

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

DISSERTATION

Bedeutung von NDRG1 für die Angiogenese,  
Tumorproliferation und Therapieresistenz gegenüber einer  
antiangiogenen und antitumoralen Therapie im Rahmen  
eines experimentellen Gliommodells

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Marie Beier, geb. Wüstner  
aus Dresden

Datum der Promotion: 4. Juni 2021

*Meiner Familie*

---

## Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

Thomas Broggini, **Marie Wüstner**, Christoph Harms, Lena Stange, Jonas Blaes, Carina Thomé, Ulrike Harms, Susanne Mueller, Markus Weiler, Wolfgang Wick, Peter Vajkoczy und Marcus Czabanka. NDRG1 overexpressing gliomas are characterized by reduced tumor vascularization and resistance to antiangiogenic treatment. 2016. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.06.026. [1]

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>1</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>3</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>4</b>
<b>Kurzfassung</b>	<b>6</b>
<b>Abstract</b>	<b>8</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>10</b>
1.1 Maligne Gliome . . . . .	10
1.1.1 Epidemiologie maligner Gliome . . . . .	10
1.2 Ätiologie und Risikofaktoren maligner Gliome . . . . .	11
1.3 Histopathologische und molekulare Klassifizierung von malignen Gliomen . . . . .	12
1.4 Pathogenese und histologisches Erscheinungsbild des Glioblastoma multiforme (GBM) . . . . .	13
1.5 Klinisches Erscheinungsbild und Diagnostik . . . . .	14
1.6 Therapieoptionen und Prognose des GBM . . . . .	15
1.7 N-myc downstream regulated 1 gene (NDRG1) . . . . .	18
1.7.1 Das Protein NDRG1 . . . . .	18
1.7.2 Die Funktion von NDRG1 in der Zelle: . . . . .	19
1.7.3 NDRG1 – ein auf Hypoxie ansprechendes Gen . . . . .	20
1.7.4 NDRG1 und Schwermetalle . . . . .	21
1.7.5 NDRG1 und seine Rolle in der Tumorigenese . . . . .	21
1.7.6 NDRG1 und seine Rolle in der Angiogenese . . . . .	23
1.8 Ziel der Dissertation / Hypothesen . . . . .	24
<b>2 Material</b>	<b>25</b>
2.1 Antikörper . . . . .	26
2.2 Zelllinien . . . . .	28
2.3 Mausmodell . . . . .	29
2.3.1 Tierhaltung . . . . .	29
2.4 Medikamente . . . . .	29
2.4.1 Temozolomid . . . . .	29
2.4.2 Sunitinib . . . . .	32

<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>34</b>
3.1	Zellkultivierung und Zellaufbewahrung . . . . .	34
3.1.1	Zellzahlbestimmung . . . . .	35
3.1.2	Zellaufbereitung und präoperative Vorbereitung der Zellsuspension	35
3.2	Versuchsplan . . . . .	36
3.2.1	Abbruchpunkte . . . . .	36
3.3	In vivo Methoden . . . . .	37
3.3.1	Stereotaktische intrakranielle Implantation . . . . .	37
3.3.2	Magnetresonanztomographie (MRT) . . . . .	39
3.4	Anfertigung von Kryoschnitten . . . . .	41
3.4.1	Immunhistologische Färbungen . . . . .	42
3.5	Statistische Methoden . . . . .	44
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>45</b>
4.1	Auswirkung der NDRG1-Überexpression auf das Gliomwachstum . . . . .	45
4.1.1	Effekte auf das Tumolvolumen in vivo . . . . .	45
4.1.2	Charakterisierung der Gefäßdichte und der PECAM/Desmin-Ratio .	47
4.1.3	Bestimmung der Tumorzellproliferation mittels Phospho-Histon H3 und Ki-67 . . . . .	48
4.2	Charakterisierung der therapeutischen Effektivität von Sunitinib hinsichtlich NDRG1-überexprimierende Tumorzellen . . . . .	50
4.2.1	Effekte auf das Tumolvolumen in vivo . . . . .	50
4.2.2	Charakterisierung der Gefäßdichte und der PECAM/Desmin-Ratio .	52
4.2.3	Bestimmung der Tumorzellproliferation mittels Phospho-Histon H3 und Endothelzellproliferation mittels Ki-67 . . . . .	54
4.3	Darstellung der therapeutischen Effektivität von Temozolomid auf NDRG1- überexprimierende Tumorzellen . . . . .	56
4.3.1	Effekte auf das Tumolvolumen in vivo nach Therapie mit TMZ . . .	56
4.3.2	Charakterisierung der Gefäßdichte und der PECAM/Desmin-Ratio .	58
4.3.3	Bestimmung der Tumorzellproliferation mittels Phospho-Histon H3 und Ki-67 . . . . .	59
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>62</b>
5.1	Diskussion der Methodik . . . . .	62
5.1.1	Das Glioblastom Modell . . . . .	62
5.1.2	Die orthotope stereotaktische Implantation . . . . .	63
5.1.3	Kardiale Perfusion / Fixation des Gewebes . . . . .	63
5.1.4	Die Medikamente Sunitinib und TMZ . . . . .	64
5.1.5	Immunhistologie . . . . .	67

5.2	Diskussion der Ergebnisse . . . . .	69
5.2.1	Verbesserte Überlebensrate bei NDRG1-überexprimierenden Gliomzellen . . . . .	70
5.2.2	Verminderte angiogene Aktivität in NDRG1-überexprimierenden Gliomzellen . . . . .	71
5.2.3	Resistenz gegenüber antiangiogener Therapie . . . . .	73
5.2.4	NDRG1 als prädiktiver Marker für die Reaktion auf eine alkylierende Chemotherapie . . . . .	75
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>79</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>81</b>
	<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>108</b>
	<b>Curriculum Vitae</b>	<b>109</b>
	<b>Publikationsliste und Anteilserklärung</b>	<b>110</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>111</b>

## Abbildungsverzeichnis

1	Inzidenz intrakranieller Tumore . . . . .	10
2	Strukturformel von Temozolomid . . . . .	30
3	Metabolismus von Temozolomid . . . . .	31
4	Strukturformel von Sunitinib . . . . .	32
5	Eigenschaften von Sunitinib . . . . .	33
6	Versuchsablauf . . . . .	36
7	Versuchsaufbau . . . . .	37
8	Stereotaktischer Rahmen . . . . .	38
9	Schemazeichnung Bregma . . . . .	39
10	MRT-Bilder von NDRG1-überexprimierenden Gliomzellen und der Vergleichsgruppe . . . . .	45
11	Wachstumsverhalten der U87MG-Tumorzellen in vivo . . . . .	46
12	Relatives Tumorstadium . . . . .	47
13	Fluoreszenzimmunhistochemische Darstellung der Gefäß-Perizyten-Assoziation	47
14	Darstellung der Gefäßdichte und der Endothelzell-Perizyten-Interaktion . . . . .	48
15	Immunfluoreszenzhistochemische Darstellung der Tumorzellproliferation . . . . .	48
16	Immunhistochemische Darstellung der Endothelzellproliferation . . . . .	49
17	Darstellung der Tumorzellproliferation und Endothelzellproliferation . . . . .	49
18	MRT-Bilder der Gliomzellen unter Therapie mit Sunitinib . . . . .	50
19	Wachstumsverhalten der U87MG-Tumorzellen in vivo unter Therapie mit Sunitinib	51
20	Fluoreszenzimmunhistochemische Darstellung der Gefäß-Perizyten-Assoziation nach Therapie mit Sunitinib . . . . .	52
21	Darstellung der Gefäßdichte nach Behandlung mit Sunitinib . . . . .	53
22	Darstellung der Desmin/PECAM (CD31+)-Ratio nach Behandlung mit Sunitinib .	53
23	Immunfluoreszenzhistochemische Darstellung der Tumorzellproliferation nach Therapie mit Sunitinib . . . . .	54
24	Darstellung der Tumorzellproliferation nach Therapie mit Sunitinib . . . . .	54
25	Immunhistochemische Darstellung der Endothelzellproliferation nach Therapie mit Sunitinib . . . . .	55
26	Darstellung der Endothelzellproliferation nach Therapie mit Sunitinib . . . . .	55
27	MRT-Bilder nach Therapie mit TMZ . . . . .	56
28	Darstellung der im MRT gemessenen Tumorstadien unter Therapie mit TMZ .	57
29	Fluoreszenzimmunhistochemische Darstellung der Gefäß-Perizyten-Assoziation nach Therapie mit TMZ . . . . .	58
30	Darstellung der Gefäßdichte nach Behandlung mit TMZ . . . . .	58
31	Darstellung der Desmin/PECAM (CD31+)-Ratio nach Therapie mit TMZ . . . . .	59

32 Immunfluoreszenzhistochemische Darstellung der Tumorzellproliferation nach Therapie mit TMZ . . . . .	60
33 Darstellung der Tumorzellproliferation nach Therapie mit TMZ . . . . .	60
34 Immunhistochemische Darstellung der Endothelzellproliferation nach Therapie mit TMZ . . . . .	61
35 Darstellung der Endothelzellproliferation nach Therapie mit TMZ . . . . .	61



## Tabellenverzeichnis

1 Medien und Zusätze . . . . .	25
2 Chemikalien und Reagenzien . . . . .	25
3 Verbrauchsmaterialien . . . . .	25
4 Immunhistochemie – Primäre Antikörper . . . . .	26
5 Immunhistochemie – Sekundäre Antikörper . . . . .	26
6 Puffer und Standardlösungen . . . . .	27
7 Medikamente . . . . .	27
8 Geräteliste . . . . .	27
9 Software . . . . .	28

## Abkürzungsverzeichnis

A	Arteria
Abb	Abbildung
AK	Antikörper
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin)
CA	Karzinom
CD	Cluster of differentiation
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DLL-4	Delta like ligand 4
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribunucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Empty	Empty-Vector, Kontrolle
FCS	Fötales Kälberserum (Fetal Calb Serum)
GBM	Glioblastoma multiforme
HIF-1 $\alpha$	Hypoxia-Inducible Factor-1-alpha
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
i.p.	Intraperitoneal
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
KG	Körpergewicht
Ki-67	Antigen Kiel-67
M	Musculus
MGMT	O <sup>6</sup> -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
mmHg	Millimeter Quecksilber
MMP	Matrix Metalloproteinase
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NaCl	Natriumchlorid
NDRG1	N-myc downstream regulated gene 1
NuNu-Maus	Charles River Nacktmaus (Nude Mouse, NMRI)
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
p	Passage
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCI	Pericyte coverage index
PDGF	Platelet derived growth factor
PDGFR	Platelet derived growth factor receptor

PECAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecule-1
PI	Propidium-iodid
PI3K	Phospho-Inositol-3-Kinase
ROI	Interessierender Bereich (Region of Interest)
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinasen
Su	Sunitinib (Sutent, SU11248)
Tab	Tabelle
TBS	Tris Buffered Saline
Tie-2	Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domain2
TK	Tyrosine-Kinase
TMZ	Temozolomid (Temodal)
V	Vena
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
ZNS	Zentrales Nervensystem

## Kurzfassung

### **Bedeutung von NDRG1 für die Angiogenese, Tumorphiliferation und Therapieresistenz gegenüber einer antiangiogenen und antitumoralen Therapie im Rahmen eines experimentellen Gliommodells**

**Einleitung** Glioblastome sind mit einer Inzidenz von 3–4/100.000/Jahr die häufigste Entität unter den Gliomen und somit die häufigsten intrinsischen Hirntumore [2]. Hypoxie-regulierte Moleküle spielen eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit vaskulären Resistenzmechanismen gegenüber antiangiogener und chemotherapeutischer Therapie. Zahlreiche Studien weisen darauf hin, dass das N-myc-downstream-regulierte Gen 1 (NDRG1) durch eine Reihe unterschiedlicher Faktoren wie zellulärer Stress, Hypoxie, DNA-Schäden, Onkogen und Tumorsuppressor-Gene reguliert wird. Ziel der vorliegenden Studie war es, die Rolle von NDRG1 in Hinsicht auf die Gliomangiogenese, die Tumorzellproliferation und Tumorgröße sowohl unter antiangiogener (Sunitinib) sowie chemotherapeutischer Behandlung (Temozolomid) zu evaluieren [1].

**Material / Methoden** Methodisch wurde hierfür ein orthotopes Tumor-Mausmodell verwendet. Dabei wurden U87MG-Glioblastomzellen stereotaktisch intrakraniell NuNu-Mäusen implantiert. An den Tagen 14, 21 und 28 post operationem wurden MRT-Bilder erstellt zur Bestimmung der Tumorprogression in vivo. In einer zweiten Versuchsreihe wurden die Tiere zudem ab Tag 21 für sechs Tage mit Sunitinib (Su) beziehungsweise Temozolomid (TMZ) behandelt. An Tag 28 erfolgte in beiden Versuchsreihen die Tumorexplantation und nachfolgend die Anfertigung von Gefrierschnitten. Anhand der Schnitte wurden weiterführende Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt [1].

**Ergebnisse** Die Ergebnisse unserer Studie zeigen, dass die Überexpression von NDRG1 zu einer signifikanten Reduktion des Tumorwachstums in vivo führt im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Dies resultiert in einem Überlebensvorteil der Tiere. Zudem wiesen die Tumore aus den NDRG1-überexprimierenden Gliomzellen eine signifikant geringere Tumorzellproliferationsrate (PHH3) auf verglichen mit der Kontrollgruppe. Zusätzlich konnte auch eine signifikant erniedrigte Endothelzellproliferation (Ki-67) festgestellt werden. Darüber hinaus waren in NDRG1-überexprimierenden U87MG-Tumoren reduzierte Gefäßstrukturen nachweisbar bei aufrechterhaltender Endothelzell-Perizyten Interaktion. Zudem konnte in diesen Tumoren immunhistochemisch eine reduzierte Gefäßdichte dargestellt werden. Dieser antiangiogene Effekt von NDRG1 zeigt sich auch in Experimenten unter Therapie mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Sunitinib. So zeigt sich nur eine geringgradige Reduktion des Tumorwachstums und der Gefäßdichte, sodass man vielmehr

von einer resistenten Reaktion gegenüber der antiangiogenen Therapie sprechen kann. Schließlich stellt sich in einer weiteren Versuchsreihe auch eine Resistenz der NDRG1-überexprimierenden Tumore gegenüber einer Therapie mit Temozolomid (TMZ) dar, wohingegen die TMZ-Therapie bei der Kontrollgruppe eine sehr gute Wirkung entfaltete [1].

**Zusammenfassung** Die Ergebnisse dieser Studie deuten darauf hin, dass NDRG1 einen antiangiogenen Einfluss auf das sich entwickelnde mikrovaskuläre System im Gliom hat und beteiligt sein könnte an der Entwicklung von Resistenzmechanismen gegenüber antiangiogenen und alkylierenden Therapeutika [1].

## Abstract

### Importance of NDRG1 for angiogenesis, tumor proliferation and therapy resistance to anti-angiogenic and anti-tumor therapy in an experimental glioma model

**Introduction** With an incidence of 3–4/100,000/year glioblastomas are the most common entity among gliomas, and thus the most common intrinsic brain tumor [2]. Hypoxia-regulated molecules play an important role in connection with vascular mechanisms of resistance to anti-angiogenic and chemotherapeutic therapy. Numerous studies indicate that N-myc downstream-regulated gene 1 (NDRG1) is regulated by a variety of factors including cellular stress, hypoxia, DNA damage, oncogenes, and tumor suppressor genes. The present study aimed to evaluate the role of NDRG1 in glioma angiogenesis, tumor cell proliferation, and tumor size as well as under antiangiogenic (Sunitinib) and chemotherapeutic treatment (Temozolomide) [1].

**Material / Methods** An orthotopic tumor mouse model was used for this purpose. U87MG glioblastoma cells were stereotactically intracranially implanted in NuNu mice. On days 14, 21, and 28 postoperative, MR images were performed to evaluate tumor progression in vivo. In the second series of experiments, mice were treated with Sunitinib (Su) respectively Temozolomide (TMZ) from day 21 for 6 days. On day 28, the tumor explantation was carried out followed by the preparation of frozen sections. Further immunofluorescent stainings were performed [1].

**Results** The results of our study show that overexpression of NDRG1 leads to a significant reduction of tumor growth in vivo compared to the control group. This results in a survival advantage of the animals. In addition, the tumors from the NDRG1-overexpressing glioma cells had a significantly lower tumor cell proliferation rate (PHH3) compared to the control group. Further, a significantly reduced endothelial cell proliferation (Ki-67) was found. Moreover, in NDRG1 overexpressing U87MG tumors, reduced vascular structures were detectable with sustained endothelial cell-pericyte interaction. In addition, a reduced vascular density could be demonstrated immunohistochemically in these tumors. This anti-angiogenic effect of NDRG1 is also demonstrated in experiments under therapy with the tyrosine kinase inhibitor sunitinib. Thus, only a slight reduction of tumor growth and vascular density is observed, so that one can rather speak of a resistant reaction to anti-angiogenic therapy. Finally, in a further series of experiments, the resistance of the NDRG1-overexpressing tumors to therapy with temozolomide (TMZ) was also shown, whereas TMZ therapy had a good effect in the control group [1].

**Conclusion** The results of this study suggest that NDRG1 has an antiangiogenic impact on the developing microvascular system in gliomas and may be involved in the development of resistance mechanisms to antiangiogenic and alkylating therapeutics [1].

# 1 Einleitung

## 1.1 Maligne Gliome

### 1.1.1 Epidemiologie maligner Gliome

Unter primären Gehirntumoren versteht man eine heterogene Gruppe von Tumoren, die von Zellen aus dem zentralen Nervensystem (ZNS) abstammen. Diese können gutartig oder bösartig sein. Die häufigsten bösartigen primären Gehirntumore bei Erwachsenen stellen mit 75 % die Gliome dar [3]. Diese sind neuroektodermalen Ursprungs aus Gliazellen oder deren Vorläuferzellen und umfassen entsprechend ihrer zyto-genetischen Herkunft Astrozytome, Oligodendrogliome und Ependymome. Aktuell erfolgt die internationale Nomenklatur und Diagnose von Gliomen nach der WHO (World Health Organisation)-Klassifizierung. Hierbei werden die Gliome in Grad I bis IV auf Grundlage ihrer Malignität und histopathologischer Kriterien eingeteilt. Klasse-I-Gliome beziehen sich auf Läsionen, die eine geringe Proliferation aufweisen und die durch chirurgische Verfahren behandelt werden können, während Grad-II- bis -IV-Gliome hochgradig maligne und invasiv wachsende Tumore darstellen [4, 5].

Das Glioblastoma multiforme ist die am aggressivsten, invasiv und undifferenziert wachsende Form von Gehirntumore und wurde von der WHO mit Grad IV definiert [5, 6].

Primäre Gehirntumore machen schätzungsweise etwa 2 % aller Krebsarten aus, mit einer jährlichen Gesamtinzidenz von 22 pro 100.000 Einwohner. Die Inzidenz steigt mit voranschreitendem Alter und ist am höchsten bei Personen, die älter sind als 85 Jahre [4].

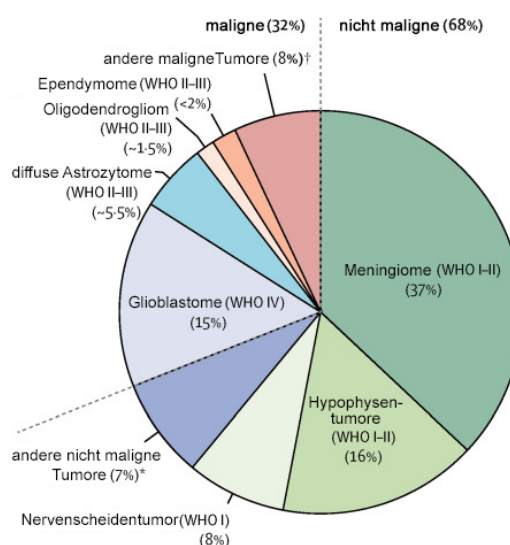


Abbildung 1: Gliome sind für 75 % der malignen Gehirntumoren verantwortlich, von denen mehr als die Hälfte Glioblastome darstellen.



Die Häufigkeit primärer Hirntumore und das Überleben variiert, abhängig von Alter, Geschlecht, ethnischer Herkunft sowie Tumortyp und molekularen Merkmalen des Patienten. Maligne Gehirntumore wie Gliome, Lymphome, Embryonal- und Keimzelltumore treten bei Männern etwas häufiger auf. Sie haben eine durchschnittliche jährliche Sterblichkeitsrate von 4–32 pro 100.000 Einwohner mit einem durchschnittlichen 5-Jahres-Überleben von 35 % [3, 4].

Zu dem allgemeinen Begriff Glioblastom gehören astrozytische Tumore (Astrozytom, anaplastische Astrozytome und Glioblastome), Oligodendrogliome, Ependymome und gemischte Gliome [6, 7, 8, 9]. Sie sind die am häufigsten vorkommenden Tumore des zentralen Nervensystems (ZNS), die fast 80 % aller malignen Primärtumoren des Gehirns ausmachen (siehe Abbildung 1) [6, 9, 10]. Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist der bösartigste und häufigste Typ primärer Astrozytome. Das GBM stellt 50 % aller Gliome aus allen Altersgruppen [11]. Es kann in jedem Alter auftreten, jedoch liegt die Spitzeninzidenz zwischen 55 und 60 Jahren [12]. Maligne Gliome sind der Grund für 2,5 % der krebisbedingten Todesfälle und sind die dritthäufigste Todesursache bei Krebs bei Personen zwischen 15 und 34 Jahren [6]. Das Verhältnis der GBM-Inzidenz ist bei Männern höher als bei Frauen [13, 12]. Die westliche Welt hat eine höhere Inzidenz von Gliomen als weniger entwickelte Länder [13], was auf schlechtere Dokumentation und eingeschränkten Zugang zum Gesundheitswesen sowie Unterschiede in der Diagnostik zurückzuführen ist [14]. Trotz multimodaler Behandlungsansätze basierend auf einer Temozolomid (TMZ)-Chemotherapie und Strahlentherapie, beträgt das mediane Überleben von Patienten mit GBM nur 14,6 Monate nach Diagnosestellung und die 5-Jahres-Überlebensrate liegt lediglich bei 4–5 % [6, 8, 15]. Laut einer Studie überlebten nur 2 % der Patienten mit GBM drei Jahre oder länger [7].

## 1.2 Ätiologie und Risikofaktoren maligner Gliome

Über die Ätiologie von Hirntumoren ist bisher wenig bekannt. Es sind keine eindeutigen zugrundeliegenden karzinogenen Ursachen gefunden worden. Bis heute ist eine Exposition gegenüber hochdosierter ionisierender Strahlung der einzige bestätigte Risikofaktor [16, 17]. So sind seit den 1960er Jahren mehr als 116 Fälle von GBM aufgrund von Strahlenexposition gemeldet worden und es wird angenommen, dass das Gesamtrisiko für die Entwicklung eines GBM nach Strahlentherapie 2,5 % beträgt [18]. Es konnte beobachtet werden, dass relativ geringe Strahlendosen, die beispielsweise zur Behandlung von Tinea capitis und Hauthämangiomen bei Kindern oder Säuglingen verwendet werden, auch mit einem relativen Risiko von 3 für Gliome in Verbindung gebracht werden [6, 19]. Umfangreiche retrospektive Kohorten-Studien zeigen auch ein deutlich erhöhtes Risiko bei Kindern nach der Exposition gegenüber therapeutischer intrakranieller Bestrahlung – abhängig

von Patientenalter und Strahlendosis/-volumen [6]. Darüber hinaus waren Patienten anfälliger ein GBM zu entwickeln, die eine Behandlung aufgrund einer akuten lymphatischen Leukämie (ALL) erhielten; entweder als unmittelbare Folge der Leukämie oder als unerwünschte Arzneimittelwirkung der Chemotherapeutika [18]. Kein schlüssiger Zusammenhang konnte zwischen dem Auftreten von Gliomen und Umweltfaktoren wie Rauchen, Ernährungsverhalten, Handys oder elektromagnetischer Felder, schweren Kopfverletzung oder beruflichen Risikofaktoren wie Pestizidbelastungen gefunden werden [16, 17]. Darüber hinaus wurde die These aufgestellt, dass Infektionen und allergische Erkrankungen eine schützende Wirkung hinsichtlich der Entwicklung von Gliomen haben könnten, die auf die Aktivierung des Immunsystems zurückzuführen sei [14, 17]. Gliome werden ebenfalls in bestimmten Familien gefunden, allerdings ist das Suszeptibilitätsgen noch nicht identifiziert worden [17]. Eine genetische Prädisposition wurde nur in 5–10 % der Fälle beobachtet [14]. Seltene genetische Störungen einschließlich der Neurofibromatose Typ 1 und Typ 2 sowie dem Li-Fraumeni oder dem Turcot Syndrom sowie die tuberöse Sklerose sind mit einer erhöhten Inzidenz assoziiert [6, 14, 17, 20].

### 1.3 Histopathologische und molekulare Klassifizierung von malignen Gliomen

Die Fortschritte auf dem Gebiet der Molekularbiologie haben das Verständnis in den vergangenen Jahren hinsichtlich der Pathogenese von Gliomen verbessert. In der Aktualisierung der Klassifikation der WHO im Jahre 2016 erfolgte erstmals die grundlegende Implementierung dieser molekularen Parameter in die neuropathologische Diagnostik, was wiederum in Kombination mit der Tumor-Histologie respektive dem Grading, basierend auf morphologischen Merkmalen, in einer differenzierten Einteilung von Gliomen mündete [4, 5, 2].

Zu den wichtigsten molekularen Markern gehören:

- **Isozitat-Dehydrogenase 1 und/oder -2 (IDH-1/-2)**  
Diffuse Gliome, die IDH1/2-Mutationen enthalten, sind mit einer besseren Prognose verbunden als diffuse Gliome mit dem IDH-Wildtyp [4].
- **Kodeletion der Chromosomenteile 1p und 19q**  
1p/19q-Codeletion führt zu einer günstigen Prognose unter diffusen Gliomen und lässt ein besseres Ansprechen auf eine alkylierende Chemotherapie erwarten [2].
- **Mutation im Histon 3 (H3 K27M)**  
Unter allen diffusen Gliomen weisen die H3 Lys27Met-mutierten Tumore im Allgemeinen die schlechteste Prognose auf (2-Jahres-Überleben < 10 %). Sie gelten als

WHO-Grad IV, auch wenn ihre Histologie ansonsten schwach oder anaplastisch erscheint [2].

- **Methylierung des Promotors für die O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)**

O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase ist ein DNA-Reparaturprotein, das an der Wiederherstellung von Schäden beteiligt ist, die durch Alkylierungsmittel wie Temozolomid induziert wurden. Die Methylierung des MGMT-Promotors (MGMTp) schaltet das MGMT-Gen aus und verringert die Fähigkeit von Tumorzellen, solche Schäden zu reparieren. Die Methylierung von MGMTp prognostiziert einen Vorteil von alkylierenden Chemotherapien bei Glioblastompatienten, einschließlich älterer Patienten. Die MGMTp verleiht den anaplastischen Astrozytomen und den Glioblastomen ebenso eine günstige Prognose [2, 4].

Diese kombinierte phänotypische und genotypische Klassifikation der Tumore anhand dieser zusätzlichen molekularen Parameter erlaubt eine bessere diagnostische Objektivität und führt mutmaßlich zu einer genaueren Bestimmung der Prognose und des Behandlungsansprechens. Ebenso bildet sie die Grundlage für die Erstellung von aktuellen Leitlinien für die Diagnose und Therapie von malignen primären Hirntumoren [4, 2].

Die Herausforderung besteht derzeit darin, diese Fortschritte in wirksame Behandlungsstrategien umzusetzen – so konzentrieren sich derzeitige Bemühungen auf die Entwicklung von molekularen zielgerichteten Therapien, Immuntherapien, Gentherapien und neuartigen Technologien zur Wirkstoffabgabe.

Die Ergebnisse mit Single-Agent-Therapien waren bisher enttäuschend, und Kombinationstherapien scheinen erforderlich zu sein, um ein breites und dauerhaftes Antitumor-Ansprechen zu erreichen. Biomarker-bezogene klinische Studien könnten die Effizienz der therapeutischen Entwicklung verbessern[4].

## **1.4 Pathogenese und histologisches Erscheinungsbild des Glioblastoma multiforme (GBM)**

Das GBM ist der bösartigste und häufigste Typ primärer Astrozytome. Gemäß der WHO-Klassifikation sind die GBM stets als maligne im Sinne eines Grad IV-Tumors zu sehen. Sie können sich einerseits primär, d. h. de novo direkt aus Gliazellen des Gehirns entwickeln ohne klinische und histologische Hinweis auf eine Vorläuferläsion oder sich langsam aus einem bereits vorhandenen mindergradigen Astrozytom entstehen (sekundäre GBM) [9]. Aktuelle experimentelle Untersuchungen haben molekulare Korrelate dieser klinischen Definition gezeigt. Zu den kennzeichnenden Veränderungen der primären GBM

gehören hierbei Genmutationen und Amplifikation des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR), eine Überexpression des mouse double minute 2 (MDM2), die Deletion von p16 und der Verlust der Heterozygotie (LOH) von Chromosom 10q mit Phosphatase und Tensinhomolog (PTEN) und TERT-Promotormutation. Zu den charakteristischen Merkmalen sekundärer GBMs gehören die Überexpression des platelet-derived growth factor A und des platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFA/PDGFRa), des Retinoblastoms (RB), des LOH von 19q und Mutationen von IDH1/2, TP53 und ATRX [9, 12, 21, 22]. Eine genauere Analyse dieser zahlreichen genetischen Veränderungen hat gezeigt, dass man diese in drei Haupt-Signalwege gruppieren kann, einschließlich der Rezeptor Tyrosinkinase (RAS/PI3K), die in fast 88 % der GBMs verändert ist, dem P53-Signalweg, der 87 % der GBMs betrifft und dem RB Signalweg, der in etwa 78 % der GBMs betroffen ist [23].

Die primäre Lokalisation für das GBM ist zerebral, genauer gesagt in 95 % der Fälle supratentoriell. Nur wenige Prozent der Tumore treten im Kleinhirn, im Hirnstamm und im Rückenmark auf [24]. Makroskopisch stellt sich das GBM recht heterogen sozusagen "bunt" dar mit multifokalen Blutungen, thrombosierten Gefäßen, Nekrosenbildung und zystischen sowie gallertartigen Bereichen [6, 9].

Histologisch ähnelt das GBM einem anaplastischen Astrozytom, d.h. die Tumore zeigen pleomorphe Zellpopulationen, die von recht kleinen schlecht differenzierten Tumorzellen bis hin zu großen multinukleären Zellen mit multifokaler Nekrose sowie pseudopalisadenartigen Kernen und erhöhter Mitose- und Proliferationsrate reichen. Die Proliferation von Gefäßendothelzellen ist auch ein wichtiges charakteristisches Merkmal [9]. Das GBM wächst und metastasiert fast ausschließlich lokal innerhalb des ZNS. Systemische Metastasen sind sehr selten [14].

## 1.5 Klinisches Erscheinungsbild und Diagnostik

An erster Stelle in der Diagnostik bei einem Patienten mit einem GBM steht die gründliche klinische Untersuchung. Meist zeigt der Patient eine kurze klinische Geschichte, wobei im Durchschnitt der Beginn etwa 3–6 Monaten vor Diagnosestellung liegt [6, 25]. Patienten mit primären Gehirntumoren können mit fokal-neurologischen Defiziten (40–60 %) (das heißt bezogen auf einen bestimmten Ort im Gehirn) oder mit generalisierten Symptomen auffallen, die über Tage bis Wochen oder Monate bis Jahre bestehen, abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit und der Lokalisation des Tumors [4, 6]. Tumore können auch als Zufallsbefund im Rahmen einer Bildgebung des Gehirns entdeckt werden. Je nachdem in welchem funktionellen Bereich des Gehirns der Tumor lokalisiert ist, wird ein spezifisches fokal neurologisches Defizit hervorgerufen: so können Tumore des Frontallappens

eine Persönlichkeitsveränderung (20–40 %) oder eine Schwäche oder Dysphasie verursachen und Parietallappen-Tumore können Taubheit, Hemineglect oder räumliche Desorientierung herbeiführen [6]. Hirntumoren können sich jedoch auch mit generalisierten Symptomen präsentieren: so leiden 50–80 % der Patienten unter epileptischen Anfällen und etwa 30–50 % unter Kopfschmerzen sowie 15 % unter Symptomen eines erhöhten intrakraniellen Drucks, wie progressive Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen sowie Schläfrigkeit und verschwommenes Sehen aufgrund eines Papilloödems [4, 6]. Wenn die Ausdehnung des Tumors beträchtlich ist, kann es auch zu Gleichgewichtsstörungen und Inkontinenz kommen [6, 26].

Es schließt sich eine bildgebende Primärdiagnostik an. Bildgebende Methode der ersten Wahl ist hier die Magnetresonanztomographie (MRT) mit Gadolinium (T1 mit und ohne KM, T2 und FLAIR-Sequenzen) aufgrund seiner überlegenen Gewebekontrastierung, womit sich die Komplexität und die Heterogenität der Tumorerkrankung und das begleitende perifokale Hirnödem deutlich visualisieren lässt [4, 6]. Die Tumore sind normalerweise unifokal, können aber auch multifokal auftreten [26]. Eine Kontrastmittelaufnahme im Tumorgewebe als Zeichen einer Schrankenstörung weist auf ein malignes Gliom vom WHO Grad III oder IV. Jedoch können auch niedriggradige Tumore vorliegen ohne KM-Anreicherung. Hierfür sind metabolische Bildgebungen (Positronen-Emissions-Tomographie) oder MRT mit Magnetspektroskopie möglich. In der kranialen Computertomographie (CCT) mit KM weist eine Anreicherung mit girlandenförmiger Ringstruktur (ringförmiges Enhancement) auf ein GMB hin – jedoch spielt sie abgesehen von der initialen Notfalldiagnostik eher eine untergeordnete Rolle, werden aber bei Patienten empfohlen, bei denen eine MR-Untersuchung aus bestimmten Gründen nicht durchgeführt werden kann, z. B. Patienten mit Herzschrittmachern [26]. Bei Verdacht auf eine Hirnmetastase sollte ein systemisches Tumor-Screening mit sorgfältiger klinischer Untersuchung und mindestens einem Thorax-Abdomen-CT durchgeführt werden. Die Inzidenz von Hirnmetastasen beträgt etwa das Zehnfache der Häufigkeit von primären Gehirntumoren bei Erwachsenen und 30 % der Erwachsenen mit einer systemischen Tumorerkrankung entwickeln Hirnmetastasen. Das Erscheinungsbild des GBM ist sehr variabel, so dass letztlich die Diagnosesicherung nur durch eine stereotaktisch geführte Serienbiopsie auf Basis struktureller und metabolischer Bildgebung (MRT/PET) und die anschließende neuropathologische Untersuchung des Präparates vorgenommen werden kann [2].

## 1.6 Therapieoptionen und Prognose des GBM

Trotz großer internationaler Bemühungen ist die GBM-Behandlung immer noch eine der größten Herausforderungen in der klinischen Onkologie [6, 27].

Die größte Schwierigkeit in der Therapie des GBM steht im Zusammenhang mit der Lage des Tumors und seiner komplexen und heterogenen Biologie [28, 29]. Fortschritte bei chirurgischen Ansätzen, in der Strahlentherapie und der adjuvanten Chemotherapie haben allmähliche Verbesserungen des Überlebens und der Lebensqualität der GBM-Patienten herbeigeführt, jedoch ist die Prognose immer noch sehr limitiert [6].

Die chirurgische Behandlung ist der Hauptbestandteil der Standardtherapie [6]. In Studien wurde belegt, dass Patienten von einer möglichst umfassenden Entfernung der kontrastmittel-affinen Tumorareale profitieren. Ein signifikant längeres Überleben wurde mit einer intraoperativen Tumordarstellung mittels systemisch applizierten Fluoreszenzfarbstoffen (5-Aminolaevulinsäure, [5-ALA]) erreicht [30]. Eine vollständige Resektion des GBM ist aufgrund der Zellmigration und Ausbildung von Mikrosatelliten nicht möglich; jedoch kann durch die Operation eine Reduzierung der Tumorgöße und das Einschränken eines möglichen Anfallsleidens, bzw. Aufhebung von neurologischen Defiziten sowie die Insertion von lokalen Therapeutika u. U. zu einer verbesserten Lebensqualität führen. In der Regel tritt in etwa 80 % der Fälle ein Rückfall innerhalb von 2–3 cm vom Rand der ursprünglichen Läsion auf [6]. Im Allgemeinen sollte eine Kontrast-MRT innerhalb von 72 Stunden nach dem Eingriff erfolgen – um das Ausmaß der durchgeführten Resektion zu bestimmen [4].

Die chirurgische Behandlung kann gefolgt sein von einer Strahlentherapie, um verbliebene Tumorzellen zu töten. Heutzutage erfolgt die perkutane fraktionierte Strahlenbehandlung standardisiert und wird gut toleriert [2]. Die Behandlung umfasst insgesamt Strahlendosen von 60 Gy in täglichen Einzeldosen von 1,8–2,0 Gy an fünf Tagen pro Woche über eine Gesamtbehandlungszeit von fünf bis sechs Wochen [2]. Allerdings wird bei älteren Patienten (> 60 Jahre) eine hypofraktionierte Strahlentherapie (10 x 3,4 Gy über zwei Wochen) empfohlen, da dieses Behandlungsregime wahrscheinlich genauso effektiv wirkt [2].

Um das Überleben von Patienten darüber hinaus zu verbessern, wurden zahlreiche Chemotherapeutika auf ihre Wirksamkeit bei der Behandlung von GBM getestet [15]. Darunter kommen das alkylierende Standardtherapeutikum Temozolomid und die Kombination aus Procarbazin, Lomustin (CCNU) und Vincristin (sogenanntes PCV-Schema) sowohl in der Primär- als auch in der Rezidivtherapie zur Anwendung [2]. Temozolomid ist die einzige Standard-Chemotherapie für Patienten mit GBM [31]. Oral verabreicht ist TMZ als Adjuvans oder simultan zur Strahlentherapie der Behandlungsstandard für Patienten mit GBM [15, 31]. Der wichtigste Mechanismus, der für die Zytotoxizität von TMZ verantwortlich ist, ist die Methylierung der DNA an der N7- und O6-Position von Guanin, was zu einem Versagen des DNA-Mismatch-Reparatursystems führt, woraufhin keine komplementäre Base für das methylierte Guanin gefunden wird und folglich der Zellzyklus an der G2-M-Grenze blockiert und die Apoptose ausgelöst wird [32]. Jedoch wurde berich-

tet, dass eine hohe MGMT-Aktivität in Tumorzellen mit einem schlechtem Ansprechen auf Temozolomid assoziiert ist. MGMT ist ein kritisches DNA-Reparaturprotein, das Tumorzellen vor alkylierenden Chemotherapeutika schützt [33, 34, 35, 36]. Carboplatin, Oxaliplatin, Etoposid und Irinotecan sind die Second-Line-Medikamente für Patienten, die nicht auf die oben beschriebenen Medikamente ansprechen. Andere Chemotherapeutika umfassen antiangiogene Wirkstoffe wie Anti-VEGF monoklonale Antikörper (Bevacizumab), Anti-FGF-Antikörper, zielgerichtete monoklonale Antikörper EGFR (Erlotinib und Gefitinib) und Tyrosinkinase Inhibitoren [15]. Bis dato bleibt das GBM aufgrund seiner Heterogenität und komplexen Pathogenese unheilbar.

Kontrovers diskutiert wird derzeit die externe Applikation von elektrischen Wechselfeldern (100–300 kHz), die nachweislich *in vitro* eine antimitotische und apoptotische Wirkung auf sich teilende Tumorzellen haben. Auf Grundlage der bisherigen Daten werden die Tumortherapiefelder (TTF) primär Patienten mit supratentoriellen Glioblastomen angeboten [2].

