konzentration gebildet. Als Referenz wurde eine Reihe Zellen ausschließlich mit DMSO behandelt. Insgesamt wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt, welche jeweils das gleiche Ergebnis zeigten.

### **3.5.2 Real Time Polymerase Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist ein etabliertes Verfahren zur Darstellung der Genexpression von Zellen. Das Prinzip ist die Vervielfältigung der zu untersuchenden Gene. Dazu wird ein Primerpaar generiert, welches an den zuvor getrennten Einzelsträngen der DNA den jeweiligen Anfang des darzustellenden Gens markiert. Anschließend repliziert eine DNA-Polymerase das Gen. Dies erfolgt exponentiell, da die bereits synthetisierten Produkte wiederum als Vorlage für neue Replikationen dienen. Je stärker das gesuchte Gen von den Zellen exprimiert wird, desto größer ist die Menge der amplifizierten Genkopien. Durch die Anwendung der real-time PCR (rt-PCR) kann eine Gelelektrophorese zur Bestimmung der Größe des PCR-Produktes umgangen werden. Stattdessen wird ein Fluoreszenzfarbstoff bei der DNA-Amplifikation eingebaut, durch den in Echtzeit die Quantität der Replikationen bestimmt wird. Dies ist eine grobe Zusammenfassung der Funktionsweise der real-time PCR. Der wissenschaftliche Umfang dieses Verfahrens ist sehr komplex und würde den Rahmen

dieser Arbeit sprengen. Für tiefergehende Details verweise ich auf einschlägige Fachliteratur und Publikationen.

Das Ausgangsprodukt der real-time PCR ist die cDNA der zu untersuchenden Zellen. Um diese zu erhalten, waren verschiedene Arbeitsschritte einzuhalten. Zunächst wurden die Zellen in der Zellkultur kultiviert und bei einer Konfluenz von 80% mit dem Antagonisten SB225002 behandelt. Es wurden dafür zwei Konzentrationen (0,25µM und 0,06µM) verwendet, die anhand der Ergebnisse der *MTT Cell Proliferation Assays* ausgewählt wurden. Die Konzentrationen sollten bestmöglich einen Verlauf der Zu- oder Abnahme der Genamplifikationen zeigen. Deshalb wurde mit 0,06 µM die niedrigste Konzentration mit noch signifikanter Reduktion der Proliferation in den GL261 Zellen ausgewählt, mit 0,25µM eine Konzentration, welche die Proliferation signifikant, aber nicht maximal hemmt. Des Weiteren wurden Zellen mit 0,25µM DMSO ohne Zugabe des Antagonisten SB225002 behandelt, um vergleichbare Kontrollwerte zu erhalten. Die Zellen wurden in DMEM Medium bei 37°C kultiviert, bei 80% Konfluenz gezählt und zu je einer Million in 25cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausgesät. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C wurde DMSO bzw. der Antagonist in DMSO in den unterschiedlichen Konzentrationen hinzugefügt und die Zellen nochmals für 24 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die RNA Isolation mit dem *RNA Isolation Kit* nach Protokoll der Firma *ambion*. Die gewonnene RNA der Zellen wurde im Anschluss an die Isolation im Plattenleser der Firma *TECAN* auf Verunreinigungen getestet. Dazu wurde über die Funktion „*Nuclein acid quantification*“ des *i-Control* Programms die Absorption bei 260nm und 280nm bestimmt. Sollte der Quotient der Werte beider Wellenlängen unter 2.0 liegen, ist von einer Verunreinigung der RNA auszugehen. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

Das Umschreiben der RNA in cDNA, welche das Ausgangsprodukt für die PCR darstellt, erfolgte mit Hilfe des *PrimeScript RT reagent Kit* nach Protokoll der Firma *TaKaRa*. Mit diesem Kit wird die RNA zunächst von eventuellen gDNA Resten gereinigt und anschließend eine Reverse-Transkriptase-Reaktion induziert. Dieser Prozess wurde in einem Thermocycler durchgeführt. Im Anschluss wurde im *TECAN*-Gerät die Konzentration der cDNA bestimmt.

Der Mastermix setzte sich zusammen aus:

- je 1,25µl forward- und reverse Primer 2,5µM in RNAse freiem Wasser
- 12,5µl SYBR-Green
- 0,5µl ROX (cDNA Kit)
- 4,5µl RNAse freies Wasser

20µl des Mastermix wurden mit 5µl der 1:20 verdünnten cDNA in ein Well einer *Fast 96-Well Reaction Plate for real-time PCR* gegeben. Für jedes Gen wurden drei Einzelwerte bestimmt und aus diesen der Mittelwert gebildet. Die PCR wurde mit jedem Gen in mindestens drei unabhängigen Versuchen mit dem *StepOne™ Real-Time PCR System* durchgeführt und mit der *StepOne™ Software v2.3* aufgezeichnet.

Die Primerpaare wurden aus einem etablierten Primerbestand des Labors oder aus Publikationen entnommen, siehe Tab. 3-6. Qualitätskriterien für die Primerauswahl waren eine Primergröße von 18-22 Basenpaaren, eine Schmelztemperatur von 58-62°C, ein GC Quotient von 40-60% sowie eine Produktgröße von 800-200 Basenpaaren. Die Qualitätskriterien wurden mit dem Programm Primer3web geprüft.

Die Auswertung der PCR erfolgte anhand statistischer Analyse der „delta cycle threshold“ ( $\Delta Ct$ ) Werte. Vereinfacht gesagt gibt der Ct-Wert an, wie viele Zyklen der rt-PCR benötigt wurden, um das Gen zu detektieren. Je mehr Zyklen benötigt werden, desto geringer ist die Konzentration bzw. Expression des Gens. Folglich entspricht ein niedriger Ct-Wert einer hohen Expression und ein hoher Ct-Wert einer niedrigen Gen-Expression. Zur Vergleichbarkeit aller Gene wurden die Ct-Werte jeweils mit dem Housekeeping-Gen (18S) verrechnet. Dies resultiert in negativen  $\Delta Ct$ -Werten. Bezogen auf die Abbildung im Ergebnisteil bedeutet das: Je weniger negativ der  $\Delta Ct$ -Wert, desto höher die Expression des Gens (110).

### **3.6 Statistische Auswertung**

Zur statistischen Analyse der Daten wurden in jedem Experiment Mittelwerte und Standardabweichungen der zu vergleichenden Gruppen gebildet. Die Mittelwerte der Fluoreszenzfärbungen erfolgten nach dem „mean-of-the-mean“ Prinzip. Die ausgewerteten mikroskopischen Aufnahmen der einzelnen Tiere wurden zu einem Mittelwert zusammengefasst. Aus den Mittelwerten aller Tiere wurde wiederum ein

Mittelwert der gesamten Gruppe gebildet, dessen Standardabweichung berechnet wurde. Zum Nachweis signifikanter Unterschiede zweier unabhängiger Gruppen wurde der ungepaarte doppelseitige t-Test verwendet. Dieser Test wurde bei den Tierexperimenten und den immunhistochemischen Färbungen angewendet.

Zum Vergleich mehrerer verschiedener Gruppen mit einer Gruppe wurde eine Varianzanalyse mittels one- bzw. two-way ANOVA mit Bonferroni Korrektur durchgeführt. Die Varianzanalyse wurde bei den Ergebnissen der MTT Proliferation Assays und der rt-PCR angewendet. Bei diesen Experimenten wurde eine gleichbleibende Kontrolle mit mehreren unabhängigen Konzentrationen bzw. Primern verglichen. Die Ergebnisse der MTT Proliferation Assays basieren auf Messungen dreier unabhängiger Experimente mit vergleichbaren Resultaten. Die Ergebnisse der rt-PCR wurden ebenfalls nach dem „mean-of-the-mean“ Prinzip berechnet. Es wurde dabei mindestens drei unabhängige Versuchsrunden pro Gen und Konzentration durchgeführt, die anschließend zu einem Mittelwert zusammengefasst wurden.

Die statistische Analyse und Darstellung wurden mit GraphPad Prism 6 durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert  $< 0,05$  festgelegt. Bei nicht-signifikanten Ergebnissen wurde in den Diagrammen kein p-Wert angegeben.

### **3.7 Anteilserklärung Methodenteil**

Alle aufgeführten Arbeitsschritte wurden von mir, Julia Zollfrank, selbstständig durchgeführt. Lediglich folgende Färbungen wurden von Kollegen auf durch mich zur Verfügung gestellten Gewebeschnitten angefertigt:

- CXCR2-Färbung der ersten Versuchsrunde: *Valentin Jünger* (Medizinstudent, Färbung im Rahmen einer Hausarbeit), *Claudius Jelgersma* (Doktorand der AG Acker, Intensitätsmessung)
- CXCR2-Färbung der zweiten Versuchsrunde: *Claudius Jelgersma* (Färbung und Intensitätsmessung)
- TUNEL-Färbung der zweiten Versuchsrunde: *Dr. Adnan Ghori* (PostDoc im Institut für Experimentelle Neurochirurgie der Charité, Färbung), *Claudius Jelgersma* (Auswertung)

## 4 Ergebnisse

Teilergebnisse dieser Doktorarbeit wurden 2020 im European Journal of Cancer veröffentlicht (111).

### 4.1 Reduktion des Tumorwachstums *in vivo* nach Antagonist-Therapie

#### 4.1.1 Die Blockade des Rezeptors CXCR2 mit dem Antagonisten SB225002

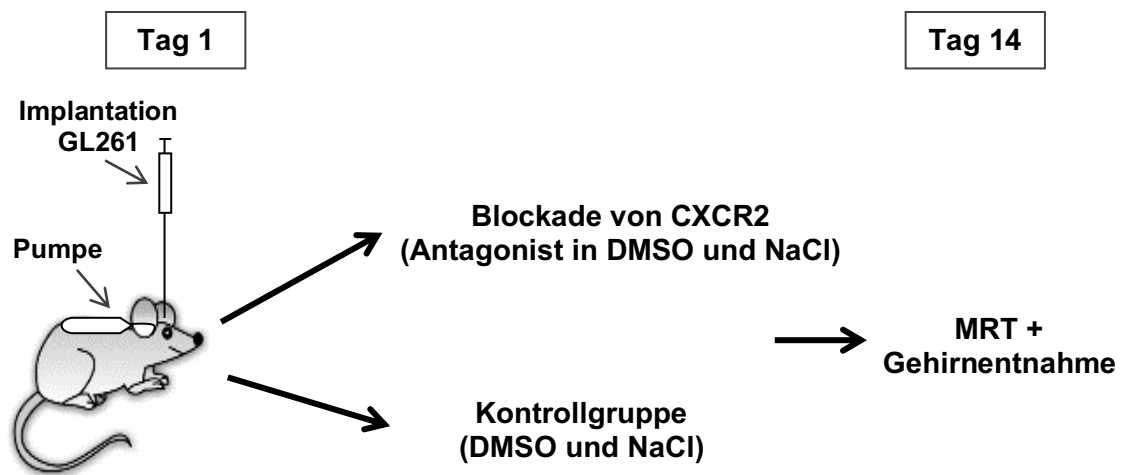
Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe ergaben ein reduziertes Tumorwachstum im Glioblastom-Mausmodell nach Blockade durch einen CXCR2-Antikörper. Dieser Versuchsaufbau sollte auf einen Therapieansatz mit dem *small-molecule* Antagonisten SB225002 übertragen werden. Im Gegensatz zu Antikörpern verändern *small-molecule* Inhibitoren die Konfiguration von Aminosäuresequenzen auf der Zelloberfläche. Sie können außerdem die Zellmembran überwinden und direkt Einfluss auf die intrazelluläre Signaltransduktion nehmen (90). Die im Folgenden vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass die Blockade des Rezeptors CXCR2 mit dem *small-molecule* Antagonisten SB225002 im Mausmodell zu signifikant reduziertem Tumorwachstum führt. Neben *in vivo* Experimenten testeten wir auch die Wirkung des Antagonisten *in vitro* an Glioblastom- und Endothelzellen und evaluierten die Effekte auf die Proliferation und die Genexpression des CXCR2- und VEGFR- Signalweges.

#### 4.1.2 Antagonist-Wirkung im Initialstadium des Tumorwachstums

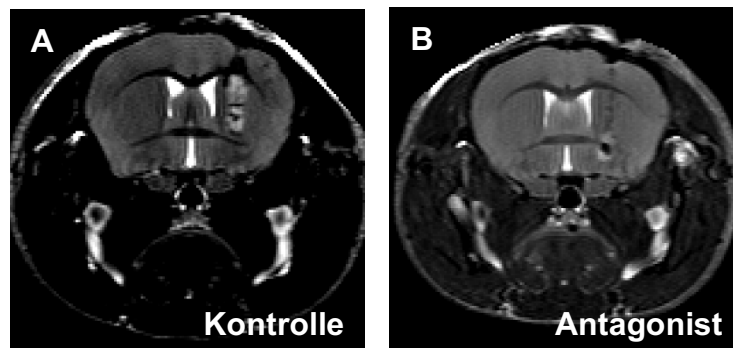
Zum Zeitpunkt der Durchführung unserer Experimente existierte keine Literatur zum Einsatz des Antagonisten SB225002 in einem *in vivo* Glioblastom-Modell. In einem ersten Versuchsaufbau wurden die Tumorzellen und die osmotischen Mini-Pumpen zeitgleich an Tag 1 des Versuchsprotokolls implantiert (**Abb. 4-1**).

Ziel war es, den Effekt eines CXCR2-Antagonisten auf die Glioblastomentstehung *in vivo* zu untersuchen. Repräsentative MRT-Schnittbilder in T1- und T2-Wichtung als auch die Volumetrie der MRT-Daten ergaben ein signifikant geringeres Tumolvolumen der Therapiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe nach 14-tätigem Tumorwachstum und simultaner Antagonist-Therapie mit 15µg pro Tag (**Abb. 4-2; 4-3**).

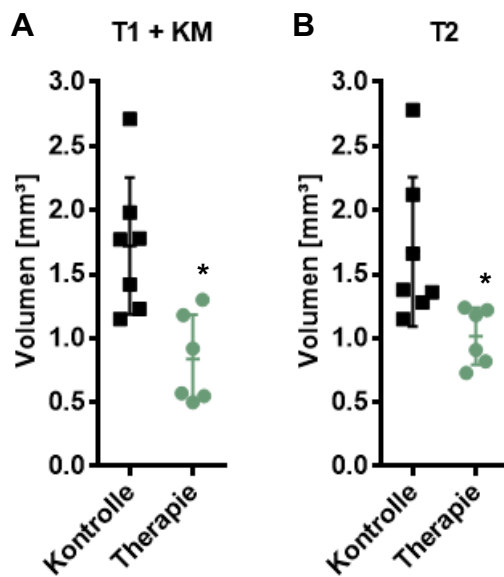




**Abbildung 4-1: Schematische Darstellung des ersten Versuchsaufbaus** zur Erfassung der Wirkung eines CXCR2-Antagonisten in der Phase der Tumorentstehung.



**Abbildung 4-2: Repräsentative MRT-Schnittbilder nach 14-tägigem Wachstum** - (A) Kontroll- und (B) Therapiegruppe in T2-Wichtung im ersten Versuchsaufbau (14-tägiges Tumorstadium mit simultaner Antagonist-Therapie). Die Tumore liegen paraventriculär und substriatal in der rechten Gehirnhälfte. Der Tumore der Kontrolltiere waren sichtbar kleiner im Vergleich zu den Tumoren der Therapietiere.



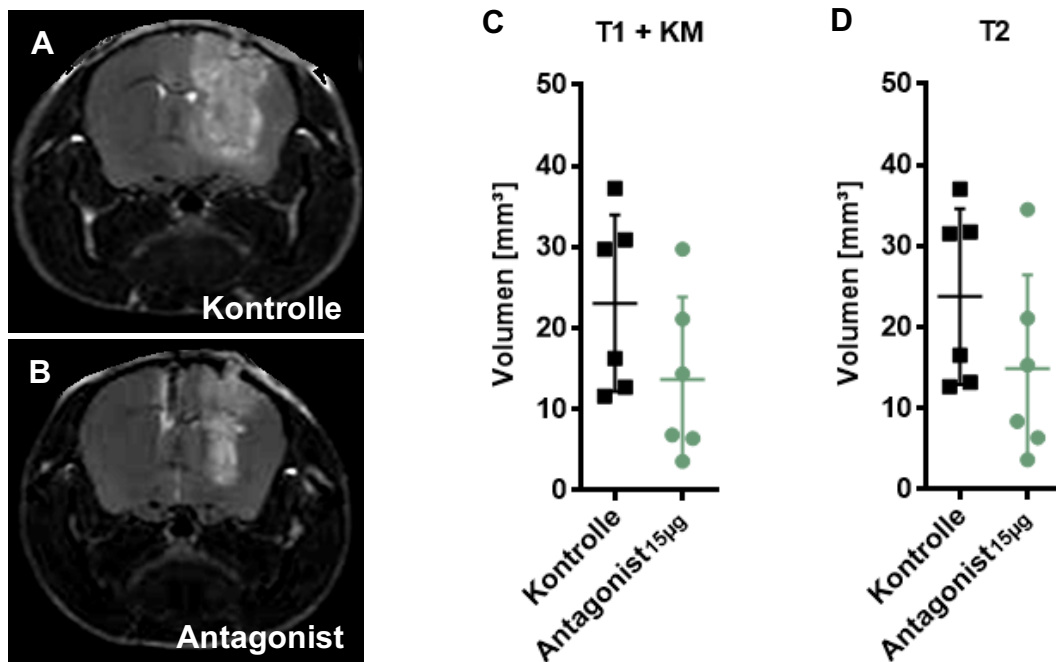
**Abbildung 4-3: Absolute Tumorumfänge der MRT Messungen nach 14-tägiger Therapie** in (A) T1-Wichtung mit Kontrastmittel und (B) T2-Wichtung. Die Tumorumfänge der SB225002-Gruppe waren nach 14-tägigem Tumorumfang mit simultaner Antagonist-Therapie signifikant reduziert. Jeder Punkt repräsentiert die absoluten Werte eines Versuchstieres (n=6-7 pro Gruppe; \* $p < 0,05$ ).

#### 4.1.3 Therapieansatz im Exponentialstadium des Tumorumfangs

Der erste Versuchsaufbau diente als explorativer Einstieg und zur Bestätigung der These, dass ein *small-molecule* CXCR2-Antagonist *in vivo* das Wachstum von Glioblastomen hemmt. Um den Tumor in der exponentiellen Wachstumsphase zu erfassen, wurde ein zweiter Versuchsaufbau durchgeführt. Damit sollte eine klinische Situation, in der der bereits an einem Tumor erkrankte Patient therapiert wird, besser erfasst werden. Die Zeiträume der Versuchsaufbauten gehen auf langjährige Erfahrung im neurochirurgischen Forschungslabor der Charité zurück, nach denen im GL261 Mausmodell der 14. Tag des Tumorumfangs ein guter Zeitpunkt für den Therapiebeginn ist. Die Tumore sind nach diesen zwei Wochen bereits in die exponentielle Wachstumsphase übergegangen. Außerdem ist die Tumorgöße zu diesem Zeitpunkt ausreichend, um eine Volumetrie mit Hilfe des Kleintier-MRTs durchführen zu können.

In einem ursprünglichen Entwurf des zweiten Versuchsaufbaus wurde die Abschlussuntersuchung für Tag 28 der Versuchsrunden angesetzt, um, wie im ersten Aufbau, 14 Tage Therapiezeitraum zu haben. In einer 28-Tage-Testrunde zeigte sich aber ein zu aggressives und rasantes Tumorumfang in der Kontrollgruppe, um eine 14-tägige Therapie durchzuführen. Mehrere Kontrolltiere überlebten diesen Zeitraum nicht oder mussten wegen eines verschlechterten Allgemeinzustandes getötet werden. Durch die fehlenden MRT Untersuchungen und Gewebeproben konnten diese Runden

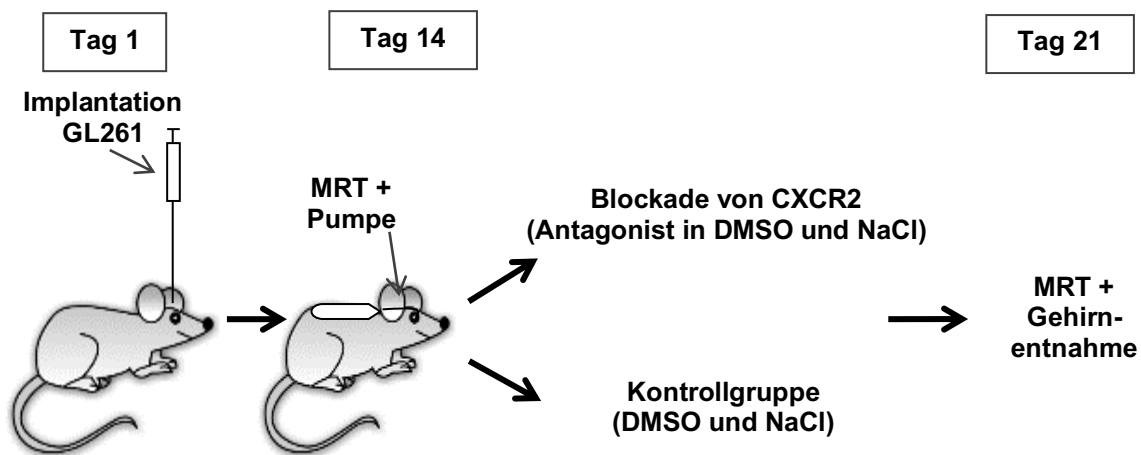
nicht bis zu Tag 28 ausgewertet werden. Im Rahmen der verkürzten Experimente gewannen wir aber die Erkenntnis, dass die Dosis von 15µg pro Tag nicht ausreicht, um das Tumorwachstum in der exponentiellen Wachstumsphase zu verlangsamen. Der Unterschied der Tumorgröße in Kontroll- und Therapiegruppe ergab mit dieser Dosis keine signifikanten Ergebnisse (**Abb. 4-4**).



**Abbildung 4-4: Ergebnisse der Therapie etablierter Tumore mit dem CXCR2-Antagonisten SB225002 in einer Dosierung von 15µg pro Tag.** Repräsentative MRT Bilder zeigen eine verringerte Tumorgröße der Therapietiere (B) im Gegensatz zur Kontrollgruppe (A) an Tag 21 der Versuche. Die Auswertung der Tumorumfassen ergaben reduzierte Werte in der Therapiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe in T1- (C) und T2-Wichtung (D), welche aber nicht signifikant waren (n=6 pro Gruppe).

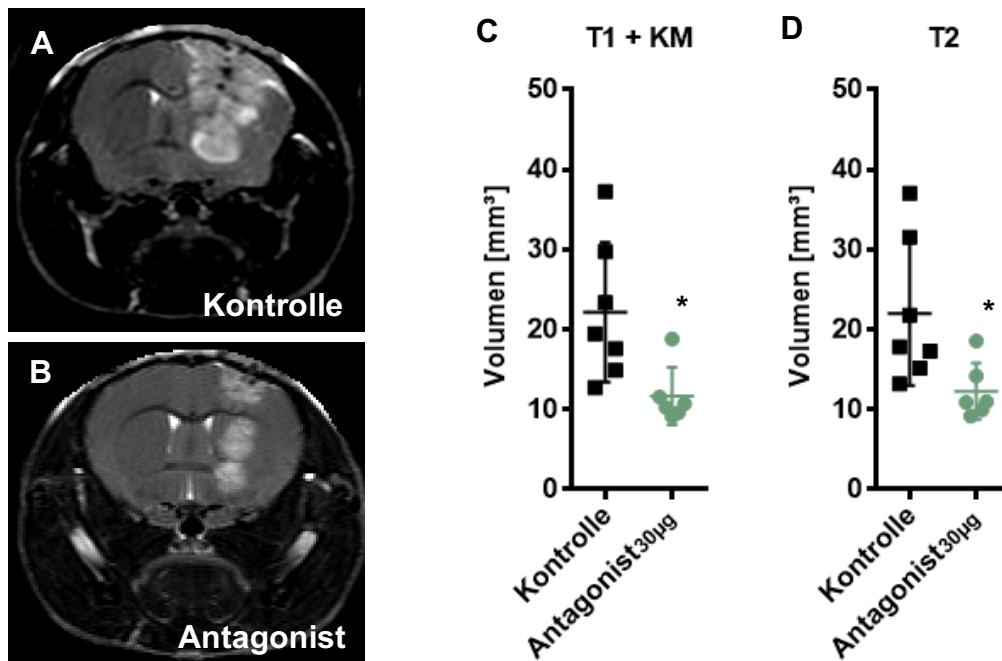
Die Versuche wurden mit einem gekürzten 21-Tage Protokoll wiederholt, um ein Überleben aller Tiere bis zu den Abschlussuntersuchungen zu gewährleisten. Dabei wurden Pumpen mit doppelter Pumprate genutzt, um die Dosis auf 30µg pro Tag zu erhöhen.

