

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

DISSERTATION

**Die zielgerichtete Inhibierung der Rezeptortyrosinkinase Axl im  
Glioblastom**

–

**Experimentelle Studie zur Wirksamkeit der niedermolekularen  
Tyrosinkinase-Inhibitoren BMS-777607, LDC-41267 und  
MPCD-84111 in Modellen des Glioblastoms**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sören Korsing

aus Frankfurt (Oder)

**Datum der Promotion:** 23.06.2019

# VORWORT

Eine Veröffentlichung von Teilergebnissen der hier vorliegenden Dissertation erfolgte bereits in:

*Oncotarget* (2016)

Titel: **„Inhibiting receptor tyrosine kinase AXL with small molecule inhibitor BMS-777607 reduces glioblastoma growth, migration, and invasion in vitro and in vivo”**

Autoren: Julia Onken<sup>1</sup>, Robert Torka<sup>3</sup>, Sören Korsing<sup>1</sup>, Josefine Radke<sup>2</sup>, Irina Kremenetskaia<sup>1</sup>, Melina Nieminen<sup>1</sup>, Xi Bai<sup>1</sup>, Axel Ullrich<sup>3</sup>, Frank Heppner<sup>2</sup>, Peter Vajkoczy<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Klinik für Neurochirurgie, Charité, Berlin, Deutschland

<sup>2</sup>Institut für Neuropathologie, Charité, Berlin, Deutschland

<sup>3</sup>Abteilung für Molekularbiologie, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Deutschland

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Abstrakt.....</b>	<b>5</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>6</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Glioblastoma multiforme.....</b>	<b>7</b>
<b>1.2 Invasives Wachstum des Glioblastoms.....</b>	<b>8</b>
<b>1.3 Tyrosinkinase-Inhibitoren in der Krebstherapie.....</b>	<b>8</b>
<b>1.4 Rezeptortyrosinkinase Axl und die Rolle im Glioblastom .....</b>	<b>9</b>
<b>1.5 BMS-777607, LDC-41267 und MPCD-84111 .....</b>	<b>13</b>
<b>1.6 Zielsetzung der vorliegenden Studie.....</b>	<b>14</b>
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Material.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2 Zellbiologische Methoden.....</b>	<b>19</b>
2.2.1 <i>Zellkultur und Gliom-Zelllinien .....</i>	<i>19</i>
2.2.2 <i>Passagierung und Ernte der Zellen .....</i>	<i>20</i>
2.2.3 <i>Kryokonservierung und Auftauen der Zellen.....</i>	<i>20</i>
2.2.4 <i>Bestimmung und Einstellung der Zellzahl .....</i>	<i>21</i>
<b>2.3 Proteinbiochemische Methoden.....</b>	<b>21</b>
2.3.1 <i>Vorbereitung der Zellen und Isolierung der Proteine .....</i>	<i>21</i>
2.3.2 <i>Bestimmung der Proteinkonzentration .....</i>	<i>21</i>
2.3.3 <i>Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....</i>	<i>22</i>
2.3.4 <i>Western Blot.....</i>	<i>22</i>
2.3.5 <i>Immundetektion der Proteine und Bildentwicklung.....</i>	<i>23</i>
<b>2.4 Funktionelle Assays.....</b>	<b>24</b>
2.4.1 <i>MTT-Assay .....</i>	<i>24</i>
2.4.2 <i>CPP32-Assay .....</i>	<i>25</i>
2.4.3 <i>Boyden-Kammer-Assay.....</i>	<i>25</i>
<b>2.5 Sphäroid-Invasions-Assay .....</b>	<b>26</b>
2.5.1 <i>Vorbereitung der Zellen.....</i>	<i>26</i>
2.5.2 <i>Anfertigung der Hirnschnitte, Sphäroidplatzierung und Behandlung.....</i>	<i>27</i>
2.5.3 <i>Fixierung und Färbung von Hirnschnitten mit Sphäroiden .....</i>	<i>27</i>
2.5.4 <i>Konfokalmikroskopie und Auswertung .....</i>	<i>28</i>
<b>2.6 Xenogenes, orthotopes Tumormodell.....</b>	<b>28</b>
2.6.1 <i>Versuchstiere.....</i>	<i>28</i>

2.6.2	<i>Vorbereitung der Zellen</i> .....	29
2.6.3	<i>Stereotaktisch intrazerebrale Tumorzellimplantation</i> .....	29
2.6.4	<i>Magnetresonanztomographie und Auswertung</i> .....	30
2.6.5	<i>Versuchstiertötung, Perfusion und Gehirnexplantation</i> .....	31
<b>2.7</b>	<b>Histologische und immunhistologische Methoden</b> .....	<b>31</b>
2.7.1	<i>Anfertigung der Kryoschnitte</i> .....	31
2.7.2	<i>Hämatoxylin-Eosin-Färbung</i> .....	32
2.7.3	<i>Immunfluoreszenzfärbung von CD31 und Ki-67</i> .....	32
2.7.4	<i>Immunfluoreszenzfärbung von apoptotischen Zellen</i> .....	33
2.7.5	<i>Mikroskopie und Auswertung</i> .....	33
<b>2.8</b>	<b>Statistische Auswertung</b> .....	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>35</b>
3.1	<b>Ergebnisse der Western Blots</b> .....	<b>35</b>
3.2	<b>Ergebnisse der funktionellen Assays</b> .....	<b>36</b>
3.2.1	<i>Zellmorphologische Beobachtungen</i> .....	36
3.2.2	<i>MTT-Assay</i> .....	38
3.2.3	<i>CPP32-Assay</i> .....	40
3.2.4	<i>Boyden-Kammer-Assay</i> .....	41
3.3	<b>Ergebnisse des Sphäroid-Invasions-Assays</b> .....	<b>43</b>
3.4	<b>Ergebnisse des xenogenen, orthotopen Tumormodells</b> .....	<b>45</b>
3.4.1	<i>Intrakranielles Tumorstadium</i> .....	45
3.4.2	<i>Wachstumsmuster</i> .....	50
3.5	<b>Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen</b> .....	<b>51</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>56</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>66</b>
<b>6</b>	<b>Verzeichnisse</b> .....	<b>67</b>
6.1	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>67</b>
6.2	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>78</b>
6.3	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>80</b>
6.4	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>81</b>
	<b>Eidesstattliche Versicherung</b> .....	<b>82</b>
	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>84</b>
	<b>Publikationsliste</b> .....	<b>85</b>
	<b>Danksagung</b> .....	<b>86</b>

## ABSTRAKT

**Zielsetzung:** Die Rezeptortyrosinkinase Axl stellt einen bedeutenden Vermittler der Proliferation, Migration und Invasion der Gliomzellen dar. In der Mehrzahl der humanen Glioblastome findet sich eine Überexpression von Axl. Daher gilt Axl als potenzielles Angriffsziel in der Behandlung des Glioblastoms. In dieser Studie wurden die Effekte einer zielgerichteten Inhibierung von Axl durch die selektiven, niedermolekularen Tyrosinkinase-Inhibitoren BMS-777607, LDC-41267 und MPCD-84111 in Modellen des Glioblastoms *in vitro*, *ex vivo* und *in vivo* evaluiert.

**Methodik:** Die Axl-Inhibitoren wurden an den Gliom-Zelllinien SF126 und U118MG getestet. Die Effekte auf die Zellviabilität, Apoptose, Zellmigration und Invasion wurden mittels funktioneller Assays (MTT-Assay, CPP32-Assay, Boyden-Kammer-Assay, Sphäroid-Invasions-Assay) analysiert. Zur Testung der Axl-Inhibitoren unter *in vivo*-Bedingungen erfolgte die stereotaktische, intrazerebrale Implantation der Gliomzellen in CD1 Nu/Nu-Mäusen. Das intrakranielle Tumorwachstum wurde mittels MRT-Kontrollen beurteilt. Das Tumorgewebe wurde hinsichtlich der intratumoralen Proliferation, Apoptose und Vaskularisation durch Immunfluoreszenzfärbungen (Ki-67, ApopTag®, CD31) untersucht.

**Ergebnisse:** Die Behandlung mit BMS-777607, LDC-41267 und MPCD-84111 resultierte in einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität, der Zellmigration sowie der Invasion der Gliomzellen *in vitro* und *ex vivo*. BMS-777607 induzierte eine Reduktion des intrakraniellen Tumorwachstums von 56 % im Tumormodell SF126 sowie von über 90 % im Tumormodell U118MG *in vivo*. Weiterhin erzielte BMS-777607 eine Reduktion Ki-67-positiver Gliomzellen sowie einen signifikanten Anstieg ApopTag®-positiver Gliomzellen im Tumorgewebe. Unter LDC-41267 zeigte sich kein Effekt auf das Tumorwachstum *in vivo*. Tierversuche mit MPCD-84111 wurden aufgrund toxischer Effekte abgebrochen.

**Fazit:** BMS-777607, LDC-41267 und MPCD-84111 erzielten multiple Anti-Tumor-Effekte in Modellen des Glioblastoms. Unsere Studie zeigt, dass die zielgerichtete Inhibierung von Axl durch selektive, niedermolekulare Tyrosinkinase-Inhibitoren einen vielversprechenden Therapieansatz für Patienten mit Glioblastom darstellen könnte.

## ABSTRACT

**Purpose:** Multiple studies highlight the role of the receptor tyrosine kinase Axl as a relevant mediator of proliferation, migration and invasion of glioma cells. Overexpression of Axl was found in the majority of human glioblastomas. In conclusion, Axl is considered as a potential target in glioblastoma therapy. The aim of this study was to evaluate the effects of small molecule tyrosine kinase inhibitors BMS-777607, LDC-41267 and MPCD-84111 targeting Axl in glioblastoma models *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo*.

**Experimental Design:** Axl inhibitors were tested using glioma cells SF126 and U118MG. The impact on cell viability, apoptosis, migration and invasion was analyzed by functional assays (MTT assay, CPP32 assay, boyden chamber migration assay, orthotopic brain slice invasion assay). For *in vivo* experiments, glioma cells were implanted stereotactically into the brains of CD1 Nu/Nu mice. Tumor growth was measured using MRI. Proliferation, apoptosis and vascularization in the tumor tissue were investigated by immunohistochemistry (Ki-67, ApopTag®, CD31).

**Results:** Treatment with BMS-777607, LDC-41267 and MPCD-84111 resulted in a decreased cell viability, migration and invasion of SF126 and U118MG glioma cells *in vitro* and *ex vivo*. BMS-777607 induced a 56 % reduction of tumor growth in SF126 xenografts and a reduction of more than 90 % in U118MG xenografts *in vivo*. Furthermore, BMS-777607 caused a decrease of Ki-67-positive cells and an increase of ApopTag®-positive cells in the tumor tissue. Treatment with LDC-41267 showed no impact on tumor growth *in vivo*. Animal experiments with MPCD-84111 were discontinued because of observed toxicity.

**Conclusion:** BMS-777607, LDC-41267 und MPCD-84111 displayed multiple anti-tumor effects in glioblastoma models. Here we demonstrate that small molecule tyrosine kinase inhibitors targeting Axl could provide a promising treatment approach for patients with glioblastoma.

# 1 EINLEITUNG

Etwa 480.000 Menschen in Deutschland erkranken jedes Jahr neu an Krebs. Nach Erhebung des Zentrums für Krebsregisterdaten machen Krebserkrankungen des Zentralnervensystems (ZNS) hiervon ca. 1,5 % aus (1). Obwohl Hirntumoren selten auftreten, kommt ihnen aufgrund ihres potenziell gravierenden Verlaufs mit z. T. schwer kranken Patienten eine wichtige Bedeutung in der Medizin zu. Die Versorgung von Patienten mit Hirntumoren stellt für Neurochirurgen sowie Spezialisten anderer Fachgebiete eine Herausforderung dar.

## 1.1 Glioblastoma multiforme

Das Glioblastom (Glioblastoma multiforme, kurz GBM) stellt den häufigsten, malignen primären Hirntumor des Erwachsenen dar. Glioblastome machen ca. 16 % der primären Hirntumoren aus (2). Nach der WHO-Klassifikation der Tumoren des Zentralnervensystems wird das GBM als Grad IV eingestuft (3). Die Inzidenz des GBM in den USA wird auf 3,20 von 100.000 Einwohnern pro Jahr bei einer geschlechtsspezifischen Verteilung von 1,58 : 1 (männlich zu weiblich) geschätzt. Das durchschnittliche Lebensalter bei Diagnosestellung liegt bei 64 Jahren (4). Typischerweise tritt das GBM sporadisch auf. Es kann *de novo* (primäres GBM) oder im Rahmen eines Tumorprogresses aus Astrozytomen geringerer WHO-Grade (sekundäres GBM) entstehen (5). Als einzig belegter Risikofaktor für die Entstehung von Gliomen gilt ionisierende Strahlung (6). Nur selten sind Gliome hereditär bedingt (7). Die Klinik des GBM kann Cephalgie, epileptische Anfälle oder fokale-neurologische Defizite umfassen (8). Besteht der klinische Verdacht auf einen Hirntumor, stellt die kraniale Magnetresonanztomografie (MRT) die diagnostische Methode der Wahl dar. Die bildgebende Diagnostik kann durch die <sup>18</sup>F-Fluorethyltyrosin-Positronenemissionstomografie (FET-PET) oder die Magnetresonanzspektroskopie (MR-Spektroskopie) ergänzt werden. In der aktuellen Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie wird als Standardtherapie des neu diagnostizierten primären Glioblastoms bei Patienten bis zum 65 – 70. Lebensjahr die weitmöglichste Resektion des Tumors, gefolgt von Strahlen- und Chemotherapie mit Temozolomid nach sog. „Stupp-Schema“, empfohlen (9-11). Trotz intensiver Forschung ist die Prognose äußerst limitiert. Unter leitliniengerechter Therapie beträgt das mittlere Überleben ca. 14,6 Monate (11). Die Zwei-Jahres-Überlebensrate liegt bei 14 % (4). Die angestrebte

Komplettresektion ist der Teilresektion bzw. Biopsie hinsichtlich Überlebenszeit und progressionsfreiem Intervall überlegen (12, 13). Weiterhin hat das molekulargenetische Profil des GBM prognostische Bedeutung. Hier ist u. a. der Methylierungsstatus der Promoterregion des O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase-Gens (MGMT-Gen) zu erwähnen (14). Patienten mit GBM und methyliertem MGMT-Promoter zeigen ein signifikant besseres Ansprechen auf Temozolomid (mittleres Überleben: 21,7 Monate vs. 12,7 Monate) (15).

### **1.2 Invasives Wachstum des Glioblastoms**

Glioblastome zeichnen sich durch ein ausgeprägtes lokal-invasives Wachstum aus. Dies trägt wesentlich zur limitierten Prognose bei (16). Die Invasion durch Gliomzellen beschreibt einen komplexen Prozess, der die Ablösung (Detachment) aus dem Tumorzellverband, die Degradierung von Komponenten der Extrazellulärmatrix (EZM) und eine aktive Tumorzellmotilität beinhaltet. Gliomzellen sind in ihrem Migrationsverhalten dysreguliert, d. h. hochgradig migratorisch eingestellt (17-19). Sie infiltrieren das gesunde Hirnparenchym rasch und diffus (16). Nach der radikalen Resektion verbleiben disseminierte Gliomzellen außerhalb der makroskopisch sichtbaren Tumorgrenze im Hirnparenchym und induzieren typischerweise ein Rezidiv. In der Regel ist der Rezidiv-Tumor an den Resektionsrändern lokalisiert (20-22). Einzelne Gliomzellen können auch weit außerhalb der Resektionshöhle bis hin zur kontralateralen Hirnhemisphäre lokalisiert sein (22-24). Das sog. „Schmetterlingsglioblastom“ beschreibt die makroskopische Ausbreitung von einer Hemisphäre über das *Corpus callosum* bis in die kontralaterale Hemisphäre. Das invasive Wachstum des GBM und das limitierte Verständnis der zugrundeliegenden Tumorbiologie sind wesentliche Gründe für das langfristige Versagen der derzeit verfügbaren Therapiemodalitäten. Es ist daher von großer Bedeutung, neue zielgerichtete Therapiestrategien zu entwickeln, die das Überleben und die Lebensqualität der Patienten mit GBM verbessern.

### **1.3 Tyrosinkinase-Inhibitoren in der Krebstherapie**

Im Gegensatz zu den klassischen, zytotoxisch wirksamen Krebstherapeutika zielen aktuelle Therapiebestrebungen auf antiproliferative, antiangiogene oder antiinvasive Effekte ab. Die sog. „zielgerichtete Krebstherapie“ (*engl.* targeted therapy) beschreibt den Einsatz von modernen Pharmaka, die selektiv an molekularen Eigenschaften von Krebszellen ansetzen. Hierzu gehören



die sog. „small molecule tyrosine kinase inhibitors“ (smTKI, *engl.* für niedermolekulare Tyrosinkinase-Inhibitoren) (25). Rezeptortyrosinkinasen (RYKs) sind eine Gruppe von Transmembranrezeptoren, die eine intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne gemeinsam haben und an der Regulation diverser zellphysiologischer Prozesse beteiligt sind. Da sie bei Dysregulation in die Progression von Krebserkrankungen involviert sein können, stellen sie ein potenzielles Angriffsziel für die Therapie dar (26, 27).

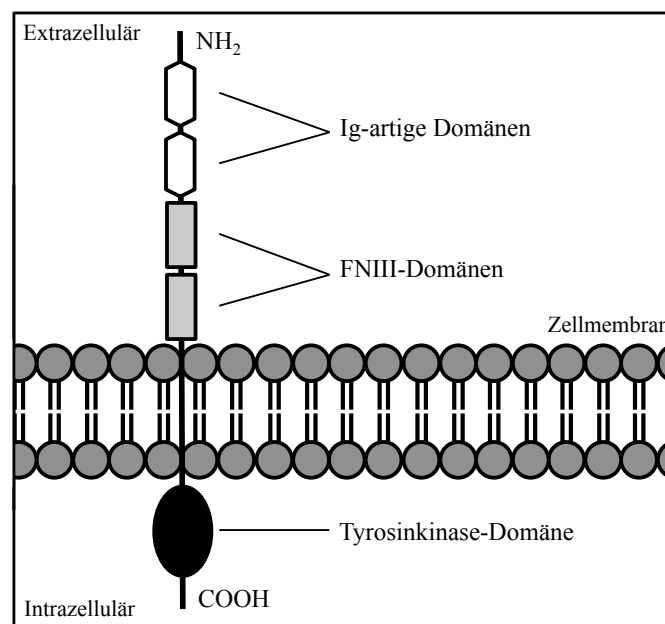
Tyrosinkinase-Inhibitoren können mit dem Adenosintriphosphat (ATP), der Kinase-Domäne oder den Substraten der RYKs kompetitiv konkurrieren. Weiterhin können sie als nichtkompetitive Antagonisten wirken oder ins Chaperon-System eingreifen. Gemeinsame Endstrecke ist die limitierte Phosphorylierung der Zielproteine (28). Einige Vertreter der smTKI sind sog. „Multikinase-Inhibitoren“ und sind in der Lage, verschiedene Tyrosinkinasen mit unterschiedlicher Selektivität zu inhibieren. Dies wird beispielsweise möglich, wenn sich die ATP-Bindungsstellen innerhalb der Kinase-Domänen verschiedener Tyrosinkinasen strukturell ähneln (29).

Tyrosinkinase-Inhibitoren sind heute ein wichtiger Bestandteil in der Therapie hämatologischer Krebserkrankungen (z. B. Imatinib/ Glivec<sup>®</sup> bei chronisch myeloischer Leukämie) sowie solider Krebserkrankungen (z. B. Erlotinib/ Tarceva<sup>®</sup> beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom oder Sunitinib/ Sutent<sup>®</sup> beim Nierenzellkarzinom) (30-32). Die zielgerichtete Therapie des Glioblastoms wird kontrovers betrachtet und ist Gegenstand aktueller Forschung. Bisher wurden nur wenige Pharmaka der *Targeted Therapies* in klinischen Studien erprobt, sie konnten die an sie gestellten Erwartungen jedoch nicht erfüllen (33). In einer Phase II-Studie zur Behandlung rezidivierter Glioblastome mit dem Multikinase-Inhibitor Sunitinib zeigte sich eine unzureichende Anti-Tumor-Wirkung bei hoher Toxizität (33, 34). Ziel gegenwärtiger Studien ist es, neue Angriffspunkte unter Berücksichtigung der spezifischen Tumorbilologie des GBM zu evaluieren. Als ein vielversprechendes Target wird die Rezeptortyrosinkinase Axl betrachtet (35, 36).

### **1.4 Rezeptortyrosinkinase Axl und die Rolle im Glioblastom**

Das Gen der Rezeptortyrosinkinase Axl wurde ursprünglich bei Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie identifiziert. Im Kontext der Entdeckung erhielt es seinen Namen, abgeleitet vom griechischen Begriff „anexelektó“ für „unkontrolliert“. Das Axl-Gen ist auf Chromosom 19 lokalisiert und kodiert für das 120 - 140 kDa große Protein (37-39).

Axl besteht aus einer extrazellulären Domäne, an die sein Ligand bindet, einer transmembranären Domäne sowie einer intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne. Die extrazelluläre Domäne ist strukturell typisch für Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie. Sie wird durch zwei immunglobulinartige Domänen sowie zwei Fibronectin III-Domänen gebildet (40, 41). In Abb. 1 wird die Struktur von Axl illustriert. Die später identifizierten RYKs Tyro-3 und Mer besitzen eine ähnliche Struktur und bilden mit Axl die Tyro-3-Axl-Mer-Familie (TAM-Familie) (42).



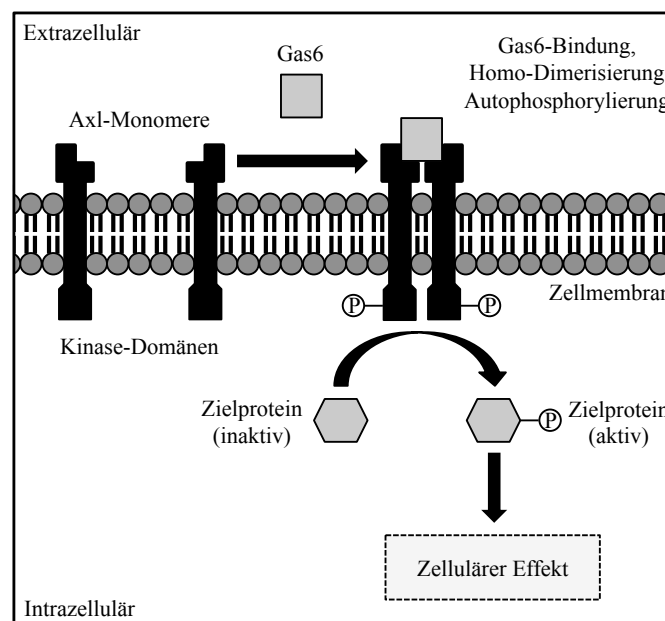
**Abb. 1: Schematische Darstellung der Struktur von Axl**

Die immunglobulinartigen Domänen (Ig-artige Domänen) und Fibronectin III-Domänen (FNIII-Domänen) befinden sich extrazellulär. Die Tyrosinkinase-Domäne befindet sich intrazellulär (40, 41).

Gas6 (*engl.* growth-arrest-specific gene-6) ist ein Vitamin K-abhängiges Protein und bildet einen natürlichen Liganden der TAM-Familie, wobei die höchste Bindungsaffinität für Axl besteht. Gas6 bindet an die immunglobulinartigen Domänen der Rezeptoren. Tyro-3 und Mer besitzen neben Gas6 das strukturähnliche Protein S als Liganden, welches jedoch nicht an Axl bindet (43, 44). Nach der Bindung von Gas6 kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors und zur lateralen Diffusion des Axl-Gas6-Komplexes. Benachbarte Axl-Gas6-Komplexe homo-dimerisieren und es resultiert die Autophosphorylierung der Tyrosingruppen. Im Ergebnis können bestimmte Zielproteine das nun biologisch aktive Axl (P-Axl, phosphoryliertes Axl)

binden, durch Phosphorylierung aktiviert werden und intrazelluläre Signalwege induzieren (45, 46). In Abb. 2 wird die Gas6-vermittelte Signaltransduktion durch Axl demonstriert.

Alternative Aktivierungsmechanismen umfassen die homophile Interaktion zwischen den Axl-Rezeptoren benachbarter Zellen, die Hetero-Dimerisierung oder den sog. „Crosstalk“ mit anderen RYKs (47-50). Die ligandenunabhängige Aktivierung erfolgt u. a. durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in glatter Muskulatur oder VEGF-A-vermittelt (*engl.* vascular endothelial growth factor-A) in Endothelzellen (51-55).



**Abb. 2: Schematische Darstellung der Gas6-vermittelten Signaltransduktion durch Axl**

Der Bindung von Gas6 an die extrazellulären Domänen folgen Homo-Dimerisierung und Autophosphorylierung der Axl-Monomere, sodass Zielproteine binden, durch Phosphorylierung aktiviert werden und die weitere Signalkaskade induzieren, die in einem zellulären Effekt mündet (45, 46).

Es existieren verschiedene Mechanismen zur Regulation des Axl-Signalwegs. Nach der Bindung von Gas6 wird das aktivierte Axl mono-ubiquitiniert, was seine lysosomale Degradation initiiert (52, 56). Eine Herabregulation durch zelluläre Phosphatasen wird diskutiert (57). Weiterhin existiert eine im Blut zirkulierende Form von Axl (*engl.* „soluble Axl“ oder kurz „sAxl“), die durch Proteolyse der extrazellulären Domäne entsteht. Gas6 bindet sAxl. Es wird vermutet, dass so die Interaktion des Liganden mit dem Rezeptor kompetitiv inhibiert wird (58, 59). Auf posttranskriptionaler Ebene findet eine Regulation durch spezifische microRNAs statt (60).

Weiterhin besitzt die Promotor-Region des Axl-Gens Erkennungsstellen für diverse Transkriptionsfaktoren (61). Schließlich wird die Hypomethylierung innerhalb der Promotor-Region mit einer Heraufregulierung der Axl-Expression assoziiert (62, 63).

Axl wird während der Embryonalentwicklung nahezu ubiquitär exprimiert. Eine Beteiligung des Axl-Rezeptors an der mesenchymalen und neuronalen Entwicklung wird vermutet (38, 41, 64). Die Aktivierung von Axl induziert zelluläre Signalkaskaden, die an der Regulation diverser zellulärer Prozesse beteiligt sind, die u. a. Proliferation, Zelldifferenzierung, Apoptose, Zellaggregation und -migration sowie Neovaskularisation umfassen. Die Effekte des Axl-Signalwegs sowie die Konsequenzen einer Herauf- oder Herabregulierung sind zell- bzw. gewebespezifisch (47, 65-68). Im adulten Organismus findet sich eine geringe Expression des Axl-Rezeptors. Stattdessen zeigt sich eine hohe Aktivität in diversen Krebszellen, u. a. in maligne entarteten epithelialen, mesenchymalen, hämatopoetischen und glialen Zelllinien (43, 69-71). Für multiple Tumorentitäten ist eine Überexpression von Axl nachgewiesen, so auch im Kolonkarzinom, Mammakarzinom, Prostatakarzinom, Schilddrüsenkarzinom, Bronchialkarzinom, malignen Melanom sowie im Glioblastom (69, 70, 72).

Das onkogene Potenzial von Axl erklärt sich durch seine Interaktion mit verschiedenen Signalwegen, die mit der Entstehung und Progression von Krebserkrankungen assoziiert sind. Hier ist die durch Axl induzierte Aktivierung des PI3K/ Akt-Signalwegs (PI3K, Phosphoinositid-3-Kinase; Akt, Proteinkinase B) sowie des MAP-Kinase-Signalwegs (MAP, *engl.* mitogen-activated protein) zu erwähnen (73-75). Diese Signalwege sind an der malignen Transformation von Zellen beteiligt (sog. Onkogene), da sie u. a. an der Regulation von Wachstum, Zellproliferation und Zellzyklus beteiligt sind. Der Axl-Signalweg induziert zudem die Heraufregulierung antiapoptotischer Proteine, wie z. B. Bcl-2 (*engl.* b-cell lymphoma 2) und die Inaktivierung proapoptotischer Proteine, wie z. B. BAD (*engl.* bcl-2-Antagonist of cell death) (76, 77). Weiterhin ist der Axl-Signalweg an der Regulation der FAK-Aktivität (FAK, *engl.* focal adhesion kinase) beteiligt. Der FAK-Signalweg ist von zentraler Bedeutung für die Vermittlung der Tumorzellinvasion im GBM (78, 79). Schließlich ist der Axl-Signalweg in die Regulation angiogenetischer Prozesse involviert (35). Nach der Entdeckung des Axl-Gens zeigte sich, dass es nur ein geringes onkogenes Potenzial besitzt. Als ein entscheidender Faktor für die Karzinogenese wird die Überexpression von Axl angesehen (37-39).