Der derzeitige Standard für die Behandlung von hochgradigen Gliomen umfasst nicht nur die therapeutische Behandlung (d. h. Antitumorale-Therapie), sondern auch die Bereitstellung einer wirksamen supportiven Behandlung für den Patienten [4]. Eine effektive unterstützende Behandlung beinhaltet die Therapie der verschiedenen begleitenden Symptome der Krankheit, d. h. von Hirnödemen, Krampfanfällen, Störungen des Magen-Darm-Trakts, Behandlung von Osteoporose, venöse Thromboembolie, kognitive Beeinträchtigung und Gemütsstörungen [37]. Symptomatische Linderung von neurologischen Symptomen wird durch Verabreichung von Kortikosteroiden herbeigeführt, jedoch wird es aufgrund seiner erheblichen Nebenwirkungen normalerweise früh im Behandlungsregime abgesetzt. Dexamethason ist in der Regel aufgrund seiner geringen mineralocorticoiden Wirkung das bevorzugte Kortikosteroid bei diesen Patienten [26]. Bei Patienten mit Anfällen wird Levetiracetam aufgrund seines geringen Toxizitätsprofils und fehlenden Wechselwirkungen mit Chemotherapeutika verschrieben [26]. Zudem stellen Gliome das höchste Risiko für tumorassoziierte venöse Thromboembolien aller Krebsarten dar. Bis zu 20 % der Patienten mit Glioblastom entwickeln während der perioperativen Periode symptomatische venöse Thromboembolien und bis zu 30 % nach einem Jahr [4]. Im Allgemeinen wird eine Prophylaxe in Form einer Kompression und Lagerung sowie einer Gabe von niedermolekularem Heparin innerhalb von 12–24 Stunden nach der Operation zur Vermeidung einer postoperativen venösen Thromboembolie empfohlen.

Die prognostischen Faktoren variieren je nach Tumorart erheblich. Ein jüngeres Alter, ein hoher Leistungsstatus, ein niedrigerer Tumorgrad und ein größeres Ausmaß der Resektion sind günstige prognostische Faktoren für die meisten primären Gehirntumore von erwachsenen Patienten. Im letzten Jahrzehnt wurden molekulargenetische Veränderun-

gen als stärkere prognostische und prädiktive Marker erkannt als allein das histologische Erscheinungsbild.

Insgesamt können die Ergebnisse der modernen Therapieansätze die hohen Erwartungen nicht erfüllen. Eine signifikante Änderung des Gesamtüberlebens konnte bisher bei keinen der genannten Therapieoptionen erreicht werden. Auch nach Einleitung der multimodalen Therapie bleibt die Prognose mit einer durchschnittlichen Überlebenszeit von 14,6 Monaten nach Diagnosestellung infaust [6, 8, 15].

## 1.7 N-myc downstream regulated 1 gene (NDRG1)

### 1.7.1 Das Protein NDRG1

Das N-myc-downstream-regulierte Gen 1 (NDRG1), ebenfalls bekannt als Drg1, Cap43, Rit42, RTP und PROXY-1 wurde als ein mutiertes Gen in der hereditären motorisch-sensiblen Neuropathie Typ I (*Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung* (HMSNL;*CMT4D*)) identifiziert und auf dem menschlichen Chromosom 8q24 kartiert [9, 38]. Bei dieser autosomal-rezessiven Neuropathie ist die Demyelinisierung sowohl im peripheren als auch im zentralen Nervensystem beobachtet worden [39]. NDRG1, NDRG2, NDRG3 und NDRG4 sind Mitglieder der NDRG-Genfamilie, die zur übergeordneten Gruppe der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen gehören. Obwohl die NDRG-Proteine  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Muster haben, fehlen ihnen die katalytischen Reste und haben daher keine hydrolytische Aktivität [9, 40]. Proteine, die durch die NDRG-Gene kodiert werden, zeigen eine zu 52–65 % homologe Aminosäuresequenz zueinander und zeichnen sich durch unterschiedliche Muster in der Gewebeexpression aus [41, 42]. NDRG1 wird ubiquitär exprimiert, wohingegen NDRG2 hauptsächlich im Gehirn und im Skelettmuskel nachgewiesen wurde [9]. Das NDRG3-Transkript wurde in Gehirn und Hoden gefunden und NDRG4 in Gehirn und Herz [41, 42].

NDRG1 ist ein 43 kDa Protein mit einem isoelektrischen Punkt von pH 5,3, zusammengesetzt aus 394 Aminosäuren [9, 41]. Es gehört zu den Phosphoproteinen, umfasst mindestens sieben Phosphorylierungsstellen und wird *in vitro* direkt durch die Proteinkinase A und Calmodulinkinase II phosphoryliert [43, 44]. Die NDRG1-mRNA ist in Zellen der meisten Organsysteme vorhanden, einschließlich des Verdauungstraktes, der Immun-, Harn- und Atemwege, jedoch hängt das Transkriptionsniveau vom Gewebetyp ab [9]. Immunhistochemische Analysen zeigten ein sehr starkes NDRG1-Signal in Epithelzellen. Das NDRG1-Protein findet sich hauptsächlich im Zytoplasma, jedoch wurde auch von nukleärer, mitochondrialer und membranärer Lokalisierung berichtet [40, 45, 46]. Es wurde beobachtet, dass NDRG1 den DNA Schäden folgend in einer p53-abhängigen Weise in den Kern transloziert wird [47]. Histochemische Analysen der NDRG1-Expression bei



Magenkarzinomen haben gezeigt, dass seine Lokalisation im Nucleus mit einer schlechteren Prognose für den Patienten korreliert, was darauf hindeutet, dass die Translokation zu dem Zellkern zu einem erhöhten Zellinvasionspotential führt [48]. In einigen Geweben wurde nur das NDRG1-Transkript nachgewiesen, aber nicht das Protein selbst, was die Vermutung nahelegt, dass die Menge des Proteins sowohl auf der Transkriptionsebene und auf der Translationsebene durch ein komplexes Regulierungssystem kontrolliert wird [40]. Eine Vielzahl an Studien zeigte, dass zahlreiche Verbindungen die Expression von NDRG1 verändern. So wurde nachgewiesen, dass Substanzen wie beispielsweise Homocystein, Cystein, Tunicamycin, 2-Mercaptoethanol [49] oder Retinsäure [50, 51] die NDRG1-Expression induzieren. Die genaue Funktion von NDRG1 ist bisher nicht genau bekannt, da dieses Protein mit vielen Verbindungen interagiert und offenbar an zellulärer Differenzierung, Reaktion auf Hypoxie und Wechselwirkung mit Hormonen beteiligt ist.

### 1.7.2 Die Funktion von NDRG1 in der Zelle:

Es ist schwierig, die wahre biologische Funktion des NDRG1-Proteins zu bestimmen und auch zahlreiche Studien haben gezeigt, dass die Expression des NDRG1-Gens in verschiedenen Situationen unterschiedlich ist. Northern-Blot-Analysen zeigten, dass die NDRG1-mRNA-Expression in normalen Zellen zweiphasig ist, d. h. es erhöht sich bei den G- und G2-M-Phasen des Zellzyklus und ist in der S-Phase niedriger [47]. Die Forschungsgruppe um Kim hat beobachtet, dass NDRG1 mit dem Zentrosom assoziiert ist, speziell in der Mikrotubulus-Matrix, was die Bedeutung von NDRG1 für die korrekte Mikrotubuli-Funktion unterstreicht, deren Störung zu genomischer Instabilität führen kann [52]. Zudem ist bekannt, dass DNA-Schäden zur Aktivierung der NDRG1-Expression führen und die Translokation des NDRG1-Proteins in den Kern induzieren kann, obwohl seine Aminosäuresequenz keine offensichtlichen Kernlokalisierungssignale beinhaltet [47]. Stein und Mitarbeiter zeigten, dass NDRG1 ein direktes Ziel für das Protein p53 darstellt: Ein Anstieg der NDRG1-Expression wurde nicht nur nach ektopischer Expression von p53 beobachtet, sondern war auch offensichtlich bei der Behandlung mit dem DNA-schädigenden Medikament Doxorubicin, was wiederum das endogene TP53 aktiviert. Interessanterweise wurde diese Beziehung nicht in metastatischen humanen Krebszelllinien beobachtet, was nahelegt, dass NDRG1 in metastatischen Zellen anders reguliert wird als bei nicht-metastatischen Zellen [53]. Eine durchgeführte Studie an Darmepithelzellen bestätigte, dass das NDRG1-Gen ein direktes Transkriptionsziel von p53 darstellt, aber stellte auch Beweise dar, dass die p53-abhängige NDRG1-Expression die Zellproliferation unterdrückt und keine Apoptose induziert [9]. Es scheint, dass die Funktion von NDRG1 und seine Wechselwirkung mit anderen Proteinen vom Zelltyp abhängt. Wie bereits betont, wird das NDRG1-Protein überwiegend im Zytoplasma gefunden, aber in einigen Zelltypen wurde auch von einer Lokalisation im Kern berichtet [40]. Allerdings

wurde keine Kernlokalisierungssignalsequenz für dieses Protein identifiziert, was andeutet, dass die Translokation von NDRG1 zum Kern von seiner Wechselwirkung mit anderen Proteinen abhängt. Experimente an Maus-Mastzellen haben gezeigt, dass das Hitzeschock-verwandte Protein 70 (Hsc70) in der Lage ist die Kerndomäne von NDRG1 zu binden und es zum Nukleus zu translozieren [44]. Es ist naheliegend, dass NDRG1 als Antwort auf einen zellulären Stress (z. B. DNA-Schaden) an Hsc70 bindet und so in den Zellkern transloziert wird, wo es mit der DNA interagiert.

### 1.7.3 NDRG1 – ein auf Hypoxie ansprechendes Gen

Sauerstoffmangel führt zur Aktivierung der Zellmaschinerie, die das Zellüberleben unter herabgesetztem Sauerstoffangebot erlaubt [9]. Der Hypoxie induzierbare Faktor 1 (HIF-1, hypoxia inducible factor 1) ist ein Transkriptionsfaktor, der die Kaskade von Änderungen initiiert, die notwendig ist, um die Zelle an den hypoxischen Zustand anzupassen [9]. Dieses Protein ist ein Heterodimer, aus einer  $\alpha$ -Untereinheit mit einem aktiven Zentrum (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  oder HIF-3 $\alpha$ , abhängig vom Gewebe) und aus einer  $\beta$ -Untereinheit, die an der Bindung zur DNA beteiligt ist [54, 55]. Die NDRG1-Expression nimmt signifikant zu in Zellen, die einer Hypoxie ausgesetzt waren. Eine Untersuchung des NDRG1-Gens hat zwei auf Hypoxie ansprechende Elemente (HRE, hypoxia-responsive elements) in seiner nicht-kodierenden Sequenz bei -1376 bp und -7503 bp gezeigt [56]. Es ist bekannt, dass HIF-1 die Expression einer Vielzahl von Hypoxie-ansprechenden Genen reguliert, wie das Transferrinrezeptoren oder das Erythropoietin Gen (EPO) durch direkte Bindung an ihre HRE-Sequenz, daher wurde auch vermutet, dass diese Art der Regulierung auch für NDRG1 funktionieren könnte [57, 58]. In der Tat haben weitere Studien gezeigt, dass die Hypoxie-induzierte Expression von NDRG1 in HIF-1 $\alpha$ -/-Fibroblasten nicht vorkommt, während es im Wildtyp-HIF-1 +/+ -Fibroblasten beobachtet wurde [59]. Jedoch während längerer Hypoxie von mindestens zwei Tagen, wurde auch etwas NDRG1-Protein in HIF-1-defizienten Zellen nachgewiesen [60]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Hypoxie die NDRG1-Expression in einer HIF-1-abhängigen und -unabhängigen Art und Weise induziert. Außerdem erhöhen hypoxische Bedingungen das Niveau von phosphorylierten NDRG1-Protein, was darauf hinweist, dass NDRG1 einer posttranskriptionellen Regulation unterliegt [61]. Unter normoxischen Bedingungen werden HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  in einem von Hippel-Lindau (VHL) Protein-abhängigen Art und Weise schnell abgebaut [62, 63, 64]. Arbeiten an menschlichen Nierenkrebs Zellen zeigten, dass in VHL-negative Zellen die Expression von mehreren Hypoxie-induzierbaren Genen zugenommen hatte, einschließlich von NDRG1 [65]. Jedoch ist der detaillierte Mechanismus einer solchen Regulierung noch nicht identifiziert.

### 1.7.4 NDRG1 und Schwermetalle

Nickel, ein bekanntes Karzinogen und Hypoxie-imitierendes Metall, induziert die Expression verschiedener Gene, die für das Überleben der Zellen unter ungünstigen Bedingungen notwendig sind. Zunächst wurde nachgewiesen, dass die Exposition der Zellen gegenüber nicht toxischen Dosen von  $\text{Ni}^{2+}$ -Verbindungen zu einem Anstieg der Expression von NDRG1 führt [66]. Diese Studie dokumentiert, dass in Bezug auf Metalle die Induktion des NDRG1-Gens nickelspezifisch war. Spätere Studien zeigten, dass eine Metallbindungsstelle nachgewiesen werden konnte [67]. Ferner haben Li und Kretzner verdeutlicht, dass die Induktion von NDRG1 durch Nickel mit der Suppression von N-myc in Neuroblastomzellen verbunden ist. N-myc ist ein bekannter Suppressor von NDRG1; so könnte Nickel durch Hemmung des negativen Reglers indirekt NDRG1 hochregulieren [68]. Darüber hinaus ist es möglich, dass Nickel die NDRG1-Gen-Expression durch Stimulation einiger NDRG1-Induktoren induziert.

Es wurde beobachtet, dass die Nickelexposition der Zelle in einer Erhöhung des HIF-1 $\alpha$ -Proteingehalts resultierte [69, 70]. Andererseits verändern Schwermetalle einschließlich Nickel die intrazelluläre Calciumhomöostase durch gezielte Bindung an  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen. So führt eine Exposition von Zellen gegenüber Nickel zu einem erhöhten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Level und zu einer Überexpression von NDRG1. Eine weitere Studie zeigte, dass  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte NDRG1-Expression sowohl in HIF-1 $\alpha$  positiven und negativen Zellen auftraten. Der Mechanismus der  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten NDRG1-Expression ist bisher nicht vollständig geklärt. Anhand von Experimenten kann davon ausgegangen werden, dass Nickel ein Stressfaktor darstellt, der zu einem erhöhten PIP3-Level (Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat) führt, was wiederum zur Aktivierung der Akt (protein kinase B) und SGK1 (serum and glucocorticoid-induced protein kinase 1) Kinasen führt [71, 72, 73, 74]. Akt induziert die HIF-abhängige Transkription von NDRG1 und SGK1 phosphoryliert das NDRG1-Protein, das daraufhin möglicherweise seine Funktion ändert. Einige Berichte verbinden die Expression von NDRG1 mit dem intrazellulären Eisenspiegel [75, 76].

Eisen ist für viele zelluläre Prozesse erforderlich und seine Deprivation führt zu einem Arrest in der G1/S-Phase und schließlich zur Apoptose. Es wurde beobachtet, dass eine Exposition von Zellen gegenüber Eisenchelatoren zu einem Anstieg von NDRG1 auf mRNA-Ebene führt. Der zugrundeliegende Mechanismus der NDRG1-Suppression durch Eisen ist bisher nicht aufgeklärt [56].

### 1.7.5 NDRG1 und seine Rolle in der Tumorigenese

Die zelluläre Funktion von NDRG1 bleibt schwer fassbar; daher ist auch die Rolle des NDRG1-Gens in der Tumorigenese schwer zu verstehen. So wird versucht die Variabilität

des Expressionsniveaus von NDRG1 anhand von Untersuchungen der Beziehungen zwischen NDRG1 und bekannten Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen aufzuklären. Es scheint, dass NDRG1 durch ein Produkt des PTEN (Phosphatase und Tensin-Homologe deletiert auf Chromosom 10) Tumorsuppressorgen hochreguliert wird [77, 78]. PTEN ist einer der häufigsten Ziele von Mutationen bei Krebs im Menschen, mit einer Mutationsfrequenz ähnlich der von TP53. PTEN hemmt die PI3K-abhängige Aktivierung von Akt und die Deletion oder die Inaktivierung von PTEN führt zu einer konstitutiven Akt-Aktivierung [79]. PTEN, das im Gegensatz zu PI3K wirkt, ist mit dem Zelltod und dem Zellzyklusarrest verbunden [80].

Studien über Prostata- und Brustkrebs zeigten, dass die Expression von NDRG1 signifikant mit der PTEN-Expression korreliert und dass die Hochregulation von NDRG1 durch einen Akt-abhängigen Weg auftritt [81].

NDRG1 ist ein Hypoxie-assoziiertes Gen und seine Expression sollte sich in Tumorzellen erhöhen, was meist in einer Umgebung funktioniert, die arm an Sauerstoff und Nährstoffen ist. In der Tat haben einige Studien eine erhöhte Expression von Hypoxie-induzierten Genen in Krebszellen dokumentiert [82]. Wang und Mitarbeiter demonstrierten, dass sich der NDRG1-Proteinspiegel schrittweise während der kolorektalen Karzinogenese erhöhte und dass es einen signifikanten Unterschied in der Expression von NDRG1 zwischen nicht-metastatischen und metastatischen Tumoren gibt [83]. Pankreas-Krebszelllinien, die ein relativ hohes Level an NDRG1 exprimieren, zeigten ein signifikant geringeres invasives Potential als Zellen mit einem niedrigeren NDRG1-Expressionsmuster [81]. In diesen Studien störte eine Überexpression von NDRG1 in Pankreaskrebszellen nicht die Wachstumsrate in Kultur, jedoch reduzierte es deutlich die Tumorstadiumsrate in Mäusen. Die Überexpression von NDRG1 wurde in humanen hepatozellulären Krebszellen beobachtet, was wiederum mit der Tumoraggressivität und einem schlechteren Überleben der Patienten korrelierte [84]. Die Assoziation von hohem NDRG1-Niveau mit der Aggressivität des hepatozellulärer Karzinoms legte eine tumorfördernde Rolle von NDRG1 nahe. Arbeiten von Yan und Mitarbeitern zeigten, dass das Stummschalten des NDRG1-Gens in hepatozellulären Karzinomzelllinien die Zellproliferation und -invasion hemmt und gleichzeitig die Apoptose induziert, was wiederum unterstreicht, dass dieses Protein eine pro-Überleben und eine anti-apoptotische Funktionen besitzt [85]. Allerdings haben andere Studien gezeigt, dass nach Untersuchung einer Vielzahl von unterschiedlichen Tumorgeweben das Expressionsniveau von NDRG1 in Krebszellen in der Regel ähnlich oder im Vergleich mit normalen Zellen verringert ist [78, 86, 87]. Es wurde beobachtet, dass ein niedriger NDRG1-Proteingehalt mit einer schlechteren Prognose für Patienten mit Gliomen [88], Kolorektalkarzinom [87], Ösophagus-Plattenepithelkarzinom [86], duktalem Adenokarzinom des Pankreas [81], Prostatakrebs [89] und Brustkrebs [45] assoziiert ist. Die erwähnten Studien zeigen, dass abhängig von der Tumorentität NDRG1 positiv oder negativ mit dem

Überleben und Fortschreiten der Krankheit korreliert. Die zunächst widersprüchlichen Ergebnisse bezüglich der NDRG1-Genexpression und sein Verhältnis zur Tumorprogression könnte darauf hinweisen, dass NDRG1 zellenspezifisch funktioniert und weist darauf hin, dass tumorbedingte Faktoren die Funktion von NDRG1 in der Zelle verändern. Zudem gibt es Berichte, die andeuten, dass das Verhältnis zwischen NDRG1-Proteinexpression und klinischem Outcome bei Krebserkrankungen auch von der Ethnizität der Patienten abhängt. Studien von Koshiji und Kollegen dokumentieren, dass eine erhöhte Expression von NDRG1 in kolorektalen Karzinomen signifikant mit einem aggressiven Phänotypen bei Japanern korreliert, während bei kaukasischen Patienten das Gegenteil beobachtet wurde [90]. Weiterführende Untersuchungen haben gezeigt, dass die Zeit bis zur notwendigen postoperativen Intervention bei Patienten mit hohem NDRG1-Expressionsmuster signifikant länger ( $P = 0,026$ ) war, was darauf hinweist, dass ein hoher NDRG1-Spiegel ein unabhängiger Prognosefaktor für günstige Ergebnisse bei Patienten mit WHO-Grad-II-Gliomen darstellt [91]. Jedoch geht dies nicht mit einem längeren Gesamtüberleben einher [91]. Die Experimente von Said et al. wiesen nach, dass die NDRG1-Expression mit Langzeithypoxie (24 Stunden) assoziiert war, nicht jedoch mit Kurzzeithypoxie in menschlichen GBM-Zellen. Es wurde festgestellt, dass die Expression von NDRG1 mit der Proteinexpression von HIF-1 $\alpha$ , SP1, CEBP $\alpha$ , YB-1 und Smad7 korreliert [92]. Sun et al. haben gezeigt, dass die NDRG1-Expression in Gewebeproben von hochgradigen Gliomen im Vergleich zu denen in Gewebe von niedriggradigen Gliomen und normalem Hirngewebe herunterreguliert wurde [88]. Diese Ergebnisse legen nahe, dass NDRG1 ein intrinsischer Regulator der Gliomagenese sein kann [92, 88]. Die Mechanismen, die den Auswirkungen von NDRG1 auf die Tumorentstehung von Gliomen zugrunde liegen, konnten jedoch noch nicht geklärt werden. Daher ist es erforderlich, die Rolle von NDRG1 bei der Regulierung des Wachstums, des Überlebens und der Invasion von Gliomzellen zu untersuchen [93].

### **1.7.6 NDRG1 und seine Rolle in der Angiogenese**

Das Wachstum eines Tumors hängt von der Nährstoff- und Sauerstoffverfügbarkeit ab, die durch die Blutversorgung bestimmt wird; neue Gefäße entwickeln sich in progredienten Tumoren mittels Angiogenese. Bei einigen Tumorarten wurde berichtet, dass die Expression von NDRG1 mit der angiogenen Aktivität korreliert.

In cervicalen Adenokarzinomen ist die erhöhte Expression von NDRG1 mit der VEGF-Expression und Angiogenese korreliert sowie mit schlechtem Gesamtüberleben [46]. Außerdem zeigten Maruyama und Mitarbeiter, dass die Produktion von angiogenen Faktoren wie die Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9), Interleukin-8 (IL-8) und VEGF in NDRG1

überexprimierenden Zelllinien deutlich reduziert ist [81]. Allerdings müssen zukünftige Studien die Frage klären, ob NDRG1 eine kausale Rolle in der Angiogenese spielt.

Eine der wichtigsten Bestandteile klinischer Studien hinsichtlich der Tumorprogression ist die Untersuchung der Sensitivität gegenüber Krebsmedikamenten. Bislang ist wenig bekannt über die Beteiligung von NDRG1 an der Veränderung der Tumorsensitivität gegenüber der Behandlung, aber es gibt eindeutige Hinweise, die darauf hindeuten, dass es in diesen Prozess involviert ist.

So zeigten Studien an Kolonkarzinomzellen, dass die Veränderung der NDRG1-Expression die Empfindlichkeit gegenüber Irinotecan ändert. Irinotecan ist ein halbsynthetisches Analogon von Camptothecin, das die Topoisomerase I inhibiert und in der kolorektalen Krebstherapie eingesetzt wird [94].

## **1.8 Ziel der Dissertation / Hypothesen**

Die bis heute gesammelten Daten zeigen, dass das NDRG1-Gen ubiquitär im menschlichen Gewebe exprimiert wird, einschließlich in Tumorzellen. Seine Expression unterliegt komplexen regulatorischen Mechanismen und wird durch pleiotrope Faktoren beeinflusst, einschließlich Hypoxie, Onkogene, Tumorsuppressorgene, Metallione und Hormone. Daher scheint es, dass die Expression von NDRG1 von den in der Zelle vorherrschenden Faktoren abhängt. Viele Studien zeigen, dass das Niveau der NDRG1 mRNA und/oder des Proteins mit der Tumorprogression korreliert. Die Bestätigung der möglichen Rolle von NDRG1 bei der Progression des Glioblastoma multiforme gilt es zu untersuchen. In diesem Zusammenhang möchte die vorliegende Studie folgende Fragestellungen erörtern:

- Ist ein Einfluss des Proteins NDRG1 auf das Tumorwachstum von U87MG-Gliomzellen in vivo nachweisbar?
- Inwieweit wirkt sich dies auf die Angiogenese und auf die Proliferation der Tumorzellen aus?
- Welchen Effekt hat eine antiangiogene Therapie auf das Tumorwachstum in vivo bzw. auf die Angiogenese und proliferative Aktivität der Tumorzellen?
- Zeigt Temozolomid eine therapeutische Wirkung auf das Tumorwachstum in vivo respektive auf die Angiogenese und Proliferation der Glioblastomzellen?

## 2 Material

Tabelle 1: Medien und Zusätze

Medium / Zusatz	Hersteller
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Inkl. 10 % FCS	PAA Laboratories GmbH
Und 5 % Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH
Zell-Einfriermedium:	
• 90 % Fetales Kälberserum (FCS) und	PAA Laboratories GmbH
• 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck Millipore

Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien	Hersteller
0,9 % NaCl (Natriumchloridlösung)	Merck Millipore
IS Mounting Medium PI + DAPI	Dianova
Methanol	Merck Millipore
Phosphate-buffered saline (PBS)	Gibco® Life Technologies
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	PAA Laboratories

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Flexüle Innendurchmesser 0,76 mm, Vasofix Braunüle	Braun
Zellkulturflasche: Falcon, 25 cm <sup>2</sup>   75 cm <sup>2</sup>	BD Biosciences
Zentrifugenröhrchen 352098 Tube, 50 ml	Thermo Fisher Scientific
Zentrifugenröhrchen 352055 Tube, 15 ml	Thermo Fisher Scientific
Prolene 5/0	Ethicon Johnson & Johnson
Filter: Millex® GP, 0,22 µm	Merck Millipore

Material	Hersteller
Neubauer Zählkammer	neoLab
Objektträger-Kasten	neoLab
Objektträger SuperFrost® Plus	R. Langenbrinck
DAKO Pen	Dako
Tissue Tek OCT Compound	Sakura Finetek
Einmalhandschuhe S/M	Charité Berlin
NaCl-Lösung (0,9 %)	Fresenius
Desinfektionsspray, Softasept	B. Braun
Einmalspritzen (1 ml, 2 ml, 10 ml)	BD Biosciences
Kanülen	BD Biosciences

## 2.1 Antikörper

Tabelle 4: Immunhistochemie – Primäre Antikörper

Antigen	Epitop	Hersteller
CD31	Ratte gegen Maus	Pharmingen (cat no. 550274)
Desmin	Kaninchen gegen Maus	Abcam (cat. no Ab15200)
Ki-67	Ratte gegen Maus	DAKO Clone Tec-3 (M7249)
Phospho-Histone H3	Kaninchen gegen Maus	Millipore (cat. no. 06-570)

Tabelle 5: Immunhistochemie – Sekundäre Antikörper

Epitop	Fluorochrom	Hersteller
Esel gegen Ratte	FITC	Dianova (cat. no. 712-095-150)
Esel gegen Ratte	Cy3	Dianova (cat. no. 712-165-150)
Esel gegen Kaninchen	FITC	Dianova (cat. no. 711-095-152)
Esel gegen Kaninchen	Cy3	Dianova (cat. no. 711-165-152)



Tabelle 6: Puffer und Standardlösungen

Puffer / Standardlösung	Zusammensetzung
Blockierungspuffer	100 ml TBS/T, 5 g Magermilchpulver
Casein 0,5 %	5 g/l PBS
Casein 1 %	10 g/l PBS
PBS/BSA	PBS + 1 g/l BSA
Tris Buffered Saline (TBS)	87,66 g NaCl, 12,11 g Tris, base pH 7,4 in dH <sub>2</sub> O

Tabelle 7: Medikamente

Medikament	Hersteller
Bepanthen® (Augensalbe)	Roche
Ketamin 10 % (Ketavet®)	Pfizer
Lidocain (Xylocain®)	AstraZeneca GmbH
Xylazinhydrochlorid (Rompun®)	Bayer
Temozolomid (Temodal®)	MSD Sharp & Dohme GmbH
Sunitinib (Sutent®)	Pfizer

Tabelle 8: Geräteliste

Gerät	Hersteller
(Begasungs-) Brutschrank	Thermo Fisher Scientific
Eisbereiter	Scotsman
Fluoreszenzmikroskop; Zeiss Axio Observer Z1	Zeiss, Jena, DE
Gefrierbox	Carl Roth
Feinwaage Abj	Kern
Inkubator Heraeus BBD620	Thermo Fisher Scientific
Kryostat HM 560	MICROM
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr
Magnetrührer Yellow Line	MSH

Gerät	Hersteller
Mikrobohrer	Fire Science Tools
Operationsmikroskop M650	Wild/Leica Microsystems
Sicherheitswerkbänke Herasafe	Thermo Fisher Scientific
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad	Memmert
Zentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific
Universalzentrifuge Heraeus Megafuge 16	Thermo Fisher Scientific
7 Tesla Kleintier-MRT	Bruker PharmaScan 70/16
Hamilton 10 µl	Hamilton SYR 10 µl 7001 KH
Model 900 LS Small Animal Stereotaxic Instrument	Kopf, Tujunga, Californien

Tabelle 9: Software

Software	Hersteller
Adobe Photoshop CS6	Adobe
AxioVision 4	Carl Zeiss
Excel 2007	Microsoft
GraphPad Prism Version 6.0	GraphPad Software
ImageJ	National Institutes of Health
LaTeX	LaTeX Project Team
Word 2007	Microsoft

## 2.2 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden folgende lentiviral transduzierte NDRG1/GFP-überexprimierende Zellen sowie stabile NDRG1 *knock-down* Zellen (*shNDRG1*, kein GFP) einschließlich der entsprechenden Kontrollzellen verwendet, die uns von Prof. Dr. Wolfgang Wick vom Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg zur Verfügung gestellt wurden. Dabei handelt es sich um Gliomzelllinien humanen Ursprungs.

Der Einsatz dieser Zelllinien als xenogenes Glioblastommodell in der athymischen Nacktmaus gilt als etabliert [95, 96].

## 2.3 Mausmodell

Für die Versuche wurden ausschließlich immundefiziente Nacktmäuse (Stamm: Crl: CD1-Foxn1 nu) NuNu-Mäuse der Firma Charles River Laboratories verwendet. Diese Nacktmäuse können aufgrund eines genetischen Defekts, der eine Thymusaplasie bedingt, keine reifen T-Lymphozyten ausbilden. Durch die Athymie der Versuchstiere wurde ein entsprechendes Wachstum der oben beschriebenen Zelllinien "in vivo" begünstigt.

Die ausgenommen weiblichen Mäuse im Alter zwischen 8–10 Wochen wiesen ein Gewicht von 22–25 g auf.

### 2.3.1 Tierhaltung

Die Versuchstiere wurden in der geschlossenen Tierhaltung in einem konventionellen Haltungssystem im Aschheim-Zondek-Haus der Experimentellen Neurochirurgie (CCM) der Charité – Universitätsmedizin Berlin gehalten. Die Hygienemaßnahmen vor Betreten der Tierräume beinhalteten Händedesinfektion, Handschuhe, Einmalkittel und Einmalüberziehschuhe. Alle Tiere wurden in apathogenen Räumen mit kontrollierter Luftfeuchtigkeit, einer Temperatur von 22,5 +/- 5 °C und 12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus in durchsichtigen Kunststoffkäfigen zu je maximal acht Tieren gehalten. Die Nacktmäuse erhielten Trockenfutter und Wasser ad libitum. Während der Studie wurden alle Anforderungen und Bedingungen nach § 8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes eingehalten.

## 2.4 Medikamente

Im zweiten Teil dieser Studie wurden zwei unterschiedliche Wirkstoffe eingesetzt: der zytotoxische Wirkstoff Temozolomid und der Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor Sunitinib.

### 2.4.1 Temozolomid

#### Eigenschaften und Wirkungsmechanismus

Bei dem Wirkstoff Temozolomid handelt es sich um 8-Carbamoyl-3-Methyl-Imidazo[5,1-d]-1,2,3,5-Tetrazin-4(3H)-one(I), das als alkylierendes Zytostatikum zur simultanen adju-

vanten Therapie von Glioblastomen in Kombination mit Radiatio eingesetzt wird (siehe Abbildung 2) [97].

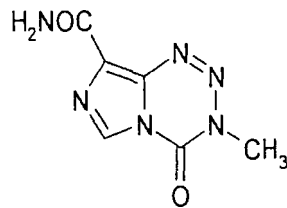


Abbildung 2: Temozolomid

Temozolomid verhält sich bei einem sauren pH-Wert ( $< 5$ ) stabil und labil bei einem pH-Wert  $> 7$  und kann somit oral verabreicht werden. Temozolomid wird bei einem physiologischen pH-Wert zur aktiven Form 5-(3-Methyltriazin-1-yl)imidazole-4-Carboxamide (MTIC) spontan hydrolysiert und zum sauren Metaboliten 3-Methyl-2,3-Dihydro-4-Oxoimidazo-[5,1,-d]-Tetrazin-8-Carboxylsäure (TMA) (siehe Abbildung 3).

MTIC wird weiter zerlegt in 5-Aminoimidazole-4-Carboxamid (AIC) und in ein Methyl-Diazo-Kation, das ein proximales DNA methylierendes Mittel ist [98].

Die hydrophobe Natur des MTIC befähigt es, die Blut-Hirn-Schranken-Membran zu durchdringen.

Temozolomid weist eine In-Vitro-Halbwertszeit von 1,9 Stunden in einem Phosphatpuffer bei  $37\text{ °C}$  und einem pH-Wert von 7,4 auf, wohingegen das MTIC in derselben Lösung eine Halbwertszeit von ungefähr 2 Minuten aufweist [99].

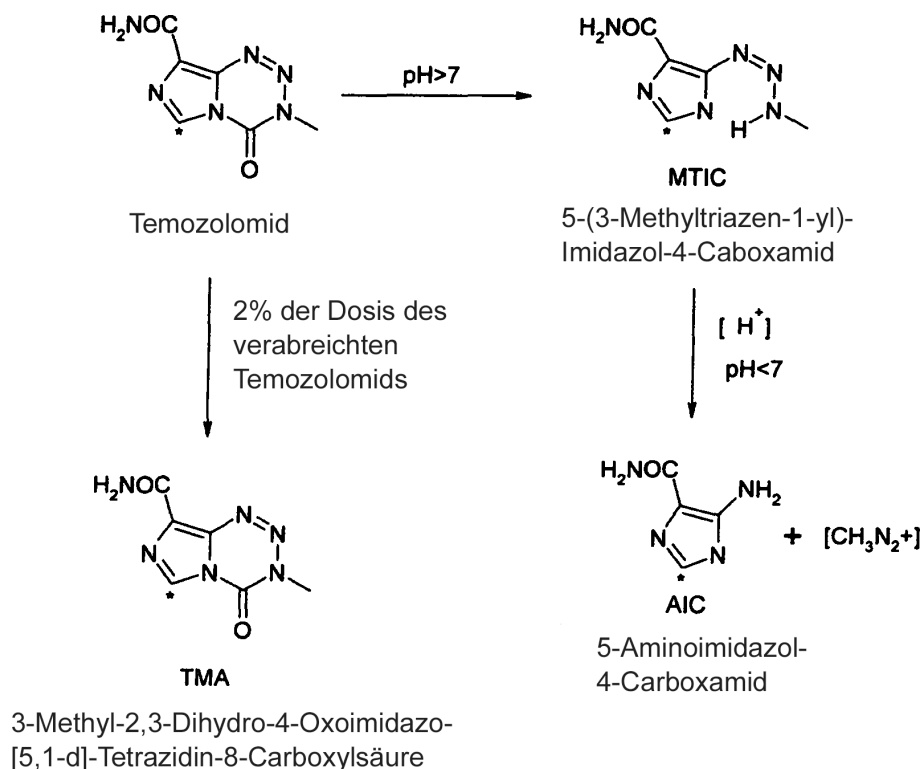


Abbildung 3: Die vorgeschlagenen Metabolismus- und Zerlegungswege von Temozolomid [97]

Temozolomid ist für die Depletion des DNA-Reparaturenzyms MGMT verantwortlich. Die antitumorale Wirkung von Temozolomid besteht in der Methylierung der O6-Position von Guaninresten. Diese wiederum spielen eine wesentliche Rolle, indem sie die Gentranskription blockieren, wodurch die GBM-Empfindlichkeit gegenüber Strahlung erhöht wird und pro-autophagische und apoptotische Prozesse aktiviert werden [100]. Dieser Wirkungsmechanismus ist von entscheidender Bedeutung für den Therapieerfolg, da GBM-Patienten mit hoher MGMT-Expression (unmethylierter Promoter des MGMT Gens) wesentlich schlechter auf Temozolomid ansprechen als Patienten mit niedriger MGMT-Expression (methylierter MGMT-Promoter) [101, 102].

Die Aktivierung von TMZ bei alkalischen oder nahezu alkalischen Bedingungen kann einer der Gründe sein, die zur Anfälligkeit von Tumorgewebe für das Medikament beitragen, da Gehirntumorgewebe einen höheren pH-Wert als natürliche Gewebe haben [98].

### Experimentelle und klinische Erfahrungen mit Temozolomid

TMZ wird schnell absorbiert und wandelt sich spontan in den aktiven Metaboliten MTIC um. Die maximale Plasmakonzentration wird nach oraler Einnahme nach ca. 30 bis 90 Minuten erreicht; die Plasma-Halbwertszeit beträgt etwa 2 Stunden. TMZ wird von Patienten in der Regel gut vertragen. Häufig leicht bis mittelschwer auftretende Nebenwirkun-

gen sind Obstipation, Müdigkeit sowie Übelkeit und Erbrechen, was gewöhnlich leicht mit Standard-Antiemetika zu kontrollieren ist. Die schwerwiegendste und zugleich dosislimitierende UAW ist eine Myelosuppression, insbesondere die Thrombozytopenie, die ca. 3 bis 4 Wochen nach Beginn der Behandlung bei weniger als 10 % der Patienten auftritt [100, 103].

Temozolomid hat bei der Behandlung wiederkehrender Gliome als einziges Agens Antitumoraktivität gezeigt. Der genehmigte herkömmliche Zeitplan umfasst eine tägliche Dosis von 150 bis 200 mg pro Quadratmeter Körperoberfläche für 5 Tage eines jeden 28-tägigen Zyklus. Eine tägliche Therapie mit einer Dosis von 75 mg pro Quadratmeter für bis zu sieben Wochen ist erprobt und sicher. Diese Exposition gegenüber Temozolomid verbraucht MGMT. Dieser Effekt kann wichtig sein, da niedrige MGMT-Spiegel im Tumorgewebe bei Patienten mit Glioblastom, die eine auf Nitrosoharnstoff basierende adjuvante Chemotherapie erhalten, mit einem längeren Überleben verbunden sind [103].

## 2.4.2 Sunitinib

### Eigenschaften und Wirkungsmechanismus

Sunitinib (früher SU11248, benannt nach Schlessinger und Ullrich) ist ein orales Oxindol, ein Multi-Target-Tyrosinkinase-Inhibitor, der aufgrund seiner Selektivität antiangiogene und antitumorale Aktivitäten aufweist (siehe Abbildung 4) [104].