In dem endgültigen Versuchsaufbau folgte auf die 14-tägige Etablierungsphase der Glioblastome ein siebentägiger Therapiezeitraum. Die GL261-Tumorzellen wurden an Tag 1 des Versuchsprotokolls implantiert. Nach 14-tägiger nativer Tumoretablierung wurde das Ausgangsvolumen der Tumore aller Tiere im MRT erfasst. Anschließend wurden am selben Tag die osmotischen Mini-Pumpen mit Therapie- und Kontrolllösung in die Ventrikel eingesetzt. Die abschließende MRT-Messung wurde nach siebentägiger Therapie an Tag 21 durchgeführt (**Abb. 4-5**).



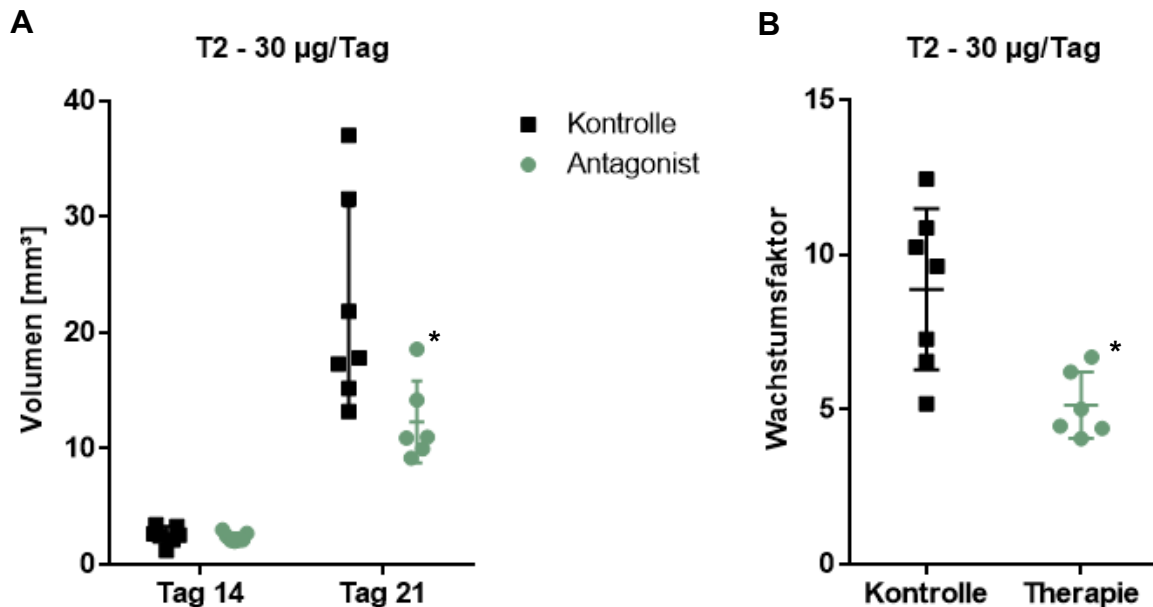
**Abbildung 4-5: Schematische Darstellung des zweiten Versuchsaufbaus zur Therapie der Glioblastome im exponentiellen Wachstumsstadium.**

Da der Antagonist bereits für die einfache Dosis an die Löslichkeitsgrenze heran titriert wurde, musste zur Dosiserhöhung ein anderes Pumpenmodell mit einer verdoppelten Laufrate genutzt werden. Nach Verdopplung der Dosis auf 30µg pro Tag in weiteren Versuchsrunden konnte der Effekt der Wachstumshemmung gesteigert werden. Die Größe der Tumore ergab mit einer Dosierung des *small-molecule* Antagonisten von 30µg pro Tag sowohl in der T1- als auch in der T2-Wichtung signifikante Unterschiede zwischen Therapie- und Kontrollgruppe (**Abb. 4-6**).



**Abbildung 4-6: Ergebnisse der Therapie etablierter Tumore in einer Dosierung von 30µg pro Tag.** Repräsentative MRT-Schnittbilder der (A) Kontroll- und (B) Antagonist-Gruppe in T2-Wichtung nach insgesamt 21 Tagen Therapiezeitraum im zweiten Versuchsaufbau bei 14-tägiger Etablierungsphase und anschließend siebentägiger Therapie mit einer Tagesdosis von 30µg Antagonist. (C, D) Die absoluten Werte der Tumorummetrie zeigten signifikant reduzierte Werte nach SB225002 Therapie in beiden MRT-Wichtungen (n=6-7 pro Gruppe; \* $p < 0,05$ ).

Weitere Analysen unter Einbeziehung der Ausgangsvolumina der Glioblastome zu Beginn der Therapiephase verdeutlichen die Wirksamkeit der CXCR2-Antagonisierung auf das Tumorwachstum. Anhand dieser Darstellungen kann eine Effektverzerrung durch unterschiedliche Volumina und Wachstumsstadien an Tag 14 ausgeschlossen werden. **Abb. 4-7** zeigt alle Datenpunkte der Versuchstiere in der 30µg-Dosis Runde sowie eine Abbildung der Wachstumsfaktoren der einzelnen Tumore.



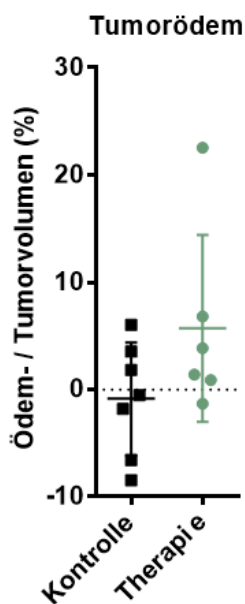
**Abbildung 4-7: Absolute Volumenwerte (A) und Wachstumsfaktoren (B) der Glioblastome der einzelnen Versuchstiere an Tag 14 und Tag 21 im zweiten Versuchsaufbau mit 30µg Antagonist pro Tag.** Zum Ausgangszeitpunkt vor Therapiebeginn an Tag 14 waren die Volumina der Tumore innerhalb der Gruppen als auch im Vergleich Kontrolle vs. Therapie nahezu identisch. Die Berechnung des Wachstumsfaktors der einzelnen Versuchstiere verdeutlicht die Homogenität der Tumorgrößen in der Therapiegruppe (n=6-7 pro Gruppe; \*=p<0,05).

#### 4.1.4 Verträglichkeit und Nebenwirkungen der Antagonist-Therapie im Versuchsaufbau

Der Einsatz und die Dosierung medikamentöser Therapieansätze werden häufig durch Nebenwirkungen begrenzt. Um etwaige Nebenwirkungen auf die Versuchstiere zu analysieren, führten wir regelmäßige Gewichtskontrollen durch und bewerteten die Ödematisierung des peritumoralen Gewebes. Des Weiteren bewerteten wir kritisch die Morphologie der Glioblastome. Ein Tier der Therapiegruppe zeigte im Versuchsaufbau mit 30µg Antagonist-Dosis pro Tag im Abschluss-MRT an Tag 21 eine diffuse und großflächige Einblutung um den Tumor. In der statistischen Auswertung der 30µg Runde wurde dieses Tier nicht eingeschlossen, da eine einwandfreie Quantifizierung der Tumorgröße technisch nicht erfolgen konnte. Blutungen gehören generell zum Variationsspektrum der Glioblastom-Morphologie. In unseren Experimenten beobachteten wir im Tumorstadium nach drei Wochen Wachstum keine weiteren

Blutungen in Therapie- oder Kontrolltieren. Durch die langjährige Erfahrung in unserer Arbeitsgruppe wissen wir, dass auch großflächige Blutungen zum normalen Spektrum der Glioblastomentwicklung im Mausmodell ab einem gewissen Tumorstadium gehören. Ein weiteres Tier starb, bevor die MRT Aufnahmen an Tag 21 durchgeführt werden konnten und fließt somit ebenfalls nicht in die Auswertung ein. Dies wird als mögliche Nebenwirkung der Therapie aufgeführt.

Zur weiteren Evaluation von möglichen Nebenwirkungen der Antagonist-Therapie verglichen wir die Gewichtszunahme der Kontroll- und Therapietiere während des Versuchszeitraumes. Wir stellten keine Gewichtsabweichung der therapierten Tiere im Vergleich mit den Kontrolltieren fest. Kontroll- und Therapietiere zeigten eine ähnliche Gewichtszunahme von 9% bzw. 8% während des Therapiezeitraums. Neben Gewicht und Tumormorphologie verglichen wir die Ausprägung des peritumoralen Ödems der Gruppen. Das Ödem wurde durch die Differenz der hyperintensiven Areale in den T2- und T1-gewichteten MRT-Messungen festgelegt. Auch hier gab es keinen Hinweis auf eine Nebenwirkung der Therapie in Form einer Schrankenstörung der Gefäße und eines dadurch vermehrten Ödems (**Abb. 4-8**).



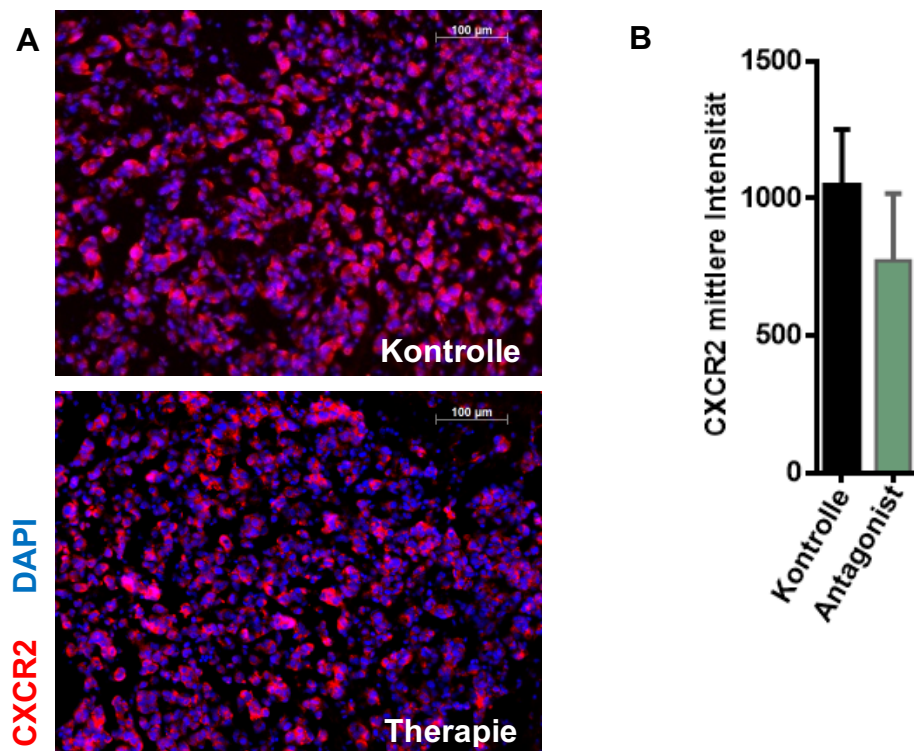
**Abbildung 4-8: Tumorödem der Kontroll- und Therapiegruppe.** Therapierte Tiere zeigten im Vergleich mit der Kontrollgruppe keine Veränderungen in der Größe des peritumoralen Ödems (n= 6-7).

## 4.2 Immunhistochemische Untersuchungen auf Gewebsschnitten

### 4.2.1 CXCR2-Antagonisierung beeinflusst Glioblastomentstehung über angiogene Wege

Die Untersuchung der Veränderungen auf Zellebene durch die Therapie mit dem *small-molecule* Antagonisten erfolgte anhand immunhistochemischer Färbungen auf Gewebeschnitten der Versuchstiere. Der erste Versuchsaufbau untersuchte die Antagonist-Behandlung simultan zur Tumoretablierung und diente als Einstiegsexperiment zur Exploration der Therapiewirkung des Antagonisten im GBM. Hierfür wurden der Rezeptor CXCR2 und Mikroglia- und Gefäßstrukturen untersucht.

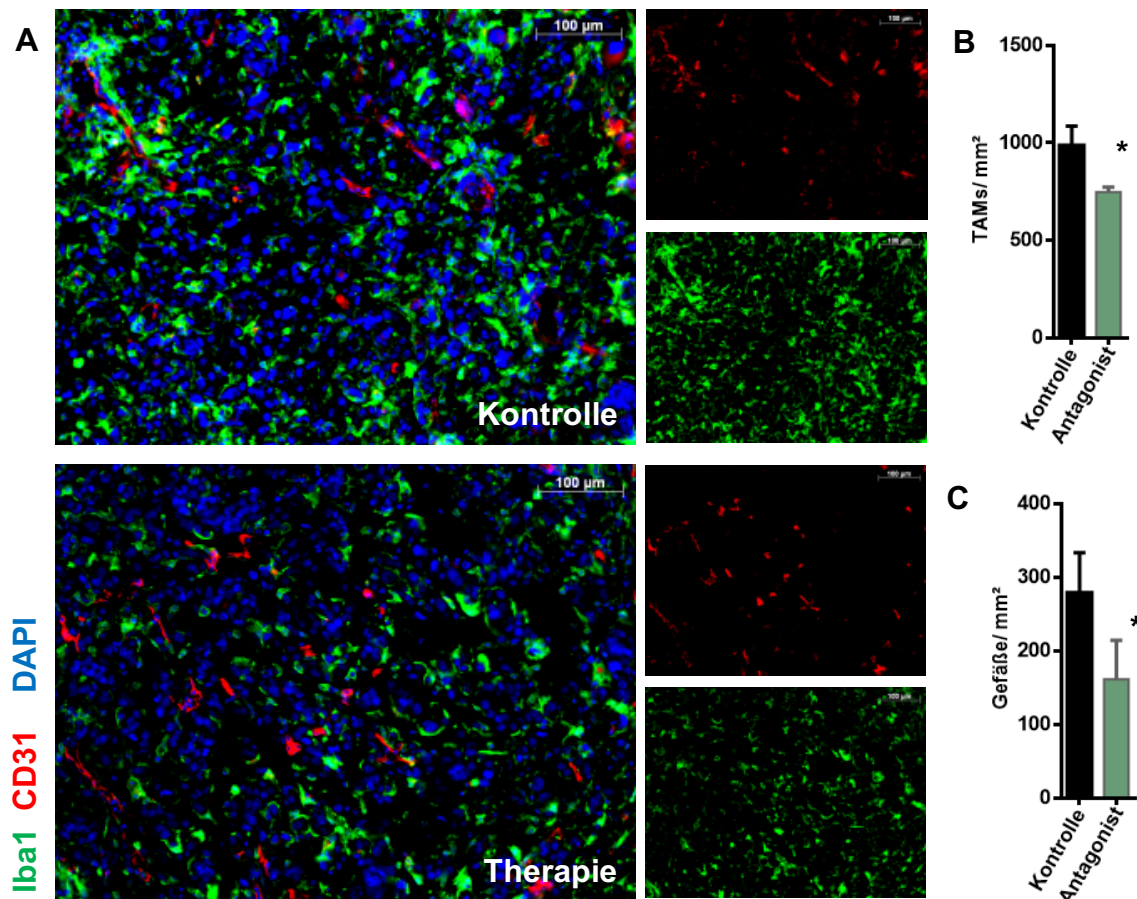
Die Rezeptordichte, gemessen in der mittleren Intensität der Färbung, war im Vergleich der Gruppen nicht verändert (**Abb. 4-9**).



**Abbildung 4-9: CXCR2 Färbung nach 14-tägiger Antagonist-Therapie in der Entstehungsphase des Glioblastoms.** (A) Immunhistochemische Färbungen von Gewebeschnitten der *in vivo* Experimente zeigten eine vergleichbare CXCR2-Dichte. (B) Die Messung der mittleren Intensität ergab keine signifikanten Unterschiede in Therapie und Kontrollgruppe. CXCR2 = rot. DAPI/Zellkerne = blau (n=4 pro Gruppe).



Mikroglia spielen im Tumorverband des Glioblastoma multiforme eine wichtige Rolle, da sie mit Endothelzellen der Gefäße interagieren und Chemokine als Signalstoffe für proliferative und angiogene Effekte nutzen. Mikrogliazellen und Gefäße zeigten in den Färbungen eine signifikant verminderte Anzahl in der Antagonist-Gruppe (**Abb. 4-10**).



**Abbildung 4-10: Mikroglia und Gefäßfärbung nach 14-tägiger Therapie in der Entstehungsphase des Glioblastoms.** (A) Färbungen von Gewebeschnitten während der Therapie in der Phase der Tumoretablierung zeigten eine reduzierte Dichte von Mikrogliazellen und Gefäßen nach CXCR2-Antagonisierung. Die Quantifizierung ergab eine signifikant reduzierte Anzahl an (B) Mikrogliazellen (TAMs) und eine signifikante Verminderung der (C) Gefäße in der SB225002-Gruppe im Vergleich zu den Kontrolltieren. Iba1/Mikroglia = grün. CD31/Gefäße = rot. DAPI/Zellkerne = blau (n=3 pro Gruppe; \*= $p < 0,05$ ).

Die folgenden immunhistochemischen Fluoreszenzfärbungen wurden auf Gewebeschnitten des zweiten Therapieansatzes im etablierten Tumor angefertigt, der die klinische Situation der Therapie bereits etablierter Glioblastome widerspiegelt. Da in den *in vivo* Versuchen nur bei einer Therapiedosis von 30µg Antagonist pro Tag eine signifikante Reduktion des Tumorwachstums in den MRT-Analysen erzielt wurde, lag der Untersuchungsfokus auf den Gewebeproben dieser Untersuchungsreihe.

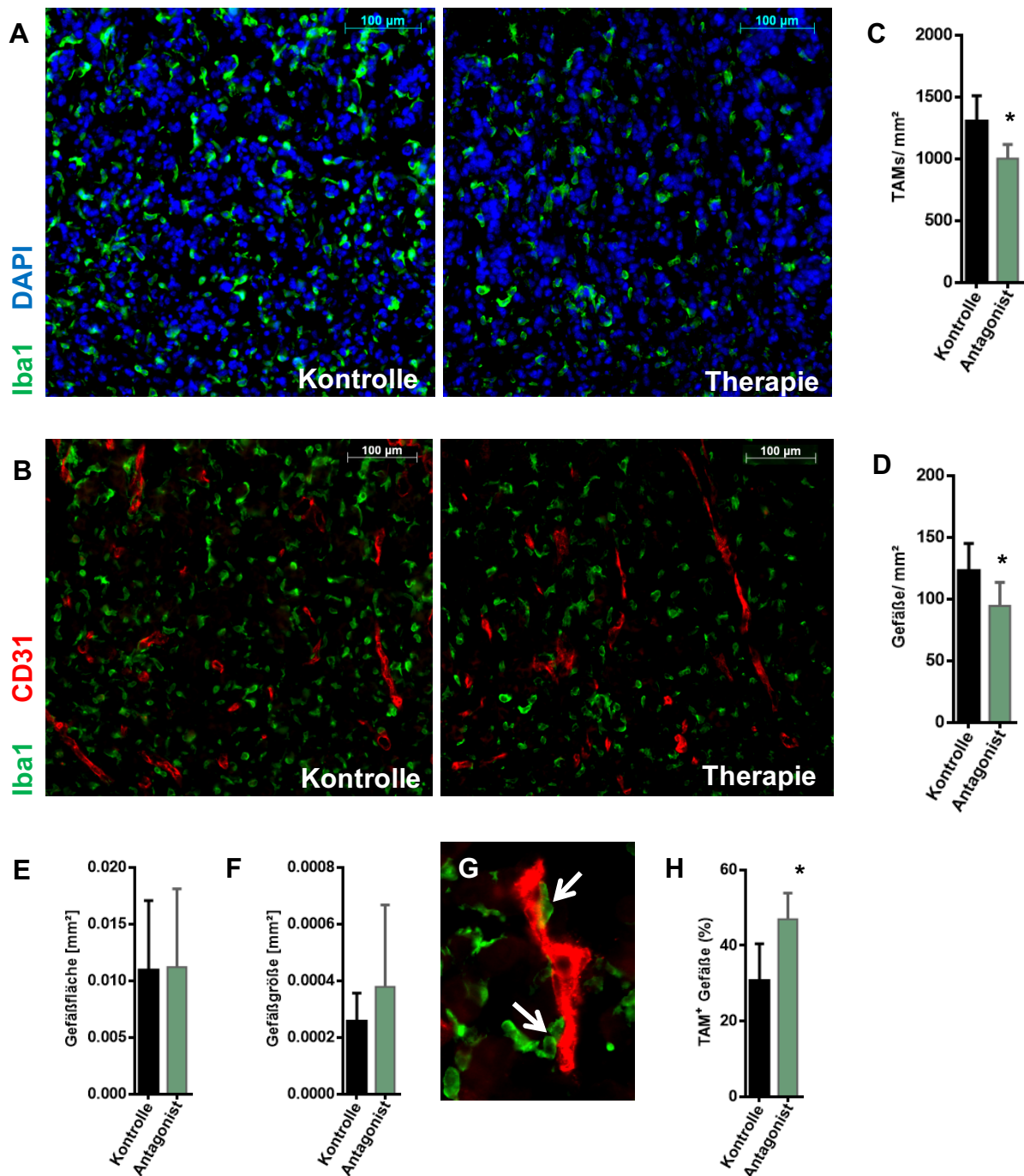
Ziel der Färbungen sollte ein besseres Verständnis der molekularen Prozesse in den Tumoren der Versuchstiere sein. Durch die von uns erwartete anti-angiogene Wirkung des Antagonisten im Glioblastoma multiforme fokussierten wir uns auf die Veränderungen der Gefäße und der anliegenden Zelltypen, auf beteiligte Signalmoleküle im CXCR2/CXCL2 Signalweg sowie auf die Proliferation und Apoptose von Tumorzellen.

## **4.2.2 Analyse von Gefäßen und Akteuren der Angiogenese**

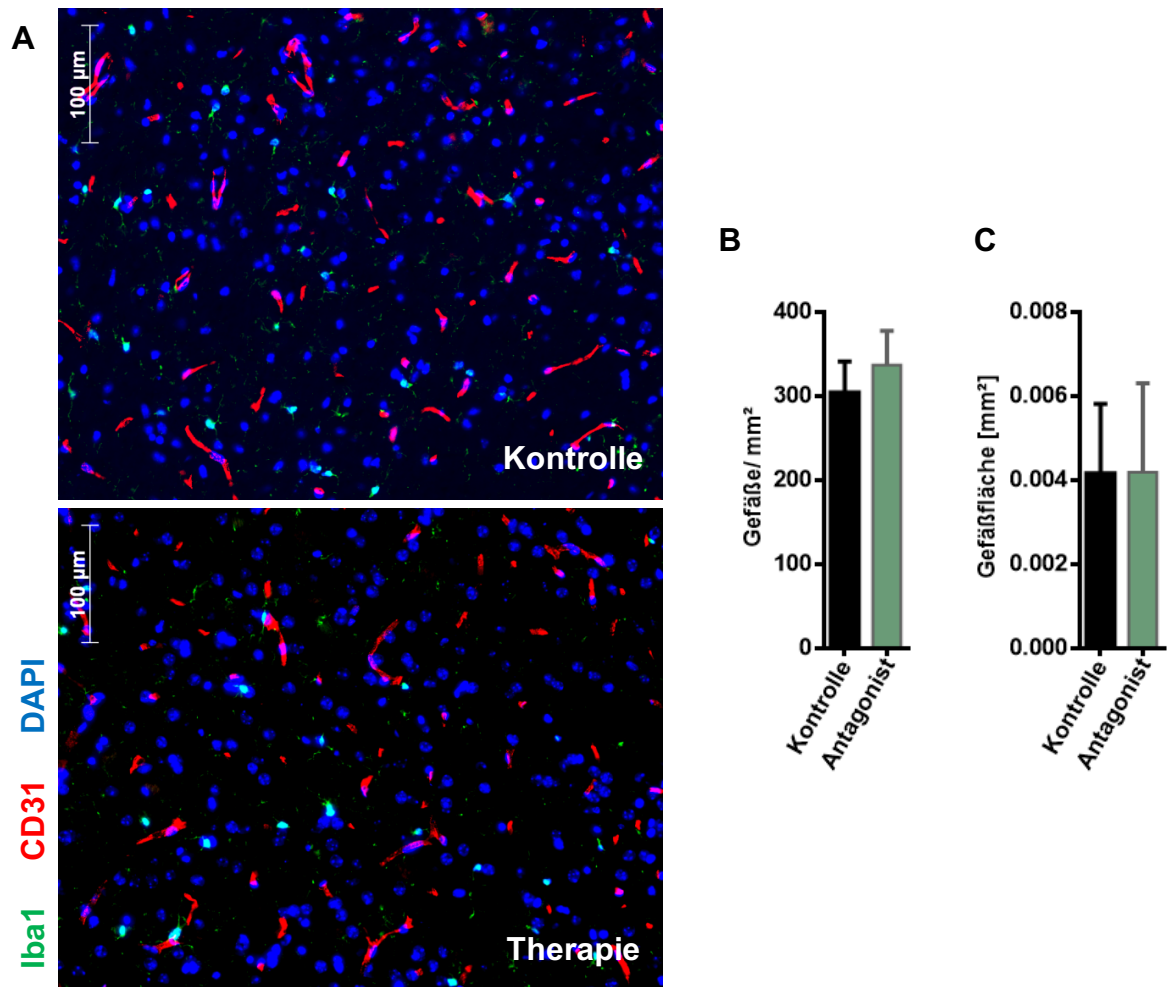
### **4.2.2.1 Mikroglia und Gefäße**

Mikrogliazellen interagieren eng mit Endothelzellen. Deshalb untersuchten wir, ob der Antagonist die Interaktion der Mikroglia mit den Gefäßen beeinflusst. Zur Quantifizierung wurden Gefäße gezählt, an deren Endothelzellen mindestens zwei Mikrogliazellen direkt mit ihrem Zellkörper anliegen. Die Interaktion der Mikrogliazellen mit den Gefäßen nahm nach Behandlung mit dem Antagonisten zu. Gefäße und Mikrogliazellen wurden außerdem isoliert gezählt und zusätzlich die Fläche der Gefäße quantifiziert. Signifikant vermindert waren sowohl die Gefäßanzahl als auch die Anzahl der Mikrogliazellen pro mm<sup>2</sup> in der Therapiegruppe. Die Gefäßfläche pro mm<sup>2</sup> Tumorfläche war in beiden Gruppen identisch. Bei geringerer Anzahl der Gefäße ist die durchschnittliche Gefäßfläche in der Therapiegruppe größer als die der Kontrollgruppe, jedoch nicht signifikant (**Abb. 4-11**).

