

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

DISSERTATION

Die Blockierung des CXCL2/CXCR2-Signalwegs bei
gleichzeitiger Temozolomid-Therapie als kombinierter
Therapieansatz im Glioblastoma multiforme

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Claudius Jelgersma

Datum der Promotion: 26. Juni 2022

Vorwort

Teilergebnisse aus der vorliegenden Arbeit wurden in einer gemeinsamen Publikation unserer Arbeitsgruppe im *European Journal of Cancer* im Jahr 2020 veröffentlicht.

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

Die Daten zu den publizierten Ergebnissen der systemischen Applikation des CXCR2-Antagonisten SB225002 wurden im Rahmen dieser Arbeit (Versuchsabschnitt I) erhoben. Die Verwendung von Daten, Graphen und Abbildungen wurden für diese Arbeit genehmigt.

Darüber hinaus wurden Teilergebnisse (Versuchsabschnitt II) zur 71. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC) (2020) als Posterbeitrag sowie im Rahmen der Jahrestagung Sektion Neuroonkologie der DGNC (2020) als Vortrag vorgestellt.

C. Jelgersma, J. Zollfrank, S. Brandenburg, P. Vajkoczy, G. Acker. Synergistic effects of blocking the CXCL2/CXCR2 pathway in combination with Temozolomide therapy in glioblastoma multiforme as a combined therapeutic approach. 71. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie 2020. 23.06.2020; Posterbeitrag

C. Jelgersma, J. Zollfrank, S. Brandenburg, P. Vajkoczy, G. Acker. Blockierung des CXCL2/CXCR2-Signalwegs bei gleichzeitiger Temozolomid Therapie als kombinierter Therapieansatz im Glioblastoma multiforme. Jahrestagung Sektion Neuroonkologie der DGNC 2020. 18.10.2020; Vortrag

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
Abbildungsverzeichnis	8
Tabellenverzeichnis	8
1 Kurzfassung/Abstract	9
1.1 Kurzfassung	9
1.2 Abstract (english)	10
2 Einleitung	12
2.1 Glioblastoma multiforme.....	12
2.1.1 Aktueller Therapiestandard in der Behandlung des GBM	13
2.1.2 Herausforderungen in der Behandlung des GBM und alternative Therapieansätze.....	13
2.1.3 Limitationen und Mechanismen der Resistenzentwicklung unter der Goldstandardtherapie mit TMZ.....	15
2.2 Chemokin-Netzwerke in der Pathogenese des GBM	16
2.2.1 Der CXCL8/CXCL2/CXCR2-Signalweg und seine Relevanz im GBM	16
2.2.2 Die Quelle von CXCL8 und CXCL2 und die Rolle der TAM im Tumormikromilieu	18
2.2.3 Intrazelluläre Signalkaskaden des CXCR2-Rezeptors.....	18
2.2.4 Auswirkung der Aktivierung des CXCL8/CXCL2/CXCR2-Signalwegs auf Proliferation, Vaskularisation und Migration	19
2.2.5 Das Potential der Blockierung des CXCL8/CXCL2/CXCR2- Signalwegs.....	21
2.3 Zielsetzung der Arbeit	23
3 Material und Methodik.....	24
3.1 Auflistung von Materialien, Geräten und Software	24
3.1.1 Materialliste.....	24
3.1.2 Softwareliste	26
3.1.3 Geräteliste	27
3.2 Anteilserklärung Methodenteil	27
3.3 GBM-Mausmodell.....	28
3.3.1 Zellkultur	28

3.3.2	Tierexperimente	29
3.3.3	Tierhaltung, Monitoring, Abbruchkriterien	29
3.3.4	Narkose und Analgesie	29
3.3.5	Tumorzellinokulation	30
3.3.6	Implantation der mini-osmotischen Pumpe	31
3.3.7	Vorbereitung der Therapien und Applikationsform	32
3.3.7.1	SB225002	32
3.3.7.2	Temozolomid	32
3.3.8	Perfusion, Tötung und Entnahme der Gewebeprobe	33
3.4	Versuchsaufbau	33
3.4.1	Versuchsabschnitt I – Wirksamkeit der systemischen intraperitonealen Applikation von SB225002	33
3.4.2	Versuchsabschnitt II – Kombinationstherapeutischer Ansatz mit TMZ und SB225002	35
3.5	MRT und Tumorummetrie	37
3.6	Immunfluoreszenzhistologische Analysen	37
3.6.1	Vorbereitung, Aufarbeitung und Aufbewahrung der Gehirne	37
3.6.2	Immunfluoreszenzfärbung und Mikroskopie	38
3.6.3	Proliferation und Apoptose	39
3.6.4	Angiogenese und TAM-Akkumulation	40
3.6.5	CXCR2 und CXCL2	41
3.7	Quantitative Real-Time-PCR	42
3.7.1	RNA Isolierung und Reverse Transkriptase	42
3.7.2	Quantitative Real-Time-PCR	43
3.8	Datenverarbeitung und Statistik	45
4	Ergebnisse	46
4.1	Versuchsabschnitt I – Analyse der systemischen Wirksamkeit des CXCR2-Antagonisten SB225002	46
4.1.1	Einführung Ergebnisse Versuchsabschnitt I	46
4.1.2	Tumorummetrienreduktion ohne Dosis-Wirkungszusammenhang bei systemischer Applikation des CXCR2-Antagonisten SB225002	46

4.1.3	Analyse der Veränderungen in der Tumervaskularisation und TAM-Akkumulation bei systemischer Applikation des CXCR2-Antagonisten SB225002.....	48
4.2	Versuchsabschnitt II – Analyse therapieinduzierter Effekte auf tumorbiologische Charakteristika durch die Kombinationstherapie.....	51
4.2.1	Einführung Ergebnisse Versuchsabschnitt II	51
4.2.2	Additiver Tumervolumenreduktionseffekt durch Kombinationstherapie	51
4.2.3	Verminderte Proliferationsaktivität bei gleichbleibender Apoptose.....	53
4.2.4	Beginnende Abnahme der Tumervaskularisation bei unveränderter TAM-Akkumulation	55
4.2.5	Therapieinduzierte Veränderungen des CXCL2/CXCR2-Signalwegs.....	59
4.2.6	Expression klassischer proangiogener Moleküle sowie CXCR1	62
4.3	Therapieverträglichkeit, Verlust und Ausschluss von Tieren	64
5	Diskussion	66
5.1	Kritische Betrachtung des verwendeten GBM-Mausmodells.....	66
5.2	Systemische Effektivität des CXCR2-Antagonisten SB225002.....	68
5.3	Stellenwert kombinatorischer Therapieansätze.....	70
5.4	Auswirkungen der zusätzlichen CXCR2-Antagonisierung bei TMZ-Therapie im GBM.....	71
5.4.1	Effekte auf das Tumervolumen	71
5.4.2	Therapieinduzierte Effekte auf tumorbiologische Charakteristika	72
5.4.2.1	Proliferation	72
5.4.2.2	Apoptose	73
5.4.2.3	Tumervaskularisation	74
5.4.2.4	Akkumulation Tumorassoziierter Mikroglia und Makrophagen	77
5.4.2.5	Therapieinduzierte Auswirkungen auf die zentralen Moleküle des Signalwegs: CXCL2 und CXCR2.....	78
5.5	Einfluss des Therapieschemas und Strategien zur Steigerung des Effektes der zusätzlichen CXCR2-Antagonisierung	79
6	Zusammenfassung und Ausblick	82
7	Literaturverzeichnis	83
	Eidesstattliche Versicherung	92
	Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen	93

Lebenslauf.....	94
Publikationsliste.....	96
Danksagung.....	98

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Analysis of variance
BAX	Bcl-2-associated X protein
BCL-2	B-cell lymphoma 2
CAR-T	Chimären-Antigen-Rezeptor-T-Zellen
CD31	Cluster of Differentiation 31
cDNA	Complementary DNA
CT	Cycle Treshold
CXCL	C-X-C Motif Ligand
CXCR	C-X-C Motif Receptor
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GBM	Glioblastoma multiforme
GL261	Glioma 261
Gy	Gray
H ₂ O	Wasser
i.p.	Intraperitoneal
IBA1	Ionized calcium binding adaptor molecule 1
IDH1/2	Isocitratdehydrogenase-1/2
IL-8	Interleukin 8
<i>in vitro</i>	Lateinisch für „im Glas“
<i>in vivo</i>	Lateinisch für „im Lebendigen“
KI67	Ki-67 (Kiel-67) Protein
KM	Kontrastmittel
LAGeSo	Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MRI/MRT	Magnetresonanztomographie

mRNA	Messenger RNA
N ₂	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
O ₂	Sauerstoff
p53	Tumorsuppressorprotein p53
PBS	Phosphate Buffered Saline
PD-1/PD-L1	Programmed Death-Rezeptor 1/Programmed Death-Ligand 1
PFA	Paraformaldehyd
qRT-PCR	Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
T1	T1-Wichtung
T2	T2-Wichtung
TAM	Tumor-assoziierte Mikroglia und Makrophagen
TCGA	The Cancer Genom Atlas
TMZ	Temozolomid
TTF	Tumortheraiefelder
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
T-Zellen	T-Lymphozyten
VEGF	Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor
VEGFR	Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor Rezeptor
VM	Vaskuläres Mimikry
WHO	Weltgesundheitsorganisation