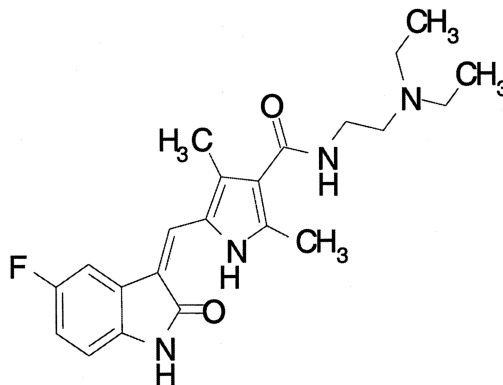
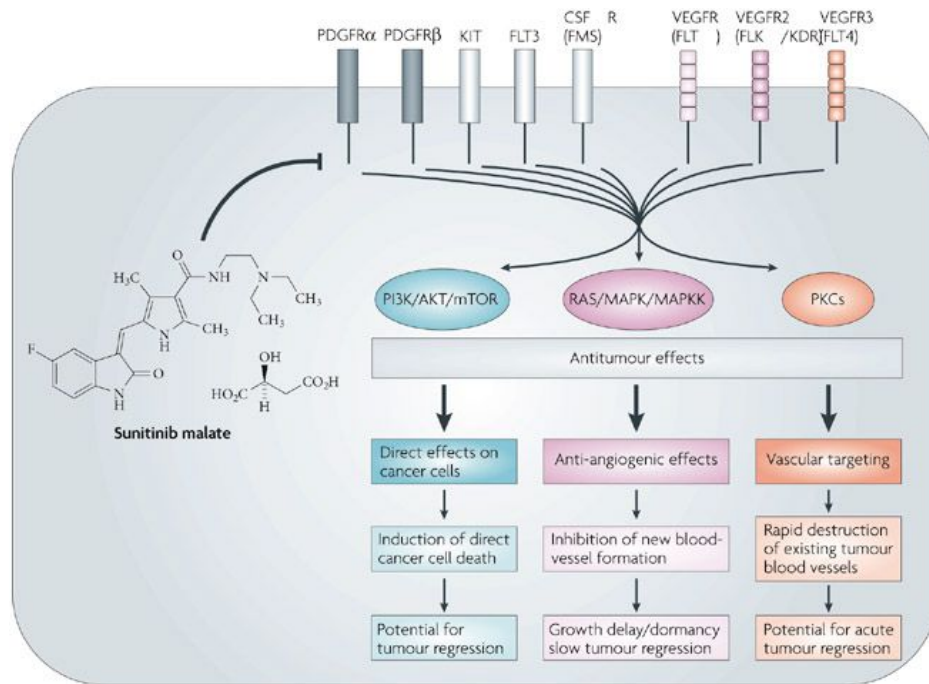


Abbildung 4: Chemische Struktur von Sunitinib [105]

Diese Eigenschaften resultieren aus einer selektiven Inhibition von VEGFR1 (auch als FLT1 bekannt), VEGFR2 (auch bekannt als FLK1/KDR), VEGFR3 (auch als FLT4 bekannt), PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$  sowie einer Inhibition des Stammzellwachstumsfaktor-Rezeptor (KIT), fms-verwandte Tyrosinkinase 3 (FLT3), RET und CSF1-Rezeptor (CSF1R) (siehe Abbildung 5).



Nature Reviews | Drug Discovery

Abbildung 5: Eigenschaften von Sunitinib [104]

Die Wirkung von Sunitinib kommt durch kompetitive Inhibition im Bereich der intrazellulären ATP-Bindungsstelle zustande. Durch die Inhibition dieser Rezeptoren werden multiple Effekte auf zelluläre Prozesse wie Tumorzellüberleben, Endothelzellwachstum und Endothelzellmigration sowie Gefäßpermeabilität und Perizytenrekrutierung ausgeübt [104].

Sunitinib hat ein akzeptables Verträglichkeitsprofil mit überschaubaren und reversiblen Nebenwirkungen und kann mit Hilfe eines flexiblen Dosierungsschemas verabreicht werden, um den individuellen Patientenbedürfnissen gerecht zu werden. Zukünftige Richtungen für Sunitinib und andere Multi-Target-Therapien umfassen die Anpassung der Therapie an den individuellen Patienten- und Tumortyp sowie die Überwindung von Arzneimittelresistenzen. Dies kann die Kombination von Sunitinib mit anderen gezielten Therapien oder einer Chemotherapie sowie die Verwendung von Sunitinib als Teil eines multimodalen Ansatzes bei der Krebsbehandlung umfassen. Translationale Forschung und die Identifizierung relevanter Biomarker dürften zur Optimierung der Therapie beitragen [104].

## 3 Methoden

Alle hier aufgeführten methodischen Verfahren und dargestellten Ergebnisse sind in Zusammenarbeit und mit technischer Hilfestellung der folgenden MTAs und Mitdoktoranden/innen entstanden und etabliert worden: Irina Kremenetskaia, MTA; Melina Nieminen, MTA; Jeannette Brünner, ehemalige Doktorandin; Stephan Marticorena-Garcia, ehemaliger Doktorand; Güliz Acker, ehemalige Doktorandin; Thomas Broggin, ehemaliger Doktorand. Alle beschriebenen Tierversuche fanden unter Beachtung des deutschen Tierschutzgesetzes statt und wurden vom Land Berlin genehmigt (Aktenzeichen: G0003/08).

### 3.1 Zellkultivierung und Zellaufbewahrung

Die NDRG1-Überexprimierenden Zellen (U87MG LV902-NDRG1) und deren Kontrolle (U87MG LV-902 empty) wurden in DMEM mit 4,5 g/L Glukosegehalt inklusive 10 % FBS und 5%igem Penicillin/Streptomycin Zusatz im Brutschrank unter konstanten Bedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Das Nährmedium wurde im Intervall von 24 bis spätestens 48 Stunden gewechselt, wobei ungefähr 50 % ersetzt wurde. Täglich erfolgte eine lichtmikroskopische Kontrolle bei 200-facher Vergrößerung hinsichtlich der Vitalität der Zellen, bakterieller Kontamination und Wachstumsverhalten. Dabei wurden polygonale Zellen mit einer nachweisbaren Adhärenz zum Boden als vitale Zellen definiert und kugelförmige nicht adhärente Zellen als tote Zellen beurteilt und ausgeschlossen. Bis zu einer Konfluenz von 80 % wurden die Zellen in Kultur gehalten und danach gesplittet/subkultiviert und in 75 cm<sup>2</sup> großen Zellkulturflaschen umgesetzt. Zum Ablösen der adhären Zellen erfolgte die Inkubation der Zellen mit 2 ml der 0,5%igen Trypsin/EDTA-Lösung bei 37 °C für 1–3 min in einem Brutschrank. Die enzymatische Reaktion der nun zu Spheres geformten Zellen wurde mittels 8 ml des jeweiligen Kulturmediums unterbrochen, in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und bei 1300 rpm und 24 °C sieben Minuten lang abzentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstands und der Resuspension des Zellpellets in frischem Nährmedium wurden die Zellen entweder wieder erneut in Kultur genommen, für die stereotaktische Implantation vorbereitet oder mittels Einfriermedium (FCS + 10 % DMSO) in stickstofftauglichen Kryoröhrchen bei -80 °C im Stickstofftank gefroren gelagert.

Eine Passage (p) wurde als Zyklus von der Aussaat bis zur erneuten Ablösung mittels Trypsin/EDTA festgelegt. Allgemein wurden alle Arbeiten an den Zellen unter einer sterilen Arbeitsbank mit sterilen Instrumenten/Materialien durchgeführt.



### 3.1.1 Zellzahlbestimmung

Zur Vorbereitung der Implantation wurde eine Zellzahlbestimmung mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer mit Trypanblau durchgeführt. Hierzu erfolgte die Wiederaufnahme des Zellpellets in 1 ml PBS und dessen Resuspension. Sodann wurden 10 µl abgenommen und mit Trypanblau (0,4 %) verdünnt (1:10). Tote Zellen erscheinen durch Trypanblau blau, da es durch die instabile Membran gelangen kann. Vitale Zellen werden nicht angefärbt. Es ist wichtig, darauf zu achten, dass angefärbte Proben nicht länger stehen gelassen werden, da der Farbstoff toxisch auf die Zellen wirkt und somit falsch positive Ergebnisse zustande kommen könnten.

Zur Zellzahlbestimmung werden 10 µl der angefärbte Zellsuspension in die Zählkammer gefüllt und unter dem Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung bewertet.

Mit Hilfe des definierten Volumens jedes einzelnen Quadrates von 0,1 µl kann mit

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\sum n \times F \times 10^4}{2}$$

die Zellzahl pro ml berechnet werden, wobei  $\sum n$  die Summe der vitalen Zellzahl in 2 Quadranten der Neubauer-Zählkammer beschreibt und F den Verdünnungsfaktor (1:10).

### 3.1.2 Zellaufbereitung und präoperative Vorbereitung der Zellsuspension

Die zur Inokulation vorbereiteten Zellen besaßen eine Konfluenz von ca. 90 %. Je Tiergruppe wurde dieselbe Zellpassage implantiert (erste Versuchsreihe P5 und zweite Versuchsreihe P3/4). Die Vorbereitung hierfür erfolgte unmittelbar vorher, wie bereits beschrieben. Die Zellzahl wurde ermittelt und in PBS aufgenommen und bis zur Implantation auf Eis gelagert.

In den Versuchen wurden 100.000 Zellen pro 2 µl zur Implantation verwendet. Zur Vermeidung von Suspensionsfehlern und um eine blasenfreie Aufnahme der Suspension zu gewährleisten, wurde pro Tier mindestens 2,5 µl Volumen bereitgestellt.

Aufgrund der Länge des Eingriffes pro Maus wurden nach maximal drei Stunden frisch geerntete Zellen gleicher Linie und gleicher Passage verwendet. Die Zellen in Suspension wurden auf Eis bei -5 °C kühl und abgedunkelt bis zur Implantation gelagert und pro Tier frisch in die verwendete Hamilton Spritze aufgenommen.

## 3.2 Versuchsplan

Zunächst wurden im Rahmen der ersten Versuchsreihe 12 Nacktmäuse mit den zwei verschiedenen Zelllinien (NDRG1+/+ und Empty-Vektor) orthotop stereotaktisch implantiert und nach 14, 21 und 28 Tagen ein MRT (7T MRT) je Maus erstellt (siehe Abbildung 6). Es erfolgte die Konservierung der Gehirne innerhalb von 12 Stunden post MRT sowie die histologische / immunhistochemische Untersuchung der erstellten Schnittbilder.

In der zweiten Versuchsreihe wurden 24 Tiere analog zur ersten Versuchsreihe stereotaktisch implantiert und zudem ab dem 21. Tag für sechs Tage mit Temozolomid (50 mg/kg KG) oder Sunitinib (80 mg/kg KG) behandelt. Die Versuchsmäuse wurden in zwei Hauptgruppen mit je zwei Untergruppen zu je sechs Tieren unterteilt.

Der Endpunkt wurde auf den 28. Tag nach dem letzten MRT-Scans bzw bei Vorliegen von klinischen Symptomen festgelegt, d. h. die Tiere wurden mittels kardialer Perfusion getötet und das Gewebe anschließend immunhistologisch untersucht. Die hierbei eingesetzten immunhistologischen Marker wurden zur näheren Differenzierung des veränderte Gewebes herangezogen.

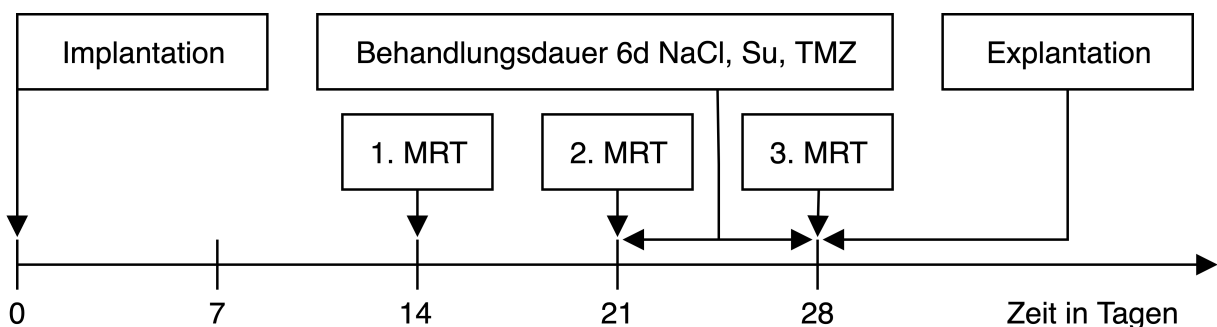


Abbildung 6: Versuchsablauf

### 3.2.1 Abbruchpunkte

Während der gesamten Versuchsdauer wurden die Nacktmäuse täglich hinsichtlich folgender Bewertungspunkte kontrolliert:

- Prozentuale Reduktion des Körpergewichts (KG)
- Auffälliges Verhalten
- Futter-/Wasseraufnahme
- Abwehr-/Schmerzreaktion
- Atmung
- Mototrik (verändertes Gangbild)
- Körperhaltung

### 3.3 In vivo Methoden

#### 3.3.1 Stereotaktische intrakranielle Implantation

##### Präoperative Vorbereitung und Versuchsaufbau

Die stereotaktischen Operationen fanden in einem gesonderten, speziell für chirurgische Eingriffe vorgesehenen Raum statt. Alle verwendeten Instrumente wurden vor dem Eingriff autoklaviert. Pro Tag wurde eine Versuchsgruppe von maximal 12 Tieren implantiert (siehe Abbildung 7).

Alle benötigten Materialien wurden vor Sedierung der Tiere wie folgt aufgebaut:

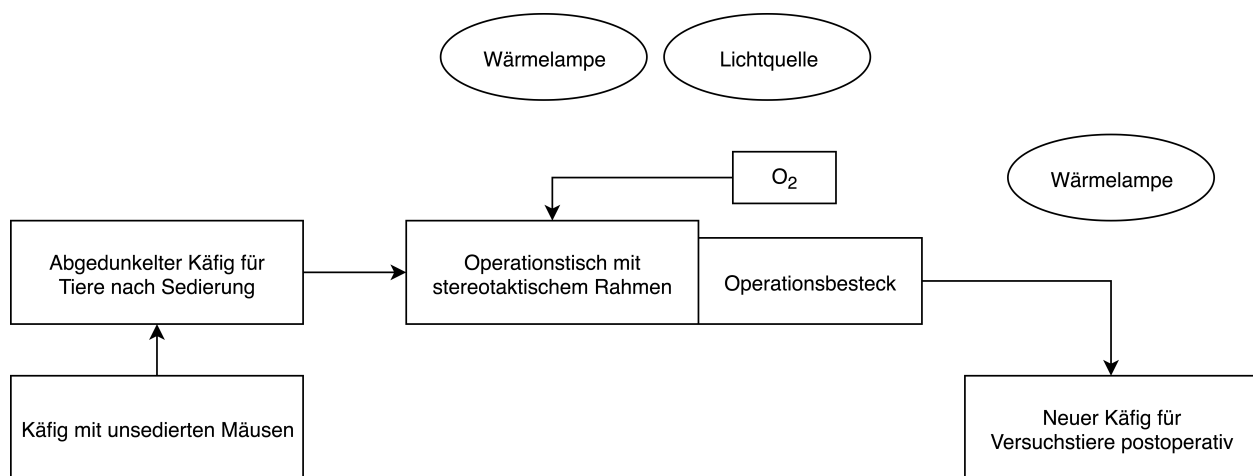


Abbildung 7: Versuchsaufbau

Nach erfolgter Sedierung wurden die Versuchstiere einzeln in einen abgedeckten Käfig gesetzt. Mit Hilfe einer Wärmelampe wurde eine Temperatur von ungefähr 37 °C gewährleistet. Nach der erfolgten Implantation wurden die Tiere in einen frischen Käfig gesetzt.

##### Sedierung

Alle Versuchstiere wurden mittels einer intraperitonealen Injektion analgosediert. Die verwendeten Substanzen wurden vorher unter sterilen Bedingungen als gebrauchsfertige Lösung angemischt. Verwendet wurde eine Mischung aus 3/4 Ketamin (Hostaket) 120 µg/kg KG als klassisches Anästhetikum und 1/4 Xylazin (Rompun) 16 µg/kg KG als Analgetikum. Diese Medikamentenlösung wurde mit einer Dosierung von 0,01 ml/10 g KG i. p. appliziert.

Zu Beginn der Eingriffe wurde die Lösung frisch hergestellt und gekühlt sowie lichtgeschützt bis zur Verwendung gelagert. Das Injektionsvolumen wurde durch Ermittlung des Körpergewichts bestimmt.

Nach Injektion erhielt jede Maus Bepanthen-Augensalbe und wurde durch eine auf 37 °C eingestellte Wärmeplatte bis zum Wirkungseintritt warm gehalten. Die optimale sedative Wirkung setzte bei den Versuchstieren nach etwa 8–10 Minuten ein und hielt eine halbe Stunde an. Zudem erfolgte eine Kennzeichnung der Tiere mit Ohrmarken in einem bzw. beiden Ohren. Die Narkosetiefe wurde anhand der Tiefensensibilität zwischen den Zehen der Mäuse mit einer chirurgischen Pinzette überprüft und ggfs nachappliziert.

### **Stereotaktische intrakranielle Implantation**



Abbildung 8: Stereotaktischer Rahmen [106]

Zu Beginn wurden die Versuchstiere in Brustlage auf den stereotaktischen Rahmen gelegt und die Ventilation durch das Einspannen der Oberkieferfrontzähne in eine Bisschiene und Vorlagern der Zunge gewährleistet (siehe Abbildung 8). Zudem erfolgte die stabile Fixierung des Schädels in exakt waagrechter Lage mittels beidseitiger Positionierstifte. Dies ist besonders wichtig, um eine Messung mit senkrechtem Injektionskanal zu gewährleisten.

Sodann erfolgte die Desinfektion und nach Abwarten der Einwirkzeit die Eröffnung der Cutis auf Höhe der Ohrbasis mittels medianer Inzision, gefolgt vom Einbringen der Fadenzügel zur Wundspreizung sowie der Freilegung des Periosts.

Anschließend wurde anhand des Bregmas der Implantationspunkt bestimmt und markiert (siehe Abbildung 9). Hierzu wurden am stereotaktischen Rahmen die dreidimensionalen Koordinaten des Bregmas bestimmt und folgende Werte hinzuaddiert:

- Anterior: + 1 mm
- Lateral: + 2 mm

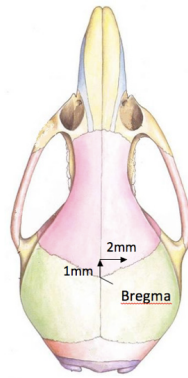


Abbildung 9: Schemazeichnung Bregma [106]

An diesem Punkt wurde ein kleines Loch mit einer dünnen 23 G Kanüle vorgebohrt. Anschließend wurde die 10  $\mu$ l Hamilton Spritze in die Halterung eingespannt. Die mit 2  $\mu$ l der Tumorzellsuspension befüllte Spritze wurde zunächst auf Höhe des Kortexes gebracht und dann vorsichtig 3–4 mm caudal Richtung Basalganglien abgesenkt. Nach Abwarten von 2–3 Minuten erfolgte die Bewegung der Nadel um 2 mm nach kranial und nach kurzem Warten die Injektion der Suspension mit einer durchschnittlichen Rate von 0,25  $\mu$ l pro Minute. Nach vollständiger Injektion wurde die Hamilton Spritze zunächst für drei Minuten am Ort der Implantation belassen und schließlich über einen Zeitrahmen von sechs Minuten 0,5 mm pro Minute repositioniert, um einen Reflux zu vermeiden. Der Schädel wurde mit Knochenkleber und die Kutis mit Einzelknopfnähten verschlossen. Das Versuchstier wurde zurück in die Wärmebox gelegt und bis zur vollständigen Mobilität kontinuierlich überwacht.

Die Operation einer Maus dauerte ca. 60 Minuten, darunter rund 10 Minuten für die Anästhesie, 30 Minuten für den eigentlichen Eingriff und 20 Minuten für die Aufwachphase.

### Postoperatives Management

Es erfolgte die kontinuierliche Überwachung und Versorgung der Versuchstiere bis zur vollständigen Regeneration. Anschließend wurde die Wunde täglich kontrolliert.

### 3.3.2 Magnetresonanztomographie (MRT)

An den Tagen 14, 21 und 28 wurden bei allen Versuchstieren die Gehirne mittels MRT bildlich dargestellt. Alle Messungen sowie die Auswertung der Tumorumfänge sind mit der Hilfe der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Christoph Harms, insbesondere Frau Susanne Müller und Frau Prof. Ulrike Harms, entstanden. Zum Einsatz kam ein 7-Tesla Scanner für Nagetiere (Pharmascan 70/16, Bruker BioSpin, Ettlingen, Deutschland) mit der Bruker Paravision Software Version 4.

### **Vorbereitung des Kontrastmittels**

Um alle strukturellen Veränderungen optimal darzustellen, wurde den Tieren über die Schwanzvene Kontrastmittel appliziert. Verwendet wurde hierfür Magnevist (Bayer, Leverkusen) 2,0 mmol/l in verdünnter Lösung. Jede Maus erhielt dabei 0,5 mmol/kg Körpergewicht (KGW) Gd-DTPA Magnevist, entsprechend 100 µl der angefertigten Lösung intravenös.

### **Vorbereitung der Mäuse**

Die Tiere wurden am Tag des MRT gruppenweise im Käfig zum MRT transportiert. Vor Ort erfolgte eine kurze Beurteilung der Mäuse. Nach Fixierung des Tieres erfolgte der intravenöse Zugang in die laterale Schwanzvene.

### **Durchführung**

Die Mäuse wurden in das MRT in Bauchlage, die Nase in einer 3 ml Spritze zur Narkoseventilation umgelegt. Die Anästhesie wurde mit 2,5 % (v/v) Isofluran/Sauerstoffgemisch eingeleitet und mit 1,5–2 % (v/v) Isofluran/Sauerstoffgemisch mittels Gesichtsmaske aufrecht erhalten. Während der Untersuchung wurden die Mäuse auf eine Wärmematte gelegt, um eine konstante Körpertemperatur von 37 °C zu gewährleisten. Zudem wurde die Atemfrequenz mit einem Monitoring-System überwacht.

Zur bildlichen Darstellung der Gehirne wurden T1- und T2-gewichtete 2D Turbo Spin-Echo-Sequenzen mit folgenden Bildgebungsparametern verwendet: für T1w TR/TE = 800/10,6 ms, RARE-Faktor 2, 4 Mittelwerte und für T2w TR/TE = 4200/36 ms, RARE Faktor 8, 4 Mittelwerte.

Zwischen dem Bulbus olfactorius und dem Cerebellum wurden von rostral nach caudal 20 koronare Schnitte mit einer Schnittdicke von jeweils 0,5 mm, einem Sichtfenster von 27,65 x 27,65 mm und einer Matrix mit 256 x 256 Pixel aufgenommen.

Nach der letzten Messung erfolgte ein sofortiges Umlagern der Maus in die Transportbox unter stetigem Monitoring.

### **Kardiale Perfusion und Entnahme / Fixierung der Gehirne**

Die Tiere wurden innerhalb von 24 Stunden nach dem letzten MRT am 28. Tag post OP unter Schmerzfreiheit mittels kardialer Perfusion tierschutzgerecht getötet und die Gehirne explantiert und fixiert.

Hierzu wurden die Versuchstiere zunächst irreversibel sediert, jedoch der Kreislauf aufrechterhalten. Nach Überprüfung der Tiefensensibilität und bei Ausbleiben der Reflexe erfolgte die Fixierung der Extremitäten an einem Styroporbett unter der Abzugshaube. Danach wurde die Bauchhaut desinfiziert und das Abdomen im Bereich der Mittellinie mittels feiner chirurgischer Schere eröffnet. Sodann erfolgte die Freilegung der Bauch- und Thoraxwand sowie der Zwerchfellkuppe unter Schonung der A./V. thoracica und anschließend die Durchtrennung der Rippen beidseits lateral bis kranial des Herzens mit Hilfe einer scharfen Schere. Nach Lösung der vorderen Thoraxwand wurde diese nach kranial verlagert und nach Freilegung des Herzens der rechte Vorhof und somit der große Kreislauf mittels eines Scherenschlages eröffnet. Mit einer 10 ml Spritze wurde der linke Ventrikel punktiert und die 4%ige PFA-Lösung langsam injiziert. Der Perfusionserfolg konnte leicht durch das Austreten der klaren PFA-Lösung aus dem rechten Atrium und an dem Verblassen der inneren Organe (Leber, Darm) sowie dem Versteifen des Tieres kontrolliert werden. Zügig wurde der Kopf mit einer Schere abgesetzt und die Kopfhaut mittig durchtrennt und entfernt. Anschließend wurde die Sutura sagittalis aufgesucht und mit einer spitzen Schere eröffnet. Nach vollständiger Entfernung der oberen Schädeldecke erfolgte das Absetzen aller sichtbaren Hirnnerven (I, II und V) und die vorsichtige Entnahme des Gehirns aus der Schädelbasis. Das entnommene Gehirn wurde in ein Falcon-Röhrchen überführt und für 24 Stunden bei  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Nach der Fixierung wurden die Gehirne in flüssigem Stickstoff bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  kryokonserviert und gelagert.

### **Bildanalyse**

Die Berechnung des Tumorumfanges wurde mit dem Programm Analyze 5.0 (Analyze Direct, Inc.; Lenexa USA) durchgeführt. Die hyperintensiven Bereiche in T2-gewichteten bzw. T1-gewichteten Bildern wurden mit einem Region-of-Interest-Tool belegt. Dies ermöglicht eine schwellenwertbasierte Segmentierung durch Verbinden aller Pixel innerhalb eines spezifizierten Schwellenwertbereichs um das ausgewählte Startpixel herum und führt zu einer 3D-Objektkarte der gesamten Tumorregion. Anschließend wurde das Gesamtvolumen der gesamten Objektkarte automatisch berechnet.

### **3.4 Anfertigung von Kryoschnitten**

Zur immunhistochemischen Analyse der Tumorexzidate wurden Gefrierschnitte mit einer durchschnittlichen Dicke von  $6\text{--}10\text{ }\mu\text{m}$  an einem Gefriermikrotom (Microm, HM 560) angefertigt. Dafür wurden die bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gefrorenen Exzidate zunächst auf den Probenhalter mittels Tissue Tec aufgebracht und über den Schnell-Gefrier-Modus befestigt. Im Anschluss wurde die Probe für eine halbe Stunde im Mikrotom gelagert, um eine Schnitttemperatur

von 20–23 °C zu erreichen. Die Einstellung der Kammertemperatur erfolgte je nach Außentemperatur und betrug durchschnittlich -20 °C; die Temperatur des Trägers lag zwischen -20 °C und -25 °C.

Die Schnitte wurden in kranio-kaudaler Führung erstellt, analog zur Schnittebene im MRT. Zur Aufnahme der Schnitte wurden speziell beschichtete Objektträger (SuperFrost Plus Microm) verwendet und während der gesamten Zeit des Schneidevorgangs bei -20 °C gelagert. Pro Objektträger wurden zwei Schnitte aufgezogen. Parallel zum Schneidevorgang wurden stets alle Proben gekühlt im Mikrotom aufbewahrt und alle fertigen Schnitte wurden zügig in Objektträgerkästen in den -80 °C kalten Gefrierschrank umgelagert. Die weitere Fixierung der Schnitte wurde erst unmittelbar vor Durchführung der jeweiligen immunhistochemischen Färbung durchgeführt.

### **3.4.1 Immunhistologische Färbungen**

#### **Färbung für den Tumorzellproliferationsmarker Phospho-Histone H3 (PHH3)**

Der Proliferationsmarker PHH3 ist ein Histonprotein, welches zusammen mit anderen Histonen die Proteinhauptbestandteile des Chromatins in eukaryotischen Zellen bildet. Gerade während der Mitose zeigt es eine maximale Chromatin-Kondensation, wohingegen die Interphase keine Rolle spielt [107]. Zudem wiesen Untersuchungen auch keine Phosphorylierung am Histon H3 während der Apoptose nach [108]. Demzufolge wurde PHH3 als mitotischen Marker verwendet, um mitotische, d. h. aktiv proliferierende Tumorzellen von apoptotischen Körperchen und Resten des karyorrhektischen Kernzerfalls zu differenzieren (Millipore cat. no. 06-570, Wirt: Kaninchen, 1:500).

#### **Färbung zur Detektion von Endothelzellproliferation mittels Anti-Maus-Ki-67**

Um die proliferierenden Endothelzellen im Tumorgewebe darzustellen, wurde der immunhistochemische anti-Maus-Ki-67-Marker verwendet (DAKO, Clone Tec-3, Wirt: Ratte, 1:25). Die induzierte Tumorangio-genese durch spezifische Stimuli wie beispielsweise VEGF wird vom Wirt Maus, d.h. von mauseigenen Endothelzellen realisiert. Ki-67 bindet an ein nukleäres Protein, das bei allen aktiven Zellen außerhalb der Ruhephase (Zellzyklus G<sub>0</sub>) nachgewiesen werden kann [109]. Je höher die Proliferationsrate, desto kräftiger ist die Färbung. Tumore, wie das primäre GBM mit hoher Proliferationsrate, weisen eine kräftig positive Färbung auf. Ki-67 eignet sich also insbesondere zur Bestimmung der Proliferationskapazität eines Tumors und damit auch zur Einschätzung der Malignität [109].



### **Doppelimmunfluoreszenzfärbung Pecam-Desmin**

Die gleichzeitige Darstellung von Perizyten (Desmin-positiv) und Endothelzellen (CD31-positiv) gelang durch kombinierte Anwendung beider Immunfluoreszenzmarkierungen von Desmin (Abcam, Wirt: Kaninchen, 1:100–1:200) und Pecam (CD31, BD Pharmingen, Wirt: Ratte, 1:50) auf den Schnitten.

Diese Doppelimmunfluoreszenz-Färbung erfolgte simultan, d.h. beide Primärantikörper sowie beide Sekundärantikörper wurden gemeinsam in einer Antikörperlösung inkubiert.

### **Immunhistochemisches Färbeprotokoll**

Die zunächst bei -80 °C aufbewahrten Objektträger wurden unmittelbar in Methanol überführt und für 5–10 Minuten bei -20 °C fixiert. Nach kurzer Trocknung wurde jeder einzelne Schnitt mit dem Fettstift DAKO Pen als zirkuläre Barriere umkreist. Anschließend wurden die Schnitte bei Raumtemperatur (RT) drei Mal für jeweils 5 Minuten mit PBS, pH 7,4 gewaschen. Danach wurden die Schnitte zur Blockierung unspezifischer Antigenbindungsstellen in einer 1%igen Casein-PBS Lösung für 30 Minuten bei RT inkubiert. Es schloss sich die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper (in 0,5%igen Casein-PBS entsprechend verdünnt) für 2 Stunden bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer ohne Lichtexposition an. Hierbei wurden 80–100 µl der jeweiligen primären Antikörperlösung auf jeden Schnitt mit einer Eppendorf Pipette so aufgetragen, dass die mit dem Fettstift gebildete Grenze nicht überschritten wurde. Nach erfolgter Inkubation wurden die Kryostatschnitte vorsichtig aufgestellt, so dass die Lösung abfließen konnte. Danach wiederum ein dreimaliger Waschvorgang bei RT mit 0,5%igen Casein-PBS. Darauf folgte das Auftragen des jeweiligen Sekundären Antikörpers verdünnt mit 0,5%igen Casein-PBS und die Inkubation für 2 Stunden bei RT in einer dunklen Feuchtkammer. Danach wurde das Sekundärantikörpergemisch vorsichtig von den Objektträgern abgeschüttelt und die Schnitte wieder drei Mal für 5 Minuten bei RT jedoch unter Lichtschutz (durch Alufolie) in PBS gewaschen. Abschließend erfolgte die Färbung der Zellkerne mittels DAPI und das Eindecken mittels Deckgläschen. Nach 30-minütigem Lufttrocknen unter Lichtschutz wurden die Deckgläschen mittels durchsichtigem Nagellack zum Luftausschluss versiegelt. Die gefärbten Kryoschnitte wurden bis zur Mikroskopie und Auswertung bei 4 °C in einer lichtundurchlässigen Box aufbewahrt.

Die Negativkontrollen zum Ausschluss unspezifischer Antikörperbindungen erfolgte jeweils durch Zugabe des Sekundärantikörpers ohne Verwendung des Primärantikörpers.

## Mikroskopie und Auswertung

Um optimale Färberesultate zu erzielen und eine mögliche Signalabschwächung der Immunfluoreszenz zu vermeiden, wurde die Mikroskopie der gefärbten Schnitte nach Abschluss der Färbung oder am darauffolgenden Tag vorgenommen.

Die mikroskopische Auswertung wurde mit Hilfe des computergestützten Axioskops der Firma Zeiss und der dazugehörigen Software Axiovision 4.0 durchgeführt.

Zur quantitativen Auswertung der jeweiligen immunhistochemischen Untersuchungen wurden zunächst im ersten Teil des Experiments 4 Tumore mit U87MG NDRG1-überexprimierenden Zellen und 4 Tumore mit dem Empty-Vektor herangezogen. Pro Tumor wurde eine Anzahl von insgesamt neun Schnitten evaluiert. Von jedem Schnitt wurden fünf Untersuchungsfelder (ROIs; Region of Interest) in einer 200-fachen Vergrößerung analysiert.

Im zweiten Teil des Experiments wurden 4 Tumore pro Behandlungsgruppe (4 x NDRG1 mit Su, 4 x NDRG1 mit TMZ sowie 4 x Empty/Kontrolle mit Su und 4 x Empty/Kontrolle mit TMZ) untersucht und ebenso drei Schnitte je Färbung und fünf ROIs je Schnitt bewertet.

## 3.5 Statistische Methoden

Aus den quantitativen Daten wurde der Mittelwert  $\pm$  SD (Standardabweichung) berechnet. Die Mittelwerte der einzelnen Parameter wurden aus den Ergebnissen der jeweiligen Versuchstiere zu den betreffenden Untersuchungszeitpunkten bestimmt.

Mittels der ANOVA-Varianzanalyse und nachfolgender Bonferroni-Korrektur (Post-hoc-Test) erfolgte die statistische Auswertung von Unterschieden. Zur statistischen Analyse von Vergleichen zwischen Gruppen wurde der Student-t-Test durchgeführt.

Als statistisch signifikant wurden alle Werte  $P < 0,05$  definiert. Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der Software GraphPad Prism (Version 6.0, La Jolla) und Excel (Microsoft) durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Auswirkung der NDRG1-Überexpression auf das Gliomwachstum

#### 4.1.1 Effekte auf das Tumolvolumen in vivo

Das Tumorwachstum von NDRG1-überexprimierenden U87MG Zellen und der Empty/Kontrollgruppe wurde in vivo über einen Zeitraum von 28 Tagen beobachtet. In den erstellten MRT-Aufnahmen zeigen sich deutlich positive Tumorbefunde an Tag 14, 21 und 28 (siehe Abbildung 10).

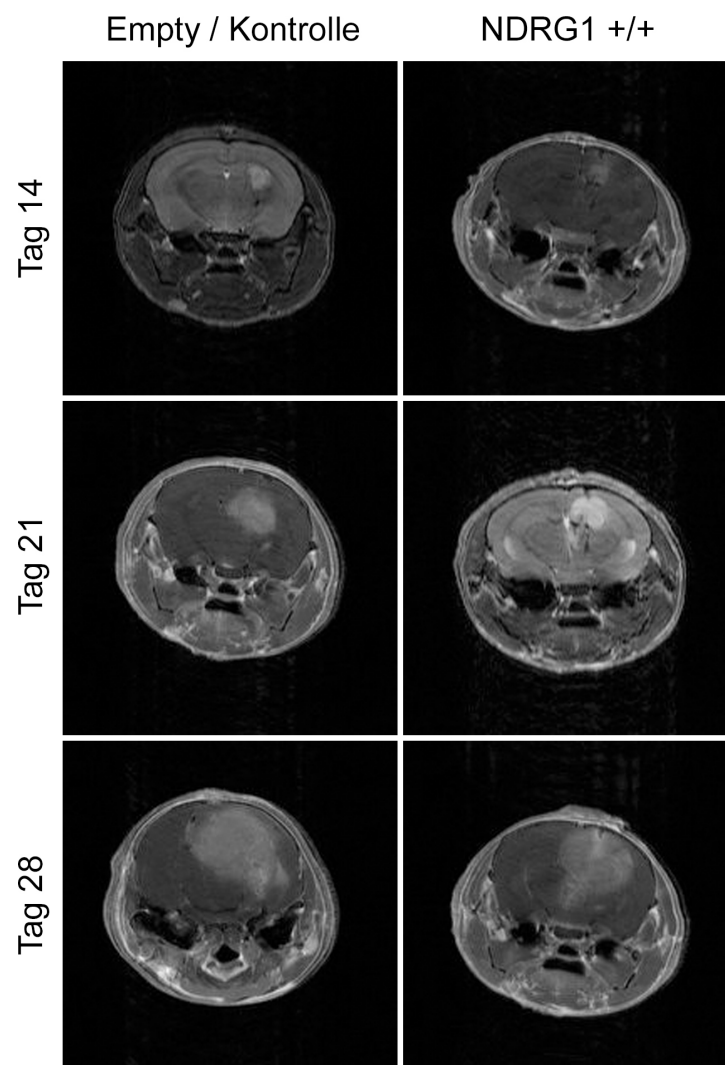


Abbildung 10: MRT-Bilder von NDRG1-überexprimierenden Gliomzellen und der Vergleichsgruppe: hyperintense, inhomogene Areale kennzeichnen den jeweiligen positiven Tumorbefund. Die Versuchstiere wurden mit der gleichen Zellzahl an identischer Stelle implantiert.

Interessant ist hierbei, dass sich bis zu Tag 21 ein vergleichbares Wachstumsverhalten zeigt und sich erst ab Tag 21 Unterschiede darstellen. So entwickelten sich die NDRG1-überexprimierenden Tumoren schneller und wiesen an Tag 14 eine Größe von  $2,19 \text{ mm}^3 \pm 3,079 \text{ mm}^3$  im Vergleich zur Empty/Kontrollgruppe ( $0,74 \text{ mm}^3 \pm 0,62 \text{ mm}^3$ ) auf (siehe Abbildung 11). An Tag 21 zeigte das Tumolvolumen der Gruppe Empty (Empty:  $7,01 \text{ mm}^3 \pm 5,97 \text{ mm}^3$ ) ein um 46 % reduzierte Tumorgöße im Vergleich zur NDRG1-Gruppe (NDRG1:  $12,92 \text{ mm}^3 \pm 18,39 \text{ mm}^3$ ). Am Tag 28 post OP war dieses Verhältnis beinahe exakt umgekehrt. Die Tumore der Empty/Kontroll-Gruppe zeigten einen Mittelwert von  $61,02 \text{ mm}^3 \pm 40,13 \text{ mm}^3$  im Vergleich zur NDRG1-überexprimierenden Gruppe ( $33,52 \text{ mm}^3 \pm 25,26 \text{ mm}^3$ ); somit konnte hier ein um 45 % reduziertes Tumolvolumen der NDRG1-Gruppe im Vergleich zu Empty beobachtet werden.

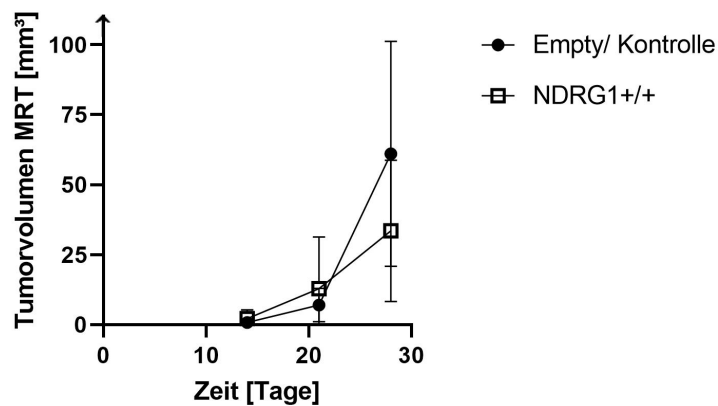


Abbildung 11: Wachstumsverhalten der U87MG-Tumorzellen in vivo: im MRT gemessene Tumorumfänge der stereotaktisch intrakraniell implantierten U87MG NDRG1-überexprimierenden Gliomzellen und des Empty-Vektors zu den Untersuchungszeitpunkten an Tag 14, 21 und 28. Je Gruppe N = 8; alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SD angegeben.

Es lässt sich beobachten, dass kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der beiden Versuchsgruppen an den jeweiligen Tagen festgestellt werden kann. Tag 14 NDRG1 vs. Empty/Kontrolle  $\rightarrow P > 0,999$ ; Tag 21 NDRG1 vs. Empty/Kontrolle  $\rightarrow P > 0,999$ ; Tag 28 NDRG1 vs. Empty/Kontrolle  $\rightarrow P = 0,1797$  (siehe Abbildung 1).

Betrachtet man hingegen die Differenz der Mittelwerte zwischen den verschiedenen Zeitebenen und stellt das relative Tumorstadium dar, so besteht ein statistisch signifikanter Unterschied in der Empty/Kontrollgruppe (Tag 14 vs. Tag 28: \*  $P < 0,0001$  und Tag 21 vs. Tag 28: \*  $P < 0,0001$ ), der größer ist als zufällig zu erwarten wäre (siehe Abbildung 12).