Die Überexpression von Axl wurde in der Mehrheit der Gliom-Zelllinien *in vitro* sowie in humanen Gliomproben nachgewiesen (36, 80). Die besondere Rolle des Axl-Signalwegs in der Tumorbilogie des GBM wurde erstmals nach seiner experimentellen Inhibierung deutlich, wobei sich multiple Anti-Tumor-Effekte zeigten. Die Etablierung einer dominant-negativen

Axl-Rezeptormutanten, d. h. einer trunkierten Variante des Rezeptors mit fehlender intrazellulärer Tyrosinkinasedomäne (sog. „AXL-DN-Zellen“ für dominant-negativ), resultierte im Glioblastom-Modell der Maus in einem reduzierten Tumorwachstum sowie in einem prolongierten Gesamtüberleben der Versuchstiere. Die AXL-DN-Zellen imponierten zudem durch einen Verlust ihrer Zellfortsätze, ihrer Zell-Zell-Kontakte sowie einer reduzierten migratorischen Aktivität *in vitro* und invasiven Aktivität *in vivo* (36).

Hutterer et al. untersuchten den Zusammenhang der Axl- und Gas6-Expressionslevel in humanem Gliomgewebe und prognostischen Faktoren in einer Patientenkohorte. Es zeigte sich, dass das hohe Expressionslevel von Axl sowie die Koexpression von Axl und Gas6 mit einem frühzeitigen Tumorprogress und einem reduzierten Gesamtüberleben von Patienten mit GBM assoziiert waren (80).

Weiterführende Studien zur Inhibierung des Axl-Signalwegs auf genetischer Ebene bestätigten seine zentrale Bedeutung im GBM und zeigten u. a. antiproliferative, antimigratorische, antiinvasive sowie apoptose-induzierende Effekte *in vitro* (71, 81). Ein zielgerichteter pharmakologischer Angriff des Axl-Rezeptors im GBM erscheint daher vielversprechend. Eine Inhibierung von Axl durch Substanzen der *Targeted Therapies* könnte eine effektive Erweiterung der bisherigen Behandlungsstrategien darstellen.

### 1.5 BMS-777607, LDC-41267 und MPCD-84111

Bei den smTKI BMS-777607, LDC-41267 und MPCD-84111 handelt es sich um Multikinase-Inhibitoren, die sich durch eine hohe Selektivität für Axl auszeichnen. BMS-777607 wurde ursprünglich als Inhibitor von c-Met (IC<sub>50</sub> = 3.9 nM, zellunabhängig) identifiziert. In späteren Studien zeigte sich jedoch, dass es eine höhere Selektivität für Axl besitzt (IC<sub>50</sub> = 1.1 nM, zellunabhängig). Weitere Targets von BMS-777607 sind Ron (*franz.* Recepteur d' Origine Nantais; IC<sub>50</sub> = 1.8 nM, zellunabhängig), Tyro-3 (IC<sub>50</sub> = 4.3 nM, zellunabhängig) und Mer (IC<sub>50</sub> = 14 nM, zellunabhängig) (82, 83). Schroeder et al. untersuchten die Effekte von BMS-777607 und zeigten eine reduzierte Proliferation der Zelllinien diverser Tumorentitäten *in vitro*, so auch für die Gliom-Zelllinie U87MG. Die Arbeitsgruppe zeigte zudem ein reduziertes Tumorwachstum im Tumormodell der Zelllinie GTL-16 (Adenokarzinom des Magens) *in vivo* (82). In Zusammenarbeit zwischen dem Max-Planck-Institut für Biochemie (Martinsried, Deutschland), Vichem Chemie Research Ltd. (Budapest, Ungarn) und dem Lead Discovery Center (LDC, Dortmund, Deutschland) wurde mit LDC-41267 ein weiterer smTKI

identifiziert, der durch eine hohe Selektivität für Axl, eine orale Bioverfügbarkeit und eine niedrige Toxizität *in vivo* charakterisiert ist. Es zeigte sich unter LDC-41267 eine signifikante Reduktion hepatischer Mikrometastasen *in vivo* (84). MPCD-84111 ist ein patentierter Axl-Inhibitor mit hoher Selektivität für Axl und c-Met (85, 86).

### 1.6 Zielsetzung der vorliegenden Studie

In unserer Studie evaluierten wir die Effekte einer zielgerichteten Inhibierung der Rezeptortyrosinkinase Axl durch die smTKI BMS-777607, LDC-41267 und MPCD-84111 in Modellen des Glioblastoms *in vitro*, *ex vivo* und *in vivo*. Aufgrund der hohen Selektivität für Axl wird nachfolgend die Bezeichnung „Axl-Inhibitoren“ verwendet.

Die Zielsetzung dieser Studie umfasste:

- die Kultivierung multipler Gliom-Zelllinien und die Untersuchung ihrer Expression von Axl und Phospho-Axl im Western Blot.
- die Evaluierung der Effekte der Axl-Inhibitoren auf die Zellviabilität, Apoptose, Zellmigration und invasiven Eigenschaften von Gliomzellen *in vitro* und *ex vivo*.
- die stereotaktische, intrazerebrale Implantation humaner Gliomzellen in Nacktmäuse und die Beurteilung der Effekte der Axl-Inhibitoren auf das intrakranielle Tumorstadium *in vivo* durch MRT-Kontrollen.
- die Untersuchung der Effekte der Axl-Inhibitoren auf die intratumorale Proliferation, Apoptose und Vaskularisation im Tumormodell mittels Immunfluoreszenzfärbungen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

Die Tierversuche dieser Studie erfolgten mit dem Einverständnis der Tierversuchskommission des Berliner Landesamtes für Gesundheit und Soziales (LaGeSo No. Aktenzeichen G 0146/13) sowie nach der Absolvierung eines Kurses zur Einführung in das tierexperimentelle Arbeiten.

### 2.1 Material

Die verwendeten Axl-Inhibitoren, Chemikalien und Substanzen, Kits, Antikörper, Apparaturen und Geräte, Verbrauchsmaterialien und Software sowie die Zusammensetzungen aller Medien, Gele, Puffer und Lösungen sind den Tab. 1 – 11 zu entnehmen. Die Axl-Inhibitoren wurden vom Max-Planck-Institut für Biochemie (Martinsried, Deutschland) zur Verfügung gestellt. BMS-777607 wurde ursprünglich von ShanHai Biochempartner Co., Ltd (Shanghai, China) mit einer Reinheit von > 98 % erworben. Eine unabhängige Qualitätskontrolle erfolgte mittels LC/MS-Analyse und NMR-Spektroskopie durch das Lead Discovery Center (LDC, Dortmund, Deutschland).

**Tab. 1:** Axl-Inhibitoren mit Molekülmasse und Bezugsquellen

Axl-Inhibitor	Molekülmasse	Bezugsquelle
BMS-777607	512,90 g/mol	Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Deutschland
LDC-41267	543,54 g/mol	Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Deutschland
MPCD-84111	616,66 g/mol	Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Deutschland

**Tab. 2:** Chemikalien und Substanzen mit Bezugsquellen

Chemikalie/ Substanz	Bezugsquelle
Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Benzylpenicillin-Natrium	Infectocillin® parenteral 5 Mega, Infectopharm Arzneimittel und Consilium GmbH, Heppenheim, Deutschland
Bepanthen® Augensalbe	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
BSA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Casein	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
CASYton	Roche Applied Science, Penzberg, Deutschland
DAPI	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
ddH <sub>2</sub> O	Merck Millipore, Billerica, USA
Desinfektionsmittel	Softasept® N, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
DiI-Reagenz	Life Technologies, Carlsbad, USA
DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Eindeckmedium (DAPI, Immunfluoreszenzfärbung)	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
Eindeckmedium (HE-Färbung)	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
Eindeckmedium (Invasions-Assay)	Immuno Mount, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA

## MATERIAL UND METHODEN

Eosin	Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland
Ethanol	Merck Millipore, Billerica, USA
Fibronektin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Gadopentetat-Dimeglumin	Magnevist® 0,5 mmol/ml, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
Gelatine	Gelatin from cold water fish skin, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Isofluran	FORENE, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
Isopropanol	Dr. K. Hollborn & Söhne GmbH & Co. KG, Leipzig, Deutschland
LDS-Puffer	Life Technologies, Carlsbad, USA
Lysepuffer	Pierce® RIPA Buffer, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Methanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Methocell	6g Carboxymethylcellulose, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Molekularmarker	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
MTT-Reagenz	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumchloridlösung	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
PBS	Life Technologies, Carlsbad, USA
PEG300	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PFA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Phosphatase-Inhibitoren	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
Ponceau-Lösung	Ponceau S Solution, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Protease-Inhibitoren	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
Streptavidin (peroxidasekonjugiert, 1:5.000 verdünnt angewendet)	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
TO-PRO®-3	Life Technologies, Carlsbad, USA
Tramadol (Tramadolhydrochlorid)	Tramal®, Grünenthal GmbH, Aachen, Deutschland
Trypsin EDTA	Life Technologies, Carlsbad, USA
Xylol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

**Tab. 3:** Kits mit Bezugsquellen

<b>Kit</b>	<b>Bezugsquelle</b>
ApopTag® Red <i>In Situ</i> Apoptosis Detection Kit	Merck Millipore, Billerica, USA
Caspase-3/CPP32 Colorimetric Assay Kit	BioVision, Inc., Milpitas, USA
Pierce® BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA

**Tab. 4:** Antikörper mit Spezifitäten, Wirtstieren, Verdünnungen und Bezugsquellen

<b>Spezifität</b>	<b>Wirtstier</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Axl	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling Technology, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Beta-Aktin, (peroxidasekonjugiert)	Kaninchen	1:25.000	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
CD31	Ratte	1:50	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Kaninchen (biotinkonjugiert)	Esel	1:1.000	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
Kaninchen (fluoresceinkonjugiert)	Esel	1:200	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
Kaninchen (peroxidasekonjugiert)	Esel	1:10.000	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
Ki-67	Kaninchen	1:50	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
P-Axl	Kaninchen	1:500	Cell Signaling Technology, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Ratte (konjugiert mit Cy3)	Esel	1:200	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland



**Tab. 5:** Apparaturen und Geräte mit Bezugsquellen

<b>Apparatur/ Gerät</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Apparaturen/ Boyden-Kammer-Assay	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Apparaturen/ Gelelektrophorese und Western Blot	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Brutschrank	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
TECAN-Mikrotiterplatten-Photometer	Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz
Entwicklungsapparat	Synoptics Ltd, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Gewebeschneider	McIlwain™, Stoelting Co., Wood Dale, USA
Konfokalmikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Kryostat	MICROM International GmbH, Walldorf, Deutschland
Lichtmikroskop	Nikon Corporation, Tokyo, Japan
MRT	Bruker Corporation, Billerica, USA
Rotator	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Schüttelmaschine	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland
Sicherheitswerkbank	Hera Safe, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
Stereotaxierahmen	David Kopf Instruments, Tujunga, USA
Thermoblock	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Wasserbad	Störk-Tronic Störk GmbH & Co. KG, Stuttgart, Deutschland
Zellzählgerät	Roche Applied Science, Penzberg, Deutschland
Zentrifuge	HERAEUS MEGAFUGE 1.0R, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
Zentrifuge [2]	HERAEUS FRESCO 17, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA

**Tab. 6:** Verbrauchsmaterialien mit Bezugsquellen

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Deckgläserchen	Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Gel Blotting-Filterpapier	Whatman plc, Maidstone, Vereinigtes Königreich
Kanülen	Becton, Dickinson and Company (BD), Franklin Lakes, USA
Kryo-Container	Mr. Frosty™ Freezing Container, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
Kryoröhrchen	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Kultureinsätze	Transparent PET membrane, 0,4 µm pore size, 1,6x10 <sup>6</sup> pores/cm <sup>2</sup> , Becton, Dickinson and Company (BD), Franklin Lakes, USA
Kulturflaschen	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Mikroliterspritze	Hamilton Company USA, Reno, USA
Mikroreaktionsgefäße	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Mikrotiterplatten	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Objektträger	SuperFrost™ Plus, MICROM International GmbH, Walldorf, Deutschland
PVDF-Membranen	Immobilon-P Membran, Merck Millipore, Billerica, USA
Zentrifugenröhrchen	Falcon®, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA

**Tab. 7:** Software mit Bezugsquellen

<b>Software</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Adobe Photoshop	Adobe Systems, San Jose, USA
AxioVision	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
GeneSnap	SynOptics Communications Inc., Santa Clara, USA
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
ImageJ	National Institutes of Health, Bethesda, USA
Magellan™	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Microsoft Office	Microsoft Corporation, Redmond, USA
ParaVision	Bruker Corporation, Billerica, USA

**Tab. 8:** Zusammensetzungen der Medien mit Bezugsquellen

<b>Medium</b>	<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Hungermedium für Gliomzellen	DMEM:	500 ml	Life Technologies, Carlsbad, USA
	D-Glucose	4,5 g/l	
	L-Glutamin (2 mM)	5 ml	
	Natriumpyruvat (100 mM)	5 ml	
	FKS	1 ml	Life Technologies, Carlsbad, USA
Kulturmedium für Gliomzellen	DMEM:	500 ml	s.o.
	D-Glucose	4,5 g/l	
	L-Glutamin (2 mM)	5 ml	
	Natriumpyruvat	5 ml	
	FKS	50 ml	
	Penicillin/ Streptomycin	5 ml	Life Technologies, Carlsbad, USA
Kulturmedium für Hirschnitte	BME	12,5 ml	Life Technologies, Carlsbad, USA
	Glucose (20 %)	1,5 ml	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
	L-Glutamin (200 mM)	0,5 ml	Life Technologies, Carlsbad, USA
	MEM	23 ml	Life Technologies, Carlsbad, USA
	Penicillin/ Streptomycin	0,5 ml	s.o.
	PS	12,5 ml	Life Technologies, Carlsbad, USA
Transportmedium für Hirschnitte	L-Glutamin (200 mM)	1 ml	s.o.
	MEM	99 ml	s.o.

**Tab. 9:** Zusammensetzungen des Trenn- und Sammelgels mit Bezugsquellen

<b>Komponente</b>	<b>6%iges Trenngel (10 ml)</b>	<b>4%iges Sammelgel (5 ml)</b>	<b>Bezugsquelle</b>
30 % Acrylamid (37,5:1)	2,0 ml	0,65 ml	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
10 % APS	50 µl	25 µl	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
ddH <sub>2</sub> O	5,4 ml	3,05 ml	s.o.
10 % SDS w/v	0,1 ml	0,05 ml	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
TEMED	10 µl	5 µl	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	-	1,25 ml	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 ml	-	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA

**Tab. 10:** Zusammensetzungen der Puffer und Lösungen mit Bezugsquellen

<b>Puffer/ Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Blockierlösung	5 g BSA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
	100 ml TBS-Tween-Lösung	s.u.
Elektrophoresepuffer	192 mM Glycin	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
	25 mM Tris-Base	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
	0,1 % SDS in H <sub>2</sub> O	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
TBS-Tween-Lösung	1000 ml TBS	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
	0,5 ml Tween	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Transferpuffer	700 ml ddH <sub>2</sub> O	s.o.
	200 ml Methanol	s.o.
	100 ml Transferpuffer 10x	s.u.
Transferpuffer 10x	144 g Glycine	s.o.
	30,3 g Tris-Base	s.o.

**Tab. 11:** Zusammensetzung der Narkoselösung von 10 ml mit Bezugsquellen

<b>Komponente</b>	<b>Menge in ml</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Aqua ad iniectabilia	8,5	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Ketaminhydrochlorid (Ketavet <sup>®</sup> 100 mg/ml)	0,7	Pfizer Inc., New York City, USA
Xylazinhydrochlorid (Rompun <sup>®</sup> 2 %)	0,8	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland

## 2.2 Zellbiologische Methoden

### 2.2.1 Zellkultur und Gliom-Zelllinien

Die Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die Zellkultivierung erfolgte in unbeschichteten, aus Polystyrol gefertigten Kulturflaschen mit Kulturmedium. Alle Reagenzien wurden vor Zellkontakt im Wasserbad auf 37 °C temperiert. Die Inkubation der Zellen fand im Brutschrank bei 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre, 99 % Luftfeuchtigkeit und 37 °C statt. Die Zentrifugation einer Zellsuspension wurde stets mit 1300 rcf für 7 min bei Raumtemperatur vollzogen. Für die Versuche wurden kryokonservierte Zellen verwendet. Die Zellen wurden adhärent als Monolage kultiviert. Die optische Konfluenz und Morphologie der Zellen wurden täglich lichtmikroskopisch untersucht. Das Kulturmedium wurde je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen nach 48 bis 72 h ausgetauscht. Alle Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % kultiviert, bevor sie für nachfolgende Versuche

verwendet wurden. Folgende Gliom-Zelllinien wurden in der vorliegenden Arbeit experimentell untersucht: GL261 (murine Gliom-Zelllinie), SF126, SF767, T98G, U87MG, U118MG, U373MG, U1242MG (jeweils humane Glioblastom-Zelllinien). Für die SF126- und U118MG-Zellen wurde im Juni 2014 eine Authentifizierung mittels STR-Analyse durchgeführt, in der die Reinheit der Zelllinien bestätigt wurde (LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland).

### 2.2.2 *Passagierung und Ernte der Zellen*

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von ca. 80 % passagiert, um eine durch die Kontakthemmung verlangsamte Zellteilungsrate zu verhindern. Zur Ernte der Zellen wurde das Kulturmedium zunächst mittels einer Pasteurpipette abgesaugt. Es folgten die Waschung der Zellen durch die Zugabe von 10 ml PBS, die anschließende Schwenkung der Kulturflasche und die Absaugung des PBS. Nun wurden 4 ml Trypsin-EDTA zugeführt und die Zellen für 5 min im Brutschrank inkubiert. Nach dem Abklopfen der Kulturflasche wurde die vollständige Ablösung der Zellen lichtmikroskopisch kontrolliert und die Trypsinierung durch die Zugabe von 8 ml Kulturmedium mit FKS inaktiviert. Die Zellsuspension wurde anschließend zentrifugiert. Nach der Absaugung des Überstandes wurde das Zellpellet in 1 ml Kulturmedium oder PBS je nach Versuchsprotokoll resuspendiert. Zur Passagierung wurde eine Teilmenge der Zellen in Kulturflaschen mit 15 ml vorgelegtem Kulturmedium ausgesät und inkubiert. Alle Mengenangaben beziehen sich auf T75-Kulturflaschen.

### 2.2.3 *Kryokonservierung und Auftauen der Zellen*

Vor dem Einfrieren der Zellen wurden diese gemäß *Punkt 2.2.2* mit PBS gewaschen, trypsinisiert und zentrifugiert. Nach der Absaugung des Überstandes wurde das Zellpellet je nach Zelldichte in einer geeigneten Menge gekühltem Einfriermedium aus FKS und 10 % DMSO resuspendiert, jeweils 1 ml der Zellsuspension in Kryoröhrchen überführt und für 24 h in einem mit Isopropanol gefüllten Kryo-Container bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen in Flüssigstickstoff bei  $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$  kryokonserviert. Das Auftauen kryokonservierter Zellen erfolgte im Wasserbad bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Anschließend wurde die Zellsuspension in Zentrifugenröhrchen überführt, im Verhältnis 1:10 mit Kulturmedium verdünnt, zentrifugiert und ausgesät.

### 2.2.4 *Bestimmung und Einstellung der Zellzahl*

Die Bestimmung der Zellzahl wurde mit dem elektronischen Zellzählgerät CASY TT nach den Herstellerangaben durchgeführt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen geerntet und im Verhältnis 1:10 mit Kulturmedium verdünnt. Anschließend wurden 100 µl der Zellsuspension in 10 ml CASYton gelöst und zur Quantifizierung in das Zellzählgerät überführt. Die für die Versuche definierten Zellzahlen resultierten aus einer Verdünnung der Zellsuspension mit einer entsprechenden Menge Kulturmedium oder mit PBS je nach Versuchsprotokoll.

## 2.3 **Proteinbiochemische Methoden**

Die Untersuchung der Expression von Axl und P-Axl in den Gliomzellen erfolgte mittels Western Blot.

### 2.3.1 *Vorbereitung der Zellen und Isolierung der Proteine*

Zur Proteinisolierung wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen zweimal mit eiskühlem PBS gewaschen. Den Zellen wurde anschließend 200 µl eiskühler Lysepuffer (RIPA-Puffer) mit dem Zusatz von Protease- und Phosphatase-Inhibitoren jeweils im Verhältnis 1:100 zugeführt und die Kulturflaschen danach für 5 min auf Eis platziert. Die Zellen wurden danach mit einem Schaber vom Kulturgefäßboden abgelöst. Das Zelllysate wurde in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und mehrfach mittels Pipette und 25G Normalkanüle aufgezogen. Das Zelllysate wurde daraufhin mit 1400 g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert, um vorhandene Zelltrümmer zu pelletieren. Der resultierende Überstand mit den enthaltenen Proteinen wurde vom Pellet getrennt und für die folgenden Proteinbestimmungen und Western Blot-Analysen aliquotiert. Die langfristige Lagerung der Proteinlysate erfolgte bei –80 °C.

### 2.3.2 *Bestimmung der Proteinkonzentration*

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des Pierce® BCA Protein Assay Kits nach den Herstellerangaben. Vor der Konzentrationsbestimmung wurden die Proteinlysate im Verhältnis 1:10 mit Lysepuffer verdünnt. Als Blindlösung diente Lysepuffer. Zur Erstellung einer Standardkurve wurde bovines Serumalbumin in den Konzentrationen 2000 µg/ml,

1500 µg/ml, 1000 µg/ml, 750 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml und 0 µg/ml verwendet. Die photometrische Messung erfolgte mit dem TECAN-Mikrotiterplatten-Photometer bei 562 nm unter Anwendung der Software Magellan™. Nach der Konzentrationsbestimmung wurden die Proteinlysate mit Lysepuffer verdünnt, sodass gleiche Proteinkonzentrationen in einer Vergleichsgruppe bestanden.

### 2.3.3 *Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)*

Zur Auftrennung der in den Lysaten enthaltenen Proteine auf der Basis ihrer Molekülmasse wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Zunächst wurde das Polyacrylamid-Gel vorbereitet. Nach dem Aufbau der Gelapparatur aus zwei Glasplatten und einem Fixierahmen wurde ein 6%iges Trenngel gegossen und mit 200 µl Isopropanol zur Glättung der Oberfläche beschichtet. Das Isopropanol wurde abgegossen, sobald das Trenngel nach ca. 20 min polymerisiert war. Im Anschluss wurde ein 4%iges Sammelgel über das Trenngel gelegt und mit einem Kamm zur Bildung von zehn Geltaschen bestückt. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm entfernt und das fertige Gel in einer mit Elektrophoresepuffer gefüllten Elektrophoresekammer montiert. Anschließend wurde eine Lösung aus 950 µl 4x LDS-Puffer und 50 µl β-Mercaptoethanol vorbereitet und den Lysaten im Verhältnis 1:4 zugeführt, bevor diese für 5 min bei 95 °C in einem Thermoblock denaturiert und anschließend auf Raumtemperatur temperiert wurden. Im Folgenden wurden die Geltaschen mit 200 µg Protein und 10 µl des Molekularmarkers beladen. Die SDS-PAGE wurde bis zum Erreichen des Trenngels durch die Proteine bei 100 V und anschließend bei 150 V durchgeführt. Sie wurde beendet, sobald die im LDS-Puffer enthaltenen Triphenylmethanfarbstoffe den Boden des Gels nach ca. 1 Stunde erreichten. Schließlich wurde der Elektrophoresepuffer abgegossen und das Gel vorsichtig aus der Elektrophoresekammer entfernt.

### 2.3.4 *Western Blot*

Zur Transferierung der Proteine vom Polyacrylamid-Gel auf eine Trägermembran wurde die Methode des Western Blots im Tank-Blot-System angewendet. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Trägermembranen aus Polyvinylidenfluorid (PVDF-Membranen) mit einer Porengröße von 0,45 µm verwendet. Die PVDF-Membran wurde zunächst für 30 s in Methanol gelegt und danach für 2 min in H<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurden PVDF-Membran,

Whatman-Filterpapiere sowie zwei Schwämme für 15 min im Transferpuffer equilibriert. Das Polyacrylamid-Gel wurde für 5 min equilibriert. Schließlich wurde das Western Blot-Sandwich zusammengefügt und in einer mit Transfer-Puffer gefüllten Western Blot-Kammer montiert. Der Protein-Transfer fand bei 0,4 A für 70 min unter Eiskühlung statt. Schließlich wurde der Transferpuffer abgossen und die PVDF-Membran aus dem Western Blot-Sandwich entfernt. Zur Überprüfung des Transfer-Erfolges wurde die PVDF-Membran für 30 s in Ponceau-Lösung gelegt und anschließend bis zur Sichtung der Proteinbanden in H<sub>2</sub>O gewaschen.

### 2.3.5 *Immundetektion der Proteine und Bildentwicklung*

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurden diese durch Antikörper detektiert. Zunächst wurde die PVDF-Membran zur Reduktion unspezifischer Bindungen des Primärantikörpers blockiert. Hierzu wurde sie mit der Proteinseite nach innen eingerollt, in ein Zentrifugenröhrchen eingefügt und dieses mit 5 ml der Blockierlösung befüllt. Die Blockierung erfolgte über Nacht bei 4 °C in einem Rotator. Anschließend wurde die Blockierlösung abgossen und das Zentrifugenröhrchen mit 3 ml der Primärantikörperlösung befüllt. Die PVDF-Membran wurde nun erneut über Nacht bei 4 °C im Rotator inkubiert. Es folgten drei Waschschriffe von jeweils 10 min, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Für jeden Waschschriff wurden die Zentrifugenröhrchen mit ca. 50 ml der TBS-Tween-Lösung befüllt. Nach dem Abgießen der TBS-Tween-Lösung wurde die PVDF-Membran mit 3 ml der Sekundärantikörperlösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur im Rotator inkubiert und im Anschluss dreimal für jeweils 10 min gewaschen. Nach Verwendung des biotinkonjugierten Sekundärantikörpers erfolgten an dieser Stelle die Inkubation der PVDF-Membran mit 3 ml der Streptavidin-HRP-Lösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur sowie drei weitere Waschschriffe für jeweils 10 min. Die Kombination aus Biotin und Streptavidin führt zu einer Signalamplifikation, sodass geringere Proteinmengen detektierbar werden. Die verwendeten Antikörper sind in Tab. 4 dargestellt und wurden vor ihrer Verwendung in Blockierlösung verdünnt. Auch Streptavidin-HRP wurde mit Blockierlösung verdünnt. Anschließend folgte die Bildentwicklung. Die PVDF-Membran wurde dem Zentrifugenröhrchen entnommen und auf einer Klarsichtfolie fixiert. Die ECL-Lösungen wurden bei Raumtemperatur equilibriert und anschließend angemischt. Nun wurde die PVDF-Membran mit dem Entwicklungsreagenz benetzt und für 5 min lichtgeschützt inkubiert. Die Bildentwicklung wurde mit einem Entwicklungsapparat unter Anwendung der Software GeneSnap durchgeführt. Zur

Qualitätskontrolle vergleichbarer Proteinmengen auf der PVDF-Membran wurde diese mit einem Antikörper gegen Beta-Aktin inkubiert. Der Nachweis von Beta-Aktin erfolgte aufgrund seiner Funktion als Haushaltsgen (87). Zur Lösung der gebundenen Antikörper wurde die PVDF-Membran dreimal in kochendes Leitungswasser für jeweils 10 min gelegt. Es folgten drei Waschschrte in TBS-Tween-Lösung für jeweils 10 min. Die Blockierung der PVDF-Membran erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einer Schüttelmaschine. Anschließend wurde die PVDF-Membran für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur mit dem peroxidasekonjugierten Beta-Aktin-Antikörper inkubiert. Nach dreimaliger Waschung der PVDF-Membran erfolgte die Bildentwicklung.

## 2.4 Funktionelle Assays

Die Axl-Inhibitoren wurden für die funktionellen Assays in DMSO und DMEM gelöst und in einer Konzentration von 12,5  $\mu\text{M}$  appliziert.