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Rolle des CXCL8/CXCL2/CXCR2-Signalwegs im GBM.....	21
Abbildung 2: Stereotaktische Tumorzellinokulation.....	31
Abbildung 3: Lage der mini-osmotischen Pumpe zur intrathekalen Applikation.	32
Abbildung 4: Schematischer Versuchsaufbau – Versuchsabschnitt I.....	34
Abbildung 5: Schematischer Versuchsaufbau – Versuchsabschnitt II.....	36
Abbildung 6: Tumorzellvolumina nach systemischer Applikation von SB225002.	47
Abbildung 7: Effekte der systemischen Applikation von SB225002 auf die Tumorzellvaskularisation.	49
Abbildung 8: Effekte der systemischen Applikation von SB225002 auf die TAM- Akkumulation und TAM-Gefäßinteraktion.	50
Abbildung 9: Tumorzellvolumetrie an Tag 21 nach Kombinationstherapie.	53
Abbildung 10: Analyse von Proliferationsaktivität und Apoptoseverhalten.	54
Abbildung 11: Genexpressionsanalyse der Moleküle Bax und Bcl2.....	55
Abbildung 12: Tumorzellvaskularisation im syngenen orthotopen GL261-Mausmodell.	56
Abbildung 13: Immunfluoreszenzfärbung der Tumorzellvaskularisation und TAM- Akkumulation.....	58
Abbildung 14: Quantitative Analyse der Tumorzellvaskularisation und TAM-Akkumulation.....	59
Abbildung 15: Genexpressionsanalyse der Moleküle Cxcl2 und Cxcr2 im Tumor vs. Nicht- Tumor.....	60
Abbildung 16: Therapieinduzierte Veränderungen des CXCR2-Rezeptors.....	61
Abbildung 17: Therapieinduzierte Veränderungen des CXCL2-Liganden.	62
Abbildung 18: Genexpressionsanalyse therapieinduzierter Veränderungen des klassischen angiogenen Signalwegs und Cxcr1.	64
Abbildung 19: Exemplarische MRT-Schnittbilder peritumorale Blutung und Ausschlussstier.....	65

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht verwendeter Materialien.....	24
Tabelle 2: Übersicht verwendeter Software	26
Tabelle 3: Übersicht verwendeter Geräte	27
Tabelle 4: Reaktionsansätze zur DNA-Elimination und Reversen Transkriptase	43
Tabelle 5: Primersequenzen.....	44
Tabelle 6: qRT-PCR Mastermix (für 384 Wellplatte pro Well) und PCR Programm	45

1 Kurzfassung/Abstract

1.1 Kurzfassung

Einleitung: Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist durch seine heterogenen Charakteristika eine große Herausforderung für eine erfolgreiche antineoplastische Therapie. Ein bedeutender Einflussfaktor in der Pathogenese ist der CXCL8/CXCL2/CXCR2-Signalweg innerhalb des Chemokin-Netzwerkes, dessen Aktivierung zu Tumorprogression, Angiogenese und Resistenzentwicklung führt. Therapieinduzierte Expressionsveränderungen der Signalmoleküle konnten dabei insbesondere unter der Goldstandardtherapie mit Temozolomid (TMZ) beobachtet werden. Darüber hinaus führte die Blockierung von CXCR2 (intrathekal) im GBM-Mausmodell zur Tumorregression. Hauptziel dieser Arbeit war es deshalb, zusätzlich zur TMZ-Monotherapie den Signalweg durch CXCR2-Antagonisierung (SB225002) zu blockieren, um potenzielle synergistische Effekte zu untersuchen. Außerdem wurde die Effektivität der systemischen Applikation von SB225002 vor Beginn der Kombinationstherapie getestet.

Methoden: Die Versuche wurden an einem immunkompetenten GBM-Mausmodell (C57BL/6N) durchgeführt. Nach orthotoper Implantation von syngenen GL261-Zellen erfolgte die Therapie ab dem 14. Tag für sieben aufeinanderfolgende Tage. Zunächst wurde die systemische Applikation von SB225002 in verschiedenen Dosen (30µg_{i.p.}, 60µg_{i.p.} und 200µg_{i.p.}) getestet. Die Kombinationstherapie wurde anschließend in vier Gruppen untersucht (Kontrolle, TMZ, SB225002 und TMZ+SB225002). Zur Verifizierung des Tumorwachstums erfolgte die Bildgebung mittels MRT. Zusätzlich wurden Therapieeffekte mittels Immunfluoreszenzfärbungen und qRT-PCR-Analysen untersucht. Es wurden das Proliferations- und Apoptoseverhalten, die Tumervaskularisation und die Akkumulation von tumorassoziierten Mikroglia und Makrophagen (TAM) untersucht. Darüber hinaus wurden sowohl Veränderungen in der Genexpression von *Cxcl2* und *Cxcr2* als auch des klassischen angiogenen Signalwegs untersucht. Die statistische Auswertung erfolgte entweder mittels Student's t-test oder One-way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur ($p \leq 0.05$).

Ergebnisse: Bei systemischer Applikation von SB225002 wies die 60µg_{i.p.}-Gruppe mit 43% die größte Tumolvolumenreduktion auf, jedoch ohne statistische Signifikanz. Die Tumervaskularisation war tendenziell vermindert, wohingegen die TAM-Akkumulation

unverändert blieb. In den Experimenten zur Kombinationstherapie führte TMZ mit 61% und TMZ+SB225002 mit 75% zu einer signifikanten Tumolvolumenreduktion ($n= 7-8$). Zusätzlich war die Proliferation bei TMZ und TMZ+SB225002 signifikant zur Kontrolle vermindert. Das Verhältnis von Apoptose zu Proliferation war nur unter TMZ+SB225002 zugunsten der Apoptose verschoben, während auch die größte Tendenz zur Abnahme der Tumovaskularisation in dieser Gruppe beobachtet werden konnte. Im Unterschied dazu war die Akkumulation von TAM unter allen Therapien unverändert. Die qRT-PCR-Analyse zeigte eine signifikante Hochregulation von *Cxcr2* im Tumorgewebe, wobei die Expression durch alle Therapien vermindert wurde.

Schlussfolgerung: Die systemische Applikation von SB225002 war im Vergleich zur intrathekalen Anwendung aus Vorarbeiten unterlegen. Die Kombinationstherapie zeigte bei guter Therapieverträglichkeit einen additiven antitumoralen Effekt im Vergleich zur TMZ-Monotherapie. Der kombinatorische Ansatz ist deshalb vielversprechend und sollte in einem längeren Beobachtungsintervall weiter untersucht werden.

1.2 Abstract (english)

Introduction: Glioblastoma multiforme (GBM) is a major challenge for successful antineoplastic therapies due to its heterogeneous characteristics. The chemokine signalling pathway CXCL8/CXCL2/CXCR2 has been identified to play a crucial role in GBM pathogenesis. Its activation promotes tumor progression, angiogenesis and development of resistance. Additionally, therapy with temozolomide (TMZ) induces modification of this pathway during the development of resistance. Intrathecal CXCR2 antagonization has already been shown to reduce tumor progression. Thus, the aim of this study was to inhibit the pathway (SB225002) in addition to TMZ therapy to investigate potential synergistic effects. The effectiveness of the systemic application of SB225002 was also tested before the start of combinational experiments.

Methods: An immunocompetent GBM mouse model (C57BL/6N) was used. After orthotopic inoculation of syngeneic GL261 cells, therapy was conducted for 7 consecutive days starting from day 14. First, the systemic application of SB225002 was tested in different doses (30 μ g_{i.p.}, 60 μ g_{i.p.} und 200 μ g_{i.p.}). Second, the combination therapy was investigated using four groups (Control, TMZ, SB225002, TMZ+SB225002). MRI imaging

was performed to assess tumor growth. For analysis of therapy induced effects, immunofluorescence staining and qRT-PCR were performed with focus on proliferation, apoptosis, tumor vascularization and the accumulation of tumor-associated microglia and macrophages (TAM). Furthermore, changes in the gene expression of *Cxcl2* and *Cxcr2* as well as the classic angiogenic signalling pathway were investigated. The statistical analysis was conducted using either student's t-test or one-way ANOVA with Bonferroni correction ($p \leq 0.05$).

Results: The greatest tumor volume reduction with systemic application of SB225002 was observed with 60 μ g_{i.p.} (43%), but without reaching a significant level. Tumor vascularization tended to decrease, whereas the TAM accumulation was unaltered. In the combinational approach tumor volume was significantly reduced with TMZ (61%) and TMZ+SB225002 (75%) ($n=7-8$ per group). TMZ and TMZ+SB225002 significantly reduced proliferation compared to the control group. Additionally, TMZ+SB225002 led to a shift of the apoptosis/proliferation ratio in favor of apoptosis with the greatest tendency of reduction of tumor vascularization. In contrast, the accumulation of TAM was not affected by any therapy. The qRT-PCR analysis showed a significant upregulation of CXCR2 in the tumor tissue which was reduced by all therapies.

Conclusion: The systemic application of SB225002 failed to achieve a comparable effect to intrathecal administration as shown in a previous study. The combination therapy was well tolerated and showed an additive antitumor effect compared to TMZ monotherapy. Therefore, the promising combinational approach should be investigated in a longer observation period.

2 Einleitung

2.1 Glioblastoma multiforme

Das Glioblastoma multiforme (GBM) gehört zu der Gruppe der Gliome. Gliome sind hirneigene neuroepitheliale Tumore und machen einen Anteil von 26% aller Hirntumore aus (1). Die Einteilung erfolgt nach WHO in vier Grade (2, 3). Das GBM wird als aggressivster und tödlichster hirneigene Tumor dem Grad IV zugeordnet (2, 3). Der Anteil an neudiagnostizierten GBM von allen Gliomen wird auf 77% geschätzt, sodass es unter den Gliomen auch die häufigste Entität der hirneigenen Tumore darstellt (4). Anhand des IDH (Isocitrat-Dehydrogenase)-Status lässt sich die Entstehung des GBM ableiten (4, 5). Dieses ist entweder *de novo* entstanden und besitzt einen IDH-Wildtyp oder entsteht sekundär aus geringgradigeren Astrozytomen und ist IDH-mutiert (2-4). Ein mutierter IDH-Status ist mit einem verlängerten Überleben assoziiert, lässt sich aber nur in 7% neudiagnostizierten Gliome finden (4). Der größte Anteil mit 71% besitzt einen IDH-Wildtyp (4).

Die Inzidenz wird in der Literatur, je nach Regionalität, zwischen 0,59-3,69/100.000 angegeben, wobei das durchschnittliche Erkrankungsalter bei 64 Jahren liegt und Männer häufiger als Frauen betroffen sind (6, 7). Trotz bestmöglicher Behandlung beträgt die medianen Überlebenszeit nach Diagnosestellung aktuell nur 15-20,9 Monate (4, 8-11). Die Überlebensrate nach 5 Jahren beträgt 5,5% (6).