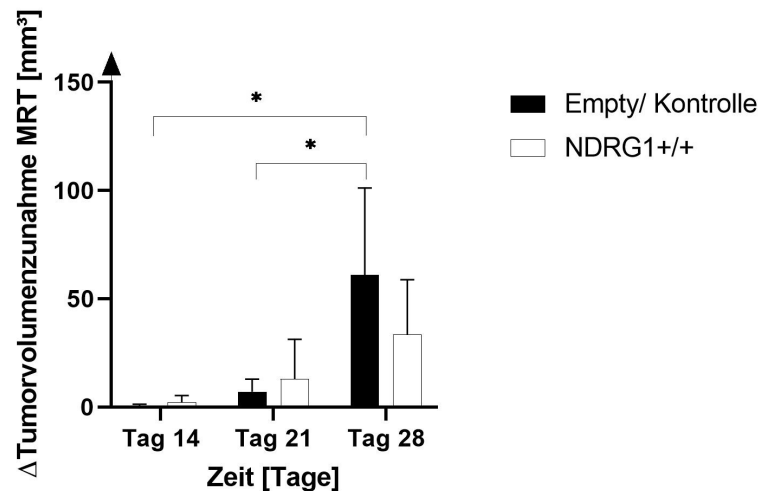


Abbildung 12: Relatives Tumorwachstum von NDRG1-überexprimierenden Tumorzellen und Tumorzellen mit dem Empty-Vektor/Kontrolle: dargestellt sind Balkendiagramme mit Mittelwerten der beiden Gruppen (NDRG1; Empty/Kontrolle) und Standardabweichung. N = 8 Tiere/Gruppe.

#### 4.1.2 Charakterisierung der Gefäßdichte und der PECAM/Desmin-Ratio

Anhand der Doppelimmunfluoreszenzfärbung PECAM/Desmin wurden die Perizyten-Endothel-Interaktion der untersuchten Gliomzellen analysiert (siehe Abbildung \ref{IHC-Darstellung}).

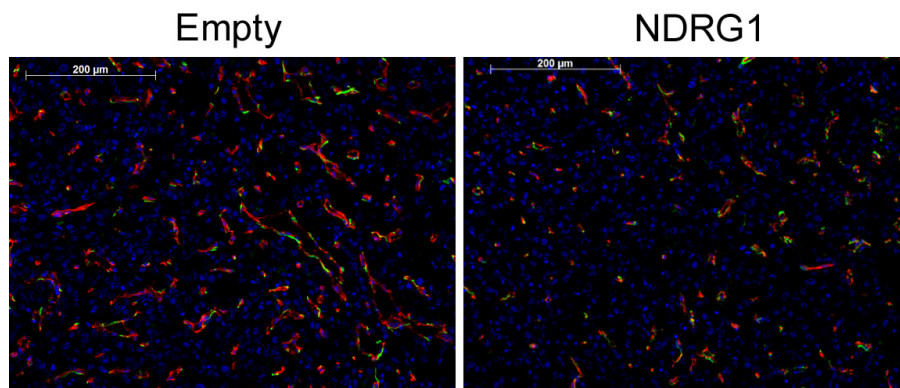


Abbildung 13: Repräsentative fluoreszenzimmunhistochemische Darstellung der Gefäß-Perizyten-Assoziation in NDRG1-überexprimierenden U87MG Tumoren und Kontrollen: PECAM (rot)/Desmin (grün), 20-fache Vergrößerung. Auffällig ist die reduzierte Gefäßdichte in NDRG1-überexprimierenden Zellen.

In diesem Zusammenhang konnte nachgewiesen werden, dass die Gefäßdichte (siehe Abbildung 14) in NDRG1-überexprimierenden Tumoren signifikant reduziert war (NDRG1:  $83,65 \text{ n/ROI} \pm 10,62 \text{ n/ROI}$ ) verglichen mit der Kontrollgruppe (Empty/Kontrollgruppe:

111,5 n/ROI  $\pm$  10,64 n/ROI); \* P = 0,00235. (NDRG1 vs. Empty/Kontrolle). Die Endothelzell-Perizyten-Interaktion war hingegen unbeeinflusst hinsichtlich der NDRG1-Überexpression (NDRG1: 0,879  $\pm$  0,05 und Empty/Kontrolle: 0,824  $\pm$  0,08).

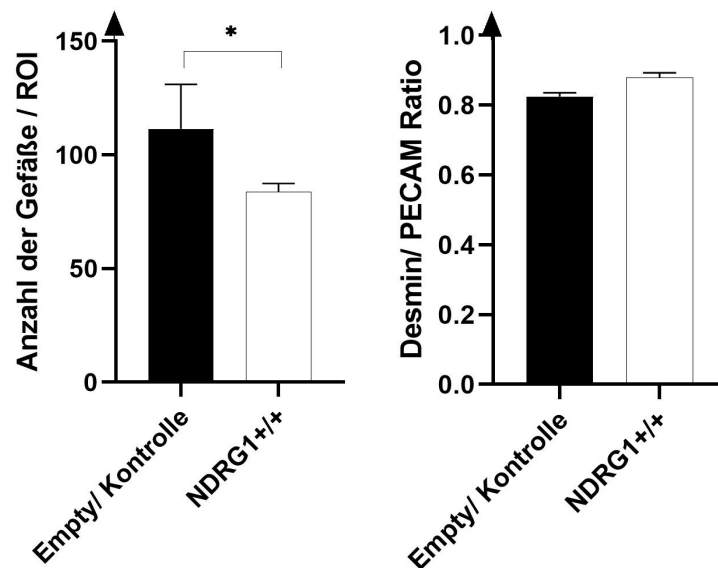


Abbildung 14: Darstellung der Gefäßdichte ("Vessel density"): signifikanter Unterschied in der Gefäßdichte (NDRG1 vs. Empty/Kontrolle), jedoch unveränderte Endothelzell-Perizyten-Interaktion. Balkendiagramme der Mittelwerte mit Standardabweichungen. N = 4 Tiere/Gruppe. \* P = 0,00235.

#### 4.1.3 Bestimmung der Tumorzellproliferation mittels Phospho-Histon H3 und Ki-67

Mithilfe des Proliferationsmarkers Phospho-Histon H3 konnte die Tumorzellproliferation immunhistochemisch analysiert werden (siehe Abbildung 15) und mittels der Ki-67-immunhistochemischen Färbung wurde die Endothelzellenproliferation dargestellt (siehe Abbildung 16).

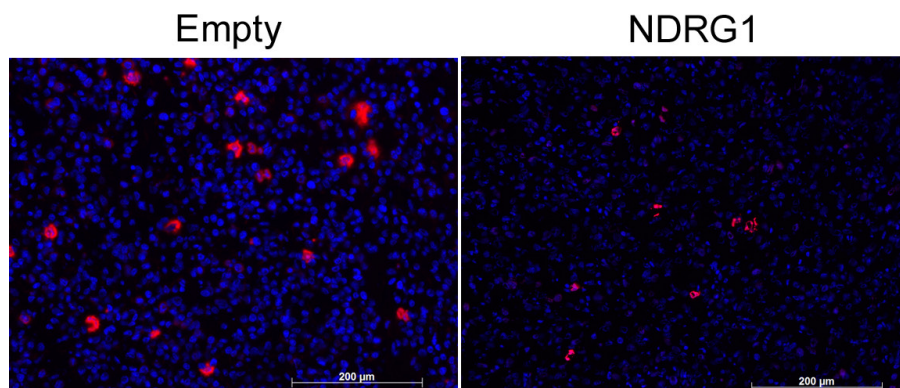


Abbildung 15: Beispielhafte immunfluoreszenzhistochemische Darstellung der Tumorzellproliferation in NDRG1-Gliomzellen und Kontrollzellen: Phospho-Histon H3 (rot) und Zellkernfärbung mittels DAPI (blau). Vergrößerung 20-fach.

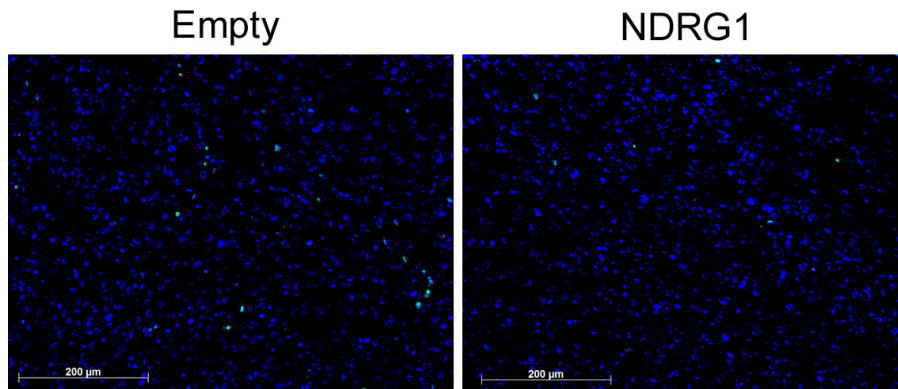


Abbildung 16: Exemplarische immunhistochemische Darstellung der Endothelzellproliferation in U87MG-Gliomzellen mittels Anti-Maus Ki-67 (grün). Visualisierung der Zellkerne mit DAPI (blau). 20-fache Vergrößerung. Maßstab 200µm. Die U87MG NDRG1-überexprimierenden Zellen wiesen auch eine signifikante Reduktion der Proliferation der Endothelzellen auf.

Die Darstellung der Tumorzellproliferation in den beiden Tumorzellgruppen ist in Abbildung 17 dargestellt.

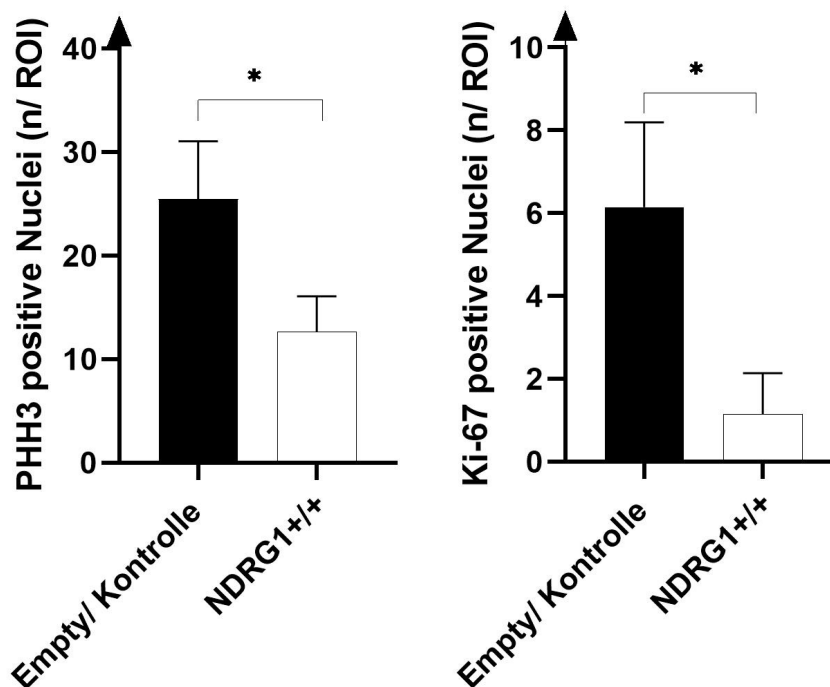


Abbildung 17: Darstellung der Tumorzellproliferation und der Endothelzellproliferation der NDRG1-überexprimierenden Zellen und Zellen mit dem Empty-Vektor: die NDRG1-positive Gruppe weist eine signifikante Reduktion der Tumorzellproliferation im Vergleich zur Referenzgruppe auf. Signifikante Verminderung der Endothelzellproliferation in der NDRG1-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle. N = 4; alle Werte sind als MW ± SD angegeben. Ungepaarter t-Test.

Es konnte eine signifikant verminderte Tumorzellproliferation in den NDRG1-positiven Tumoren (NDRG1:  $12,65 \text{ n/ROI} \pm 4,76 \text{ n/ROI}$ ) dargestellt werden verglichen mit der Empty/Kontrollgruppe (Empty/Kontrolle:  $25,48 \text{ n/ROI} \pm 7,75 \text{ n/ROI}$ ; \*  $P = 0,0078$ ). Die Tumorzellproliferation in der NDRG1-Gruppe ist im Durchschnitt 50 % geringer als in der Kontrollgruppe. Auch bezüglich der Endothelzellproliferation konnte ein signifikanter Unterschied mit \*  $P = 0,0047$  konstatiert werden: NDRG1 wies einen Wert von  $1,15 \text{ n/ROI} \pm 1,40 \text{ n/ROI}$  und Empty/Kontrolle  $6,15 \text{ n/ROI} \pm 3,71 \text{ n/ROI}$ .

## 4.2 Charakterisierung der therapeutischen Effektivität von Sunitinib hinsichtlich NDRG1-überexprimierende Tumorzellen

### 4.2.1 Effekte auf das Tumolvolumen in vivo

Zur Untersuchung inwieweit sich eine antiangiogene Behandlung auf das Wachstumsverhalten der NDRG1-überexprimierenden Tumorzellen auswirkt, wurden die Versuchstiere in der zweiten Versuchsreihe ab dem 21. Tag über sechs Tage mit Sunitinib i.p. behandelt. Die Abbildungen (siehe Abbildung 18) zeigen repräsentativ MRT-Befunde an Tag 28 in den beiden Gruppen (NDRG1-überexprimierende Gliomzellen unter Therapie mit Su und der Empty-Vektor/Kontrolle unter Therapie mit Su). Hyperintense, inhomogene Areale kennzeichnen den deutlich positiven Tumorbefund. Die Versuchstiere wurden mit der gleichen Zellzahl an identischer Stelle implantiert und mit Su (80 mg/kg KG i.p.) behandelt.

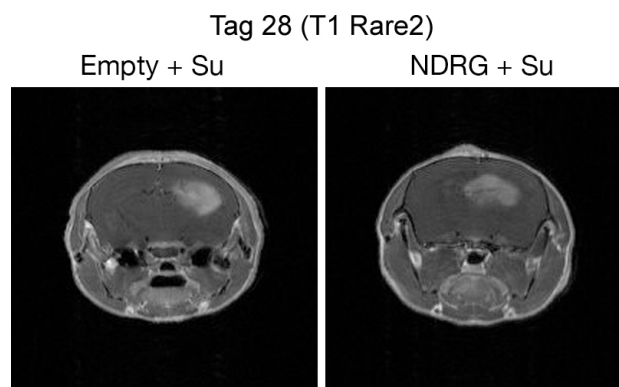


Abbildung 18: MRT-Bilder von NDRG1-überexprimierenden Gliomzellen und der Vergleichsgruppe unter Therapie mit Su.

Bemerkenswert ist, dass sich auch in der Therapiegruppe mit Su zunächst die NDRG1-überexprimierenden Tumore schneller entwickelten und an Tag 14 eine Größe von  $1,03 \text{ mm}^3 \pm 0,80 \text{ mm}^3$  (NDRG1 ohne Therapie:  $2,19 \text{ mm}^3 \pm 3,079 \text{ mm}^3$ ) im Vergleich zu Empty/Kontrolle + Su:  $0,23 \text{ mm}^3 \pm 0,30 \text{ mm}^3$  (Empty-Kontrollgruppe ohne Therapie:  $0,74 \text{ mm}^3 \pm 0,62 \text{ mm}^3$ ) aufwiesen (siehe Abbildung 19). Daraus lässt sich ableiten, dass NDRG1 +



Su ein um 52,97 % reduziertes Tumorwachstum im Vergleich zur NDRG1-Gruppe ohne Therapie aufweist und Empty + Su ein um 68,92 % reduziertes Tumolvolumen.

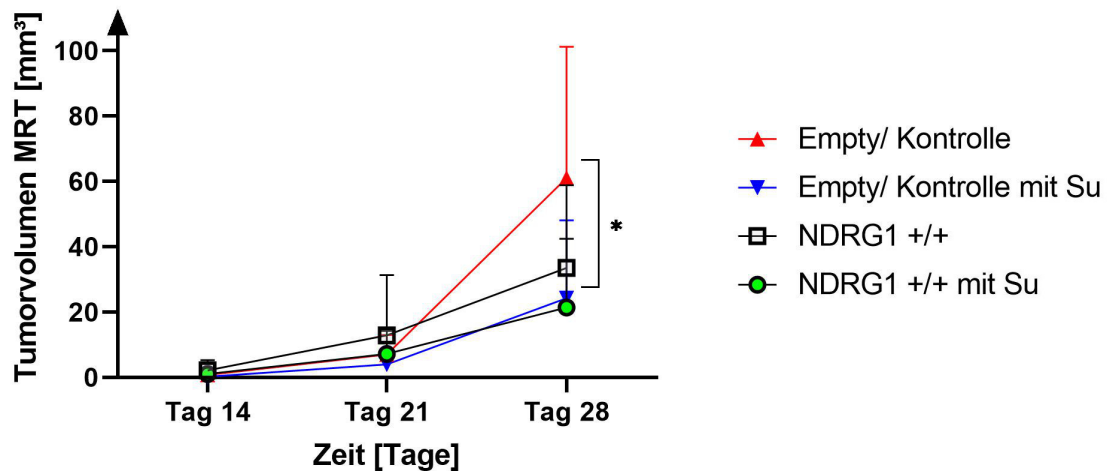


Abbildung 19: Wachstumsverhalten der U87MG-Tumorzellen in vivo unter Therapie mit Sunitinib: NDRG1 und Empty/Kontrolle N = 8; NDRG1 + Su: N = 4; Empty/Kontrolle + Su: N = 6. Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SD angegeben. Two-way ANOVA mit Bonferronis multiple comparison post-hoc Test.

An Tag 21 zeigte sich, dass das Tumolvolumen in der Gruppe von NDRG1 + Su:  $7,23 \text{ mm}^3 \pm 7,00 \text{ mm}^3$  deutlicher zugenommen hat (vgl. NDRG1 ohne Therapie:  $12,92 \text{ mm}^3 \pm 18,39 \text{ mm}^3$ ) als in der Vergleichsgruppe Empty/Kontrolle + Su:  $3,98 \text{ mm}^3 \pm 3,50 \text{ mm}^3$  (vgl. Empty/Kontrolle ohne Therapie:  $7,01 \text{ mm}^3 \pm 5,97 \text{ mm}^3$ ). Hieraus ergibt sich ein um 44,04 % vermindertes Tumolvolumen in der NDRG1 + Su-Therapiegruppe im Vergleich zur NDRG1 ohne Therapie und eine um 43,22 % reduzierte Tumorgröße in der Empty-Gruppe + Su.

Am Tag 28 post OP veränderte sich das Verhältnis deutlich. Hier konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen Empty/Kontrolle ohne Therapie ( $61,02 \text{ mm}^3 \pm 40,13 \text{ mm}^3$ ) und Empty/Kontrolle + Su ( $24,29 \text{ mm}^3 \pm 23,80 \text{ mm}^3$ ) aufgezeigt werden;  $*P = 0,0331$ . So zeigte das Tumolvolumen der Gruppe von Empty/Kontrolle + Su ein um 60,19 % reduziertes Tumorwachstum verglichen mit der Empty/Kontrollgruppe ohne Therapie. Die NDRG1 + Su Gruppe ( $21,36 \text{ mm}^3 \pm 21,00 \text{ mm}^3$ ) zeigte ein um 36,28 % reduziertes Tumolvolumen im Vergleich zur nicht therapierten Kohorte ( $33,52 \text{ mm}^3 \pm 25,26 \text{ mm}^3$ ). Zwischen den anderen Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Tag 14/21: NDRG1 vs. NDRG1 mit Su  $\rightarrow P > 0,999$ ).

#### 4.2.2 Charakterisierung der Gefäßdichte und der PECAM/Desmin-Ratio

Anhand der Doppelimmunfluoreszenzfärbung PECAM/Desmin wurde auch in dieser Studiengruppe die Gefäß-Perizyten-Assoziation analysiert (siehe Abbildung 20).

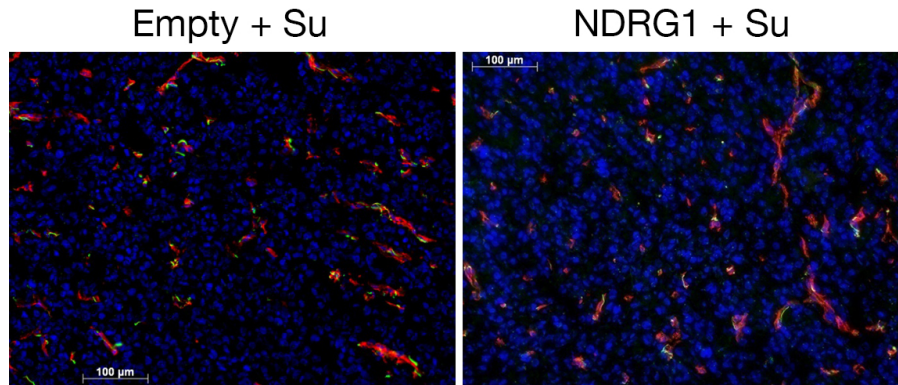


Abbildung 20: Repräsentative fluoreszenzimmunhistochemische Darstellung der Gefäß-Perizyten-Assoziation in NDRG1-überexprimierenden U87MG Tumoren und Kontrollen nach Therapie mit Sunitinib: PECAM (rot)/Desmin (grün), 20-fache Vergrößerung. Auffällig ist die signifikant reduzierte Gefäßdichte in der Kontrollgruppe (Empty/Kontrolle vs. Empty/Kontrolle mit Su).

Wie in der folgenden Abbildungen dargestellt (siehe Abbildung 21), konnte ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Gefäßdichte in den Gruppen Empty/Kontrolle vs. Empty/Kontrolle mit Su ( $111,5 \text{ n/ROI} \pm 10,64 \text{ n/ROI}$  vs.  $69,05 \text{ n/ROI} \pm 6,36 \text{ n/ROI}$ , \*  $P = 0,0012$ ) beobachtet werden und darüber hinaus auch in der Gruppe Empty/Kontrolle vs. NDRG1 (\*  $P = 0,00198$ ).

In der Behandlungsgruppe NDRG1 vs. NDRG1 mit Su ( $83,66 \text{ n/ROI} \pm 10,62 \text{ n/ROI}$  vs.  $72,9 \text{ n/ROI} \pm 11,43 \text{ n/ROI}$ ) konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. So lässt sich schlussfolgern, dass die Gruppe von NDRG1 + Su eine um 12,86 % geringere Gefäßdichte als die Vergleichsgruppe ohne Therapie aufweist. Darüber hinaus zeigt sich eine deutlich größere Reduktion der Gefäßdichte um 38,07 % in der Gruppe Empty/Kontrolle + Su im Vergleich zur Empty/Kontrolle ohne Therapie.

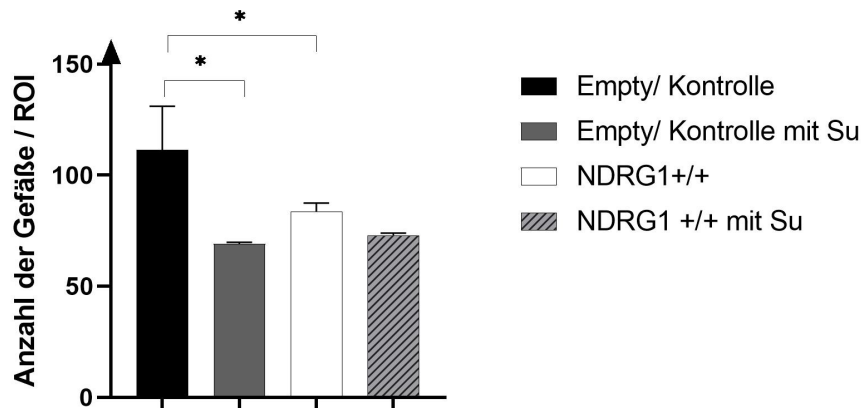


Abbildung 21: Darstellung der Gefäßdichte (“Vessel density”) der U87MG Gliomzellen nach Behandlung mit Sunitinib: Darstellung mittels Balkendiagrammen. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen; multiple Varianzanalyse two-way ANOVA mit Bonferronis post-hoc test. N = 4 Tiere/Gruppe.

Hinsichtlich der Endothelzell-Perizyten-Interaktion konnten auch signifikante Differenzen in den einzelnen Gruppen festgestellt werden (siehe Abbildung 22): NDRG1 vs. NDRG1 + Su (NDRG1:  $0,879 \pm 0,05$ ; NDRG1 + Su:  $0,689 \pm 0,103$ ; \*  $P < 0,001$ ) und Empty/Kontrolle vs. Empty/Kontrolle + Su (Empty/Kontrolle:  $0,825 \pm 0,08$ ; Empty/Kontrolle + Su:  $0,663 \pm 0,105$ ; \*  $P < 0,001$ ). Auch hier lässt sich eine um 21,62 % geringere Endothelzell-Perizyten-Interaktion in der NDRG1 + Su-Gruppe (im Vergleich mit NDRG1 ohne Therapie) nachweisen und eine um 19,64 % reduzierte Interaktion zwischen Empty/Kontrolle + Su und Empty/Kontrolle ohne Therapie.

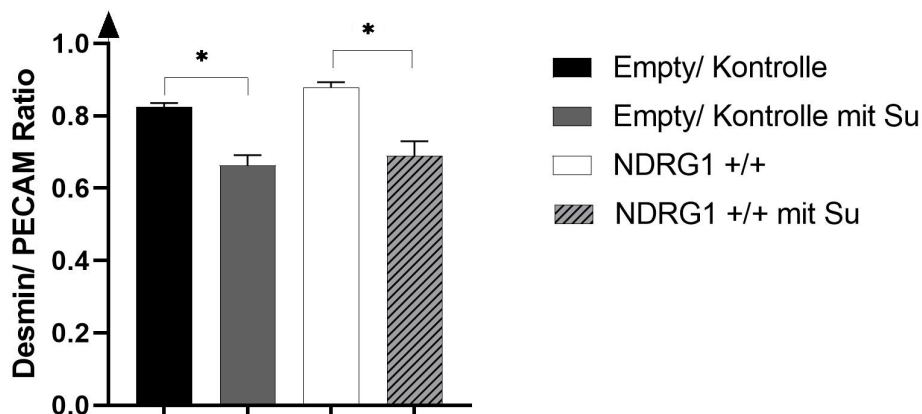


Abbildung 22: Desmin/PECAM (CD31+)-Ratio: Balkendiagramme zur Veranschaulichung der signifikanten Unterschiede in den Gruppen. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen; multiple Varianzanalyse two-way ANOVA mit Bonferronis post-hoc test. N = 4 Tiere/Gruppe.

### 4.2.3 Bestimmung der Tumorzellproliferation mittels Phospho-Histon H3 und Endothelzellproliferation mittels Ki-67

Auch in der Therapiegruppe wurde mithilfe des Proliferationsmarkers Phospho-Histon H3 die Tumorzellproliferation immunhistochemisch analysiert (siehe Abbildung 23).

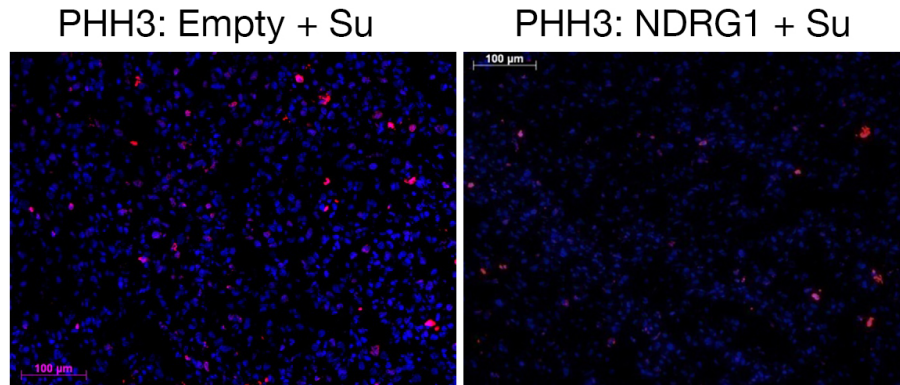


Abbildung 23: Beispielhafte immunfluoreszenzhistochemische Darstellung der Tumorzellproliferation: Proliferationsmarker Phospho-Histon H3 (rot) und Zellkernfärbung mittels DAPI (blau). Vergrößerung 20-fach.

Die Auswertung zeigt, dass die Tumorzellproliferation in der NDRG1-überexprimierenden Versuchsgruppe bei  $12,65 \text{ n/ROI} \pm 4,76 \text{ n/ROI}$  und in der Therapiegruppe (NDRG1 mit Su) bei  $11,48 \text{ n/ROI} \pm 4,79 \text{ n/ROI}$  liegt (siehe Abbildung 24). Die Differenz ist statistisch nicht signifikant. Hingegen ist der Unterschied zwischen den Gruppen NDRG1 ( $12,65 \text{ n/ROI} \pm 4,76 \text{ n/ROI}$ ) vs. Empty/Kontrolle ( $25,48 \text{ n/ROI} \pm 7,75 \text{ n/ROI}$ ) und NDRG1 mit Su ( $11,48 \text{ n/ROI} \pm 4,79 \text{ n/ROI}$ ) vs. Empty/Kontrolle statistisch signifikant (\* $P = 0,0276$  und  $0,0165$ ). Es zeigt sich eine Reduktion der Tumorzellproliferation um 41,05% in der Empty + Su-Gruppe im Vergleich zur Empty/Kontrollgruppe.

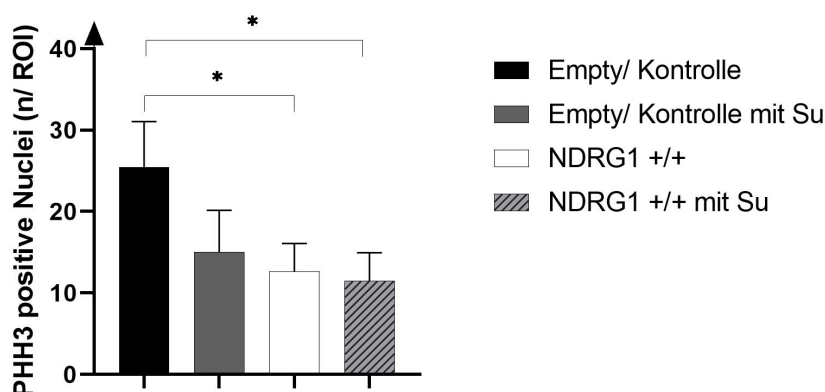


Abbildung 24: Darstellung der Tumorzellproliferation in NDRG1-überexprimierenden Zellen und dem Empty-Vektor: gemessen in Phospho-Histon-H3-positiven Zellen pro Beobachtungsfeld von  $0,04 \text{ mm}^2$ .  $N = 4$  Tiere/Gruppe; alle Werte sind als  $\text{MW} \pm \text{SD}$  angegeben. Multiple Varianzanalyse two-way ANOVA mit Bonferronis post-hoc test.

Auch im Hinblick auf die Endothelzellproliferation erfolgte die immunhistochemische Analyse mittels Anti-Maus Ki-67 (siehe Abbildung 25).

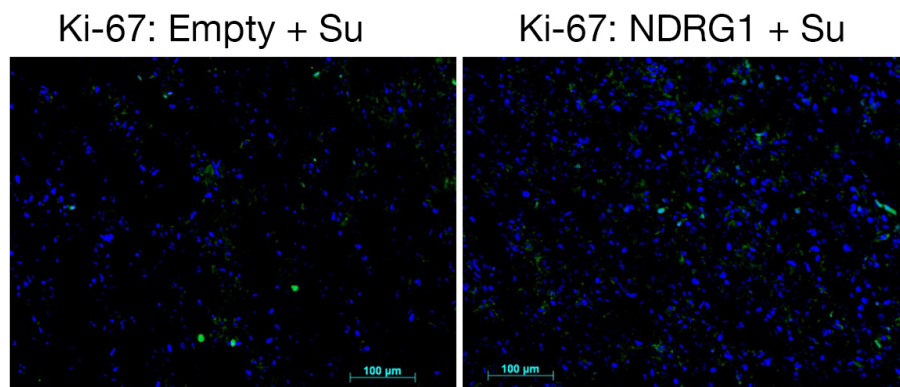


Abbildung 25: Exemplarische immunhistochemische Darstellung der Endothelzellproliferation: Anti-Maus Ki-67 (grün). Visualisierung der Zellkerne mit DAPI (blau). 20-fache Vergrößerung. Maßstab 100 µm.

Es konnte ein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Endothelzellproliferation aufgezeigt werden (siehe Abbildung 26): Als signifikant stellt sich die Differenz in den Gruppen Empty/Kontrolle (6,15 n/ROI  $\pm$  3,71 n/ROI) vs. NDRG1 (1,15 n/ROI  $\pm$  1,40 n/ROI) mit \*P = 0,016 und Empty vs. NDRG1 + Su (2,35 n/ROI  $\pm$  1,15 n/ROI) mit \*P = 0,0107 sowie Empty/Kontrolle + Su (5,13 n/ROI  $\pm$  2,15 n/ROI) vs. NDRG1 mit \*P = 0,0078 dar. Im Gegensatz dazu konnte in der Gruppe von NDRG1 (1,15 n/ROI  $\pm$  1,40 n/ROI) vs. NDRG1 + Su (2,35 n/ROI  $\pm$  1,15 n/ROI) kein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt werden, auch wenn NDRG1 + Su eine stärkere Endothelzellproliferation als die Vergleichsgruppe (NDRG1 ohne Therapie) aufwies bei einer insgesamt sehr niedrigen Anzahl an Ki-67 positiven Zellen im Tumorareal.

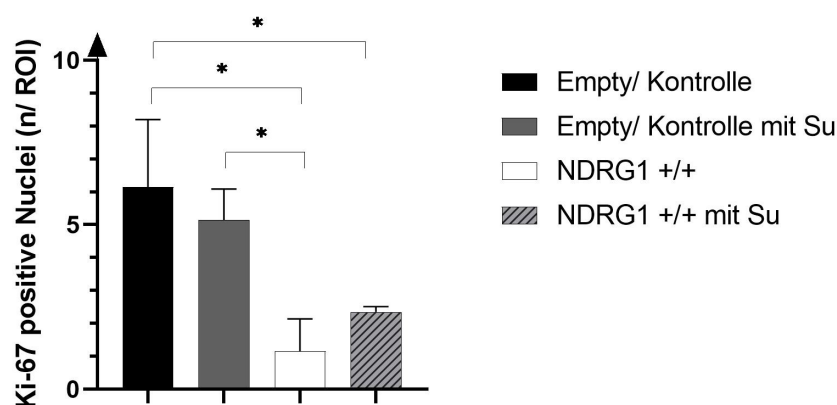


Abbildung 26: Darstellung der Endothelzellproliferation der NDRG1-überexprimierenden Zellen und Zellen mit dem Empty-Vektor nach Therapie mit Sunitinib: signifikante Unterschiede der Endothelzellproliferation. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SD. Multiple Varianzanalyse mit two-way ANOVA mit Bonferronis multiple post-hoc test. N = 4 Tiere/Gruppe.

### 4.3 Darstellung der therapeutischen Effektivität von Temozolomid auf NDRG1-überexprimierende Tumorzellen

#### 4.3.1 Effekte auf das Tumolvolumen in vivo nach Therapie mit TMZ

Zur Untersuchung inwieweit sich eine antitumorale Behandlung auf das Wachstumsverhalten der NDRG1-überexprimierenden Tumorzellen auswirkt, wurden die Versuchstiere in einer weiteren Versuchsreihe ab dem 21. Tag über sechs Tage mit Temozolomid i.p. behandelt. Auch hier wurde das Tumorstadium von NDRG1-überexprimierenden U87MG Zellen und der Empty/Kontrollgruppe in vivo über einen Zeitraum von 28 Tagen beobachtet. Die dargestellten MRT-Scans (siehe Abbildung 27) zeigen repräsentativ MRT-Befunde am Tag 28 in den beiden Gruppen (NDRG1-überexprimierende Gliomzellen nach Therapie mit TMZ und der Empty-Vektor/Kontrolle nach Therapie mit TMZ). Hyperintense, inhomogene Areale kennzeichnen den deutlich positiven Tumorbefund. Die Versuchstiere wurden mit der gleichen Zellzahl an identischer Stelle implantiert und mit TMZ behandelt.

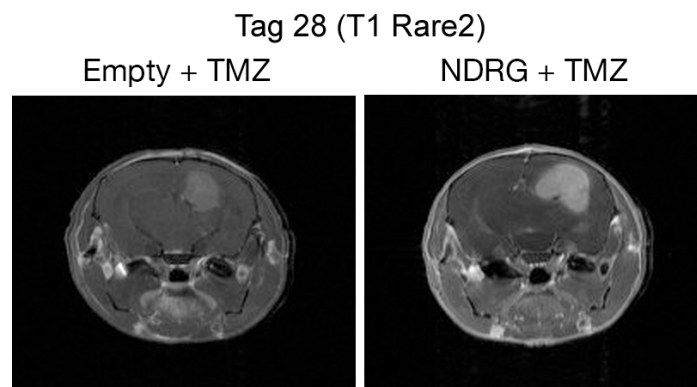


Abbildung 27: Exemplarische MRT-Bilder von NDRG1-überexprimierenden Gliomzellen und der Vergleichsgruppe nach Therapie mit TMZ

Bei der Analyse der Daten ist auffallend, dass sich auch in der Therapiegruppe mit TMZ zunächst die NDRG1-überexprimierenden Tumore schneller entwickelten und an Tag 14 eine Größe von  $2,37 \text{ mm}^3 \pm 2,3 \text{ mm}^3$  (NDRG1 ohne Therapie:  $2,19 \text{ mm}^3 \pm 3,079 \text{ mm}^3$ ) im Vergleich zu Empty/Kontrolle + TMZ:  $1,06 \text{ mm}^3 \pm 0,70 \text{ mm}^3$  (Empty-Kontrollgruppe ohne Therapie:  $0,74 \text{ mm}^3 \pm 0,62 \text{ mm}^3$ ) aufwiesen (siehe Abbildung 28). Daraus lässt sich ableiten, dass die untherapierte Gruppe von NDRG1 ein um 7,59 % reduziertes Tumorstadium im Vergleich zur NDRG1-Gruppe unter Therapie mit TMZ aufweist und Empty ohne Therapie ein um 30,19 % reduziertes Tumorstadium im Vergleich zu Empty + TMZ.



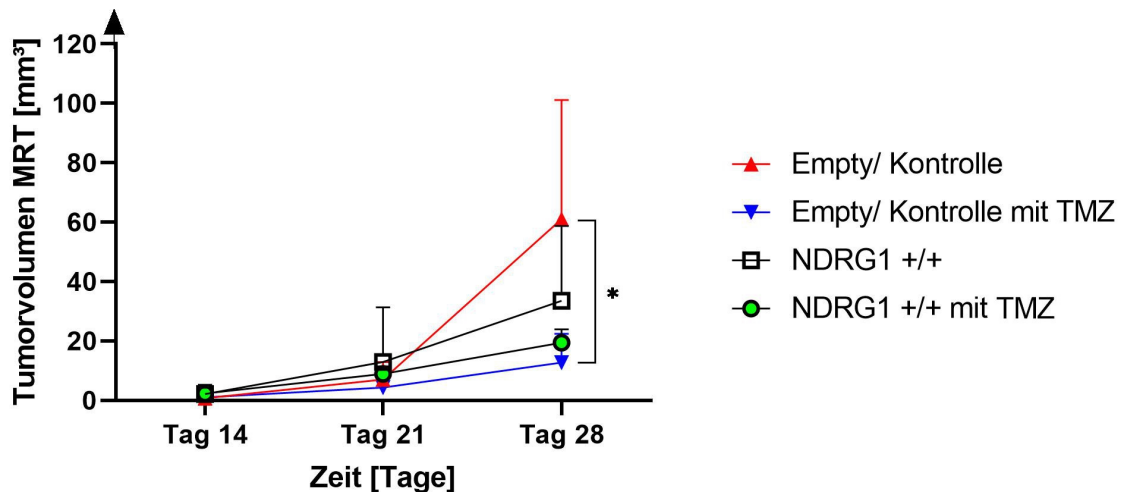


Abbildung 28: Im MRT gemessene Tumordimensionen der stereotaktisch intrakraniell implantierten U87MG NDRG1-überexprimierenden Gliomzellen und des Empty-Vektors unter Therapie mit TMZ (Behandlung der Tiere für 6 Tage i.p. ab Tag 21) zu den Untersuchungszeitpunkten an Tag 14, 21 und 28. NDRG1 und Empty/Kontrolle N = 8; NDRG1 mit TMZ und Empty/Kontrolle mit TMZ: N = 4. Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SD angegeben. Zur Analyse von Unterschieden wurde die two-way ANOVA Varianzanalyse mit Bonferronis multiple comparison post-hoc Test durchgeführt.