### 2.4.1 MTT-Assay

Zur Evaluierung des Effekts der Axl-Inhibitoren auf die Zellviabilität wurden die Zelllinien GL261, SF126, U87MG und U118MG im MTT-Assay analysiert. Die Zellen wurden hierfür auf Flachboden-Mikrotiterplatten ausgesät (4000 Zellen pro Vertiefung). Nach einer Inkubation von 24 h erfolgte die Behandlungsphase. Es wurden jeweils 11  $\mu\text{l}$  der Axl-Inhibitor-Lösungen alle 12 h zum Kulturmedium hinzugegeben. Die Zellen wurden während der Behandlungsphase lichtmikroskopisch fotodokumentiert und zwischen den Behandlungen im Brutschrank inkubiert. Die MTT-Stammlösung wurde nach Herstellerangaben angesetzt, aliquotiert und bis zur Verwendung lichtgeschützt bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die MTT-Assays wurden 48 h nach erstmaliger Applikation der Axl-Inhibitoren durchgeführt. Hierfür wurde das Kulturmedium aus den Vertiefungen der Mikrotiterplatten abgesaugt und diese mit je 100  $\mu\text{l}$  PBS gewaschen. In jede Vertiefung wurden anschließend 100  $\mu\text{l}$  einer MTT-PBS-Lösung im Verhältnis 1:10 pipettiert. Nach dreistündiger Inkubation wurde die MTT-PBS-Lösung entfernt und durch 100  $\mu\text{l}$  einer DMSO-Isopropanol-Lösung im Verhältnis 1:1 ersetzt. Die Mikrotiterplatten wurden für 10 min auf einer Schüttelmaschine platziert und die Lösungen jeder Vertiefung anschließend suspendiert. Die photometrische Messung der optischen Dichte (OD-Wert) wurde mit dem TECAN-Mikrotiterplatten-Photometer bei 570 nm unter Anwendung der Software Magellan<sup>TM</sup>



durchgeführt. Die Auswertung erfolgte als relativer Vergleich der ermittelten OD-Werte behandelter Zellen gegenüber denen der Kontrollproben in Prozent.

### 2.4.2 *CPP32-Assay*

Zur Evaluierung des Effekts der Axl-Inhibitoren auf das Apoptoseverhalten wurde die Zelllinie SF126 im Apoptose-Assay analysiert. Der Apoptose-Assay wurde mit dem Caspase-3/CPP32 Colorimetric Assay Kit durchgeführt. Die Zellen wurden zunächst bis zur Konfluenz von ca. 80 % in T25-Kulturflaschen kultiviert und mit PBS gewaschen. Zur Synchronisierung des Zellzyklus wurden die Zellen nun für 24 h in 5 ml des Hungermediums inkubiert. Anschließend wurde das Hungermedium erneuert und mit 100 µl der Axl-Inhibitor-Lösungen versetzt. Nach einer Inkubation von 12 h wurden die Zellen geerntet und gezählt. Es erfolgte die Einstellung auf ca.  $1,75 \times 10^6$  Zellen in 50 µl eisgekühltem Lysepuffer des CPP32-Assay Kits. Die weitere Durchführung des Apoptose-Assays erfolgte nach den Herstellerangaben. Für die Versuche wurden 200 µg Protein verwendet. Die photometrische Messung wurde mit dem TECAN-Mikrotiterplatten-Photometer bei 405 nm unter Anwendung von Magellan™ durchgeführt. Die Auswertung erfolgte als relativer Vergleich der ermittelten OD-Werte behandelter Zellen gegenüber denen der Kontrollproben in Prozent.

### 2.4.3 *Boyden-Kammer-Assay*

Zur Evaluierung des Effekts der Axl-Inhibitoren auf das Migrationsverhalten wurden die Zelllinien SF126 und U118MG im Boyden-Kammer-Assay analysiert. Zur Definierung des oberen Kompartiments wurden Kultureinsätze mit einer mikroporösen Membran (Porengröße von 8 µm) verwendet. Die Kultureinsätze wurden auf Flachboden-Mikrotiterplatten überführt, die das untere Kompartiment bildeten. Zunächst wurden die Kultureinsätze mit Fibronectin (10 µg/ml in PBS) beschichtet. Hierzu wurden die Kultureinsätze mit der Fibronectin-PBS-Lösung befüllt und für 2 h inkubiert. Die Fibronectin-PBS-Lösung wurde anschließend abgesaugt. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatten wurden mit jeweils 110 µl FCM (*engl.* fibroblast-conditioned medium) befüllt. FCM enthält u. a. von Fibroblasten sezernierte Wachstumsfaktoren, welche im Boyden-Kammer-Assay als Migrationsstimulanzien verwendet wurden (88). Die Zellen wurden wie beschrieben geerntet. Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet in 200 µl DMEM ohne FKS resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Die Kultureinsätze wurden jeweils mit 50.000 Zellen befüllt. Die Axl-Inhibitor-Lösungen (100 µl)

wurden nach der Aussaat der Zellen in die Kultureinsätze pipettiert. Die Zellen wurden nach der Behandlung für 3 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Fixierung, Färbung und Zählung der migrierten Zellen. Zellen, die auf der Oberseite der Membran verblieben, wurden mit einem Wattestäbchen entfernt. Die migrierten Zellen wurden 5 min in Methanol fixiert. Die Kultureinsätze wurden nun 5 min getrocknet und dann mit einer DAPI-PBS-Lösung im Verhältnis 1:100 zur Färbung der Zellkerne befüllt. Dann wurden sie in mit PBS gefüllte Flachboden-Mikrotiterplatten überführt und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Pro Membran wurden 4 Gesichtsfelder betrachtet (10x Objektiv) und die dort sichtbaren Zellen ausgezählt. Die Auswertung wurde mit der Software ImageJ realisiert und erfolgte als relativer Vergleich der ermittelten Zellzahlen behandelter Zellen gegenüber denen der Kontrollproben in Prozent.

### 2.5 Sphäroid-Invasions-Assay

Zur Evaluierung des Effekts der Axl-Inhibitoren auf das Invasionsverhalten wurde die Zelllinie U118MG im Sphäroid-Invasions-Assay analysiert.

#### 2.5.1 *Vorbereitung der Zellen*

Die Zellen wurden wie beschrieben kultiviert. Anschließend erfolgte die Färbung der Zellen mit dem Cyaninfarbstoff 1,1'-dioctadecyl-3,3,3'-tetramethylindocarbocyanin-perchlorat (DiI). Hierfür wurde das Kulturmedium abgesaugt und durch eine steril filtrierte Lösung aus 10 ml Kulturmedium (T75-Kulturflasche) mit einem Zusatz von 75 µl DiI-Reagenz ersetzt. Nach einer Inkubation von 24 h im Brutschrank erfolgte die Generierung multizellulärer Tumorsphäroide. Hierzu wurden die Zellen zunächst geerntet und gezählt. Schließlich wurden die Zellen auf Rundboden-Mikrotiterplatten ausgesät. Jede Vertiefung wurde mit 30 µl der Zellsuspension (ca. 7000 Zellen) sowie einem Zusatz von 100 µl einer 2:10 Methocell-Kulturmedium-Lösung befüllt. Das visköse Methocell (Carboxymethylcellulose) verhindert ein schnelles Absinken der Zellen auf den Boden der Vertiefungen und begünstigt das Formieren zu Sphäroiden. Nach einer Inkubation von weiteren 24 h wurden die makroskopisch sichtbaren Sphäroide auf die Hirnschnitte platziert. Für die Versuche wurden ausschließlich Sphäroide mit einem Durchmesser von 300 – 500 µm und rundlicher Kontur verwendet.

### 2.5.2 *Anfertigung der Hirnschnitte, Sphäroidplatzierung und Behandlung*

Für den Sphäroid-Invasions-Assay wurden Mäuse-Jungtiere (C57BL/6NCrl, Charles River Laboratories, Wilmington, USA) im Alter von 3 – 6 Tagen verwendet. Die Versuchstiere wurden unmittelbar nach der Trennung vom Muttertier dekapitiert und die Gehirne anschließend mit einer chirurgischen Pinzette entnommen. Nach der Spaltung der Gehirne entlang der *Fissura longitudinalis cerebri* mit einem Skalpell wurden unter Verwendung eines Gewebeschniders sagittale, 300 µm dicke Hirnschnitte jeder Hirnhemisphäre angefertigt. Die Hirnschnitte wurden für wenige Minuten in einer mit dem Transportmedium gefüllten Petrischale gelagert, bis die Platzierung der Sphäroide erfolgte. Die Kultivierung der Hirnschnitte mit den Sphäroiden erfolgte in Flachboden-Mikrotiterplatten. Jede Vertiefung wurde mit 0,5 ml des Kulturmediums für Hirnschnitte gefüllt und mit einem Kultureinsatz bestückt. Die Kultureinsätze besitzen eine mikroporöse Membran als Trägerplatte für die Hirnschnitte, die in das Kulturmedium innerhalb der Vertiefungen eingetaucht wird und die Ernährung gewährleistet. Die Hirnschnitte wurden durch eine Pasteurpipette aufgenommen und in die Kultureinsätze überführt. Schließlich erfolgte die Platzierung der Sphäroide. Hierzu wurde ein Sphäroid durch eine Pipette aufgenommen und auf die Oberfläche eines Hirnschnittes zwischen dem *Corpus callosum* und dem *Striatum* aufgebracht. In den Kultureinsätzen vorhandenes Medium wurde vollständig abgesaugt. Die Hirnschnitte mit den Sphäroiden wurden im Folgenden 24 h inkubiert. Das Kulturmedium für die Hirnschnitte wurde alle 48 h erneuert. Die Behandlungsphase wurde 24 h nach der Platzierung der Sphäroide begonnen. Es wurden jeweils 100 µl der Axl-Inhibitor-Lösungen alle 12 h für 7 d zum Kulturmedium hinzugegeben. Die Axl-Inhibitoren wurden für den Sphäroid-Invasions-Assay in DMSO und DMEM gelöst und in der Konzentration 12,5 µM appliziert. Zwischen den Behandlungen wurden die Hirnschnitte mit den Sphäroiden im Brutschrank inkubiert.

### 2.5.3 *Fixierung und Färbung von Hirnschnitten mit Sphäroiden*

Nach der Behandlungsphase wurden die Hirnschnitte mit den Sphäroiden fixiert und gefärbt. Vor der Fixierung mit 4%igem PFA in PBS wurden die Kultureinsätze auf neue Mikrotiterplatten gesteckt. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatten erhielten 1 ml, die Kultureinsätze weitere 0,5 ml PFA-PBS-Lösung. Die Hirnschnitte wurden nun für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden sie unter Verwendung eines Pinsels auf neue Mikrotiterplatten

mit 0,5 ml vorgelegtem PBS überführt. Danach folgte die dreimalige Waschung der Hirnschnitte in PBS auf einer Schüttelmaschine für jeweils 5 min. Zur eindeutigen Identifikation der Hirnschnittgrenzen während der Konfokalmikroskopie erfolgte die Färbung mit dem Farbstoff TO-PRO®-3. Hierfür wurden 1 ml einer TO-PRO®-3-PBS-Lösung im Verhältnis 1:10.000 in jede Vertiefung pipettiert und die Hirnschnitte für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während und nach der Färbung wurde unter lichtgeschützten Bedingungen gearbeitet. Schließlich wurden die Hirnschnitte dreimal in PBS sowie einmal in Wasser auf einer Schüttelmaschine für jeweils 5 min gewaschen. Die Lagerung der Hirnschnitte erfolgte in PBS, lichtgeschützt im Kühlschrank bei 4 °C.

### 2.5.4 *Konfokalmikroskopie und Auswertung*

Die Auswertung des Sphäroid-Invasions-Assays erfolgte mittels Konfokalmikroskopie. Diese ermöglichte eine dreidimensionale Ausmessung der Distanzen zwischen invadierten Gliomzellen und Sphäroidverbund. Die Mikroskopie wurde am Folgetag der Färbung mit TO-PRO®-3 durchgeführt, um einen Verlust der Signalintensität zu vermeiden. Vor der mikroskopischen Untersuchung wurden die Hirnschnitte mit den Sphäroiden auf Deckgläschen überführt und eingedeckt. Die Auswertung erfolgte als absoluter Vergleich der gemessenen Distanzen der invadierten Gliomzellen zur Grenze des Sphäroids.

## 2.6 **Xenogenes, orthotopes Tumormodell**

Die Effekte der Axl-Inhibitoren auf das Tumorzellwachstum wurden anhand eines xenogenen, orthotopen Tumormodells mit MRT-Kontrollen untersucht. Die Zelllinien SF126 und U118MG wurden hierfür stereotaktisch intrazerebral in die Versuchstiere implantiert.

### 2.6.1 *Versuchstiere*

Für das Tumormodell wurden weibliche, thymusaplastische Nacktmäuse (CD1 Nu/Nu, Charles River Laboratories, Wilmington, USA) im Alter von ca. 6 – 10 Wochen mit einem Körpergewicht von 20 – 28 g verwendet. Die Haltung der Versuchstiere erfolgte unter pathogenfreien Bedingungen in Polycarbonat-Käfigen zu maximal je fünf Tieren mit kontrollierter Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit sowie einem 12-stündigen

Tag-Nacht-Zyklus. Nestmaterial in Form von Papierstreifen und Kunststoffrohren wurde zur Verfügung gestellt. Futter und Trinkwasser wurden nicht autoklaviert und *ad libitum* angeboten. Die Betreuung der Versuchstiere erfolgte durch ausgebildete Tierpfleger. Nach der Operation wurden die Versuchstiere durch im Trinkwasser beigemishtes Tramadol (15 mg/kg KG) analgisiert und täglich hinsichtlich Körpergewicht und Verhalten beurteilt. Folgende Abbruchkriterien resultierten in einer vorzeitigen Tötung der Versuchstiere:  $\geq 20\%$  Körpergewichtsverlust, zunehmende motorische Unruhe oder Apathie, neurologische Defizite wie z. B. Hemiplegie. Die Behandlung mit den Axl-Inhibitoren wurde je nach Zelllinie entweder 3 d (SF126) oder 7 d (U118MG) nach Tumorzellimplantation aufgrund unterschiedlicher Wachstumsparameter begonnen. Die Axl-Inhibitoren wurden alle 12 h bis zum Tag 14 nach Tumorzellimplantation appliziert, indem jeweils 0,15 ml der Axl-Inhibitor-Lösungen intraperitoneal injiziert wurden. Die Axl-Inhibitoren wurden für das Tumormodell in DMSO und PEG300 gelöst und in den Konzentrationen 30 – 100 mg/kg Körpergewicht (KG) verabreicht.

### 2.6.2 Vorbereitung der Zellen

Die Zellen wurden wie beschrieben kultiviert, geerntet und gezählt. Nach der Zentrifugation der Zellsuspension wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml PBS (SF126) oder DMEM ohne FKS (U118MG) resuspendiert. Die für die Tumorzellimplantationen erforderlichen Zellzahlen unterschieden sich bei den verwendeten Zelllinien SF126 und U118MG aufgrund ihrer unterschiedlichen Wachstumsparameter und sind in Tab. 12 dargestellt.

**Tab. 12:** Zelllinien mit zu implantierenden Zellzahlen

Zelllinie	Eingestellte Zellzahl	Verdünnung in	Implantierte Zellen
SF126	$2 \times 10^7/\text{ml}$	PBS	20.000 in 1 $\mu\text{l}$
U118MG	$1 \times 10^8/\text{ml}$	DMEM ohne FKS	500.000 in 5 $\mu\text{l}$

### 2.6.3 Stereotaktisch intrazerebrale Tumorzellimplantation

Zunächst erfolgte die intraperitoneale Injektion von 0,1 ml der Narkoselösung pro 10 g KG zur Anästhesie. Zum Augenschutz während der Narkose wurde Bepanthen® Augensalbe aufgetragen. Alle Versuchstiere erhielten 0,1 ml Benzylpenicillin-Natrium als Injektion in den *Musculus quadriceps femoris* zur Infektionsprophylaxe. Eine hinreichende Narkosetiefe wurde durch das Ausbleiben des Interdigitalisreflexes bestätigt und die Köpfe der Versuchstiere im Anschluss horizontal im Stereotaxierahmen fixiert. Der Desinfektion der Kopfhaut folgte eine ca. 1 cm

lange Inzision in der Längsachse des Kopfes durch eine chirurgische Schere unter Freilegung der Schädelkalotte. Die Gliomzellen wurden im Bereich des Caudatuskopfes der rechten Hirnhemisphäre implantiert. Hierfür wurden die Wundränder zunächst gespreizt und das Bregma als basaler Orientierungspunkt aufgesucht. Die Applikation der Zellen erfolgte über eine Mikroliterspritze. Diese wurde im Voraus dreimal mit 70%igem Ethanol und anschließend dreimal mit PBS gespült. Anschließend wurde die Mikroliterspritze mit 1 µl (SF126) bzw. 5 µl (U118MG) der Zellsuspension befüllt und schließlich in der Halterung des Stereotaxierahmens eingespannt. Mit den Stereotaxieschrauben wurde die Mikroliterspritze über dem Bregma platziert und 1 mm nach rostral sowie 2 mm nach lateral rechts verschoben. Die Schädelkalotte wurde am Implantationspunkt mit einer 23 G 1'' Normalkanüle trepaniert. Die Nadel der Mikroliterspritze wurde dann zunächst 4 mm ins Hirnparenchym eingebracht und daraufhin 1 mm zurückgestellt, um eine Tasche für die zu implantierenden Zellen zu schaffen. Die Applikation von 1 µl (SF126) bzw. 5 µl (U118MG) Zellsuspension erfolgte im Anschluss kleinschrittig innerhalb eines Zeitraums von 5 min. Nach einer Wartezeit von 5 min wurde die Mikroliterspritze innerhalb von weiteren 5 min vorsichtig aus dem Hirnparenchym entfernt. Die Operationswunde wurde durch eine kontinuierliche Hautnaht verschlossen. Zur späteren Identifikation wurden die Versuchstiere durch Ohrlochungen markiert. Bis zum Erwachen der Versuchstiere wurden diese hinsichtlich Bewusstseinsquantität kontrolliert sowie zur Vermeidung von Hypothermie in ihrem Käfig auf einer Wärmeplatte platziert.

### 2.6.4 *Magnetresonanztomographie und Auswertung*

14 Tage nach der Tumorzellimplantation wurden Messungen an einem 7-Tesla-Ganzkörper-MRT für Kleintiere in T1-Gewichtung zur Überwachung der Tumorprogression durchgeführt. Die MRT-Untersuchungen fanden im neurowissenschaftlichen Forschungszentrum (NWFZ) der Charité – Universitätsmedizin Berlin statt. Die Versuchstiere erhielten zunächst eine intravenöse Injektion von 0,2 ml des Kontrastmittels Magnevist® (Gadopentetat-Dimeglumin) und wurden durch die inhalative Applikation von 1,5 – 2 % Isofluran in einem Gasgemisch aus 30 % molekularem Sauerstoff und 70 % Distickstoffoxid anästhesiert. Das Kontrastmittel wurde zuvor mit isotonischer Natriumchloridlösung im Verhältnis 1:5 verdünnt. Anschließend wurden die Versuchstiere unter Aufrechterhaltung der Anästhesie in einer Halterung innerhalb des MRT-Tunnels fixiert. Während der MRT-Messungen wurden eine ausreichende Narkosetiefe durch ein Monitoring der

Atemfrequenz kontrolliert und die Versuchstiere durch den Kontakt zu einem Schlauchsystem mit Warmwasserzufuhr vor Hypothermie bewahrt. Datenerfassung und Bildverarbeitung erfolgten mit der Software ParaVision. Nach den MRT-Untersuchungen wurden die Tumorgößen mit der Software ImageJ kalkuliert. Die Auswertung erfolgte als absoluter Vergleich der im MRT ermittelten Tumorgößen behandelter Versuchstiere gegenüber denen der Kontrollgruppe.

### 2.6.5 Versuchstiertötung, Perfusion und Gehirnexplantation

Die Versuchstiertötung erfolgte nach den MRT-Untersuchungen am 14. postoperativen Tag. Hierfür wurden die Versuchstiere zunächst gemäß *Punkt 2.6.3* anästhesiert und anschließend mit einer chirurgischen Schere total sternotomiert sowie laparotomiert. Die Rippenbögen wurden distal durchtrennt und die vordere Thoraxwand entfernt. Zur Perfusion des großen Blutkreislaufes wurden die Versuchstiere auf der rechten Seite liegend fixiert, der linke Ventrikel durch eine Kanüle punktiert und dann 10 ml PBS intrakardial injiziert. Um den venösen Blutabfluss zu gewährleisten, wurde das rechte Atrium zuvor inzidiert. Der Perfusionserfolg wurde durch ein Erblassen der inneren Organe wie Leber und Darm überprüft. Schließlich folgte die Dekapitation der Versuchstiere durch eine chirurgische Schere. Nach dem Abziehen der Kopfhaut unter Freilegung der Schädelkalotte wurde diese entlang der *Sutura sagittalis* aufgetrennt und die obere Schädeldecke durch eine chirurgische Pinzette entfernt, sodass das Gehirn nach Durchtrennung aller sichtbaren Hirnnerven vollständig entnommen werden konnte. Die Gehirne wurden in Kryoröhrchen überführt und vorrübergehend in Flüssigstickstoff gelagert. Die langfristige Lagerung der Gehirne erfolgte bei  $-80\text{ °C}$ .

## 2.7 Histologische und immunhistologische Methoden

### 2.7.1 Anfertigung der Kryoschnitte

Für die Färbungen wurden feingewebliche Schnitte unter Verwendung eines Kryostats angefertigt. Vor Beginn des Schneidevorgangs wurden die Gehirne in 2%iger Gelatine eingebettet und an ihrem Okzipitalpol im Kryostaten fixiert, sodass die Schnittrichtung von rostral nach okzipital erfolgte. Anschließend wurden koronare, 20  $\mu\text{m}$  dicke Kryoschnitte aus dem Tumorgewebe bei etwa  $-20\text{ °C}$  hergestellt. Die Kryoschnitte wurden an Objektträger

gebunden, für wenige Minuten bei Raumluft getrocknet und während des weiteren Schneidevorgangs im Kryostaten gelagert. Die langfristige Lagerung der Kryoschnitte erfolgte bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Die Fixierung der Kryoschnitte erfolgte erst unmittelbar vor den Färbungen. Die gesammelten Kryoschnitte jedes Tumors wurden in drei gleichmäßig große Gruppen eingeteilt. Diese wurden als rostrale und okzipitale Tumorgrenzen sowie als Tumorzentrum definiert.

### 2.7.2 *Hämatoxylin-Eosin-Färbung*

Vor der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) wurden die Kryoschnitte in mit Methanol gefüllte Glasküvetten überführt und für 5 min bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  fixiert. Dann folgte dreimaliges Waschen der Kryoschnitte in PBS auf einem Schüttler für jeweils 5 min. Zur Durchführung der HE-Färbung wurde ein Standardprotokoll befolgt. Zunächst wurde die Färbung der Kryoschnitte in Hämatoxylin für 3 min und das anschließende Bläuen durch Spülung unter fließendem Leitungswasser für weitere 2 min durchgeführt. Danach erfolgte die Färbung in Eosin für 30 s. Nach einem erneuten Spülschritt in Leitungswasser für 15 s wurden die Kryoschnitte zunächst in 70%igem Ethanol für 20 s und dann in einer aufsteigenden Ethanolreihe (80 %, 96 %, 100 %) für jeweils 1 min dehydriert. Im Anschluss wurde zweimal für jeweils 1 min in Xylol geklärt. Schließlich wurden die HE-gefärbten Kryoschnitte unter Verwendung eines Eindeckmediums eingedeckt, bei Raumtemperatur getrocknet und gelagert.

### 2.7.3 *Immunfluoreszenzfärbung von CD31 und Ki-67*

Ein Antikörper gegen murines CD31 (*engl.* cluster of differentiation 31) wurde zur Visualisierung von intratumoralen (CD31-positiven) Endothelzellen verwendet (89, 90). Ein weiterer Antikörper wurde gegen humanes Ki-67 eingesetzt. Die Expression von Ki-67 ist mit Zellproliferation assoziiert (91). Der verwendete Antikörper wies keine Kreuzreaktivität gegen murines Ki-67 auf. Vor Beginn der Färbung wurden die Kryoschnitte analog *Punkt 2.7.2* fixiert und dreimal in PBS gewaschen. Die Immunfluoreszenzfärbung von CD31 und Ki-67 erfolgte simultan. Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tab. 4 dargestellt und wurden vor ihrer Verwendung in 0,5%iger Casein-PBS-Lösung verdünnt. Zur Reduktion unspezifischer Bindungen wurden die Kryoschnitte vor dem Auftragen der Antikörper in 1%iger Casein-PBS-Lösung für 30 min bei Raumtemperatur blockiert. Nach dem Auftragen von  $50\text{ }\mu\text{l}$  der Primärantikörperlösung wurden die Kryoschnitte für 2 h inkubiert. Die Inkubation wurde



stets in einer angefeuchteten, lichtundurchlässigen Färbekammer bei Raumtemperatur durchgeführt. Es folgten drei Waschschrte in 0,5%iger Casein-PBS-Lösung von jeweils 5 min, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Danach wurden die Kryoschnitte mit 50 µl der Sekundärantikörperlösung für weitere 1,5 h inkubiert. Die Kryoschnitte wurden zuletzt lichtgeschützt dreimal in PBS sowie einmal in Leitungswasser für jeweils 5 min gewaschen und schließlich unter Verwendung von Eindeckmedium mit DAPI gegengefärbt und eingedeckt. Die Lagerung der gefärbten Kryoschnitte erfolgte lichtgeschützt bei 4 °C. Bei allen Immunfluoreszenzfärbungen wurden Negativkontrollen von Tumorgewebe angefertigt, um unspezifische Antikörperbindungen weitestgehend auszuschließen. Hierzu wurde das beschriebene Färbeprotokoll befolgt, dabei jedoch auf den Primärantikörper verzichtet.

### 2.7.4 *Immunfluoreszenzfärbung von apoptotischen Zellen*

Die Immunfluoreszenzfärbung apoptotischer Zellen wurde mit dem ApopTag® Red *In Situ* Apoptosis Detection Kit realisiert. Die Fixierung der Kryoschnitte und Färbung der apoptotischen Zellen wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die Eindeckung der Kryoschnitte mit Medium (DAPI), gemäß dem im *Punkt 2.7.3* beschriebenen Protokoll.

### 2.7.5 *Mikroskopie und Auswertung*

Die Mikroskopie der gefärbten Kryoschnitte wurde mit dem computergestützten, inversen Forschungsmikroskop Axio Observer.Z1 mit Fluoreszenz-System und konnektierter Digitalkamera durchgeführt. Die Digitalaufnahmen wurden mit der Software AxioVision bearbeitet. Aus jeder Behandlungsgruppe wurden drei Tumoren mikroskopiert. Pro Tumor wurden neun gefärbte Kryoschnitte für die Betrachtung herangezogen. Dabei handelte es sich um jeweils drei Kryoschnitte aus der rostralen und okzipitalen Tumorgrenze sowie aus dem Tumorzentrum. Die HE- bzw. DAPI-Färbung ermöglichte die Differenzierung des Tumors vom übrigen Hirnparenchym. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden am Folgetag der Färbung mikroskopiert, um einen Verlust der Signalintensität auszuschließen. Zur Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen wurden abhängig von der Tumorgöße drei bis fünf nicht überlappende Untersuchungsfelder des Tumorrandes sowie zwei bis drei Untersuchungsfelder des Tumorrinneren aufgenommen (20x Objektiv). Dies entspricht ca. 60 Digitalaufnahmen pro Tumor. Bei der Einstellung von Untersuchungsfeldern der Tumorränder wurde auf ein

Verhältnis von ca. 2:1 zwischen Tumorfläche und nichttumorösem Hirnparenchym geachtet. Ausschließlich die Tumorfläche wurde in die Auswertung einbezogen. Die Auswertung erfolgte mit ImageJ. CD31-positive Zellen wurden als Endothelzellen definiert. Einzelne CD31-positive Endothelzellen und Endothelzellcluster mit oder ohne Lumen, die eindeutig separiert von benachbarten CD31-positiven Signalen vorlagen, wurden als jeweils ein Mikrogefäß ausgezählt und vermessen. ApopTag®-positive Zellen wurden als apoptotische Zellen definiert und ausgezählt. Alle ausgezählten oder vermessenen Objekte wurden stets in Relation zur zuvor vermessenen Tumorfläche angegeben. Die Mikroskopie der HE-Färbungen erfolgte innerhalb weniger Tage nach der Färbung. Für die Auswertung wurden drei bis fünf Untersuchungsfelder des Tumorrandes (ca. 40 Digitalaufnahmen pro Tumor, 10x Objektiv) einbezogen. Die Tumoren wurden hinsichtlich des invasiven Wachstums ins Hirnparenchym betrachtet.