Um Veränderungen durch die Verabreichung des Antagonisten in gesunden Gefäßen zu überprüfen, analysierten wir zusätzlich zu den Gefäßen im Tumor auch die Gefäße der kontralateralen, nicht vom Tumor betroffenen Gehirnhälften. Wir stellten keine Abweichungen in Gefäßanzahl, Gesamtfläche der Gefäße oder durchschnittlicher Gefäßfläche in den kontralateralen Hemisphären der therapierten Tiere fest (**Abb. 4-12**).



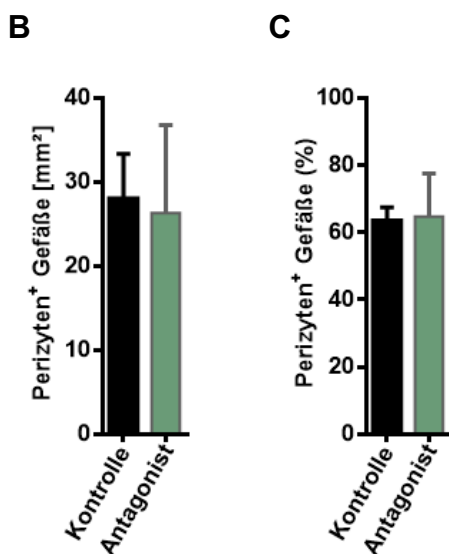
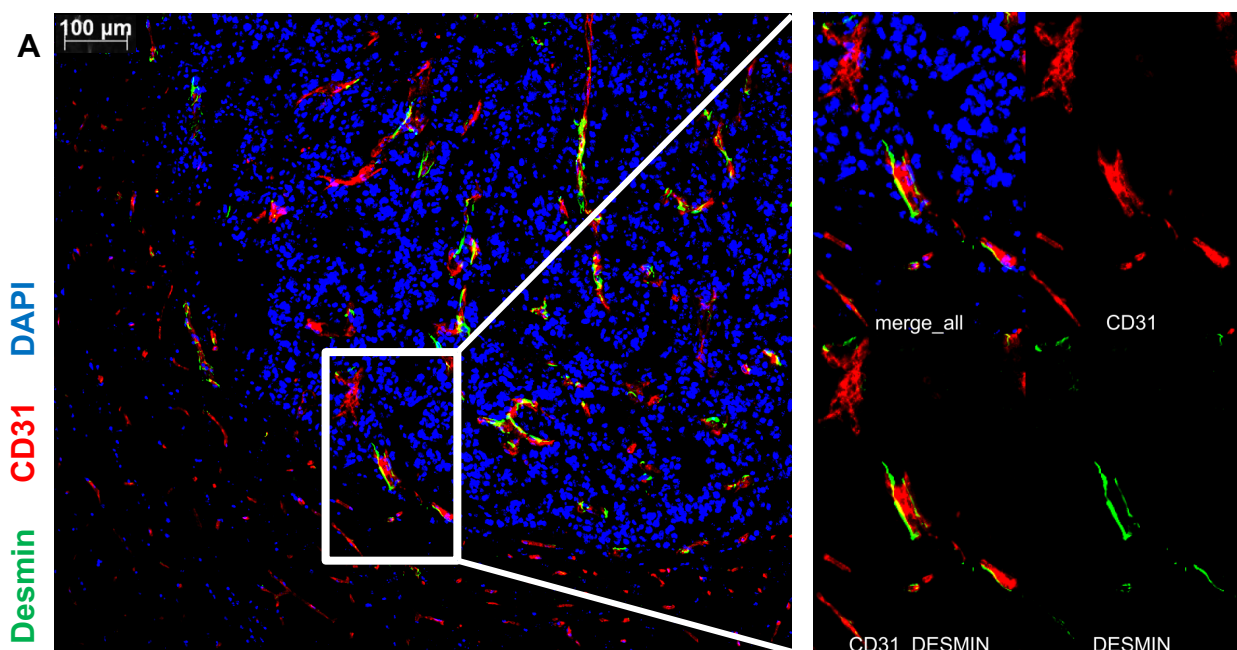
**Abbildung 4-11: Verringerte Anzahl an (A) Mikrogliazellen und (B) Gefäße nach CXCR2-Therapie etablierter Tumore.** Die mit Antagonist SB225002 therapierten Tiere (30µg pro Tag) zeigten eine (C) signifikant geringere Zahl an Mikrogliazellen, (D) signifikant weniger Gefäße, (E) eine unveränderte gesamte Gefäßfläche, (F) eine nicht signifikant erhöhte durchschnittliche Fläche je Gefäß und eine (G, H) signifikant erhöhte Interaktion zwischen Mikrogliazellen und Gefäßen. Iba1/Mikroglia = grün. CD31/Gefäße = rot. DAPI/Zellkerne = blau (n=6 pro Gruppe; \*=p<0,05).



**Abbildung 4-12: GefäÙanalyse der kontralateralen Hemisphären.** (A) Repräsentative Färbungen der Kontroll- und Therapiegruppe mit unveränderter (B) Anzahl sowie (C) Fläche der GefäÙe in der kontralateralen, gesunden Gehirnhemisphäre in vivo. Betrachtet man Färbungen aus der Tumorregion (wie in Abb. 4-11), erkennt man besonders gut die Unterschiede in der GefäÙarchitektur und Dichte der Mikroglia zwischen gesundem Gehirn und Tumorgewebe. Iba1/Mikroglia = grün. CD31/GefäÙe = rot. DAPI/Zellkerne = blau (n=6 pro Gruppe).

#### 4.2.2.2 Perizyten

Wichtige Akteure in der perivaskulären Nische sind neben Mikrogliazellen auch die Perizyten. Aus ihrer Anzahl rund um Gefäße können Schlüsse über die Gefäßintegrität gezogen werden (112, 113). Ein Gefäß wurde als positiv gezählt, wenn mindestens zwei Perizyten mit ihrem Zellkörper direkt an den Endothelzellen anliegen. Das gemeinsame Anfärben von Perizyten mit Gefäßen ergab keine signifikante Veränderung in der Anzahl der Perizyten oder der Interaktion von Perizyten mit Gefäßen (**Abb. 4-13**). Trotz der veränderten Gefäßgröße und der erhöhten Interaktion von Mikroglia mit Gefäßen beeinflusste der Antagonist die Interaktion von Perizyten mit Gefäßen nicht.



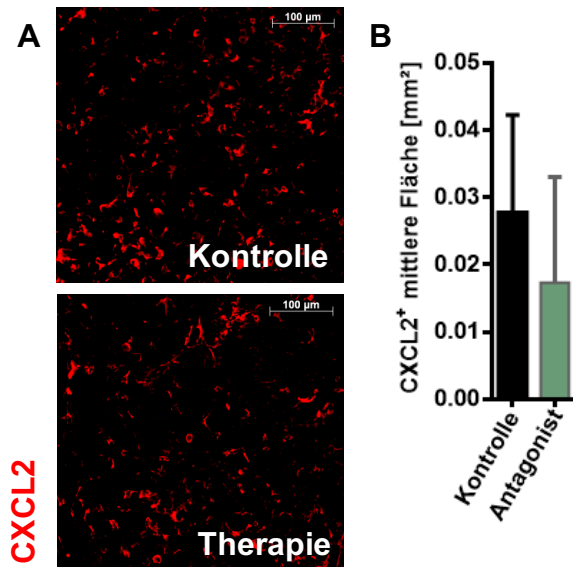
**Abbildung 4-13: Unveränderte Perizyten-Aktivität nach CXCR2-Blockade.** (A) Perizyten liegen an Gefäßen an, um mit ihnen zu interagieren. Die (B) Anzahl der Gefäße mit Perizyten sowie die (C) prozentuale Interaktion von Gefäßen und Perizyten waren in Kontroll- und Therapiegruppen jeweils vergleichbar. Desmin/Perizyten = grün. CD31/Gefäße = rot. DAPI/Zellkerne = blau (n=6-7 pro Gruppe).



## 4.2.3 Charakterisierung assoziierter Marker des CXCR2/CXCL2 Signalweges

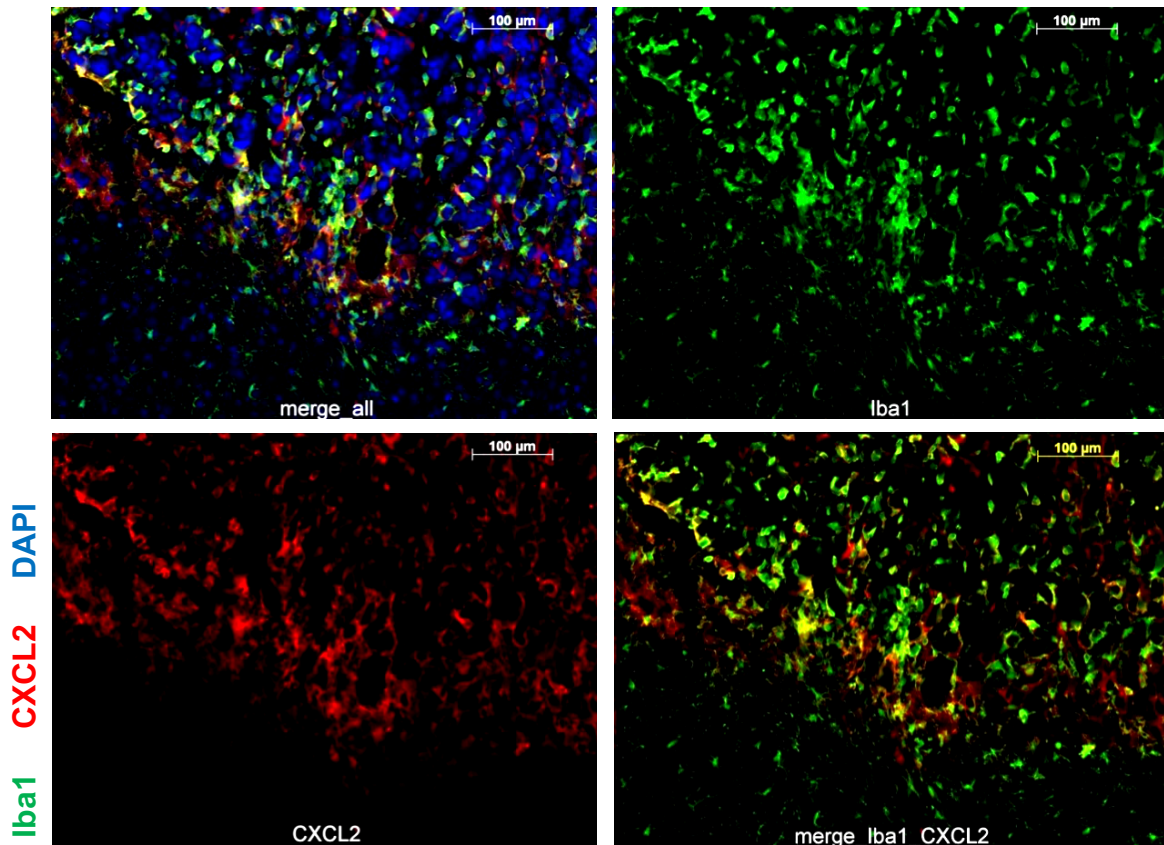
### 4.2.3.1 Expressionsmuster von CXCL2

Die CXCL2 Färbung der mit Antagonist SB225002 blockierten Therapiegruppe zeigte eine vergleichbare mittlere Fläche/mm<sup>2</sup> mit der der Kontrollgruppe (**Abb. 4-14**). Es konnte demnach keine Veränderung der CXCL2 Expression in den immunhistochemischen Analysen der Gewebeprobe nach *in vivo* Therapie mit SB225002 gezeigt werden.

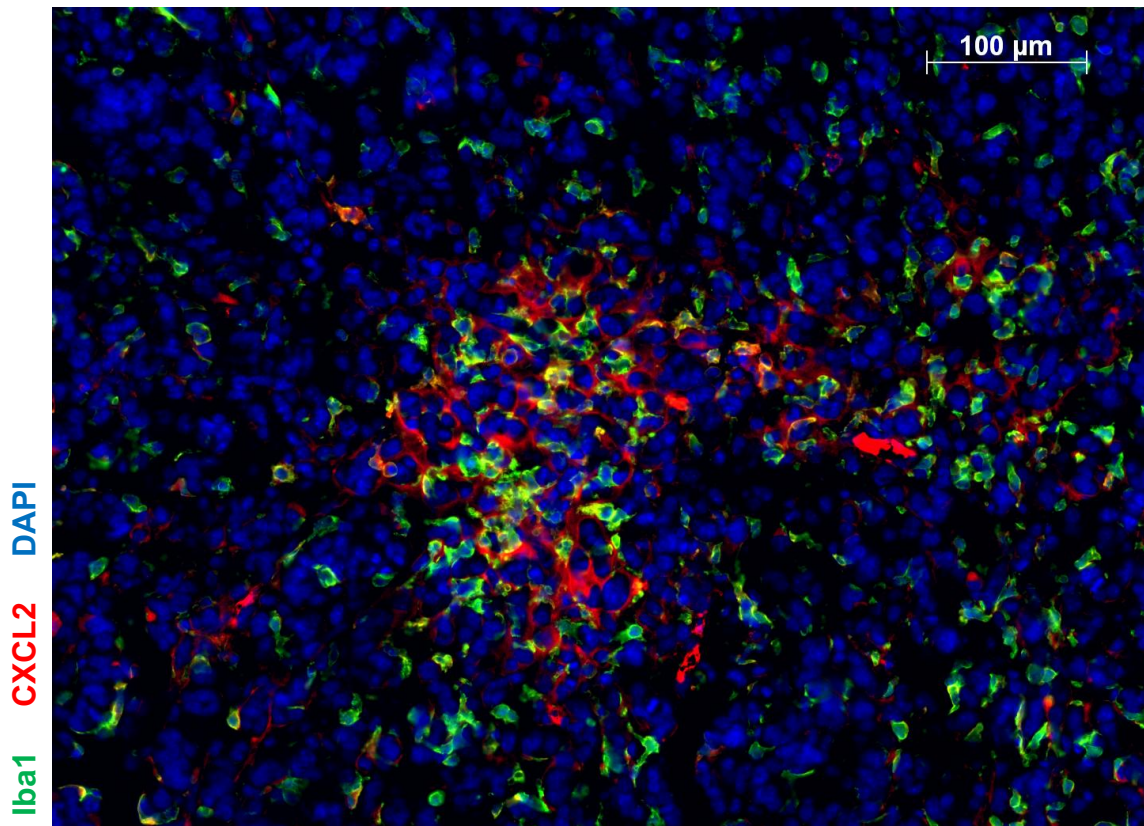


**Abbildung 4-14: CXCL2 Färbung nach CXCR2 Blockade etablierter Glioblastome.** (A) Vergleichbare Darstellung von CXCL2 in der Färbung auf Kontroll- und Therapiegewebe. (B) Auch die Quantifizierung der angefärbten Fläche ergab keine signifikanten Unterschiede in beiden Gruppen. CXCL2 = rot (n=6 pro Gruppe).

Einen Schwerpunkt in der Färbung molekularer Marker setzten wir auf die Untersuchung von CXCL2 als Ligand des blockierten Rezeptors CXCR2. CXCL2 ließ sich im Tumorgewebe im Vergleich zum gesunden Gewebe in der kontralateralen Hemisphäre gut darstellen. Außerhalb der Tumorgrenze war kaum CXCL2 zu finden, im peritumoralen Saum, rund 100µm um den Tumor, exprimierten es noch einige wenige Zellen (**Abb. 4-15**). Innerhalb des Tumors fiel auf, dass CXCL2 im Randbereich stärker exprimiert wurde. In jedem der untersuchten Tumoren war eine starke Ansammlung von CXCL2 im Zentrum des Tumors zu finden (**Abb. 4-16**). Dies korrelierte nicht zwingend mit einer hohen allgemeinen Zelldichte aber häufig mit einer erhöhten Dichte von Mikroglia.



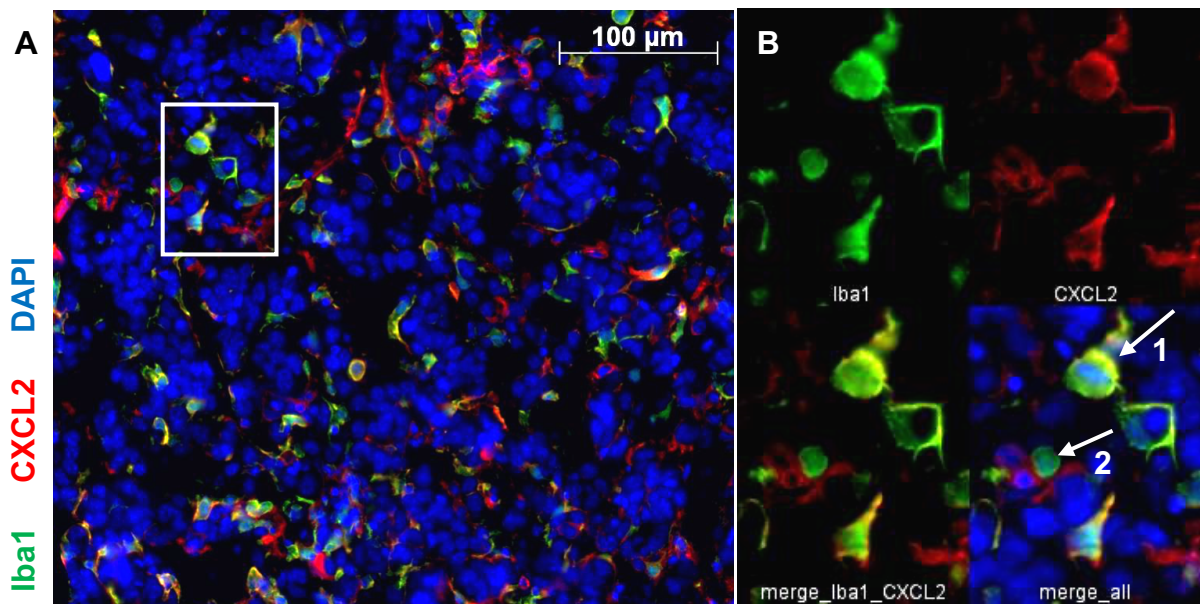
**Abbildung 4-15: Übersichtsaufnahme des Übergangs von Tumor- zu Normalgewebe** in einer 20fachen Vergrößerung. Das neoplastische Gewebe war deutlich abgrenzbar durch die erhöhte Zelldichte, erkennbar an der Anzahl der mit DAPI angefärbten Zellkerne. Sowohl die Anzahl der Mikrogliazellen als auch die Menge von CXCL2 waren im Randbereich des Tumors im Vergleich zum restlichen Tumorgewebe erhöht. Iba1/Mikroglia = grün. CXCL2 = rot. DAPI/Zellkerne = blau.



**Abbildung 4-16: Repräsentative CXCL2-Färbung des Tumorzentrums** in einer 20fachen Vergrößerung. Eine Anhäufung von CXCL2 und Mikroglia ist erkennbar, die in dieser Form im umgebenden Tumorgewebe nicht auszumachen war. Iba1/Mikroglia = grün. CXCL2 = rot. DAPI/Zellkerne = blau.

Viele Mikrogliazellen exprimieren CXCL2, erkennbar an der auffallend hohen Überschneidung der beiden Färbungen. Allerdings produzieren auch die Tumorzellen CXCL2 und nicht alle Mikrogliazellen exprimieren CXCL2 (**Abb. 4-17**).



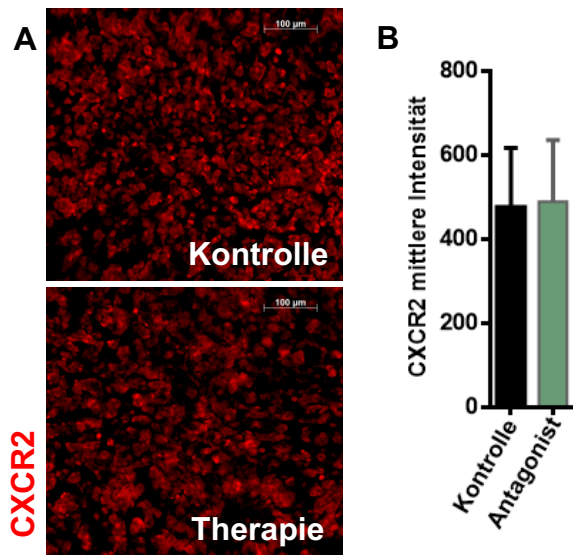


**Abbildung 4-17: Mikroglia exprimieren CXCL2.** (A) Übersichtsaufnahme eines Gewebeschnittes aus der Therapiegruppe mit einer 20fachen Vergrößerung. Die Aufnahme stammt aus dem Tumorrand. (B) Beispielhafte Vergrößerung einiger Mikrogliazellen zur Darstellung der Expression von CXCL2 aus Mikroglia und anderen Tumorzellen. [1] Eine CXCL2 positive und [2] negative Mikrogliazelle. Das die Zellen umgebende CXCL2 wird von anderen Tumorzellen exprimiert, deren Zellkerne innerhalb der CXCL2-Wolken zu erkennen sind. Iba1/Mikroglia = grün. CXCL2 = rot. DAPI/Zellkerne = blau.

#### 4.2.3.2 Expressionsmuster von CXCR2

Der Antagonist SB225002 beeinflusst durch Blockade des Rezeptors CXCR2 die Signalachse über CXCL2/CXCR2. Da wir keinen Unterschied in der Färbung des Liganden sahen, untersuchten wir den Rezeptor im Gewebe der Kontroll- und Therapietiere. Die Färbung des Rezeptors CXCR2 auf den Proben aus den *in vivo* Experimenten ergab vergleichbare Intensitäten der CXCR2 Expression in Kontroll- und Therapiegruppe (**Abb. 4-18**).

Diese Daten bestätigen die oben dargestellten Färbungen in der ersten Versuchsrunde mit synchronem Tumorwachstums- und Therapiestart. In beiden Experimenten gab es keinen Unterschied in der Expression von CXCR2 auf den Gewebeschnitten.

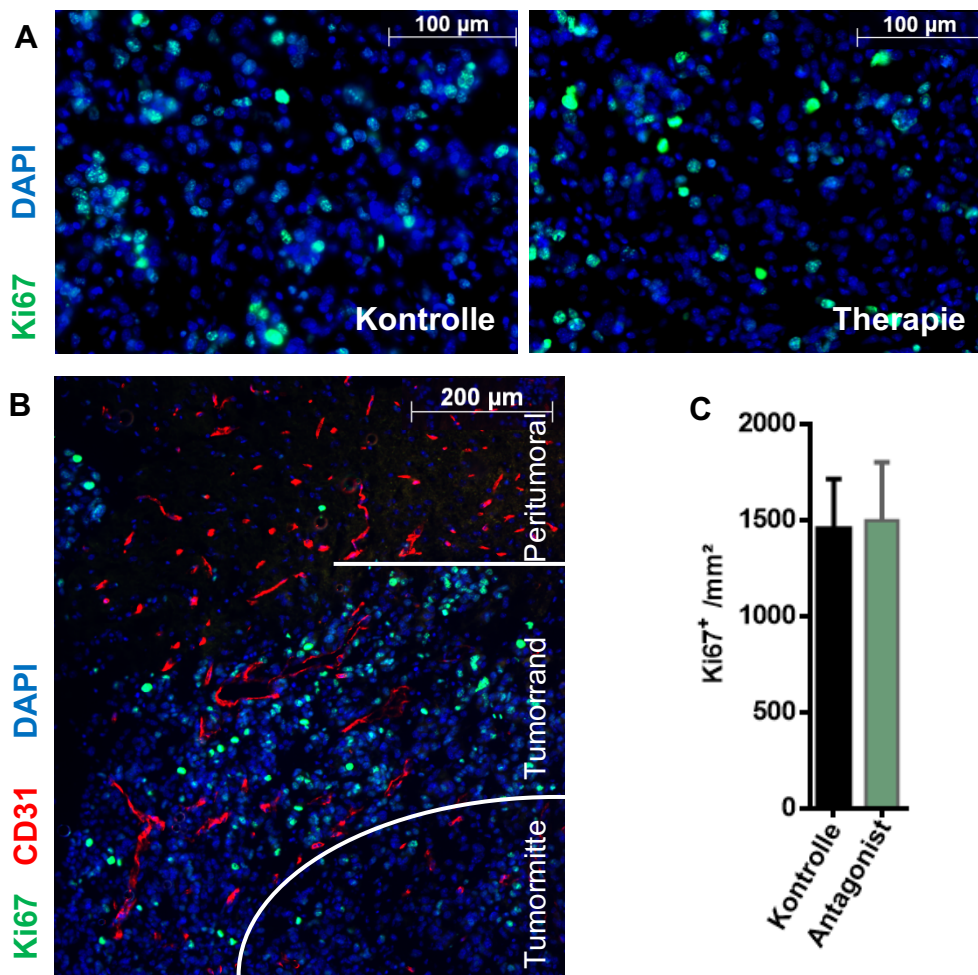


**Abbildung 4-18: CXCR2 Färbung nach CXCR2 Blockade etablierter Glioblastome.** (A) Vergleichbare Darstellung von CXCR2 in der Färbung auf Kontroll- und Therapiegewebe. (B) Die Messung der mittleren Intensität ergab keine signifikanten Unterschiede in beiden Gruppen. CXCR2 = rot (n=6 pro Gruppe).