Das GBM zeichnet sich durch besondere histologische Charakteristika aus, durch die es sich von geringgradigeren Gliomen abgrenzen lässt. Dazu gehören insbesondere Nekroseareale sowie eine ausgeprägte Gefäßproliferation (3, 12). Als weitere allgemeine Malignitätskriterien sind eine hohe Invasivität und Mitoserate, eine ausgeprägte Kernpolymorphie sowie palisadenartige Zellanordnungen, die einen Migrationswall bilden, zu nennen (3, 5, 13). Das GBM bildet ein spezifisches Tumormikromilieu, das sowohl für die Entwicklung und Ausbreitung als auch für die Resistenzentwicklung des GBM eine entscheidende Rolle spielt (14). Es ist ein komplexes Zusammenspiel verschiedenster Zellen, die entweder einen tumorfördernden oder einen tumorhemmenden Einfluss haben (14). Das Tumormikromilieu setzt sich aus zellulären Bestandteilen (u.a. Tumorstammzellen, Astrozyten, Immunzellen, Bindegewebszellen, Endothelzellen, Perizyten) sowie Extrazellulärmatrix und löslichen Molekülen zusammen, die die optimalen Bedingungen für die Tumoretablierung und -erhaltung schaffen (14). Das GBM besitzt eine geringe extrakranielle Metastasierungsrate von nur 0,5% (14). Nichtsdestotrotz breitet es sich intrakraniell invasiv entlang der perivaskulären Nische

sowie entlang der Axone bis auf die kontralaterale Seite aus (14). Diese aggressiven Eigenschaften sind eine Herausforderung für die Entwicklung von erfolgreichen Therapien.

2.1.1 Aktueller Therapiestandard in der Behandlung des GBM

Aktueller Goldstandard in der Primärtherapie des GBM ist die chirurgische Resektion des Tumors mit anschließender Radiochemotherapie (8). Das Ausmaß der Resektion korreliert positiv mit dem Überleben, das sich bei einer Resektion von 78-98% deutlich verbessert (15, 16). Es wird sogar ein zusätzlicher Überlebensvorteil erwartet, wenn das Ausmaß der Resektion über die Tumorgrenzen hinaus erfolgt (16). Nichtsdestotrotz bleibt die operative Resektion durch angrenzende eloquente Gehirnareale limitiert. Mit der Einführung des Stupp-Schemas, das die zusätzliche Gabe von Temozolomid (TMZ) zur Radiotherapie etablierte, konnte das mediane Überleben von 12,1 auf 14,6 Monate verlängert werden (8). Die konkomitante Radiochemotherapie besteht aus fraktionierter Bestrahlung mit einer Gesamtdosis von 60 Gy über 6 Wochen (2Gy pro Tag, 5 Tage pro Woche) und täglicher Gabe von TMZ (75mg/m²/KO(Körperoberfläche)). Die adjuvante TMZ-Therapie erfolgt danach in sechs Zyklen. Ein Zyklus beinhaltet 150-200mg/m²/KO TMZ in fünf Tagen in einem Zeitraum von 28 Tagen (8).

2.1.2 Herausforderungen in der Behandlung des GBM und alternative Therapieansätze

Durch die ausgeprägte inter- und intratumorale Heterogenität des GBM, die sich durch unterschiedliche Mutationen und veränderter Signalwege zeigt, war die Entwicklung einer heilenden Therapie bis heute unmöglich (17-21). Einheitliche Therapiestrategien, die sich auf einzelne Angriffspunkte beziehen, sind deshalb nicht zielführend (18). Weitere Hürden sind Immunevasionsstrategien des Tumors sowie der erschwerte pharmakologische Zugang über die Bluthirnschranke (18, 22). Nicht zuletzt stellt auch die ausgeprägte Angiogenese im GBM eine Herausforderung dar (12, 23).

Über die Goldstandardtherapie hinaus gibt es deshalb eine Vielzahl von neuen therapeutischen Ansätzen, die auf unterschiedlichen Mechanismen beruhen. Für sogenannte Tumor Treating Fields, Bevacizumab und Immuntherapien wurde in Studien die längste mediane Überlebenszeit bestimmt (24).

Tumor Treating Fields (TTF) wird bereits in Kombination bei der Primärbehandlung eingesetzt und führt zu einer Verlängerung des medianen Überlebens auf 20,7 Monate nach Diagnosestellung (24). TTF wurde im März 2020 zur Kostenübernahme durch die Krankenkassen in Deutschland zugelassen (25). Die Funktionsweise von TTF beruht auf Elektroden, die auf der rasierten Kopfhaut angebracht werden und Wechselstromfelder mit einer Frequenz von 200kHz erzeugen (26). Dadurch werden entscheidende Mitoseschritte gestört und folglich das GBM in seinem Wachstum behindert (26). Trotz des nebenwirkungsarmen Profils ist die Lebensqualität der Patienten*innen durch eine minimale Tragezeit von 18h pro Tag eingeschränkt, was in einer verminderten Compliance resultiert (26). Dies hat zur Folge, dass dieser Therapieansatz nicht für alle Patienten*innen geeignet ist und auch nicht großflächig als Standard eingesetzt werden kann.

Bevacizumab ist ein VEGF-Antikörper (27). Durch Blockade des im GBM hochregulierten klassischen angiogenen VEGF-Signalwegs wird die Neovaskularisation im Tumor, die die Grundvoraussetzung für eine ausreichende Nährstoffversorgung ist, gehemmt (23, 27). Außerdem wirkt sich die Gefäßnormalisierung auf eine bessere Verteilung von Chemotherapeutika innerhalb des Tumors sowie auf die Reduktion der peritumoralen Ödems aus (23). Bevacizumab wird zur Therapie des rezidivierenden GBM eingesetzt und führt zu einer Verlängerung des progressionsfreien Intervalls, nicht aber zu einem verlängerten Überleben (24). Auch andere antiangiogene Therapien, die nicht auf VEGF abzielen, konnten bisher keinen Überlebensvorteil nachweisen (23).

GBM-Tumorzellen sind durch die Lokalisation hinter der Bluthirnschranke und den immunsuppressiven Eigenschaften des Tumormikromilieus nur schwer für die körpereigene Tumorbekämpfung durch das Immunsystem zugänglich (17, 28, 29). Immuntherapien versuchen deshalb, Tumorzellen wieder „erkennbar“ zu machen. Zu den wichtigsten Strategien gehört die Unterbrechung von Evasionsmechanismen des Tumors durch antikörpervermittelte Blockade des PD-1/PD-L1-Signalwegs (30). T-Zellen besitzen den PD-1 Rezeptor und Tumorzellen den PD-L1 Ligand, durch die bei Bindung keine Immunantwort gegen Tumorzellen ausgelöst werden kann (30). Eine weitere Strategie ist durch Impfung von tumorspezifischen Oberflächenmolekülen, eine gegen diese Zellen gerichtete Immunantwort auszulösen (30). Ein ähnlicher Ansatz wird bei der CAR-T-Zell-Therapie (chimäre Antigenrezeptor-T-Zellen) verfolgt. Das Prinzip beruht darauf, körpereigene T-Zellen zu entnehmen und gentechnologisch so zu verändern, dass sie sich gegen GBM-spezifische Oberflächenmoleküle (EGFRvIII oder IL-13R α 2)

richten (30). Immuntherapien sind aussichtsreiche Ansätze, für die insbesondere in der Anwendung als Kombinationstherapie Erfolge erwartet werden (24, 30, 31). Nichtsdestotrotz befinden sich diese noch in der Frühphase der Entwicklung, sodass der klinische Nutzen erst im Rahmen der laufenden Studien analysiert werden muss.

Trotz Anwendung der Goldstandardtherapie mit TMZ und alternativen Therapieansätzen kommt es bei GBM-Patienten*innen innerhalb kurzer Zeit zu der Entwicklung von Resistenzen mit Rezidiven oder lokalem Progress, weshalb nach wie vor ein großer Forschungsbedarf für weitere therapeutische Ansätze vorhanden ist (32).

2.1.3 Limitationen und Mechanismen der Resistenzentwicklung unter der Goldstandardtherapie mit TMZ

Über die letzten Jahre konnten Mechanismen identifiziert werden, die die Entwicklung von Resistenzen unter der Goldstandardtherapie mit TMZ fördern. Temozolomid (4-Methyl-5-oxo-2,3,4,6,8-pentazabicyclo[4.3.0]nona-2,7,9-trien-9-carboxamid) ist ein alkylierendes Chemotherapeutikum. Durch Methylierung, vorrangig der Base Guanin, werden DNA-Strangbrüche induziert bzw. Replikationsvorgänge gestört, was konsekutiv zu apoptotischen Zellvorgängen führt (24). Die zu Beginn der Therapie gute DNA-destabilisierende Wirkweise führt jedoch zu einer Selektion von Zell-Subpopulationen, die dem Therapiestress widerstehen konnten (33). Diese zeichnen sich durch therapieinduzierte genetische und phänotypische Heterogenität aus, die als primärer Grund für tumorfördernde Eigenschaften von Krebsstammzellen angesehen wurden (34). Der andauernde Therapiestress unter TMZ führt durch Selektionsprozesse zur Tumorevolution, sodass sogar die Entwicklung zu höhergradigen Tumoren induziert werden kann (34). Dies wird unter anderem durch TMZ-induzierte mutagene Modifikationen des Genoms erklärt (20). Es entstehen sogenannte „Hypermutatoren“, die zu einer Destabilisierung der DNA-Struktur führen und wiederum neue Mutationen produzieren (24, 30, 31). Zu den Resistenzmechanismen zählen auch Mismatch-Reparaturgene, darunter insbesondere MGMT (O⁶-Methylguanin-DNA Methyltransferase), die TMZ-induzierte Methylierungen der DNA umgehend reparieren und so die TMZ-Toxizität abschwächen (35). Auch die Aktivierung von Autophagie-Prozessen durch TMZ wirkt sich protektiv auf die einzelne Zelle aus, da unwichtige Proteine degradiert und abgebaut werden, die für das Überleben nicht zweckdienlich sind (35).