### **2.8 Statistische Auswertung**

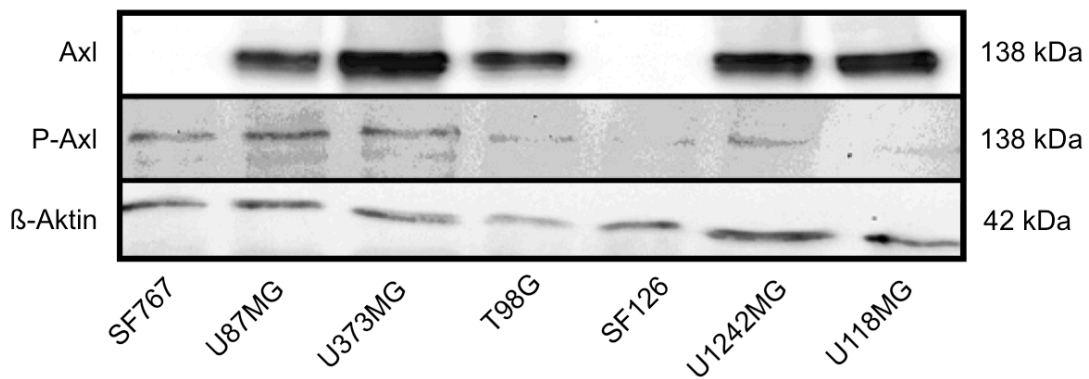
Für die statistische Auswertung wurde die Software GraphPad Prism verwendet. Zur Signifikanztestung wurden der t-Test sowie die Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließender Bonferroni-Korrektur (Konfidenzniveau: 95 %) durchgeführt. Ein  $p$ -Wert  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant definiert. Die Auswertung der Western Blots erfolgte semiquantitativ. Die CPP32-Assays erfolgten in Duplikaten. Die MTT-Assays und Sphäroid-Invasions-Assays erfolgten mindestens in Triplikaten. Für die Boyden-Kammer-Assays wurden mindestens 6 (U118MG) bzw. 10 (SF126) Parallelproben angesetzt. Die Tierversuche erfolgten mit mindestens 3 (SF126) bzw. 4 (U118MG) Tieren pro Vergleichsgruppe. Mittels der Immunfluoreszenzfärbungen wurden 2 Tiere (Kontrollgruppe) bzw. 3 Tiere (behandelte Gruppen) untersucht. Bei den Versuchstieren lagen zu Beginn der Experimente keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Alter und Körpergewicht vor. Die MRT-Untersuchungen der Versuchstiere sowie die Mikroskopie und Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen erfolgten verblindet.

### 3 ERGEBNISSE

Das Ziel dieser Studie war die Evaluierung der zielgerichteten Inhibierung von Axl durch BMS-777607, LDC-41267 und MPCD-84111 in Modellen des Glioblastoms. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Studie grafisch dargestellt. Die Grafiken wurden mit Microsoft PowerPoint und GraphPad Prism erstellt. Bei den dargestellten Werten handelt es sich jeweils um das arithmetische Mittel  $\pm$  Standardabweichung mit Markierungen für statistisch signifikante Unterschiede. Die Axl-Inhibitoren wurden in den Grafiken mit „BMS“, „LDC“ und „MPCD“ abgekürzt.

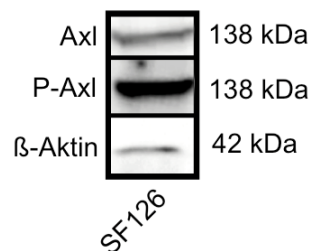
#### 3.1 Ergebnisse der Western Blots

Die Gliom-Zelllinien SF767, U87MG, U373MG, T98G, SF126, U1242MG und U118MG wurden zur Charakterisierung des Expressionsverhaltens hinsichtlich Axl und P-Axl im Western Blot semiquantitativ analysiert. Zunächst wurde ein peroxidasekonjugierter Sekundärantikörper zur Immundetektion verwendet (Abb. 3). Die Intensität der Signale für Axl variierte in den getesteten Gliom-Zelllinien. Starke Signale waren in den Zelllinien T98G, U87MG, U118MG, U373MG und U1242MG detektierbar. Die Zelllinien SF126 und SF767 wiesen schwache Signale auf. Signale für P-Axl waren in jeder Zelllinie erkennbar. In einem zweiten Versuch wurde ein biotinkonjugierter Sekundärantikörper und Streptavidin (peroxidasekonjugiert) verwendet (Abb. 4). Diese Kombination erzeugt eine Signalamplifikation, sodass geringere Proteinnengen detektiert werden können. Hierbei zeigten sich auch in der Zelllinie SF126 deutliche Signale für Axl und P-Axl.



**Abb. 3: Axl-Expression in multiplen Gliom-Zelllinien *in vitro***

Western Blot der Zelllinien SF767, U87MG, U373MG, T98G, SF126, U1242MG und U118MG zur Charakterisierung des Expressionsverhaltens hinsichtlich Axl und P-Axl. Hier wurde ein peroxidasekonjugierter Sekundärantikörper verwendet. Es wurden jeweils 200 µg der isolierten Proteine jeder Zelllinie aufgetragen. Axl besitzt eine Molekülmasse von ca. 138 kDa. Beta-Aktin (ca. 42 kDa) wurde aufgrund seiner Funktion als Haushaltsgen detektiert.



**Abb. 4: Axl-Expression der SF126-Zellen *in vitro***

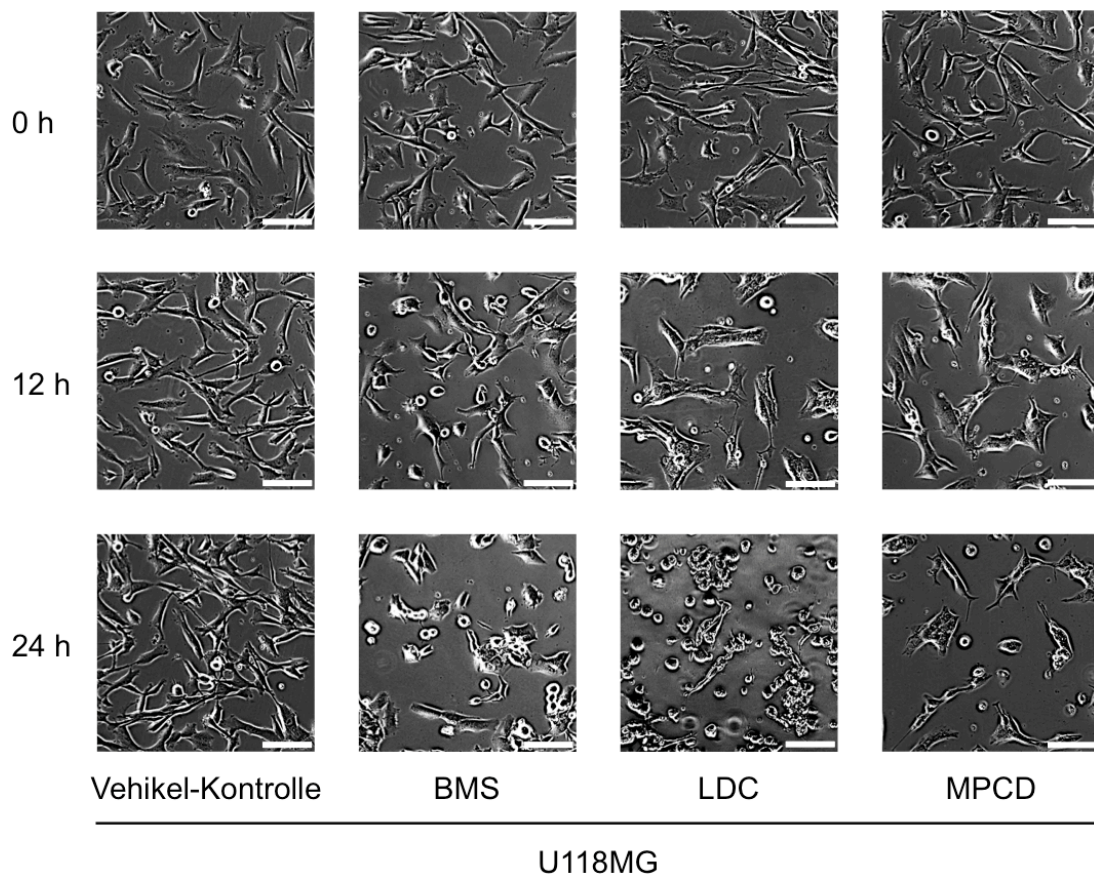
Western Blot der Zelllinie SF126 zur Charakterisierung des Expressionsverhaltens hinsichtlich Axl und P-Axl. Hier wurde ein biotinkonjugierter Sekundärantikörper und Streptavidin verwendet. Es wurden 200 µg der Proteine aufgetragen.

## 3.2 Ergebnisse der funktionellen Assays

### 3.2.1 Zellmorphologische Beobachtungen

Zur Charakterisierung des Effekts von BMS-777607, LDC-41267 und MPCD-84111 auf die Zellmorphologie wurde die Zelllinie U118MG während der Behandlungsphase im Phasenkontrast-Verfahren fotodokumentiert. Es zeigte sich, dass die Axl-Inhibitoren eine

veränderte Zellmorphologie induzieren. In Abb. 5 sind repräsentative, mikroskopische Ausschnitte dargestellt. Unter Standardkulturbedingungen imponierten die Gliomzellen als adhärente, fibroblastenartige Zellen mit multiplen Zellfortsätzen. Ein geringer Anteil der Zellpopulation besaß eine abgerundete Form ohne Zellfortsätze. Nach der Behandlung mit BMS-777607, LDC-41267 und MPCD-84111 zeigte sich ein vermehrtes Auftreten abgerundeter, vom Kulturflaschenboden abgelöster Zellen. Weiterhin zeigte sich eine Reduktion der Zellfortsätze und Zell-Zell-Kontakte im Vergleich zur Vehikel-Kontrollgruppe. Die Zelldichte war nach 12 h bzw. nach 24 h sichtbar reduziert. Diese Veränderungen waren bereits nach 12 h zu beobachten. Nach 24 h zeigte sich ein stärkerer Effekt, insbesondere nach der Behandlung mit LDC-41267.



**Abb. 5: Repräsentative Phasenkontrast-Aufnahmen der U118MG-Zellen *in vitro***

Zelllinie U118MG unter BMS-777607, LDC-41267 und MPCD-84111 im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle nach 12 h und 24 h (20x Objektiv). Die Axl-Inhibitoren wurden in DMSO und DMEM gelöst und in einer Konzentration von 12,5  $\mu\text{M}$  einmalig appliziert. Der Maßstabsbalken kennzeichnet 10  $\mu\text{m}$ .

3.2.2 MTT-Assay

Die Zelllinien SF126, U118MG, U87MG und GL261 wurden mittels MTT-Assay analysiert, um den Effekt von BMS-777607, LDC-41267 und MPCD-84111 auf die Zellviabilität zu untersuchen. Die Axl-Inhibitoren erzielten in einer Konzentration von 12,5  $\mu$ M eine Reduktion der Zellviabilität von über 50 % in allen getesteten Gliom-Zelllinien (Abb. 6 - 9). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Die Gliom-Zelllinien zeigten ein vergleichbar starkes Therapie-Ansprechen. Infolge dieser Beobachtungen wurden die Axl-Inhibitoren in den weiterführenden Experimenten in der Konzentration von 12,5  $\mu$ M appliziert.

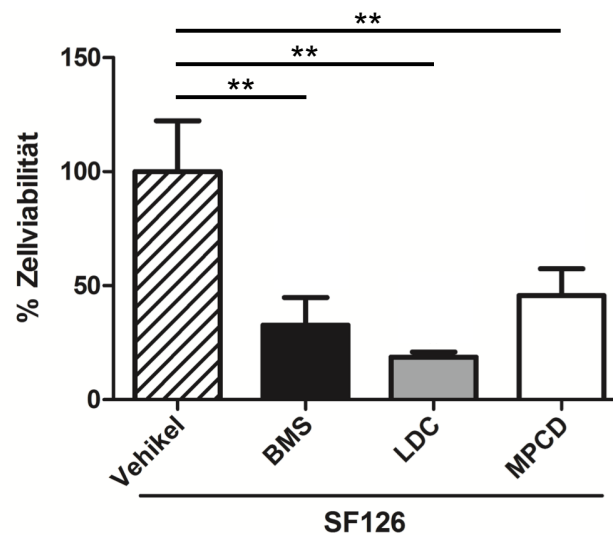


Abb. 6: Zellviabilität der SF126-Zellen *in vitro*

MTT-Assay der Zelllinie SF126 unter BMS-777607, LDC-41267 und MPCD-84111 im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle nach 48 h. Die Axl-Inhibitoren wurden in DMSO und DMEM gelöst und in einer Konzentration von 12,5  $\mu$ M alle 12 h appliziert. (\*\*  $p < 0,01$ )

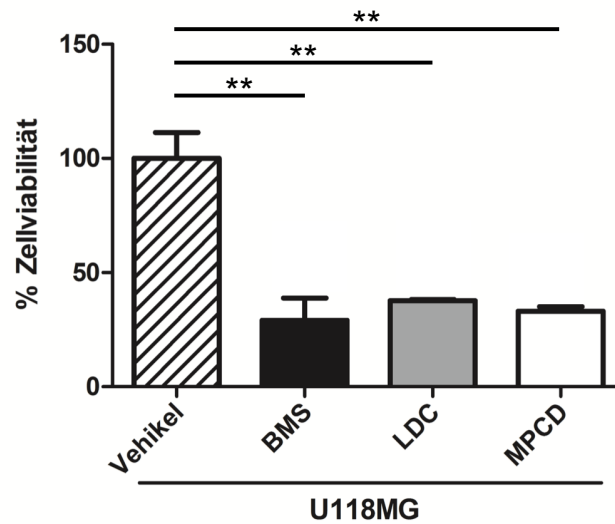


Abb. 7: Zellviabilität der U118MG-Zellen *in vitro*

MTT-Assay der Zelllinie U118MG unter BMS-777607, LDC-41267 und MPCD-84111 im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle nach 48 h. Die Axl-Inhibitoren wurden in DMSO und DMEM gelöst und in einer Konzentration von 12,5  $\mu\text{M}$  alle 12 h appliziert. (\*\*  $p < 0,01$ )

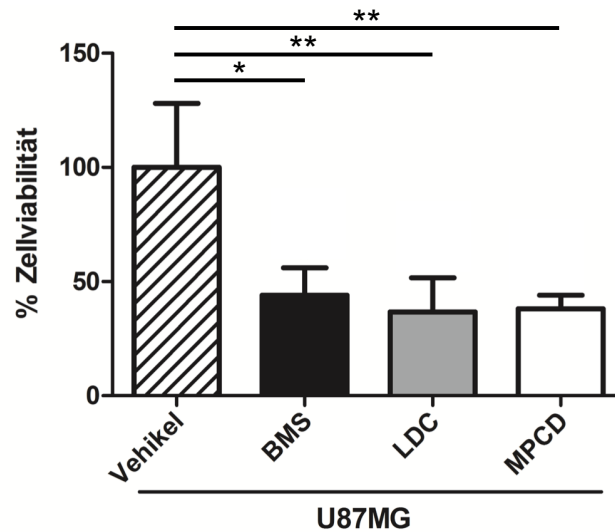
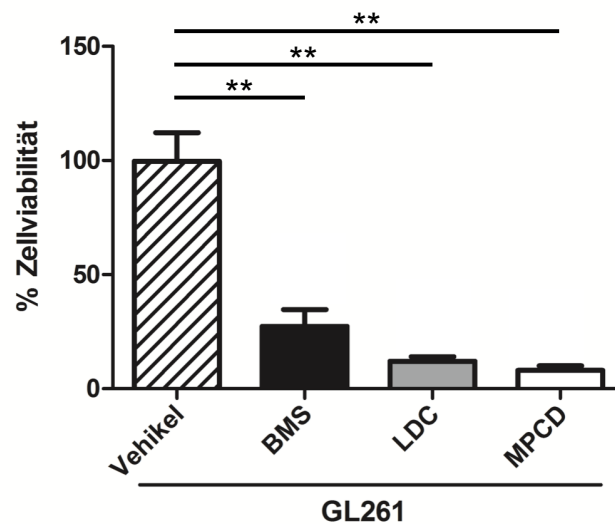


Abb. 8: Zellviabilität der U87MG-Zellen *in vitro*

MTT-Assay der Zelllinie U87MG unter BMS-777607, LDC-41267 und MPCD-84111 im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle nach 48 h. Die Axl-Inhibitoren wurden in DMSO und DMEM gelöst und in einer Konzentration von 12,5  $\mu\text{M}$  alle 12 h appliziert. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ )



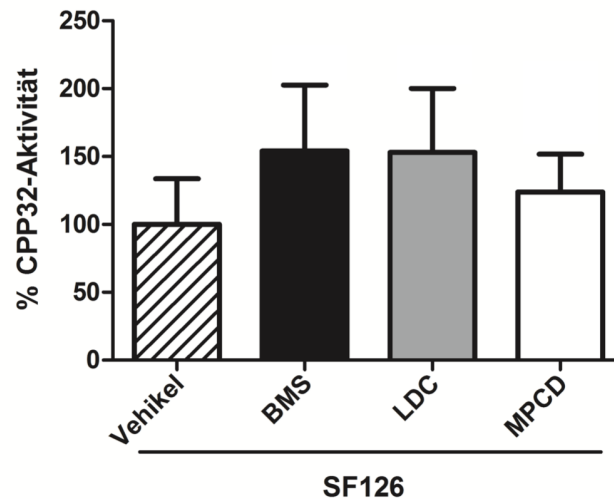
**Abb. 9: Zellviabilität der GL261-Zellen *in vitro***

MTT-Assay der Zelllinie GL261 unter BMS-777607, LDC-41267 und MPCD-84111 im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle nach 48 h. Die Axl-Inhibitoren wurden in DMSO und DMEM gelöst und in einer Konzentration von 12,5 µM alle 12 h appliziert. (\*\*  $p < 0,01$ )

### 3.2.3 CPP32-Assay

Die Zelllinie SF126 wurde mittels CPP32-Assay analysiert, um den Effekt von BMS-777607, LDC-41267 und MPCD-84111 auf die Apoptose zu untersuchen. Die Ergebnisse sind Abb. 10 zu entnehmen. Hierbei zeigten sich erhöhte CPP32-Aktivitäten der Gliomzellen für BMS-777607 (154,1 %), LDC-41267 (153,1 %) und MPCD-84111 (123,8 %) im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle ohne statistische Signifikanz. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen.



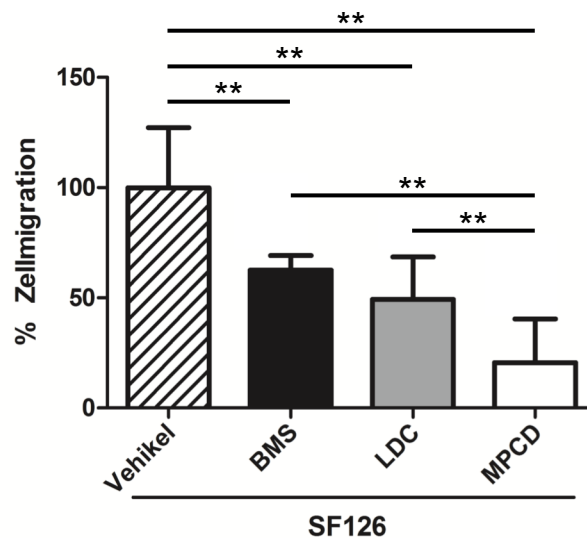


**Abb. 10: Apoptoseverhalten der SF126-Zellen *in vitro***

CPP32-Assay der Zelllinie SF126 unter BMS-777607, LDC-41267 und MPCD-84111 im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle nach 24 h. Die Axl-Inhibitoren wurden in DMSO und DMEM gelöst und in einer Konzentration von 12,5  $\mu$ M einmalig appliziert.

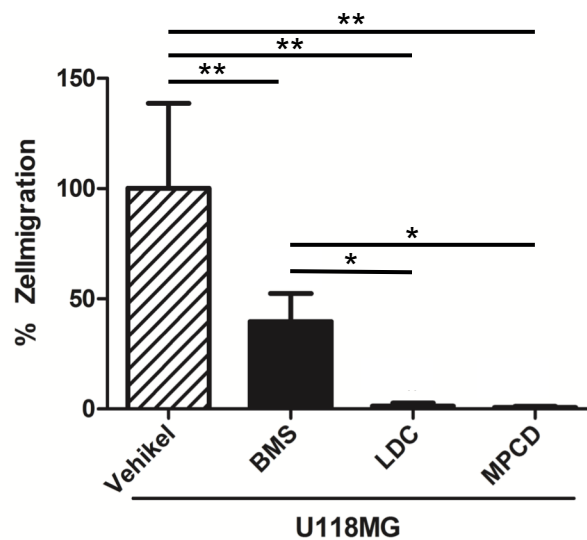
#### 3.2.4 Boyden-Kammer-Assay

Die Zelllinien SF126 und U118MG wurden mittels Boyden-Kammer-Assay analysiert, um den Effekt von BMS-777607, LDC-41267 und MPCD-84111 auf die Zellmigration zu untersuchen. Die Ergebnisse sind den Abb. 11 – 12 zu entnehmen. Hierbei zeigte sich in beiden Zelllinien eine signifikante Reduktion der Zellmigration für BMS-777607 (SF126: 62,6 %; U118MG: 39,7 %), LDC-41267 (SF126: 49,3 %; U118MG: 1,3 %) und MPCD-84111 (SF126: 20,5 %; U118MG: 0,7 %) ( $p < 0,01$ ). LDC-41267 und MPCD-84111 erzielten in der Zelllinie U118MG eine deutlich stärkere Reduktion der Zellmigration im Vergleich zur Zelllinie SF126.



**Abb. 11: Zellmigration der SF126-Zellen *in vitro* modifiziert nach Onken et al. (33)**

Boyden-Kammer-Assay der Zelllinie SF126 unter BMS-777607, LDC-41267 und MPCD-84111 im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle nach 3 h. Die Axl-Inhibitoren wurden in DMSO und DMEM gelöst und in einer Konzentration von 12,5  $\mu\text{M}$  einmalig appliziert. (\*\*  $p < 0,01$ )



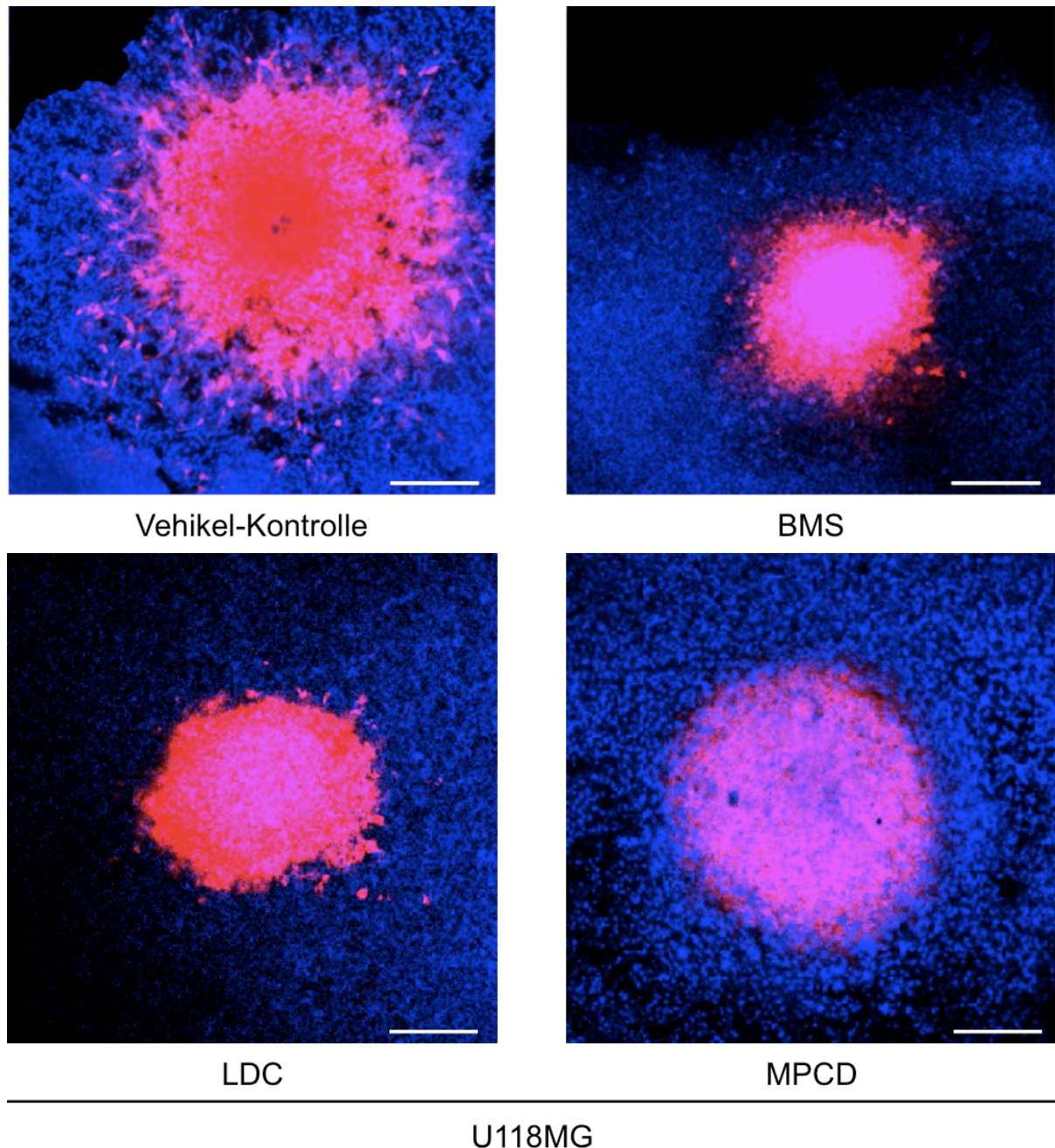
**Abb. 12: Zellmigration der U118MG-Zellen *in vitro* modifiziert nach Onken et al. (33)**

Boyden-Kammer-Assay der Zelllinie U118MG unter BMS-777607, LDC-41267 und MPCD-84111 im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle nach 3 h. Die Axl-Inhibitoren wurden in DMSO und DMEM gelöst und in einer Konzentration von 12,5  $\mu\text{M}$  einmalig appliziert. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ )

### 3.3 Ergebnisse des Sphäroid-Invasions-Assays

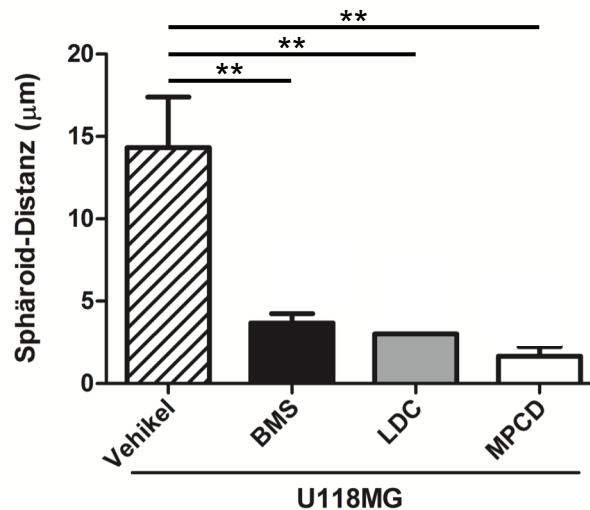
Die Zelllinie U118MG wurde mittels Sphäroid-Invasions-Assay analysiert, um den Effekt von BMS-777607, LDC-41267 und MPCD-84111 auf das Invasionsverhalten zu untersuchen. In Abb. 13 sind repräsentative Fotografien der Versuche dargestellt. Die Sphäroide erschienen unmittelbar nach ihrer Platzierung auf die Hirnschnitte deutlich begrenzt (nicht dargestellt). Nach 8 Tagen zeigte sich in der Konfokalmikroskopie, dass multiple Gliomzellen der Vehikel-Kontrollgruppe sich vom Tumorsphäroid separiert und das Hirnparenchym diffus invadiert haben. Die klare Begrenzung der Sphäroide war sichtbar aufgelöst (Abb. 13). Die Zelllinie SF126 zeigte unter Kontrollbedingungen kein Bestreben des invasiven Wachstums (Ergebnisse nicht dargestellt), sodass der invasive Aspekt ausschließlich anhand der Zelllinie U118MG untersucht wurde. Nach der Behandlung mit BMS-777607, LDC-41267 und MPCD-84111 zeigte sich eine deutlich reduzierte Anzahl von invadierten Gliomzellen im murinen Hirnparenchym. Im Vergleich zur Vehikel-Kontrollgruppe erschienen die behandelten Sphäroide klarer begrenzt und von geringerer Größe.

Weiterhin erfolgte die quantitative Auswertung der gemessenen Distanzen von den Ausläuferzellen (invadierte Gliomzellen) zur Grenze des Sphäroidverbunds (Abb. 14). Hierbei bestätigte sich eine signifikante Reduktion des Invasionsverhaltens der Zelllinie U118MG für BMS-777607 (3,7  $\mu\text{m}$ ), LDC-41267 (3,0  $\mu\text{m}$ ) und MPCD-84111 (1,7  $\mu\text{m}$ ) im Vergleich zur Vehikel-Kontrollgruppe (14,3  $\mu\text{m}$ ;  $p < 0,01$ ). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen.