## 4.2.4 Vergleich der proliferativen und apoptotischen Aktivität

### 4.2.4.1 Vermehrte Proliferation im Randbereich der Tumore

Neben den bereits festgestellten Einflüssen auf die Vaskularisierung wirken auch antiproliferative Effekte des Antagonisten auf das verlangsamte Tumorstadium *in vivo*. Um den Einfluss dieser Effekte zu testen, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit dem Proliferationsmarker Ki67 durchgeführt. Besonderes Augenmerk legten wir auf die Randbereiche der Tumore, da wir dort bereits eine erhöhte Expression von CXCL2 feststellen konnten. In den Randbereichen war in beiden Gruppen eine erhöhte proliferative Aktivität der Zellen zu sehen (**Abb. 4-19**). Insgesamt gab es keine Veränderung der Proliferation im Vergleich von Kontroll- und Therapiegruppe.

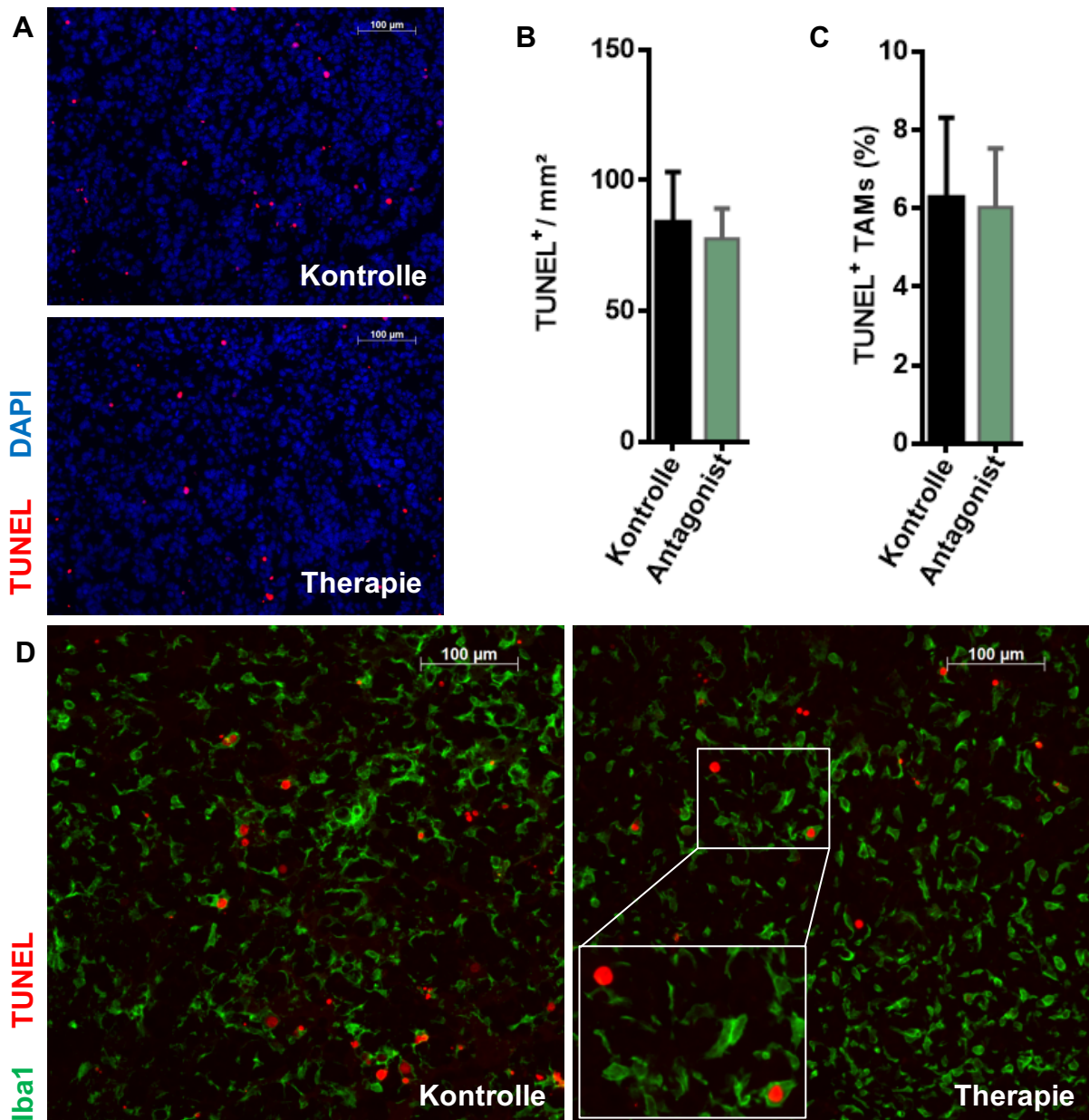


**Abbildung 4-19: Proliferation nach CXCR2 Blockade etablierter Glioblastome.**

(A) Vergleichbare Dichte Ki67-positiver Zellen. (B) Übersichtsaufnahme aus der Therapiegruppe mit einer 10fachen Vergrößerung. Die höchste Dichte der Ki67 Färbung war im Tumorrand zu erkennen. (C) Die Anzahl der Ki67-positiven Zellen war in Kontroll- und Therapietieren ähnlich hoch. Ki67/Proliferation = grün. CD31/Gefäße = rot. DAPI/Zellkerne = blau (n=4 pro Gruppe).

#### 4.2.4.2 Unveränderte Apoptose trotz Wachstumsreduktion *in vivo*

Nachdem die Proliferationsfärbung keinen Unterschied zeigte, untersuchten wir die Apoptose des Tumorgewebes nach CXCR2-Blockade durch TUNEL-Färbung der Gewebeproben. Im Vergleich zeigte sich die Apoptoseaktivität sowohl insgesamt als auch im Zusammenhang mit den Mikrogliazellen unverändert (**Abb. 4-20**).

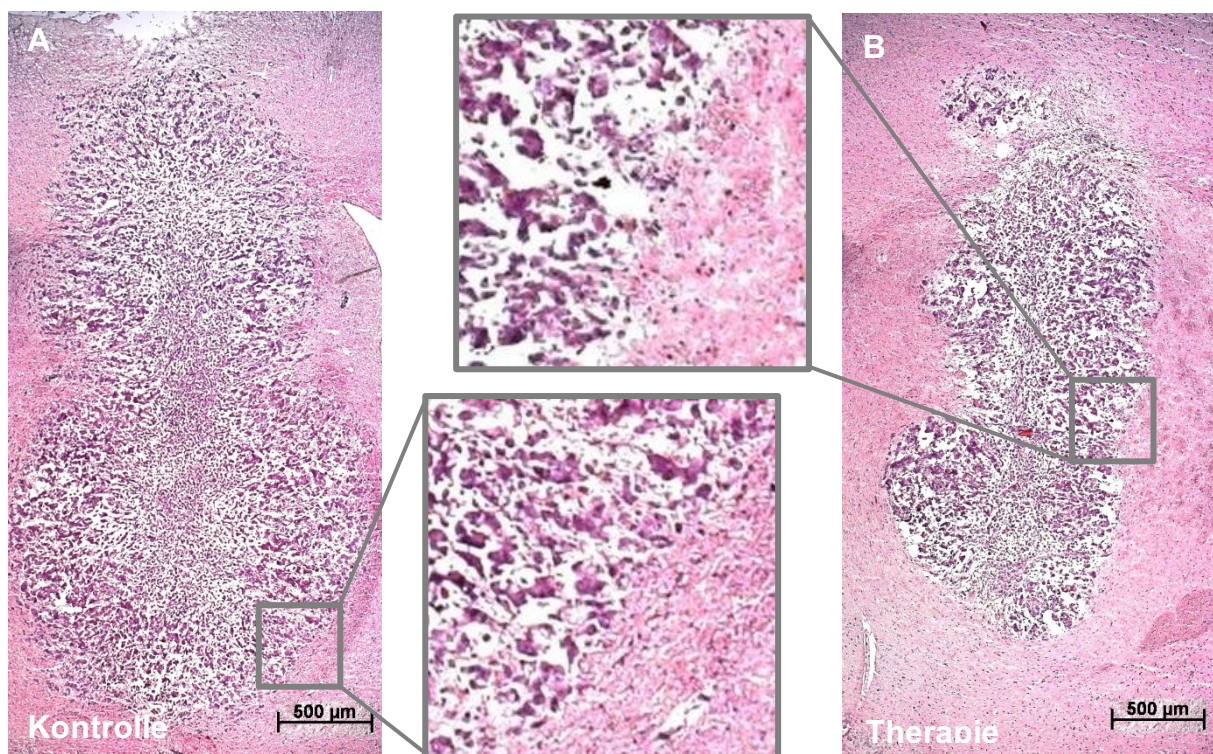


**Abbildung 4-20: Apoptose nach CXCR2 Blockade etablierter Glioblastome.** (A) Apoptose in Kontroll- und Therapietieren mit (B) vergleichbarer Anzahl TUNEL-positiver Zellen nach CXCR2 Blockade. (C) Auch der prozentuale Anteil der Mikroglia mit Apoptosesignal ist nicht verändert, erkennbar in (D) Übersichtsaufnahmen von Gewebeschnitten beider Gruppen. Iba1/Mikroglia = grün. TUNEL/Apoptose = rot. DAPI/Zellkerne = blau (n=4 pro Gruppe).



### 4.3 Vergleichbares Wachstumsverhalten nach CXCR2-Blockade

Einfache HE-Färbungen eignen sich, einen Überblick über die Struktur eines Gewebes zu erhalten und um beispielsweise Tumorränder und dadurch das Wachstumsverhalten zu vergleichen. Allgemein erkennt man in **Abb. 4-21** die typische Morphologie eines Glioblastoms mit stark erhöhter Zelldichte, pleomorphen Zellkernen und zum Teil flächenhaften Tumornekrosen. Der infiltrative Charakter des Tumors wurde in allen Gewebeproben auf mehreren Schnitten betrachtet und war durch die Antagonist-Therapie nicht verändert.

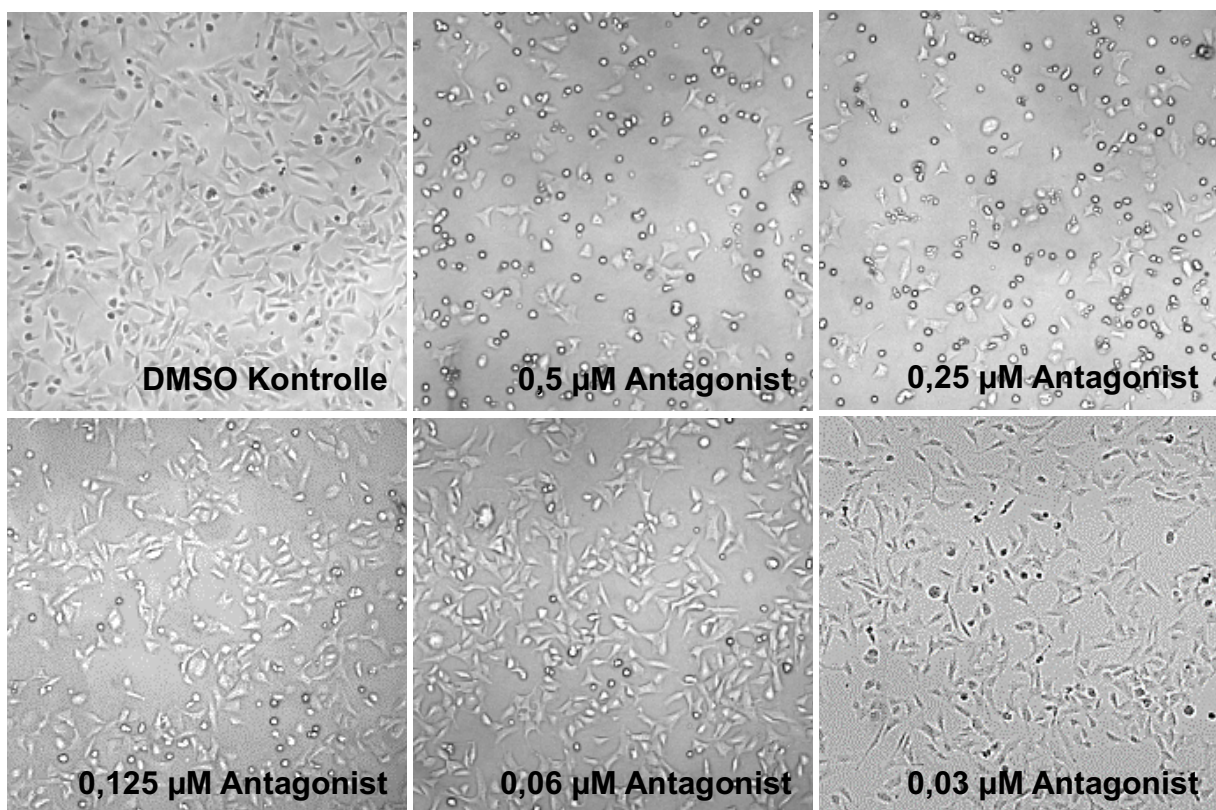


**Abbildung 4-21: Vergleichbar infiltratives Wachstumsverhalten der Glioblastome nach CXCR2-Blockade.** HE-Färbungen des gesamten Tumorareals in repräsentativen (A) Kontroll- und (B) Therapietieren. Die Ausschnitte zeigen ein vergleichbares Bild der tumorösen Gewebsveränderungen, auch das Wachstumsverhalten ist in der näheren Betrachtung der Tumorränder ähnlich infiltrativ.

## 4.4 Reduktion der Proliferation nach Antagonist-Therapie *in vitro*

### 4.4.1 Morphologische Zellveränderungen durch Antagonist-Stimulation

Zur Evaluation des Effekts von SB225002 auf die Tumor- und Endothelzellen *in vitro* wurde den Zellen in verschiedenen Konzentrationen Antagonist in DMSO zugesetzt und anschließend MTT Assays durchgeführt. Nach 18 Stunden Inkubationszeit des Antagonisten auf den Zellen zeigte sich im Lichtmikroskop eine dosisabhängige Verringerung der Zellzahl sowie morphologische Veränderungen der Zellen in Form einer Abrundung. **Abb. 4-22** zeigt eine repräsentative Darstellung der konzentrationsabhängigen Veränderung der GL261 Zellen im Lichtmikroskop.

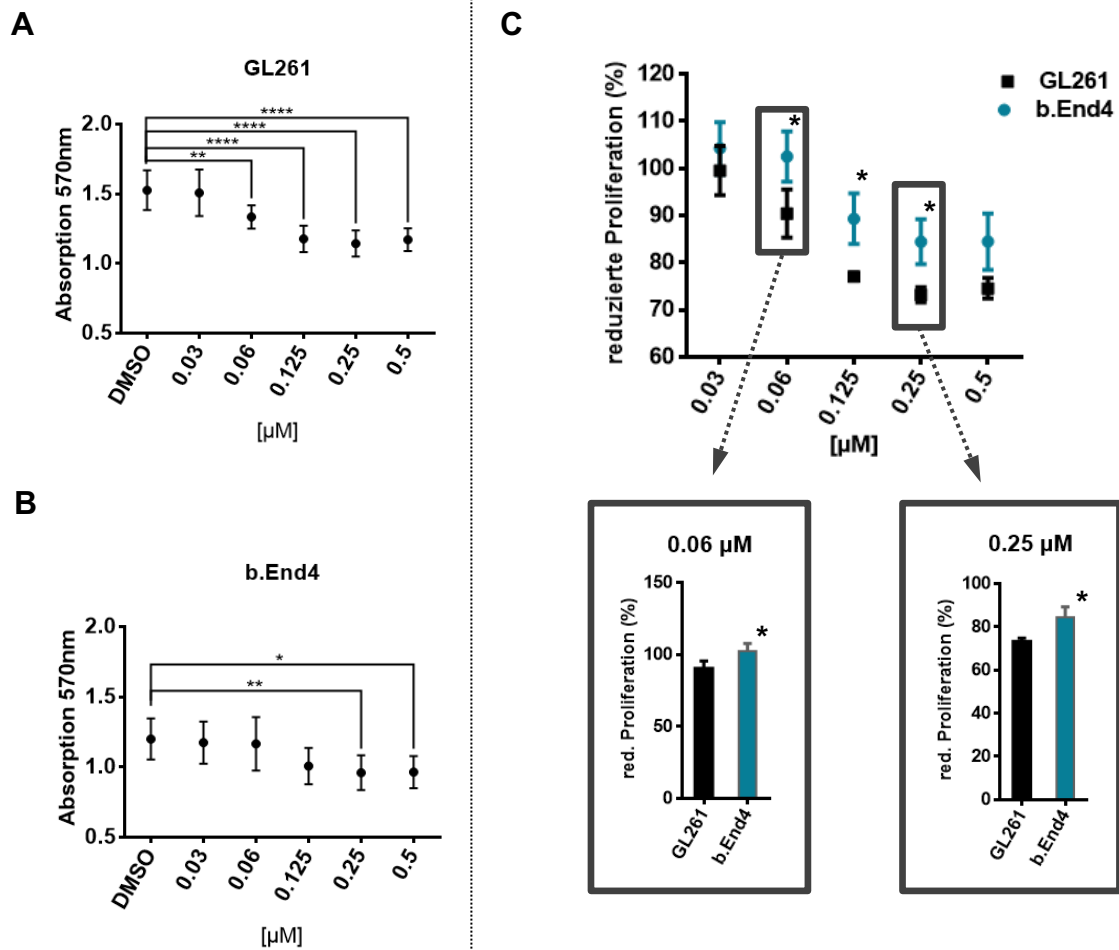


**Abbildung 4-22: Morphologische Zellveränderungen durch Antagonist-Stimulation.** GL261 Zellen *in vitro* nach 18 Stunden Inkubation mit dem Antagonist SB225002 in DMSO sowie DMSO Kontrolle ohne zugesetzten Antagonisten. Man erkennt morphologisch veränderte, abgerundete Zellen, die aber im anschließenden MTT Assay als vitale Zellen markiert wurden. Die Anzahl der veränderten Zellen nahm mit geringeren Mengen des Antagonisten ab.

#### 4.4.2 Verminderte Proliferation der Tumorzellen im Vergleich mit Endothelzellen nach Antagonist-Stimulation

Aus den durchgeführten MTT Assays wurde in **Abb. 4-23** repräsentativ eine Versuchsrunde aus drei identischen Versuchen je Zellreihe dargestellt. Die GL261 Tumorzellen reagierten auf den Antagonisten mit signifikant geringerer Proliferation bei Konzentrationen bis  $0,06\mu\text{M}$ . Zum Vergleich der Wirkung auf gesunde Zellen wurden die Versuche mit Endothelzellen wiederholt. Die bEnd.4 Endothelzellen zeigten nur bis zu einer Konzentration von  $0,125\mu\text{M}$  signifikant weniger Proliferationsaktivität nach CXCR2-Blockade mittels SB225002. Betrachtet man die prozentuale Verminderung der Zellzahl und vergleicht die beiden Zellreihen miteinander, stellt man fest, dass die Tumorzellen bei gleicher Konzentration des Antagonisten signifikant stärker in ihrer Proliferation eingeschränkt werden. Dies gilt bei allen Konzentrationen von  $0,5\mu\text{M}$  bis  $0,06\mu\text{M}$  und ist in **Abb. 4-23C** beispielhaft mit zwei Konzentrationen dargestellt.

Analog zu den Ergebnissen in den *in vivo* Versuchen und den histologischen Aufarbeitungen der Gewebeschnitte sahen wir auch in den MTT Assays einen konzentrationsabhängigen Effekt des Antagonisten, sowohl auf Tumor- als auch Endothelzellen. Anhand der Proliferationsessays wurde der Wirkungsbereich des Antagonisten für die folgenden real-time-PCR Versuche bestimmt.



**Abbildung 4-23: Verminderte Proliferation nach in vitro Stimulation mit SB225002.** Sowohl die (A) GL261 Tumorzellen als auch die (B) b.End.4 Endothelzellen reagierten auf die erhöhten Antagonist Konzentrationen mit reduzierter Proliferationsaktivität. Die Tumorzellen waren im Gegensatz zu den Endothelzellen bis zu einer Dosisreduktion von  $0,06\mu\text{M}$  signifikant reduziert. (C) zeigt die prozentuale Reduktion der Proliferation von Endothel- und Gliomzellen, ausgehend von der jeweiligen Negativkontrolle mit DMSO. Dies verdeutlicht den erhöhten anti-proliferativen Effekt auf die Gliomzellen im Vergleich zu den Endothelzellen (\*= $p<0,05$ . \*\*= $p<0,01$ . \*\*\*\*= $p<0,0001$ ;  $n=3$  pro Gruppe).

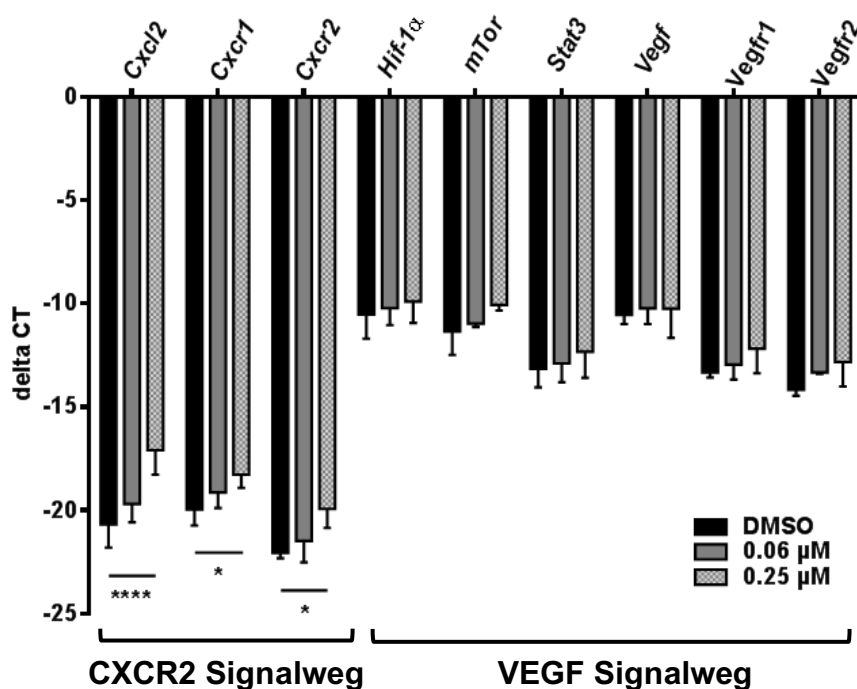


## 4.5 Effekte des Antagonisten auf die Gene des CXCR2/CXCL2 Signalweges

### 4.5.1 Signifikante Hochregulation von *Cxcl2*, *Cxcr1* und in *Cxcr2* Tumorzellen

Mittels real-time PCR untersuchten wir die Wirkung des Antagonisten auf DNA-Ebene. Es wurden Key-Points der CXCR2/CXCL2 und VEGFR1,2/VEGF Signalwege bestimmt, welche jeweils in den Gliomzellen GL261 und den Endothelzellen bEnd.4 nach CXCR2 Blockade durch SB225002 analysiert wurden. **Abbildung 4-24** zeigt die Expression der ausgewählten Gene in den beiden Zellreihen nach Inkubation der Zellen mit DMSO (Kontrolle) bzw. Konzentrationen des Antagonisten von 0,06µM und 0,25µM in DMSO. Die GL261 Zellen reagierten mit einem signifikanten Anstieg der *Cxcl2*, *Cxcr1* und *Cxcr2* Expression auf die höhere Konzentration des Antagonisten.