Einer der wichtigsten Treiber von Therapieresistenzen sind Tumorstammzellen, die unempfindlich gegenüber TMZ und Radiotherapie sind (18). Sie befinden sich in schwer zugänglichen Nischen, wo sie ihr Proliferations- und Differenzierungspotential erhalten können (36). Hasan et al. untersuchten die Adaptation an den therapeutischen Stress durch TMZ an Glioma-initiiierenden Zellen, die weit gefasst Gliomastammzellen bzw. Zellen mit Stammzeleigenschaften darstellen und Rezidive initiieren (37). Er beschrieb den Prozess als zelluläre Plastizität, die entscheidend für die Resistenzentwicklung ist (37). Als ein bedeutender Regulator der Adaptation wurde der Interleukin-8 (IL8, synonym CXCL8)-Signalweg innerhalb des Chemokin-Netzwerkes identifiziert (37). TMZ erhöhte zeitabhängig sowohl die CXCL8-Genexpression als auch die Expression der Zielrezeptoren CXCR2 und CXCR1 (38). Umgekehrt führte ein CXCL8-Knockdown zu einer erhöhten TMZ-Sensitivität und konsekutiv zu einem verlängerten Überleben (38). Eine weitere Arbeit zu dem Einfluss von TMZ auf das Chemokin-Netzwerk wurde von Bruyere et al. publiziert (38). Diese Arbeit zeigte ebenfalls, dass es unter TMZ-Wirkung zu Veränderungen des CXCL8/CXCL2/CXCR2-Signalwegs kommt (38). Die Langzeittherapie mit TMZ führte bei GBM-Zellen astroglialen Ursprungs zur erhöhten Expression und Sekretion von CXCL2 und CXCL8 *in vitro* (38). Außerdem führte die *in vitro* Präkonditionierung von Tumorzellen durch TMZ zu einer reduzierten TMZ-Wirksamkeit *in vivo* (38).

Aufgrund der einflussreichen Rolle des Signalwegs in der TMZ-induzierten Resistenzentwicklung ist die Blockade des CXCL8/CXCL2/CXCR2-Signalwegs ein möglicher Ansatzpunkt für neue Therapiestrategien. Während der Fokus in der humanen GBM-Forschung insbesondere auf dem Liganden CXCL8 liegt, muss an dieser Stelle vorwegnehmend ergänzt werden, dass in der Maus kein CXCL8 exprimiert wird (39). In der experimentellen Forschung an Mäusen konnte CXCL2 identifiziert werden, das als homolog zum humanen CXCL8 angenommen werden kann (40). Der theoretische Hintergrund dieser Arbeit wird deshalb vorrangig anhand von CXCL8 erläutert, während sich der experimentelle Teil am GBM-Mausmodell auf CXCL2 bezieht.

2.2 Chemokin-Netzwerke in der Pathogenese des GBM

2.2.1 Der CXCL8/CXCL2/CXCR2-Signalweg und seine Relevanz im GBM

Das inflammatorische Tumormikromilieu hat in der Pathogenese des GBM eine bedeutende Funktion in der Aufrechterhaltung und Progression des Tumors (14, 41-43).

Im Unterschied zu anderen Tumorentitäten induziert das GBM selbst die assoziierte Entzündungsreaktion und entsteht nicht aus einer vorbestehenden chronischen Entzündung (42). Die inflammatorischen Interaktionsprozesse werden vorrangig durch Chemokine wie das bereits erwähnte Chemokin CXCL8 und CXCL2, vermittelt (39). Ursprünglich wurden Chemokine bekannt durch ihre Funktion als Signalmoleküle zur Chemotaxis, also der Anlockung von Immunzellen entlang eines Konzentrationsgradienten (39). Chemokine sind somit chemotaktische Zytokine und gehören zu einer großen Gruppe sekretierter kleiner Signalmoleküle, die in vier Untergruppen - CC, CXC, CX3C, CX – unterteilt werden können (39). Innerhalb des Tumormikromilieus bilden Chemokine und ihre Zielrezeptoren ein Netzwerk, durch das neben der physiologischen immunologischen Funktion auch tumorfördernde Eigenschaften direkt oder indirekt vermittelt werden (44, 45). Durch den Einfluss auf das Tumorwachstum, die Vaskularisation, die Invasion sowie die Resistenzentwicklung gegenüber Chemotherapeutika, ist die Bedeutung von Chemokin-Netzwerken für die Tumorgenese unumstritten (43, 44, 46-48).

CXCR2 gehört zu der großen Familie der G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren (GPCR), genauer zu der Klasse der Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren, und besitzt wie alle GPCR sieben transmembrane Domänen, durch die er auf der Zelloberfläche verankert ist (39, 49). Davon befindet sich das N-terminale Ende mit drei Loops extrazellulär und das C-terminale Ende mit vier Loops intrazellulär (50). Seine Struktur ist zu 78% identisch mit CXCR1, wobei CXCR2 im Vergleich zu CXCR1 eine höhere Anzahl an Liganden bindet (49). Insbesondere hat CXCR2 eine höhere Affinität zu proangiogenen Liganden, die durch ihre charakteristische Aminosäureabfolge Glu-Leu-Arg eine verstärkte Angiogenese an den Effektorzellen fördern (49). CXCR2 wird nicht nur durch unterschiedliche Liganden, CXCL1, 2, 3, 5, 6, 7 und 8 angesteuert, sondern aktiviert auch unterschiedliche intrazelluläre Signalwege (50, 51). Unter den Liganden des CXCR2-Rezeptors ist CXCL8 ein wissenschaftlich gut beschriebener Agonist. Dieser wird durch Stimuli, die im Zusammenhang von Entzündungsprozessen oder der Tumorgenese entstehen, hochreguliert, aber nicht oder kaum im gesunden Mikromilieu exprimiert (52).

Untersuchungen an humanen GBM-Gewebeproben zeigten, dass CXCL8 mit einer mehr als vierfach erhöhten Expression im GBM hochreguliert ist (53). Im Vergleich mit anderen Datenbanken war CXCL8 eines der häufigsten hochregulierten Chemokine, die eine Überexpression im GBM zeigten (53). Neben CXCL8 konnte auch für CXCL2 eine Überexpression in humanen Gewebeproben beobachtet werden (54). Bei detaillierteren

Tumorgenom (TCGA)-Analysen korrelierte darüber hinaus sowohl die Expression von CXCL8 als auch die von CXCL2 negativ mit dem Gesamtüberleben (54). Die mit der Überexpression einhergehende Verschlechterung der Prognose bezogen auf das Gesamtüberleben bestätigt eindrücklich die Relevanz in der Pathogenese des GBM (54-56). Analog zum Liganden CXCL8 konnte der Einfluss auf relevante Endpunkte auch für seinen Rezeptor CXCR2 nachgewiesen werden. So korreliert eine alters- und geschlechtsunabhängige Überexpression für CXCR2 im Vergleich zu normalem Gewebe mit dem Schweregrad und der Rezidivhäufigkeit des GBM (57). Korkolopoulou et al. und Angara et al. beschrieben sowohl für die Expression von CXCL8 als auch die von CXCR2 ein verkürztes Gesamtüberleben (58, 59).

2.2.2 Die Quelle von CXCL8 und CXCL2 und die Rolle der TAM im Tumormikromilieu

Neben Tumorzellen konnten auch TAM (synonym und gliomspezifisch auch unter Glioma-assoziierte Mikroglia und Makrophagen zu finden) als eine Hauptquelle für die Chemokine CXCL8 und CXCL2 identifiziert werden (42, 46, 49, 60-62). TAM werden durch sekretierte Chemokine und Botenstoffe aus Tumorzellen rekrutiert und nehmen innerhalb des Tumormikromilieus eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung des inflammatorischen Milieus und der Tumorprogression ein (42, 62-64). Sie bilden mit circa einem Drittel und mehr einen großen Anteil der Gesamttumormasse (65, 66). Hauptanteil dieser Zellpopulation sind vorwiegend aktivierte ortständige Mikroglia (67). Im Kontext der GBM-Pathogenese befinden sich TAM vorwiegend im sogenannten M2-Phänotyp, der im Gegensatz zum M1-Phänotyp einen tumorfördernden und immunsuppressiven Einfluss auf das Tumormikromilieu ausübt (64-66, 68). Ein weiterer Hinweis für die Bedeutung dieser Immunzellpopulation ist die Korrelation der TAM-Akkumulation mit dem Schweregrad des Tumors und der CXCL8-Expression (61, 69). Außerdem lässt sich anhand des Anteils der sich im M2-Phänotyp befindlichen TAM die Prognose in Bezug auf das Überleben der Patienten abschätzen. Dieses ist umso schlechter, je mehr TAM im M2-Phänotyp vorzufinden sind (68).

2.2.3 Intrazelluläre Signalkaskaden des CXCR2-Rezeptors

Die Bindung der Liganden CXCL8 und CXCL2 an CXCR2 löst tumorfördernde Effekte aus, die durch unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden vermittelt werden (50, 70,

71). Eine der wichtigsten Downstream-Kaskaden ist PI3K/Akt (synonym Phosphatidylinositol-3-Kinase/Proteinkinase B), die sehr häufig im Rahmen der Karzinogenese verändert ist (50). Die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs fördert die Proliferation von Tumorzellen und deren Überleben, die Angiogenese, die Motilität und die Migration (50). Darüber hinaus ist die Aktivierung von PI3K ein Hauptübermittler zur Aktivierung des konservierten MAPK-Signalwegs, der eine wichtige Funktion bei der Regulierung der Proliferation und dem Überleben der Zelle einnimmt (70, 71).

Des Weiteren führt die CXCR2-Rezeptoraktivierung zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung von Phospholipase C. Das führt in nachgeschalteten Reaktionen unter anderem zu einer Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration, die in Konformationsänderungen des Zytoskeletts resultiert und dadurch Migrationsprozesse auslöst (70). Die Aktivierung von Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen und Rho-GTPasen hingegen führt sowohl zu Proliferationsvorgängen als auch zu einer Induktion von Chemoresistenz (70).

Auch auf Ebene der Regulation von Transkription und Proteinexpression konnte nach CXCR2-Aktivierung eine erhöhte transkriptionelle Aktivität festgestellt werden, durch die die Expression von Chemokinen und Zytokinen, darunter auch CXCL2 und CXCL8, beeinflusst wird (50). Durch die vermittelte Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie E2F und NF- κ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) wird darüber hinaus auch die Transkription verschiedener Gene, die für Zellzyklus, Invasion, Apoptose, Angiogenese und Migration verantwortlich sind, beeinflusst (70, 71).

2.2.4 Auswirkung der Aktivierung des CXCL8/CXCL2/CXCR2-Signalwegs auf Proliferation, Vaskularisation und Migration

Der CXCL8/CXCL2/CXCR2-Signalweg vermittelt über die Aktivierung von CXCR2 tumorfördernde Effekte. Diese sind in Abbildung 1 schematisch dargestellt und werden im Folgenden detailliert erläutert.