**Abb. 13: Repräsentative Konfokalmikroskopie-Aufnahmen des Invasionsverhaltens der U118MG-Sphäroide *ex vivo* modifiziert nach Onken et al. (33)**

U118MG-Sphäroide im Hirnschnitt unter BMS-777607, LDC-41267 und MPCD-84111 im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle am Tag 8 (20x Objektiv). Die Sphäroide wurden auf murinen Hirnschnitten platziert. Die Axl-Inhibitoren wurden in DMSO und DMEM gelöst und in einer Konzentration von 12,5  $\mu\text{M}$  alle 12 h appliziert. Die Gliomzellen wurden zunächst mit DiI gefärbt (rot fluoreszierend). Sphäroide und Hirnschnitte wurden mit TO-PRO®-3 gefärbt (blau fluoreszierend). Der Maßstabsbalken kennzeichnet 50  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 14: Invasionsverhalten der U118MG-Sphäroide *ex vivo* modifiziert nach Onken et al. (33)**

Sphäroid-Invasions-Assay der Zelllinie U118MG unter BMS-777607, LDC-41267 und MPCD-84111 im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle am Tag 8. Die Axl-Inhibitoren wurden in DMSO und DMEM gelöst und in einer Konzentration von 12,5 µM alle 12 h appliziert. (\*\*  $p < 0,01$ )

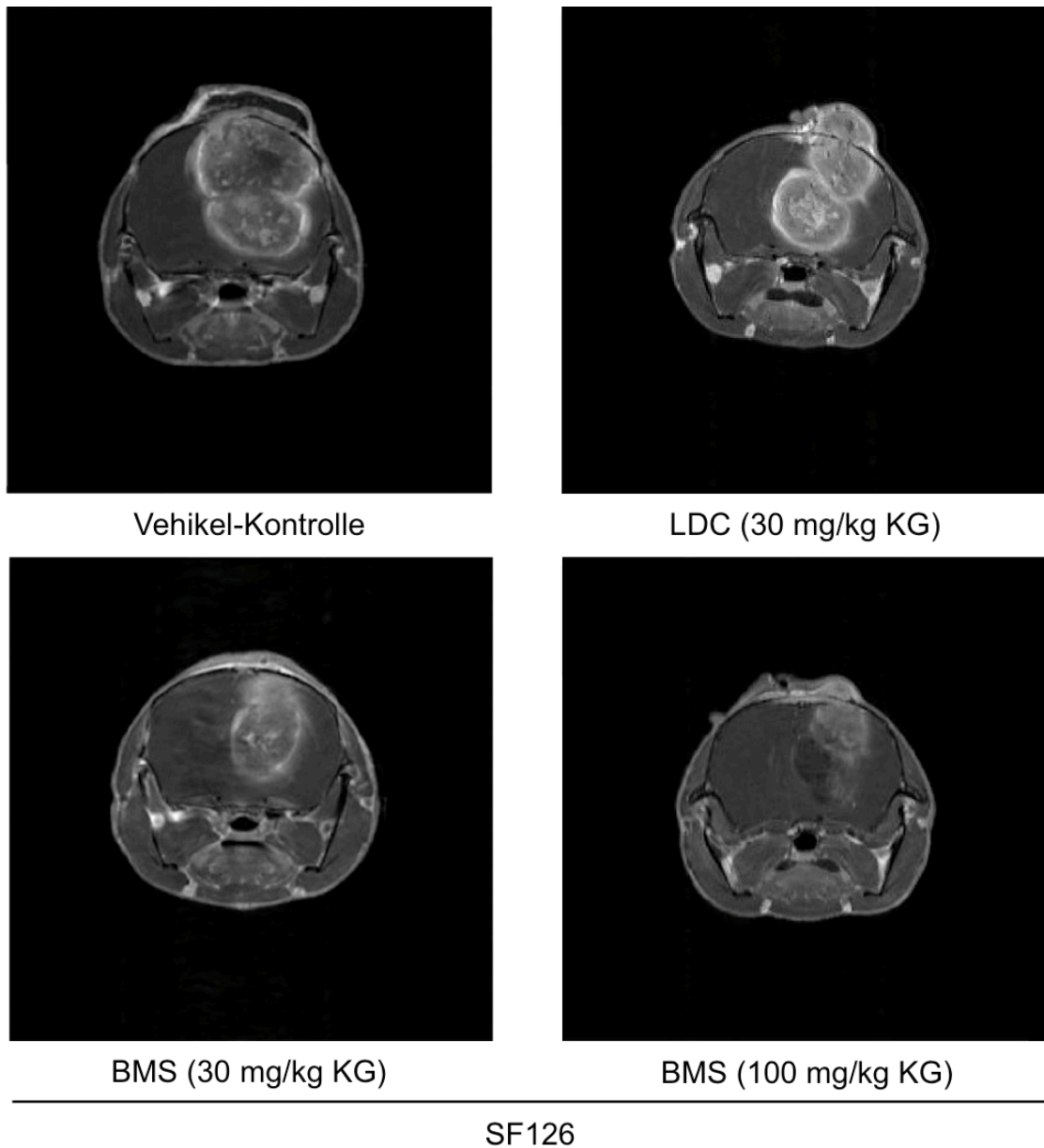
### 3.4 Ergebnisse des xenogenen, orthotopen Tumormodells

#### 3.4.1 Intrakranielles Tumorstadium

Die Effekte der Axl-Inhibitoren auf das intrakranielle Tumorstadium wurden im xenogenen, orthotopen Tumormodell mit MRT-Kontrollen untersucht. Versuchstiere der MPCD-84111-Gruppe verstarben während der Behandlungsphase, vermutlich nach Entwicklung einer Peritonitis. Dies führte zum Abbruch weiterer Tierversuche mit MPCD-84111. Somit liegen Ergebnisse für BMS-777607 und LDC-41267 im Tiermodell vor. SF126-Xenografts wurden mit BMS-777607 und LDC-41267 behandelt. Aufgrund des ausbleibenden Effektes unter LDC-41267 in den SF126-Xenografts wurden die U118MG-Xenografts ausschließlich mit BMS-777607 behandelt (siehe im Folgenden).

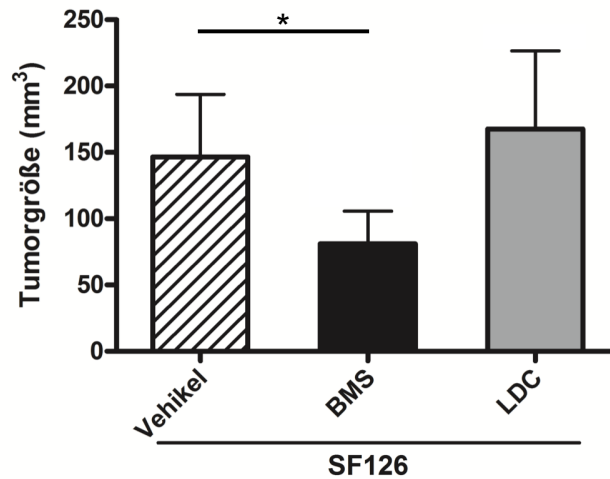
Die Behandlung der Versuchstiere mit den Axl-Inhibitoren wurde begonnen, sobald sich ein nachweisbarer Tumor in den MRT-Messungen manifestiert hatte. Dieser Zeitpunkt war von der verwendeten Zelllinie abhängig und wurde in Vorversuchen ermittelt. Die Zelllinie SF126 wies im Tumormodell ein schnelleres Tumorstadium im Vergleich zur Zelllinie U118MG auf,

sodass die Behandlung hier bereits 3 Tage nach Gliomzell-Implantation begonnen wurde. Im Tumormodell U118MG wurde die Behandlungsphase 7 Tage nach Gliomzell-Implantation begonnen. Die finalen MRT-Messungen erfolgten 14 Tage nach Gliomzell-Implantation. Daraus ergab sich eine Behandlungszeit von 11 (Tumormodell SF126) bzw. 7 Tagen (Tumormodell U118MG). In den Abb. 15 und 18 sind repräsentative MRT-Bilder der Versuche dargestellt. Die Tumoren der Zelllinien SF126 und U118MG imponierten im Glioblastom-Modell der Maus als vom Implantationsort ausgehende, hyperintense Raumforderungen mit diffuser, z. T. randständiger Kontrastmittelanreicherung. Die Zelllinie SF126 brachte deutlich größere Tumoren mit resultierender Mittellinienverlagerung im Vergleich zur Zelllinie U118MG hervor. Bei Betrachtung der MRT-Bilder zeigte sich unter BMS-777607 bereits ein reduziertes Tumorwachstum für beide Gliom-Zelllinien (Abb. 15, 18). In der LDC-41267-Gruppe war keine Reduktion des Tumorwachstums zu beobachten (Abb. 15). Die quantitative Auswertung erfolgte auf der Grundlage der volumetrischen Tumor-Ausmessungen (Abb. 16, 17, 19). Hierbei bestätigte sich nach 14 Tagen eine signifikante Reduktion der Tumorumfänge unter BMS-777607 für beide Gliom-Zelllinien. Im Tumormodell der Zelllinie SF126 war nach Behandlung mit BMS-777607 (30 mg/kg KG) eine Reduktion des Tumorwachstums von 53,4 % im Vergleich zur Vehikel-Kontrollgruppe zu beobachten ( $54,24 \text{ mm}^3$  vs.  $101,48 \text{ mm}^3$ ;  $p < 0,01$ ). Eine Dosiserhöhung von BMS-777607 auf 100 mg/kg KG (Tumormodell SF126) erzielte eine weitere Reduktion des Tumorwachstums ( $35,87 \text{ mm}^3$ ;  $p < 0,01$ ). Im Tumormodell der Zelllinie U118MG resultierte die Behandlung mit BMS-777607 (30 mg/kg KG) in einer Reduktion des Tumorwachstums von mehr als 90 % im Vergleich zur Vehikel-Kontrollgruppe ( $0,08 \text{ mm}^3$  vs.  $0,76 \text{ mm}^3$ ;  $p < 0,05$ ). In zwei Fällen wurde eine komplette Tumorregression beobachtet. In der LDC-41267-Gruppe zeigte sich keine signifikante Reduktion des Tumorwachstums im Vergleich zur Vehikel-Kontrollgruppe (Tumormodell SF126:  $167,5 \text{ mm}^3$  vs.  $146,6 \text{ mm}^3$ ;  $p > 0,05$ ).



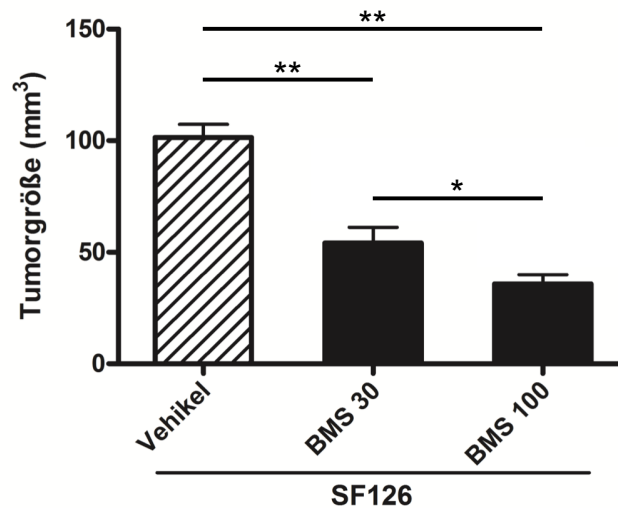
**Abb. 15: Repräsentative MRT-Darstellung des intrakraniellen Tumorwachstums in SF126-Xenografts *in vivo* modifiziert nach Onken et al. (33)**

Kraniale MRT-Bilder des Tumormodells SF126 unter BMS-777607 und LDC-41267 im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle am Tag 14 (T1-Sequenz + KM). Die Zelllinie SF126 wurde intrazerebral in die Versuchstiere (CD1 Nu/Nu) implantiert. Die Axl-Inhibitoren wurden in DMSO und PEG300 gelöst. Die Injektion erfolgte intraperitoneal in einer Dosis von 30 – 100 mg/kg KG alle 12 h für 11 d. Die Tumoren erscheinen hyperintens.



**Abb. 16: Intrakranielles Tumorwachstum in SF126-Xenografts *in vivo* modifiziert nach Onken et al. (33)**

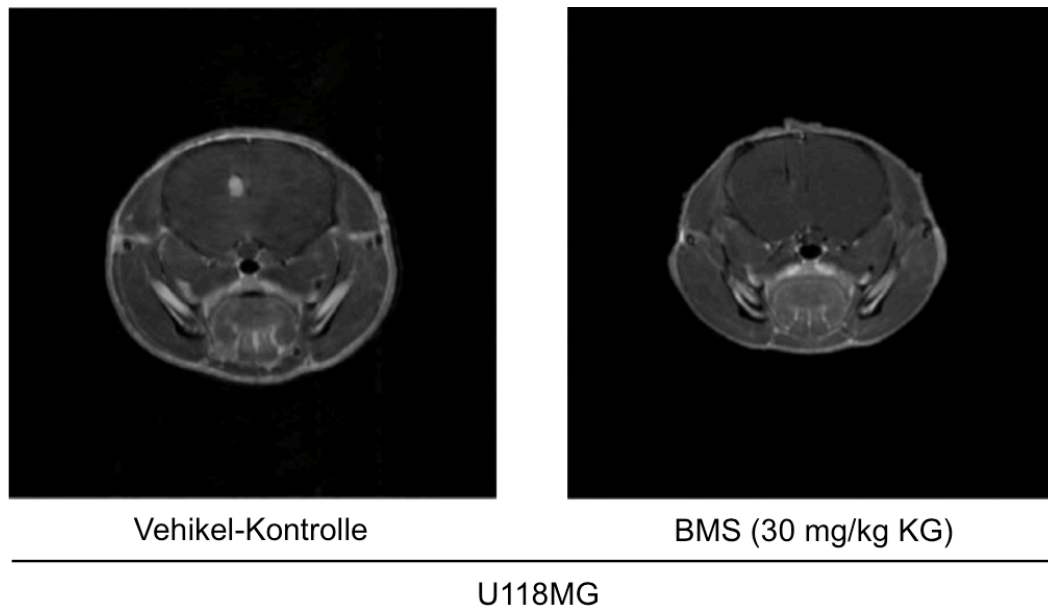
Tumorvolumina im Tumormodell SF126 unter BMS-777607 ( $n = 4$ ) und LDC-41267 ( $n = 5$ ) im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle ( $n = 4$ ) am Tag 14. Die Axl-Inhibitoren wurden in DMSO und PEG300 gelöst. Die Injektion erfolgte intraperitoneal in einer Dosis von 30 mg/kg KG alle 12 h für 11 d. (\*  $p < 0,05$ )



**Abb. 17: Intrakranielles Tumorwachstum in SF126-Xenografts *in vivo* [2] modifiziert nach Onken et al. (33)**

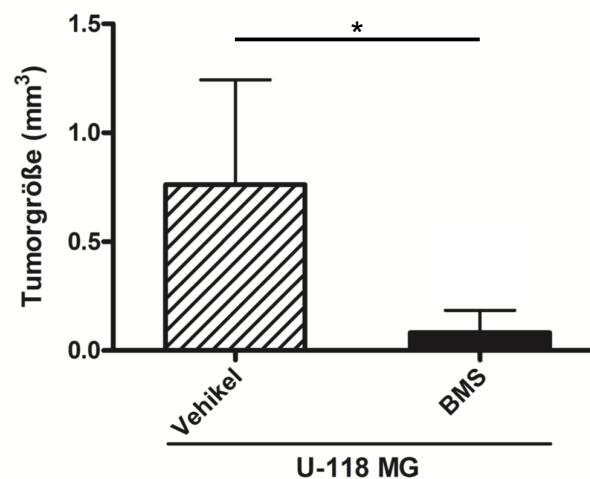
Tumorvolumina im Tumormodell SF126 unter BMS-777607 im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle am Tag 14. BMS-777607 wurde in DMSO und PEG300 gelöst. Die Injektion erfolgte intraperitoneal in einer Dosis von 30 – 100 mg/kg KG alle 12 h für 11 d. ( $n = 3$ ; \*  $p = 0,05$ ; \*\*  $p = 0,01$ )





**Abb. 18: Repräsentative MRT-Darstellung des intrakraniellen Tumorwachstums in U118MG-Xenografts *in vivo* modifiziert nach Onken et al. (33)**

Kraniale MRT-Bilder des Tumormodells U118MG unter BMS-777607 im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle am Tag 14 (T1-Sequenz + KM). Die Zelllinie U118 MG wurde intrazerebral in die Versuchstiere (CD1 Nu/Nu) implantiert. BMS-777607 wurde in DMSO und PEG300 gelöst. Die Injektion erfolgte intraperitoneal in einer Dosis von 30 mg/kg KG alle 12 h für 7 d. Die Tumoren erscheinen hyperintens.

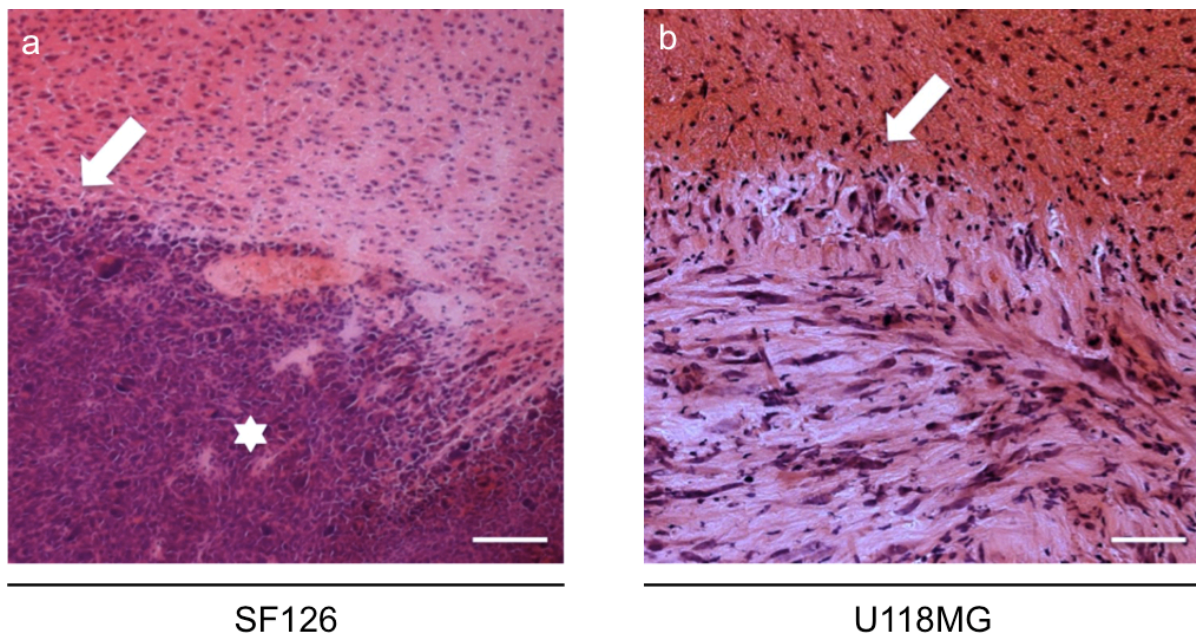


**Abb. 19: Intrakranielles Tumorwachstum in U118MG-Xenografts *in vivo* modifiziert nach Onken et al. (33)**

Tumorvolumina im Tumormodell U118MG unter BMS-777607 ( $n = 4$ ) im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle ( $n = 7$ ) am Tag 14. BMS-777607 wurde in DMSO und PEG300 gelöst. Die Injektion erfolgte intraperitoneal in einer Dosis von 30 mg/kg KG alle 12 h für 7 d. (\*  $p < 0,05$ )

3.4.2 *Wachstumsmuster*

Zur histopathologischen Untersuchung der Tumormodelle SF126 und U118MG wurden Kryoschnitte der explantierten Gehirne angefertigt und diese der HE-Färbung unterzogen (Tag 14 nach Implantation). In Abb. 20 sind repräsentative Fotografien dargestellt. Die Tumoren der Zelllinie SF126 zeigten im Vergleich zu Tumoren der Zelllinie U118MG eine erhöhte Wachstumskinetik, was sich durch das Vorkommen von intratumoralen Gefäßproliferaten und Nekrosen in der HE-Färbung darstellte.

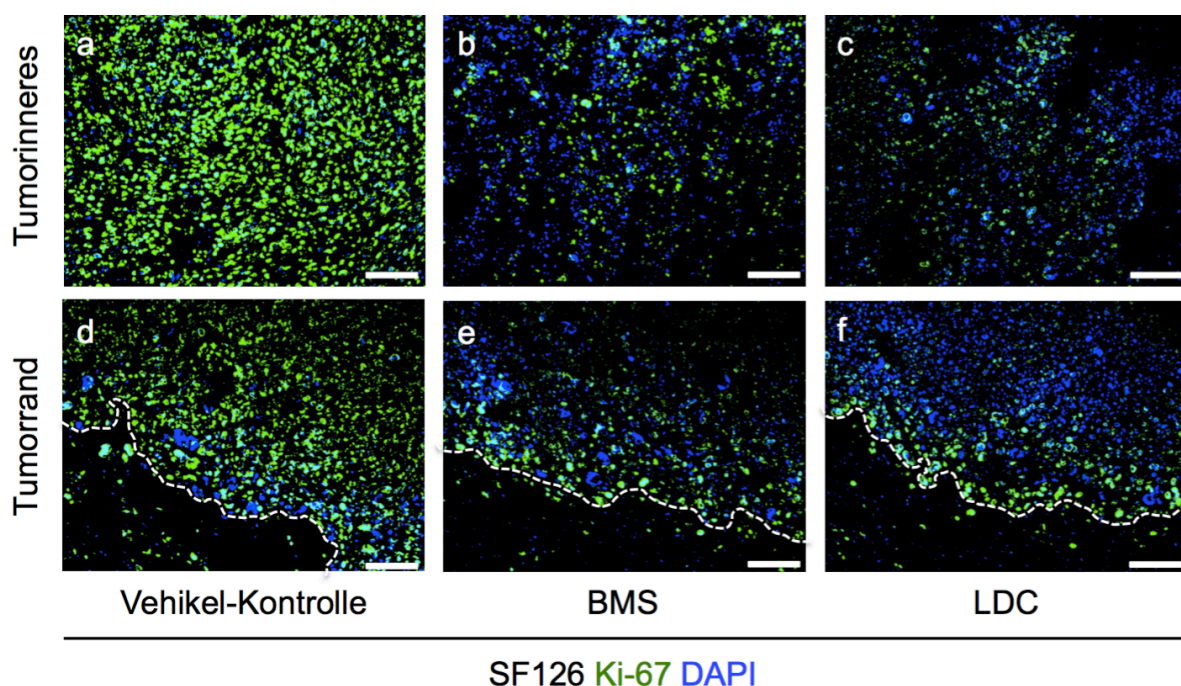


**Abb. 20: Repräsentative Darstellung der SF126- und U118MG-Xenografts in HE-Färbung modifiziert nach Onken et al. (33)**

Mikroskopische Aufnahmen der Tumoren in HE-Färbung am Tag 14 (a: SF126; b: U118MG; 10x Objektiv). Die Tumorareale befinden sich jeweils in der unteren Bildhälfte. Tumoren der Zelllinie SF126 wiesen intratumorale Gefäßproliferate auf (Stern). Hier zeigte sich zudem ein gering ausgeprägtes Invasionsverhalten ins murine Hirnparenchym (a, Pfeil). Tumoren der Zelllinie U118MG zeigten ein vermehrt invasives Wachstumsmuster (b, Pfeil). Der Maßstabsbalken kennzeichnet 50  $\mu\text{m}$ .

### 3.5 Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen

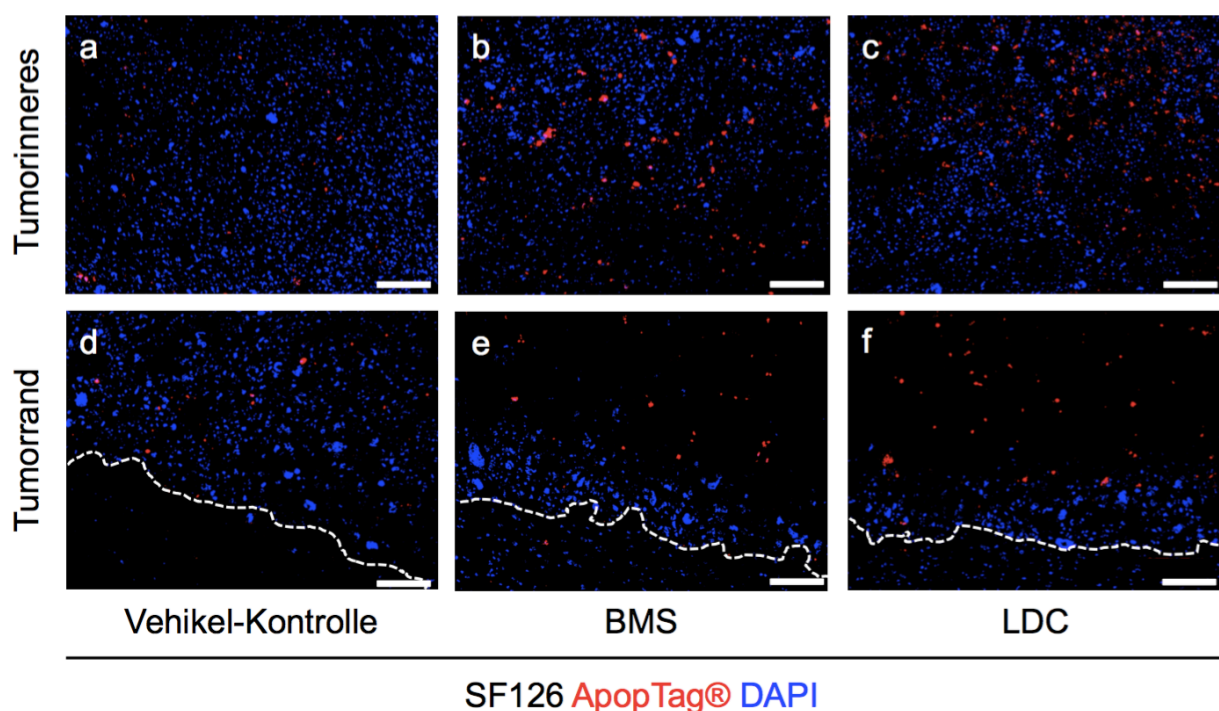
Weiterhin wurde das Tumorgewebe mittels Immunfluoreszenzfärbungen untersucht. Es wurden sowohl Bereiche der Tumorränder als auch des Tumorrinneren analysiert, da sich hier Unterschiede, v. a. hinsichtlich der Vaskularisation, auftraten. Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbungen wurde das Tumormodell SF126 unter BMS-777607 und LDC-41267 (30 mg/kg KG) untersucht. Zur Markierung proliferativer Vorgänge wurde ein Primärantikörper gegen Ki-67 verwendet. In Abb. 21 sind repräsentative Fotografien dargestellt. Unter Vehikel-Kontrollbedingungen imponierte eine Vielzahl Ki-67-positiver Zellen disseminiert im gesamten Tumorgewebe. Die qualitative Analyse zeigte eine deutliche Reduktion der Ki-67-positiven Zellen nach der Behandlung mit BMS-777607 und LDC-41267. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen.



**Abb. 21: Repräsentative Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen der Proliferation in SF126-Xenografts *in vivo***

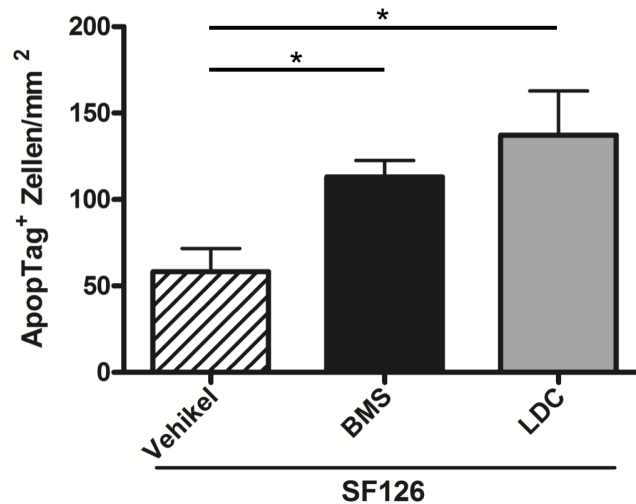
Ki-67-positive Zellen im Tumormodell SF126 unter BMS-777607 ( $n = 3$ ) und LDC-41267 ( $n = 3$ ) im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle ( $n = 2$ ) am Tag 14 (20x Objektiv). Aufgenommen wurden jeweils Areale des Tumorrinneren (a – c) und des Tumorrandes (d – f; Tumoreareale jeweils im oberen Bildbereich, gestrichelt begrenzt). Ki-67-positive Zellen erscheinen grün fluoreszierend. Die Gegenfärbung erfolgte mit DAPI (blau fluoreszierend). Der Maßstabsbalken kennzeichnet 50  $\mu\text{m}$ .