An Tag 21 zeigte sich, dass das Tumordimensionen in der Gruppe von NDRG1 + TMZ:  $8,95 \text{ mm}^3 \pm 2,50 \text{ mm}^3$  deutlicher zugenommen hat (vgl. NDRG1 ohne Therapie:  $12,92 \text{ mm}^3 \pm 18,39 \text{ mm}^3$ ) als in der Vergleichsgruppe Empty/Kontrolle + TMZ:  $4,36 \text{ mm}^3 \pm 2,90 \text{ mm}^3$  (vgl. Empty/Kontrolle ohne Therapie:  $7,01 \text{ mm}^3 \pm 5,97 \text{ mm}^3$ ). Hieraus ergibt sich ein um 30,73 % vermindertes Tumordimensionen in der NDRG1 + TMZ-Therapiegruppe im Vergleich zur NDRG1 ohne Therapie und eine um 37,8 % reduzierte Tumordimensionen in der Empty-Gruppe + TMZ.

Am Tag 28 post OP veränderte sich das Verhältnis deutlich. Hier konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen Empty/Kontrolle ohne Therapie ( $61,02 \text{ mm}^3 \pm 40,13 \text{ mm}^3$ ) und Empty/Kontrolle + TMZ ( $12,72 \text{ mm}^3 \pm 9,70 \text{ mm}^3$ ) aufgezeigt werden; \* P = 0,0025. So zeigte das Tumordimensionen der Gruppe von Empty/Kontrolle + TMZ ein um 79,15 % reduziertes Tumordimensionen verglichen mit der Empty/Kontrollgruppe ohne Therapie. Die NDRG1 + TMZ Gruppe ( $19,41 \text{ mm}^3 \pm 4,50 \text{ mm}^3$ ) zeigte ein um 42,09 % reduziertes Tumordimensionen im Vergleich zur nicht therapierten Kohorte ( $33,52 \text{ mm}^3 \pm 25,26 \text{ mm}^3$ ). Zudem sind die Differenzen in der Gruppe Empty/Kontrolle (Tag 14) vs. Empty/Kontrolle (Tag 28) mit \* P < 0,0001 sowie der Gruppe Empty/Kontrolle (Tag 21) vs. Empty/Kontrolle (Tag 28) mit \* P < 0,0001 statistisch hochsignifikant.

### 4.3.2 Charakterisierung der Gefäßdichte und der PECAM/Desmin-Ratio

Anhand der Doppelimmunfluoreszenzfärbung PECAM/Desmin wurde auch in dieser Studiengruppe die Gefäß-Perizyten-Assoziation analysiert (siehe Abbildung 29).

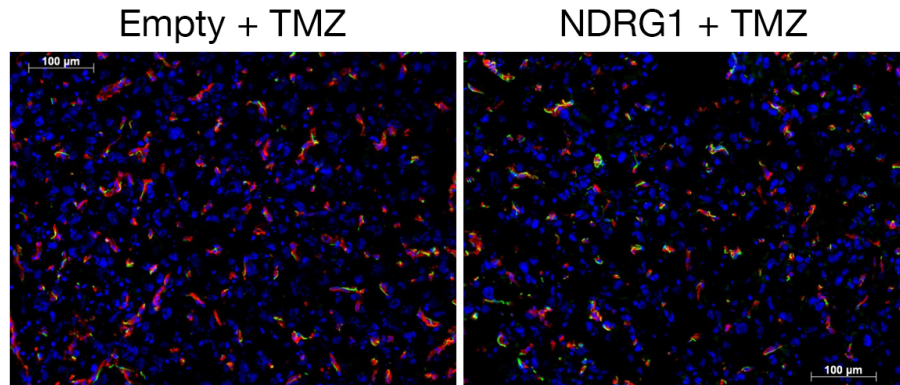


Abbildung 29: Repräsentative fluoreszenzimmunhistochemische Darstellung der Gefäß-Perizyten-Assoziation in intrakraniellen U87MG Gliomxenografts nach Therapie mit TMZ: PECAM (rot) und Desmin (grün); 20-fache Vergrößerung. Visualisierung der Zellkerne mit DAPI (blau). Maßstab 100µm.

Die Analyse der Gefäßdichte ist in der folgenden Abbildung graphisch dargestellt (siehe Abbildung 30). Wie bereits bekannt, lässt sich ein signifikanter Unterschied in der Gruppe Empty/Kontrolle ( $111,5 \text{ n/ROI} \pm 10,64 \text{ n/ROI}$ ) vs. NDRG1 ( $83,66 \text{ n/ROI} \pm 10,62 \text{ n/ROI}$ ) mit  $*P = 0,0197$  dargestellt. Ebenso liegt ein statistisch signifikanter Unterschied in der Gruppe Empty vs. NDRG1 mit TMZ ( $77,2 \text{ n/ROI} \pm 18,04 \text{ n/ROI}$ ) vor ( $* P < 0,0052$ ).

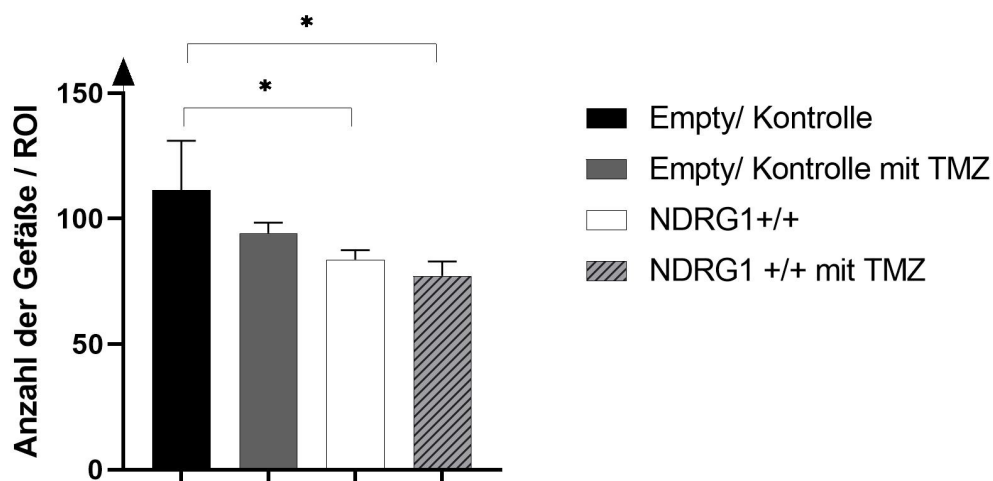


Abbildung 30: Darstellung der Gefäßdichte ("Vessel density") der U87MG Gliomzellen nach Behandlung mit Temozolomid: Darstellung mittels Balkendiagrammen. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen; multiple Varianzanalyse two-way ANOVA mit Bonferronis post-hoc test. N = 4 Tiere/Gruppe.



Kein Unterschied ist hingegen in den unmittelbar vergleichbaren Gruppe von Empty/Kontrolle vs. Empty/Kontrolle mit TMZ ( $94,2 \text{ n/ROI} \pm 20,34 \text{ n/ROI}$ ) sowie NDRG1 vs. NDRG1 mit TMZ zu erkennen. So lässt sich ableiten, dass die Gruppe von NDRG1 ohne Therapie nur eine um 7,8 % geringere Gefäßdichte aufweist als die Vergleichsgruppe mit Therapie. Darüber hinaus zeigt sich eine Reduktion der Gefäßdichte um 15,5 % in der Gruppe Empty/Kontrolle ohne Therapie im Vergleich zur Empty/Kontrolle mit TMZ.

Hinsichtlich der Endothelzell-Perizyten-Interaktion konnten keine signifikanten Differenzen in den einzelnen Gruppen festgestellt werden (siehe Abbildung 31): NDRG1 ( $0,879 \pm 0,05$ ) vs. NDRG1 mit TMZ ( $0,86 \pm 0,12$ ) und Empty/Kontrolle ( $0,825 \pm 0,08$ ) vs. Empty/Kontrolle mit TMZ ( $0,79 \pm 0,099$ ). Hier lässt sich eine um 2,16 % geringere Endothelzell-Perizyten-Interaktion in der NDRG1 + TMZ-Gruppe (im Vergleich zu NDRG1 ohne Therapie) nachweisen und eine nur um 4,24 % reduzierte Interaktion zwischen Empty/Kontrolle + TMZ und Empty/Kontrolle ohne Therapie.

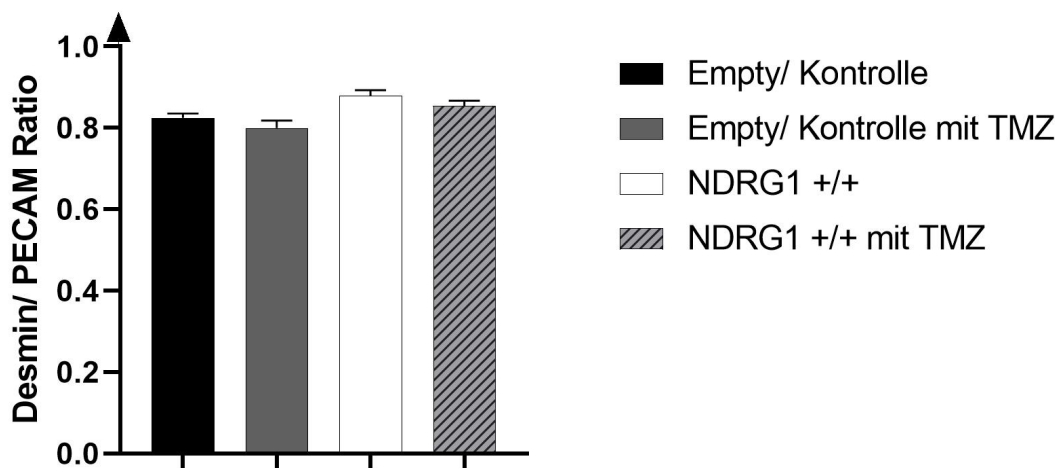


Abbildung 31: Desmin/PECAM (CD31+)-Ratio nach Therapie mit TMZ: Balkendiagramme zur Veranschaulichung der Unterschiede. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen; multiple Varianzanalyse two-way ANOVA mit Bonferronis post-hoc test. N = 4 Tiere/Gruppe.

#### 4.3.3 Bestimmung der Tumorzellproliferation mittels Phospho-Histon H3 und Ki-67

Auch in der Therapiegruppe mit TMZ wurde mithilfe des Proliferationsmarkers Phospho-Histon H3 die Tumorzellproliferation immunhistochemisch analysiert (siehe Abbildung 32). Die Analyse der Daten ist in Abbildung 33 dargestellt.

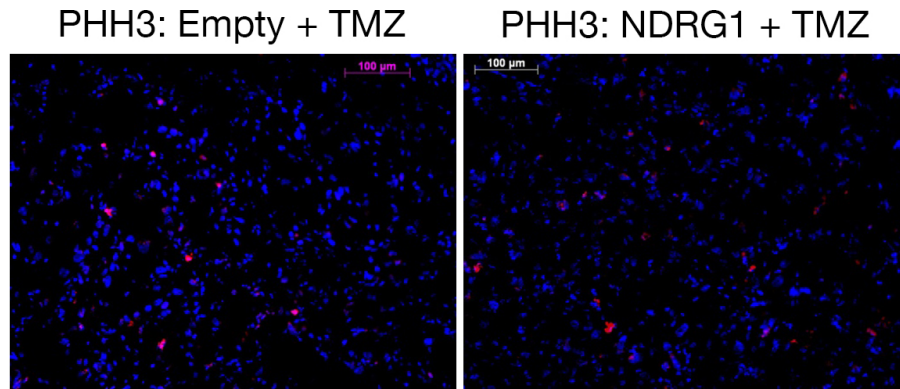


Abbildung 32: Beispielhafte immunfluoreszenzhistochemische Darstellung der Tumorzellproliferation in NDRG1-Gliomzellen und Kontrollzellen: Phospho-Histon H3 (rot) und Zellkernfärbung mittels DAPI (blau). Vergrößerung 20-fach.

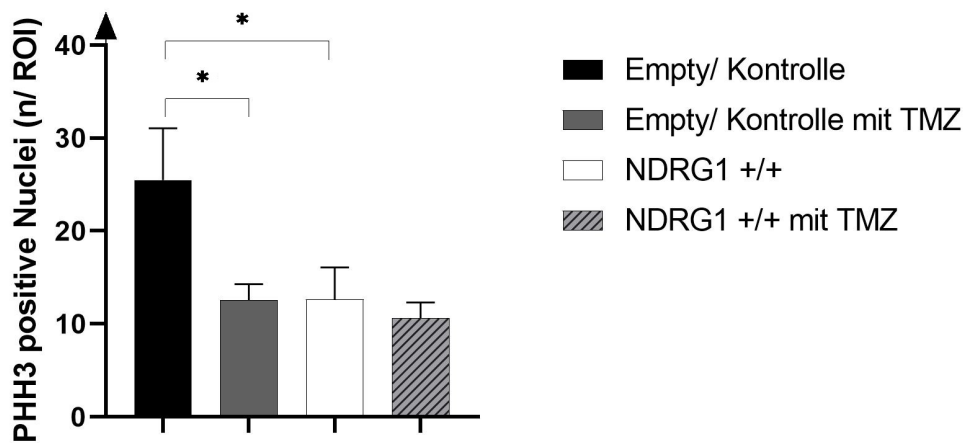


Abbildung 33: Darstellung der Tumorzellproliferation in NDRG1-überexprimierenden Zellen und dem Empty-Vektor nach Therapie mit TMZ: N = 4 Tiere/Gruppe; alle Werte sind als MW ± SD angegeben. Multiple Varianzanalyse two-way ANOVA mit Bonferronis post-hoc test.

Die Tumorzellproliferation liegt in der NDRG1-überexprimierenden Versuchsgruppe bei 12,65 n/ROI ± 4,76 n/ROI und in der Therapiegruppe (NDRG1 mit TMZ) bei 10,62 n/ROI ± 3,58 n/ROI. Die Differenz ist statistisch nicht signifikant ( $P = 0,2471$ ). Hingegen ist der Unterschied zwischen den Gruppen NDRG1 (12,65 n/ROI ± 4,76 n/ROI) vs. Empty/Kontrolle (25,48 n/ROI ± 7,75 n/ROI) und Empty/Kontrolle (25,48 n/ROI ± 7,75 n/ROI) vs. Empty/Kontrolle mit TMZ (14,92 n/ROI ± 7,14 n/ROI) statistisch signifikant (\*  $P = 0,0027$  und  $0,0014$ ). Es zeigt sich eine prozentuale Reduktion der Tumorzellproliferation um 16,05 % in der NDRG1 + TMZ-Gruppe im Vergleich zur Gruppe NDRG1 ohne Therapie. Eine deutlich höhere Verminderung der Tumorzellproliferation um 41,44 % konnte in der Empty + TMZ Gruppe beobachtet werden (im Vergleich zur Empty/Kontrollgruppe).

Auch im Hinblick auf die Endothelzellproliferation erfolgte eine immunhistochemische Analyse mittels Anti-Maus Ki-67 (siehe Abbildung 34).

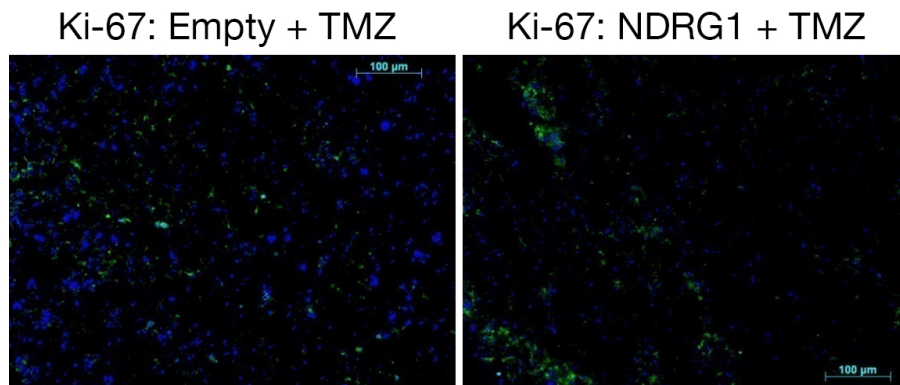


Abbildung 34: Exemplarische immunhistochemische Darstellung der Endothelzellproliferation in U87MG-Gliomzellen: Anti-Maus Ki-67 (grün). Visualisierung der Zellkerne mit DAPI (blau). 20-fache Vergrößerung. Maßstab 100µm.

Nach Analyse der Daten konnten signifikante Unterschiede hinsichtlich der Endothelzellproliferation dargestellt werden (siehe Abbildung 35): Zwischen der Gruppe NDRG1 (1,15 n/ROI  $\pm$  1,40 n/ROI) vs. NDRG1 mit TMZ (2,25 n/ROI  $\pm$  1,32 n/ROI) besteht kein statistisch signifikanter Unterschied. Als signifikant stellt sich die Differenz in den Gruppen Empty/Kontrolle (6,15 n/ROI  $\pm$  3,71 n/ROI) vs. NDRG1 (1,15 n/ROI  $\pm$  1,40 n/ROI) bzw. NDRG1 mit TMZ (2,25 n/ROI  $\pm$  1,32 n/ROI) mit \*  $P = 0,0027$  und Empty/Kontrolle (6,15 n/ROI  $\pm$  3,71 n/ROI) vs. Empty/Kontrolle mit TMZ (3,5 n/ROI  $\pm$  1,95 n/ROI) dar (\*  $P = 0,0314$ ). Hier lässt sich ableiten, dass die Gruppe Empty/Kontrolle unter Therapie mit TMZ eine um 43 % reduzierte Endothelzellproliferation zeigt. Im Gegensatz dazu hat die Therapie mit TMZ in der NDRG1-Gruppe keinen inhibierenden Effekt.

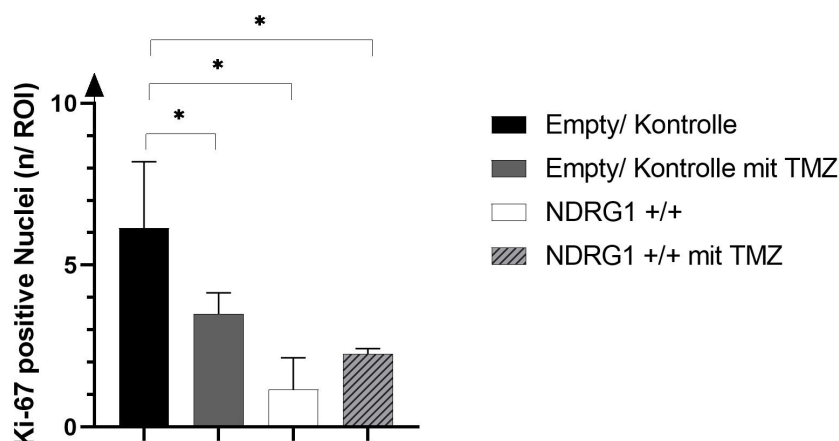


Abbildung 35: Darstellung der Endothelzellproliferation der NDRG1-überexprimierenden Zellen und Zellen mit dem Empty-Vektor nach Therapie mit TMZ: signifikanter Unterschied der Endothelzellproliferation. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SD. Multiple Varianzanalyse mit two-way ANOVA mit Bonferronis multiple post-hoc test.  $N = 4$  Tiere/Gruppe.

## 5 Diskussion

### 5.1 Diskussion der Methodik

#### 5.1.1 Das Glioblastom Modell

Wie bereits in Kapitel drei ausführlich erläutert, wurden zur Untersuchung der Rolle von NDRG1 die etablierten U87 Gliomzellen stereotaktisch orthotop intrazerebral NuNu-Mäusen implantiert. Die NuNu-Versuchsmäuse sind seit Jahrzehnten ein wissenschaftlich etabliertes Modell und wurden bereits aufgrund der bestehenden Thymusaplasie von Pantelouris 1970 erstmals beschrieben und mit fötalen und neugeborenen Mäusen verglichen [110]. Aufgrund der fehlenden Immunkompetenz sind Nacktmäuse speziell für orthotop injizierte humane Zellen etabliert [111].

Erste Berichte über Xenograft-Modelle wurden von Tan et al. 1977 veröffentlicht. Hierbei wurde nachgewiesen, dass die orthotope Implantation von Kolonadenokarzinomen in den Dickdarm zu einer deutlichen Zunahme von hepatischen Metastasen führte im Vergleich zur ektopen Injektion (subkutane Injektion) [112]. Diese und andere Studien konnten belegen, dass orthotope Xenograft-Modelle das klinisch relevantere Tumormodell in Hinsicht auf das ursprüngliche reale anatomische Mikromilieu darstellen [111]. Einige Studien haben im Tumorwachstum Unterschiede festgestellt. Zudem ist die organspezifische Umgebung auch gerade bei der Untersuchung von (Auswirkungen von) Chemotherapeutika und/oder Bestrahlung von großer Bedeutung. Weitere Vorteile im Vergleich zur subkutanen Injektion ist die Entstehung von spontanen Tumormetastasen bei der orthotopen intrakraniellen Implantation [113] und die Möglichkeit Prozesse, die zur lokalen Tumordinvasion führen (z. B. Inhibierung von Proteasen oder Störung der Angiogenese), klinisch untersuchen zu können [114]. Gerade zur Vorhersage klinischen Ansprechens einer Wirkstoffaktivität unterscheiden sich die subkutane von den orthotopen präklinischen Modellen [114]. Jedoch haben die orthotopen Xenograft-Modelle auch eine Reihe von Nachteilen: so sind diese technisch anspruchsvoller und benötigen mehr Zeit zur Etablierung. Darüber hinaus stellt die chirurgische Intervention eine höhere Belastung für das Versuchstier dar mit möglichen Risiken wie schweren Schädigungen oder Tod. Zudem ist eine postoperative Erholungsphase der Versuchstiere notwendig. Methoden zur Bestimmung des Tumorumfanges sind meist aufwendig wie beispielsweise das Kleintier-MRT oder die Positronen-Emissions-Tomographie, was auch dazu beiträgt, dass sie insgesamt neben den erforderlichen aufwendigen operativen Maßnahmen sehr zeit- und kostenintensiv sind [114, 115].

### 5.1.2 Die orthotope stereotaktische Implantation

Bei allen operierten NuNu-Mäusen wurde eine orthotope Implantation durchgeführt. Wie in der einschlägigen Literatur dargestellt, so wurde auch in dieser Studie die kraniale, rechte Hemisphäre (das Putamen) für die Implantation ausgewählt [116, 117, 118]. Die Lokalisation ist besonders geeignet, da erst mit fortgeschrittener Volumenbildung mit neurologischen Ausfällen zu rechnen ist. Um eine reproduzierbare Implantation zu gewährleisten wurde mit einem Stereotaxie-Rahmen für Mäuse gearbeitet – das Prozedere ist in etlichen Publikationen beschrieben und gilt ebenfalls als etabliert [116, 117]. Beim operativen Vorgehen ist besonders darauf zu achten, dass das Tier im stereotaktischen Rahmen gerade gelagert wird und so die senkrechte Achse des Einstichkanals gewährleistet wird. Eine weitere Fehlerquelle stellt das Injektionsvolumen sowie die Injektionsrate dar. Hierbei wurde ein Injektionsvolumen von 100.000 Zellen pro 2  $\mu$ l mit einer Injektionsrate von 0,25  $\mu$ l/min implantiert und die Nadel nach fünf minütigem Abwarten über einen Zeitraum von fünf Minuten wieder repositioniert. Dieses Vorgehen lässt sich auch in anderen Veröffentlichungen als Standard finden [111].

Gerade diese Parameter sind wichtig, da es bei zu schneller Applikation und bei zu schneller Repositionierung der Kanüle leicht zu einem Reflux der Zellen entlang des Injektionskanals kommen kann und konsekutiv zu einem atypischen Tumorverteilungsmuster. Bei einem zu hohen Injektionsvolumen ist eine laterale Verteilung von Tumorzellen in das Ventrikelsystem denkbar [118]. Vor jeder Implantation fand eine Resuspension der Zelllösung statt und auch durch die singuläre Aufnahme in die Hamilton Spritze und Injektion unter Sicht kann davon ausgegangen werden, dass die Zellsuspension stabil war.

### 5.1.3 Kardiale Perfusion / Fixation des Gewebes

Mit Hilfe der kardialen Perfusion können größere Präparate (> 1 cm Durchmesser) effektiv mit PFA fixiert werden. Dieses Verfahren stellt den Goldstandard der Gewebefixation dar. Durch das Spülen mit PFA kommt es zu einer weitgehenden Blutleere aller Gefäßabschnitte und zu einer vollständigen Sättigung im Gewebe. Dadurch wird eine Artefaktbildung in den histologischen Präparaten deutlich vermindert [119].

Demgegenüber steht die Immersionsfixation, bei der das Präparat durch Eintauchen in ein Medium passiv gesättigt wird [120]. Es wurden in der Literatur zahlreiche Vergleichsstudien zwischen Perfusionsfixation und Immersionsfixation veröffentlicht. So konnte Beach nachweisen, dass durch Perfusion fixierte Proben insgesamt eine deutlich bessere Qualität in der Immunhistochemie zur Folge haben bedingt durch ein homogeneres Schnittbild.

Ganz ähnliche Ergebnisse lieferten auch die Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Kasukorthi. Auch hier wurden beide Methoden bei Präparaten bis 1 cm Durchmesser miteinander verglichen. Auch in dieser Studie stellte sich die Perfusion als überlegene Methode dar [119].

Dietzmann führt jedoch auch Nachteile an: die Perfusionsfixation stellt ein deutlich aufwendigeres Verfahren dar, bei der mit nicht etablierter Technik, wie beispielsweise ein zu hoher intravasaler Druck oder eine unvollständige Perfusion zu einer ungenügenden Fixation und somit zur eingeschränkten Beurteilbarkeit der Präparate führen kann [121].

#### **5.1.4 Die Medikamente Sunitinib und TMZ**

##### **Sunitinib**

Bereits in zahlreichen präklinischen und klinischen Studien hat sich gezeigt, dass es sich bei dem Multi-Tyrosinkinase-Inhibitor Sunitinib um eine Substanz mit starker antiangiogener und antiproliferative Aktivität handelt [104]. Diese Eigenschaften ergeben sich aus der selektiven Inhibition der Rezeptoren VEGFR1-3, KIT, FLT3, PDGFR- $\alpha$ , PDGFR- $\beta$  sowie RET und CSF1R [104].

Die Wirkung von Sunitinib wird – als Einzelwirkstoff und in Kombination mit anderen Wirkstoffen – in unterschiedlichen klinischen Studien für verschiedene Tumorarten evaluiert. Es hat sich gezeigt, dass eine Therapie mit Sunitinib in Mausmodellen zu einer Tumorregression bzw. Tumorstillstand bei einer Vielzahl von Tumorentitäten einschließlich Lungen-, Brust-, Kolon-, Nierenzell- und Prostatakarzinom bewirkt hat [122]. Zudem haben auch Experimente mit subkutanen Gliomxenografts der Zelllinien C6, GL261 und SF763T unter Anwendung von Sunitinib eine wachstumsverzögernde und tumorverkleinernde Wirkung gezeigt [123]. Darüber hinaus konnte auch im orthotopen Mikromilieu die antiinvasiven und antiangiogenen Effekte von Sunitinib nachgewiesen werden. Hierbei fand die Forschungsgruppe um de Boüard heraus, dass eine Therapie mit Sunitinib bei Tieren mit intrazerebral implantierten U87-Xenografts einen signifikanten Überlebensvorteil von 36 % im Vergleich zur Kontrolle zeigt [122]. Es ist davon auszugehen, dass Sunitinib infolge seiner dualen inhibierenden Wirkung gegenüber VEGFRs und PDGFRs sowohl das Überleben als auch die Proliferation von Endothelzellen, Perizyten und PDGFR-exprimierende Gliomzellen beeinflusst.

Weiterführende Studien haben nachgewiesen, dass Sunitinib die Blutgefäßbildung signifikant reduziert, jedoch nur eine geringe Wirkung auf bereits vorhandene Blutgefäße hatte [124, 125]. Dies deutet darauf hin, dass unreife Tumorgefäße anfälliger gegenüber einer

Sunitinib-Therapie sind, während reife Gefäße sich als resistent darstellen. Die verbleibenden reifen Gefäße in den Tumoren sind in der Lage, den Blutfluss aufrechtzuerhalten und Sauerstoff und Nährstoffe bereitzustellen, wodurch das Tumorstadium unterstützt wird [124]. Die Arbeitsgruppe um Zhou et al. kommen in ihrer Studie zu dem Schluss, dass die erworbene Tumoresistenz gegenüber Sunitinib nicht mit einer Revascularisierung im Tumor assoziiert ist, sondern mit der Aktivierung alternativer Überlebenswege, insbesondere den durch PLC-1- und c-Jun-Proteine vermittelten [124]. Die verminderte Medikamentenaufnahme in Tumorzellen, die auf hochreguliertes ABCG2 zurückzuführen ist, scheint auch eine Rolle bei der erworbenen Sunitinib-Resistenz zu spielen. Weitere Studien sind erforderlich, um die Rolle dieser potenziellen Resistenzfaktoren bei der Resistenz gegenüber Sunitinib zu klären [124].

In einer Vorgängerstudie aus unserer Klinik wurde der Effekt von Sunitinib auf die Tumormikrohämodynamik und den lokalen Zufluss einer Chemotherapie in SF 126-Xenografts intravitalmikroskopisch veranschaulicht [95]. Hierbei zeigten sich Tumorgefäße, die sich gegenüber antiangiogenen Stimuli refraktär verhielten – weiterführende Untersuchungen konnten belegen, dass diese Gefäße einen durchschnittlich größeren Gefäßdurchmesser aufwiesen mit konsekutiv höherer Blutflussrate und zunehmender Erythrozytenfließgeschwindigkeit (Red Blood Cell Velocity = RBCV). Man vermutete, dass Sunitinib einen “chemosensibilisierenden” Effekt auf Tumorgefäße und Tumorzellen ausüben könnte [95].

Zukünftige Richtungen für Sunitinib und andere Multi-Target-Therapien umfassen die Anpassung der Therapie an den individuellen Patienten- und Tumortyp sowie die Überwindung von Arzneimittelresistenzen. Dies kann die Kombination von Sunitinib mit anderen gezielten Therapien oder einer Chemotherapie sowie die Verwendung von Sunitinib als Teil eines multimodalen Ansatzes bei der Krebsbehandlung umfassen.

### **Temozolomid**

Bei Temozolomid handelt es sich um eine antineoplastische Substanz aus der Gruppe der Alkylanzien, die von Stevens et al Ende der Achtziger Jahre synthetisiert worden ist [126]. TMZ stellt ein Prodrug dar, dessen wirksame Form nennt sich Monomethyl-Triazinyl-Imidazol-Carboxamid (MTIC) und entfaltet seine zytostatische Wirksamkeit durch Alkylierung an der O6-Stelle des Guanins mit zusätzlicher Alkylierung der N-7-Position mit folgendem Zellzyklus-Arrest und konsekutiver Apoptose [127]. Erste Untersuchungen in Studien bestätigten die gute antitumorale Aktivität in zahlreichen Tumorentitäten in vivo [127]. Klinische Studien Anfang der neunziger Jahre wiesen eine gute Wirksamkeit beim Melanom und Glioblastom nach bei gleichzeitig guter oraler Bioverfügbarkeit und geringer Myelotoxizität [127, 29].

In weiterführenden Untersuchungen wurden vielversprechende Ergebnisse bei der Evaluation einer TMZ-Therapie bei primären Hirntumoren erzielt [128]. So wurden synergistische zytotoxische Effekte einer Radio-/TMZ-Therapie hinsichtlich Gliomzellen aufgedeckt. In diesem Zusammenhang war die multizentrische Studie der Arbeitsgruppe von Stupp et al. wegweisend für den bis heute geltenden Therapiestandard [102]. Ein bisher unübertroffene Erfolg wurde mit Hilfe der kombinierten Temozolomid-/Radiotherapie erreicht: hierbei konnte eine Verlängerung der Überlebenszeit von Glioblastompatienten auf durchschnittlich 14,6 Monate und somit eine Steigerung der 2-Jahres-Überlebensrate auf 27,2 % sowie der 5-Jahres-Überlebensrate auf 9,8 % erzielt werden [103].

Arzneimittelresistenz ist ein Hauptproblem bei der Behandlung von Gliomen [129]. Es ist heute weithin anerkannt, dass die Methylierung des MGMT-Promotors ein Biomarker für das TMZ-Therapieansprechen ist, da das Enzym die Wirkung von TMZ antagonisiert, so dass es deren Zytotoxizität entgegenwirkt und als negativer prognostischer Faktor einzustufen ist [130, 131]. Aktuelle Studien um die Arbeitsgruppe von LoDico et al. aus dem Jahr 2018, wiesen nach, dass es weitere Biomarker gibt, die die Wirksamkeit von TMZ voraussagen können [100]. So wird die HIF-1 $\alpha$ -Aktivität als früher Biomarker für die Reaktion auf TMZ in U251-Gliomzellen vorgeschlagen [132]. Der durch Hypoxie induzierbare Faktor hängt mit einer Reihe von Merkmalen von Gliomen zusammen, die an Tumorprogression, Malignität und Behandlungsresistenz beteiligt sind [133, 134, 135]. Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass die Expression von HIF-1 $\alpha$  (aber nicht HIF-2 $\alpha$ ) durch die TMZ-Behandlung moduliert werden kann und dass nur die HIF-1 $\alpha$ -Modulation für die Gliom-Reaktion auf den Wirkstoff verantwortlich ist. Diese These wird durch HIF-1 $\alpha$ -Silencing-Experimente in resistenten Zellen nach der TMZ-Behandlung untermauert: Der Test der Zelllebensfähigkeit zeigt, dass die HIF-1 $\alpha$ -Downregulation allein eine notwendige und ausreichende Voraussetzung für die Wiederherstellung der Reaktionsfähigkeit des Arzneimittels TMZ ist. Neue Erkenntnisse haben gezeigt, dass die HIF-1 $\alpha$ -Aktivität bei vielen verschiedenen Tumoren eine grundlegende Rolle spielt, da sie nicht nur an der Zellreaktion auf Hypoxie, sondern auch am bioenergetischen Gleichgewicht der Zellen, der Aufrechterhaltung und der Invasivität beteiligt ist [136, 137]. Beispielsweise wurde berichtet, dass das metastatische Potenzial von Brustkrebs bei Patienten, die sich einer anti-angiogenen Therapie unterziehen, erhöht ist, möglicherweise aufgrund einer positiven Modulation der HIF-1 $\alpha$ -Aktivität unter hypoxischen Bedingungen. Weiterführende Studien haben gezeigt, dass es bei der pathophysiologischen Bewertung von Gliomen eine Rolle spielt, da HIF-1 $\alpha$ -Stummschaltung in Kombination mit einer Strahlentherapie die therapeutische Wirksamkeit der Gliombehandlung erhöht regulieren zellzyklus- und apoptosebezogene Signalwege [138, 139]. In gleicher Weise wurde bereits gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen der Aufhebung der HIF-1 $\alpha$ -Aktivität und einer verminderten Lebensfähigkeit und Migration von Tumorzellen besteht, wodurch auch das Metastasen-



potenzial reduziert wird [140]. Aus diesem Grund wurde eine Reihe von HIF-1 $\alpha$ -Inhibitoren in Kombination mit einer Standard-Chemotherapie zur Behandlung von Melanomen [141], Brustkrebs [142] und GBMs [143] in klinischen Studien verwendet, in denen festgestellt wurde, dass die Inhibition von HIF-1 $\alpha$  die Reaktion des Tumors auf die Behandlung erhöht und so zu einer Verringerung der Tumorprogressionsrate führt, was sie zu einer interessanten neuen therapeutischen Option macht [144]. Weitere Studien werden erforderlich sein, um zu verstehen, welches Molekül in der Lage ist, in Kombination mit TMZ die höchste Synergie zu erzielen, wodurch die Nebeneffekte minimiert werden.

### 5.1.5 Immunhistologie

In unserer Studie kamen eine Reihe unterschiedlicher immunhistochemischer Marker zur Anwendung. Inwieweit die genannten Marker für unsere Fragestellung geeignet sind, soll im Folgenden näher erörtert werden.

#### PHH3 als Proliferationsmarker

Eine immunhistochemische Färbung gegen das phosphorylierte PHH3 wurde zur Darstellung der proliferierenden Zellen in einer Verdünnung von 1:500 durchgeführt. Histon H3 stellt eines der Hauptproteine, das mit anderen Histonen die Hauptproteinbestandteile in eukaryontischen Zellen bildet. PHH3 erreicht seine maximale Chromatinkondensation im Zellkern während der Mitose und kommt in der Interphase des Zellzyklus nur in vernachlässigbarer Quantität vor, was somit eine Differenzierung zwischen apoptotischen und mitotischen Zellkernen erlaubt [145]. Der Vorteil der Phospho-Histon-H3-Färbung im Vergleich zu Ki-67 liegt darin, dass nur Zellen während der Mitose angefärbt werden, d.h. in der Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase, nicht in der Interphase und somit eine wirkliche Aussage zum Mitoseindex gemacht werden kann. Laut Datenblatt von Millipore erfolgt eine Markierung der Zellen hingegen bei der Ki-67/MIB-1-Färbung in allen Phasen des Zellzyklus, ausgenommen G0.

#### Ki-67 als Proliferationsmarker für Endothelzellen

Ki-67 stellt ein nukleäres Zellzyklusregulatorprotein dar, dessen Expression eng mit zellulärer Proliferation gekoppelt ist. Zur Visualisierung der proliferierenden Endothelzellen in unseren humanen Xenografts, was gleichzusetzen ist mit dem Anteil der aktiver Angiogenese, wurde ein monoklonaler Antikörper der Ratte gegen das Maus Ki-67 Antigen verwendet. Da bei diesem Klon keine Kreuzreaktion mit humanem Ki-67-Antigen nachgewiesen werden kann, ist davon auszugehen, dass die von der Maus in den xenogenen Tumoren induzierte Angiogenese mit Endothelzellproliferation dargestellt wird.

Das Ki-67-Antigen wird während der aktiven Phasen des Zellzyklus (G1-, S-, G2- und M-Phase) exprimiert, während es in der G0-Phase in ruhenden Zellen nicht nachweisbar ist. Mit Beginn der Mitose wird das Protein zur Oberfläche der Chromosomen transportiert, wohingegen es in der Interphase ausschließlich innerhalb des Zellkerns zu finden ist. Es besitzt eine sehr kurze Halbwertszeit [146] und wird zügig abgebaut, wenn die Zelle in die nicht-proliferative Phase eintritt. Parallel zu DNA-Reparaturprozessen ist keine Ki-67-Expression nachweisbar.

Der Name des Ki-67-Antigens leitet sich aus der Stadt Kiel ab, in der das Antigen ursprünglich identifiziert wurde und dem entsprechenden "Well" mit Ursprungsklon in einer Arbeitsplatte 117. Laut Datenblatt der Firma Dako wird das Protein in allen Phasen des Zellzyklus exprimiert außer in der Ruhephase G0 und zu Beginn der G1 Phase. Damit wird die proliferative Fraktion der normalen und der neoplastischen Zellen nachgewiesen. Zahlreiche Studien haben eine erhöhte Expression von Ki-67 in unterschiedlichen soliden sowie hämatologischen Tumoren darstellen können [147]. Ferner besteht eine Korrelation zwischen histopathologischem Grading und dem ermittelten Ki-67-Index (Prozentsatz der Ki-67 positiven Zellen) [148]. In der Routinediagnostik von Gliomen findet Ki-67 zur Darstellung erhöhter mitotischer Aktivität auch heute seine Anwendung.

### **Desmin als Perizytenmarker sowie CD31/PECAM zur Gefäßdarstellung**

In etlichen Studien sind in der Vergangenheit zahlreiche Marker zur Identifizierung und Visualisierung von vaskulären Endothelzellen untersucht und evaluiert worden. Als Beispiele hierfür sind vor allem CD31, CD105, CD34, VEGFR-2, vWF, VE-Cadherin sowie Integrine und Lectine [149] zu nennen.