Die Aktivierung des Rezeptors erfolgt para- und autokrin in unterschiedlichen Kompartimenten des Tumors (49, 53, 55). Die proliferationsfördernde Wirkung wird direkt an der Tumorzelle vermittelt, während der Signalweg in der perivaskulären Nische zu Gefäßneubildung führt (41, 55, 56, 59). Infanger et al. beschreiben des Weiteren den positiven Einfluss von CXCL8 auf die Migration und das Wachstum von

Tumorstammzellen sowie die wechselseitige Beeinflussung von Endothelzellen, bei denen nach Stimulation eine CXCL8-Hochregulation beobachtet werden konnte (72). Im Rahmen der Angiogenese kommt es durch CXCR2-Aktivierung zu einer Erhöhung der Permeabilität von Hirnendothelzellen, was wiederum die Bildung neuer Gefäße und Ödeme begünstigt und die pharmakologische Erreichbarkeit des Tumors erschwert (73). Insbesondere TAM haben durch die räumliche Nähe in der perivaskulären Nische durch Sekretion von CXCL2 einen besonderen Einfluss auf die Angiogenese (62). CXCL2 wirkt proliferativ und im Vergleich zu VEGF sehr potent auf die Gefäßneubildung ein (54, 62). Die Auswirkung auf die Gefäßneubildung wurde *in vitro* an Hirnendothelzellen verglichen, wobei sich CXCL2 mindestens vergleichbar potent oder potenter zeigte (54, 62). Angara et al. zeigte als Ergänzung dazu, dass CXCR2-positive Tumorzellen insbesondere perivaskulär zu finden sind (59). Diese tragen maßgeblich zur Entstehung des sogenannten Vaskulären Mimikry (VM) bei (59). VM beschreibt fragile gefäßähnliche Strukturen, die nicht von Endothelzellen gebildet werden, aber ebenfalls zur nutritiven Versorgung des Tumors beitragen (74, 75). Die Ausprägung des VM korreliert nicht nur mit dem Schweregrad des Tumors, sondern ist auch ein negativer Prognosefaktor für GBM Patienten*innen (74, 76). Für die Bildung von VM im GBM sind Tumorzellen verantwortlich, die in Folge der Stimulation über CXCR2 endothelzellartige Eigenschaften annehmen (59).

Ein weiteres Kompartiment, in dem sich vermehrt CXCL8 und CXCR2 nachweisen lassen sind Regionen, die sich randständig zu Nekrosearealen befinden und Pseudopalisadenzellen enthalten (49, 55, 58, 77). Es wird vermutet, dass die Expression in diesen Arealen durch Hypoxie vermittelt wird und von nekrotischen Zellen ausgeht, wodurch Invasions- und Migrationsprozesse begünstigt werden (49, 56, 58, 77). Die Mobilisation der Zellen hinzu infiltrierenden Zellpopulationen wird dabei durch den Mechanismus der epithelial-mesenchymalen Transition ermöglicht. Die Initiation erfolgt ebenfalls durch Überexpression von CXCL8 (56). Ergänzend konnte durch Blockierung der Rezeptorebene (CXCR2 bzw. CXCR1 und CXCR2) die Migrations- und Invasionsaktivität von Tumorzellen gehemmt werden (55, 57).

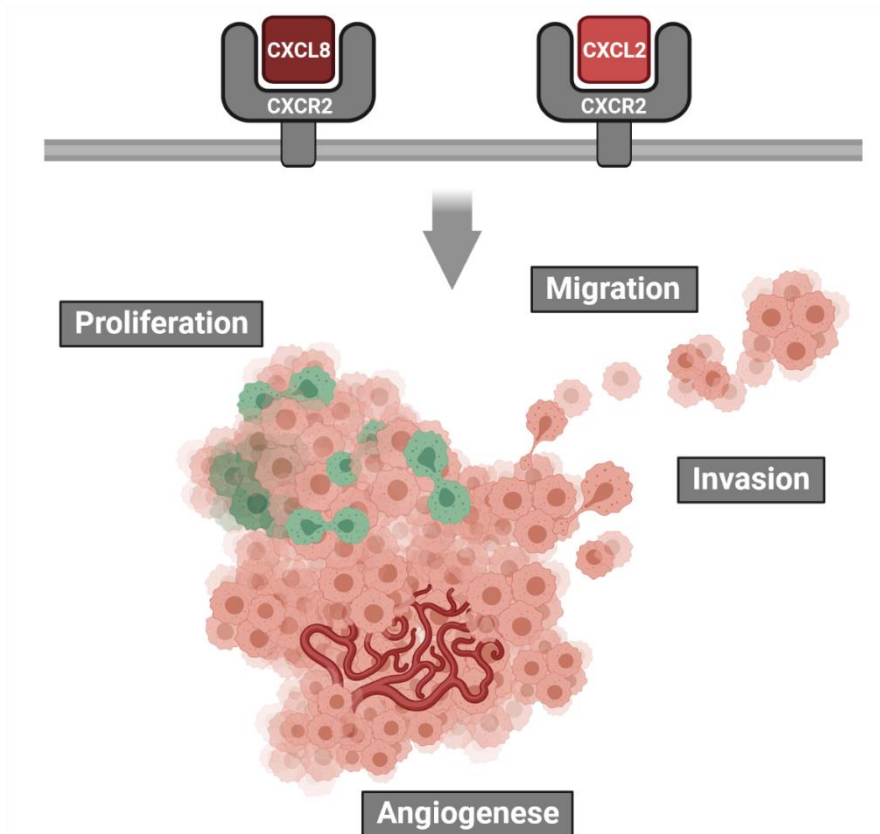


Abbildung 1: Die Rolle des CXCL8/CXCL2/CXCR2-Signalwegs im GBM.

Die Abbildung zeigt eine vereinfachte Darstellung der Wirkmechanismen des CXCL8/CXCL2/CXCR2-Signalwegs. Während im humanen CXCL8 und CXCL2 als Liganden vorhanden sind, exprimieren Mäuse kein CXCL8. Stattdessen wurde CXCL2 als Mausomolog zu CXCL8 identifiziert, welches gleichermaßen in der Lage ist, CXCR2 zu binden und zu aktivieren. Die Aktivierung des CXCR2-Rezeptors führt zu tumorfördernden Prozessen wie Angiogenese, Proliferation, Invasion und Migration, wodurch das Potential der Blockade des Signalwegs in der Entwicklung von neuen Therapien deutlich wird. Die Abbildung wurde mit biorender.com erstellt.

2.2.5 Das Potential der Blockierung des CXCL8/CXCL2/CXCR2-Signalwegs

Aufgrund der in den vorangegangenen Abschnitten dargestellten Schlüsselrolle des CXCL8/CXCL2/CXCR2-Signalwegs innerhalb tumorigen veränderter Chemokin-Netzwerke wird die Inhibierung und damit die Reduktion der Aktivierung als vielversprechendes Therapieziel erforscht. Für verschiedene Tumorentitäten und inflammatorische Erkrankungen gibt es bereits CXCR2-Antagonisten, die in klinischen Studien getestet werden (78, 79). Für das GBM gibt es bisher nur tierexperimentelle Untersuchungen zur Wirkung der Blockierung des CXCL2/CXCR2-Signalwegs. Die Inhibierung des Signalwegs erfolgte dabei auf unterschiedliche Weise. In vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe konnte im Mausmodell die Wirksamkeit der lokalen Anwendung eines CXCR2-Antikörpers mit konsekutiv reduziertem

Tumorzellen in der Tumorentstehungsphase nachgewiesen werden (62). Die Applikation von Antikörpern zur Behandlung von intraparenchymatösen Hirntumoren ist jedoch eine Herausforderung, da die Passierbarkeit über die Blut-Hirn-Schranke bei systemischer Gabe aufgrund der Größe und Eigenschaften der Antikörper erschwert ist und eine ausreichende Konzentration *in situ* selten erreicht wird (80). Eine Alternative ist deshalb die Verwendung von kleineren Molekülen (englisch „small-molecule“). In vorangegangenen Studien unserer und anderer Arbeitsgruppen wurde dabei SB225002 ((*N*-(2-Bromophenyl)-*N'*-(2-hydroxy-4-nitrophenyl)urea)), ein selektiver, Nicht-peptid small-molecule CXCR2-Antagonist, verwendet (59, 81, 82). SB225002 hat eine über 150-fach höhere Affinität zu CXCR2 im Vergleich zu CXCR1 (82). In tierexperimentellen Studien unserer Arbeitsgruppe wurde bei lokaler intrathekaler Applikation ein reduziertes Tumorzellvolumen, eine Reduktion der TAM-Akkumulation und eine geringere Gefäßzahl beobachtet (81). Angara et al. zeigten außerdem, dass SB225002 CXCR2+ (CXCR2-positiv) Subpopulationen reduziert und damit die Entstehung von VM hemmen kann (59). Ebenfalls konnte das Aussprossen von humanen Endothelzellen unter SB225002 Therapie *in vitro* reduziert werden (54).

Weitere Möglichkeiten, um im experimentellen Kontext die Auswirkung der Blockierung des Signalwegs zu erforschen, sind siRNA bzw. shRNA-basierte CXCR2-Knockout-Ansätze (59, 72). Hierdurch konnte ebenfalls eine Tumorzellvolumenreduktion erreicht werden (59, 72).

Durch die antitumorale Wirkung der Blockade des CXCL8/CXCL2/CXCR2-Signalwegs demonstrieren diese Ergebnisse einen vielversprechenden Ansatz in der Erforschung neuer Therapiemöglichkeiten in der Behandlung des GBM.

2.3 Zielsetzung der Arbeit

Wie in den vorangegangenen Kapiteln erläutert, spielen Veränderungen des Chemokin-Netzwerkes, genauer die Hochregulation des CXCL8/CXCL2/CXCR2-Signalwegs eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung, Progression und Rezidiventstehung des GBM. Insbesondere die im Rahmen der TMZ-Therapie induzierten Veränderungen des Signalwegs stellen einen Angriffspunkt dar, um die Wirksamkeit der Standardtherapie durch Blockade von CXCR2 zu verbessern. Die Arbeit gliederte sich in zwei Versuchsabschnitte. Der erste Versuchsabschnitt sollte vor dem Hintergrund eines translationalen Ansatzes klären, ob

1) die systemische Applikation des CXCR2-Antagonisten SB225002 vergleichbar effektiv wie die lokale Applikation über einen intrathekal platzierten Katheter ist.