Die Immunfluoreszenzfärbung apoptotischer Zellen wurde mit dem ApopTag® Red *In Situ* Apoptosis Detection Kit realisiert. In Abb. 22 sind repräsentative Fotografien dargestellt. Unter Vehikel-Kontrollbedingungen war eine sehr geringe Anzahl ApopTag®-positiver Gliomzellen zu detektieren. Nach Behandlung mit BMS-777607 und LDC-41267 zeigte sich eine vermehrte Anzahl ApopTag®-positiver Zellen im Tumorgewebe. Dies bestätigte sich in der quantitativen Auswertung (Abb. 23). Hierbei zeigte sich ein signifikanter Anstieg der ApopTag®-positiven Zellen pro mm<sup>2</sup> Tumorfläche unter BMS-777607 (113,1/mm<sup>2</sup>) und LDC-41267 (137,3/mm<sup>2</sup>) im Vergleich zur Vehikel-Kontrollgruppe (58,2/mm<sup>2</sup>;  $p < 0,05$ ). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen.



**Abb. 22: Repräsentative Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen der Apoptose in SF126-Xenografts *in vivo* modifiziert nach Onken et al. (33)**

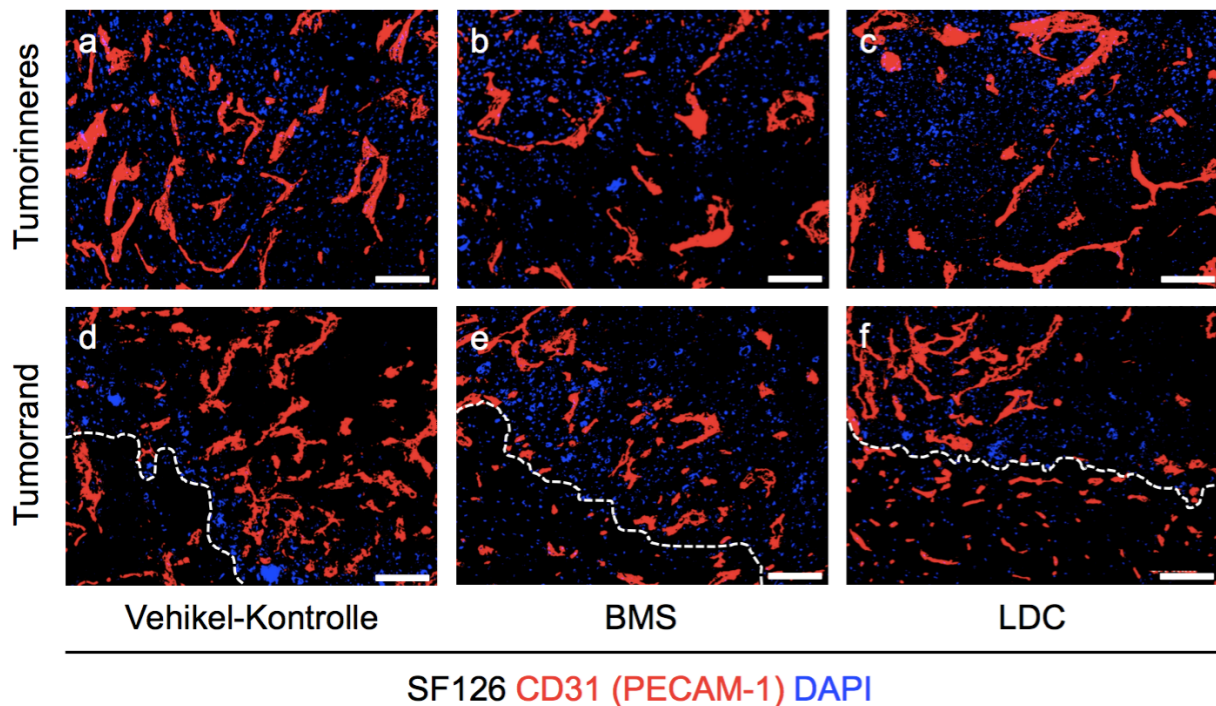
ApopTag®-positive Zellen im Tumormodell SF126 unter BMS-777607 ( $n = 3$ ) und LDC-41267 ( $n = 3$ ) im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle ( $n = 2$ ) am Tag 14 (20x Objektiv). Aufgenommen wurden jeweils Areale des Tumorrinneren (a – c) und des Tumorrandes (d – f; Tumorareale jeweils im oberen Bildbereich, gestrichelt begrenzt). ApopTag®-positive Zellen erscheinen rot fluoreszierend. Die Gegenfärbung erfolgte mit DAPI (blau fluoreszierend). Der Maßstabsbalken kennzeichnet 50  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 23: Apoptoseverhalten in SF126-Xenografts *in vivo* modifiziert nach Onken et al. (33)**

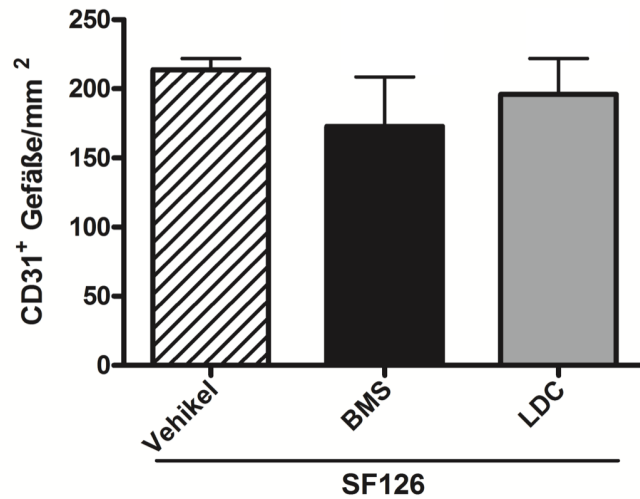
ApoptTag®-positive Zellen im Tumormodell SF126 unter BMS-777607 ( $n = 3$ ) und LDC-41267 ( $n = 3$ ) im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle ( $n = 2$ ) am Tag 14. (\*  $p < 0,05$ )

Die intratumoralen Endothelzellen wurden mit Hilfe eines Primärantikörpers gegen CD31 detektiert. In Abb. 24 sind repräsentative Fotografien dargestellt. Unter Vehikel-Kontrollbedingungen zeigte sich eine Vielzahl intratumoraler, CD31-positiver Endothelzellen, v. a. konzentriert im Bereich der Tumorränder. In der qualitativen Analyse zeigte sich eine geringfügig reduzierte Tumolvaskularisation unter BMS-777607 und LDC-41267. Dies äußerte sich v. a. in einer geringeren Gefäßdichte. Weiterhin erfolgte eine quantitative Auswertung durch die Auszählung der CD31-positiven Gefäße pro mm<sup>2</sup> Tumorfäche sowie durch die Ausmessung des prozentualen Flächenanteils der CD31-positiven Gefäße an der Gesamttumorfäche. Die ermittelten Gefäßdichten und Gefäßflächen sind den Abb. 25 – 26 zu entnehmen. Hierbei zeigte sich eine geringfügige Reduktion der intratumoralen Gefäßdichte für BMS-777607 (172,8/mm<sup>2</sup>) und LDC-41267 (195,9/mm<sup>2</sup>) im Vergleich zur Vehikel-Kontrollgruppe (213,9/mm<sup>2</sup>) ohne statistische Signifikanz. Weiterhin zeigte sich eine geringe Reduktion der Gefäßflächen im Tumor für BMS-777607 (9,3 %) und LDC-41267 (10,2 %) im Vergleich zur Vehikel-Kontrollgruppe (12,8 %) ohne statistische Signifikanz. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen.



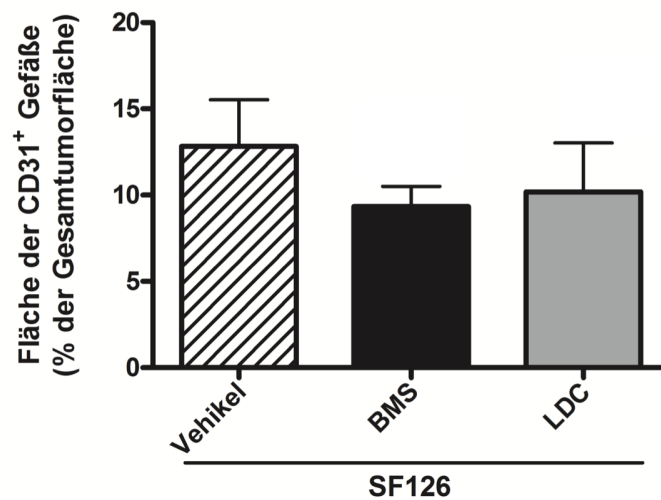
**Abb. 24: Repräsentative Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen der Vaskularisation in SF126-Xenografts *in vivo***

CD31-positive Endothelzellen im Tumormodell SF126 unter BMS-777607 ( $n = 3$ ) und LDC-41267 ( $n = 3$ ) im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle ( $n = 2$ ) am Tag 14 (20x Objektiv). Aufgenommen wurden jeweils Areale des Tumorrinneren (a – c) und des Tumorrandes (d – f; Tumorareale jeweils im oberen Bildbereich, gestrichelt begrenzt). CD31-positive Zellen erscheinen rot fluoreszierend. Die Gegenfärbung erfolgte mit DAPI (blau fluoreszierend). Der Maßstabsbalken kennzeichnet 50  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 25: GefäÙdichte in SF126-Xenografts *in vivo***

GefäÙdichte im Tumormodell SF126 unter BMS-777607 ( $n = 3$ ) und LDC-41267 ( $n = 3$ ) im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle ( $n = 2$ ) am Tag 14.



**Abb. 26: GefäÙfläche in SF126-Xenografts *in vivo***

GefäÙfläche im Tumormodell SF126 unter BMS-777607 ( $n = 3$ ) und LDC-41267 ( $n = 3$ ) im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle ( $n = 2$ ) am Tag 14.

## 4 DISKUSSION

In dieser Studie wurden die Effekte der zielgerichteten Inhibierung von Axl durch die smTKI BMS-777607, LDC-41267 und MPCD-84111 in Modellen des Glioblastoms evaluiert. Der phosphorylierte Axl-Rezeptor wurde in allen getesteten Gliom-Zelllinien detektiert. BMS-777607, LDC-41267 und MPCD-84111 induzierten eine signifikante Reduktion der Zellviabilität, der Zellmigration sowie der invasiven Eigenschaften der Gliomzellen *in vitro* und *ex vivo*. Unsere Studie zeigt, dass die Behandlung mit BMS-777607 in einer signifikanten Reduktion des intrakraniellen Tumorwachstums in den Tumormodellen SF126 und U118MG *in vivo* resultiert. Weiterhin induzierte BMS-777607 eine Reduktion Ki-67-positiver Gliomzellen sowie einen signifikanten Anstieg ApopTag®-positiver Gliomzellen *in vivo*. LDC-41267 erzielte keinen Effekt auf das Tumorwachstum *in vivo*. Tierversuche mit MPCD-84111 wurden aufgrund toxischer Effekte abgebrochen.

Um die Effekte einer zielgerichteten Inhibierung von Axl zu untersuchen, wurden für die vorliegende Studie smTKI ausgewählt, die sich durch eine hohe Selektivität für den Axl-Rezeptor auszeichnen. Es ist jedoch zu konstatieren, dass BMS-777607, LDC-41267 und MPCD-84111 Multikinase-Inhibitoren darstellen, sodass eine Interaktion mit alternativen RYKs nicht ausgeschlossen werden kann. Eine Limitation dieser Arbeit bilden daher potenzielle Off-Target-Effekte.

Die Testungen der Axl-Inhibitoren erfolgten an multiplen Gliom-Zelllinien, vorwiegend SF126 und U118MG. Hierbei handelt es sich um humane Gliom-Zelllinien, die ursprünglich aus dem Biopsiematerial von Patienten mit primärem GBM isoliert wurden (92-94). Die Versuchsdurchführung anhand verschiedener Gliom-Zelllinien empfahl sich, da es sich beim Glioblastom um eine sehr heterogene Tumorentität handelt.

Einen Schwerpunkt dieser Studie bildete die Untersuchung der Axl-Inhibitoren im Tierversuch. Das xenogene, orthotope Glioblastom-Modell ist für die neuroonkologische Forschung von großer Bedeutung. So proliferieren die implantierten Gliomzellen in ihrem Ursprungsorgan und interagieren mit ihrer organtypischen Mikroumgebung. Ein Nachteil des orthotopen Tumormodells ist das ausschließlich expansive Wachstum der Tumoren, sodass der invasive Phänotyp des GBM nicht adäquat imitiert wird (36). Die Effekte der Axl-Inhibitoren auf das Invasionsverhalten wurden daher im Sphäroid-Invasions-Assay *ex vivo* untersucht.

Im orthotopen Glioblastom-Modell werden physiologische Barrieren wie die Blut-Hirn-Schranke berücksichtigt, was insbesondere für pharmakokinetische Prozesse relevant ist. Die Applikation



der Axl-Inhibitoren erfolgte durch eine intraperitoneale Injektion. Nur ein geringer Anteil niedermolekularer Verbindungen passiert die Blut-Hirn-Schranke (95). Konzentrationsbestimmungen der Axl-Inhibitoren im murinen Hirnparenchym bzw. im Tumorgewebe werden Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

Als Modellorganismus diente die Nacktmaus. Das eingeschränkte Immunsystem der Nacktmaus ermöglichte die Implantation und damit Testung der Axl-Inhibitoren an humanen Gliom-Zelllinien. Auf eine Testung der Axl-Inhibitoren im syngenem Tiermodell, bspw. durch Implantation der murinen Gliom-Zelllinie GL261 in die C57BL/6-Maus, wurde verzichtet, da eine Kreuzreaktivität für den murinen Axl-Rezeptor bisher nicht sicher bestätigt wurde. Zudem stand der Immunaspekt nicht im Fokus dieser Studie.

Den Ausgangspunkt dieser Arbeit bildeten die Expressionsanalysen des Axl-Rezeptors. Die Untersuchungsergebnisse bestätigen, dass die Mehrheit der Gliom-Zelllinien hohe Expressionslevel von Axl aufweist. Nach unseren Beobachtungen imponierte die Zelllinie U118MG durch eine hohe Expression von Axl, während die Zelllinie SF126 eine geringere Expression zeigte. Zudem wurden Signale für den phosphorylierten Axl-Rezeptor in allen getesteten Gliom-Zelllinien unter Standardkulturbedingungen detektiert. Die Applikation des Liganden Gas6 war hierfür nicht notwendig. Dies kann als hohe Grundaktivität des Axl-Rezeptors interpretiert werden. Wie beschrieben, existieren diverse ligandenunabhängige Aktivierungsmechanismen des Axl-Signalwegs (51-55). Hier ist bspw. die Hypoxie-induzierte oder die durch sog. „Crosstalk“ vermittelte Aktivierung zu erwähnen (50, 96). Unsere Beobachtungen stimmen im Wesentlichen mit den Vorarbeiten, die eine Überexpression des Axl-Rezeptors in Gliomzellen darlegen, überein. Vajkoczy et al. demonstrierten bereits hohe Expressionslevel von Axl in multiplen Gliom-Zelllinien *in vitro*. Interessanterweise zeigte die Arbeitsgruppe hohe Expressionslevel für die Zelllinie SF126 auf (36). Diese Diskrepanz ist durch methodische Unterschiede im Nachweis der Axl-Expression zu erklären. So bezogen Vajkoczy et al. u. a. RNA-Analysen in ihre Untersuchung ein (36). In späteren Studien von Keating et al. sowie Vouri et al. wurden die Expression von Axl in der Zelllinie U118MG und weiteren Gliom-Zelllinien *in vitro* beschrieben (71, 97).

Im Anschluss der Expressionsanalysen erfolgten die Testungen der Axl-Inhibitoren in den GBM-Modellen. Hierfür wurden im Wesentlichen die Zelllinien SF126 und U118MG ausgewählt, was sich aufgrund ihrer verschiedenen Expressionsprofile empfahl. So konnten zelllinienspezifische bzw. expressionsspezifische Unterschiede im Therapieansprechen auf die Axl-Inhibitoren erfasst werden. Durch die hohe Grundaktivität des Axl-Rezeptors in den Gliomzellen erfolgten alle Experimente ohne eine exogene Zufuhr des Liganden Gas6. Die

Relevanz von Gas6 oder alternativer Aktivierungsmechanismen des Axl-Signalwegs im GBM lässt sich auf der Grundlage dieser Arbeit daher nicht evaluieren.

Die Testung von BMS-777607, LDC-41267 und MPCD-84111 erfolgte zunächst in funktionellen Assays *in vitro*. Nach der Behandlung zeigten sich mikroskopisch eine Reduktion der Zelldichte, der Zellfortsätze sowie eine vermehrte Ablösung der U118MG-Zellen. Dies findet Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Vajkoczy et al. In Ihrer Studie beleuchten Vajkoczy et al. erstmals die essentielle Bedeutung des Axl-Signalwegs für die Tumorbilogie des GBM. Die Arbeitsgruppe etablierte eine dominant-negative Rezeptormutante, d. h. eine trunkierte Variante des Axl-Rezeptors ohne Tyrosinkinasedomäne und transfizierte die Zelllinie SF126 („AXL-DN-Zellen“). Dies resultierte in einer selektiven Blockade des Axl-Signalwegs, wobei sich multiple Anti-Tumor-Effekte aufzeigten. So waren die AXL-DN-Zellen nicht länger adhären und wiesen reduzierte Zellfortsätze sowie Zell-Zell-Kontakte auf. Dies wurde von den Autoren als supprimierte lokomotorische Aktivität gedeutet (36).

Die mikroskopisch sichtbare Abnahme der Zelldichte bestätigte sich in den MTT-Assays. BMS-777607, LDC-41267 und MPCD-84111 induzierten eine potente Reduktion der Zellviabilität multipler Gliom-Zelllinien *in vitro*. Vajkoczy et al. demonstrierten bereits ein Wachstumsdefizit der AXL-DN-Zellen mittels MTS-Assay und interpretierten dies als antiproliferative Effekte (36). Vouri et al. untersuchten später die Effekte einer zielgerichteten Inhibierung des Axl-Rezeptors durch BGB324 in Gliomzellen *in vitro*. Bei BGB324 handelt es sich um einen weiteren smTKI des Axl-Rezeptors (98). Auf der Grundlage der IC<sub>50</sub>-Werte scheint BMS-777607 Axl selektiver zu inhibieren (IC<sub>50</sub> = 1.1 nM vs. 14 nM). BMS-777607 besitzt zudem eine höhere Selektivität gegenüber anderen RYKs der Met-Superfamilie, wobei die höchste Selektivität für Axl besteht (82, 98). Durch den MTT-Assay können lediglich quantitative Aussagen über die Zellviabilität einer Zellpopulation getroffen werden. Es lässt sich nicht differenzieren, ob eine Reduktion der Zellviabilität durch zytotoxische, antiproliferative oder Apoptose-induzierende Effekte bedingt ist.

Zur Untersuchung der Apoptose erfolgte der CPP32-Assay. Hierbei zeigten sich nach der Behandlung nicht signifikant erhöhte CPP32-Aktivitäten der Zelllinie SF126 *in vitro*. Auf der Grundlage der Vorarbeiten waren Apoptose-induzierende Eigenschaften der Axl-Inhibitoren zu vermuten (71). Keating et al. untersuchten die Effekte eines Knock-downs des Axl-Gens auf das Apoptose-Verhalten einer Gliomzell-Population. Im Ergebnis zeigte sich ein Anstieg der früh-apoptotischen Zellfraktion *in vitro*. Die Arbeitsgruppe führte dies auf die induzierte Herabregulierung zellulärer Signalwege, die mit Zellüberleben und Apoptose-Inhibierung assoziiert sind, zurück. So resultierte der Knock-down des Axl-Gens in einer reduzierten

Phosphorylierung der Kinasen AKT und ERK (*engl.* Extracellular-signal regulated kinases) (71). Vouri et al. konnten zwar ein Wachstumsdefizit jedoch keine Apoptose-induzierenden Effekte des Axl-Inhibitors BGB324 detektieren (97). Die Auswertung des CPP32-Assays für BMS-777607, LDC-41267 und MPCD-84111 ergab zunächst keine statistische Signifikanz, was durch eine hohe Standardabweichung der erhobenen Werte zu erklären ist. In Folgeversuchen unserer Arbeitsgruppe bestätigten sich signifikant erhöhte CPP32-Aktivitäten der SF126- und U118MG-Zellen nach einmaliger Applikation von BMS-777607 (12,5  $\mu$ M) *in vitro* (33). In Zusammenschau lässt sich die reduzierte Zellviabilität daher partiell auf einen proapoptotischen Effekt zurückführen. Unklar bleibt, warum Vouri et al. keine Apoptose-induzierenden Effekte von BGB324 nachwies (97). Dies ist möglicherweise durch die unterschiedliche Selektivität der Axl-Inhibitoren bedingt.

Der Axl-Signalweg scheint insbesondere für die Vermittlung von Migration und Invasion der Gliomzellen eine kritische Rolle zu spielen (36, 97). Dies können wir durch unsere Untersuchungsergebnisse bestätigen. Unter allen Axl-Inhibitoren zeigte sich eine potente Reduktion der Zellmigration *in vitro*, wobei sich Unterschiede im Ansprechen der verwendeten Zelllinien auftraten. Die Behandlung der Zelllinie U118MG mit LDC-41267 und MPCD-84111 resultierte in einer nahezu vollständigen Suppression der Zellmigration. Die SF126-Zellen wiesen hier ein schwächeres Therapieansprechen auf. Möglicherweise ist dies durch die geringere Expression des Axl-Rezeptors in dieser Zelllinie zu erklären.

Die Zellmigration stellt eine Grundvoraussetzung der Tumorzell-Invasion dar. Gängige Migrations-Assays sind zu limitiert, um das Invasionsverhalten von Gliomzellen zu analysieren, da die Zellmotilität lediglich zweidimensional erfasst und die organotypische Mikroumgebung mit der EZM nicht abgebildet wird. Aufgrund des starken Ansprechens der U118MG-Zellen im Boyden-Kammer-Assay erfolgte die weitere Untersuchung im Sphäroid-Invasions-Assay. Hier zeigte sich eine drastische Reduktion der Gliomzell-Invasion unter BMS-777607, LDC-41267 und MPCD-84111 *ex vivo*. Dies halten wir für ein wichtiges Ergebnis unserer Studie, da das lokal-invasive Wachstum des GBM maßgeblich zum langfristigen Versagen der derzeitigen Therapiemodalitäten beiträgt. Die Untersuchungen von Li et al. belegen, dass der Axl-Rezeptor die Migration und Invasion von Krebszellen über eine Aktivierung des PI3K/ Akt-Signalwegs stimuliert (75, 99). Die antiinvasiven Effekte von BMS-777607, LDC-41267 und MPCD-84111 könnten daher auf einer Axl-vermittelten Herabregulation dieses Signalwegs resultieren, wobei hierfür weitere Untersuchungen notwendig sind. Die SF126-Zellen wiesen auch unter Kontrollbedingungen kein Bestreben auf, das murine Hirngewebe zu invadieren. Hierbei handelt es sich um ein bekanntes Phänomen der orthotopen Implantation vieler Gliom-Zelllinien (36,

100). Vajkoczy et al. untersuchten den invasiven Aspekt daher im Rückenhautkammer-Modell der Maus. Als Kontrollgruppe dieser Studie dienten SF126-Zellen, die mit einer humanen Wildtyp-Form des Axl-Rezeptors transfiziert wurden (sog. „AXL-WT-Zellen“ für AXL-Wildtyp), was in einer erhöhten Rezeptorexpression resultiert. Die AXL-DN-Zellen imponierten hier durch eine signifikant geringere Invasion des muskulären und subkutanen Gewebes im Vergleich zu den AXL-WT-Zellen, die eine massive Invasion und Destruktion des murinen Gewebes zeigten (36). Unsere Ergebnisse sind des Weiteren mit Vouri et al. kongruent. Hier erfolgte die Testung von BGB324 in einem modifizierten Boyden-Kammer-Assay mit simulierter EZM-Beschichtung, wobei sich eine reduzierte Gliomzell-Invasion zeigte (97). Der Vorteil unserer Studie liegt in der Untersuchung der Invasion im intakten Hirnparenchym *ex vivo* sowie in der Verwendung der Konfokalmikroskopie, die eine dreidimensionale Betrachtung der invadierenden Gliomzellen ermöglichte.

Aufbauend auf den Beobachtungen der funktionellen Assays erfolgte die Testung der Axl-Inhibitoren im xenogenen, orthotopen Glioblastom-Modell. Vajkoczy et al. demonstrierten nach zerebraler Implantation der AXL-DN-Zellen in die Nacktmaus eine Reduktion des Tumorwachstums von über 85 %. Dies führte weiterhin zu einer signifikanten Verlängerung des Überlebens der Versuchstiere (36). Bisher existierten keine Studien zur pharmakologischen Inhibierung von Axl durch Substanzen der *Targeted Therapies* im experimentellen Glioblastom *in vivo*. Unsere Daten zeigen nun erstmals, dass die zielgerichtete Inhibierung von Axl durch BMS-777607 das intrakranielle Gliomwachstum ebenso effektiv supprimiert wie eine Inhibierung des Rezeptors auf genetischer Ebene. Dies war in beiden Tumormodellen zu beobachten, wobei sich in den U118MG-Xenografts zwei Fälle einer kompletten Tumorremission zeigten. Es ist jedoch zu konstatieren, dass diese Zelllinie im Vergleich zur Zelllinie SF126 durch eine geringere Wachstumskinetik imponierte. BMS-777607 supprimierte das Gliomwachstum dosisabhängig, ohne dass toxische Effekte zu verzeichnen waren. LDC-41267 hingegen erzielte keinen Effekt auf das Tumorwachstum *in vivo*. Tierversuche mit MPCD-84111 wurden aufgrund toxischer Effekte abgebrochen. Damit erwies sich BMS-777607 als potentester der drei getesteten Axl-Inhibitoren der vorliegenden Arbeit.

Durch die Immunfluoreszenzfärbungen des Tumorgewebes konnten wir weitere Anti-Tumor-Effekte der Axl-Inhibitoren nachweisen. Konkordant mit den Beobachtungen der funktionellen Assays zeigten sich unter BMS-777607 eine Reduktion Ki-67-positiver Gliomzellen sowie ein Anstieg ApopTag®-positiver Gliomzellen *in vivo*. In der Gesamtbetrachtung lässt sich daher postulieren, dass die Suppression des intrakraniellen

Tumorstadiums durch BMS-777607 aus antiproliferativen sowie Apoptose-induzierenden Effekten resultiert.

Multiple Studien belegen regulierende Effekte des Axl-Signalwegs auf die Funktion von Endothelzellen bzw. Blutgefäßen (35, 101). Die Expression des Axl-Rezeptors findet sich in verschiedenen Zelltypen der Tumorgefäße des GBM. Eine Beteiligung des Signalwegs an der Neovaskularisation im GBM wird vermutet (80, 102). Vajkoczy et al. untersuchten nach Implantation der AXL-DN-Zellen im Rückenmarkkammer-Modell auch vaskuläre Aspekte. Hierbei wies die Arbeitsgruppe keine Unterschiede bezüglich der Gefäßdichte im Vergleich zur Kontrollgruppe nach (36). In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch eine geringfügige Reduktion der Tumor-Vaskularisation unter BMS-777607 und LDC-41267 *in vivo* detektiert. Dies war sowohl im Tumorrand als auch im Tumorzentrum zu beobachten. Die Auswertung ergab keine statistische Signifikanz, was durch die geringe Anzahl an Versuchstieren erklärbar ist. In weiterführenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe bestätigten sich die antiangiogenen Effekte von BMS-777607. Hier zeigte sich eine reduzierte Bildung sog. „tubes“ (*engl.* für kapillarähnliche Strukturen) durch Endothelzellen *in vitro* sowie eine signifikante Reduktion der intratumoralen Gefäßfläche im Glioblastom-Modell *in vivo* (33). Daher lässt sich konkludieren, dass die Reduktion des intrakraniellen Tumorstadiums durch BMS-777607 neben antiproliferativen und Apoptose-induzierenden Effekten weiterhin aus antiangiogenen Effekten resultiert (33). Dieses Ergebnis unterscheidet sich von den Beobachtungen durch Vajkoczy et al. (36). Es bleibt unklar, ob die reduzierte Vaskularisation durch BMS-777607 auf der selektiven Inhibierung des Axl-Rezeptors oder einer Multikinase-Inhibierung beruht.