Der panendotheliale Marker CD31, auch bekannt unter der Bezeichnung PECAM-1, gilt seit langem als gut etabliert für die visuelle Darstellung der Angiogenese respektive die Gefäßdichte [150]. Untersuchungen zur Expression von CD31 haben ergeben, dass dieser ein endothelialer Marker ist der im ZNS vor allem vaskulär vorkommt, aber auch in Lymphgefäßen nachgewiesen werden kann und bei Tumoren verwendet wird, um dessen Differenzierung einzugrenzen [151]. Darüber hinaus wird CD31 ebenso in Thrombozyten, Monozyten und Granulozyten exprimiert – was insgesamt aus seine geringe Selektivität hinweist. Die besondere Eigenschaft des Markers CD31 besteht darin auch frühe, das heißt unreife Gefäßabschnitte visualisieren zu können.

Die Blutgefäßwand setzt sich zusammen aus Endothelzellen und Perizyten sowie glatten Muskelzellen [152]. Ihre Funktion beinhaltet unter anderem die Stabilisation hämodynamischer Prozesse und der Erhalt der Blut-Hirn-Schranke. Zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente zu dieser Studie waren die Perizyten im Allgemeinen noch nicht ausreichend untersucht, so dass keine verlässlichen Marker zur Verfügung standen. In

den vergangenen Jahren konnten zahlreiche Marker benannt werden, die mit Perizyten vergesellschaftet sind. Darunter sind  $\alpha$ -SMA, Vimentin, Desmin, Nestin und PDGF $\beta$  sowie NG-2. In unserer Studie wurde das Intermediärfilament Desmin verwendet, das zum Typ III gehört und in den Sarkomeren von Skelett- und Herzmuskelzellen sowie in glatten Muskelzellen zu finden ist. Es lässt sich bereits früh in der Embryonalentwicklung im Muskel nachweisen. Auch wenn Desmin primär für den Nachweis von Zellen muskulären Ursprungs, wie beispielsweise für die Diagnostik von Rhabdomyosarkomen, verwendet wird, kommt dieser Marker auch regelmäßig für die Detektion von Perizyten zur Anwendung [153]. Endothelzellen lassen sich mit Desmin allerdings nicht nachweisen [154].

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

Als einer der Ersten erkannte Judah Folkman die zentrale Bedeutung der Blutgefäße für das Tumorwachstum, die Tumordinvasion sowie deren lymphogene und hämatogene Metastasierung und stellte Hypothesen zur Tumorangio-genese auf [155]. Folkmans Theorien begründen sich auf der Annahme, dass sich Tumore nur bis zu einer bestimmten Größe allein durch Diffusion aus dem bereits bestehenden Gefäßsystem mit Nährstoffen und Sauerstoff erhalten können [156]. Bei einem weiteren Wachstum des Tumors kommt es zu einem Aussprossen neuer Gefäßknospen ("sprouts") aus dem bestehenden Gefäßsystem des umliegenden Gewebes. Dies nannte Folkman "angiogenic switch" [156]. Ferner proklamierte er bereits in seinen ersten Arbeiten einen Faktor, der die Tumorgefäße zur Proliferation anregen kann. Diesen bezeichnete er als Tumor-Angiogenese-Faktor (TAF). Seit jener Zeit wird das Gebiet der Tumorangio-genese intensiv untersucht mit dem Ziel, Oberflächenstrukturen auf den Tumorzellen zu erkennen und therapeutisch nutzbar zu machen [156, 155].

Bis heute wurden, ausgehend von den ursprünglichen Untersuchungen Folkmans, zahlreiche Studien veröffentlicht, die das mögliche Potenzial des therapeutischen Ansatzes näher beleuchtet haben. Insgesamt hat dies zu einem profunderen Verständnis der zugrundeliegenden Pathophysiologie und angiogener Vorgänge geführt.

Unsere Studie rückt in diesem Zusammenhang das Protein NDRG1 und seinen Einfluss auf angiogene Vorgänge unter antiangiogener und antitumoraler Therapie in den Fokus. Wie bereits einleitend erwähnt, ist die genaue Funktion des Proteinprodukts von NDRG1 bisher noch ungeklärt [157]. Abhängig vom Gewebetyp ist das NDRG1-Protein im Zytoplasma, Kern, Mitochondrium oder in Membranen lokalisiert. Darüber hinaus kann die Expression von NDRG1 durch mehrere Faktoren wie Hypoxie, Schwermetalle, DNA-Schäden, Hormone, Onkogen und Tumorsuppressor Gene verändert sein [157]. Eine

Reihe von Studien betonen die Rolle von NDRG1 in der Krebsentstehung. Vermutlich beteiligt sich NDRG1 an der Angiogenese, Entstehung von Metastasen und Mechanismen, die zu einer Resistenzentwicklung gegenüber Chemotherapeutika führt.

Die Rolle von NDRG1 in der Pathogenese von Krebs und sein möglicher Nutzen als prognostischer Faktor für Patienten mit Krebs wird ebenfalls diskutiert.

### **5.2.1 Verbesserte Überlebensrate bei NDRG1-überexprimierenden Gliomzellen**

In unserer Studie wurden insbesondere die verbesserte Überlebensrate unter NDRG1-überexprimierenden Gliomzellen beleuchtet. Es konnte experimentell nachgewiesen werden, dass die Tumorgröße bei den mit NDRG1-überexprimierenden Gliomzellen implantierten Versuchstieren signifikant reduziert war verglichen mit der Kontrollgruppe. Unsere Ergebnisse knüpfen damit auch direkt an die Studie von Sun et al. an, die zudem auch eine erhöhte Überlebensrate nachweisen konnte [88]. Die gerade in dieser Studie angesprochene Hypothese, wonach das verbesserte Überleben das Ergebnis einer verminderten Tumorzellproliferation und einer geringeren Tumorzellinvasion und Angiogenese resultierte als Antwort auf eine veränderte NDRG1-Expression – haben wir in dieser Studie untersucht und können dies bestätigen. Die Tumore aus den NDRG1-überexprimierenden Gliomzellen wiesen eine signifikant reduzierte Tumorzellproliferationsrate auf im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zudem konnte auch eine signifikant verminderte Endothelzellproliferation festgestellt werden. Auch in der Studie von Wei MA konnte belegt werden, dass die Überexpression von NDRG1 die Zellproliferation und -invasion hemmt sowie die Apoptose in den U87 MG-Gliomzellen induziert, während die Herunterregulierung von NDRG1 die Proliferation erhöhte, die Apoptose unterdrückte und die Invasion von Gliomzellen förderte [93].

Zahlreiche Studien zeigten, dass die Expression von NDRG1 auf mRNA- und Proteinebene in primären Krebs- und Metastasenzellen, einschließlich Kolon- [158, 159, 17], Prostata- [153, 160], Brustkrebs [160] und Plattenepithelkarzinom der Speiseröhre [86] sowie Gliomen [88] reduziert ist, verglichen mit dem in gesunden Zellen. Darüber hinaus unterdrückte die Überexpression von NDRG1 in U87 MG-Zellen in einem subkutanen Tumormodell an der Maus die Tumorigenität in vivo [93]. Sun et al. haben gezeigt, dass die NDRG1-Expression in Gewebeproben von hochgradigen Gliomen im Vergleich zu denen in Gewebe von niedriggradigen Gliomen und normalem Hirngewebe herunterreguliert wurde [88]. Diese Ergebnisse legen nahe, dass NDRG1 ein intrinsischer Regulator der Gliomgenese sein kann. Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass NDRG1 für die Hemmung der Gliomgenese erforderlich ist und das Targeting auf NDRG1 und seine nachgeschalteten Ziele die Möglichkeit neuartiger Therapien für die Behandlung von Gliomen darstellen könnte. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass NDRG1 bei bestimmten Tumoren mit

Zellwachstum, Differenzierung, Tumorigenese, Metastasierung und schlechten klinischen Ergebnissen zusammenhängt [93].

Ein weiteres wichtiges Merkmal von Gliomzellen ist neben der schnellen Proliferation und Resistenz gegen Apoptose das Eindringen in das umgebende gesunde Gehirngewebe [161]. Es wurde bereits vermutet, dass Vimentin, N-Cadherin und der invasive Marker E-Cadherin in zahlreichen Gliomzelllinien und chirurgisch resezierten Proben deutlich erhöht sind [162]. Die Studie von Wei Ma zeigte eine negative Korrelation zwischen Vimentin, N-Cadherin und NDRG1-Expression und eine positive Korrelation zwischen E-Cadherin und NDRG1-Expression. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Überexpression von NDRG1 die Invasivität von Gliomzellen durch Modulation von Vimentin, N-Cadherin und E-Cadherin hemmen kann [93]. Darüber hinaus bestätigten die Ergebnisse der Nacktmaus-Xenotransplantatstudien auch, dass die Überexpression von NDRG1 die Proliferation und die Bildung von Mikrogefäßen *in vivo* signifikant hemmen konnte. Eine in der bereits genannten Studie durchgeführte immunhistochemische Analyse zeigte, dass die Expression von Ki-67 und CD31 im Tumorgewebe abnahm, während die Expression der gespaltenen Caspase-3 in der NDRG1-Gruppe erhöht war. Auch in unserer Studie konnte die Ki-67-Expression in NDRG1-überexprimierenden Gliomzellen als signifikant reduziert nachgewiesen werden, ebenso wie die CD31-Expression. Weitere Untersuchungen anderer Forschungsgruppen konnten nachweisen, dass die Herunterregulierung von NDRG1 einen Anstieg der Proteinexpressionsniveaus von Bcl-2 induzierte und auch die Expressionsniveaus von Bax signifikant senkte. Ferner induziert ein NDRG1-Knockdown auch die AKT-Phosphorylierung, während es die Expression von total-AKT nicht beeinflusste. Daher kann der Anstieg von p-AKT zusammen mit der erhöhten Expression von Bcl-2 erklären, warum Zellen mit niedriger NDRG1-Expression gegen durch Chemotherapie induzierte Apoptose resistent sind [94].

### **5.2.2 Verminderte angiogene Aktivität in NDRG1-überexprimierenden Gliomzellen**

Unsere Studie konnte zeigen, dass in NDRG1-überexprimierenden U87MG-Tumoren reduzierte Gefäßstrukturen nachweisbar waren, bei aufrechterhaltender Endothelzell-Perizyten Interaktion. Zudem konnte in diesen Tumoren immunhistochemisch eine reduzierte Gefäßdichte dargestellt werden, wobei kein signifikanter Unterschied in der Gefäßreifung festgestellt wurde.

Dieser antiangiogene Effekt von NDRG1 widerspricht dem allgemeinen Konzept, demzufolge Hypoxie eine der wichtigsten Induktoren der Neoangiogenese ist. Interessanterweise supprimiert NDRG1 das Tumorstadium und die Angiogenese in Pankreastumoren, bedingt durch die reduzierte VEGF Aktivität [163]. Vor allem in der Gliomforschung unterstreichen diese Ergebnisse die verschiedenartigen Effekte, die Hypoxie auf das angio-

gene System ausüben kann. Es deutet vieles darauf hin, dass eine durch NDRG1 induzierte Hochregulation von TFSF15 vielleicht im nekrotischen Kern von malignen Gliomen auftaucht, der durch massive Hypoxie und geminderte Angiogenese gekennzeichnet ist [164, 165]. Das Gegenteil dürfte in der weniger hypoxischen, jedoch proangiogenen Infiltrationszone von malignen Gliomen auftreten [166].

Wie bereits erörtert, stellt NDRG1 ein Tumorsuppressor dar mit dem Potenzial, Metastasenbildung, Invasion und Migration von Krebszellen zu unterdrücken. Es wird durch Stressbedingungen wie Hunger oder Hypoxie reguliert. Die NDRG1-Regulation wird durch hypoxische Bedingungen sowohl durch HIF-1 $\alpha$ -abhängige als auch unabhängige Wege induziert und kontrolliert.

In Untersuchungen der Forschungsgruppe von Said et al. wurde experimentell nachgewiesen, dass eine langfristige (24 Stunden), aber keine kurzfristige Hypoxie zur Induktion der NDRG1-Expression in humanen Gliomzelllinien führte [92]. Zudem korreliert die Expression von NDRG1 mit der Proteinexpression von HIF-1 $\alpha$ , SP1, CEBP $\alpha$ , YB-1 und Smad7. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die NDRG1-Expression in Gliomzellen unter Hypoxie zeitabhängig reguliert wird zusammen mit HIF-1 $\alpha$ , CEBP $\alpha$ , YB-1 und Smad7. Diese Moleküle können einzeln oder in Kombination das Potenzial besitzen, Zielmoleküle für therapeutische Angriffe gegen Tumoren zu werden, insbesondere in menschlichen Gehirntumoren.

Das lässt darauf schließen, dass die NDRG1-Expression mit Langzeithypoxie assoziiert ist, nicht jedoch mit Kurzzeithypoxie in menschlichen Gliomzellen. Eine übliche Überlebensstrategie von Tumorzellen zu Beginn der Hypoxie umfasst die Remission des Pasteur-Effekts. In diesem Fall scheint HIF-1 $\alpha$  an HER-Sequenzen von auf Hypoxie reagierenden Genen [58] zu binden und stimuliert dadurch glykolytische Transportproteine und die Enzymexpression [167]. Das NDRG1-Gen enthält zwei HREs in seiner nichtkodierenden Sequenz [56], was darauf hinweist, dass seine Regulation HIF-1 $\alpha$ -abhängig ist [157]. Daher liegt es nahe NDRG1 als Marker für hypoxische Regionen innerhalb einer Tumormasse zu nutzen [168]. Eine andere Studie zeigte jedoch, dass die Expression von NDRG1-mRNA und -Protein in GBM im Vergleich zu normalem Hirngewebe insgesamt reduziert ist [88]. Diese Beobachtungen legen nahe, dass die Regulation von NDRG1 krebszellenspezifisch sein kann und auch vom Sauerstoffstatus des Tumorgewebes abhängig ist. Die Stabilität von NDRG1 nach der Reoxygenierung nach langzeitiger Exposition unter hypoxischen Oxygenierungsbedingungen kann sowohl mit posttranskriptionellen als auch posttranslationalen Modifikationen zusammenhängen. Basierend auf weiterführenden Forschungsdaten, kann angenommen werden, dass eine posttranskriptionelle Modifikation durch NDRG1-Interaktion mit dem HSP90-Protein erreicht werden kann [169]. Der mTOR-Signalweg ist in dem Zusammenhang auch beteiligt, da der nachgeschalte-

te Regler CCR4-NOT NDRG1 [170] hochregulieren kann. Eine solche posttranskriptionelle Regulation kann zusammen mit einer posttranslationalen Modifikation wirken, wie z. Sumoylierung von HIF-1 $\alpha$ . HIF-1 $\alpha$  ist destabilisiert und als Konsequenz ist die Transkriptionsrate von NDRG1 reduziert. Es wurde gezeigt, dass ein kooperativer Mechanismus die Regulierung von Genen fördert, die für die Anpassung der Zelle an verschiedene Mikroumgebungen erforderlich sind, beispielsweise während Hunger und Hypoxie [171]. Es wurde in Studien gezeigt, dass eine Hochregulierung von CEBP $\alpha$  in humanen GBM-Zellen als Reaktion auf Hypoxie erfolgt. Unterschiedliche Signaltransduktionswege werden durch verschiedene Wachstumsfaktoren und Umweltereignisse wie hypoxische Oxygenierungsbedingungen gesteuert und moduliert [172]. Es liegt nahe, dass HIF-1 $\alpha$  die NDRG1-Expression in GBM-Zellen in Verbindung mit SP1, CEBP $\alpha$ , YB-1 und Smad7 unter verschiedenen physiologischen Bedingungen reguliert, während Egr-1 als Cofaktor fungieren kann [173]. Ein sehr ähnlicher Regulationsmechanismus kann auch für andere Hypoxie-induzierte Gene [174], wie CA9, Epo und VEGF bei menschlichem Gehirntumor [175], existieren. Diese Faktoren werden auch durch HIF-1 $\alpha$  gesteuert. Andere Kofaktoren können jedoch beteiligt sein. Das Wissen über solche regulatorischen Prozesse während der Krebsentwicklung ist wichtig für die Entwicklung und Anwendung von Krebsbehandlungsmodalitäten.

### 5.2.3 Resistenz gegenüber antiangiogener Therapie

Wie in der Literatur beschrieben, ist Angiogenese durch verschiedene angiogene Moleküle bedingt, in erster Linie durch VEGF [176]. Unsere Untersuchungen zeigen, dass die Inhibition von VEGFR2 durch Therapie mit Sunitinib nicht zu einer signifikanten Reduktion des Tumorwachstums in der Gruppe der NDRG1 überexprimierenden Tumore führt. Auch ist keine signifikante Reduktion der Gefäßdichte in dieser Gruppe nachweisbar. Auf der anderen Seite mindert die Behandlung mit Sunitinib sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den NDRG1-überexprimierenden Tumore die Endothelzell-Perizyten Interaktion signifikant. Zusammengenommen weist dies auf eine mögliche Resistenz der NDRG1-überexprimierenden U87-Gliomzellen gegenüber einer antiangiogenen Therapie hin. Mögliche Mechanismen, die dazu führen, sollen an dieser Stelle näher beleuchtet werden. Die molekularen Gründe, die der Resistenz gegenüber einer antiangiogenen Therapie zugrunde liegen sind sehr unterschiedlich [177]. Zunächst wird nach "Ausschaltung" eines angiogenen Pfades ein alternativer proangiogener Weg kompensatorisch genutzt und somit ein "angiogeneischer Notfallplan" eingeleitet, der im Falle einer Therapie mit Sunitinib zu einer Induktion der Faktoren MMP-9, CXCL1 und FGF-1/-2 führt [64, 136, 137] [178]. Zudem lässt sich beobachten, dass gerade im Falle einer alleinigen VEGF-Inhibition eine erhöhte Rekrutierung und Assoziation von Perizyten beobachtet werden kann, die insbesondere das Fortbestehen von Tumorgefäßen fördert. Im Allgemeinen sind Perizyten für die Ge-

fäßstabilisierung und Gefäßausbildung essentiell. In der Literatur ist bereits bekannt, dass mit einem Perizytenverlust auch ein massiver Verlust der Gefäßintegrität mit Bildung von Ödemen oder Mikroaneurysmen sowie Metastasenbildung einhergeht [140, 118]. Weiterführende Untersuchungen konnten zeigen, dass Perizyten auch einen inhibitorischen Effekt auf Endothelzellproliferation ausüben und durch feste Verbindung in dieser Perizyten-Endothelzell-Interaktion auch eine Hochregulation von Basalmembranproteinen wie Laminin und Intergrinen induzieren, was wiederum zu einer erhöhten vaskulären Resistenzentwicklung führt [64, 142]. In einer Vorgängerstudie in unserer Arbeitsgruppe wurden potenzielle Signalwege für die vaskuläre Perizytenaktivierung untersucht [96]. In diesem Zusammenhang ist der Ang-1/Tie-2 Signalweg zu nennen. Perizyten und glatte Muskelzellen generieren Ang-1, das wiederum endotheliale Gap-junctions induziert und durch Aktivierung von Tie-2-Rezeptoren die Perizyten-Endothelzell-Interaktionen in Gefäßabschnitten beschleunigt [51]. In der besagten Studie wurde neben der Ang-1/Tie-2-Expression auch eine signifikante Reduktion von DLL-4 (Delta-like ligand 4-Expression) unter antiangiogener Therapie entdeckt [96]. Allgemein spielt die DLL-4/Notch-Signalkaskade eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Gefäßverzweigungen [60].

Ein weiterer Mechanismus, der zur Resistenz gegenüber Sunitinib führt, ist die Mobilisierung von vaskulären Vorläuferzellen und anderen proangiogenen Monozyten aus dem Knochenmark. Gerade im Bereich hypoxischer Tumoreale kommt es durch proangiogene Signalkaskaden zu einer Aktivierung von EPCs und anderen Angiogenese-stimulierenden Faktoren [64].

Weitere Untersuchungen in unserer Forschungsgruppe haben nachfolgend ergeben, dass dieser antiangiogene Phänotyp begleitet ist von einer signifikanten Hochregulation des antiangiogenen Gens TNFSF15 [1]. Die TNFSF15-Hochregulation ist vergesellschaftet mit der NDRG1 induzierten Aktivierung von NF- $\kappa$ B und AP-1 response elements innerhalb der TNFSF15 Promotor-Region. Infolgedessen wird gezeigt, dass NDRG1 überexprimierende Gliome an sich resistent gegenüber antiangiogener Therapiemaßnahmen sind [1]. Unsere Daten unterstreichen die komplexe Regulation der Aktivität von NDRG1, indem sie die vielfältigen zellulären und gewebeabhängigen Effekte von NDRG1 aufzeigen.

Wie in der Literatur beschrieben, ist Angiogenese durch verschiedene angiogene Moleküle bedingt, in erster Linie durch VEGF [176]. Bei der Überexpression von NDRG1 wurde keine Veränderung der Genexpression von proangiogenen Molekülen beobachtet. Der einzige hochregulierte proangiogene Effektor war CCL2 [179]. Allerdings wurde ein antiangiogener Phänotyp in den Tumoren beobachtet, so dass die CCL2-Expression nur einen geringen Effekt in den Experimenten ausübt. Stattdessen wurde eine hoch signifikante Veränderung des endogenen TNFSF15 festgestellt. Dieses Phänomen lässt vermuten, dass TNFSF15 ein Schlüsselmolekül darstellt, das für den antiangiogenen Phä-



notyp verantwortlich ist [1]. TNFSF15 wurde initial als spezifischer autokiner Inhibitor beschrieben, der durch endotheliale Zellen exprimiert wird [180]. Gonsky et al. wiesen nach, dass auch Monozyten TNFSF15 exprimieren [181]. Zudem wurden luminale, glanduläre und tief glanduläre epitheliale Zellen des Rinderuterus positiv für TNFSF15 gefärbt, was zeigt, dass die TNFSF15-Expression nicht auf endotheliale Zellen begrenzt ist [182]. In dieser Hinsicht scheint es auch nicht überraschend, dass Gliomzellen, die für diverse Genmutationen und Genregulierungen bekannt sind, auch TNFSF15 exprimieren. Demzufolge wurde die TNFSF15-Expression in Gliom-Patienten mit einem sehr unterschiedlichen Expressions- und DNA copy number Profil nachgewiesen. Es wurden 3 Isoformen von TNFSF15 entdeckt: VEGI-174, VEGI-192 und VEGI-251 [183]. Die einzige Isoform des TNFSF15, die ein Sekretionssignalpeptid ist und bei dem nachgewiesen wurde, dass es von Endothelzellen und Krebszellen sezerniert wird, ist VEGI-251 [184]. Der Überstand der NDRG1 überexprimierenden Gliomzellen übt einen negativen Effekt auf die Proliferation, Migration und tube formation von HUVEC-Zellen aus, ähnlich zu den Ergebnissen der Experimente mit VEGI-251 überexprimierende Brusttumorzellen [184, 1]. Daher erscheint es wahrscheinlich, dass die NDRG1 überexprimierenden Gliome eine gespaltete Variante von VEGI-251 ausscheidet. In diesem Zusammenhang wurde beschrieben, dass TNF-alpha und Il1b die Ausscheidung von TNFSF15 induzieren [185, 186]. Jedoch wurden diese Mediatoren in der Studie durch NDRG1-Überexpression nicht verändert, abgesehen von TNF-alpha und Il1b als Induktoren für TNFSF15 in den Experimenten. Sezerniertes TNFSF15 inhibiert die Vaskulogenese durch herunterregulierte Membranschanke VEGF Rezeptor 1 und durch Erhöhung des löslichen VEGF Rezeptor 1, dadurch greift es in die Vaskulogenese ein [187]. Ferner wurde in weiterführenden Experimenten in unserer Forschungsgruppe gezeigt, dass TNFSF15 einen antiangiogenen Effekt ausübt, indem es einen frühen G1 Arrest in ruhenden Endothelzellen auslöst sowie durch Stimulation der Apoptose in proliferierenden Endothelzellen [188, 1, 189]. Dies könnte auch eine Erklärung für die von uns festgestellte signifikante Reduktion der Endothelzellproliferation darstellen.

#### **5.2.4 NDRG1 als prädiktiver Marker für die Reaktion auf eine alkylierende Chemotherapie**

Unsere Studie zeigt, dass die Gabe von TMZ in der Empty/Kontrollgruppe zu einer signifikanten Reduktion des Tumorwachstums in vivo führt. Dieser deutliche therapeutische Effekt von TMZ kann in der NDRG1-überexprimierenden Gruppe nicht in dem Maße vorgefunden werden. Dies deutet auf eine mögliche TMZ-Resistenz bei den NDRG1-überexprimierenden Tumoren hin.

Allgemein ist die primäre oder erworbene Resistenz gegenüber einer antitumoralen Therapie eines der größten Hindernisse in der Onkologie. Für Gliome ist dies bis heute entscheidend für ein Ansprechen der Standardtherapie, die aus einer Strahlentherapie und begleitender Chemotherapie mit Temozolomid (TMZ) besteht. Die Studie von Weiler et al. 2014 veranschaulicht, dass das DNA-Reparaturprotein MGMT eine entscheidende Rolle bei der Primärresistenz gegenüber der alkylierenden Substanz TMZ spielt [190]. Es fiel auf, dass die NDRG1 überexprimierenden Zellen *in vitro* langsamer proliferieren als die Kontrollzellen. Auch in dieser Studie konnte dies mit Experimenten *in vivo* bestätigt werden. Auf der einen Seite wirkt TMZ direkt auf die Proliferation von Endothelzellen negativ und darüber hinaus werden auch durch indirekte systemische antivaskuläre Effekte, durch generelle Myelosuppression die Mobilisierung von Knochenmarkszellen gehemmt. Hier sind insbesondere die endothelialen Progenitorzellen im Fokus, die aktiv am Prozess der Vaskulogenese und Angiogenese Anteil haben. Zudem war augenscheinlich NDRG1 in humanen Gliomproben mit dem Malignitätsgrad assoziiert. Nachfolgende Untersuchungen an Tumorproben von unbehandelten Patienten konnten belegen, dass NDRG1 nur in moderaten Mengen primär in hypoxischen, perinekrotischen Bereichen des Tumors zu finden ist. Tritt nach erfolgter Therapie mit TMZ ein Rezidiv auf und wurde wiederholt Tumorgewebe operativ entfernt, so konnte gezeigt werden, dass die NDRG1 Expression deutlich ausgeprägter war und dies nicht nur im perinekrotischen, sondern auch gerade im perivaskulären Raum. Weitergehende Untersuchungen haben ergeben, dass die Expression von NDRG1 in Gliomgewebe mit einem schlechten Ansprechen speziell auf alkylierende Chemotherapeutika assoziiert ist. Molekulare Untersuchungen führten zu dem Schluss, dass die exogene Expression von NDRG1 zu einer verstärkten Demethylierungsaktivität von MGMT in Gliomzellen führt, die TMZ ausgesetzt waren. Dies lässt darauf schließen, dass NDRG1 direkt mit dem DNA-Reparaturprotein MGMT sowie weitere wie APEX1 und PNKP interagiert und somit den MGMT-vermittelten Schutz vor TMZ fördert. Mittels Koimmunpräzipitation konnte diese Interaktion auf molekularer Ebene validiert werden [190]. So bildet NDRG1 mit MGMT direkt einen chaperonähnlichen Proteinkomplex, der MGMT in seiner Funktion fördert und die Resistenz gegenüber TMZ induziert. NDRG1 wiederum wird unter anderem von Steroiden über SGK1 induziert. Das Serin/Threonin-Kinase-Ziel von Rapamycin (mTOR) dient hier als zentraler Dreh- und Angelpunkt, der mehrere intrazelluläre und extrazelluläre Signale integriert und damit ein attraktives Antitumorziel darstellt. Die Aktivierung des Signalnetzwerks, an dem die Proteine Inositol-3-Kinase/AKT/mTOR-Achse beteiligt ist, erfolgt häufig durch Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK), wobei hauptsächlich der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) die am häufigsten veränderte RTK bei Glioblastomen verkörpert. Jedoch zeigte sich in weiteren Experimenten, dass die bloße Hemmung von EGFR oder mTOR bei Glioblastomen unwirksam blieb [190]. Es liegt nahe, dass die hypoxische Mikroumgebung als Keimzentrum für aggressivere und therapieresistente Tumorzellphäno-

typen dient [191], die zudem auch die Wirksamkeit der Strahlentherapie verhindert [192, 193]. Nachfolgende Untersuchungen zeigten, dass Hypoxie eine Resistenz gegenüber verschiedenen Antikrebsmitteln in Neuronen [194], aber auch in Gliomzellen induziert [195]. Wie bereits erwähnt, verursacht im Allgemeinen Hypoxie die Akkumulation des Transkriptionsfaktors HIF-1, was zur Expression hypoxieinduzierbarer Gene führt, wie z. B. für den VEGF und das NDRG1 [190, 196]. In unserer Studie konnten wir keine signifikante Differenz in der Gefäßdichte in der NDRG1 + TMZ-Behandlungsgruppe gegenüber der NDRG1-Gruppe ohne Therapie feststellen. Deutlicher war die Differenz in den Kontrollgruppen. Demgegenüber zeigten sich bei der Endothel-Perizyten-Interaktion deutliche Unterschiede. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich hier um die Neu-Ausbildung unreifer Gefäßabschnitte handelt. So haben frühere Untersuchungen von Carmeliet et al. nachgewiesen, dass die Tumervaskularisation morphologisch strukturlos und inhomogen wirkt. So findet man Gefäßabbrüche und labyrinth-ähnliche Sproßbildungen, die insgesamt wenig ausdifferenziert erscheinen [197].

Umgekehrt zeigten die überexprimierenden NDRG1-Zellen eine Verringerung des durch TMZ induzierten G2/M-Arrests, was einer Verringerung der Proliferation *in vitro* und des Tumorstadiums *in vivo* entsprach. In unserer Studie zeigte sich eine nahezu gleichbleibende Tumorzellproliferationsrate in der NDRG1 und der NDRG1 + TMZ-Gruppe. Im Gegensatz dazu zeigte die Empty/Kontrollgruppe eine signifikante Differenz; hier konnte die Therapie mit TMZ die Tumorzellproliferation deutlich senken. Hinsichtlich der Endothelzellproliferation scheint es bemerkenswert, dass die NDRG1-überexprimierenden Zellen, die nicht TMZ ausgesetzt waren, signifikant langsamer proliferierten als die Kontrollen; diese Ergebnisse korrespondieren auch mit den Untersuchungen der Kollegen Weiler et al. [190]. In diesem Zusammenhang wurde die weiterführende Hypothese untersucht, inwieweit sich der Einfluss therapeutischer Maßnahmen, die die Tumormikroumgebung beeinflussen, auf die Expression und Aktivität von NDRG1 auswirkt. Es zeigte sich, dass die durch Bestrahlung induzierte NDRG1-Expression von der p53-Expression abhängig war – im Gegensatz zur Hypoxie – wurde jedoch durch HIF-1 $\alpha$ - oder HIF-2 $\alpha$ -Gen-Silencing nicht beeinträchtigt, was darauf hinweist, dass Hypoxie und Bestrahlung verschiedene Signalwege verwenden, um über NDRG1 eine Chemoresistenz zu induzieren [190]. Folglich führte die langfristige Exposition gegenüber TMZ zu einer erhöhten Phosphorylierung von NDRG1 an Position T346 in überlebenden Zellen [190]. Die NDRG1-Phosphorylierung bei T346 ist mit einer erhöhten Aktivität verbunden [198]. Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass Hypoxie und Bestrahlung, jedoch keine alkylierende Chemotherapie, NDRG1 auf unterschiedlichen Wegen aktivieren, was zu einer Resistenz gegenüber einer alkylierenden Chemotherapie führt [190].

Jedoch ist, im Gegensatz zur transkriptionellen Regulation von NDRG1 durch Hypoxie und Bestrahlung, die Signalkaskade, die die NDRG1-Phosphorylierung in TMZ-resistenten

Gliomzellen vermittelt, bislang unklar; es wird vermutet, dass sie höchstwahrscheinlich stromabwärts von mTOR zu finden ist [190]. So führte die Herunterregulierung des Rapamycin-unempfindlichen Begleiters der mTORC2-Untereinheit von mTOR (RICTOR), nicht jedoch des regulatorisch assoziierten Proteins der mTORC1-Untereinheit von mTOR (RAPTOR) zu einer Reduktion der NDRG1-Phosphorylierung und -Expression. Die Kontrolle der NDRG1-Phosphorylierung durch RICTOR ist unabhängig von seiner transkriptionellen Regulation von NDRG1 als knockdown von RICTOR in Zellen mit exogener NDRG1-Expression, was zu einer Verringerung der NDRG1-Phosphorylierung und anschließenden Sensibilisierung gegenüber TMZ führt [190]. Studien bei Pankreastumoren zeigten, dass die Phosphorylierung von NDRG1 an dieser spezifischen Stelle durch den mutmaßlichen mTOR-Downstream-Effektor Serumglucocorticoid-induzierte Proteinkinase 1 (SGK1) vermittelt wird [199]. Dexamethason (DEX), ein wesentlicher Bestandteil bei der Behandlung von malignen Gliomen als Mittel zur Kontrolle des Ödems, induzierte die Transkription von SGK1 und erhöhte die Phosphorylierung von NDRG1 bei T346. Ein Tierversuch mit U87MG-Zellen unterstützt einen negativen Einfluss von DEX auf die Wirksamkeit von TMZ [190]. Eine Pharmakologische Hemmung von SGK1 durch die Substanz "EMD638683" führte zu einer verminderten Phosphorylierung von T346 und überwand den NDRG1-vermittelten Schutz vor TMZ.

Zusammenfassend wurde NDRG1 als ein einzigartiges, durch Hypoxie, Steroide und mTORC2/SGK1 reguliertes Molekül in Gliomen identifiziert, das als prädiktiver Biomarker für die Reaktion auf die Behandlung mit TMZ in hochgradigen Gliomen verstanden werden kann. Seine TMZ-Schutzwirkung macht NDRG1 zu einem attraktiven Kandidaten für eine zielgerichtete Therapie nicht nur bei Gliomen, sondern auch bei einer Vielzahl anderer Krebsarten, möglicherweise durch Hemmung von SGK1. Die präklinischen Daten deuten auf mehrere Ebenen von zellinternen (mTORC1), Mikroumgebungen (Hypoxie) und iatrogenen (Radiotherapie, Dexamethason) Einfluss auf diesen kritischen Signalweg stromabwärts von mehreren Wachstumsfaktorrezeptoren hin. So kann der mTORC2/SGK1/NDRG1-Weg als Ziel für zukünftige präklinische und klinische Forschungen zur Therapieresistenz dienen.

## 6 Zusammenfassung

Trotz erheblicher Fortschritte in den letzten zehn Jahren bei der Aufklärung der molekularen Grundlagen von primären Hirntumoren gibt es nur wenige wirksame Therapien. Hypoxie-regulierte Moleküle spielen eine zentrale Rolle im Zusammenhang mit vaskulären Resistenzmechanismen gegenüber antiangiogener und alkylierender Therapie. Das N-myc-downstream-regulierte Gen 1 (NDRG1) wird durch eine Reihe unterschiedlichster Faktoren wie Hypoxie, Schwermetalle, DNA-Schäden, Hormone, Onkogen und Tumorsuppressor Gene exprimiert. Bisher durchgeführte Studien betonen die Rolle von NDRG1 in der Krebsentstehung, Bildung von Metastasen und Mechanismen, die zu einer Resistenzentwicklung gegenüber Chemotherapeutika führt; jedoch ist die genaue Funktion des Proteinprodukts von NDRG1 bisher noch ungeklärt [157]. Ziel der vorliegenden Studie war es, die Rolle von NDRG1 in Hinsicht auf die Gliomangiogenese, die Tumorzellproliferation und Tumorgroße sowie unter antiangiogener (Sunitinib) sowie chemotherapeutischer Behandlung (Temozolomid) zu evaluieren. Methodisch wurde hierfür ein etabliertes intrakranielles Tumormodell verwendet sowie magnetresonanztomographische Untersuchungen durchgeführt. Anschließend wurden die GBM-Tumorexeno-grafts mit NDRG1-überexprimierenden Tumorzellen sowie die Kontrollgruppe zur Beurteilung immunhistochemisch analysiert.

Eine Überexpression von NDRG1 resultiert in einer signifikanten Reduktion des Tumorstwachstums in vivo im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Dies resultiert in einem Überlebensvorteil der Tiere. Zudem wiesen die Tumore aus den NDRG1-überexprimierenden Gliomzellen eine signifikant geringere Tumorzellproliferationsrate (PHH3) auf verglichen mit der Kontrollgruppe. Zusätzlich konnte auch eine signifikant erniedrigte Endothelzellproliferation (Ki-67) festgestellt werden. Darüber hinaus waren in NDRG1-überexprimierenden U87MG-Tumoren reduzierte Gefäßstrukturen nachweisbar bei aufrechterhaltender Endothelzell-Perizyten-Interaktion. Zudem konnte in diesen Tumoren immunhistochemisch eine reduzierte Gefäßdichte dargestellt werden, wobei kein signifikanter Unterschied in der Gefäßreifung konstatiert wurde. Dieser antiangiogene Effekt von NDRG1 zeigt sich auch in Experimenten unter Therapie mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Sunitinib. So zeigt sich nur eine geringe Reduktion des Tumorstwachstums und der Gefäßdichte, sodass man von einem resistenten Verhalten gegenüber der antiangiogenen Therapie sprechen kann. Schließlich stellt sich in einer weiteren Versuchsreihe auch eine Resistenz der NDRG1-überexprimierenden Tumore gegenüber einer Therapie mit Temozolomid (TMZ) dar, wohingegen die TMZ-Therapie bei der Kontrollgruppe eine sehr gute Wirkung entfaltete. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass NDRG1 einen antiangiogenen Einfluss auf das sich entwickelnde mikrovaskuläre System im Gliom hat

und beteiligt sein könnte an der Entwicklung von Resistenzmechanismen gegenüber antiangiogenen und alkylierenden Therapeutika.

## Literaturverzeichnis

- [1] Thomas Broggini, Marie Wüstner, Christoph Harms, Lena Stange, Jonas Blaes, Carina Thomé, Ulrike Harms, Susanne Mueller, Markus Weiler, Wolfgang Wick, Peter Vajkoczy und Marcus Czabanka. *NDRG1 overexpressing gliomas are characterized by reduced tumor vascularization and resistance to antiangiogenic treatment*. 2016. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.06.026.
- [2] Maximilian Ruge, Martin Kocher, Norbert Lucas Carolin Weißand Galldiks, Stefan Grau und Roland Goldbrunner. „The treatment of gliomas in adulthood“. In: *Deutsches Ärzteblatt International* 115.20-21 (2018), S. 356–364. ISSN: 1866-0452. DOI: 10.3238/arztebl.2018.0356.
- [3] Quinn T Ostrom, Haley Gittleman, Peter Liao, Toni Vecchione-Koval, Yingli Wolinsky, Carol Kruchko und Jill S Barnholtz-Sloan. „CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010–2014“. In: *Neuro-Oncology* 19.suppl\_5 (11/2017), S. v1–v88. ISSN: 1522-8517. DOI: 10.1093/neuonc/nox158. URL: [http://academic.oup.com/neuro-oncology/article/19/suppl%7B%5C\\_%7D5/v1/4596648](http://academic.oup.com/neuro-oncology/article/19/suppl%7B%5C_%7D5/v1/4596648).
- [4] Sarah Lapointe, Arie Perry und Nicholas A Butowski. *Primary brain tumours in adults*. 2018. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)30990-5.
- [5] David N Louis, Arie Perry, Guido Reifenberger, Andreas von Deimling, Dominique Figarella-Branger, Webster K Cavenee, Hiroko Ohgaki, Otmar D Wiestler, Paul Kleihues und David W Ellison. „The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary“. In: *Acta Neuropathologica* 131.6 (06/2016), S. 803–820. ISSN: 0001-6322. DOI: 10.1007/s00401-016-1545-1. URL: <http://link.springer.com/10.1007/s00401-016-1545-1>.
- [6] Farina Hanif, Saima M Malhi, Kahkashan Perveen, Shabana U Simjee und Kanza Muzaffar. „Glioblastoma multiforme: A review of its epidemiology and pathogenesis through clinical presentation and treatment“. In: *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 18.1 (2017), S. 3–9. ISSN: 2476-762X. DOI: 10.22034/APJCP.2017.18.1.3.
- [7] E C Holland. „Glioblastoma multiforme: The terminator“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97.12 (06/2000), S. 6242–6244. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.97.12.6242. URL: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.97.12.6242>.
- [8] Elizabeth A Maher, Frank B Furnari, Robert M Bachoo, David H Rowitch, David N Louis, Webster K Cavenee und Ronald A DePinho. *Malignant glioma: Genetics and biology of a grave matter*. 2001. DOI: 10.1101/gad.891601.