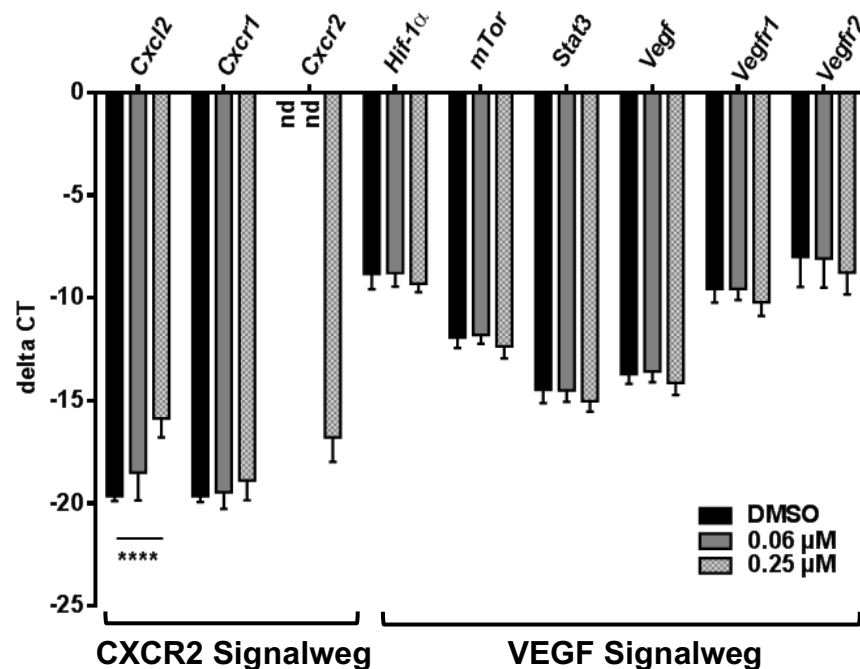
Alle untersuchten Gene zeigten einen tendenziellen Anstieg der Expression, signifikant waren nur die Akteure des CXCR2-Signalweges. Da CXCL2 sowohl an CXCR2 als auch an CXCR1 bindet, der Antagonist aber 150mal selektiver an CXCR2, könnte durch die Blockade die Expression von CXCL2 über den CXCR1-Signalweg hochreguliert worden sein.



**Abbildung 4-24: Expression CXCR2- und VEGF-Signalweg-assoziiierter Gene nach CXCR2 Blockade in Tumorzellen.** Nach Inkubation von GL261 Zellen mit 0,25µM Antagonist nahm die Expression der Gene von *Cxcl2*, *Cxcr1* und *Cxcr2* signifikant zu (\*= $p < 0,05$ . \*\*\*\*= $p < 0,0001$ ;  $n = 3$  pro Gruppe).

#### 4.5.2 Signifikante Hochregulation von Cxcl2 in Endothelzellen

Im Gegensatz zu den Tumorzellen konnten bei den bEnd.4 Endothelzellen der Rezeptoren *Cxcr2* teilweise nicht amplifiziert werden (**Abb. 4-25**). Ohne Stimulation wird der Rezeptor *in vitro* in Endothelzellen so gering exprimiert, dass mit der Methode einer real-time-PCR die Detektion der Gene nicht möglich war. Bei dem Liganden *Cxcl2* zeigte sich eine signifikante Hochregulation der Genexpression der Endothelzellen nach Zugabe der höheren Konzentration des Antagonisten von 0,25µM. Bei den übrigen Genen sah man eine Tendenz der Herunterregulation durch den Antagonisten, die nicht signifikant war. Dieser Eindruck verstärkt sich, wenn man die Ergebnisse in Zusammenschau mit denen der Tumorzellen betrachtet.



**Abbildung 4-25: Expression CXCR2- und VEGF-Signalweg-assoziiierter Gene nach CXCR2 Blockade in Endothelzellen.** In den bEnd.4 Endothelzellen beobachteten wir ebenso wie in den GL261 Tumorzellen eine signifikante Erhöhung der Expression des *Cxcl2* Gens bei einer Konzentration von 0,25µM. Der Rezeptor *Cxcr2* konnte nur nach Stimulation mit der höheren Dosis des Antagonisten amplifiziert werden. Ohne bzw. mit wenig Stimulation durch den Antagonisten konnte keine Amplifikation detektiert werden (nd = nicht detektierbar; \*\*\*\*= $p < 0,0001$ ;  $n = 3$  pro Gruppe).

Die *in vitro* Ergebnisse der MTT Assays und der real-time-PCR geben weitere Hinweise auf die Ursachen des reduzierten Tumorwachstums nach Antagonist-Therapie in den *in vivo* Modellen. Wir konnten zeigen, dass der Antagonist auch in der Zellkultur konzentrationsabhängige Effekte auf die Proliferation der Tumorzellen hatte. Außerdem werden, ebenfalls konzentrationsabhängig, verschiedene Gene des CXCR2-Signalweges reguliert.

## 5 Diskussion

### 5.1 Morphologische und molekulare Veränderungen durch die Antagonist-Therapie

In unserer Studie konnten wir erstmals zeigen, dass ein *small-molecule* Inhibitor des Chemokin-Rezeptors CXCR2 signifikant das Tumorwachstum im murinen Glioblastom-Modell hemmt. In den untersuchten Tumorgeweben analysierten wir die mikroskopischen Veränderungen durch die Rezeptorblockade und konnten eine verminderte Dichte an Gefäßen sowie eine reduzierte Anzahl Mikrogliazellen bzw. Tumor-assoziiertes Makrophagen feststellen. Wir führen diese wachstumsreduzierende Wirkung insgesamt auf eine Beeinträchtigung der Tumorangiogenese durch den Antagonisten zurück.

#### 5.1.1 Tumorwachstumsreduktion durch anti-angiogene Effekte der *in vivo* Therapie

Forschungsergebnisse der letzten Jahre zeigen, dass Chemokine maßgeblich an der Tumorentstehung und insbesondere an der Tumorangiogenese beteiligt sind (76). Die Signalachse über den Chemokin-Rezeptor CXCR2 nimmt eine wichtige Rolle in der Kommunikation von Tumorzellen mit Gefäßen ein (61). Auch im Glioblastoma multiforme, einem Hirntumor mit sehr schlechter Prognose, ist CXCR2 ein potentieller Angriffspunkt für Therapien. Vorexperimente unserer Arbeitsgruppe ergaben eine geringere Tumorgroße nach CXCR2-Antikörper Therapie in der initialen Wachstumsphase (88). In der vorliegenden Arbeit konnten wir erstmals demonstrieren, dass eine lokale Therapie mit dem *small-molecule* CXCR2-Antagonisten SB225002 eine effektive Reduktion des Glioblastomwachstums in einem syngenem Modell immunkompetenter Mäuse bewirkt. In ersten Versuchen einer initialen 14-tägigen Verabreichung des Antagonisten, synchron zum Wachstumsstart des Tumors, sahen wir reduzierte Tumorumfänge im MRT. Die darauffolgenden Experimente zum therapeutischen Einsatz des Antagonisten bei bestehendem Tumor ergaben nach Dosisanpassung ebenfalls signifikant kleinere Tumore. Die Tumorumfangmetrie im MRT zeigte eine bis zu 51%ige Reduktion der Tumorgroße in der Therapiegruppe (111).

Die Aufarbeitung der Gewebeproben mittels Immunfluoreszenzfärbungen ergab eine Beeinträchtigung der Angiogenese, dargestellt durch eine geringere Dichte an Tumorgefäßen um 23% nach CXCR2 Blockade. Die durchschnittliche Gefäßfläche pro mm<sup>2</sup> Tumorgebiet war durch die CXCR2 Blockade wider Erwarten nicht verändert. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass Tumorgewebsschnitte ein zweidimensionales Abbild

einer dreidimensionalen Struktur darstellen und somit die Genauigkeit der Quantifizierung, vor allem die der Gefäßfläche, limitiert ist. Dies gilt im Allgemeinen für alle Strukturen, die auf Gewebsschnitten ausgewertet werden. Die Abweichungen durch Schnittwinkel, Schichtdicke etc. fallen bei größeren und zusammenhängenden Strukturen wie Gefäßen aber stärker ins Gewicht als bei kleineren Strukturen wie Zellen. Durch sehr genaue Ausmessung und eine große Anzahl an ausgewerteten Schnitten wurde versucht, diesen Fehler zu minimieren und eine möglichst akkurate Abbildung der Gefäße zu gewährleisten.

Die therapierten Tiere zeigten nach siebentägiger Behandlung mit dem Antagonisten eine signifikant verminderte Anzahl an Gefäßen in den analysierten Gewebeproben. Somit konnten wir, wie in der Literatur auch für andere Tumorentitäten beschrieben (61, 78, 85), zeigen, dass der CXCR2-Signalweg in der Tumorangio-genese des Glioblastoms eine zentrale Rolle einnimmt. Die gehemmte Angiogenese nach CXCR2 Blockade führt am ehesten zu einer Unterversorgung des Tumorgewebes und dadurch zu vermindertem Tumorwachstum. Die Therapie mit dem Antagonisten verlangsamte insgesamt das Wachstum der Tumore im Anfangsstadium der Tumorbildung sowie in der exponentiellen Wachstumsphase (111).

Als nächstes stellten wir die Frage, über welche Mechanismen die CXCR2 Signalwegblockade die Angiogenese beeinflusst und welche Akteure im Gewebe eine Rolle spielen. Die Beeinträchtigung der Angiogenese könnte durch einen direkten Effekt des Antagonisten auf die Endothelzellen oder durch die veränderte Kommunikation von Zellen über Chemokine erklärt werden. Die Aspekte dieser Theorien werden in den folgenden Kapiteln der Diskussion näher beleuchtet. Bei den Experimenten legten wir den Schwerpunkt auf die Untersuchung von Mikroglia bzw. TAMs, da sie eine tragende Rolle in der immunologischen Glioblastom-Biologie einnehmen und ebenfalls an der Chemokin-vermittelten Angiogenese im Tumor beteiligt sind.

### **5.1.2 Einfluss des Antagonisten auf Zellen der perivaskulären Nische**

Von Tumorzellen produzierte Chemokine rekrutieren neutrophile Granulozyten und andere Entzündungszellen, die daraufhin CXCR2-vermittelt zu Tumor-assoziierten Makrophagen/Mikroglia differenzieren (114). Dieser Zelltyp neigt dazu, sich an Gefäße anzulagern, um direkt mit den Endothelzellen zu interagieren (88). Die TAMs sind

maßgeblich am Erhalt und Wachstum des Tumors, vor allem im Rahmen der zellulären peritumoralen Mikroumgebung, beteiligt.

Mikrogliazellen sind im physiologischen Hirngewebe netzartig und gleichmäßig verteilt (115). Die Form der Zellen ändert sich je nach Aktivitätszustand der Mikroglia. Sie besitzen, wie fast alle Gliazellen, zahlreiche Ausläufer, welche sie im ruhenden Zustand weit in das Gewebe ausstrecken. Im aktivierten Zustand ziehen die Mikroglia ihre Ausläufer zur Phagozytose zurück, runden sich ab und die Zellkörper vergrößern ihr Volumen (116). Die Funktionen der Mikroglia sind vielfältig, bei einer Schädigung des Nervensystems gehen sie in ihren aktivierten Zustand über, können durch Chemokine mit den umliegenden Zellen kommunizieren, zytotoxische Signale aussenden und Antigene präsentieren (117). Die Wächterfunktion über das zentrale Nervensystem ist ein Grund dafür, dass Mikrogliazellen bei vielen entzündlichen, malignen und degenerativen Erkrankungen (u.a. Multiple Sklerose, Alzheimer- oder Parkinson-Krankheit) vermehrt vorhanden sind und in ihren aktivierten Zustand übergehen (118). Aktivierte Mikroglia in GL261 Hirntumorgewebe präsentieren sich in der Intravitalmikroskopie runder, hypertropher und motiler als Mikroglia in physiologischem Hirngewebe (119).

In den Färbungen unserer Gewebeproben konnten wir die Akkumulation sowie die Aktivierung durch Abrundung der Mikrogliazellen im Tumor ebenfalls beobachten. Die mikroskopische Grenze des Tumorgewebes war, neben der erhöhten Zelldichte, deutlich durch die veränderte Morphologie der Mikrogliazellen erkennbar. Die Zellen waren im Vergleich zum gesunden Hirngewebe nicht nur quantitativ erhöht, sondern zeigten im aktivierten Zustand auch einen vergrößerten Zellkörper, eine abgerundete Form und das Fehlen von Ausläufern (111).

In den Immunfluoreszenzfärbungen demonstrierten wir im Vergleich zur Kontrollgruppe eine reduzierte Akkumulation von TAMs in den therapierten Tieren. Diese Beobachtung könnte ein Effekt der veränderten Kommunikation der Zellen durch die Signalwegblockade sein. Brandenburg et al. wiesen in isolierten Mikrogliazellen eine erhöhte Expression von CXCL2, aber keine Expression von CXCR2 nach (88). Flynn et al. wiesen in ihrer Arbeit auf eine geringe Expression von CXCR2 durch Mikrogliazellen hin (120). Obwohl Mikrogliazellen CXCR2 scheinbar nur wenig oder sporadisch exprimieren, werden sie von der Blockade des Rezeptors beeinträchtigt. Auch fehlendes Feedback des Rezeptorsignalweges und dadurch unterbrochene

Rückkopplungsschleifen könnten die Effekte auf die Mikrogliazellen erklären. Der Signalweg über CXCR2 könnte somit sowohl direkte als auch indirekte Effekte auf die Akkumulation von TAMs im Glioblastom haben (94, 121).

In den Färbungen der Therapiegruppe stellten wir neben der reduzierten Anzahl an Mikrogliazellen eine erhöhte Interaktion der Zellen mit Tumorgefäßen fest (111). Die Blockade des Rezeptors CXCR2 durch den Antagonisten und die dadurch veränderte Chemokinantwort im Bereich der Endothelzellen könnte eine vermehrte Rekrutierung von Mikrogliazellen an die Gefäßwände bewirkt haben.

Neben den Mikrogliazellen sind auch Perizyten Teil der perivaskulären Nische. Diese exprimieren ebenfalls CXCL2, wenn auch in geringerem Ausmaß als die Mikroglia (122). Auch Perizyten interagieren direkt mit Gefäßen. In einer ausführlichen Literaturrecherche konnte nicht evaluiert werden, ob Perizyten CXCR2 exprimieren. Bodnar et al. zum Beispiel widmen sich schwerpunktmäßig den Perizyten und zählen in ihrer Veröffentlichung Zellen auf, die CXCR2 exprimieren (123). Perizyten werden hier nicht genannt. Wir gehen davon aus, dass Perizyten ebenso wie Mikroglia nur den Liganden exprimieren, nicht aber den Rezeptor. Es stellt sich die Frage, warum sich die Anzahl der Mikrogliazellen verändert, aber nicht die der Perizyten. Perizyten scheinen durch ihre geringen CXCL2-Expressionslevel bei der pro-migratorischen Aktivität eine deutlich kleinere Rolle als Mikrogliazellen zu spielen (122). In unseren Experimenten zeigten die Perizyten keine Veränderungen in Anzahl oder Interaktion mit den Gefäßen (111). Dies spricht dafür, dass sie keinen oder nur einen geringen Anteil an den therapieinduzierten Veränderungen des Wachstumsverhaltens haben.

### **5.1.3 Expressionsmuster der Chemokine und Rezeptoren**

In der Färbung der Gewebeproben konnten wir keine Veränderung der CXCL2 Expression nach CXCR2 Blockade feststellen (111). In der Literatur gibt es keine einheitlichen Erkenntnisse zur Veränderung der CXCL2 Expression nach *in vivo* Applikation von CXCR2 Antagonisten. Eine reduzierte CXCL2 Expression im Nierenzellkarzinommodell und im Schlaganfallmodell *in vivo* nach SB225002 Therapie wurde ebenso berichtet wie eine erhöhte CXCL2 Expression *in vitro* nach der Behandlung von Brustkrebszellen (99, 103, 124). Ahn et al. zeigten, dass die CXCL8 Sekretion von Tumorzellen durch nekrotische Tumorareale induziert wird und es zu einer verstärkten Expression von CXCL8 in perinekrotischen Arealen kommt (125). In unseren Färbungen

beobachteten wir eine zentrale Verstärkung der CXCL2 Expression, was für ein fortgeschrittenes Tumorstadium mit zentralen Nekrosen in den Tumoren spricht und zusätzlich die Validität der Färbung bestärkt. Nekrotische Areale gelten als charakteristisches histologisches Merkmal der Morphologie von Glioblastomen. Vermehrte Nekrosen in Tumoren sind ein negativ prognostischer Faktor für die Überlebenswahrscheinlichkeit, da sie die Migration und Invasion von Glioblastomzellen fördern (126). Eine Erklärung für das Verteilungsmuster von CXCL2 könnte außerdem eine erhöhte Wachstumsaktivität an den Rändern des Tumors sein. Auch könnten Areale mit vielen Mikrogliazellen ein erhöhtes Aktivitätspotential des Tumors mit vermehrter Expression angiogen wirkender Faktoren darstellen.

Anders als im Schlaganfallmodell sowie in den *in vivo* Experimenten bei Angara et al. veränderte sich in den Experimenten der vorliegenden Arbeit die Expression des Rezeptors CXCR2 in den Immunfluoreszenzfärbungen der Tumorgewebe nicht (69, 103, 111). Catusse et al. analysierten den Wirkmechanismus von SB225002 *in vitro* an humanen CXCR2 Rezeptoren (91). Sie stellten fest, dass SB225002 an Epitope aus verschiedenen Aminosäuren bindet. Diese Epitope sind über die Rezeptorstruktur verteilt und die Angriffspunkte des Antagonisten entsprechen nicht den Bindungsstellen der Liganden CXCL1 oder CXCL8. Die Bindungsstellen der Liganden liegen räumlich gesehen sehr viel weiter auseinander als die des Antagonisten. Die wahrscheinlichste Erklärung hierfür scheint eine Konformationsänderung des Rezeptors nach SB225002 Aktivierung zu sein, welche die Bindung der Liganden verhindert (91).

Die Konformationsänderung, die CXCR2 durchläuft, könnte der Grund für die schlechte Darstellbarkeit von Veränderungen des Rezeptors im Gewebe nach *in vivo* Antagonist-Therapie sein. Die antikörperbasierte Färbung von Molekülen auf Gefrierschnitten spiegelt zwar wider, ob eine Struktur eine höhere oder niedrigere Expression aufweist. Es lässt sich aber keine Aussage über den Aktivitätszustand treffen. CXCR2 könnte also in den therapierten Tumoren ähnlich intensiv gefärbt worden sein, ohne im lebenden Tier aktiv gewesen zu sein. Die Bindung des für die Färbung verwendeten Antikörpers scheint durch die strukturelle Veränderung des Rezeptors nicht beeinflusst zu werden.

Inwiefern CXCL2 bzw. CXCL8 Rückkopplungsschleifen mit CXCR2 bilden ist bisher nicht vollständig geklärt. Einerseits geht man davon aus, dass Tumorzellen sich über CXCL8 autokrin selbst stimulieren, da nach CXCR2 Blockade *in vitro* eine erhöhte CXCL8 Ausschüttung aus Tumorzellen beobachtet wurde (127). Andererseits wird CXCR2 nicht



konstitutiv auf Gliomzellen exprimiert, was wiederum gegen die Theorie der autokrinen Stimulation über diese Signalwege spricht (44). Vielmehr wird vermutet, dass es einen Zusammenhang zwischen hoher CXCL8 Expression und der Resistenz gegenüber proapoptotischen Signalwegen gibt. Folglich könnte es hier eine Verbindung zwischen der Expression proapoptotischer Rezeptoren und der CXCL8 Ausschüttung geben (44).

#### **5.1.4 Unveränderte Apoptose und Proliferation sprechen gegen anti-mitotischen Effekt**

Anhand der mikroskopischen Untersuchung der therapierten Glioblastome stellten wir fest, dass der durch den Antagonisten erzeugte Effekt auf die Tumore über die Angiogenese und damit eher Chemokin-vermittelt als anti-mitotisch bzw. proapoptotisch ist. In den Färbungen zu Proliferation und Apoptose sahen wir keine Unterschiede zwischen Kontroll- und Therapiegruppe (111). In anderen Publikationen findet sich u.a. im Mausmodell bei Lungenkrebs und Nierenzellkarzinom eine reduzierte Proliferation nach *in vivo* Therapie mit SB225002 (99, 128). Lungenmetastasen von Brustkrebszellen zeigen zusätzlich erniedrigte Apoptoseaktivität (129). Diese Erkenntnisse aus anderen Krebsmodellen konnten wir *in vivo* im Glioblastom-Modell nicht bestätigen. Grund für die fehlenden Unterschiede in Apoptose und Proliferation könnte eine zu geringe Dosis des CXCR2-Inhibitors in unseren *in vivo* Experimenten sein. Das Volumen der therapeutischen Lösung von Antagonist SB225002 in DMSO und NaCl war durch die Füllmenge der Pumpen limitiert. Die Konzentration in der Lösung wiederum war durch die Löslichkeit des Antagonisten in den Trägersubstanzen begrenzt, so dass die Dosis des Therapeutikums im Tierexperiment nicht weiter gesteigert werden konnte. Auf Grund dieser Vermutung untersuchten wir den Einfluss des Antagonisten auf die Proliferation auch *in vitro* auf Tumor- und Endothelzellen.

Im Gegensatz zu den Färbungen der Gewebeproben reagierten die Glioblastomzellen in den *in vitro* Versuchen anti-proliferativ auf den Antagonisten (111). In den Proliferations-Assays der Tumor- und Endothelzellen sahen wir einen dosisabhängigen Effekt des Antagonisten, vergleichbar zu anderen Publikationen mit Prostata-, Ovarial- und Ösophaguskarzinomzellen sowie Leukämiezellen (100, 130-132). Der dosisabhängige Effekt könnte erklären, warum wir *in vivo* keine Veränderung der Proliferation in den immunhistochemischen Färbungen sehen konnten. Ein weiterer Grund für die fehlenden anti-proliferativen Effekte des Antagonisten *in vivo* könnte sein, dass sich die Therapie

nur in bestimmten Tumorwachstumsphasen sichtbar auf die Zellproliferation auswirkt. Mit unserem Protokoll und der Probenentnahme am siebten Therapietag stellen wir nur einen kleinen Ausschnitt der dynamischen Tumorentwicklung dar, etwaige Effekte in anderen Wachstumsphasen sind nicht erfassbar.

### **5.1.5 *In vitro* Analysen der Signalwegveränderungen durch SB225002**

Zur Vertiefung der Signalweganalysen behandelten wir Gliomzellen sowie Endothelzellen *in vitro* mit verschiedenen Dosen des Antagonisten. Im Gegensatz zu den Analysen der *in vivo* Experimente konnten wir *in vitro* Veränderungen der Expression von Chemokinen und Rezeptoren feststellen. Wir beobachteten eine dosisabhängige, signifikante Erhöhung der Genexpression von CXCL2, CXCR1 und CXCR2 in den Gliomzellen nach Behandlung mit SB225002 (111). CXCL2 zeigte eine ausgeprägte Hochregulation, sowohl in Gliom- als auch in Endothelzellen. Der Anstieg der Genexpression von CXCL2 wurde auch in einer Publikation mit Brustkrebszellen beschrieben (124). Die Reaktion der Zellen auf den Antagonisten bestätigt den Wirkmechanismus über die Chemokinsignalachse und sprechen für einen anti-angiogenen Effekt durch den Antagonisten.

Um festzustellen, ob die Beeinflussung der Angiogenese über Chemokine eine Rückkopplung mit einem anderen pro-angiogenen Signalweg bildet, untersuchten wir zusätzlich zu CXCL2 und den Rezeptoren des CXCR2 Signalweges die Expression von Molekülen des VEGF-Signalweges. Alle getesteten Moleküle dieser Signalachse zeigten in den Gliomzellen einen tendenziellen Anstieg, der aber nicht signifikant war. Dies könnten Anzeichen für die Verknüpfung beider Signalwege sein. Die erhöhte Permeabilität von Endothelzellen und Angiogenese wird im VEGF-Signalweg vorwiegend über den Rezeptor VEGFR2 vermittelt (133). Petreaca et al. konnten zeigen, dass CXCL8 über CXCR1 und CXCR2 auch VEGFR2 mitstimuliert bzw. transaktiviert (134). Die Rezeptoren CXCR1/2 bildeten nach Stimulation durch CXCL8 in *in vitro* Experimenten Komplexe mit VEGFR2 und sorgten so für eine von VEGF unabhängige Aktivierung des VEGFR2 Signalweges (134). Die Inhibition des CXCR2 Signalweges durch den CXCR1/2 Antagonisten Reparixin *in vitro* blockierte auch die Signalweiterleitung und Aktivierung des VEGFR2 Signalweges (134). Von allen Molekülen des VEGF/VEGFR Signalweges zeigte die Genexpression von VEGFR2 in unseren *in vitro* Experimenten die größte Veränderung nach Behandlung der Tumor- und Endothelzellen mit dem CXCR2 Antagonisten. Dies könnte dafür sprechen, dass auch der von uns genutzte

Antagonist SB225002 durch die CXCR2 Blockade Einfluss auf den Signalweg des VEGFR2 nimmt. Des Weiteren zeigten Yu et al. eine Blockade der VEGF Expression und Sekretion in humanen Brustkrebszellen nach SB225002 Therapie *in vitro*, welche wir jedoch in unseren Experimenten zur Genexpression in Gliomzellen nicht feststellen konnten (135). Auch in den Endothelzellen sahen wir *in vitro* einen Effekt auf die Moleküle des VEGF/VEGFR Signalweges in Form eines tendenziellen Abfalls der Expression aller Gene, diese Beobachtung war ebenfalls nicht signifikant. Die Erkenntnisse der Verknüpfung von CXCL8 und VEGF bzw. CXCR1/2 und VEGFR2 geben Hinweise auf die mögliche Wirkweise von Kombinationstherapien, die an beiden Signalwegen angreifen.