Schroeder et al. erläuterten die Selektivität von BMS-777607 gegenüber der sog. „Met-Superfamilie“ (c-Met, Axl, Tyro3, Mer, Ron) (82). In Folgeversuchen unserer Arbeitsgruppe bestätigte sich unter BMS-777607 (12,5 µM bzw. 30 und 100 mg/kg KG) eine reduzierte Phosphorylierung von Axl in kultivierten Gliomzellen sowie im Glioblastom-Modell *in vivo*. Die Behandlung mit BMS-777607 zeigte in den verwendeten Konzentrationen keinen Effekt auf die Phosphorylierung von c-Met *in vitro* und *in vivo* (33). Wir postulieren die Effekte von BMS-777607 daher als Axl-selektiv. Ein *Kinase Switch* von Axl auf c-Met wurde von unserer Arbeitsgruppe bisher nicht beobachtet (33). Es stellt sich die Frage, ob Resistenzmechanismen der Gliomzellen die Langzeiteffektivität einer Inhibierung des Axl-Rezeptors limitieren. Hierfür sind langfristige Untersuchungen erforderlich.

Auf der Grundlage dieser Arbeit können Off-Target-Effekte gegenüber weiteren RYKs nicht ausgeschlossen werden. Tatsächlich sind im GBM jedoch multiple RYKs gleichzeitig aktiv, sodass der Einsatz von Multikinase-Inhibitoren pharmakologisch durchaus sinnvoll ist (33, 103).

So spielen neben Axl andere Mitglieder der Met-Superfamilie und weitere RYKs eine Rolle in der Tumorbilogie des GBM (104, 105).

Unsere Studie bestätigt die kritische Bedeutung des Axl-Signalwegs im GBM. Wir zeigen im präklinischen Kontext auf, dass der Einsatz Axl-selektiver Tyrosinkinase-Inhibitoren einen vielversprechenden Therapieansatz des GBM darstellt. Fraglich ist, inwiefern sich unsere Studienergebnisse auf die Anwendung beim Menschen übertragen lassen.

Aufgrund der komplexen Tumorbilogie des GBM ist es unwahrscheinlich, dass die Inhibierung eines einzelnen Signalwegs für die Therapie dieser Tumorentität suffizient sein wird. Basierend auf den Erkenntnissen vorausgegangener Studien sowie dieser Arbeit scheint der Axl-Rezeptor jedoch eine Schnittstelle für die Vermittlung diverser GBM-Eigenschaften zu sein. Insbesondere BMS-777607 imponierte durch proapoptotische, antiproliferative, antiinvasive und antiangiogene Effekte *in vitro* und *in vivo* (33). Dies unterscheidet BMS-777607 nicht nur von den konventionellen, zytotoxischen Chemotherapeutika wie Temozolomid/ Temodal<sup>®</sup> sondern auch von anderen Pharmaka der *Targeted Therapies* wie z. B. dem antiangiogen wirkenden VEGF-A-Antikörper Bevacizumab/ Avastin<sup>®</sup> (106).

Trotz multipler Anti-Tumor-Effekte von BMS-777607 im Tiermodell ist zu konstatieren, dass im Fall des GBM bisher Vertreter der *Targeted Therapies* kaum einen substanziellen Benefit in klinischen Studien zeigten. Der klinische Einsatz von Tyrosinkinase-Inhibitoren beim GBM wird durch verschiedene Faktoren erschwert. Das GBM ist als ZNS-Tumor pharmakologisch schwerer zu erreichen als andere solide Tumoren. Der klinische Einsatz von Tyrosinkinase-Inhibitoren kann durch eine ausbleibende Penetranz der Blut-Hirn-Schranke und dadurch insuffiziente Distribution im Tumorgewebe limitiert sein. Aufgrund der diversen Effekte von BMS-777607 im Glioblastom-Modell *in vivo* postulieren wir jedoch eine adäquate Distribution (33).

Eine wesentliche Limitation von Tyrosinkinase-Inhibitoren können zudem toxische Effekte bilden (33). Am Beispiel von Sunitinib/ Sutent<sup>®</sup> ergab sich in einer Patientenstudie zur Behandlung des rezidierten GBM eine hohe Toxizität (33, 34). In der vorliegenden Arbeit zeigten sich toxische Effekte im Fall von MPCD-84111. Die Behandlung mit MPCD-84111 induzierte multiple Anti-Tumor-Effekte *in vitro*, insbesondere bezüglich der Zellmigration, erwies sich jedoch in der applizierten Dosis für die Versuchstiere als letal. In den postmortalen Untersuchungen ergaben sich Hinweise für eine Peritonitis. Dies führte zum Abbruch der Tierversuche mit MPCD-84111. Für zukünftige Versuche sind geringere Dosierungen oder alternative Applikationsformen zu bedenken. Für BMS-777607 zeigte sich in der vorliegenden Arbeit eine geringe Toxizität, gemessen an Gewichtsverlust und Morbidität der Versuchstiere.

Die Versuchstiere unserer Studie tolerierten eine intraperitoneal applizierte Dosis von 100 mg/kg KG (33). Schroeder et al. beschrieben bereits eine gute Verträglichkeit von BMS-777607 im Tierversuch (33, 82). Die Ergebnisse von Phase I- bzw. Phase II-Studien zur Untersuchung der Sicherheit von BMS-777607 sind zu diesem Zeitpunkt nicht veröffentlicht (107, 108).

Weiterhin können Resistenzmechanismen der Krebszellen die Effektivität von Tyrosinkinase-Inhibitoren im klinischen Einsatz reduzieren. Die Behandlung mit LDC-41267 zeigte eine potente Anti-Tumor-Wirkung *in vitro*. Obwohl sich im Tumorgewebe antiproliferative und proapoptotische Effekte darstellten, erzielte LDC-41267 (30 mg/kg KG) keinen Effekt auf das Gliomwachstum *in vivo*. Diese Diskrepanz kann durch die vorliegende Arbeit nicht hinreichend erklärt werden. Möglicherweise spielen hier Resistenzmechanismen der Gliomzellen eine Rolle. Ein vorstellbarer Mechanismus ist das Phänomen des sog. „kinase switch“. Bei therapeutischer Blockade einzelner Signalwege können Krebszellen die Heraufregulierung alternativer Signalwege induzieren (109). Die Selektivität der Tyrosinkinase-Inhibitoren ist hierfür von entscheidender Bedeutung. Multikinase-Inhibitoren sind weniger anfällig für Therapeutika-Resistenzen (29). Auf der Grundlage der Untersuchungsergebnisse lässt sich vermuten, dass BMS-777607 ein günstigeres Spektrum an RYKs als LDC-41267 erfasste.

Ein interessanter Aspekt, der in dieser Arbeit bisher nicht näher beleuchtet wurde, ist der Zusammenhang des Axl-Signalwegs mit der Chemosensitivität von Krebszellen. Axl wurde als zentrale Triebkraft der Entstehung diverser Resistenzen gegenüber Zytostatika, Krebsimmuntherapien sowie *Targeted Therapies* identifiziert (110). Keating et al. demonstrierten nach Knock-down des Axl-Gens eine höhere Chemosensitivität der Gliomzellen gegenüber Temozolomid (71). Dies wurde später von Vouri et al. bestätigt. Die Kombination aus BGB324 und Temozolomid erzielte demnach eine stärkere Reduktion der Zellviabilität als Temozolomid allein (97). Die Kombination aus BMS-777607 und Temozolomid sollte in zukünftigen Untersuchungen evaluiert werden.

Zudem interagiert der Axl-Rezeptor über Crosstalk mit anderen RYKs wie z. B. dem EGFR (*engl.* epidermal growth factor receptor) oder dem VEGFR (*engl.* receptor for vascular, endothelial growth factor) (101, 111). Es zeigte sich, dass der Axl-Signalweg die Resistenz gegenüber dem EGFR-Inhibitor Erlotinib in multiplen Krebs-Zelllinien induzierte, so auch in Gliomzellen (111-113). Weiterhin ist der Axl-Signalweg an der Entstehung von Resistenzen gegenüber antiangiogenen Therapeutika beteiligt (101, 114). Resistenzen gegenüber Krebstherapeutika sind mit dem Phänomen der Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT)

assoziiert. Die EMT beschreibt einen Phänotypenwechsel von Zellen, der einen Verlust epithelialer Eigenschaften zu Gunsten mesenchymaler Merkmale beinhaltet. Im malignen Kontext resultieren aus der EMT Krebszellen, die sich durch eine gesteigerte Migration, Invasion sowie durch eine erhöhte Therapeutika-Resistenz auszeichnen (115, 116). Diese Krebszellen weisen Gemeinsamkeiten mit Stammzellen (sog. „Krebsstammzellen“) auf (117). Der Axl-Signalweg hat eine zentrale Bedeutung für die Induktion der EMT in multiplen Krebserkrankungen (110, 118). Ein der EMT vergleichbares Phänomen findet in Gliomzellen statt (115, 116, 119). Auch hier spielt der Axl-Signalweg eine entscheidende Rolle. So wurde Axl als Schlüsselregulator der mesenchymalen Differenzierung stammzellartiger Zellen des GBM identifiziert (120). Diese Zellpopulation des GBM agiert hochgradig invasiv und zeigt diverse Resistenzen (121-123). Zukünftige Studien sollten sich daher auch auf die Evaluierung geeigneter Kombinationstherapien des GBM fokussieren, um Anti-Tumor-Effekte zu maximieren und Therapeutika-Resistenzen vorzubeugen (124). Die zielgerichtete Inhibierung des Axl-Signalwegs in Kombination mit EGFR-selektiven Inhibitoren wie z. B. Erlotinib könnte einen potenten Ansatz darstellen (112, 125). Zudem erscheint die Kombination aus Axl-Inhibierung und antiangiogenen Therapeutika interessant (101, 126). Im Fall des GBM zeigte sich bisher kein eindeutiger Benefit antiangiogener Therapiestrategien (127). Wick et al. untersuchten die Kombination aus Bevacizumab und dem Zytostatikum Lomustin bei Patienten mit erstmalig rezidiertem GBM. Hierbei ergab sich kein wesentlicher Überlebensvorteil im Vergleich zur Monotherapie mit Lomustin (Mittleres Überleben: 9,1 Monate vs. 8,6 Monate) (106). Die Resistenzmechanismen von Gliomzellen gegenüber antiangiogenen Therapien sind nicht in Gänze aufgeklärt (128). Es zeigt sich u. a. ein vermehrt invasives Wachstumsmuster des GBM unter Bevacizumab (129). Die Resistenz gegenüber Bevacizumab ist mit der mesenchymalen Transition von Gliomzellen assoziiert (130). Nach unseren Ergebnissen erzielten die Axl-Inhibitoren eine potente Reduktion der Gliomzell-Migration und -Invasion. Die Kombination aus Axl-selektiven Inhibitoren sowie antiangiogenen Substanzen, wie z. B. Sunitinib oder Bevacizumab, erscheint in der Behandlung des GBM daher vielversprechend (126).

Erste klinische Daten zur Expression des Axl-Rezeptors in humanem Gliomgewebe verdeutlichen seine Relevanz im GBM (80, 102). Nach Hutterer et al. imponierte mehr als die Hälfte humaner GBM-Proben durch moderate bis hohe Expressionslevel des Axl-Rezeptors. Es zeigte sich eine vermehrte Expression in den Pseudopalisaden sowie in reaktiven Astrozyten (80). Onken et al. bestätigten später die Expression von P-Axl in 74 % der GBM-Proben. Hier wurde eine betonte Expression v. a. in den Pseudopalisaden sowie in den Tumorgefäßen



detektiert (102). Beide Studien belegen die Korrelation von erhöhter Axl- bzw. P-Axl-Expression mit einer ungünstigen Prognose für die Patienten. Dies stellte sich als ein frühzeitiger Tumorprogress und ein reduziertes Gesamtüberleben dar (80, 102).

Auf der Basis der Forschungsergebnisse der letzten Jahre hinsichtlich seiner Expression und Rolle in der Tumorbilogie ist der Axl-Rezeptor ein attraktives Angriffsziel für Krebstherapeutika. Aktuell werden bereits mehrere Axl-Inhibitoren als Mono- oder in Kombinationstherapie in Phase-I-/ Phase-II-Studien bei verschiedenen Krebserkrankungen getestet (110). Hier ist u. a. der selektive, oral verfügbare Axl-Inhibitor BGB324 (Bemcentinib) zu erwähnen, der zu diesem Zeitpunkt in sechs Phase-II-Studien bei Patienten mit Bronchialkarzinom, Mammakarzinom, Melanom, akuter myeloischer Leukämie und Myelodysplastischem Syndrom evaluiert wird (131). Ein monoklonaler Antikörper (YW327.6S2) sowie ein Decoy-Rezeptor (GL2I.T) von Axl befinden sich derzeit in präklinischer Entwicklung (102, 110, 132). Die klinische Erprobung einer zielgerichteten Inhibierung des Axl-Signalwegs durch *Targeted Therapies* bei Patienten mit GBM ist in zukünftigen Studien zu erwarten.

Zudem wird es zunehmend relevant, Krebspatienten zu identifizieren, die von einer zielgerichteten Inhibierung des Axl-Signalwegs profitieren. Im Fall des GBM wurde die Grundlage hierfür bereits durch die Arbeiten von Hutterer et al. sowie Onken et al. gelegt. Der Axl-Rezeptor stellt hiernach für die Mehrheit der Patienten mit GBM ein potentielles Target dar (80, 102). Nach Onken et al. könnten Patienten mit einer simultanen Expression von P-Axl in hyperzellulären Tumorarealen und den Tumorgefäßen bevorzugt von einer derartigen Therapie profitieren (102).

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Für die Patienten mit Glioblastom existiert zum aktuellen Zeitpunkt kein kurativer Behandlungsansatz. Selbst unter leitliniengerechter Therapie, basierend auf operativer Tumorresektion, Strahlentherapie und Chemotherapie mit Temozolomid, ist die Prognose äußerst limitiert. Die sog. „zielgerichteten Krebstherapien“ erlangten zuletzt große Bedeutung für die Behandlung diverser Krebserkrankungen. Im Fall des Glioblastoms blieben die *Targeted Therapies* bisher hinter den Erwartungen zurück. Es ist notwendig, neue Angriffspunkte unter Berücksichtigung der speziellen Tumorbilogie des Glioblastoms zu identifizieren. Als ein potenzielles Target gilt die Rezeptortyrosinkinase Axl.

Das Ziel unserer Studie war daher die Evaluierung einer zielgerichteten Inhibierung von Axl durch die niedermolekularen Tyrosinkinase-Inhibitoren BMS-777607, LDC-41267 und MPCD-84111 in verschiedenen Modellen des Glioblastoms. Die Effekte dieser Axl-Inhibitoren auf die Eigenschaften multipler Gliom-Zelllinien wurden in funktionellen Assays *in vitro* und *ex vivo* untersucht. Weiterhin wurde ein etabliertes intrakranielles Tumormodell *in vivo* anhand zweier Gliom-Zelllinien verwendet. GBM-Xenografts wurden nach der Behandlungsphase mittels MRT-Kontrollen sowie durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie analysiert.

Unsere Untersuchungsergebnisse zeigen, dass BMS-777607, LDC-41267 und MPCD-84111 multiple Eigenschaften der Gliomzellen supprimieren. Die Behandlung mit den Axl-Inhibitoren resultierte insbesondere in einer starken Reduktion der Migration und Invasion *in vitro* und *ex vivo*. BMS-777607 zeigte als einziger Axl-Inhibitor eine signifikante Reduktion des intrakraniellen Tumorwachstums *in vivo*. Dies konnten wir durch antiproliferative sowie proapoptotische Effekte im Tumorgewebe erklären.

Zusammenfassend stellt die zielgerichtete Inhibierung von Axl durch selektive, niedermolekulare Tyrosinkinase-Inhibitoren eine potente Therapiestrategie im experimentellen Glioblastom dar. Eine Limitation unserer Studie bilden mögliche Off-Target-Effekte der verwendeten Axl-Inhibitoren. Weitere Untersuchungen zur Inhibierung von Axl durch Substanzen der *Targeted Therapies* in patientennahen Glioblastom-Modellen sind für die Realisierung klinischer Studien wichtig. Eine Erweiterung der therapeutischen Möglichkeiten für die Patienten mit Glioblastom ist dringend notwendig.

## 6 VERZEICHNISSE

### 6.1 Literaturverzeichnis

1. Zentrum für Krebsregisterdaten, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.: Krebs in Deutschland für 2013/2014 [Internet]. 11. Ausgabe. Dezember 2017 [zitiert am 22.02.2018]. URL: [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/kid\\_2017/krebs\\_in\\_deutschland\\_2017.pdf](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2017/krebs_in_deutschland_2017.pdf)
2. Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro Oncol.* 2012;14 Suppl 5:v1-49.
3. 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.
4. Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, Liu M, Blanda R, Kromer C, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro Oncol.* 2015;17 Suppl 4:iv1-iv62.
5. Kleihues P, Ohgaki H. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro Oncol.* 1999;1(1):44-51.
6. Walter AW, Hancock ML, Pui CH, Hudson MM, Ochs JS, Rivera GK, Pratt CB, Boyett JM, Kun LE. Secondary brain tumors in children treated for acute lymphoblastic leukemia at St Jude Children's Research Hospital. *J Clin Oncol.* 1998;16(12):3761-7.
7. Ohgaki H. Epidemiology of brain tumors. *Methods Mol Biol.* 2009;472:323-42.
8. DeAngelis LM. Brain tumors. *N Engl J Med.* 2001;344(2):114-23.
9. Deutsche Gesellschaft für Neurologie: Gliome – Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie [Internet]. Dezember 2014 [zitiert am 22.02.2018]. URL: <https://www.dgn.org/leitlinien/2977-ii-76-gliome>
10. Stupp R, Dietrich PY, Ostermann Kraljevic S, Pica A, Maillard I, Maeder P, Meuli R, Janzer R, Pizzolato G, Miralbell R, Porchet F, Regli L, de Tribolet N, Mirimanoff RO, Leyvraz S. Promising survival for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with concomitant radiation plus temozolomide followed by adjuvant temozolomide. *J Clin Oncol.* 2002;20(5):1375-82.

11. Stupp R, Weber DC. The role of radio- and chemotherapy in glioblastoma. *Onkologie*. 2005;28(6-7):315-7.
12. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ, Group A-GS. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol*. 2006;7(5):392-401.
13. Stummer W, Reulen HJ, Meinel T, Pichlmeier U, Schumacher W, Tonn JC, Rohde V, Opperl F, Turowski B, Woiciechowsky C, Franz K, Pietsch T, Group A-GS. Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias. *Neurosurgery*. 2008;62(3):564-76; discussion -76.
14. Weller M, Stupp R, Reifenberger G, Brandes AA, van den Bent MJ, Wick W, Hegi ME. MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nat Rev Neurol*. 2010;6(1):39-51.
15. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352(10):997-1003.
16. Lefranc F, Brotchi J, Kiss R. Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis. *J Clin Oncol*. 2005;23(10):2411-22.
17. Demuth T, Berens ME. Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. *J Neurooncol*. 2004;70(2):217-28.
18. Tonn JC, Goldbrunner R. Mechanisms of glioma cell invasion. *Acta Neurochir Suppl*. 2003;88:163-7.
19. Paw I, Carpenter RC, Watabe K, Debinski W, Lo HW. Mechanisms regulating glioma invasion. *Cancer Lett*. 2015;362(1):1-7.
20. Lefranc F, Rynkowski M, DeWitte O, Kiss R. Present and potential future adjuvant issues in high-grade astrocytic glioma treatment. *Adv Tech Stand Neurosurg*. 2009;34:3-35.
21. Bellail AC, Hunter SB, Brat DJ, Tan C, Van Meir EG. Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(6):1046-69.
22. Onken J. The role of the proteoglycan versican in high-grade gliomas [Dissertation]. Regensburg: Universität Regensburg; 2013.
23. Hill C, Hunter SB, Brat DJ. Genetic markers in glioblastoma: prognostic significance and future therapeutic implications. *Adv Anat Pathol*. 2003;10(4):212-7.
24. Fuller GN, Hess KR, Rhee CH, Yung WK, Sawaya RA, Bruner JM, Zhang W. Molecular classification of human diffuse gliomas by multidimensional scaling analysis of gene expression profiles parallels morphology-based classification, correlates with survival, and reveals clinically-relevant novel glioma subsets. *Brain Pathol*. 2002;12(1):108-16.

25. Gerber DE. Targeted therapies: a new generation of cancer treatments. *Am Fam Physician*. 2008;77(3):311-9.
26. Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*. 1990;61(2):203-12.
27. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2000;103(2):211-25.
28. Posner I, Engel M, Gazit A, Levitzki A. Kinetics of inhibition by tyrophostins of the tyrosine kinase activity of the epidermal growth factor receptor and analysis by a new computer program. *Mol Pharmacol*. 1994;45(4):673-83.
29. Garuti L, Roberti M, Bottegoni G. Multi-kinase inhibitors. *Curr Med Chem*. 2015;22(6):695-712.
30. Gan HK, Seruga B, Knox JJ. Sunitinib in solid tumors. *Expert Opin Investig Drugs*. 2009;18(6):821-34.
31. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers CL. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2001;344(14):1031-7.
32. Wu SG, Shih JY. Management of acquired resistance to EGFR TKI-targeted therapy in advanced non-small cell lung cancer. *Mol Cancer*. 2018;17(1):38.
33. Onken J, Torka R, Korsing S, Radke J, Kremenceskaia I, Nieminen M, Bai X, Ullrich A, Heppner F, Vajkoczy P. Inhibiting receptor tyrosine kinase AXL with small molecule inhibitor BMS-777607 reduces glioblastoma growth, migration, and invasion in vitro and in vivo. *Oncotarget*. 2016;7(9):9876-89.
34. Hutterer M, Nowosielski M, Haybaeck J, Embacher S, Stockhammer F, Gotwald T, Holzner B, Capper D, Preusser M, Marosi C, Oberndorfer S, Moik M, Buchroithner J, Seiz M, Tuettenberg J, Herrlinger U, Wick A, Vajkoczy P, Stockhammer G. A single-arm phase II Austrian/German multicenter trial on continuous daily sunitinib in primary glioblastoma at first recurrence (SURGE 01-07). *Neuro Oncol*. 2014;16(1):92-102.
35. Li Y, Ye X, Tan C, Hongo JA, Zha J, Liu J, Kallop D, Ludlam MJ, Pei L. Axl as a potential therapeutic target in cancer: role of Axl in tumor growth, metastasis and angiogenesis. *Oncogene*. 2009;28(39):3442-55.
36. Vajkoczy P, Knyazev P, Kunkel A, Capelle HH, Behrndt S, von Tengg-Kobligk H, Kiessling F, Eichelsbacher U, Essig M, Read TA, Erber R, Ullrich A. Dominant-negative inhibition of the Axl receptor tyrosine kinase suppresses brain tumor cell growth and invasion and prolongs survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(15):5799-804.
37. Liu E, Hjelle B, Bishop JM. Transforming genes in chronic myelogenous leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(6):1952-6.

38. O'Bryan JP, Frye RA, Cogswell PC, Neubauer A, Kitch B, Prokop C, Espinosa R, Le Beau MM, Earp HS, Liu ET. *axl*, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol.* 1991;11(10):5016-31.
39. Janssen JW, Schulz AS, Steenvoorden AC, Schmidberger M, Strehl S, Ambros PF, Bartram CR. A novel putative tyrosine kinase receptor with oncogenic potential. *Oncogene.* 1991;6(11):2113-20.
40. Stoeckli ET, Landmesser LT. Axonin-1, Nr-CAM, and Ng-CAM play different roles in the in vivo guidance of chick commissural neurons. *Neuron.* 1995;14(6):1165-79.
41. Faust M, Ebensperger C, Schulz AS, Schleithoff L, Hameister H, Bartram CR, Janssen JW. The murine ufo receptor: molecular cloning, chromosomal localization and in situ expression analysis. *Oncogene.* 1992;7(7):1287-93.
42. Lai C, Lemke G. An extended family of protein-tyrosine kinase genes differentially expressed in the vertebrate nervous system. *Neuron.* 1991;6(5):691-704.
43. Nagata K, Ohashi K, Nakano T, Arita H, Zong C, Hanafusa H, Mizuno K. Identification of the product of growth arrest-specific gene 6 as a common ligand for Axl, Sky, and Mer receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem.* 1996;271(47):30022-7.
44. Prasad D, Rothlin CV, Burrola P, Burstyn-Cohen T, Lu Q, Garcia de Frutos P, Lemke G. TAM receptor function in the retinal pigment epithelium. *Mol Cell Neurosci.* 2006;33(1):96-108.
45. Sasaki T, Knyazev PG, Clout NJ, Cheburkin Y, Göhring W, Ullrich A, Timpl R, Hohenester E. Structural basis for Gas6-Axl signalling. *EMBO J.* 2006;25(1):80-7.
46. Braunger J, Schleithoff L, Schulz AS, Kessler H, Lammers R, Ullrich A, Bartram CR, Janssen JW. Intracellular signaling of the Ufo/Axl receptor tyrosine kinase is mediated mainly by a multi-substrate docking-site. *Oncogene.* 1997;14(22):2619-31.
47. Pierce A, Bliesner B, Xu M, Nielsen-Preiss S, Lemke G, Tobet S, Wierman ME. Axl and Tyro3 modulate female reproduction by influencing gonadotropin-releasing hormone neuron survival and migration. *Mol Endocrinol.* 2008;22(11):2481-95.
48. Rothlin CV, Ghosh S, Zuniga EI, Oldstone MB, Lemke G. TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell.* 2007;131(6):1124-36.
49. Park IK, Trotta R, Yu J, Caligiuri MA. Axl/Gas6 pathway positively regulates FLT3 activation in human natural killer cell development. *Eur J Immunol.* 2013;43(10):2750-5.
50. Vouri M, Croucher DR, Kennedy SP, An Q, Pilkington GJ, Hafizi S. Axl-EGFR receptor tyrosine kinase hetero-interaction provides EGFR with access to pro-invasive signalling in cancer cells. *Oncogenesis.* 2016;5(10):e266.
51. Konishi A, Aizawa T, Mohan A, Korshunov VA, Berk BC. Hydrogen peroxide activates the Gas6-Axl pathway in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2004;279(27):28766-70.

52. Valverde P. Effects of Gas6 and hydrogen peroxide in Axl ubiquitination and downregulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;333(1):180-5.
53. D'Arcangelo D, Ambrosino V, Giannuzzo M, Gaetano C, Capogrossi MC. Axl receptor activation mediates laminar shear stress anti-apoptotic effects in human endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 2006;71(4):754-63.
54. Ruan GX, Kazlauskas A. Axl is essential for VEGF-A-dependent activation of PI3K/Akt. *EMBO J.* 2012;31(7):1692-703.
55. Bellosta P, Costa M, Lin DA, Basilico C. The receptor tyrosine kinase ARK mediates cell aggregation by homophilic binding. *Mol Cell Biol.* 1995;15(2):614-25.
56. Paolino M, Choidas A, Wallner S, Pranjic B, Uribealago I, Loeser S, Jamieson AM, Langdon WY, Ikeda F, Fededa JP, Cronin SJ, Nitsch R, Schultz-Fademrecht C, Eickhoff J, Menninger S, Unger A, Torka R, Gruber T, Hinterleitner R, Baier G, Wolf D, Ullrich A, Klebl BM, Penninger JM. The E3 ligase Cbl-b and TAM receptors regulate cancer metastasis via natural killer cells. *Nature.* 2014;507(7493):508-12.
57. Hafizi S, Ibraimi F, Dahlbäck B. C1-TEN is a negative regulator of the Akt/PKB signal transduction pathway and inhibits cell survival, proliferation, and migration. *FASEB J.* 2005;19(8):971-3.
58. Costa M, Bellosta P, Basilico C. Cleavage and release of a soluble form of the receptor tyrosine kinase ARK in vitro and in vivo. *J Cell Physiol.* 1996;168(3):737-44.
59. Ekman C, Stenhoff J, Dahlbäck B. Gas6 is complexed to the soluble tyrosine kinase receptor Axl in human blood. *J Thromb Haemost.* 2010;8(4):838-44.
60. Mudduluru G, Ceppi P, Kumarswamy R, Scagliotti GV, Papotti M, Allgayer H. Regulation of Axl receptor tyrosine kinase expression by miR-34a and miR-199a/b in solid cancer. *Oncogene.* 2011;30(25):2888-99.
61. Schulz AS, Schleithoff L, Faust M, Bartram CR, Janssen JW. The genomic structure of the human UFO receptor. *Oncogene.* 1993;8(2):509-13.
62. Liu R, Gong M, Li X, Zhou Y, Gao W, Tulpule A, Chaudhary PM, Jung J, Gill PS. Induction, regulation, and biologic function of Axl receptor tyrosine kinase in Kaposi sarcoma. *Blood.* 2010;116(2):297-305.
63. Mudduluru G, Allgayer H. The human receptor tyrosine kinase Axl gene--promoter characterization and regulation of constitutive expression by Sp1, Sp3 and CpG methylation. *Biosci Rep.* 2008;28(3):161-76.
64. Prieto AL, Weber JL, Lai C. Expression of the receptor protein-tyrosine kinases Tyro-3, Axl, and mer in the developing rat central nervous system. *J Comp Neurol.* 2000;425(2):295-314.
65. Linger RM, Keating AK, Earp HS, Graham DK. TAM receptor tyrosine kinases: biologic functions, signaling, and potential therapeutic targeting in human cancer. *Adv Cancer Res.* 2008;100:35-83.