- [9] Agnihotri S., Burrell K.E., Wolf A., Jalali S., Hawkins C., Rutka J.T. und Zadeh G. „Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies“. In: *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 61.1 (2013), S. 25–41. ISSN: 0004-069X. DOI: 10.1007/s00005-012-0203-0. URL: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord%7B%5C%7Dfrom=export%7B%5C%7Ddid=L52341813%7B%5C%7D0Ahttp://dx.doi.org/10.1007/s00005-012-0203-0>.
- [10] Andrew Messali, Reginald Villacorta und Joel W Hay. *A Review of the Economic Burden of Glioblastoma and the Cost Effectiveness of Pharmacologic Treatments*. 2014. DOI: 10.1007/s40273-014-0198-y.
- [11] Kathy Rock. „A clinical review of treatment outcomes in glioblastoma multiforme - The validation in a non-trial population of the results of a randomised Phase III clinical trial: Has a more radical approach improved survival?“ In: *British Journal of Radiology* 85.1017 (2012). ISSN: 0007-1285. DOI: 10.1259/bjr/83796755.
- [12] Hiroko Ohgaki und Paul Kleihues. „Epidemiology and etiology of gliomas“. In: *Acta Neuropathologica* 109.1 (01/2005), S. 93–108. ISSN: 0001-6322. DOI: 10.1007/s00401-005-0991-y. URL: <http://link.springer.com/10.1007/s00401-005-0991-y>.
- [13] Thakkar J.P., Dolecek T.A., Horbinski C., Ostrom Q.T., Lightner D.D., Barnholtz-Sloan J.S. und Villano J.L. „Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma“. In: *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 23.10 (2014), S. 1985–1996. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-14-0275. arXiv: NIHMS150003. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25053711%7B%5C%7D0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4185005%7B%5C%7D0Ahttp://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord%7B%5C%7Dfrom=export%7B%5C%7Ddid=L600120315%7B%5C%7D5Cnhttp://dx.doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-14-0275%7B%5C%7D5Cn>.
- [14] James L Fisher, Judith A Schwartzbaum, Margaret Wrensch und Joseph L Wiemels. „Epidemiology of brain tumors“. In: *neurologic.theclinics.com Neurol Clin* 25.867-90 (2007), S. 867–890. DOI: 10.1016/j.ncl.2007.07.002. URL: <https://www.clinicalkey.com/service/content/pdf/watermarked/1-s2.0-S0733861907000746.pdf?locale=en%7B%5C%7DUS>.
- [15] Gabriel Iacob und Eduard B Dinca. „Current data and strategy in glioblastoma multiforme.“ In: *Journal of medicine and life* 2.4 (2009), S. 386–393. ISSN: 1844-122X. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20108752%7B%5C%7D0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3019011>.



- [16] Peter D Inskip, Robert E Tarone, Elizabeth E Hatch, Timothy C Wilcosky, William R Shapiro, Robert G Selker, Howard A Fine, Peter M Black, Jay S Loeffler und Martha S Linet. „Cellular-Telephone Use and Brain Tumors“. In: *New England Journal of Medicine* 344.2 (01/2001), S. 79–86. ISSN: 0028-4793. DOI: 10.1056/NEJM200101113440201. URL: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM200101113440201>.
- [17] Melissa L Bondy, Michael E Scheurer, Beatrice Malmer, Jill S Barnholtz-Sloan, Faith G Davis, Dora Il'yasova, Carol Kruchko, Bridget J McCarthy, Preetha Rajaraman, Judith A Schwartzbaum, Siegal Sadetzki, Brigitte Schlehofer, Tarik Tihan, Joseph L Wiemels, Margaret Wrensch und Patricia A Buffler. „Brain tumor epidemiology: Consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium“. In: *Cancer* 113.S7 (2008), S. 1953–1968. ISSN: 0008543X. DOI: 10.1002/cncr.23741.
- [18] Salvati M., Frati A., Russo N., Caroli E., Polli F.M. und Minniti G. „Radiation-induced gliomas: Report of 10 cases and review of the literature“. In: *Surgical Neurology* 60.1 (2003), S. 60–67. ISSN: 0090-3019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/S0090-3019%2803%2900137-X>. URL: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS%7B%5C%7DPAGE=reference%7B%5C%7DD=emed9%7B%5C%7DNEWS=N%7B%5C%7DAN=36818958>.
- [19] Margaret Wrensch, Yuriko Minn, Terri Chew, Melissa Bondy und Mitchel S Berger. „Epidemiology of primary brain tumors: Current concepts and review of the literature“. In: *Neuro-Oncology* 4.4 (2004), S. 278–299. ISSN: 15228517. DOI: 10.1215/s152285170200011x.
- [20] Cory Adamson, Okezie O Kanu, Ankit I Mehta, Chunhui Di, Ningjing Lin, Austin K Mattox und Darell D Bigner. „Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going“. In: *Expert Opinion on Investigational Drugs* 18.8 (08/2009), S. 1061–1083. ISSN: 1354-3784. DOI: 10.1517/13543780903052764. URL: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/13543780903052764>.
- [21] Xiao-Yang Liu, Adam Fleming, Adam M Fontebasso, Jacek Majewski, Gelareh Zadeh, Nada Jabado, Nesrin Sabha, Guido Reifenberger, David T W Jones, Peter Siegel, Jeremy Schwartzentruber, Dong-Anh Khuong-Quang, Sidney Croul, Stefan Pfister, Djihad Hadjadj, Noha Gerges und Marcel Kool. *Frequent ATRX mutations and loss of expression in adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations*. 2012. DOI: 10.1007/s00401-012-1031-3.
- [22] Timothy F Cloughesy, Webster K Cavenee und Paul S Mischel. „Glioblastoma: From Molecular Pathology to Targeted Treatment“. In: *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 9.1 (01/2014), S. 1–25. ISSN: 1553-4006. DOI: 10.1146/annurev-pathol-011110-130324. URL: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-pathol-011110-130324>.

- [23] Kenneth Aldape, Gelareh Zadeh, Sheila Mansouri, Guido Reifenberger und Andreas von Deimling. „Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers“. In: *Acta Neuropathologica* 129.6 (06/2015), S. 829–848. ISSN: 0001-6322. DOI: 10.1007/s00401-015-1432-1. URL: <http://link.springer.com/10.1007/s00401-015-1432-1>.
- [24] Nakada M., Kita D., Watanabe T., Hayashi Y., Teng L. und Pyko I.V. „Aberrant signaling pathways in Glioma“. In: *Cancers* 3.3 (2011), S. 3242–3278. ISSN: 2072-6694. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers3033242>. URL: <http://www.mdpi.com/2072-6694/3/3/3242/pdf%7B%5C%7D0Ahttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS%7B%5C%7DPAGE=reference%7B%5C%7DD=emed13%7B%5C%7DNEWS=N%7B%5C%7DAN=362634968>.
- [25] Author Abm, Salah Uddin, Chief Editor und Stephen A Berman. „Neurologic Manifestations of Glioblastoma Multiforme“. In: *E* (2012). URL: <http://emedicine.medscape.com/%20https://emedicine.medscape.com/article/1156220-clinical>.
- [26] Omuro A. und DeAngelis L.M. „Glioblastoma and other malignant gliomas: A clinical review“. In: *JAMA - Journal of the American Medical Association* 310.17 (2013), S. 1842–1850. ISSN: 0098-7484. DOI: 10.1001/jama.2013.280319. URL: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord%7B%5C%7Dfrom=export%7B%5C%7Ddid=L370179037%7B%5C%7D0Ahttp://jama.jamanetwork.com/data/Journals/JAMA/928522/jrv130010.pdf%7B%5C%7D0Ahttp://dx.doi.org/10.1001/jama.2013.280319%7B%5C%7D0Ahttp://lh.cineca.it/Ccube/openclink.do?sid=EMBASE%7B%5C%7Dsid=>.
- [27] Maciej M Mrugala. „Advances and challenges in the treatment of glioblastoma: a clinician’s perspective.“ In: *Discovery medicine* 15.83 (2013), S. 221–230. ISSN: 1944-7930. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23636139>.
- [28] Santosh Kesari. „Understanding glioblastoma tumor biology: The potential to improve current diagnosis and treatments“. In: *Seminars in Oncology*. Bd. 38. SUPPL. 4. 2011, S2. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2011.09.005.
- [29] Kevin P Becker und James Yu. *Status quo-standard-of-care medical and radiation therapy for glioblastoma*. 2012. DOI: 10.1097/PP0.0b013e318244d7eb.
- [30] Walter Stummer, Uwe Pichlmeier, Thomas Meinel, Otmar Dieter Wiestler, Friedhelm Zanella und Hans Jürgen Reulen. „Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial“. In: *Lancet Oncology* 7.5 (2006), S. 392–401. ISSN: 14702045. DOI: 10.1016/S1470-2045(06)70665-9.

- [31] D A Reardon. „Therapeutic Advances in the Treatment of Glioblastoma: Rationale and Potential Role of Targeted Agents“. In: *The Oncologist* 11.2 (2006), S. 152–164. ISSN: 1083-7159. DOI: 10.1634/theoncologist.11-2-152.
- [32] Jacob Scott, Ya-Yu Tsai, Prakash Chinnaiyan und Hsiang-Hsuan Michael Yu. „Effectiveness of Radiotherapy for Elderly Patients With Glioblastoma“. In: *International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics* 81.1 (09/2011), S. 206–210. ISSN: 03603016. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2010.04.033. URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360301610006115>.
- [33] Chang J.E., Khuntia D., Robins H.I. und Mehta M.P. „Radiotherapy and radiosensitizers in the treatment of glioblastoma multiforme“. In: *Clinical Advances in Hematology and Oncology* 5.11 (2007), S. 894–915. ISSN: 1543-0790. URL: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord%7B%5C%7Dfrom=export%7B%5C%7Ddid=L351699408%7B%5C%7D5Cnhttp://www.clinicaladvances.com/article%7B%5C%7Dpdfs/ho-article-200711-chang.pdf%7B%5C%7D5Cnhttp://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE%7B%5C%7Dissn=15430790%7B%5C%7Ddid=doi:%7B%5C%7Datitle=Radiotherapy+and+ra>.
- [34] H S Friedman, T Kerby und H Calvert. „Temozolomide and treatment of malignant glioma.“ In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 6.7 (07/2000), S. 2585–2597. ISSN: 1078-0432. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10914698>.
- [35] Nimit Singhal, Sudarshan Selva-Nayagam und Michael P Brown. *Prolonged and severe myelosuppression in two patients after low-dose temozolomide treatment-case study and review of literature*. 2007. DOI: 10.1007/s11060-007-9403-6.
- [36] Sadhak Sengupta, Jaclyn Marrinan, Caroline Frishman und Prakash Sampath. *Impact of temozolomide on immune response during malignant glioma chemotherapy*. 2012. DOI: 10.1155/2012/831090.
- [37] Norden A.D. und Wen P.Y. „Glioma therapy in adults“. In: *Neurologist* 12.6 (2006), S. 279–292. ISSN: 1074-7931. URL: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord%7B%5C%7Dfrom=export%7B%5C%7Ddid=L44813664%7B%5C%7D5Cnhttp://dx.doi.org/10.1097/01.nrl.0000250928.26044.47%7B%5C%7D5Cnhttp://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE%7B%5C%7Dissn=10747931%7B%5C%7Ddid=doi:10.1097%7B%5C%7D2F01.nrl.0000250928.26044.47%7B%5C%7Datitle=Glio>.
- [38] L Kalaydjieva, J Hallmayer, D Chandler, A Savov, A Nikolova, D Angelicheva, R H King, B Ishpekova, K Honeyman, F Calafell, A Shmarov, J Petrova, I Turnev, A Hristova, M Moskov, S Stancheva, I Petkova, A H Bittles, V Georgieva, L Middleton und P K Thomas. „Gene mapping in Gypsies identifies a novel demyelinating

- neuropathy on chromosome 8q24“. In: *Nature Genetics* 14.2 (1996), S. 214–217. ISSN: 1061-4036. DOI: 10.1038/ng1096-214.
- [39] Andoni Echaniz-Laguna, Bertrand Degos, Céline Bonnet, Philippe Latour, Tarik Hamadouche, Nicolas Lévy und Bruno Leheup. „NDRG1-linked Charcot-Marie-Tooth disease (CMT4D) with central nervous system involvement“. In: *Neuromuscular Disorders* 17.2 (02/2007), S. 163–168. ISSN: 09608966. DOI: 10.1016/j.nmd.2006.10.002. URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960896606005748>.
- [40] Pascale Lachat, Philip Shaw, Sandra Gebhard, Nico van Belzen, Pascal Chaubert und Fred T Bosman. „Expression of NDRG1, a differentiation-related gene, in human tissues“. In: *Histochemistry and Cell Biology* 118.5 (11/2002), S. 399–408. ISSN: 0948-6143. DOI: 10.1007/s00418-002-0460-9. URL: <http://link.springer.com/10.1007/s00418-002-0460-9>.
- [41] Rui Hai Zhou, Koichi Kokame, Yoshitane Tsukamoto, Chikao Yutani, Hisao Kato und Toshiyuki Miyata. „Characterization of the human NDRG gene family: A newly identified member, NDRG4, is specifically expressed in brain and heart“. In: *Genomics* 73.1 (2001), S. 86–97. ISSN: 08887543. DOI: 10.1006/geno.2000.6496.
- [42] Xianghu Qu, Yun Zhai, Handong Wei, Chenggang Zhang, Guichun Xing, Yongtao Yu und Fuchu He. „Characterization and expression of three novel differentiation-related genes belong to the human NDRG gene family“. In: *Molecular and Cellular Biochemistry* 229.1-2 (2002), S. 35–44. ISSN: 03008177. DOI: 10.1023/A:1017934810825.
- [43] Kishan Lal Agarwala, Koichi Kokame, Hisao Kato und Toshiyuki Miyata. „Phosphorylation of RTP, an ER stress-responsive cytoplasmic protein“. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 272.3 (2000), S. 641–647. ISSN: 0006291X. DOI: 10.1006/bbrc.2000.2833.
- [44] Toshihiko Sugiki, Yoshitaka Taketomi, Rei Kikuchi-Yanoshita, Makoto Murakami und Ichiro Kudo. „Association of N-myc Downregulated Gene 1 with Heat-Shock Cognate Protein 70 in Mast Cells“. In: *Biological & Pharmaceutical Bulletin* *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 27.5 (2004), S. 628–633. ISSN: 0918-6158. DOI: 10.1248/bpb.27.628.
- [45] Bandyopadhyay S., Pai SK., Hirota S., Hosobe S., Takano Y., Saito K., Piquemal D., Commes T., Watabe M., Gross SC., Wang Y., Ran S. und Watabe K. „Role of the putative tumor metastasis suppressor gene Drg-1 in breast cancer progression.“ In: *Oncogene* 23.33 PG - 5675-81 (2004), S. 5675–5681. DOI: 10.1038/sj.onc.1207734. URL: NS%20-

- [46] Shin Nishio, Kimio Ushijima, Naotake Tsuda, Shuji Takemoto, Kouichiro Kawano, Tomohiko Yamaguchi, Naoyo Nishida, Tatsuyuki Kakuma, Hitoshi Tsuda, Takahiro Kasamatsu, Yuko Sasajima, Masayoshi Kage, Michihiko Kuwano und Toshiharu Kamura. „Cap43/NDRG1/Drg-1 is a molecular target for angiogenesis and a prognostic indicator in cervical adenocarcinoma“. In: *Cancer Letters* 264.1 (06/2008), S. 36–43. ISSN: 03043835. DOI: 10.1016/j.canlet.2008.01.020. URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383508000372>.
- [47] Siavash K Kurdistani, Paz Arizti, Corinne L Reimer, Mary M Sugrue, Stuart A Aaronson und Sam W Lee. „Inhibition of tumor cell growth by RTP/rit42 and its responsiveness to p53 and DNA damage“. In: *Cancer Research* 58.19 (1998), S. 4439–4444. ISSN: 00085472.
- [48] Y Inagaki, W Tang, H L Xu, Q Guo, K Mafune, T Konishi, M Nakata, Y Sugawara und N Kokudo. „Localization of N-myc downstream-regulated gene 1 in gastric cancer tissue“. In: *Digestive and Liver Disease* 41.2 (2009), S. 96–103. ISSN: 1590-8658. DOI: 10.1016/j.dld.2008.04.003.
- [49] Koichi Kokame, Hisao Kato und Toshiyuki Miyata. „Homocysteine-respondent genes in vascular endothelial cells identified by differential display analysis: GRP78/BiP and novel genes“. In: *Journal of Biological Chemistry* 271.47 (1996), S. 29659–29665. ISSN: 00219258. DOI: 10.1074/jbc.271.47.29659.
- [50] David Piquemal, Dominique Joulia, Patrick Balaguer, Annie Basset, Jacques Marti und Thérèse Commes. „Differential expression of the RTP/Drg1/Ndr1 gene product in proliferating and growth arrested cells“. In: *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1450.3 (1999), S. 364–373. ISSN: 01674889. DOI: 10.1016/S0167-4889(99)00056-7.
- [51] Su Chen, Yu Hui Han, Ying Zheng, Meng Zhao, Hua Yan, Qiao Zhao, Guo Qiang Chen und Dao Li. „NDRG1 contributes to retinoic acid-induced differentiation of leukemic cells“. In: *Leukemia Research* 33.8 (2009), S. 1108–1113. ISSN: 01452126. DOI: 10.1016/j.leukres.2008.10.016.
- [52] Pat P Ongusaha, Sam W Lee, Siavash K Kurdistani, Masafumi Nakamura, Young-Kwon Hong, Kyung-tae Kim und Kun Ping Lu. „Function of Drg1/Rit42 in p53-dependent Mitotic Spindle Checkpoint“. In: *Journal of Biological Chemistry* 279.37 (2004), S. 38597–38602. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.M400781200.
- [53] Susanne Stein, Emily K. Thomas, Birger Herzog, Matthew D. Westfall, Jonathan V. Rocheleau, Roger S. Jackson, Mai Wang und Peng Liang. „NDRG1 Is Necessary for p53-dependent Apoptosis“. In: *Journal of Biological Chemistry* 279.47 (11/2004), S. 48930–48940. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.M400386200. URL: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M400386200>.

- [54] Semenza GL. „Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1“. In: *Annu Rev Cell Dev Biol* 15 (1999), S. 551–578. URL: <http://dx.doi.org/10.1146/ANNUREV.CELLBIO.15.1.551>.
- [55] Sarah R Walmsley, Naomi N McGovern, Moira K B Whyte und Edwin R Chilvers. *The HIF/VHL pathway: From oxygen sensing to innate immunity*. 2008. DOI: 10.1165/rcmb.2007-0331TR.
- [56] Nghia T V Le und Des R Richardson. „Iron chelators with high antiproliferative activity up-regulate the expression of a growth inhibitory and metastasis suppressor gene: A link between iron metabolism and proliferation“. In: *Blood* 104.9 (2004), S. 2967–2975. ISSN: 00064971. DOI: 10.1182/blood-2004-05-1866.
- [57] Chun Nam Lok und Prem Ponka. „Identification of a Hypoxia Response Element in the Transferrin Receptor Gene“. In: *Journal of Biological Chemistry* 274.34 (08/1999), S. 24147–24152. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.274.34.24147. URL: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.274.34.24147>.
- [58] A Madan und P T Curtin. „A 24-base-pair sequence 3' to the human erythropoietin gene contains a hypoxia-responsive transcriptional enhancer.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90.9 (2006), S. 3928–3932. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.90.9.3928.
- [59] K Salnikow, T Kluz, M Costa, D Piquemal, Z N Demidenko, K Xie und M V Blagosklonny. „The Regulation of Hypoxic Genes by Calcium Involves c-Jun/AP-1, Which Cooperates with Hypoxia-Inducible Factor 1 in Response to Hypoxia“. In: *Molecular and Cellular Biology* 22.6 (2002), S. 1734–1741. ISSN: 0270-7306. DOI: 10.1128/mcb.22.6.1734-1741.2002.
- [60] Hakan Cangul. „Hypoxia upregulates the expression of the NDRG1 gene leading to its overexpression in various human cancers“. In: *BMC Genetics* 5 (2004). ISSN: 14712156. DOI: 10.1186/1471-2156-5-27.
- [61] Sonja Sibold, Vincent Roh, Adrian Keogh, Peter Studer, Céline Tiffon, Eliane Angst, Stephan A Vorburger, Rosemarie Weimann, Daniel Candinas und Deborah Stroka. „Hypoxia increases cytoplasmic expression of NDRG1, but is insufficient for its membrane localization in human hepatocellular carcinoma“. In: *FEBS Letters* 581.5 (2007), S. 989–994. ISSN: 00145793. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.01.080.
- [62] Patrick H Maxwell, Michael S Wiesener, Gin-Wen Chang, Steven C Clifford, Emma C Vaux, Matthew E Cockman, Charles C Wykoff, Christopher W Pugh, Eamonn R Maher und Peter J Ratcliffe. „The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis“. In: *Nature* 399.6733 (05/1999), S. 271–275. ISSN: 0028-0836. DOI: 10.1038/20459. URL: <http://www>.

- ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10353251%7B%5C%%7D5Cnhttp://www.nature.com/doi/finder/10.1038/20459%20http://www.nature.com/articles/20459.
- [63] Michael Ohh, Cheol Won Park, Mircea Ivan, Michael A Hoffman, Tae-you Kim, Eric Huang, Nikola Pavletich, Vincent Chau und William G Kaelin. „Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the“. In: *Nature Cell Biology* 2.July (2000), S. 423–427.
- [64] M E Cockman, N Masson, D R Mole, P Jaakkola, G W Chang, S C Clifford, E R Maher, C W Pugh, P J Ratcliffe und P H Maxwell. „Hypoxia inducible factor- $\alpha$  binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein“. In: *Journal of Biological Chemistry* 275.33 (2000), S. 25733–25741. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.M002740200.
- [65] Katsuaki Masuda, Mayumi Ono, Masahiro Okamoto, Wataru Morikawa, Michihiro Otsubo, Toshiro Migita, Masazumi Tsuneyosh, Heiwa Okuda, Taro Shuin, Seiji Naito und Michihiko Kuwano. „Downregulation of Cap43 gene by von Hippel-Lindau tumor suppressor protein in human renal cancer cells“. In: *International Journal of Cancer* 105.6 (2003), S. 803–810. ISSN: 00207136. DOI: 10.1002/ijc.11152.
- [66] M Costa, D Zhou und K Salnikow. „Cap43, a novel gene specifically induced by Ni<sup>2+</sup> compounds“. In: *Cancer Research* 58.10 (1998), S. 2182.
- [67] Maria Antonietta Zoroddu, Teresa Kowalik-Jankowska, Henryk Kozlowski, Konstantin Salnikow und Max Costa. „Ni(II) and Cu(II) Binding with a 14-aminoacid Sequence of Cap43 protein, TRRSHTSEGTSSR“. In: *Journal of Inorganic Biochemistry* 84.1-2 (2001), S. 47–54. ISSN: 01620134. DOI: 10.1016/S0162-0134(00)00204-X.
- [68] Jun Li und Leo Kretzner. *The growth-inhibitory Ndr1 gene is a Myc negative target in human neuroblastomas and other cell types with overexpressed N- or c-myc*. 2003. DOI: 10.1023/A:1024918328162.
- [69] Konstantin Salnikow, Tomasz Kluz und Max Costa. „Role of Ca<sup>2+</sup> in the regulation of nickel-inducible Cap43 gene expression“. In: *Toxicology and Applied Pharmacology* 160.2 (1999), S. 127–132. ISSN: 0041008X. DOI: 10.1006/taap.1999.8759.
- [70] Aaron Barchowsky, Nicole V Soucy, Kimberley A O'Hara, John Hwa, Trisha L No-reault und Angeline S Andrew. „A novel pathway for nickel-induced interleukin-8 expression“. In: *Journal of Biological Chemistry* 277.27 (2002), S. 24225–24231. ISSN: 00219258. DOI: 10.1074/jbc.M202941200.
- [71] Dietrich Büsselberg. „Calcium channels as target sites of heavy metals“. In: *Toxicology Letters* 82-83.C (1995), S. 255–261. ISSN: 03784274. DOI: 10.1016/0378-4274(95)03559-1.

- [72] G W Zamponi, E Bourinet und T P Snutch. „Nickel block of a family of neuronal calcium channels: Subtype- and subunit-dependent action at multiple sites“. In: *Journal of Membrane Biology* 151.1 (1996), S. 77–90. ISSN: 0022-2631. DOI: 10.1007/s002329900059.
- [73] Juan Bernal, Jung-Ha Lee, Leanne L Cribbs und Edward Perez-Reyes. „Full reversal of Pb<sup>++</sup> block of L-type Ca<sup>++</sup> channels requires treatment with heavy metal antidotes“. In: *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 282.1 (1997), S. 172–180. ISSN: 0022-3565.
- [74] B Tarabova. „Inorganic Mercury and Methylmercury Inhibit the Cav3.1 Channel Expressed in Human Embryonic Kidney 293 Cells by Different Mechanisms“. In: *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 317.1 (12/2005), S. 418–427. ISSN: 0022-3565. DOI: 10.1124/jpet.105.095463. URL: <http://jpet.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/jpet.105.095463>.
- [75] Zizheng Dong, Randy J Arnold, Youyun Yang, Myung Hee Park, Petra Hrnčirova, Yehia Mechref, Milos V Novotny und Jian-Ting Zhang. „Modulation of Differentiation-related Gene 1 Expression by Cell Cycle Blocker Mimosine, Revealed by Proteomic Analysis“. In: *Molecular & Cellular Proteomics* 4.7 (2005), S. 993–1001. ISSN: 1535-9476. DOI: 10.1074/mcp.m500044-mcp200.
- [76] Zaklina Kovacevic, Dong Fu und Des R Richardson. „The iron-regulated metastasis suppressor, NdrG-1: Identification of novel molecular targets“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1783.10 (10/2008), S. 1981–1992. ISSN: 01674889. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2008.05.016. URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167488908001791>.
- [77] M Unoki und Y Nakamura. „Growth-suppressive effects of BPOZ and EGR2, two genes involved in the PTEN signaling pathway“. In: *Oncogene* 20.33 (2001), S. 4457–4465. ISSN: 0950-9232. DOI: 10.1038/sj.onc.1204608.
- [78] Sucharita Bandyopadhyay, Sudha K Pai, Shigeru Hirota, Sadahiro Hosobe, Taisei Tsukada, Kunio Miura, Yukio Takano, Ken Saito, Therese Commes, David Piquemal, Misako Watabe, Steven Gross, Ying Wang, Jodi Huggenvik und Kounosuke Watabe. „PTEN up-regulates the tumor metastasis suppressor gene Drg-1 in prostate and breast cancer“. In: *Cancer Research* 64.21 (2004), S. 7655–7660. ISSN: 00085472. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1623.
- [79] L C Cantley und B G Neel. „New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96.8 (1999), S. 4240–4245. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.96.8.4240. URL: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.96.8.4240>.



- [80] P L Dahia. „PTEN, a unique tumor suppressor gene.“ In: *Endocrine-related cancer* 7.2 (06/2000), S. 115–129. ISSN: 1351-0088. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Dahia+PL.+PTEN%7B%5C%%7D2C+a+unique+tumor+suppressor+gene.%20http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10903528>.
- [81] Maruyama Y., Ono M., Kawahara A., Yokoyama T., Basaki Y., Kage M., Aoyagi S. und Kinoshita H. „Tumor growth suppression in pancreatic cancer by a putative metastasis suppressor gene Cap43/NDRG1/Drg-1 through modulation of angiogenesis“. In: *Cancer Research* 66.12 (2006), S. 6233–6242. ISSN: 0008-5472. DOI: <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0183>. URL: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS%7B%5C%%7DPAGE=reference%7B%5C%%7DD=emed9%7B%5C%%7DNEWS=N%7B%5C%%7DAN=44005868>.
- [82] Hakan Cangul, Konstantin Salnikow, Herman Yee, David Zagzag, Therese Commes und Max Costa. „Enhanced overexpression of an HIF-1/hypoxia-related protein in cancer cells“. In: *Environmental Health Perspectives* 110.SUPPL. 5 (2002), S. 783–788. ISSN: 00916765.
- [83] Wang Z., Wang F., Wang W.-Q., Gao Q., Wei W.-L., Yang Y. und Wang G.-Y. „Correlation of N-myc downstream-regulated gene 1 overexpression with progressive growth of colorectal neoplasm“. In: *World Journal of Gastroenterology* 10.4 (2004), S. 550–554. ISSN: 1007-9327. URL: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord%7B%5C%%7Dfrom=export%7B%5C%%7Ddid=L38325313%7B%5C%%7D5Cnhttp://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE%7B%5C%%7Dissn=10079327%7B%5C%%7Ddid=doi:%7B%5C%%7Datitle=Correlation+of+N-myc+downstream-regulated+gene+1+overexpression+with+progressive+growth+of+color>.
- [84] Mei-Sze Chua, Hongbo Sun, Siu T Cheung, Veronica Mason, John Higgins, Douglas T Ross, Sheung T Fan und Samuel So. „Overexpression of NDRG1 is an indicator of poor prognosis in hepatocellular carcinoma“. In: *Modern Pathology* 20.1 (01/2007), S. 76–83. ISSN: 0893-3952. DOI: 10.1038/modpathol.3800711. URL: <http://www.oncotarget.com/fulltext/22665%20http://www.nature.com/articles/3800711>.
- [85] Xinrui Yan, Mei Sze Chua, Hongbo Sun und Samuel So. „N-Myc down-regulated gene 1 mediates proliferation, invasion, and apoptosis of hepatocellular carcinoma cells“. In: *Cancer Letters* 262.1 (2008), S. 133–142. ISSN: 03043835. DOI: 10.1016/j.canlet.2007.12.010.
- [86] T Ando, H Ishiguro, M Kimura, A Mitsui, H Kurehara, N Sugito, K Tomoda, R Mori, N Takashima, R Ogawa, Y Fujii und Y Kuwabara. „Decreased expression of NDRG1 is correlated with tumor progression and poor prognosis in patients with esophage-

- al squamous cell carcinoma“. In: *Diseases of the Esophagus* 19.6 (2006), S. 454–458. ISSN: 1442-2050. DOI: 10.1111/j.1442-2050.2006.00618.x.
- [87] Strzelczyk B., Szulc Szutowicz A., Rzepko R., Kitowska A., Skokowski J., Szulc Szutowicz A., Pawelczyk T., Barbara Strzelczyk, Aneta Szulc, Robert Rzepko, Agnieszka Kitowska, Jaroslaw Skokowski, Andrzej Szutowicz und Tadeusz Pawelczyk. „Identification of high-risk stage II colorectal tumors by combined analysis of the NDRG1 gene expression and the depth of tumor invasion.“ In: *Annals of surgical oncology* 16.5 (2009), S. 1287–1294. DOI: 10.1245/s10434-009-0381-0. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19259744><http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS%7B%5C%7DPAGE=reference%7B%5C%7DD=med5%7B%5C%7DNEWS=N%7B%5C%7DAN=19259744%7B%5C%7D5Cnhttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS%7B%5C%7DPAGE=reference%7B%5C%7DD=emed9%7B%5C%7DNEWS=N%7B%5C%7DAN=2009172906>.
- [88] Boqian Sun, Dake Chu, Wei Li, Xiaodan Chu, Yunming Li, Dun Wei und Haiping Li. „Decreased expression of NDRG1 in glioma is related to tumor progression and survival of patients“. In: *Journal of Neuro-Oncology* 94.2 (2009), S. 213–219. ISSN: 0167594X. DOI: 10.1007/s11060-009-9859-7.
- [89] Takehiko Segawa, Linda L Xu, Rao N Chilukuri, Mazen Makarem, Gyorgy Petrovics, David G McLeod, Judd W Moul, Shiv Srivastava, Martin E Nau, Maryanne Vahey, Wei Zhang und Isabell A Sesterhenn. „Androgen-induced expression of endoplasmic reticulum (ER) stress response genes in prostate cancer cells“. In: *Oncogene* 21.57 (2002), S. 8749–8758. ISSN: 0950-9232. DOI: 10.1038/sj.onc.1205992.
- [90] Minori Koshiji, Kam-Meng Tchou-Wong, Kensuke Kumamoto, Shinji Ohki, Seiichi Takenoshita, Curtis C Harris, Keilchirou Morimura, Yasufumi Utsumi, Michiko Aizawa, Masami Hoshino, Thérèe Commes, David Piquemal und Max Costa. „Correlation of N-myc downstream-regulated gene 1 expression with clinical outcomes of colorectal cancer patients of different race/ethnicity“. In: *World Journal of Gastroenterology* 13.20 (2007), S. 2803–2810. ISSN: 1007-9327. DOI: 10.3748/wjg.v13.i20.2803.
- [91] J Blaes, M Weiler, F Sahn, B Hentschel, M Osswald, M Czabanka, C M Thomé, M G Schliesser, S Pusch, S Luger, F Winkler, A Radbruch, M Jugold, M Simon, J P Steinbach, G Schackert, M Tatagiba, M Westphal, J C Tonn, D Gramatzki, T Pietsch, C Hartmann, H Glimm, P Vajkoczy, A von Deimling, M Platten, M Weller und W Wick. „NDRG1 prognosticates the natural course of disease in WHO grade II glioma“. In: *Journal of Neuro-Oncology* 117.1 (03/2014). Hrsg. von Pietsch T D, Hartmann C, Glimm H, Vajkoczy P, von Deimling A, Platten M, Weller M und

- Wick W, S. 25–32. ISSN: 0167-594X. DOI: 10.1007/s11060-013-1357-2. URL: <http://link.springer.com/10.1007/s11060-013-1357-2>.
- [92] Harun Muayad Said, Roghaiyeh Safari, Ghada Al-Kafaji, Ralf Ingo Ernestus, Mario Löhr, Astrid Katzer, Michael Flentje und Carsten Hagemann. „Time- and oxygen-dependent expression and regulation of NDRG1 in human brain cancer cells“. In: *Oncology Reports* 37.6 (2017), S. 3625–3634. ISSN: 17912431. DOI: 10.3892/or.2017.5620.
- [93] Wei Ma, Meng Na, Chongyang Tang, Haiyang Wang und Zhiguo Lin. „Overexpression of N-myc downstream-regulated gene 1 inhibits human glioma proliferation and invasion via phosphoinositide 3-kinase/AKT pathways“. In: *Molecular Medicine Reports* 12.1 (2015), S. 1050–1058. ISSN: 17913004. DOI: 10.3892/mmr.2015.3492.
- [94] Monica Motwani, Francis M Sirotnak, Yuhong She, Therese Commes und Gary K Schwartz. „Drg1, a novel target for modulating sensitivity to CPT-11 in colon cancer cells“. In: *Cancer Research* 62.14 (2002), S. 3950–3955. ISSN: 00085472.
- [95] Marcus Czabanka, Mara Vinci, Frank Heppner, Axel Ullrich und Peter Vajkoczy. „Effects of sunitinib on tumor hemodynamics and delivery of chemotherapy“. In: *International Journal of Cancer* 124.6 (2009), S. 1293–1300. ISSN: 00207136. DOI: 10.1002/ijc.24019.
- [96] M Czabanka, J Bruenner, G Parmaksiz, T Broggin, M Topalovic, S H Bayerl, G Auf, I Kremenetskaia, M Nieminen, A Jabouille, S Mueller, U Harms, C Harms, A Koch, F L Heppner und P Vajkoczy. „Combined temozolomide and sunitinib treatment leads to better tumour control but increased vascular resistance in O6-methylguanine methyltransferase-methylated gliomas“. In: *European Journal of Cancer* 49.9 (2013), S. 2243–2252. ISSN: 1879-0852. DOI: 10.1016/j.ejca.2013.02.019.
- [97] Mohammed Alnabari, Arad Oded, Danon Edna, Etlin Olga, Kaspi Joseph und Sery Yana. *Verbessertes Verfahren zur Herstellung von Temozolomid*. 2006. URL: <https://patents.google.com/patent/DE102006007309B4>.
- [98] M Hossein Khalilian, Saber Mirzaei und Avat Arman Taherpour. „The simulation of UV spectroscopy and electronic analysis of temozolomide and dacarbazine chemical decomposition to their metabolites“. In: *Journal of Molecular Modeling* 22.11 (2016), S. 11–22. ISSN: 09485023. DOI: 10.1007/s00894-016-3133-7.
- [99] Brian J Denny, Richard T Wheelhouse, Malcolm F G Stevens, Lincoln L H Tsang und John A Slack. „NMR and Molecular Modeling Investigation of the Mechanism of Activation of the Antitumor Drug Temozolomide and Its Interaction with DNA“. In:

- Biochemistry* 33.31 (08/1994), S. 9045–9051. ISSN: 0006-2960. DOI: 10.1021/bi00197a003. URL: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00197a003>.
- [100] Alessia Lo Dico, Cristina Martelli, Cecilia Diceglie, Giovanni Lucignani und Luisa Ottobrini. „Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  Activity as a Switch for Glioblastoma Responsiveness to Temozolomide“. In: *Frontiers in Oncology* 8.249 (2018). DOI: 10.3389/fonc.2018.00249.
- [101] Monika E Hegi, Annie-Claire Diserens, Thierry Gorlia, Marie-France Hamou, Nicolas de Tribolet, Michael Weller, Johan M Kros, Johannes A Hainfellner, Warren Mason, Luigi Mariani, Jacqueline E C Bromberg, Peter Hau, René O Mirimanoff, J Gregory Cairncross, Robert C Janzer und Roger Stupp. „MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma“. In: *New England Journal of Medicine* 352.10 (03/2005), S. 997–1003. ISSN: 0028-4793. DOI: 10.1056/NEJMoa043331. URL: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa043331>.
- [102] R Stupp, M Hegi, W P Mason, M J van den Bent, M J Taphoorn, R C Janzer, S K Ludwin, A Allgeier, B Fisher, K Belanger, P Hau, A.A., Brandes, J Gijtenbeek, C Marosi, C.J., Vecht, K Mokhtari, P Wesseling, S Villa, E Eisenhauer, T Gorlia, M Weller, D Lacombe, J.G., Cairncross und R O Mirimanoff. „Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma“. In: *New England Journal of Medicine* 352.10 (03/2005), S. 987–996. ISSN: 0028-4793. DOI: 10.1056/NEJMoa043330. URL: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa043330>.
- [103] Roger Stupp, Monika E Hegi, Warren P Mason, Martin J van den Bent, Martin J B Taphoorn, Robert C Janzer, Samuel K Ludwin, Anouk Allgeier, Barbara Fisher, Karl Belanger, Peter Hau, Alba A Brandes, Johanna Gijtenbeek, Christine Marosi, Charles J Vecht, Karima Mokhtari, Pieter Wesseling, Salvador Villa, Elizabeth Eisenhauer, Thierry Gorlia, Michael Weller, Denis Lacombe, J Gregory Cairncross und René-Olivier Mirimanoff. „Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial“. In: *The Lancet Oncology* 10.5 (05/2009), S. 459–466. ISSN: 14702045. DOI: 10.1016/S1470-2045(09)70025-7. URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470204509700257>.
- [104] Sandrine Faivre, George Demetri, William Sargent und Eric Raymond. *Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development*. 2007. DOI: 10.1038/nrd2380.
- [105] Dirk B Mendel, A Douglas Laird, Xiaohua Xin, Sharienne G Louie, James G Christensen, Guangmin Li, Randall E Schreck, Tinya J Abrams, Theresa J Ngai, Leslie B Lee, Lesley J Murray, Jeremy Carver, Emily Chan, Katherine G Moss, Joshua O

- Haznedar, Juthamas Sukbuntherng, Robert A Blake, Li Sun, Cho Tang, Todd Miller, Sheri Shirazian, Gerald McMahon und Julie M Cherrington. „In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship.“ In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 9.1 (01/2003), S. 327–337. ISSN: 1078-0432. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12538485>.
- [106] Tamalee R Kramp und Kevin Camphausen. „Combination Radiotherapy in an Orthotopic Mouse Brain Tumor Model“. In: *Journal of Visualized Experiments* 61 (03/2012). ISSN: 1940-087X. DOI: 10.3791/3397. URL: <http://www.jove.com/video/3397/>.
- [107] L R Gurley. *Histone Phosphorylation and Chromatin Structure during Mitosis in Chinese Hamster Cells - GURLEY - 2008 - European Journal of Biochemistry*. 1978.
- [108] Michael J Hendzel, Walter K Nishioka, Yves Raymond, C David Allis, David P Bazett-Jones und John P H Th'ng. „Chromatin Condensation Is Not Associated with Apoptosis“. In: *Journal of Biological Chemistry* 273.38 (09/1998), S. 24470–24478. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.273.38.24470. URL: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.273.38.24470>.
- [109] Shaye I Moskowitz, Tao Jin und Richard A Prayson. „Role of MIB1 in Predicting Survival in Patients with Glioblastomas“. In: *Journal of Neuro-Oncology* 76.2 (01/2006), S. 193–200. ISSN: 0167-594X. DOI: 10.1007/s11060-005-5262-1. URL: <http://link.springer.com/10.1007/s11060-005-5262-1>.
- [110] E M Pantelouris und J Hair. „Thymus dysgenesis in nude (nu nu) mice.“ In: *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 24.3 (1970), S. 615–623. ISSN: 0022-0752.
- [111] D Beier, J Wischhusen, Peter J Oefner, Alexander Brawanski, Ulrich Bogdahn, Peter Hau, Christoph P Beier, Annette Lohmeier, Ludwig Aigner und Martin Proescholdt. „CD133+ and CD133- Glioblastoma-Derived Cancer Stem Cells Show Differential Growth Characteristics and Molecular Profiles“. In: *Cancer Research* 67.9 (2007), S. 4010–4015. ISSN: 0008-5472. DOI: 10.1158/0008-5472.can-06-4180.
- [112] M H Tan, E D Holyoke und M H Goldrosen. „Murine colon adenocarcinoma: Syngeneic orthotopic transplantation and subsequent hepatic metastases“. In: *Journal of the National Cancer Institute* 59.5 (1977), S. 1537–1544. ISSN: 0027-8874. DOI: 10.1093/jnci/59.5.1537.