## **5.2 Gestaltung des Versuchsaufbaus**

### **5.2.1 Auswahl des Tumormodells**

Generell gibt es verschiedene Mausmodelle, die je nach Arbeitshypothese und den zu untersuchenden Strukturen mehr oder weniger für die experimentelle Forschung geeignet sind (136). Das Chemokin-Netzwerk ist ein wichtiger Teil des Immunsystems, weshalb sich immunkompetente Mausmodelle für die Untersuchung der Interaktion von Glioblastom, Immunantwort sowie zu untersuchender therapeutischer Substanz anbieten (137). Ein Glioblastom-Modell sollte außerdem die Invasion und Angiogenese eines menschlichen Glioms widerspiegeln und reproduzierbare und vorhersagbare Wachstumseigenschaften vorweisen (137). Das Modell mit in C57BL6 Mäuse implantierten GL261-Tumorzellen bringt viele dieser Eigenschaften mit. Es wurde in den 1970er Jahren etabliert und hat seit Mitte der 1990er Jahre stabile Zelllinien (137). Durch seine Eigenschaften als syngenes Modell hat es den Nachteil, dass beispielsweise das Chemokin CXCL8 nicht exprimiert wird (138). Der Phänotyp ist, soweit beim Glioblastom möglich, reproduzierbar und zeigt histologisch ähnliche Merkmale zum humanen Glioblastom wie Pleomorphismus und pseudopalisadenartige Nekrosen (137). Das GL261 Mausmodell eignet sich damit besonders gut zur Darstellung von aggressivem und infiltrativem Wachstum. Außerdem metastasiert es nicht und bildet sich nicht spontan zurück. Durch seinen sehr häufigen Einsatz in der präklinischen Forschung gibt es viele Publikationen und einen großen Erfahrungspool zu dem Modell (138).

### **5.2.2 Umgehung der Bluthirnschranke durch lokale Therapie**

Zur Verabreichung des Antagonisten wählten wir die lokale Applikation über den Liquor mittels osmotischer Minipumpen. Gründe für die intrathekale Applikation waren zum einen, dass die Operationstechnik in unserem Labor bereits etabliert war und Vorexperimente mit lokaler CXCR2-Antikörper-Therapie bereits positive Ergebnisse erzielt hatte (88). Des Weiteren sollte ein Einfluss der Bluthirnschranke auf die Ergebnisse soweit wie möglich reduziert werden. Zwar ist die Bluthirnschranke nach aktuellem Forschungsstand durchlässig für Moleküle bis zu einer Masse von 500 Dalton. Der Antagonist hat nur eine Masse von 352,14 Dalton und sollte deshalb die Bluthirnschranke überwinden können. Für uns war trotzdem von hoher Priorität, einen möglichst hohen Wirkspiegel am Zielort zu erreichen und den Einfluss der Bluthirnschranke zu umgehen, um die maximale Wirkung des Antagonisten zu erfassen. Die intrathekale Applikation des Antagonisten in einem Tumormodell wurde von uns erstmals etabliert. Bei anderen neurologischen Erkrankungen wie neuropathischen Schmerzen und Hyperalgesie bei Knochenmetastasen konnte die intrathekale Applikation bereits positive Ergebnisse erzielen (108, 139). Die Arbeitsgruppe von Manjavachi et al. stellte zudem eine Wirkung bei Hyperalgesie nach intrathekaler Verabreichung von SB225002, nicht jedoch nach intraperitonealer Gabe fest (139). Als nächster Schritt nach erfolgreichem Abschluss der intrathekalen Therapie wurde in unserer Arbeitsgruppe eine intraperitoneale (i.p.) Applikation des Antagonisten evaluiert. Die Ergebnisse dieser Experimente werden in einer weiteren Dissertation veröffentlicht werden (Jelgersma C., in Arbeit).

### **5.2.3 Aktualität der Studienlage**

Experimente im Zusammenhang mit dieser Arbeit wurden ab 2016 durchgeführt. Das Projekt wurde seit 2012 geplant und Vorarbeiten zur Etablierung der Methodik wurden im neurochirurgischen Forschungslabor der Charité durchgeführt. Das Forschungsfeld der Gliomtherapie ist ein Gebiet, das sich durchgehend im Wandel befindet und weiterentwickelt. Dies hat zur Folge, dass hochaktuelle Forschungsthemen an verschiedenen Standorten weltweit gleichzeitig erforscht werden und die Ergebnisse, wie üblich in der Forschung, erst im Zeitversatz veröffentlicht werden. So ergab es sich auch bei dieser Arbeit, dass im Laufe der Ergebniszusammentragung und -auswertung neue Forschungsergebnisse von anderen Arbeitsgruppen veröffentlicht wurden. Um die eigenen Ergebnisse im richtigen Zusammenhang zu demonstrieren, gehe ich deshalb bis

zu diesem Diskussionsteil nicht auf Ergebnisse von Studien ein, die zeitlich nach der Durchführung der Experimente veröffentlicht wurden und sich den konkreten Fragestellungen dieser Arbeit widmen.

Zu Beginn der Experimente zu dieser Dissertation gab es noch keine Studie, die den Antagonisten SB225002 *in vivo* in einem Glioblastom-Modell etabliert und getestet hat. Angara et al. veröffentlichten im Oktober 2018 die Ergebnisse von Experimenten mit dem Antagonisten *in vivo* an immundefizienten Nacktmäusen mit U251 Glioblastomzellen (69). SB225002 wurde sowohl alleine als auch in Kombination mit Vatalanib, einem VEGFR2-Antikörper, verabreicht (69). Die Applikation des Antagonisten erfolgte intraperitoneal und auch in einem anderen zeitlichen Rahmen als in unserem Versuchsaufbau. Am achten Tag nach Tumorimplantation wurde die Therapie für zwei Wochen an fünf Tagen pro Woche i.p. gespritzt (69). Die Auswertung erfolgte ebenfalls mittels Volumenmessung im MRT und Immunfluoreszenzfärbungen der Gewebeproben. Mit einer Gruppengröße von n=3 konnten Angara et al. sowohl in der Einfach- als auch in der Kombinationstherapie ein signifikant kleineres Tumolvolumen nach Therapie feststellen. Sie stellten histologisch verminderte Expressionen von CXCR2 sowie vaskulärem Laminin nach Therapie fest, welche aber nicht quantifiziert wurden (69).

Im Vergleich zur Angara-Studie nutzten wir ein immunkompetentes Mausmodell, da der Antagonist als Chemokinrezeptorblocker auch mit dem Immunsystem interagiert und ein Einfluss auf diese Wirkachse durch Immundefizienz vermieden werden sollte. Weiterhin starteten wir die Therapie sieben Tage später als Angara et al. und führten die Therapie anschließend nur sieben statt 14 Tage durch. Die Wachstumsgeschwindigkeit unterschiedlicher Zelllinien kann stark variieren und muss im Versuchsaufbau berücksichtigt werden. Die Vermessung sehr kleiner Tumore ist mitunter durch die begrenzte Auflösung der Aufnahmen des Kleintier-MRTs ungenau. Durch das längere Zeitfenster des anfänglichen Tumorwachstums von 14 Tagen nach Implantation der GL261 Zellen und den dadurch größeren Tumorumfängen konnten die Ausgangsgrößen vor Therapiebeginn in unserer Studie sehr genau bestimmt werden. Die nötige Dosisverdopplung in der exponentiellen Wachstumsphase im Vergleich zur Initialtherapie ist vermutlich ebenfalls Resultat des späteren Therapiebeginns in unserem Versuchsprotokoll. Die initial geringe Dosis reichte nach 14 Tagen unbeeinflusstem Tumorwachstum nicht mehr aus, um signifikante Ergebnisse zu erzielen. Angara et. al

konnten durch die intraperitoneale Applikation deutlich höhere Volumina pro Tag und damit auch höhere Dosen verabreichen.

Die Ergebnisse der Angara-Studie bestärken die Ergebnisse der hier präsentierten Arbeit. Es konnte ebenfalls ein Effekt des Antagonisten auf das Tumorwachstum *in vivo* gezeigt werden. Somit gibt es nun positive Ergebnisse zur Therapie mit dem Antagonisten SB225002 mit zwei verschiedenen Tumorzellreihen in unterschiedlichen Mausmodellen aus zwei unabhängigen Laboren. Diese Erkenntnisse untermauern die Wirksamkeit des Antagonisten im Glioblastom.

### **5.3 Limitationen und Herausforderungen anti-angiogener Therapieansätze**

#### **5.3.1 Der Antagonist als Schnittpunkt immunologischer und anti-angiogener Therapien**

Das Glioblastom stellt Forscher immer wieder vor Herausforderungen, da es regelhaft Resistenzen gegen alle therapeutischen Ansätze entwickelt. Die Resistenzentstehung gegenüber anti-angiogenen Therapien ist eng verstrickt mit der Rolle des Immunsystems im Glioblastom. Wie bereits dargestellt nehmen myeloide Zellen eine wichtige Position im Zusammenspiel der pro-angiogen agierenden Zellen ein (114, 117). Anti-angiogene Therapien resultieren in einer erhöhten Einwanderung myeloider Zellen und weiterer Stammzellen. Deshalb wird davon ausgegangen, dass Akteure des Immunsystems eine tragende Rolle in der Resistenzentwicklung anti-angiogener Therapien spielen (140). Ein tieferes Verständnis des Immunsystems im Glioblastom sowie eine Weiterentwicklung immunologischer und anti-angiogener Ansätze könnte die Glioblastom-Forschung vorantreiben. Die Therapie mit dem CXCR2 Antagonisten SB225002 stellt einen interessanten Schnittpunkt zwischen immunologischen und anti-angiogenen Ansätzen dar, da der Rezeptor CXCR2 sowohl Akteur im Immunsystem als auch Teil angiogener Signalachsen ist.

Die Blut-Hirn-Schranke ist eine Besonderheit in der Therapie von ZNS Tumoren und erniedrigt die Wahrscheinlichkeit des Ansprechens von systemisch verabreichten Immuntherapien (141). Einerseits verhindert sie, dass Medikamente zu ihrem Angriffspunkt im Gehirn vordringen. Andererseits hält sie auch Immunzellen aus dem Blut davon ab zu passieren (142). Die Anwesenheit von Immunzellen ist entscheidend für die erfolgreiche Anwendung immunologischer Therapien, da Antikörper, Trägerviren oder

Tumorimpfungen nur mit Immunzellen wirksam sein können (143). Neben der Blut-Hirn-Schranke gibt es auch eine Blut-Hirntumor-Schranke. Durch die defekten Tumorgefäße, die abnormale Gefäßstruktur durch Neovaskularisierung und den irregulären Blutfluss innerhalb des Tumors werden Medikamente davon abgehalten, in den Tumorblutfluss zu gelangen (141). Anti-angiogene Therapien unterstützen die Normalisierung der Gefäßarchitektur des Tumors und können dadurch positiv zur Pharmakokinetik beitragen (144). Die pathologische Durchlässigkeit der Gefäße nimmt ab und das peritumorale Ödem wird reduziert. Wegen dieses Effekts wird der in der Einleitung bereits erwähnte VEGF Antikörper Bevacizumab palliativ zur Symptomkontrolle und zur Senkung des Steroidbedarf genutzt (46). Auch gibt es Hypothesen, dass es durch die Reduzierung von Ödemen und dem damit verbundenen erniedrigten Gewebedruck zu einem erleichterten Transport von Chemotherapeutika in das Tumorareal kommt (29). Die funktionelle und strukturelle Gefäßnormalisierung durch anti-angiogene Therapien führen einerseits, wie bereits beschrieben, zur Hypoxie von Tumorarealen. Zusätzlich generiert die Gefäßstabilisierung durch anti-angiogene Substanzen ein gleichmäßigeres und natürlicheres Sauerstoffversorgungsprofil im geschädigten Gewebe und erzeugt damit unter anderem eine erhöhte Effizienz von Radiotherapie in Gliomen (145).

### **5.3.2 Therapieresistenz durch Vaskuläre Mimikry**

Forscher gehen davon aus, dass Glioblastome unter anderem alternative Signalwege der Angiogenese aktivieren bzw. hochregulieren und somit Resistenzmechanismen gegen die zunächst effektive Therapie entwickeln. Es wird vermutet, dass es bei der Therapie mit Bevacizumab durch die anti-angiogene VEGF-Blockade zu einer Normalisierung der Gefäßstrukturen kommt (146). Der Tumor ist auf seine eigene, chaotische Gefäßstruktur angewiesen, da nur diese die Versorgung des extrem schnell wachsenden Tumorgewebes garantiert. Durch die Rückbildung der Tumorgefäße kommt es zur verminderten Durchblutung und Hypoxie des Tumorgewebes (144). Dadurch werden Faktoren wie der Hypoxie-induzierende Faktor 1 $\alpha$  (Hif-1 $\alpha$ ) in den Zellen hochreguliert (144). Hif-1 $\alpha$  ist mitverantwortlich für die Ausschüttung von Chemokinen und Wachstumsfaktoren und reguliert deren Genexpression (44). Dies führt zur Ausbildung und erhöhten Inanspruchnahme alternativer Signalwege der Angiogenese neben dem VEGF/VEGFR Signalweg (146). Anti-angiogene Therapien entwickeln im GBM, im Vergleich zu anderen Tumorentitäten, besonders häufig Resistenzen (147). Eine Ursache ist unter anderem die Vaskuläre Mimikry (VM), ein entscheidender Prozess für

das rasante Tumorwachstum (147). Das Phänomen der VM wurde erstmals 1999 in Melanomzellen entdeckt und beschreibt die Transdifferenzierung von Tumorzellen, welche über einen stammzellähnlichen Zustand endothelzellartige Phänotypen annehmen (148). In der remodellierten krebsspezifischen Gefäßarchitektur besteht die Auskleidung der Blutgefäße sowohl aus Endothel- als auch aus Tumorzellen (8, 149). Diese bilden keine regulären, homogenen Gefäße sondern vaskuläre Kanäle, die auch von extrazellulärer Matrix, sezerniert durch die Tumorzellen, ummantelt und ausgekleidet sein können (8). Die Tumorzellen bilden bei der VM quantitativ einen viel höheren Anteil an der Gefäßmatrix, vaskuläre Kanäle können sogar ganz ohne Endothelzellen gebildet werden und stellen für den Tumor eine weitere Quelle zur Blutversorgung für schnelles Wachstum und hämatogene Streuung dar (150). Dadurch schafft der Tumor neue Wege der Angiogenese und die Instabilität, Permeabilität und Desorganisation der Tumorgefäßarchitektur wird potenziert (63). Vaskuläre Mimikry ist im normalen Tumorkonstrukt ein seltener Prozess, wird aber durch die Anwendung anti-angiogener Substanzen wie Bevacizumab gefördert und geht mit der Entstehung von Resistenzen einher (147). Bevacizumab greift nur an einem Signalweg der Angiogenese und dort auch nur an einem Liganden, VEGF, an. Man könnte nun davon ausgehen, Inhibitoren, die an mehreren Signalwegen gleichzeitig angreifen, seien effektiver in der Tumorthherapie. In Studien hat sich aber genau das Gegenteil gezeigt. Tyrosinkinaseinhibitoren, welche multiple Angiogenesewege blockieren, waren klinisch weniger wirksam als z.B. Bevacizumab (48).

CXCL8 und CXCR2 beeinflussen im GBM ebenfalls die vaskuläre Mimikry. Anti-angiogen therapierte GBM Tumore zeigen eine erhöhte Zahl CXCR2 positiver Stammzellen mit Endothelzell-ähnlichen Phänotypen, wie bei der VM zu erwarten (69). CXCR2 positive Zellen in dieser Konstellation waren dazu fähig, funktionale VM Strukturen im Tumorgewebe auszubilden, während eine Antagonisierung von CXCR2 mit dem Antagonisten SB225002 im Experiment eine Verminderung der Bildung von VM Strukturen nach anti-angiogener Therapie im Tiermodell ergab (69).



## **5.4 Kombinationsstrategien und klinische Übertragbarkeit von Antagonisten**

### **5.4.1 Auswege aus der Resistenz durch Kombinationstherapien**

Das Zusammenspiel unterschiedlicher therapeutischer Ansätze in der Therapie von Glioblastomen könnte der Schlüssel zu einer erfolgreichen Umgehung von Resistenzentwicklungen gegenüber einzelnen Therapeutika sein. Wie bereits dargestellt zeigen anti-angiogene und immunologische Therapieansätze Erfolge und Rückschläge. Eine Kombination der Ansätze könnte die jeweiligen Nachteile ausgleichen. Jackson et al. beschreiben die rasante Veränderung molekularer Strukturen in Primär- und Rezidiv-Glioblastomen (141). Die Expression von 90% der medikamentösen Angriffspunkte zeigte sich in Rezidivtumoren im Vergleich zur Expression bei initialer Diagnose verändert (151). Glioblastome entwickeln sich demnach extrem schnell und flexibel und präsentieren der Mikroumgebung und dem veränderten Immunsystem viele komplexe Signalwege. Der Eingriff in nur einen Signalweg hat isoliert kaum die Chance, nachhaltig und rezidivfrei diese aggressive Tumorerkrankung zu heilen (23).

Diese Aspekte wurden in therapeutischen Studien beobachtet und kommentiert. Da Monotherapien langfristig keinen Erfolg zu haben scheinen, wird an flexiblen Therapieansätze und Kombinationsstrategien unterschiedlicher Therapeutika geforscht. Einige der erfolgsversprechenden Kombinationen mit dem CXCR2-Antagonisten SB225002 werden im Folgenden dargestellt.

Der Macrophage colony stimulating factor 1 (CSF1) ist ein Zytokin, welches von Tumorzellen exprimiert wird und zur Rekrutierung, Infiltration und Differenzierung von Mikroglia und Makrophagen führt (152). Sowohl CSF1 als auch sein Rezeptor CSFR1 sind in humanen Glioblastomen überexprimiert (152). In einem Melanom- sowie Lungenkarzinommodell zeigte der Antagonist SB225002 erst in Kombination mit einem CSFR1 Inhibitor eine signifikante Tumorzustandsreduktion. Noch ausgeprägter waren die Effekte im Lungenkarzinom nach dreifach-Kombination mit einem zusätzlichen anti-PD1-Inhibitor (153). Zusammenfassend erzielte die Publikation mit der Kombination aus anti-angiogener (SB225002) und doppelter immunologischer (CSFR1-Inhibitor und PD1-Checkpoint-Inhibitor) Therapie die besten Ergebnisse und bestätigt damit die theoretischen Überlegungen zur Verknüpfung der beiden Therapieansätze (153).

Devapatla et al. führten Experimente zum Ovarialkarzinom durch und behandelten Mäuse mit Sorafenib, bis diese Resistenzen gegen die Therapie entwickelten. Sorafenib

ist ein Tyrosinkinaseinhibitor und unterbindet die Signalkaskade des VEGF/VEGFR-Signalweges. Es wirkt somit unter anderem anti-angiogen (96). Nach Resistenzentwicklung erhielten die Mäuse SB225002, Sorafenib oder eine Kombination aus beiden Substanzen. Die Monotherapie mit SB225002 zeigte die geringste Wirkung. Interessanterweise erzielte die Kombinationstherapie im Gegensatz zur Sorafenib Monotherapie eine drastische Wachstumshemmung (96). Dies zeigt, dass auch die Kombination verschiedener anti-angiogener Mechanismen, insbesondere nach Resistenzentwicklung, erfolversprechende Wirkungen erzielen kann.

Ijichi et al. kombinierten im Pankreaskarzinom-Modell das Zytostatikum Gemcitabine mit dem Antagonisten SB225002. Sie beschreiben nur mäßige therapeutische Erfolge (97). Die Ergebnisse der Kombinationstherapie unterschieden sich nicht signifikant von denen der Monotherapien. Stattdessen zeigten die Tiere der Kombinationsgruppe erhöhte Nebenwirkungsraten, sie verloren Gewicht und hatten eine erhöhte Mortalität (97).

Angara et al. führten eine Kombinationstherapie mit zwei *small-molecule* Antagonisten durch (69). Sie kombinierten die SB225002-Therapie im Glioblastom-Mausmodell mit Vatalanib, einem *small-molecule* Inhibitor des VEGF-Rezeptors. Die Kombinationstherapie der beiden Antagonisten ergab eine ausgeprägte Tumorstillstandreduktion im Vergleich zur SB225002 Monotherapie (69).

Das Zytostatikum Temozolomid ist bereits fester Bestandteil der Therapie von Hirntumoren. Studien an Glioblastomzellen ergaben eine Hochregulation von IL-8, CXCR1 und CXCR2 durch Temozolomid *in vitro*. Es zeigte sich außerdem eine erhöhte Wirksamkeit des Therapeutikums in einem IL8-*knockout* Mausmodell (154). Eine Kombinationstherapie von Temozolomid mit dem CXCR2 Inhibitor SB225002 wird aktuell von unserer Arbeitsgruppe etabliert und analysiert.

#### **5.4.2 *small-molecule* Inhibitoren der Chemokinsignalwege in der klinischen Forschung**

Obwohl CXCL8 und CXCR2 seit einem Jahrzehnt im Fokus der GBM Forschung stehen, sind die therapeutischen Ansätze für den Signalweg noch nicht in der klinischen Tumorforschung etabliert. Speziell der von uns genutzte Antagonist SB225002 wird bisher in keiner klinischen Studie getestet. Die CXCR2 Signalkaskade betreffend stehen vor allem die CXCR2 Antagonisten AZD5069 beim Pankreaskarzinom (NCT02583477, Studie abgebrochen), SX-682 beim Melanom und myelodysplastischen Syndrom

(NCT03161431 und NCT04245397, aktuell Rekrutierung) sowie Reparixin bei Brustkrebs im Fokus klinischer Studien (155). Die Studien betreffen bisher vor allem die Verträglichkeit der Therapien, sodass es keine aussagekräftigen Ergebnisse zu CXCR2 Antagonisten in der klinischen Krebsforschung gibt. In der Therapie anderer Erkrankungen wie der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung, Asthma oder koronarer Herzerkrankung werden CXCR2 Antagonisten hingegen bereits in klinischen Studien getestet (76).

Weiter vorangeschritten ist die klinische Tumorforschung mit der Gruppe der CXCR4 Inhibitoren. Ähnlich wie CXCR2 ist CXCR4 in hochgradigen Gliomen überexprimiert, in perinekrotischen Arealen finden sich besonders hohe Konzentrationen des Rezeptors (63). CXCR4 interagiert vor allem mit dem Liganden CXCL12, welcher ELR-negativ ist aber trotzdem pro-angiogene Eigenschaften aufweist (156). Im Tumorverband exprimieren neben Tumorzellen vor allem Endothelzellen und Leukozyten CXCR4, die Signalachse über CXCL12 stimuliert den Rezeptor und induziert unter anderem die Sekretion von VEGF, CXCL1 und CXCL8 (157). Damit erzielt der Rezeptor neben Tumorzellproliferation und -migration auch pro-angiogene Effekte (158). Im Vergleich zu CXCR2 ist die pro-angiogene Aktivität weniger ausgeprägt (70). Studien zeigten, dass im Glioblastomrezidiven der pro-angiogene Signalweg über VEGFR2 unter anderem von der CXCR4/CXCL12-Signalachse abgelöst wird (159).

Im Gegensatz zu CXCR2 werden bereits zahlreiche CXCR4 Antagonisten klinisch getestet, unter anderem bei akuter myeloischer Leukämie, kolorektalem Karzinom, Lungen-, Brust- und Prostatakrebs sowie hämatologischen Erkrankungen (160-163). Bisher gibt es keine durchschlagenden Erfolge. Gliome betreffend gibt es aktuell laufende klinische Studien zu zwei CXCR4 Antagonisten. Der CXCR4 Inhibitor Plerixafor ist europaweit seit 2009 zur Mobilisierung von Stammzellen im Zuge der Stammzelltransplantation bei malignen Erkrankungen zugelassen (164). Zur direkten Therapie von Krebserkrankungen mit Plerixafor gibt es bisher nur erste klinischen Studien zur Verträglichkeit, u.a. bei der akuten myeloischen Leukämie und höher gradigen Gliomen (165, 166). Eine weitere klinische Studie zu Glioblastomrezidiven mit dem CXCR4 Antagonisten USL311 in Kombination mit Lomustine wurde 2020 beendet, es wurden noch keine Ergebnisse veröffentlicht (NCT02765165).