Der zweite Versuchsabschnittes sollte untersuchen, ob

2) die Kombination des CXCR2-Antagonisten SB225002 mit dem Standardtherapeutikum TMZ zu einer Verstärkung der antitumoralen Antwort im Vergleich zu den jeweiligen Monotherapien führt.

3 Material und Methodik

3.1 Auflistung von Materialien, Geräten und Software

3.1.1 Materialliste

Tabelle 1: Übersicht verwendeter Materialien

Bezeichnung	Besonderheiten	Hersteller
384-Well Platte MicroAmp Optical Reaction plate		Applied Biosystems
Abdeckfolie, MicroAmp Optical Adhesive Film		Applied Biosystems
Alexa Fluor® 647-conjugated donkey anti rabbit, 711-605-152		Jackson ImmunoResearch
Alexa Fluor® 647-conjugated Donkey Anti-Goat IgG, 705-605-147		Jackson ImmunoResearch
ApopTag® Red In Situ Apoptosis Detection Kit, S7165		Merck Millipore
Aqua ad iniectabilia		B/Braun
Bepanthen Augensalbe		Bayer
Casein 0,5%/1%	5g/10g Casein in 1l PBS	Sigma Life Science
Combitips advanced für Multipipette		Eppendorf
Cyanacrylatklebstoff Contact Pen-System		Weicon
CyTM3 donkey anti-rat, 712-165-153		Jackson ImmunoResearch
D(+)-Saccharose		Carl Roth
DAKO Pen		DAKO Agilent
DAPI Mounting Medium		Dianova
Deckgläser		Carl Roth, Karlsruhe
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium + D-Glucose + L-Glutamine + Pyruvate	Gibco by life technologies
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	Sigma Aldrich
Einfrierlösung	DMSO+FCS (1:10)	
Ethanol		Merck Millipore
FCS	Fetales Kälberserum	PAA Laboratories
FITC-Lectin		Vector Laboratories
Gadolinium (Magnevist)		Bayer AG
Gelatine	Aus Kaltwasserfisch-Haut	Sigma Life Science

GentleMacs M Tubes		Miltenyi Biotec
Goat anti CXCL2, AF-452-NA		R&D Systems
Hamilton 1µl Spritze		Carl Roth
Isoflurane		CP Pharma
Kanülen (Sterican)	23G, 25G, 26G, 27G, 30G	B/Braun
Ketamin 10%		WDT
Kryotubes		Thermo Scientific
Microfilter Millex - GV 0.22µm		Merk Millipore Ltd.
Mini-osmotic Pump (2001)		Alzet
Nährmedium	DMEM+ 10% FCS + 1% Penicillin/Streptomycin	
Nahtmaterial	Fadenstärke 4-0	Ethicon
Natriumchlorid 0,9%		B/Braun
Neubauer Zählkammer		Brand
Paracetamol Infusionslösung		B/Braun
Paracetamol, ben-u-ron Saft		Bene Arzneimittel
Paraformaldehyd		Sigma Aldrich
PBS Tabletten, unsteril	Aufgelöst in destilliertem H2O	Gibco by life technologies
PBS, steril, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Gibco by life technologies
PCR Primer		TIB Molbiol
Penicillin G	Benzympenicillin- Natrium	Infectopharm
Penicillin/Streptomycin		PAA Laboratories
Pipettenspitzen		Falkon
Pipettenspitzen mit Filter (Biosphere Filter Tips)		Sarstedt
PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser, RR047A		TaKaRa
Rabbit anti-CXCR2, ab14935		Abcam
Rabbit anti-Iba1, 019-19741		WAKO
Rabbit anti-Kl67, RM-9106-S1		Thermo Scientific
Rat anti-CD31, 550274		BD Pharmingen™
RNAse freies steriles destilliertes H2O		Qiagen
RNeasy mini Kit		Qiagen
Saccharose Lösung 10%/20%/30%	10g/20g/30g in 100ml PBS	

SB225002	N-(2-Hydroxy-4- itrophenyl)- N'-(2- bromophenyl)urea	Tocris
Schlauchmaterial, Brain Infusion Kit 3		Alzet
Spritzen		B/Braun, Becton Dickinson
β-Mercapto-ethanol		Sigma Aldrich
SuperFrost Plus Objektträger		R. Langenbrinck, Emmerlingen
SYBR Premix Ex Taq, RR420A		TaKaRa
Temodal, TMZ	Temozolomid	MSD
Tissue-Tek		Sakura
Triton		Sigma Aldrich
Trypan Blau (0,4%)		Gibco by life technologies
Trypsin	Trypsin in EDTA (1:10)	Thermo Scientific
Tubes 50ml		Falcon
Xylazin (Xylavet 20mg/ml)		Cp-pharma
Xylocain Gel 2%		AstraZeneca
Zellkulturflaschen 75cm²		Falcon

3.1.2 Softwareliste

Tabelle 2: Übersicht verwendeter Software

Programm	Hersteller
Axio Vision 4	Carl Zeiss
BioRender 2021	BioRender
EndNote X9	Clarivate Analytics
i-Control	Tecan
Microsoft Office 2016 (Word, Excel, PowerPoint)	Microsoft
ImageJ 1.53c	NIH
Analyze 10.0	AnalyzeDirect, Inc.
GraphPad Prism Version 9.1.2	GraphPad Software, Inc.
ParaVision Version 5.1	Bruker

3.1.3 Geräteliste

Tabelle 3: Übersicht verwendeter Geräte

Gerät	Hersteller
Homogenisator dispomix	Xiril
Inkubator Heraeus BBD 6220	Thermo Scientific
Konfokalmikroskop SP8	Leica
Kryostat Microm HM 560	Thermo Scientific
Kühlschränke -4°C,-20°C,-80°C	Unterschiedliche Hersteller
Lichtmikroskop Nikon Diaphot	Nikon
Magnetrührer Yellowline	MSH
Mikroskop Axio Observer Z1	Microlmaging 217
Multipipette E3	Eppendorf
PCR System Quant Studio 6 Flex System	Applied biosystems
Pharmascan 70 / 16 AS	Bruker BioSpin
Pipette Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
Pipetten 2.5, 10, 20, 100, 1000	Eppendorf
Plate Reader Infinite M200	Tecan
Rotationsmixer M2000	Sarstedt
Stereotaxierahmen	Stoelting
Sterilwerkbank Hera Safe	Thermo Scientific
Thermocycler UnoCycler	VWR
Thermomixer Comfort	Eppendorf
VortexGenie II	Scientific Industries
Waage EMB 1000-2	Kern
Waage Sartorius	Entris
Wärmebad W32	Medingen
Wippe Shaker DRS-12	NeoLab
Zentrifuge	Labnet International, Inc.
Zentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Scientific
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0R	Thermo Scientific
Zentrifuge Heraeus Pico 17	Thermo Scientific

3.2 Anteilserklärung Methodenteil

Die unten beschriebenen Arbeitsschritte wurden selbständig von mir, Claudius Jelgersma, durchgeführt. Davon ausgenommen ist die einmalige FITC-Lektin-Färbung und Mikroskopie, die freundlicherweise durch Till de Bortoli durchgeführt wurde.

3.3 GBM-Mausmodell

3.3.1 Zellkultur

Für die Tumorzellinokulation wurden syngene GL261-Zellen verwendet. Diese Zellen entstammen aus GBM-Tumoren die chemisch in immunkompetenten Mäusen durch 3-Methylcholanthreninjektion induziert wurden [87]. Die Aufbewahrung der GL261 Zellen erfolgte bei -80°C im Stickstofftank in einer Einfrierlösung aus DMSO und fetalem Kälberserum (FCS) im Verhältnis 1:10. Für die Anlage einer Zellkultur mit dem Ziel, entweder Zellen zu passagieren oder Zellen für die Implantation vorzubereiten, wurden die Zellen aus dem Stickstofftank entnommen und im 37°C Wasserbad zügig aufgetaut. Es erfolgte die sofortige Auswaschung von DMSO durch Zugabe von Nährmedium (=DMEM + 10% FCS + 1% Penicillin/Streptomycin) und anschließender Zentrifugation (7min, 22°C, 1300/min). Die Zellen wurden nach Entfernung des alten Nährmediums mit DMSO in 1ml Nährmedium resuspendiert und in der Neubauer Zählkammer lichtmikroskopisch gezählt. Hierzu wurde zweimalig je 10µl der Zellsuspension entnommen und mit 90µl Trypanblau verdünnt. Nach Mittelwertbildung der Zählwerte wurde die Gesamtzellzahl nach Rückrechnung des Verdünnungsfaktors bestimmt. Zum Passagieren wurden 1Mio Zellen inkubiert. Für die Vorbereitung der Zellen für die Implantation wurden im ersten Versuchsabschnitt 1Mio bzw. im zweiten Versuchsabschnitt 550.000 für 60-72h inkubiert. Die Inkubation erfolgte in einer 75cm² Zellkulturflasche in 10ml Nährmedium bei 37°C, 5% Kohlendioxid und einer relativen Luftfeuchte von 95-98%. Nach dem Erreichen einer Konfluenz von 70-90% wurde nach lichtmikroskopischer Beurteilung der Qualität der Überstand entfernt und mit 10 ml PBS gewaschen. Die Ablösung der Zellen von dem Boden der Zellkulturflasche wurde mit 2ml Trypsin (1-fach) bei 37°C für 2min erreicht. Die Trypsinreaktion wurde durch Zugabe von 20ml Nährmedium gestoppt. Die Zellsuspension wurde anschließend zentrifugiert (7min, 22°C, 1300/min). Zur Vorbereitung der Zellimplantation wurden die Zellen jetzt in PBS gezählt und nach erneuter Zentrifugation auf die entsprechende Konzentration von 20.000 Zellen/µl (Versuchsabschnitt I) bzw. 100.000 Zellen/µl (Versuchsabschnitt II) gebracht. Die Aufbewahrung bis zur Implantation erfolgte in PBS auf Eis. Im Gegensatz zur Vorbereitung der Zellen für die Implantation wurden für das Passagieren 1Mio Zellen in Nährmedium erneut inkubiert (37°C, 5% CO₂, 95-98% rel. Luftfeuchte). Nach Erreichen der gewünschten Konfluenz wurden alle qualifizierten Zellkulturen entsprechend dem beschriebenen Protokoll entnommen und anschließend gepoolt. Nach Zählung der jetzt gepoolten Zellen wurden diese nach einer abschließenden

Zentrifugation auf eine Konzentration von 1Mio Zellen/ml in Einfrierlösung gebracht. Die Zellen wurden daraufhin schonend eingefroren. Dies wurde zum einen durch DMSO in der Einfrierlösung, das die Bildung von Eiskristallen verhindert sowie durch das langsame Herunterkühlen der Zellsuspensionen in einem speziellen Behälter (Mr. Frosty™ Gefrierbehälter) befüllt mit Propanol bei -80°C, gewährleistet. Die Zellen wurden nach 24h in den Stickstofftank (-80°C) überführt.