66. Hutchison MR, Bassett MH, White PC. SCF, BDNF, and Gas6 are regulators of growth plate chondrocyte proliferation and differentiation. *Mol Endocrinol.* 2010;24(1):193-203.
67. Angelillo-Scherrer A, Burnier L, Flores N, Savi P, DeMol M, Schaeffer P, Herbert JM, Lemke G, Goff SP, Matsushima GK, Earp HS, Vesin C, Hoylaerts MF, Plaisance S, Collen D, Conway EM, Wehrle-Haller B, Carmeliet P. Role of Gas6 receptors in platelet signaling during thrombus stabilization and implications for antithrombotic therapy. *J Clin Invest.* 2005;115(2):237-46.
68. Ruan GX, Kazlauskas A. Lactate engages receptor tyrosine kinases Axl, Tie2, and vascular endothelial growth factor receptor 2 to activate phosphoinositide 3-kinase/Akt and promote angiogenesis. *J Biol Chem.* 2013;288(29):21161-72.
69. Korshunov VA. Axl-dependent signalling: a clinical update. *Clin Sci (Lond).* 2012;122(8):361-8.
70. Linger RM, Cohen RA, Cummings CT, Sather S, Migdall-Wilson J, Middleton DH, Lu X, Barón AE, Franklin WA, Merrick DT, Jedlicka P, DeRyckere D, Heasley LE, Graham DK. Mer or Axl receptor tyrosine kinase inhibition promotes apoptosis, blocks growth and enhances chemosensitivity of human non-small cell lung cancer. *Oncogene.* 2013;32(29):3420-31.
71. Keating AK, Kim GK, Jones AE, Donson AM, Ware K, Mulcahy JM, Salzberg DB, Foreman NK, Liang X, Thorburn A, Graham DK. Inhibition of Mer and Axl receptor tyrosine kinases in astrocytoma cells leads to increased apoptosis and improved chemosensitivity. *Mol Cancer Ther.* 2010;9(5):1298-307.
72. Zhang YX, Knyazev PG, Cheburkin YV, Sharma K, Knyazev YP, Orfi L, Szabadkai I, Daub H, Kéri G, Ullrich A. AXL is a potential target for therapeutic intervention in breast cancer progression. *Cancer Res.* 2008;68(6):1905-15.
73. Hoshino R, Chatani Y, Yamori T, Tsuruo T, Oka H, Yoshida O, Shimada Y, Ari-i S, Wada H, Fujimoto J, Kohno M. Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene.* 1999;18(3):813-22.
74. Mahajan K, Mahajan NP. PI3K-independent AKT activation in cancers: a treasure trove for novel therapeutics. *J Cell Physiol.* 2012;227(9):3178-84.
75. Li Y, Jia L, Ren D, Liu C, Gong Y, Wang N, Zhang X, Zhao Y. Axl mediates tumor invasion and chemosensitivity through PI3K/Akt signaling pathway and is transcriptionally regulated by slug in breast carcinoma. *IUBMB Life.* 2014;66(7):507-18.
76. Hong CC, Lay JD, Huang JS, Cheng AL, Tang JL, Lin MT, Lai GM, Chuang SE. Receptor tyrosine kinase AXL is induced by chemotherapy drugs and overexpression of AXL confers drug resistance in acute myeloid leukemia. *Cancer Lett.* 2008;268(2):314-24.
77. Lee WP, Wen Y, Varnum B, Hung MC. Akt is required for Axl-Gas6 signaling to protect cells from E1A-mediated apoptosis. *Oncogene.* 2002;21(3):329-36.



78. Kwiatkowska A, Kijewska M, Lipko M, Hibner U, Kaminska B. Downregulation of Akt and FAK phosphorylation reduces invasion of glioblastoma cells by impairment of MT1-MMP shuttling to lamellipodia and downregulates MMPs expression. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813(5):655-67.
79. Kanlikilicer P, Ozpolat B, Aslan B, Bayraktar R, Gurbuz N, Rodriguez-Aguayo C, Bayraktar E, Denizli M, Gonzalez-Villasana V, Ivan C, Lokesh GLR, Amero P, Catuogno S, Haemmerle M, Wu SY, Mitra R, Gorenstein DG, Volk DE, de Franciscis V, Sood AK, Lopez-Berestein G. Therapeutic Targeting of AXL Receptor Tyrosine Kinase Inhibits Tumor Growth and Intraperitoneal Metastasis in Ovarian Cancer Models. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2017;9:251-62.
80. Hutterer M, Knyazev P, Abate A, Reschke M, Maier H, Stefanova N, Knyazeva T, Barbieri V, Reindl M, Muigg A, Kostron H, Stockhammer G, Ullrich A. Axl and growth arrest-specific gene 6 are frequently overexpressed in human gliomas and predict poor prognosis in patients with glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res*. 2008;14(1):130-8.
81. Ott M, Litzenburger UM, Sahm F, Rauschenbach KJ, Tudoran R, Hartmann C, Marquez VE, von Deimling A, Wick W, Platten M. Promotion of glioblastoma cell motility by enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) is mediated by AXL receptor kinase. *PLoS One*. 2012;7(10):e47663.
82. Schroeder GM, An Y, Cai ZW, Chen XT, Clark C, Cornelius LA, Dai J, Gullo-Brown J, Gupta A, Henley B, Hunt JT, Jeyaseelan R, Kamath A, Kim K, Lippy J, Lombardo LJ, Manne V, Oppenheimer S, Sack JS, Schmidt RJ, Shen G, Stefanski K, Tokarski JS, Trainor GL, Wautlet BS, Wei D, Williams DK, Zhang Y, Fargnoli J, Borzilleri RM. Discovery of N-(4-(2-amino-3-chloropyridin-4-yloxy)-3-fluorophenyl)-4-ethoxy-1-(4-fluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide (BMS-777607), a selective and orally efficacious inhibitor of the Met kinase superfamily. *J Med Chem*. 2009;52(5):1251-4.
83. Ronsin C, Muscatelli F, Mattei MG, Breathnach R. A novel putative receptor protein tyrosine kinase of the met family. *Oncogene*. 1993;8(5):1195-202.
84. Max-Planck-Innovation GmbH, Lead Discovery Center GmbH: Identification and Characterization of Axl Inhibitors as Pharmaceutical Leads [Internet]. Version 1.4. Dezember 2010 [zitiert am 22.02.2018]. URL: [https://www.lead-discovery.de/pdf/Axl\\_Inhibitors\\_MPG\\_LDC.pdf](https://www.lead-discovery.de/pdf/Axl_Inhibitors_MPG_LDC.pdf)
85. Torka R, Péntzes K, Gusenbauer S, Baumann C, Szabadkai I, Örfi L, Kéri G, Ullrich A. Activation of HER3 interferes with antitumor effects of Axl receptor tyrosine kinase inhibitors: suggestion of combination therapy. *Neoplasia*. 2014;16(4):301-18.
86. Péntzes K, Baumann C, Szabadkai I, Orfi L, Kéri G, Ullrich A, Torka R. Combined inhibition of AXL, Lyn and p130Cas kinases block migration of triple negative breast cancer cells. *Cancer Biol Ther*. 2014;15(11):1571-82.

87. Caradec J, Sirab N, Keumeugni C, Moutereau S, Chimingqi M, Matar C, Revaud D, Bah M, Manivet P, Conti M, Loric S. 'Desperate house genes': the dramatic example of hypoxia. *Br J Cancer*. 2010;102(6):1037-43.
88. Boilly B, Vercoutter-Edouart AS, Hondermarck H, Nurcombe V, Le Bourhis X. FGF signals for cell proliferation and migration through different pathways. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2000;11(4):295-302.
89. Newman PJ, Berndt MC, Gorski J, White GC, Lyman S, Paddock C, Muller WA. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science*. 1990;247(4947):1219-22.
90. Newman PJ. The role of PECAM-1 in vascular cell biology. *Ann N Y Acad Sci*. 1994;714:165-74.
91. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000;182(3):311-22.
92. Westphal M, Meissner H. Establishing human glioma-derived cell lines. *Methods Cell Biol*. 1998;57:147-65.
93. Bodell WJ, Aida T, Berger MS, Rosenblum ML. Increased repair of O6-alkylguanine DNA adducts in glioma-derived human cells resistant to the cytotoxic and cytogenetic effects of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Carcinogenesis*. 1986;7(6):879-83.
94. Rousset M, Zweibaum A, Fogh J. Presence of glycogen and growth-related variations in 58 cultured human tumor cell lines of various tissue origins. *Cancer Res*. 1981;41(3):1165-70.
95. Pardridge WM. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx*. 2005;2(1):3-14.
96. Mishra A, Wang J, Shiozawa Y, McGee S, Kim J, Jung Y, Joseph J, Berry JE, Havens A, Pienta KJ, Taichman RS. Hypoxia stabilizes GAS6/Axl signaling in metastatic prostate cancer. *Mol Cancer Res*. 2012;10(6):703-12.
97. Vouri M, An Q, Birt M, Pilkington GJ, Hafizi S. Small molecule inhibition of Axl receptor tyrosine kinase potently suppresses multiple malignant properties of glioma cells. *Oncotarget*. 2015;6(18):16183-97.
98. Holland SJ, Pan A, Franci C, Hu Y, Chang B, Li W, Duan M, Torneros A, Yu J, Heckrodt TJ, Zhang J, Ding P, Apatira A, Chua J, Brandt R, Pine P, Goff D, Singh R, Payan DG, Hitoshi Y. R428, a selective small molecule inhibitor of Axl kinase, blocks tumor spread and prolongs survival in models of metastatic breast cancer. *Cancer Res*. 2010;70(4):1544-54.
99. Li Y, Jia L, Liu C, Gong Y, Ren D, Wang N, Zhang X, Zhao Y. Axl as a downstream effector of TGF- $\beta$ 1 via PI3K/Akt-PAK1 signaling pathway promotes tumor invasion and chemoresistance in breast carcinoma. *Tumour Biol*. 2015;36(2):1115-27.

100. Engelhorn T, Savaskan NE, Schwarz MA, Kreutzer J, Meyer EP, Hahnen E, Ganslandt O, Dörfler A, Nimsky C, Buchfelder M, Eyüpoglu IY. Cellular characterization of the peritumoral edema zone in malignant brain tumors. *Cancer Sci.* 2009;100(10):1856-62.
101. Gallicchio M, Mitola S, Valdembri D, Fantozzi R, Varnum B, Avanzi GC, Bussolino F. Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated endothelial cell activation by Axl tyrosine kinase receptor. *Blood.* 2005;105(5):1970-6.
102. Onken J, Vajkoczy P, Torka R, Hempt C, Patsouris V, Heppner FL, Radke J. Phospho-AXL is widely expressed in glioblastoma and associated with significant shorter overall survival. *Oncotarget.* 2017;8(31):50403-14.
103. Stommel JM, Kimmelman AC, Ying H, Nabioullin R, Ponugoti AH, Wiedemeyer R, Stegh AH, Bradner JE, Ligon KL, Brennan C, Chin L, DePinho RA. Coactivation of receptor tyrosine kinases affects the response of tumor cells to targeted therapies. *Science.* 2007;318(5848):287-90.
104. Petterson SA, Dahlrot RH, Hermansen SK, K A Munthe S, Gundesen MT, Wohlleben H, Rasmussen T, Beier CP, Hansen S, Kristensen BW. High levels of c-Met is associated with poor prognosis in glioblastoma. *J Neurooncol.* 2015;122(3):517-27.
105. Linger RM, Keating AK, Earp HS, Graham DK. Taking aim at Mer and Axl receptor tyrosine kinases as novel therapeutic targets in solid tumors. *Expert Opin Ther Targets.* 2010;14(10):1073-90.
106. 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, Golfopoulos 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.
107. ASLAN Pharmaceuticals: A Phase I Multiple Ascending Dose Study of ASLAN002 in Subjects With Advanced or Metastatic Solid Tumors (NCT01721148) [Internet]. Januar 2017 [zitiert am 22.02.2018] URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01721148>
108. AdisInsight databases: BMS 777607 [Internet]. März 2017 [zitiert am 22.02.2018]. URL: <https://adisinsight.springer.com/drugs/800029207>
109. Boichuk S, Galembikova A, Dunaev P, Valeeva E, Shagimardanova E, Gusev O, Khaiboullina S. A Novel Receptor Tyrosine Kinase Switch Promotes Gastrointestinal Stromal Tumor Drug Resistance. *Molecules.* 2017;22(12).
110. Gay CM, Balaji K, Byers LA. Giving AXL the axe: targeting AXL in human malignancy. *Br J Cancer.* 2017;116(4):415-23.
111. Zhang Z, Lee JC, Lin L, Olivás V, Au V, LaFramboise T, Abdel-Rahman M, Wang X, Levine AD, Rho JK, Choi YJ, Choi CM, Kim SW, Jang SJ, Park YS, Kim WS, Lee DH, Lee JS, Miller VA, Arcila M, Ladanyi M, Moonsamy P, Sawyers C, Boggon TJ, Ma PC, Costa C, Taron M, Rosell R, Halmos B, Bivona TG. Activation of the AXL kinase causes resistance to EGFR-targeted therapy in lung cancer. *Nat Genet.* 2012;44(8):852-60.

112. Giles KM, Kalinowski FC, Candy PA, Epis MR, Zhang PM, Redfern AD, Stuart LM, Goodall GJ, Leedman PJ. Axl mediates acquired resistance of head and neck cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib. *Mol Cancer Ther.* 2013;12(11):2541-58.
113. Guo G, Gong K, Ali S, Ali N, Shallwani S, Hatanpaa KJ, Pan E, Mickey B, Burma S, Wang DH, Kesari S, Sarkaria JN, Zhao D, Habib AA. A TNF-JNK-Axl-ERK signaling axis mediates primary resistance to EGFR inhibition in glioblastoma. *Nat Neurosci.* 2017;20(8):1074-84.
114. Zhou L, Liu XD, Sun M, Zhang X, German P, Bai S, Ding Z, Tannir N, Wood CG, Matin SF, Karam JA, Tamboli P, Sircar K, Rao P, Rankin EB, Laird DA, Hoang AG, Walker CL, Giaccia AJ, Jonasch E. Targeting MET and AXL overcomes resistance to sunitinib therapy in renal cell carcinoma. *Oncogene.* 2016;35(21):2687-97.
115. Iwate Y. Epithelial-mesenchymal transition in glioblastoma progression. *Oncol Lett.* 2016;11(3):1615-20.
116. Iser IC, Pereira MB, Lenz G, Wink MR. The Epithelial-to-Mesenchymal Transition-Like Process in Glioblastoma: An Updated Systematic Review and In Silico Investigation. *Med Res Rev.* 2017;37(2):271-313.
117. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Brisken C, Yang J, Weinberg RA. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell.* 2008;133(4):704-15.
118. Asiedu MK, Beauchamp-Perez FD, Ingle JN, Behrens MD, Radisky DC, Knutson KL. AXL induces epithelial-to-mesenchymal transition and regulates the function of breast cancer stem cells. *Oncogene.* 2014;33(10):1316-24.
119. Lee JK, Joo KM, Lee J, Yoon Y, Nam DH. Targeting the epithelial to mesenchymal transition in glioblastoma: the emerging role of MET signaling. *Onco Targets Ther.* 2014;7:1933-44.
120. Cheng P, Phillips E, Kim SH, Taylor D, Hielscher T, Puccio L, Hjelmeland AB, Lichter P, Nakano I, Goidts V. Kinome-wide shRNA screen identifies the receptor tyrosine kinase AXL as a key regulator for mesenchymal glioblastoma stem-like cells. *Stem Cell Reports.* 2015;4(5):899-913.
121. Zhang X, Zhang W, Mao XG, Zhen HN, Cao WD, Hu SJ. Targeting role of glioma stem cells for glioblastoma multiforme. *Curr Med Chem.* 2013;20(15):1974-84.
122. Murat A, Migliavacca E, Gorlia T, Lambiv WL, Shay T, Hamou MF, de Tribolet N, Regli L, Wick W, Kouwenhoven MC, Hainfellner JA, Heppner FL, Dietrich PY, Zimmer Y, Cairncross JG, Janzer RC, Domany E, Delorenzi M, Stupp R, Hegi ME. Stem cell-related "self-renewal" signature and high epidermal growth factor receptor expression associated with resistance to concomitant chemoradiotherapy in glioblastoma. *J Clin Oncol.* 2008;26(18):3015-24.

123. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, Williams PM, Modrusan Z, Feuerstein BG, Aldape K. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell*. 2006;9(3):157-73.
124. Kariolis MS, Miao YR, Diep A, Nash SE, Olcina MM, Jiang D, Jones DS, Kapur S, Mathews II, Koong AC, Rankin EB, Cochran JR, Giaccia AJ. Inhibition of the GAS6/AXL pathway augments the efficacy of chemotherapies. *J Clin Invest*. 2017;127(1):183-98.
125. Liu Q, Yu S, Zhao W, Qin S, Chu Q, Wu K. EGFR-TKIs resistance via EGFR-independent signaling pathways. *Mol Cancer*. 2018;17(1):53.
126. Martinho O, Zucca LE, Reis RM. AXL as a modulator of sunitinib response in glioblastoma cell lines. *Exp Cell Res*. 2015;332(1):1-10.
127. Nagane M, Nishikawa R. Bevacizumab for glioblastoma-a promising drug or not? *Cancers (Basel)*. 2013;5(4):1456-68.
128. Lu KV, Bergers G. Mechanisms of evasive resistance to anti-VEGF therapy in glioblastoma. *CNS Oncol*. 2013;2(1):49-65.
129. Li Y, Ali S, Clarke J, Cha S. Bevacizumab in Recurrent Glioma: Patterns of Treatment Failure and Implications. *Brain Tumor Res Treat*. 2017;5(1):1-9.
130. Piao Y, Liang J, Holmes L, Henry V, Sulman E, de Groot JF. Acquired resistance to anti-VEGF therapy in glioblastoma is associated with a mesenchymal transition. *Clin Cancer Res*. 2013;19(16):4392-403.
131. BerGenBio: About BerGenBio [Internet]. Juni 2018 [zitiert am 30.06.2018]. URL: <https://www.bergenbio.com/company/>
132. Ye X, Li Y, Stawicki S, Couto S, Eastham-Anderson J, Kallop D, Weimer R, Wu Y, Pei L. An anti-Axl monoclonal antibody attenuates xenograft tumor growth and enhances the effect of multiple anticancer therapies. *Oncogene*. 2010;29(38):5254-64.

## 6.2 Abkürzungsverzeichnis

Akt	Proteinkinase B
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AXL-DN	Dominant-negative Axl-Rezeptormutante
AXL-WT	Axl-Wildtyp
BAD	Bcl-2-antagonist of cell death
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BME	Basal Medium Eagle
BSA	Bovines Serumalbumin
c-Met	Tyrosine-protein kinase Met
CD31	Cluster of differentiation 31
CPP32	Caspase 3
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DiI	1,1'-Dioctadecyl-3,3,3'-tetramethylindocarbocyanin-perchlorat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
EZM	Extrazellularmatrix
FAK	Focal adhesion kinase
FCM	Fibroblast-conditioned medium
FKS	Fetales Kälberserum
FNIII	Fibronectin III
Gas6	Growth-arrest-specific gene-6
GBM	Glioblastoma multiforme
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HRP	Horseradish peroxidase
Ig	Immunglobulin
KG	Körpergewicht
LDS	Lithiumdodecylsulfat

MAP	Mitogen-activated protein
MEM	Minimum Essential Medium
MGMT-Gen	Methylguanin-DNA-Methyltransferase-Gen
MRT	Magnetresonanztomographie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
P-Axl	Phosphoryliertes Axl
PBS	Phosphate buffered saline
PEG300	Polyethylenglycol 300
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PS	Pferdeserum
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RNA	Ribonucleic acid
Ron	Recepteur d' Origine Nantais
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RYK	Rezeptortyrosinkinase
sAxl	Soluble Axl
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
smTKI	Small molecule tyrosine kinase inhibitor
TAM-Familie	Tyro-3-Axl-Mer-Familie
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGF-A	Vascular endothelial growth factor-A
VEGFR	Receptor for vascular, endothelial growth factor
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentralnervensystem

### 6.3 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b>	Schematische Darstellung der Struktur von Axl .....	10
<b>Abb. 2:</b>	Schematische Darstellung der Gas6-vermittelten Signaltransduktion durch Axl .....	11
<b>Abb. 3:</b>	Axl-Expression in multiplen Gliom-Zelllinien <i>in vitro</i> .....	36
<b>Abb. 4:</b>	Axl-Expression der SF126-Zellen <i>in vitro</i> .....	36
<b>Abb. 5:</b>	Repräsentative Phasenkontrast-Aufnahmen der U118MG-Zellen <i>in vitro</i> .....	37
<b>Abb. 6:</b>	Zellviabilität der SF126-Zellen <i>in vitro</i> .....	38
<b>Abb. 7:</b>	Zellviabilität der U118MG-Zellen <i>in vitro</i> .....	39
<b>Abb. 8:</b>	Zellviabilität der U87MG-Zellen <i>in vitro</i> .....	39
<b>Abb. 9:</b>	Zellviabilität der GL261-Zellen <i>in vitro</i> .....	40
<b>Abb. 10:</b>	Apoptoseverhalten der SF126-Zellen <i>in vitro</i> .....	41
<b>Abb. 11:</b>	Zellmigration der SF126-Zellen <i>in vitro</i> modifiziert nach Onken et al. (33) .....	42
<b>Abb. 12:</b>	Zellmigration der U118MG-Zellen <i>in vitro</i> modifiziert nach Onken et al. (33) .....	42
<b>Abb. 13:</b>	Repräsentative Konfokalmikroskopie-Aufnahmen des Invasionsverhaltens der U118MG-Sphäroide <i>ex vivo</i> modifiziert nach Onken et al. (33) .....	44
<b>Abb. 14:</b>	Invasionsverhalten der U118MG-Sphäroide <i>ex vivo</i> modifiziert nach Onken et al. (33) .....	45
<b>Abb. 15:</b>	Repräsentative MRT-Darstellung des intrakraniellen Tumorwachstums in S126-Xenografts <i>in vivo</i> modifiziert nach Onken et al. (33) .....	47
<b>Abb. 16:</b>	Intrakranielles Tumorwachstum in SF126-Xenografts <i>in vivo</i> modifiziert nach Onken et al. (33) .....	48
<b>Abb. 17:</b>	Intrakranielles Tumorwachstum in SF126-Xenografts <i>in vivo</i> [2] modifiziert nach Onken et al. (33) .....	48
<b>Abb. 18:</b>	Repräsentative MRT-Darstellung des intrakraniellen Tumorwachstums in U118MG-Xenografts <i>in vivo</i> modifiziert nach Onken et al. (33) .....	49
<b>Abb. 19:</b>	Intrakranielles Tumorwachstum in U118MG-Xenografts <i>in vivo</i> modifiziert nach Onken et al. (33) .....	49
<b>Abb. 20:</b>	Repräsentative Darstellung der SF126- und U118MG-Xenografts in HE-Färbung modifiziert nach Onken et al. (33) .....	50
<b>Abb. 21:</b>	Repräsentative Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen der Proliferation in SF126-Xenografts <i>in vivo</i> .....	51



<b>Abb. 22:</b>	Repräsentative Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen der Apoptose in SF126-Xenografts <i>in vivo</i> modifiziert nach Onken et al. (33) .....	52
<b>Abb. 23:</b>	Apoptoseverhalten in SF126-Xenografts <i>in vivo</i> modifiziert nach Onken et al. (33) .....	53
<b>Abb. 24:</b>	Repräsentative Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen der Vaskularisation in SF126-Xenografts <i>in vivo</i> .....	54
<b>Abb. 25:</b>	Gefäßdichte in SF126-Xenografts <i>in vivo</i> .....	55
<b>Abb. 26:</b>	Gefäßfläche in SF126-Xenografts <i>in vivo</i> .....	55

## 6.4 Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b>	Axl-Inhibitoren mit Molekülmasse und Bezugsquellen .....	15
<b>Tab. 2:</b>	Chemikalien und Substanzen mit Bezugsquellen .....	15
<b>Tab. 3:</b>	Kits mit Bezugsquellen .....	16
<b>Tab. 4:</b>	Antikörper mit Spezifitäten, Wirtstieren, Verdünnungen und Bezugsquellen .....	16
<b>Tab. 5:</b>	Apparaturen und Geräte mit Bezugsquellen .....	17
<b>Tab. 6:</b>	Verbrauchsmaterialien mit Bezugsquellen .....	17
<b>Tab. 7:</b>	Software mit Bezugsquellen .....	17
<b>Tab. 8:</b>	Zusammensetzungen der Medien mit Bezugsquellen .....	18
<b>Tab. 9:</b>	Zusammensetzungen des Trenn- und Sammelgels mit Bezugsquellen .....	18
<b>Tab. 10:</b>	Zusammensetzungen der Puffer und Lösungen mit Bezugsquellen .....	19
<b>Tab. 11:</b>	Zusammensetzung der Narkoselösung von 10 ml mit Bezugsquellen .....	19
<b>Tab. 12:</b>	Zelllinien mit zu implantierenden Zellzahlen .....	29

## EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

„Ich, Sören Korsing, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **„Die zielgerichtete Inhibierung der Rezeptortyrosinkinase Axl im Glioblastom – Experimentelle Studie zur Wirksamkeit der niedermolekularen Tyrosinkinase-Inhibitoren BMS-777607, LDC-41267 und MPCD-84111 in Modellen des Glioblastoms“** selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

Berlin, den 09.10.2018

---

Sören Korsing

## Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Sören Korsing hatte Anteil an folgender Publikation:

Onken, J.; Torka, R.; Korsing, S.; Radke, J.; Kremenetskaia, I.; Nieminen, M.; Bai, X.; Ullrich, A.; Heppner, F.; Vajkoczy, P., **Inhibiting receptor tyrosine kinase AXL with small molecule inhibitor BMS-777607 reduces glioblastoma growth, migration, and invasion in vitro and in vivo.** Oncotarget 2016, 7 (9), 9876-89.

### Beitrag im Einzelnen :

Ko-Autor, Durchführung praktischer Experimente (Zellkultur-Versuche, Sphäroid-Invasions-Assay, Tierversuche in Kooperation mit Dr. med. Julia Onken, Dipl. Biol. Irina Kremenetskaia und Melina Nieminen-Kelhä, Aufarbeitung des Gewebes, HE- und Immunfluoreszenzfärbungen), Mitwirkung an der statistischen Auswertung der Primärdaten, Literaturrecherche, Teilhabe an der Erarbeitung des Manuskriptes

Berlin, den 09.10.2018

---

Prof. Dr. med. Peter Vajkoczy

Berlin, den 09.10.2018

---

Sören Korsing

## **LEBENS LAUF**

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

## **PUBLIKATIONSLISTE**

Onken J, Torke R, Korsing S, Radke J, Kremenetskaia I, Nieminen M, Bai X, Ullrich A, Heppner F, Vajkoczy P. Inhibiting receptor tyrosine kinase AXL with small molecule inhibitor BMS-777607 reduces glioblastoma growth, migration, and invasion in vitro and in vivo. *Oncotarget*. 2016;7(9):9876-89.

## **DANKSAGUNG**

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Peter Vajkoczy danke ich für die Überlassung des Promotionsthemas sowie die Möglichkeit der Bearbeitung in seinem Neurochirurgischen Forschungslabor.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. med. Julia Onken für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten, die konstruktiven Ratschläge und Hilfestellungen bei der Durchführung dieser Arbeit und das freundschaftliche Arbeitsverhältnis.

Ich danke den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Labors für die freundliche Aufnahme und die gute Zusammenarbeit. Insbesondere danke ich Frau Dipl. Biol. Irina Kremenetskaia, Frau Melina Nieminen-Kelhä, Frau Dr. rer. nat. Kati Turkowski und Frau Dr. rer. nat. Kinga Blecharz-Lang für die Einarbeitung in die verschiedenen Methoden sowie die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Ich danke meinen Korrekturlesern der Dissertation, allen voran meiner Großmutter.

Schließlich danke ich meiner Familie und meinen engsten Vertrauten, auf deren Beistand ich jederzeit zählen kann.