Besonders vielversprechend erweist sich in präklinischen Studien der CXCR4 Antagonist PRX177561, der in *in vivo* Experimenten mit Mäusen bei Glioblastomen eingesetzt wurde (167). Die Kombination mit Bevacizumab, Sunitinib und PRX177561 ergab ein deutlich

reduziertes Tumorwachstum im Vergleich zu den Monotherapien (167). Auch hier erzielte wieder eine Kombination von VEGFR- und Chemokinrezeptorinhibitor positive Ergebnisse.

Zusammenfassend zeigt die Inhibition eines Chemokinrezeptor-Signalweges klinische Erfolge in der Glioblastomtherapie, wobei CXCR2 im Gegensatz zu CXCR4 noch stärker pro-angiogen agiert. Dies spricht für das große Potential, das in der klinischen Erprobung von CXCR2 Antagonisten wie SB225002 besteht und unterstreicht die Dringlichkeit von klinischen Studien mit dem CXCR2-Antagonisten.

## **5.5 Zusammenfassung und Ausblick**

Die Heterogenität und extreme Wandlungsfähigkeit des Glioblastoma multiforme beschäftigt Forscher seit Jahrzehnten und erschwert die Entwicklung suffizienter Therapien. Ein potentielles Therapeutikum sollte auf verschiedenen Ebenen in die Biologie des Tumors einwirken. Der Signalweg über den Chemokinrezeptor CXCR2 verknüpft immunologische und angiogene Prozesse und stellt somit eine Schnittstelle beider Angriffspunkte auf molekularer Ebene dar. Der *small-molecule* Antagonist SB225002 blockiert die Weiterleitung von Signalen des CXC-Rezeptors und zeigte in unseren Experimenten das Potential zur Reduktion des Glioblastomwachstums *in vivo* nach lokaler SB225002-Therapie. Bei der Betrachtung anti-angiogener Therapien im Glioblastom gilt es zu beachten, dass diese Tumorentität das Gehirn durch diffuse Invasion von einzelnen Tumorzellen infiltriert und dass dieser Prozess unabhängig von den Angiogenesestrategien des Tumors abläuft. Das Glioblastom ist damit keine auf einen Bereich des Gehirns lokalisierte Entität, sondern betrifft global das gesamte Gehirn. Typischerweise ist das GBM ein dynamischer Tumor mit vielen Facetten und einer hohen Wandlungsfähigkeit im Verlauf der Erkrankung. Im Licht dieser Erkenntnisse haben anti-angiogene Therapieansätze alleine keine Chance zur Heilung von Glioblastomen. Selbst ein kompletter Stillstand der Angiogenese würde die Verbreitung der Tumorzellen im Gehirn nicht unterbinden und könnte auch die Entstehung von Rezidiven nicht verhindern. In präklinischen sowie einigen klinischen Studien zeichnet sich deshalb die Kombination verschiedener Therapieansätze als erfolgversprechendste Strategie der Tumorbekämpfung ab. Der CXCR2-Antagonist SB225002 blockiert eine der wichtigsten angiogenen und myleoiden Signalachsen und repräsentiert deshalb einen potentiell vielversprechenden Kandidaten in zukünftigen klinischen Studien.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Kaatsch P, Spix C, Katalinic A, Hentschel S, Luttmann S, Waldeyer-Sauerland M, Waldmann A, Christ M, Folkerts J, Hansmann J. Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland eV: Krebs in Deutschland 2015/16. Robert-Koch-Institut: Berlin, Germany; 2019.
2. Tan AC, Ashley DM, Lopez GY, Malinzak M, Friedman HS, Khasraw M. Management of glioblastoma: State of the art and future directions. *CA Cancer J Clin*. 2020.
3. Kraywinkel K, Spix C. Epidemiologie primärer Hirntumoren bei Kindern und Erwachsenen in Deutschland. *Der Onkologe*. 2019;25(1):5-9.
4. Scheurer ME, Etzel CJ, Liu M, Barnholtz-Sloan J, Wiklund F, Tavelin B, Wrensch MR, Melin BS, Bondy ML, Consortium G. Familial aggregation of glioma: a pooled analysis. *Am J Epidemiol*. 2010;172(10):1099-107.
5. Amirian ES, Zhou R, Wrensch MR, Olson SH, Scheurer ME, Il'yasova D, Lachance D, Armstrong GN, McCoy LS, Lau CC, Claus EB, Barnholtz-Sloan JS, Schildkraut J, Ali-Osman F, Sadetzki S, Johansen C, Houlston RS, Jenkins RB, Bernstein JL, Merrell RT, Davis FG, Lai R, Shete S, Amos CI, Melin BS, Bondy ML. Approaching a Scientific Consensus on the Association between Allergies and Glioma Risk: A Report from the Glioma International Case-Control Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2016;25(2):282-90.
6. Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res*. 2013;19(4):764-72.
7. Urbanska K, Sokolowska J, Szmidi M, Sysa P. Glioblastoma multiforme - an overview. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2014;18(5):307-12.
8. Dietel M. *Harrisons Hämatologie und Onkologie*. ABW Wissenschaftsverlagsgesellschaft. 2016.
9. Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S. *Physiologie*: Georg Thieme Verlag; 2018.
10. Wirsching HG, Galanis E, Weller M. Glioblastoma. *Handb Clin Neurol*. 2016;134:381-97.
11. Wesseling P, Capper D. WHO 2016 Classification of gliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2018;44(2):139-50.
12. Goldbrunner R, Ruge M, Kocher M, Weiß L. The treatment of gliomas in adulthood. *Dtsch Arztebl Int*. 2018;115:356-64.
13. Wen PY, Huse JT. 2016 World Health Organization Classification of Central Nervous System Tumors. *Continuum (Minneapolis Minn)*. 2017;23(6, Neuro-oncology):1531-47.
14. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*. 2016;131(6):803-20.
15. Gupta A, Dwivedi T. A Simplified Overview of World Health Organization Classification Update of Central Nervous System Tumors 2016. *J Neurosci Rural Pract*. 2017;8(4):629-41.
16. van Breemen MS, Wilms EB, Vecht CJ. Epilepsy in patients with brain tumours: epidemiology, mechanisms, and management. *Lancet Neurol*. 2007;6(5):421-30.
17. Kellner U, Frahm S, Mawrin C, Krams M. *Kurzlehrbuch Pathologie*. Thieme. 2019.
18. Brat DJ. Glioblastoma: biology, genetics, and behavior. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2012:102-7.
19. Brown TJ, Brennan MC, Li M, Church EW, Brandmeir NJ, Rakszawski KL, Patel AS, Rizk EB, Suki D, Sawaya R, Glantz M. Association of the Extent of Resection With Survival in Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol*. 2016;2(11):1460-9.
20. Lun M, Lok E, Gautam S, Wu E, Wong ET. The natural history of extracranial metastasis from glioblastoma multiforme. *J Neurooncol*. 2011;105(2):261-73.
21. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO, European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Working Group, National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352(10):987-96.
22. Herrlinger U, Tzaridis T, Mack F, Steinbach JP, Schlegel U, Sabel M, Hau P, Kortmann RD, Krex D, Grauer O, Goldbrunner R, Schnell O, Bahr O, Uhl M, Seidel C, Tabatabai G, Kowalski T, Ringel F, Schmidt-Graf F, Suchorska B, Brehmer S, Weyerbrock A, Renovan M, Bullinger L, Galldiks N, Vajkoczy P, Misch M,

- Vatter H, Stuplich M, Schafer N, Kebir S, Weller J, Schaub C, Stummer W, Tonn JC, Simon M, Keil VC, Nelles M, Urbach H, Coenen M, Wick W, Weller M, Fimmers R, Schmid M, Hattingen E, Pietsch T, Coch C, Glas M, Neurooncology Working Group of the German Cancer S. Lomustine-temozolomide combination therapy versus standard temozolomide therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CeTeG/NOA-09): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2019;393(10172):678-88.
23. Marenco-Hillebrand L, Wijesekera O, Suarez-Meade P, Mampre D, Jackson C, Peterson J, Trifiletti D, Hammack J, Ortiz K, Lesser E, Spiegel M, Prevatt C, Hawayek M, Quinones-Hinojosa A, Chaichana KL. Trends in glioblastoma: outcomes over time and type of intervention: a systematic evidence based analysis. *J Neurooncol*. 2020;147(2):297-307.
24. Zhu P, Zhu JJ. Tumor treating fields: a novel and effective therapy for glioblastoma: mechanism, efficacy, safety and future perspectives. *Chin Clin Oncol*. 2017;6(4):41.
25. Stupp R, Taillibert S, Kanner A, Read W, Steinberg D, Lhermitte B, Toms S, Idbaih A, Ahluwalia MS, Fink K, Di Meco F, Lieberman F, Zhu JJ, Stragliotto G, Tran D, Brem S, Hottinger A, Kirson ED, Lavy-Shahaf G, Weinberg U, Kim CY, Paek SH, Nicholas G, Bruna J, Hirte H, Weller M, Palti Y, Hegi ME, Ram Z. Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2017;318(23):2306-16.
26. Stupp R, Taillibert S, Kanner AA, Kesari S, Steinberg DM, Toms SA, Taylor LP, Lieberman F, Silvani A, Fink KL, Barnett GH, Zhu JJ, Henson JW, Engelhard HH, Chen TC, Tran DD, Sroubek J, Tran ND, Hottinger AF, Landolfi J, Desai R, Caroli M, Kew Y, Honnorat J, Idbaih A, Kirson ED, Weinberg U, Palti Y, Hegi ME, Ram Z. Maintenance Therapy With Tumor-Treating Fields Plus Temozolomide vs Temozolomide Alone for Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2015;314(23):2535-43.
27. Fabian D, Guillermo Prieto Eibl MDP, Alnahhas I, Sebastian N, Giglio P, Puduvali V, Gonzalez J, Palmer JD. Treatment of Glioblastoma (GBM) with the Addition of Tumor-Treating Fields (TTF): A Review. *Cancers (Basel)*. 2019;11(2).
28. Lassman AB, Joanta-Gomez AE, Pan PC, Wick W. Current usage of tumor treating fields for glioblastoma. *Neurooncol Adv*. 2020;2(1):vdaa069.
29. Khasraw M, Lassman AB. Advances in the treatment of malignant gliomas. *Curr Oncol Rep*. 2010;12(1):26-33.
30. McGranahan T, Therkelsen KE, Ahmad S, Nagpal S. Current State of Immunotherapy for Treatment of Glioblastoma. *Curr Treat Options Oncol*. 2019;20(3):24.
31. Patel AP, Tirosi I, Trombetta JJ, Shalek AK, Gillespie SM, Wakimoto H, Cahill DP, Nahed BV, Curry WT, Martuza RL, Louis DN, Rozenblatt-Rosen O, Suva ML, Regev A, Bernstein BE. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science*. 2014;344(6190):1396-401.
32. Chen RQ, Liu F, Qiu XY, Chen XQ. The Prognostic and Therapeutic Value of PD-L1 in Glioma. *Front Pharmacol*. 2018;9:1503.
33. Cloughesy TF, Mochizuki AY, Orpilla JR, Hugo W, Lee AH, Davidson TB, Wang AC, Ellingson BM, Rytlewski JA, Sanders CM, Kawaguchi ES, Du L, Li G, Yong WH, Gaffey SC, Cohen AL, Mellinghoff IK, Lee EQ, Reardon DA, O'Brien BJ, Butowski NA, Nghiemphu PL, Clarke JL, Arrillaga-Romany IC, Colman H, Kaley TJ, de Groot JF, Liau LM, Wen PY, Prins RM. Neoadjuvant anti-PD-1 immunotherapy promotes a survival benefit with intratumoral and systemic immune responses in recurrent glioblastoma. *Nat Med*. 2019;25(3):477-86.
34. Vik-Mo EO, Nyakas M, Mikkelsen BV, Moe MC, Due-Tonnesen P, Suso EM, Saeboe-Larsen S, Sandberg C, Brinchmann JE, Helseth E, Rasmussen AM, Lote K, Aamdal S, Gaudernack G, Kvalheim G, Langmoen IA. Therapeutic vaccination against autologous cancer stem cells with mRNA-transfected dendritic cells in patients with glioblastoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2013;62(9):1499-509.
35. Morales A. BCG: A throwback from the stone age of vaccines opened the path for bladder cancer immunotherapy. *Can J Urol*. 2017;24(3):8788-93.
36. Morales A, Eidinger D, Bruce AW. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol*. 1976;116(2):180-3.
37. Mougel A, Terme M, Tanchot C. Therapeutic Cancer Vaccine and Combinations With Antiangiogenic Therapies and Immune Checkpoint Blockade. *Front Immunol*. 2019;10:467.

38. Lim M, Xia Y, Bettegowda C, Weller M. Current state of immunotherapy for glioblastoma. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018;15(7):422-42.
39. Kambayashi T, Laufer TM. Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell? *Nat Rev Immunol.* 2014;14(11):719-30.
40. Liao LM, Ashkan K, Tran DD, Campian JL, Trusheim JE, Cobbs CS, Heth JA, Salacz M, Taylor S, D'Andre SD, Iwamoto FM, Dropcho EJ, Moshel YA, Walter KA, Pillainayagam CP, Aiken R, Chaudhary R, Goldlust SA, Bota DA, Duic P, Grewal J, Elinzano H, Toms SA, Lillehei KO, Mikkelsen T, Walbert T, Abram SR, Brenner AJ, Brem S, Ewend MG, Khagi S, Portnow J, Kim LJ, Loudon WG, Thompson RC, Avigan DE, Fink KL, Geoffroy FJ, Lindhorst S, Lutzky J, Sloan AE, Schackert G, Krex D, Meisel HJ, Wu J, Davis RP, Duma C, Etame AB, Mathieu D, Kesari S, Piccioni D, Westphal M, Baskin DS, New PZ, Lacroix M, May SA, Pluard TJ, Tse V, Green RM, Villano JL, Pearlman M, Petrecca K, Schulder M, Taylor LP, Maida AE, Prins RM, Cloughesy TF, Mulholland P, Bosch ML. First results on survival from a large Phase 3 clinical trial of an autologous dendritic cell vaccine in newly diagnosed glioblastoma. *J Transl Med.* 2018;16(1):142.
41. Locke FL, Ghobadi A, Jacobson CA, Miklos DB, Lekakis LJ, Oluwole OO, Lin Y, Braunschweig I, Hill BT, Timmerman JM, Deol A, Reagan PM, Stiff P, Flinn IW, Farooq U, Goy A, McSweeney PA, Munoz J, Siddiqi T, Chavez JC, Herrera AF, Bartlett NL, Wiezorek JS, Navale L, Xue A, Jiang Y, Bot A, Rossi JM, Kim JJ, Go WY, Neelapu SS. Long-term safety and activity of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma (ZUMA-1): a single-arm, multicentre, phase 1-2 trial. *Lancet Oncol.* 2019;20(1):31-42.
42. Chiocca EA, Nassiri F, Wang J, Peruzzi P, Zadeh G. Viral and other therapies for recurrent glioblastoma: is a 24-month durable response unusual? *Neuro Oncol.* 2019;21(1):14-25.
43. Webb ES, Liu P, Baleeiro R, Lemoine NR, Yuan M, Wang YH. Immune checkpoint inhibitors in cancer therapy. *J Biomed Res.* 2018;32(5):317-26.
44. Brat DJ, Bellail AC, Van Meir EG. The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro Oncol.* 2005;7(2):122-33.
45. Keeley EC, Mehrad B, Strieter RM. Chemokines as mediators of tumor angiogenesis and neovascularization. *Exp Cell Res.* 2011;317(5):685-90.
46. Hundesberger T, Weller M. Bevacizumab: Bone of Contention in the Therapy of Glioblastoma. *Praxis.* 2017;106:415-20.
47. Zhao C, Wang H, Xiong C, Liu Y. Hypoxic glioblastoma release exosomal VEGF-A induce the permeability of blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;502(3):324-31.
48. Piao Y, Liang J, Holmes L, Zurita AJ, Henry V, Heymach JV, de Groot JF. Glioblastoma resistance to anti-VEGF therapy is associated with myeloid cell infiltration, stem cell accumulation, and a mesenchymal phenotype. *Neuro Oncol.* 2012;14(11):1379-92.
49. Castro BA, Aghi MK. Bevacizumab for glioblastoma: current indications, surgical implications, and future directions. *Neurosurg Focus.* 2014;37(6):E9.
50. Ghiaseddin A, Peters KB. Use of bevacizumab in recurrent glioblastoma. *CNS Oncol.* 2015;4(3):157-69.
51. Ameratunga M, Pavlakis N, Wheeler H, Grant R, Simes J, Khasraw M. Anti-angiogenic therapy for high-grade glioma. *Cochrane Database Syst Rev.* 2018;11:CD008218.
52. 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(8):699-708.
53. 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(4):334-40.
54. Wick W, Gorlia T, Bendszus M, Taphoorn M, Sahm F, Harting I, Brandes AA, Taal W, Domont J, Idbaih A, Campone M, Clement PM, Stupp R, Fabbro M, Le Rhun E, Dubois F, Weller M, von Deimling A, Golfingopoulos V, Bromberg JC, Platten M, Klein M, van den Bent MJ. Lomustine and Bevacizumab in Progressive Glioblastoma. *N Engl J Med.* 2017;377(20):1954-63.
55. Tang P, Wang JM. Chemokines: the past, the present and the future. *Cell Mol Immunol.* 2018;15(4):295-8.

56. Zlotnik A, Yoshie O. The chemokine superfamily revisited. *Immunity*. 2012;36(5):705-16.
57. Zlotnik A, Burkhardt AM, Homey B. Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(9):597-606.
58. Zlotnik A, Yoshie O, Nomiya H. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biol*. 2006;7(12):243.
59. Tiberio L, Del Prete A, Schioppa T, Sozio F, Bosisio D, Sozzani S. Chemokine and chemotactic signals in dendritic cell migration. *Cell Mol Immunol*. 2018;15(4):346-52.
60. Salazar N, Zabel BA. Support of Tumor Endothelial Cells by Chemokine Receptors. *Front Immunol*. 2019;10:147.
61. Strieter RM, Burdick MD, Mestas J, Gomperts B, Keane MP, Belperio JA. Cancer CXC chemokine networks and tumour angiogenesis. *Eur J Cancer*. 2006;42(6):768-78.
62. Ben-Baruch A. The Tumor-Promoting Flow of Cells Into, Within and Out of the Tumor Site: Regulation by the Inflammatory Axis of TNFalpha and Chemokines. *Cancer Microenviron*. 2012;5(2):151-64.
63. Groblewska M, Litman-Zawadzka A, Mroczko B. The Role of Selected Chemokines and Their Receptors in the Development of Gliomas. *Int J Mol Sci*. 2020;21(10).
64. Ahuja SK, Ozcelik T, Milatovitch A, Francke U, Murphy PM. Molecular evolution of the human interleukin-8 receptor gene cluster. *Nat Genet*. 1992;2(1):31-6.
65. Murphy PM, Tiffany HL. Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor. *Science*. 1991;253(5025):1280-3.
66. Veenstra M, Ransohoff RM. Chemokine receptor CXCR2: physiology regulator and neuroinflammation controller? *J Neuroimmunol*. 2012;246(1-2):1-9.
67. Wolf M, Delgado MB, Jones SA, Dewald B, Clark-Lewis I, Baggiolini M. Granulocyte chemotactic protein 2 acts via both IL-8 receptors, CXCR1 and CXCR2. *Eur J Immunol*. 1998;28(1):164-70.
68. Russo RC, Garcia CC, Teixeira MM, Amaral FA. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert Rev Clin Immunol*. 2014;10(5):593-619.
69. Angara K, Borin TF, Rashid MH, Lebedyeva I, Ara R, Lin PC, Iskander A, Bollag RJ, Achyut BR, Arbab AS. CXCR2-Expressing Tumor Cells Drive Vascular Mimicry in Antiangiogenic Therapy-Resistant Glioblastoma. *Neoplasia*. 2018;20(10):1070-82.
70. Bruyere C, Mijatovic T, Lonez C, Spiegl-Kreinecker S, Berger W, Kast RE, Ruyschaert JM, Kiss R, Lefranc F. Temozolomide-induced modification of the CXC chemokine network in experimental gliomas. *Int J Oncol*. 2011;38(5):1453-64.
71. Hol J, Wilhelmsen L, Haraldsen G. The murine IL-8 homologues KC, MIP-2, and LIX are found in endothelial cytoplasmic granules but not in Weibel-Palade bodies. *J Leukoc Biol*. 2010;87(3):501-8.
72. Reutershan J. CXCR2--the receptor to hit? *Drug News Perspect*. 2006;19(10):615-23.
73. Cacalano G, Lee J, Kikly K, Ryan AM, Pitts-Meek S, Hultgren B, Wood WI, Moore MW. Neutrophil and B cell expansion in mice that lack the murine IL-8 receptor homolog. *Science*. 1994;265(5172):682-4.
74. Semple BD, Kossmann T, Morganti-Kossmann MC. Role of chemokines in CNS health and pathology: a focus on the CCL2/CCR2 and CXCL8/CXCR2 networks. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010;30(3):459-73.
75. Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14(21):6735-41.
76. Cheng Y, Ma XL, Wei YQ, Wei XW. Potential roles and targeted therapy of the CXCLs/CXCR2 axis in cancer and inflammatory diseases. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2019;1871(2):289-312.
77. Zhou SL, Zhou ZJ, Hu ZQ, Li X, Huang XW, Wang Z, Fan J, Dai Z, Zhou J. CXCR2/CXCL5 axis contributes to epithelial-mesenchymal transition of HCC cells through activating PI3K/Akt/GSK-3beta/Snail signaling. *Cancer Lett*. 2015;358(2):124-35.
78. Keane MP, Belperio JA, Xue YY, Burdick MD, Strieter RM. Depletion of CXCR2 inhibits tumor growth and angiogenesis in a murine model of lung cancer. *J Immunol*. 2004;172(5):2853-60.
79. Chen J, Mao S, Li H, Zheng M, Yi L, Lin JM, Lin ZX. The pathological structure of the perivascular niche in different microvascular patterns of glioblastoma. *PLoS One*. 2017;12(8):e0182183.
80. Ha H, Debnath B, Neamati N. Role of the CXCL8-CXCR1/2 Axis in Cancer and Inflammatory Diseases. *Theranostics*. 2017;7(6):1543-88.



81. Chen Z, Mou L, Pan Y, Feng C, Zhang J, Li J. CXCL8 Promotes Glioma Progression By Activating The JAK/STAT1/HIF-1alpha/Snail Signaling Axis. *Onco Targets Ther.* 2019;12:8125-38.
82. Samaras V, Piperi C, Levidou G, Zisakis A, Kavantzias N, Themistocleous MS, Boviatsis EI, Barbatis C, Lea RW, Kalofoutis A, Korkolopoulou P. Analysis of interleukin (IL)-8 expression in human astrocytomas: associations with IL-6, cyclooxygenase-2, vascular endothelial growth factor, and microvessel morphometry. *Hum Immunol.* 2009;70(6):391-7.
83. Yang L, Liu Z, Wu R, Yao Q, Gu Z, Liu M. Correlation of C-X-C chemokine receptor 2 upregulation with poor prognosis and recurrence in human glioma. *Onco Targets Ther.* 2015;8:3203-9.
84. Highfill SL, Cui Y, Giles AJ, Smith JP, Zhang H, Morse E, Kaplan RN, Mackall CL. Disruption of CXCR2-mediated MDSC tumor trafficking enhances anti-PD1 efficacy. *Sci Transl Med.* 2014;6(237):237ra67.
85. Matsuo Y, Raimondo M, Woodward TA, Wallace MB, Gill KR, Tong Z, Burdick MD, Yang Z, Strieter RM, Hoffman RM, Guha S. CXC-chemokine/CXCR2 biological axis promotes angiogenesis in vitro and in vivo in pancreatic cancer. *Int J Cancer.* 2009;125(5):1027-37.
86. Dwyer J, Hebda JK, Le Guelte A, Galan-Moya EM, Smith SS, Azzi S, Bidere N, Gavard J. Glioblastoma cell-secreted interleukin-8 induces brain endothelial cell permeability via CXCR2. *PLoS One.* 2012;7(9):e45562.
87. Korkolopoulou P, Levidou G, El-Habr EA, Adamopoulos C, Samaras V, Zisakis A, Kavantzias N, Boviatsis E, Fragkou P, Papavassiliou AG, Patsouris E, Piperi C. Expression of interleukin-8 receptor CXCR2 and suppressor of cytokine signaling-3 in astrocytic tumors. *Mol Med.* 2012;18:379-88.
88. Brandenburg S, Muller A, Turkowski K, Radev YT, Rot S, Schmidt C, Bungert AD, Acker G, Schorr A, Hippe A, Miller K, Heppner FL, Homey B, Vajkoczy P. Resident microglia rather than peripheral macrophages promote vascularization in brain tumors and are source of alternative pro-angiogenic factors. *Acta Neuropathol.* 2016;131(3):365-78.
89. Kholodenko RV, Kalinovskiy DV, Doronin, II, Ponomarev ED, Kholodenko IV. Antibody Fragments as Potential Biopharmaceuticals for Cancer Therapy: Success and Limitations. *Curr Med Chem.* 2019;26(3):396-426.
90. Imai K, Takaoka A. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(9):714-27.
91. Catusse J, Liotard A, Loillier B, Pruneau D, Paquet JL. Characterization of the molecular interactions of interleukin-8 (CXCL8), growth related oncogen alpha (CXCL1) and a non-peptide antagonist (SB 225002) with the human CXCR2. *Biochem Pharmacol.* 2003;65(5):813-21.
92. Rubin JB, Kung AL, Klein RS, Chan JA, Sun Y, Schmidt K, Kieran MW, Luster AD, Segal RA. A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(23):13513-8.
93. White JR, Lee JM, Young PR, Hertzberg RP, Jurewicz AJ, Chaikin MA, Widdowson K, Foley JJ, Martin LD, Griswold DE, Sarau HM. Identification of a potent, selective non-peptide CXCR2 antagonist that inhibits interleukin-8-induced neutrophil migration. *J Biol Chem.* 1998;273(17):10095-8.
94. Wu F, Zhao Y, Jiao T, Shi D, Zhu X, Zhang M, Shi M, Zhou H. CXCR2 is essential for cerebral endothelial activation and leukocyte recruitment during neuroinflammation. *J Neuroinflammation.* 2015;12:98.
95. Dwyer MP, Yu Y. CXCR2 receptor antagonists: a medicinal chemistry perspective. *Curr Top Med Chem.* 2014;14(13):1590-605.
96. Devapatla B, Sharma A, Woo S. CXCR2 Inhibition Combined with Sorafenib Improved Antitumor and Antiangiogenic Response in Preclinical Models of Ovarian Cancer. *PLoS One.* 2015;10(9):e0139237.
97. Ijichi H, Chytil A, Gorska AE, Aakre ME, Bierie B, Tada M, Mohri D, Miyabayashi K, Asaoka Y, Maeda S, Ikenoue T, Tateishi K, Wright CV, Koike K, Omata M, Moses HL. Inhibiting Cxcr2 disrupts tumor-stromal interactions and improves survival in a mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Clin Invest.* 2011;121(10):4106-17.
98. Sueoka H, Hirano T, Uda Y, Iimuro Y, Yamanaka J, Fujimoto J. Blockage of CXCR2 suppresses tumor growth of intrahepatic cholangiocellular carcinoma. *Surgery.* 2014;155(4):640-9.