3.3.2 Tierexperimente

Alle Tierexperimente wurden entsprechend der Bestimmungen des geltenden deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Die Experimente wurden durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo) Berlin unter der Registrierungsnummer G0221/17 genehmigt. Für die Experimente wurden weibliche C57BL6/N Mäuse im Alter von 13 ± 4 Wochen und einem Gewicht von $22 \pm 1,6$ Gramm verwendet. Dabei handelte es sich um Mäuse mit erhaltener Immunkompetenz die häufig in der immunologischen und onkologischen Forschung verwendet werden (83, 84).

3.3.3 Tierhaltung, Monitoring, Abbruchkriterien

Die Unterbringung der Tiere erfolgte in individuell belüfteten Käfigen (IVC-System (Individual Ventilated Cages)) die mit Streu und Nestmaterial (Zellstoff und Unterschlupfmöglichkeit) ausgestattet waren. Die Haltung der Tiere erfolgte bei einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12h. Des Weiteren erhielten die Mäuse Futter und Wasser ad libitum. Die Beobachtung und das Scoring auf Nebenwirkungen oder Abbruchkriterien während der Experimentalphase erfolgte 1-2x täglich. Des Weiteren wurden die Tiere wöchentlich gewogen. Eine intensivere Beobachtung der Tiere erfolgte an den Tagen nach operativen Eingriffen sowie zum Ende der Experimentalphase. Definitive Abbruchkriterien waren u.a. neurologische Ausfälle, verminderte Wasser- und Futteraufnahme und ein signifikanter Gewichtsverlust (>20% des Ausgangsgewichts).

3.3.4 Narkose und Analgesie

Die Tiere wurden für die Tumorzellinokulation, die Implantation der mini-osmotischen Pumpe und die Perfusion durch eine intraperitoneal applizierte Narkose mit Ketamin und Xylazin abgeschirmt. Diese wurde in einer Konzentration von 1mg Xylazin mit 9mg

Ketamin pro 100g gewichtsadaptiert appliziert. Die Tiefe der Narkose wurde durch Überprüfung des Zwischenzehenreflex getestet. Bei Bedarf wurden die Tiere in 5-10% Schritten der Ausgangsdosis titriert, bis das gewünschte Toleranzstadium erreicht war. Für die Perfusion mit anschließender Tötung erhielten die Tiere initial zusätzlich 25% der ursprünglichen Gesamtdosis. Eine zusätzliche Analgosedierung erfolgte präoperativ durch 2mg Paracetamol subkutan pro Maus. Postoperativ erhielten die Tiere für drei Tage Paracetamol in das Trinkwasser. Für die MRT-Untersuchungen wurde eine Inhalationsnarkose mit Isofluran 1,0-1,8% im Gasgemisch (70% Distickstoffmonoxid + 30% Sauerstoff) durchgeführt. Die Tiere wurden nach Durchführung der Narkosen engmaschig überwacht und erst in adäquatem Zustand zurück in den Käfig gesetzt und in den Tierstall gebracht.

3.3.5 Tumorzellinokulation

Die Vorbereitung der Tiere für die Tumorzellinokulation erfolgte nach Erreichen des Toleranzstadiums durch Rasur der Kopfhare und Desinfektion des Hautareals. Die Tiere erhielten präoperativ subkutan 2mg Paracetamol und intramuskulär 10.000 IE Benzylpenicilin-Natrium als Single-Shot zur Infektionsprophylaxe. Die Kopfhaut wurde zusätzlich mit einem Lokalanästhetikum (Lidocain) betäubt. Die Augen wurden durch Bepanthen-Salbe geschützt. Im Anschluss erfolgte die Fixierung des Kopfes durch Einspannung in den Stereotaxierahmen (Abbildung 2). Hierzu wurden die Frontzähne in den Zahnschlitten gelegt und die Kalotte durch stumpfe aurikulär platzierte Pins fixiert. Nach erneuter Hautdesinfektion, Hautschnitt und Präparation konnte das Bregma als Orientierungspunkt markiert werden. Die Trepanation erfolgte mit einer 23G-Kanüle 1mm rostral und 2mm rechtslateral des Bregma. GL261-Zellen wurden mit einer 1µl-Hamilton-Spritze in 3mm Tiefe ab Kalottenoberfläche in das Striatum ventral des Corpus Callosum injiziert. Die Hamilton-Kanüle wurde initial auf 4mm Tiefe vorgeschoben und nach 30s zur Implantation entsprechend auf eine Tiefe von 3mm zurückgezogen. Die Injektion erfolgte über eine Dauer von 5min. Die Hamilton-Kanüle wurde für 5min in Position belassen und langsam über einen Zeitraum von weiteren 5min zurückgezogen, um artifizielle Blutungen und das Verschleppen von Tumorzellen in den Implantationskanal zu vermeiden. Die Haut wurde mit einem polyfilen nicht-resorbierbaren Faden in der Stärke 4:0 fortlaufend verschlossen. Die Tiere wurden mit Ohrstanze und Schwanzmarkierung gekennzeichnet.

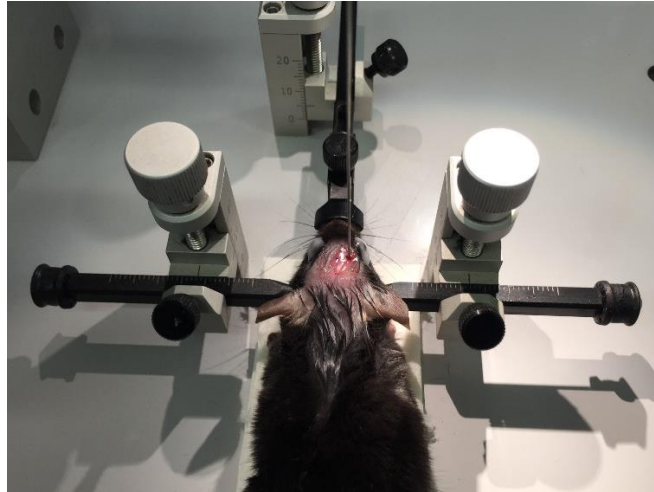


Abbildung 2: Stereotaktische Tumorzellinokulation.

Auf der Abbildung ist eine eingespannte Maus im Stereotaxierahmen zu sehen. Die Hamilton-Kanüle ist zur Tumorzellinokulation rechtslateral platziert.

3.3.6 Implantation der mini-osmotischen Pumpe

Die Vorbereitung der Tiere erfolgte wie in Kapitel 3.3.5 beschrieben. Nach Einspannung erfolgte die Hautinzision idem zur Tumorzellinokulation mit Schnitterweiterung nach kaudal. Nach stumpfer Präparation einer subkutanen Tasche als Pumpenlager erfolgte die Markierung des Bregma. Die Trepanation mit einer 27G Kanüle erfolgte zwischen 0,8-1mm linkslateral der Markierung, was abhängig des gemessenen Abstands des linken Seitenventrikels zur Mittellinie im MRT war. Der Katheter des Kopfteils wurde nach Konnektierung mit Schlauch und Pumpe langsam in den Ventrikel eingebracht. Die Auflageplatte wurde auf der Kalottenoberfläche fest verklebt. Der Wundverschluss erfolgte wie beschrieben (3.3.5) mit zusätzlichen Sicherungsnähten in Einzelknopftechnik. Die Pumpenlage und die Lokalisation des Katheters sind schematisch in Abbildung 3 dargestellt.

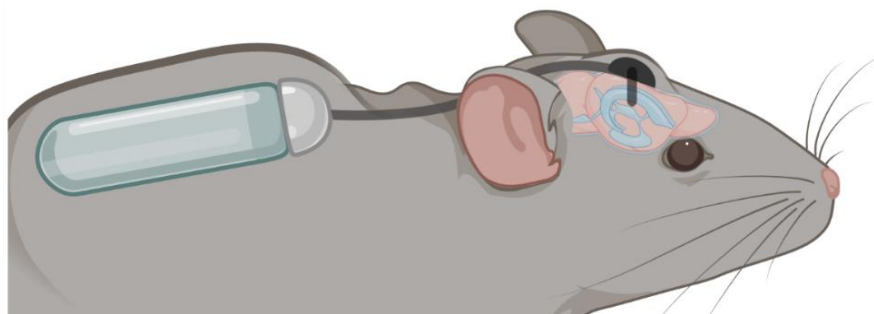


Abbildung 3: Lage der mini-osmotischen Pumpe zur intrathekalen Applikation.

Die Abbildung zeigt schematisch die Lage der mini-osmotischen Pumpe in der präparierten subkutanen Tasche unter der Rückenhaut. Ein subkutan liegender Schlauch verbindet die Pumpe mit dem Kopfteil. Das Kopfteil ist mit dem intrathekal liegenden Katheter konnektiert. Die Abbildung wurde mit biorender.com erstellt.