- [113] Robert S Kerbel. *Human tumor xenografts as predictive preclinical models for anticancer drug activity in humans: better than commonly perceived-but they can be improved*. 2003.
- [114] M C Bibby. „Orthotopic models of cancer for preclinical drug evaluation“. In: *European Journal of Cancer* 40.6 (04/2004), S. 852–857. ISSN: 09598049. DOI: 10.1016/j.ejca.2003.11.021. URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959804903010293>.
- [115] B Rubio-Viqueira und M Hidalgo. „Direct in vivo xenograft tumor model for predicting chemotherapeutic drug response in cancer patients“. In: *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 85.2 (2009), S. 217–221. ISSN: 00099236. DOI: 10.1038/clpt.2008.200.
- [116] Sumeer Lal, Michel Lacroix, Philip Tofilon, Gregory N Fuller, Raymond Sawaya und Frederick F Lang. „An implantable guide-screw system for brain tumor studies in small animals“. In: *Journal of Neurosurgery* 92.2 (2009), S. 326–333. ISSN: 0022-3085. DOI: 10.3171/jns.2000.92.2.0326.
- [117] R Nishikawa, X D Ji, R C Harmon, C S Lazar, G N Gill, W K Cavenee und H J Huang. „A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91.16 (1994), S. 7727–7731. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.91.16.7727. URL: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.91.16.7727>.
- [118] Shinya Yamada, Vazgen Khankaldyyan, Xiang Bu, Atsushi Suzuki, Ignacio Gonzalez-Gomez, Kouichi Takahashi, J Gordon McComb und Walter E Laug. „A method to accurately inject tumor cells into the caudate/putamen nuclei of the mouse brain.“ In: *The Tokai journal of experimental and clinical medicine* 29.4 (12/2004), S. 167–173. ISSN: 0385-0005. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15717488>.
- [119] Rahul Kasukurthi, Michael J Brenner, Amy M Moore, Arash Moradzadeh, Wilson Z Ray, Katherine B Santosa, Susan E Mackinnon und Daniel A Hunter. „Transcardial perfusion versus immersion fixation for assessment of peripheral nerve regeneration“. In: *Journal of Neuroscience Methods* 184.2 (11/2009), S. 303–309. ISSN: 01650270. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2009.08.019. URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165027009004658>.
- [120] T G Beach, H Tago, T Nagai, H Kimura, P L McGeer und E G McGeer. „Perfusion-fixation of the human brain for immunohistochemistry: comparison with immersion-fixation.“ In: *Journal of neuroscience methods* 19.3 (03/1987), S. 183–192. ISSN: 0165-0270. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2437408>.

- [121] Knut Dietzmann. „Möglichkeiten und Bedeutung der Neuropathologie für die Neurologie“. In: *Neurologie*. Elsevier, 2005, S. 127–133. DOI: 10.1016/B978-343723390-6.50016-4. URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9783437233906500164>.
- [122] Sophie de Boüard, Paulette Herlin, James G Christensen, Edwige Lemoisson, Pascal Gauduchon, Eric Raymond und Jean-Sébastien Guillamo. „Antiangiogenic and anti-invasive effects of sunitinib on experimental human glioblastoma“. In: *Neuro-Oncology* 9.4 (2007), S. 412–423. ISSN: 1522-8517. DOI: 10.1215/15228517-2007-024.
- [123] Qingyu Zhou und James M Gallo. „Differential effect of sunitinib on the distribution of temozolomide in an orthotopic glioma model“. In: *Neuro-Oncology* 11.3 (2009), S. 301–310. ISSN: 1522-8517. DOI: 10.1215/15228517-2008-088.
- [124] Q Zhou, H Lv, A R Mazloom, H Xu, A Ma’ayan und J M Gallo. „Activation of Alternate Prosurvival Pathways Accounts for Acquired Sunitinib Resistance in U87MG Glioma Xenografts“. In: *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 343.2 (2012), S. 509–519. DOI: 10.1124/jpet.112.196097.
- [125] Katherine L Osusky, Dennis E Hallahan, Allie Fu, Fei Ye, Yu Shyr und Ling Geng. „The receptor tyrosine kinase inhibitor SU11248 impedes endothelial cell migration, tubule formation, and blood vessel formation in vivo, but has little effect on existing tumor vessels“. In: *Angiogenesis* 7.3 (2004), S. 225–233. ISSN: 09696970. DOI: 10.1007/s10456-004-3149-y.
- [126] M F Stevens und J A Hickman. „Antitumor activity and pharmacokinetics in mice of 8-carbamoyl-3-(2-“. In: *Cancer Res* 4 (1987), S. 5846–5852. URL: [http://scholar.google.com/scholar?hl=en%7B%5C%7DbtnG=Search%7B%5C%7Dq=intitle:Antitumor+activity+and+pharmacokinetics+in+mice+of+8-carbamoyl-3-\(2-%7B%5C%7D4](http://scholar.google.com/scholar?hl=en%7B%5C%7DbtnG=Search%7B%5C%7Dq=intitle:Antitumor+activity+and+pharmacokinetics+in+mice+of+8-carbamoyl-3-(2-%7B%5C%7D4).
- [127] E S Newlands, G R Blackledge, J A Slack, G J Rustin, D B Smith, N S Stuart, C P Quarterman, R Hoffman, M F Stevens und M H Brampton. „Phase I trial of temozolomide“. In: *British Journal of Cancer* 65.2 (1992), S. 287–291. ISSN: 0007-0920. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1977719%7B%5C%7Dtool=pmcentrez%7B%5C%7Drendertype=abstract>.
- [128] S M O’Reilly, E S Newlands, M Brampton, M G Glaser, J M Rice-Edwards, R D Illingworth, P G Richards, C Kennard, I R Colquhoun, P Lewis und M F G Stevens. „Temozolomide: A new oral cytotoxic chemotherapeutic agent with promising activity against primary brain tumours“. In: *European Journal of Cancer* 29.7 (01/1993), S. 940–942. ISSN: 09598049. DOI: 10.1016/S0959-8049(05)80198-4. URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959804905801984>.

- [129] Yiwen Jiang und Lene Uhrbom. „On the origin of glioma“. In: *Upsala Journal of Medical Sciences* 117.2 (05/2012), S. 113–121. ISSN: 0300-9734. DOI: 10.3109/03009734.2012.658976. URL: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/03009734.2012.658976>.
- [130] D Beier, S Rohrl, Deepu R Pillai, Stefanie Schwarz, L A Kunz-Schughart, Petra Leukel, Martin Proescholdt, Alexander Brawanski, Ulrich Bogdahn, A Trampe-Kieslich, Bernd Giebel, J Wischhusen, Guido Reifenberger, Peter Hau und C P Beier. „Temozolomide Preferentially Depletes Cancer Stem Cells in Glioblastoma“. In: *Cancer Research* 68.14 (07/2008), S. 5706–5715. ISSN: 0008-5472. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6878. URL: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-07-6878>.
- [131] Andrea Salmaggi, Amerigo Boiardi, Maurizio Gelati, Annamaria Russo, Chiara Calatuzzolo, Emilio Ciusani, Francesca Luisa Sciacca, Arianna Ottolina, Eugenio Agostino Parati, Catehina La Porta, Giulio Alessandri, Carlo Marras, Danilo Croci und Marco De Rossi. „Glioblastoma-derived tumorspheres identify a population of tumor stem-like cells with angiogenic potential and enhanced multidrug resistance phenotype“. In: *GLIA* 54.8 (2006), S. 850–860. ISSN: 08941491. DOI: 10.1002/glia.20414.
- [132] Lo Dico A, Martelli C, Valtorta S, Raccagni I, Diceglie C, Belloli S, Gianelli U, Vaira V, Politi LS, Bosari S, Lucignani G, Moresco RM und Ottobrini L. „Identification of imaging biomarkers for the assessment of tumour response to different treatments in a preclinical glioma model“. In: *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 42.7 (2015), S. 1093–1105. ISSN: 1619-7089. DOI: 10.1007/s00259-015-3040-7.
- [133] G L Semenza. „Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics“. In: *Oncogene* 29.5 (2010), S. 625–634. ISSN: 1476-5594. DOI: 10.1038/onc.2009.441.
- [134] Joanna Reszec, Adam Hermanowicz, Robert Rutkowski, Piotr Bernaczyk, Zenon Mariak und Lech Chyczewski. „Evaluation of mast cells and hypoxia inducible factor-1 expression in meningiomas of various grades in correlation with peritumoral brain edema“. In: *Journal of Neuro-Oncology* 115.1 (10/2013), S. 119–125. ISSN: 0167-594X. DOI: 10.1007/s11060-013-1208-1. URL: <http://link.springer.com/10.1007/s11060-013-1208-1>.
- [135] Mehmet Yasar Kaynar, Galip Zihni Sanus, Hakan Hnimoglu, Tibet Kacira, Rahsan Kemerdere, Pinar Atukeren, Koray Gumustas, Bulent Canbaz und Taner Tanriverdi. „Expression of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  in tumors of patients with glioblastoma multiforme and transitional meningioma“. In: *Journal of Clinical Neuroscience* 15.9 (2008), S. 1036–1042. ISSN: 09675868. DOI: 10.1016/j.jocn.2007.07.080.



- [136] Anne R Diers, Praveen K Vayalil, Claudia R Oliva, Corinne E Griguer, Victor Darley-Usmar, Douglas R Hurst, Danny R Welch und Aimee Landar. „Mitochondrial Bioenergetics of Metastatic Breast Cancer Cells in Response to Dynamic Changes in Oxygen Tension: Effects of HIF-1 $\alpha$ “. In: *PLoS ONE* 8.6 (06/2013). Hrsg. von Janine Santos, e68348. ISSN: 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0068348. URL: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0068348>.
- [137] Marie Strickland und Elizabeth A Stoll. „Metabolic Reprogramming in Glioma“. In: *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 5 (04/2017). ISSN: 2296-634X. DOI: 10.3389/fcell.2017.00043. URL: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2017.00043/full>.
- [138] Zhonghua Luo, Yi Huan, Zhiqun Wu, Minghua Bai, Xian Xiao, Wei Zhang, Sanzhong Li, Xiang Zhang, Weidong Cao, Xuedong Liu und Xiaoliang Yang. „Silencing of HIF-1 $\alpha$  enhances the radiation sensitivity of human glioma growth in vitro and in vivo“. In: *Neuropharmacology* 89 (2015), S. 168–174. ISSN: 1873-7064. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2014.05.009.
- [139] Olivia Lanvin, Sylvie Monferran, Caroline Delmas, Bettina Couderc, Christine Toulas und Elizabeth Cohen-Jonathan-Moyal. „Radiation-induced mitotic cell death and glioblastoma radioresistance: A new regulating pathway controlled by integrin-linked kinase, hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  and survivin in U87 cells“. In: *European Journal of Cancer* 49.13 (2013), S. 2884–2891. ISSN: 09598049. DOI: 10.1016/j.ejca.2013.05.003.
- [140] Debbie Liao, Courtney Corle, Tiffany N Seagroves und Randall S Johnson. „Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  is a key regulator of metastasis in a transgenic model of cancer initiation and progression“. In: *Cancer Research* 67.2 (2007), S. 563–572. ISSN: 00085472. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2701.
- [141] Welsh S.J. und Corrie P.G. „Management of BRAF and MEK inhibitor toxicities in patients with metastatic melanoma“. In: *Therapeutic Advances in Medical Oncology* 7.2 (2015), S. 122–136. ISSN: 1758-8359. URL: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord%7B%5C%7Dfrom=export%7B%5C%7Ddid=L603021421%7B%5C%7D5Cnhttp://dx.doi.org/10.1177/1758834014566428%7B%5C%7D5Cnhttp://bj7rx7bn7b.search.serialssolutions.com?sid=EMBASE%7B%5C%7Dissn=17588359%7B%5C%7Ddid=doi:10.1177%7B%5C%7D2F1758834014566428%7B%5C%7Datitle=Management>.
- [142] Sebastian Kuger, Eemre Cörek, Bülent Polat, Ulrike Kämmerer, Michael Flentje und Cholpon S Ddjuzenova. „Novel PI3K and mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 radiosensitizes breast cancer cell lines under normoxic and hypoxic conditions“. In: *Breast Cancer: Basic and Clinical Research* 8.1 (2014), S. 39–49. ISSN: 11782234. DOI: 10.4137/BCBCR.S13693.

- [143] M Weiler, M Platten, T Batchelor, A W K Yung, M Weller und W Wick. „Pathway inhibition: emerging molecular targets for treating glioblastoma“. In: *Neuro-Oncology* 13.6 (2011), S. 566–579. ISSN: 1522-8517. DOI: 10.1093/neuonc/nor039.
- [144] Alessia Lo Dico, Viviana Costa, Cristina Martelli, Cecilia Diceglie, Francesca Rajata, Aroldo Rizzo, Carmine Mancone, Marco Tripodi, Luisa Ottobrini, Riccardo Alessandro und Alice Conigliaro. „MiR675-5p Acts on HIF-1 $\alpha$  to Sustain Hypoxic Responses: A New Therapeutic Strategy for Glioma“. In: *Theranostics* 6.8 (2016), S. 1105–1118. ISSN: 1838-7640. DOI: 10.7150/thno.14700. URL: <http://www.thno.org/v06p1105.htm>.
- [145] Hidehiro Takei, Meenakshi B Bhattacharjee, Andreana Rivera, Yeongju Dancer und Suzanne Z Powell. „New immunohistochemical markers in the evaluation of central nervous system tumors: a review of 7 selected adult and pediatric brain tumors.“ In: *Archives of pathology & laboratory medicine* 131.2 (02/2007), S. 234–241. DOI: 10.1043/1543-2165. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17284108>.
- [146] Oliver von Bohlen. „Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus“. In: *Cell and Tissue Research* 345.2011 (2011), S. 1–19. DOI: 10.1007/s00441-011-1196-4.
- [147] A A Sahin, J Y Ro, A K El-Naggar, P L Wilson, K Teague, M Blick und A G Ayala. „Tumor proliferative fraction in solid malignant neoplasms: A comparative study of Ki-67 immunostaining and flow cytometric determinations“. In: *American Journal of Clinical Pathology* 96.4 (1991), S. 512–519. ISSN: 0002-9173. DOI: 10.1093/ajcp/96.4.512.
- [148] D Seigneurin und P Guillaud. „[Ki-67 antigen, a cell cycle and tumor growth marker].“ In: *Pathologie-biologie* 39.10 (1991), S. 1020–1028. ISSN: 0369-8114. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1666669>.
- [149] Peter Baluk und Donald M McDonald. „Markers for microscopic imaging of lymphangiogenesis and angiogenesis“. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. Bd. 1131. 2008, S. 1–12. DOI: 10.1196/annals.1413.001.
- [150] Steven M Albelda, William A Muller, Clayton A Buck und Peter J Newman. „Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): A novel vascular cell-cell adhesion molecule“. In: *Journal of Cell Biology* 114.5 (1991), S. 1059–1068. ISSN: 00219525. DOI: 10.1083/jcb.114.5.1059.
- [151] Tiffany A Doucette, Ling Yuan Kong, Yuhui Yang, Sherise D Ferguson, Jinbo Yang, Jun Wei, Wei Qiao, Gregory N Fuller, Krishna P Bhat, Kenneth Aldape, Waldemar Priebe, Oliver Bögler, Amy B Heimberger und Ganesh Rao. „Signal transducer and activator of transcription 3 promotes angiogenesis and drives malignant progres-

- sion in glioma“. In: *Neuro-Oncology* 14.9 (2012), S. 1136–1145. ISSN: 15228517. DOI: 10.1093/neuonc/nos139.
- [152] Gabriele Bergers und Steven Song. „The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance“. In: *Neuro-Oncology* 7.4 (2005), S. 452–464. ISSN: 1522-8517. DOI: 10.1215/s1152851705000232.
- [153] D VONTELL, A ARMULIK und C BETSHOLTZ. „Pericytes and vascular stability“. In: *Experimental Cell Research* 312.5 (03/2006), S. 623–629. ISSN: 00144827. DOI: 10.1016/j.yexcr.2005.10.019. URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014482705004866>.
- [154] Roumen Balabanov und Paula Dore-Duffy. „Role of the CNS microvascular pericyte in the blood-brain barrier“. In: *Journal of Neuroscience Research* 53.6 (09/1998), S. 637–644. ISSN: 0360-4012. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4547(19980915)53:6<637::AID-JNR1>3.0.CO;2-6. URL: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19980915\)53:6%7B%5C%%7D3C637::AID-JNR1%7B%5C%%7D3E3.0.CO;2-6/pdf%20http://doi.wiley.com/10.1002/%7B%5C%%7D28SICI%7B%5C%%7D291097-4547%7B%5C%%7D2819980915%7B%5C%%7D2953%7B%5C%%7D3A6%7B%5C%%7D3C637%7B%5C%%7D3A%7B%5C%%7D3AAID-JNR1%7B%5C%%7D3E3.0.CO%7B%5C%%7D3B2-6](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-4547(19980915)53:6%7B%5C%%7D3C637::AID-JNR1%7B%5C%%7D3E3.0.CO;2-6/pdf%20http://doi.wiley.com/10.1002/%7B%5C%%7D28SICI%7B%5C%%7D291097-4547%7B%5C%%7D2819980915%7B%5C%%7D2953%7B%5C%%7D3A6%7B%5C%%7D3C637%7B%5C%%7D3A%7B%5C%%7D3AAID-JNR1%7B%5C%%7D3E3.0.CO%7B%5C%%7D3B2-6).
- [155] Louis M Sherwood, Edith E Parris und Judah Folkman. „Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications“. In: *New England Journal of Medicine* 285.21 (1971), S. 1182–1186. ISSN: 0028-4793. DOI: 10.1056/NEJM197111182852108. URL: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM197111182852108>.
- [156] J OK-Folkman. „Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease“. In: *Nature Medicine* 1.1 (1995), S. 27–31. ISSN: 10788956. URL: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0028929803%7B%5C%7DpartnerID=tZ0tx3y1>.
- [157] Agnieszka Kitowska und Tadeusz Pawelczyk. *N-myc downstream regulated 1 gene and its place in the cellular machinery*. 2010.
- [158] Rong J Guan, Heide L Ford, Yineng Fu, Youzhi Li, Leslie M Shaw und Arthur B Pardee. „Drg-1 as a differentiation-related, putative metastatic suppressor gene in human colon cancer“. In: *Cancer Research* 60.3 (2000), S. 749–755. ISSN: 00085472.
- [159] Nico Van Belzen, Winand N M Dinjens, Michaël P G Diesveld, Nicole A Groen, Angelique C J Van Der Made, Yoshihiro Nozawa, Remko Vlietstra, Jan Trapman und Fred T Bosman. „A novel gene which is up-regulated during colon epithelial cell differentiation and down-regulated in colorectal neoplasms“. In: *Laboratory Investigation* 77.1 (1997), S. 85–92. ISSN: 0023-6837.

- [160] Sucharita Bandyopadhyay, Sudha K Pai, Steven C Gross, Shigeru Hirota, Sadahiro Hosobe, Kunio Miura, Ken Saito, Therese Commes, Sunao Hayashi, Misako Watabe und Kounosuke Watabe. „The Drg-1 gene suppresses tumor metastasis in prostate cancer“. In: *Cancer Research* 63.8 (2003), S. 1731–1736. ISSN: 00085472.
- [161] Mitsutoshi Nakada. „The role of matrix metalloproteinases in glioma invasion“. In: *Frontiers in Bioscience* 8.5 (2007), e261–269. ISSN: 10939946. DOI: 10.2741/1016.
- [162] A J Bolteus, M E Berens und G J Pilkington. „Migration and invasion in brain neoplasms.“ In: *Current neurology and neuroscience reports* 1.3 (05/2001), S. 225–232. ISSN: 1528-4042. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11898522>.
- [163] Hosoi F., Izumi H., Kawahara A., Murakami Y., Kinoshita H., Kage M., Nishio K., Kohno K. und Kuwano M. „N-myc downstream regulated gene 1/Cap43 suppresses tumor growth and angiogenesis of pancreatic cancer through attenuation of inhibitor of kappaB kinase beta expression“. In: *Cancer Research* 69.12 (2009), S. 4983–4991. ISSN: 0008-5472. DOI: <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4882>. URL: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/reprint/69/12/4983%7B%5C%7D0Ahttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS%7B%5C%7DPAGE=reference%7B%5C%7DD=emed11%7B%5C%7DNEWS=N%7B%5C%7DAN=354756599>.
- [164] L Persano, F Pistollato, E Rampazzo, A Della Puppa, S Abbadi, C Frasson, F Volpin, S Indraccolo, R Scienza und G Basso. „BMP2 sensitizes glioblastoma stem-like cells to Temozolomide by affecting HIF-1 $\alpha$  stability and MGMT expression“. In: *Cell Death and Disease* 3.10 (2012). ISSN: 2041-4889. DOI: 10.1038/cddis.2012.153.
- [165] Wong E.T. und Brem S. „Antiangiogenesis treatment for glioblastoma multiforme: Challenges and opportunities“. In: *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 6.5 (2008), S. 515–522. DOI: 10.6004/jnccn.2008.0039. URL: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord%7B%5C%7Dfrom=export%7B%5C%7Ddid=L351760842>.
- [166] Tate M.C. und Aghi M.K. „Biology of Angiogenesis and Invasion in Glioma“. In: *Neurotherapeutics* 6.3 (2009), S. 447–457. ISSN: 1933-7213. DOI: 10.1016/j.nurt.2009.04.001. URL: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1016%7B%5C%7D2Fj.nurt.2009.04.001.pdf%7B%5C%7D0Ahttp://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord%7B%5C%7Dfrom=export%7B%5C%7Ddid=L354770297%7B%5C%7D0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.nurt.2009.04.001>.

- [167] Valéry L Payen, Lucie Brisson, Mark W Dewhirst und Pierre Sonveaux. *Common responses of tumors and wounds to hypoxia*. 2015. DOI: 10.1097/PP0.0000000000000098.
- [168] Harun M Said, Buelent Polat, Adrian Staab, Michael Flentje, Dirk Vordermark, Susanne Stein, Matthias Theobald, Carsten Hagemann, Jelena Anacker und Beate Schoemig. „Oxygen-dependent regulation of NDRG1 in human glioblastoma cells in vitro and in vivo“. In: *Oncology Reports* 21.1 (2009), S. 237–246. ISSN: 1791-2431. DOI: 10.3892/or\_00000214.
- [169] Vanessa M Banz, Adrian Keogh, Cynthia Furer, Daniel Candinas, Deborah Stroka, Michaela Medová und Yitzhak Zimmer. „Hsp90 transcriptionally and post-translationally regulates the expression of NDRG1 and maintains the stability of its modifying kinase GSK3 $\beta$ “. In: *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1793.10 (2009), S. 1597–1603. ISSN: 0167-4889. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2009.08.002.
- [170] Helena Khaliullina, Nicola Love und William Harris. „Nutrient-Deprived Retinal Progenitors Proliferate in Response to Hypoxia: Interaction of the HIF-1 and mTOR Pathway“. In: *Journal of Developmental Biology* 4.2 (2016), S. 17. DOI: 10.3390/jdb4020017.
- [171] Shiro Koizume, Shin Ito, Yoshiyasu Nakamura, Mitsuyo Yoshihara, Mitsuko Furuya, Roppei Yamada, Etsuko Miyagi, Fumiki Hirahara, Yasuo Takano und Yohei Miyagi. „Lipid starvation and hypoxia synergistically activate ICAM1 and multiple genes in an Sp1-dependent manner to promote the growth of ovarian cancer“. In: *Molecular Cancer* 14.1 (2015). ISSN: 14764598. DOI: 10.1186/s12943-015-0351-z.
- [172] Feray Kockar. „Hypoxia and cytokines regulate carbonic anhydrase 9 expression in hepatocellular carcinoma cells in vitro“. In: *World Journal of Clinical Oncology* 3.6 (2012), S. 82–91. ISSN: 2218-4333. DOI: 10.5306/wjco.v3.i6.82. URL: <http://www.wjgnet.com/2218-4333/full/v3/i6/82.htm>.
- [173] Nam D.H., Park K., Park C., Im Y.H., Kim M.H., Lee S., Hong S.C., Shin H.J., Kim J.H., Eoh W., McDonnell T.J., Do-Hyun Nam, Kwan Park, Chaehwa Park, Young-Hyuck Im, Mi-Hyun Kim, Sangjun Lee, Seung-Chyul Hong, Hyung-Jin Shin, Jong-Hyun Kim, Whan Eoh, Timothy J McDonnell, Nam D.H., Park K., Park C., Im Y.H., Kim M.H., Lee S., Hong S.C., Shin H.J., Kim J.H., Eoh W. und McDonnell T.J. „Intracranial inhibition of glioma cell growth by cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib.“ In: *Oncology reports* 11.2 (2004), S. 263–268. ISSN: 1021-335X. URL: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord%7B%5C%7Dfrom=export%7B%5C%7Ddid=L38974216>.

- [174] G L Semenza. „Involvement of oxygen-sensing pathways in physiologic and pathologic erythropoiesis“. In: *Blood* 114.10 (09/2009), S. 2015–2019. ISSN: 0006-4971. DOI: 10.1182/blood-2009-05-189985. URL: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2009-05-189985>.
- [175] Harun M Said, Adrian Staab, Carsten Hagemann, Giles H Vince, Astrid Katzer, Michael Flentje und Dirk Vordermark. „Distinct patterns of hypoxic expression of carbonic anhydrase IX (CA IX) in human malignant glioma cell lines“. In: *Journal of Neuro-Oncology* 81.1 (2007), S. 27–38. ISSN: 0167594X. DOI: 10.1007/s11060-006-9205-2.
- [176] Napoleone Ferrara und Robert S Kerbel. „Angiogenesis as a therapeutic target“. In: *Nature* 438.7070 (12/2005), S. 967–974. ISSN: 0028-0836. DOI: 10.1038/nature04483. URL: <http://www.nature.com/articles/nature04483>.
- [177] A McIntyre und A L Harris. „Metabolic and hypoxic adaptation to anti-angiogenic therapy: a target for induced essentiality“. In: *EMBO Molecular Medicine* 7.4 (2015), S. 368–379. ISSN: 1757-4676. DOI: 10.15252/emmm.201404271.
- [178] Moserle L., Jiménez-Valerio G. und Casanovas O. „Antiangiogenic therapies: Going beyond their limits“. In: *Cancer Discovery* 4.1 (2014), S. 31–41. ISSN: 2159-8274. DOI: 10.1158/2159-8290.cd-13-0199. URL: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord%7B%5C%7Dfrom=export%7B%5C%7Ddid=L372087109%7B%5C%7D0Ahttp://cancerdiscovery.aacrjournals.org/content/4/1/31.full.pdf%7B%5C%7D0Ahttp://dx.doi.org/10.1158/2159-8290.cd-13-0199>.
- [179] Svetlana M Stamatovic, Richard F Keep, Marija Mostarica-Stojkovic und Anuska V Andjelkovic. „CCL2 Regulates Angiogenesis via Activation of Ets-1 Transcription Factor“. In: *The Journal of Immunology* 177.4 (08/2006), S. 2651–2661. ISSN: 0022-1767. DOI: 10.4049/jimmunol.177.4.2651. URL: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.177.4.2651>.
- [180] Linda Metheny-Barlow und Lu Yuan Li. *Vascular endothelial growth inhibitor (VEGI), an endogenous negative regulator of angiogenesis*. 2006. DOI: 10.1080/08820530500511446.
- [181] Gonsky R., Deem R.L. und Targan S.R. „Multiple activating and repressive cis-promoter regions regulate TNFSF15 expression in human primary mononuclear cells“. In: *Cytokine* 63.1 (2013), S. 36–42. ISSN: 1043-4666. DOI: 10.1016/j.cyto.2013.04.004. URL: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord%7B%5C%7Dfrom=export%7B%5C%7Ddid=L52561136%7B%5C%7D0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2013.04.004%7B%5C%7D0Ahttp://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE%7B%5C%7Dissn=10434666%7B%5C%7Ddid=doi>

- 10.1016/j.cyt.2013.04.004&title=Multiple+activating+.
- [182] H Sağsöz und B G Saruhan. „The expression of vascular endothelial growth factor and its receptors (flt1/fms, flk1/KDR, flt4) and vascular endothelial growth inhibitor in the bovine uterus during the sexual cycle and their correlation with serum sex steroids“. In: *Theriogenology* 75.9 (2011), S. 1720–1734. ISSN: 0093-691X. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2011.01.012.
- [183] Zhisong Zhang und Lu Yuan Li. „TNFSF15 modulates neovascularization and inflammation“. In: *Cancer Microenvironment* 5.3 (2012), S. 237–247. ISSN: 18752284. DOI: 10.1007/s12307-012-0117-8.
- [184] Li Jin Chew, Hongguang Pan, Jingyi Yu, Song Tian, Wei Qun Huang, John Y Zhang, Shen Pang und Lu Yuan Li. „A novel secreted splice variant of vascular endothelial cell growth inhibitor.“ In: *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16.7 (2002), S. 742–744. ISSN: 15306860.
- [185] W Lehmann, C M Edgar, K Wang, T J Cho, G L Barnes, S Kakar, D T Graves, J M Rueger, L C Gerstenfeld und T A Einhorn. „Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) coordinately regulates the expression of specific matrix metalloproteinases (MMPs) and angiogenic factors during fracture healing“. In: *Bone* 36.2 (2005), S. 300–310. ISSN: 8756-3282. DOI: 10.1016/j.bone.2004.10.010.
- [186] Matija Hedl und Clara Abraham. „A TNFSF15 disease-risk polymorphism increases pattern-recognition receptor-induced signaling through caspase-8–induced IL-1“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111.37 (09/2014). Hrsg. von M Hedl und C Abraham, S. 13451–13456. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.1404178111. URL: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1404178111>.
- [187] Jian-Wei Qi, Ting-Ting Qin, Li-Xia Xu, Kun Zhang, Gui-Li Yang, Jie Li, Huai-Yuan Xiao, Zhi-Song Zhang und Lu-Yuan Li. „TNFSF15 inhibits vasculogenesis by regulating relative levels of membrane-bound and soluble isoforms of VEGF receptor 1“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.34 (2013), S. 13863–13868. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.1304529110.
- [188] Yifan Zhai, Jian Ni, Gong-wei Jiang, Jiamo Lu, Lily Xing, Clint Lincoln, Kenneth C Carter, Fouad Janat, Diane Kozak, Simin Xu, Lorena Rojas, Bharat B Aggarwal, Steve Ruben, Lu-yuan Li, Reiner Gentz und Guo-liang Yu. „VEGI, a novel cytokine of the tumor necrosis factor family, is an angiogenesis inhibitor that suppresses the growth of colon carcinomas in vivo“. In: *The FASEB Journal* 13.1 (01/1999),

- S. 181–189. ISSN: 0892-6638. DOI: 10.1096/fasebj.13.1.181. URL: <http://www.fasebj.org/doi/10.1096/fasebj.13.1.181>.
- [189] Ning Zhang, Andrew J Sanders, Lin Ye, Howard G Kynaston und Wen G Jiang. „Vascular endothelial growth inhibitor, expression in human prostate cancer tissue and the impact on adhesion and migration of prostate cancer cells in vitro“. In: *International Journal of Oncology* 35.6 (10/2009), S. 1473–1480. ISSN: 10196439. DOI: 10.3892/ijo-00000466. URL: <http://www.spandidos-publications.com/ijo/35/6/1473>.
- [190] M Weiler, J Blaes, S Pusch, F Sahm, M Czabanka, S Luger, L Bunse, G Solecki, V Eichwald, M Jugold, S Hodecker, M Osswald, C Meisner, T Hielscher, P Rubmann, P.-N. Pfenning, M Ronellenfitsch, T Kempf, M Schnolzer, A Abdollahi, F Lang, M Bendszus, A von Deimling, F Winkler, M Weller, P Vajkoczy, M Platten und W Wick. „mTOR target NDRG1 confers MGMT-dependent resistance to alkylating chemotherapy“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111.1 (2014), S. 409–414. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.1314469111.
- [191] Verena Amberger-Murphy. „Hypoxia helps glioma to fight therapy.“ In: *Current cancer drug targets* 9.3 (05/2009), S. 381–90. ISSN: 1873-5576. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19442057>.
- [192] Adrian L. Harris. „Hypoxia — a key regulatory factor in tumour growth“. In: *Nature Reviews Cancer* 2.1 (01/2002), S. 38–47. ISSN: 1474-175X. DOI: 10.1038/nrc704. URL: <http://www.nature.com/articles/nrc704>.
- [193] Frank Winkler, Sergey V. Kozin, Ricky T. Tong, Sung-Suk Chae, Michael F. Booth, Igor Garkavtsev, Lei Xu, Daniel J. Hicklin, Dai Fukumura, Emmanuelle di Tomaso, Lance L. Munn und Rakesh K. Jain. „Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation“. In: *Cancer Cell* 6.6 (12/2004), S. 553–563. ISSN: 15356108. DOI: 10.1016/j.ccr.2004.10.011. URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610804003058>.
- [194] Antje Wick, Wolfgang Wick, Johannes Waltenberger, Michael Weller, Johannes Dichgans und Jörg B Schulz. „Neuroprotection by hypoxic preconditioning requires sequential activation of vascular endothelial growth factor receptor and Akt.“ In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22.15 (08/2002), S. 6401–7. ISSN: 1529-2401. DOI: 20026672. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12151519>.
- [195] A.-T. Henze, J. Riedel, T. Diem, J. Wenner, I. Flamme, J. Pouysegur, K. H. Plate und T. Acker. „Prolyl Hydroxylases 2 and 3 Act in Gliomas as Protective Negative Feedback Regulators of Hypoxia-Inducible Factors“. In: *Cancer Research* 70.1 (01/2010), S. 357–366. ISSN: 0008-5472. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1876.



- URL: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-09-1876>.
- [196] K Salnikow, M V Blagosklonny, H Ryan, R Johnson und M Costa. „Carcinogenic nickel induces genes involved with hypoxic stress.“ In: *Cancer research* 60.1 (01/2000), S. 38–41. ISSN: 0008-5472. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10646848>.
- [197] Peter Carmeliet und Rakesh K. Jain. „Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases“. In: *Nature Reviews Drug Discovery* 10.6 (06/2011), S. 417–427. ISSN: 1474-1776. DOI: 10.1038/nrd3455. URL: <http://www.nature.com/articles/nrd3455>.
- [198] Juan M. García-Martínez und Dario R. Alessi. „mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1)“. In: *Biochemical Journal* 416.3 (12/2008), S. 375–385. ISSN: 0264-6021. DOI: 10.1042/BJ20081668. URL: <http://www.biochemj.org/cgi/doi/10.1042/BJ20081668>.
- [199] Yuichi Murakami, Fumihito Hosoi, Hiroto Izumi, Yuichiro Maruyama, Hiroki Ureshino, Kosuke Watari, Kimitoshi Kohno, Michihiko Kuwano und Mayumi Ono. „Identification of sites subjected to serine/threonine phosphorylation by SGK1 affecting N-myc downstream-regulated gene 1 (NDRG1)/Cap43-dependent suppression of angiogenic CXC chemokine expression in human pancreatic cancer cells“. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 396.2 (05/2010), S. 376–381. ISSN: 0006291X. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.04.100. URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X10007801>.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich, Marie Beier (geb. Wüstner), versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Bedeutung von NDRG1 für die Angiogenese, Tumorphiliferation und Therapieresistenz gegenüber einer antiangiogenen und antitumoralen Therapie im Rahmen eines experimentellen Gliommodells" 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/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

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

---

Datum

Unterschrift

## **Curriculum Vitae**

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

## Publikationsliste und Anteilserklärung

**Publikation** Thomas Broggini, **Marie Wüstner**, Christoph Harms, Lena Stange, Jonas Blaes, Carina Thomé, Ulrike Harms, Susanne Mueller, Markus Weiler, Wolfgang Wick, Peter Vajkoczy und Marcus Czabanka. NDRG1 overexpressing gliomas are characterized by reduced tumor vascularization and resistance to antiangiogenic treatment. 2016. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.06.026.

**Eigenanteil** Ich, Marie Beier, war unter Mitwirkung der oben genannten Co-Autoren und unter federführender Regie durch Herrn Prof. Dr. Marcus Czabanka beteiligt an der Konzeption der oben genannten Studie sowie Durchführung der laborexperimentellen Arbeiten. Dies betrifft die Gesamtheit der dieser Dissertation zugrundeliegenden Experimente mit Ausnahme der Durchführung der MRT-Aufnahmen, die freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. C. Harms zur Verfügung gestellt wurden. Darüberhinaus stellte die Operation der Versuchstiere und die Analyse der erhobenen immunhistochemischen Daten einen wesentlichen Teil meiner Aufgabenbereiche dar. Die Berechnung der Tumorumfänge in vivo anhand der erhobenen MRT-Daten wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. C. Harms durchgeführt. Die Interpretation der Ergebnisse und Erstellung der Abbildungen erfolgte in enger Zusammenarbeit mit den Co-Autoren, insbesondere mit Herrn Prof. Dr. Marcus Czabanka. Die Konzeption und Verfassung des Manuskriptes wurde in Abstimmung mit den Co-Autoren durchgeführt.

---

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

---

Unterschrift des Doktoranden

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. med. Peter Vajkoczy, Direktor der Neurochirurgischen Klinik der Charité, für die Überlassung des interessanten Themas und die Aufnahme in seine Abteilung.

Meinem Betreuer und Doktorvater Prof. Dr. med. Marcus Czabanka, für die kompetente und geduldige Begleitung.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der experimentellen neurochirurgischen Forschung, insbesondere Irina Kremenetskaia, Melina Nieminen-Kelhä und Dr. Adnan Ghori für die gute Zusammenarbeit und das stets angenehme Arbeitsklima.

Meinen ehemaligen Mitdoktorandinnen und Mitdoktoranden Dr. Güliz Acker, Dr. Stephan Marticorena Garcia, Dr. Moritz Markel und Dr. Thomas Broggini für die fachlichen Diskussionen und die motivierende Arbeitsatmosphäre.

Meiner Familie, für den Rückhalt und die Geduld, gerade in der letzten Phase dieser Arbeit.