99. Grepin R, Guyot M, Giuliano S, Boncompagni M, Ambrosetti D, Chamorey E, Scoazec JY, Negrier S, Simonnet H, Pages G. The CXCL7/CXCR1/2 axis is a key driver in the growth of clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 2014;74(3):873-83.
100. de Vasconcellos JF, Laranjeira AB, Leal PC, Bhasin MK, Zenatti PP, Nunes RJ, Yunes RA, Nowill AE, Libermann TA, Zerbini LF, Yunes JA. SB225002 Induces Cell Death and Cell Cycle Arrest in Acute Lymphoblastic Leukemia Cells through the Activation of GLIPR1. *PLoS One.* 2015;10(8):e0134783.
101. Herz J, Sabellek P, Lane TE, Gunzer M, Hermann DM, Doeppner TR. Role of Neutrophils in Exacerbation of Brain Injury After Focal Cerebral Ischemia in Hyperlipidemic Mice. *Stroke.* 2015;46(10):2916-25.
102. Che J, Wang Z, Sheng H, Huang F, Dong X, Hu Y, Xie X, Hu Y. Ligand-based pharmacophore model for the discovery of novel CXCR2 antagonists as anti-cancer metastatic agents. *R Soc Open Sci.* 2018;5(7):180176.
103. Brait VH, Rivera J, Broughton BR, Lee S, Drummond GR, Sobey CG. Chemokine-related gene expression in the brain following ischemic stroke: no role for CXCR2 in outcome. *Brain Res.* 2011;1372:169-79.
104. Fan X, Patera AC, Pong-Kennedy A, Deno G, Gonsiorek W, Manfra DJ, Vassileva G, Zeng M, Jackson C, Sullivan L, Sharif-Rodriguez W, Opdenakker G, Van Damme J, Hedrick JA, Lundell D, Lira SA, Hipkin RW. Murine CXCR1 is a functional receptor for GCP-2/CXCL6 and interleukin-8/CXCL8. *J Biol Chem.* 2007;282(16):11658-66.
105. Reutershan J, Morris MA, Burcin TL, Smith DF, Chang D, Saprito MS, Ley K. Critical role of endothelial CXCR2 in LPS-induced neutrophil migration into the lung. *J Clin Invest.* 2006;116(3):695-702.
106. Riddle RC, Frey JL, Tomlinson RE, Ferron M, Li Y, DiGirolamo DJ, Faugere MC, Hussain MA, Karsenty G, Clemens TL. Tsc2 is a molecular checkpoint controlling osteoblast development and glucose homeostasis. *Mol Cell Biol.* 2014;34(10):1850-62.
107. Felsenstein M, Blank A, Bungert AD, Mueller A, Ghori A, Kremenetskaia I, Rung O, Broggin T, Turkowski K, Scherschinski L, Raggatz J, Vajkoczy P, Brandenburg S. CCR2 of Tumor Microenvironmental Cells Is a Relevant Modulator of Glioma Biology. *Cancers (Basel).* 2020;12(7).
108. Xu J, Zhu MD, Zhang X, Tian H, Zhang JH, Wu XB, Gao YJ. NFkappaB-mediated CXCL1 production in spinal cord astrocytes contributes to the maintenance of bone cancer pain in mice. *J Neuroinflammation.* 2014;11:38.
109. Du M, Qiu Q, Gruslin A, Gordon J, He M, Chan CC, Li D, Tsang BK. SB225002 promotes mitotic catastrophe in chemo-sensitive and -resistant ovarian cancer cells independent of p53 status in vitro. *PLoS One.* 2013;8(1):e54572.
110. Schmall A, Al-Tamari HM, Herold S, Kampschulte M, Weigert A, Wietelmann A, Vipotnik N, Grimminger F, Seeger W, Pullamsetti SS, Savai R. Macrophage and cancer cell cross-talk via CCR2 and CX3CR1 is a fundamental mechanism driving lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015;191(4):437-47.
111. Acker G, Zollfrank J, Jelgersma C, Nieminen-Kelha M, Kremenetskaia I, Mueller S, Ghori A, Vajkoczy P, Brandenburg S. The CXCR2/CXCL2 signalling pathway - An alternative therapeutic approach in high-grade glioma. *Eur J Cancer.* 2020;126:106-15.
112. Lee ST, Seo Y, Bae JY, Chu K, Kim JW, Choi SH, Kim TM, Kim IH, Park SH, Park CK. Loss of Pericytes in Radiation Necrosis after Glioblastoma Treatments. *Mol Neurobiol.* 2018;55(6):4918-26.
113. Cheng L, Huang Z, Zhou W, Wu Q, Donnola S, Liu JK, Fang X, Sloan AE, Mao Y, Lathia JD, Min W, McLendon RE, Rich JN, Bao S. Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell.* 2013;153(1):139-52.
114. Caronni N, Savino B, Bonecchi R. Myeloid cells in cancer-related inflammation. *Immunobiology.* 2015;220(2):249-53.
115. Nayak D, Roth TL, McGavern DB. Microglia development and function. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:367-402.
116. Lüllmann-Rauch R, Asan E. Taschenbuch Histologie. 6., vollständig überarbeitete Auflage: Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2019. 219-44 p.
117. Sevenich L. Brain-Resident Microglia and Blood-Borne Macrophages Orchestrate Central Nervous System Inflammation in Neurodegenerative Disorders and Brain Cancer. *Front Immunol.* 2018;9:697.

118. Michell-Robinson MA, Touil H, Healy LM, Owen DR, Durafourt BA, Bar-Or A, Antel JP, Moore CS. Roles of microglia in brain development, tissue maintenance and repair. *Brain*. 2015;138(Pt 5):1138-59.
119. Bayerl SH, Niesner R, Cseresnyes Z, Radbruch H, Pohlan J, Brandenburg S, Czabanka MA, Vajkoczy P. Time lapse in vivo microscopy reveals distinct dynamics of microglia-tumor environment interactions- a new role for the tumor perivascular space as highway for trafficking microglia. *Glia*. 2016;64(7):1210-26.
120. Flynn G, Maru S, Loughlin J, Romero IA, Male D. Regulation of chemokine receptor expression in human microglia and astrocytes. *J Neuroimmunol*. 2003;136(1-2):84-93.
121. Jablonska J, Wu CF, Andzinski L, Leschner S, Weiss S. CXCR2-mediated tumor-associated neutrophil recruitment is regulated by IFN-beta. *Int J Cancer*. 2014;134(6):1346-58.
122. Girbl T, Lenn T, Perez L, Rolas L, Barkaway A, Thiriot A, Del Fresno C, Lynam E, Hub E, Thelen M, Graham G, Alon R, Sancho D, von Andrian UH, Voisin MB, Rot A, Nourshargh S. Distinct Compartmentalization of the Chemokines CXCL1 and CXCL2 and the Atypical Receptor ACKR1 Determine Discrete Stages of Neutrophil Diapedesis. *Immunity*. 2018;49(6):1062-76 e6.
123. Bodnar RJ, Wells A. Differential regulation of pericyte function by the CXC receptor 3. *Wound Repair Regen*. 2015;23(6):785-96.
124. Erin N, Nizam E, Tanriover G, Koksoy S. Autocrine control of MIP-2 secretion from metastatic breast cancer cells is mediated by CXCR2: a mechanism for possible resistance to CXCR2 antagonists. *Breast Cancer Res Treat*. 2015;150(1):57-69.
125. Ahn SH, Park H, Ahn YH, Kim S, Cho MS, Kang JL, Choi YH. Necrotic cells influence migration and invasion of glioblastoma via NF-kappaB/AP-1-mediated IL-8 regulation. *Sci Rep*. 2016;6:24552.
126. Raza SM, Lang FF, Aggarwal BB, Fuller GN, Wildrick DM, Sawaya R. Necrosis and glioblastoma: a friend or a foe? A review and a hypothesis. *Neurosurgery*. 2002;51(1):2-12; discussion -3.
127. Sharma B, Nawandar DM, Nannuru KC, Varney ML, Singh RK. Targeting CXCR2 enhances chemotherapeutic response, inhibits mammary tumor growth, angiogenesis, and lung metastasis. *Mol Cancer Ther*. 2013;12(5):799-808.
128. Saintigny P, Massarelli E, Lin S, Ahn YH, Chen Y, Goswami S, Erez B, O'Reilly MS, Liu D, Lee JJ, Zhang L, Ping Y, Behrens C, Solis Soto LM, Heymach JV, Kim ES, Herbst RS, Lippman SM, Wistuba II, Hong WK, Kurie JM, Koo JS. CXCR2 expression in tumor cells is a poor prognostic factor and promotes invasion and metastasis in lung adenocarcinoma. *Cancer Res*. 2013;73(2):571-82.
129. Sasaki S, Baba T, Muranaka H, Tanabe Y, Takahashi C, Matsugo S, Mukaida N. Involvement of Prokineticin 2-expressing Neutrophil Infiltration in 5-Fluorouracil-induced Aggravation of Breast Cancer Metastasis to Lung. *Mol Cancer Ther*. 2018;17(7):1515-25.
130. Xu M, Jiang H, Wang H, Liu J, Liu B, Guo Z. SB225002 inhibits prostate cancer invasion and attenuates the expression of BSP, OPN and MMP2. *Oncol Rep*. 2018;40(2):726-36.
131. Wang B, Hendricks DT, Wamunyokoli F, Parker MI. A growth-related oncogene/CXC chemokine receptor 2 autocrine loop contributes to cellular proliferation in esophageal cancer. *Cancer Res*. 2006;66(6):3071-7.
132. Yung MM, Tang HW, Cai PC, Leung TH, Ngu SF, Chan KK, Xu D, Yang H, Ngan HY, Chan DW. GRO-alpha and IL-8 enhance ovarian cancer metastatic potential via the CXCR2-mediated TAK1/NFkappaB signaling cascade. *Theranostics*. 2018;8(5):1270-85.
133. Gille H, Kowalski J, Li B, LeCouter J, Moffat B, Zioncheck TF, Pelletier N, Ferrara N. Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *J Biol Chem*. 2001;276(5):3222-30.
134. Petreaca ML, Yao M, Liu Y, Defea K, Martins-Green M. Transactivation of vascular endothelial growth factor receptor-2 by interleukin-8 (IL-8/CXCL8) is required for IL-8/CXCL8-induced endothelial permeability. *Mol Biol Cell*. 2007;18(12):5014-23.
135. Yu M, Berk R, Kosir MA. CXCL7-Mediated Stimulation of Lymphangiogenic Factors VEGF-C, VEGF-D in Human Breast Cancer Cells. *J Oncol*. 2010;2010:939407.
136. Jacobs VL, Valdes PA, Hickey WF, De Leo JA. Current review of in vivo GBM rodent models: emphasis on the CNS-1 tumour model. *ASN Neuro*. 2011;3(3):e00063.

137. Oh T, Fakurnejad S, Sayegh ET, Clark AJ, Ivan ME, Sun MZ, Safaee M, Bloch O, James CD, Parsa AT. Immunocompetent murine models for the study of glioblastoma immunotherapy. *J Transl Med.* 2014;12:107.
138. Szatmari T, Lumniczky K, Desaknai S, Trajcevski S, Hidvegi EJ, Hamada H, Safrany G. Detailed characterization of the mouse glioma 261 tumor model for experimental glioblastoma therapy. *Cancer Sci.* 2006;97(6):546-53.
139. Manjavachi MN, Passos GF, Trevisan G, Araujo SB, Pontes JP, Fernandes ES, Costa R, Calixto JB. Spinal blockage of CXCL1 and its receptor CXCR2 inhibits paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice. *Neuropharmacology.* 2019;151:136-43.
140. Achyut BR, Shankar A, Iskander AS, Ara R, Angara K, Zeng P, Knight RA, Scicli AG, Arbab AS. Bone marrow derived myeloid cells orchestrate antiangiogenic resistance in glioblastoma through coordinated molecular networks. *Cancer Lett.* 2015;369(2):416-26.
141. Sanders S, Debinski W. Challenges to Successful Implementation of the Immune Checkpoint Inhibitors for Treatment of Glioblastoma. *Int J Mol Sci.* 2020;21(8).
142. Debinski W, Priebe W, Tatter SB. Maximizing Local Access to Therapeutic Deliveries in Glioblastoma. Part I: Targeted Cytotoxic Therapy. In: De Vleeschouwer S, editor. *Glioblastoma.* Brisbane (AU)2017.
143. Deeken JF, Loscher W. The blood-brain barrier and cancer: transporters, treatment, and Trojan horses. *Clin Cancer Res.* 2007;13(6):1663-74.
144. Soda Y, Myskiw C, Rommel A, Verma IM. Mechanisms of neovascularization and resistance to anti-angiogenic therapies in glioblastoma multiforme. *J Mol Med (Berl).* 2013;91(4):439-48.
145. Winkler F, Osswald M, Wick W. Anti-Angiogenics: Their Role in the Treatment of Glioblastoma. *Oncol Res Treat.* 2018;41(4):181-6.
146. Zhang M, Ye G, Li J, Wang Y. Recent advance in molecular angiogenesis in glioblastoma: the challenge and hope for anti-angiogenic therapy. *Brain Tumor Pathol.* 2015;32(4):229-36.
147. Angara K, Borin TF, Arbab AS. Vascular Mimicry: A Novel Neovascularization Mechanism Driving Anti-Angiogenic Therapy (AAT) Resistance in Glioblastoma. *Transl Oncol.* 2017;10(4):650-60.
148. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, Trent JM, Meltzer PS, Hendrix MJ. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol.* 1999;155(3):739-52.
149. Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, Todaro M, Invernici G, Cenci T, Maira G, Parati EA, Stassi G, Larocca LM, De Maria R. Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature.* 2010;468(7325):824-8.
150. Folberg R, Hendrix MJ, Maniotis AJ. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol.* 2000;156(2):361-81.
151. Jackson CM, Choi J, Lim M. Mechanisms of immunotherapy resistance: lessons from glioblastoma. *Nat Immunol.* 2019;20(9):1100-9.
152. De I, Steffen MD, Clark PA, Patros CJ, Sokn E, Bishop SM, Litscher S, Maklakova VI, Kuo JS, Rodriguez FJ, Collier LS. CSF1 Overexpression Promotes High-Grade Glioma Formation without Impacting the Polarization Status of Glioma-Associated Microglia and Macrophages. *Cancer Res.* 2016;76(9):2552-60.
153. Kumar V, Donthireddy L, Marvel D, Condamine T, Wang F, Lavilla-Alonso S, Hashimoto A, Vonteddu P, Behera R, Goins MA, Mulligan C, Nam B, Hockstein N, Denstman F, Shakamuri S, Speicher DW, Weeraratna AT, Chao T, Vonderheide RH, Languino LR, Ordentlich P, Liu Q, Xu X, Lo A, Pure E, Zhang C, Loboda A, Sepulveda MA, Snyder LA, Gabilovich DI. Cancer-Associated Fibroblasts Neutralize the Anti-tumor Effect of CSF1 Receptor Blockade by Inducing PMN-MDSC Infiltration of Tumors. *Cancer Cell.* 2017;32(5):654-68 e5.
154. Hasan T, Caragher SP, Shireman JM, Park CH, Atashi F, Baisiwala S, Lee G, Guo D, Wang JY, Dey M, Wu M, Lesniak MS, Horbinski CM, James CD, Ahmed AU. Interleukin-8/CXCR2 signaling regulates therapy-induced plasticity and enhances tumorigenicity in glioblastoma. *Cell Death Dis.* 2019;10(4):292.

155. Schott AF, Goldstein LJ, Cristofanilli M, Ruffini PA, McCanna S, Reuben JM, Perez RP, Kato G, Wicha M. Phase Ib Pilot Study to Evaluate Reparixin in Combination with Weekly Paclitaxel in Patients with HER-2-Negative Metastatic Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2017;23(18):5358-65.
156. Singh AK, Arya RK, Trivedi AK, Sanyal S, Baral R, Dormond O, Briscoe DM, Datta D. Chemokine receptor trio: CXCR3, CXCR4 and CXCR7 crosstalk via CXCL11 and CXCL12. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2013;24(1):41-9.
157. Ahn GO, Brown JM. Role of endothelial progenitors and other bone marrow-derived cells in the development of the tumor vasculature. *Angiogenesis.* 2009;12(2):159-64.
158. Wurth R, Bajetto A, Harrison JK, Barbieri F, Florio T. CXCL12 modulation of CXCR4 and CXCR7 activity in human glioblastoma stem-like cells and regulation of the tumor microenvironment. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:144.
159. Tabouret E, Tchoghandjian A, Denicolai E, Delfino C, Metellus P, Graillon T, Boucard C, Nanni I, Padovani L, Ouafik L, Figarella-Branger D, Chinot O. Recurrence of glioblastoma after radio-chemotherapy is associated with an angiogenic switch to the CXCL12-CXCR4 pathway. *Oncotarget.* 2015;6(13):11664-75.
160. Mollica Poeta V, Massara M, Capucetti A, Bonecchi R. Chemokines and Chemokine Receptors: New Targets for Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 2019;10:379.
161. Salgia R, Stille JR, Weaver RW, McCleod M, Hamid O, Polzer J, Roberson S, Flynt A, Spigel DR. A randomized phase II study of LY2510924 and carboplatin/etoposide versus carboplatin/etoposide in extensive-disease small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2017;105:7-13.
162. Galsky MD, Vogelzang NJ, Conkling P, Raddad E, Polzer J, Roberson S, Stille JR, Saleh M, Thornton D. A phase I trial of LY2510924, a CXCR4 peptide antagonist, in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res.* 2014;20(13):3581-8.
163. Pernas S, Martin M, Kaufman PA, Gil-Martin M, Gomez Pardo P, Lopez-Tarruella S, Manso L, Ciruelos E, Perez-Fidalgo JA, Hernando C, Ademuyiwa FO, Weilbaecher K, Mayer I, Pluard TJ, Martinez Garcia M, Vahdat L, Perez-Garcia J, Wach A, Barker D, Fung S, Romagnoli B, Cortes J. Balixafortide plus eribulin in HER2-negative metastatic breast cancer: a phase 1, single-arm, dose-escalation trial. *Lancet Oncol.* 2018;19(6):812-24.
164. Fruehauf S. Current clinical indications for plerixafor. *Transfus Med Hemother.* 2013;40(4):246-50.
165. Lee EQ, Duda DG, Muzikansky A, Gerstner ER, Kuhn JG, Reardon DA, Nayak L, Norden AD, Doherty L, LaFrankie D, Stefanik J, Vardam T, Smith KH, McCluskey C, Gaffey S, Batchelor TT, Jain RK, Wen PY. Phase I and Biomarker Study of Plerixafor and Bevacizumab in Recurrent High-Grade Glioma. *Clin Cancer Res.* 2018;24(19):4643-9.
166. Martinez-Cuadron D, Boluda B, Martinez P, Bergua J, Rodriguez-Veiga R, Esteve J, Vives S, Serrano J, Vidriales B, Salamero O, Cordon L, Sempere A, Jimenez-Ubieto A, Prieto-Delgado J, Diaz-Beya M, Garrido A, Benavente C, Perez-Simon JA, Moscardo F, Sanz MA, Montesinos P, Cetlam, groups P. A phase I-II study of plerixafor in combination with fludarabine, idarubicin, cytarabine, and G-CSF (PLERIFLAG regimen) for the treatment of patients with the first early-relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Ann Hematol.* 2018;97(5):763-72.
167. Gravina GL, Mancini A, Marampon F, Colapietro A, Delle Monache S, Sferra R, Vitale F, Richardson PJ, Patient L, Burbidge S, Festuccia C. The brain-penetrating CXCR4 antagonist, PRX177561, increases the antitumor effects of bevacizumab and sunitinib in preclinical models of human glioblastoma. *J Hematol Oncol.* 2017;10(1):5.

## 7 Anhang

### 7.1 Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung

„Ich, Julia Zollfrank, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Blockade des CXCR2/CXCL2 Signalweges als therapeutischer Ansatz im Glioblastoma multiforme“ 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/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung).

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum

Unterschrift

## Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Julia Zollfrank hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Acker G, **Zollfrank J**, Jelgersma C, Nieminen-Kelha M, Kremenetskaia I, Mueller S, Ghori A, Vajkoczy P, Brandenburg S. The CXCR2/CXCL2 signalling pathway - An alternative therapeutic approach in high-grade glioma. Eur J Cancer. 2020;126:106-15.

Beitrag im Einzelnen:

- Durchführung und Auswertung der *in vivo* Experimente zur intrathekalen Therapie sowie Erstellen der dazugehörigen Grafiken
- Histologische und immunhistochemische Aufarbeitung und Auswertung der Gewebeproben zu o.g. Experimenten sowie Erstellen der dazugehörigen Grafiken und Bilder
- Durchführung, Auswertung und Statistik der *in vitro* Experimente (Proliferationsassays, rt-PCRs) sowie Erstellen der dazugehörigen Grafiken

---

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## **7.2 Lebenslauf**

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



### 7.3 Publikationsliste

Publikation 1:

Acker G, **Zollfrank J**, Jelgersma C, Nieminen-Kelha M, Kremenetskaia I, Mueller S, Ghori A, Vajkoczy P, Brandenburg S. The CXCR2/CXCL2 signalling pathway - An alternative therapeutic approach in high-grade glioma. Eur J Cancer. 2020;126:106-15.

## 7.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlichst bei PD Dr. med. Güliz Acker für die einzigartige Betreuung über die letzten Jahre bedanken. Ich danke dir für die Zeit und das große Engagement, dass du in mich und diese Arbeit investiert hast und hoffe, dass sich unsere Wege mit Abschluss dieses Projektes nicht trennen werden.

Bei Prof. Peter Vajkoczy möchte ich mich für die Überlassung des Themas, die fachliche Hilfestellung bei der Anfertigung der Arbeit und die enge Betreuung bedanken.

Vielen Dank auch an Dr. rer. nat. Susan Brandenburg, die immer ein offenes Ohr für alle fachlichen und alltäglichen Probleme hatte und jedes Hindernis zu überwinden wusste. Die Jahre im neurochirurgischen Forschungslabor werden mir immer in äußerst positiver Erinnerung bleiben. Für die freundschaftliche und liebevolle Betreuung möchte ich mich auch bei Irina, Sabine, Adnan und Melina bedanken. Für den emotionalen Ausgleich im Labor möchte ich mich bei allen DoktorandInnen, insbesondere Jana, Kathi, Lea, Alex, Anna und Aabi bedanken.

Mein großer Dank gilt meinen Doktorgeschwistern, Ruth und Claudius, für die viele Motivation und den Antrieb und am Ende für die Freundschaft, die ich nach all der Zeit immer noch mit euch teilen darf.

Vielen Dank, lieber Paul, für schnelle und unkonventionelle Hilfe bei technischen Problemen.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern dafür danken, immer alles gut zu heißen, was ich beginne, und dann auch das Durchhaltevermögen zu befeuern.