3.3.7 Vorbereitung der Therapien und Applikationsform

3.3.7.1 SB225002

Für die Experimente dieser Arbeit wurde der CXCR2-Antagonist SB225002 von Tocris verwendet (Molekulargewicht: 352,14; Formel: C₁₃H₁₀BrN₃O₄). Dieser wurde entsprechend den Angaben des Herstellers in einer Stammlösung von 100mM in DMSO gelöst und bei -20°C aufbewahrt. Zur Vorbereitung der intraperitonealen Therapie sowie der Pumpenbefüllung für die Kombinationstherapie wurde der CXCR2-Antagonist entsprechend der gewünschten Endkonzentration mit NaCl 0,9% diluiert. Aufgrund der schweren Löslichkeit erfolgte dies in einem Wasserbad bei 57°C für 20min. Nach kräftigem Schütteln wurde die Lösung mikrofiltriert (0,22µm Porengröße; Merk Millipore Ltd.) und entweder in Tageseinzeldosen (30µg, 60µg und 200µg) eingefroren oder zur Befüllung der Pumpen verwendet. Die Konzentration für die intrathekale Applikation mittels mini-osmotischer Pumpe betrug 30µg pro Tag pro Tier. Es wurden mini-osmotische-Pumpen (ALZET, Model 2001) mit einer Laufrate von 1µl/h für 7Tage verwendet. Die Vorbereitung der Pumpen erfolgte mindestens 6-8h vor Implantation, da diese schon anlaufen mussten, um einen kontinuierlichen Fluss ab Implantation zu gewährleisten. Dazu erfolgte nach dem luftfreien Befüllen der Pumpen in aufrechter Position, die Einlage des Reservoirs in 10ml NaCl 0,9% bei 37°C bis zur Implantation. Voraussetzung für die Implantation war das sichtbare Anlaufen der Pumpe.

3.3.7.2 Temozolomid

Aufgrund der schlechteren Löslichkeit von TMZ (TEMODAL®; MSD) in NaCl 0,9%, wie es in der Vergangenheit durchgeführt worden war, erfolgte in dieser Arbeit die Auflösung des Pulvers laut Herstellerangaben in Aqua ad iniectabilia (B/Braun) (85). Es wurde eine Konzentration von 3mg/ml hergestellt, um anschließend Aliquote in der Tagesgesamtdosis vorzubereiten und bei -20°C bis zur Verwendung aufzubewahren. Kurz vor Applikation wurden diese aufgetaut. Die Tiere erhielten gewichtsadaptiert an sieben aufeinanderfolgenden Tagen 60µg/g/d. Die gewählte Konzentration entsprach der

humanen Maximaldosis von 200mg/m² berechnet auf die Körperoberfläche. TMZ wurde für die Experimente dieser Arbeit intraperitoneal (26G-Kanüle) appliziert.

3.3.8 Perfusion, Tötung und Entnahme der Gewebeproben

Die Perfusion der Tiere erfolgte intrakardial in vertiefter Narkose (3.3.4). Nach T-förmiger Inzision des Abdomens wurden die Rippenbögen sowie das Diaphragma von abdominal dargestellt. Der Zugang zum schlagenden Herzen erfolgte durch Inzision des Zwerchfells und Herausnahme der vorderen Thoraxwand. Nach Durchtrennung der Vena cava inferior oberhalb der Leber konnte über den linken Ventrikel entweder je 10 ml kaltes PFA 4%ig oder PBS infundiert werden. Die erfolgreiche Perfusion konnte anhand der Beobachtung des Ablassens der inneren Organe, insbesondere der Leber, sichergestellt werden. Nach Abtrennung des Kopfes konnte das Gehirn nach vorsichtigem Eröffnen der Kalotte entnommen werden. Im Falle der PFA Perfusion für histologische Analysen, wurde das Gehirn direkt in 4%iger PFA Lösung für 24h bei 4°C inkubiert. Für mRNA-Analysen wurden im Anschluss an die Entnahme der PBS perfundierten Gehirne die Tumore unter mikroskopischer Sicht herauspräpariert und direkt eingefroren. Das Einfrieren erfolgte schonend durch Einlegen in schon vorgekühlte Cryotubes bei -80°C.

3.4 Versuchsaufbau

3.4.1 Versuchsabschnitt I – Wirksamkeit der systemischen intraperitonealen Applikation von SB225002

Im ersten Versuchsabschnitt wurde die Wirksamkeit des CXCR2-Antagonisten SB225002 bei systemischer Applikation untersucht. Dabei wurden die Dosierungen 30µg_{i.p.}, 60µg_{i.p.} und 200µg_{i.p.} pro Tag pro Tier verglichen. Die Wahl der Dosis richtete sich primär nach den Erfahrungen der Experimente unserer Arbeitsgruppe bei intrathekaler Dosis von 30µg/Tag, bei der ein signifikanter antitumoraler Effekt beobachtet werden konnte (81). Da der Einfluss der Bluthirnschranke auf die Passierbarkeit von SB225002 sowie mögliche Distributions- und Metabolisierungsverluste bei systemischer Applikation unbekannt waren, wurden entsprechend auch höhere Dosen getestet. Für SB225002 ist eine dosisabhängige Verminderung der Aktivierbarkeit von CXCR2 bekannt (82). Durch Verwendung unterschiedlicher Dosen sollte ein möglicher Dosis-Wirkungs-Zusammenhang

berücksichtigt werden. Die Applikation erfolgte intraperitoneal einmal täglich an sieben aufeinander folgenden Tagen. Die Kontrollgruppe erhielt das Lösungsmedium äquivalent zu SB225002 (NaCl 0,9%+Dimethylsulfoxid (DMSO)) in gleicher Volumenmenge wie die SB225002-Gruppe. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 4 dargestellt. Vor Therapiebeginn an Tag 14 nach Tumorzellinokulation, wurde die erste MRT-Bildgebung durchgeführt, um das Tumorwachstum zu bestimmen. Nach 21 Tagen wurde die zweite MRT-Bildgebung durchgeführt, bevor die Tiere anschließend für histologische Analysen perfundiert wurden (siehe 3.3.8 und 3.6.1). Die histologischen Analysen wurden in der Gruppe mit dem größten Volumenreduktionseffekt und den dazugehörigen Kontrollen durchgeführt. Die Gruppenzugehörigkeit wurde per Zufall festgelegt.

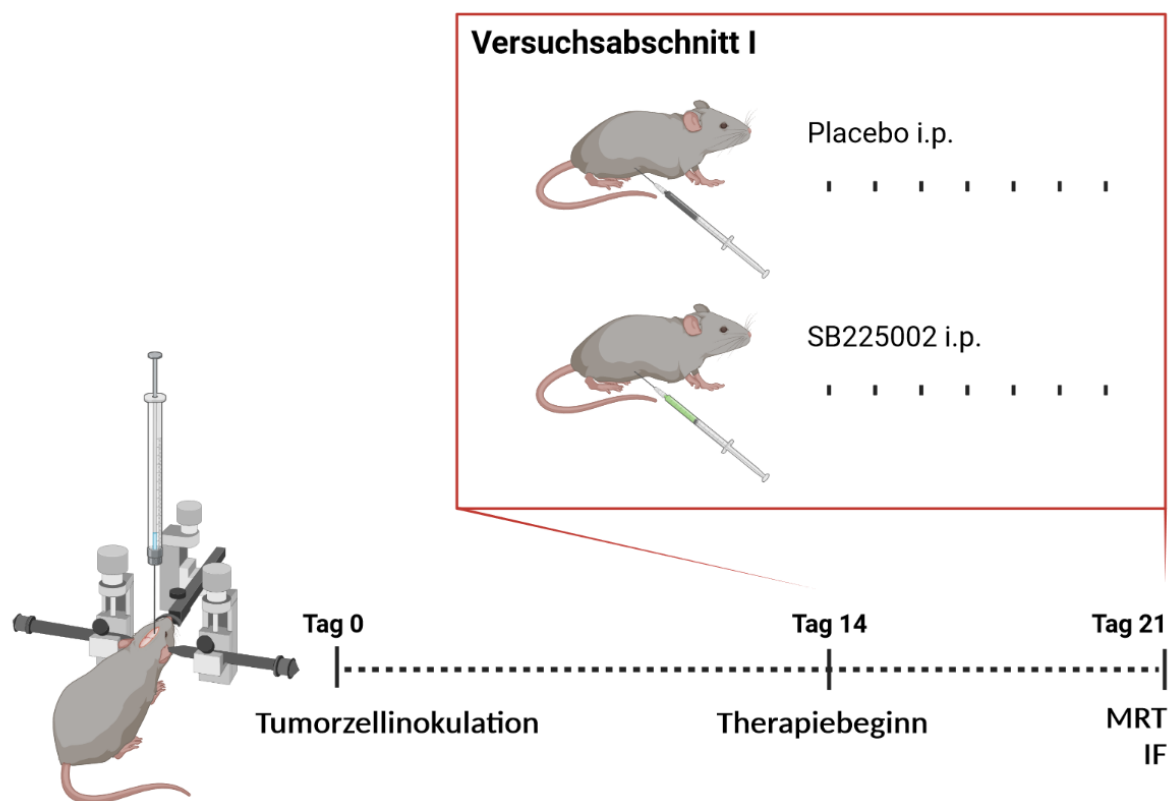


Abbildung 4: Schematischer Versuchsaufbau – Versuchsabschnitt I.

Die stereotaktische Tumorzellinokulation erfolgte an Tag 0. Unmittelbar vor Therapiebeginn an Tag 14 wurde zur Wachstumskontrolle der Tumore eine Tumorumfangmessung mittels MRT-Bildgebung durchgeführt. Nach einer siebentägigen Therapiedauer erfolgte vor Perfusion und Tötung der Tiere an Tag 21 die zweite MRT-Bildgebung. Nach der Perfusion wurde das Gewebe für weitere Analysen mittels Immunfluoreszenz aufgearbeitet. Der CXCR2-Antagonist SB225002 wurde systemisch über eine intraperitoneale Injektion appliziert. Die Kontrollgruppe erhielt als Placebo intraperitoneal das Lösungsmedium von SB225002 in gleichem Volumen. (Abkürzungen: i.p., intraperitoneal; MRT, Magnetresonanztomografie; IF, Immunfluoreszenzfärbung; qRT-PCR, quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion) Die Abbildung wurde mit biorender.com erstellt.

3.4.2 Versuchsabschnitt II – Kombinationstherapeutischer Ansatz mit TMZ und SB225002

Die Kombinationstherapie von TMZ und SB225002 wurde in vier Gruppen analysiert (Abbildung 5). Diese waren: Kontrolle, Monotherapien mit TMZ oder SB225002 und die Kombinationstherapie TMZ+SB225002. Die Kontrollgruppe erhielt intraperitoneal Aqua ad iniectabilia (B/Braun) in gleicher Volumendosis der intraperitoneal verabreichten Menge an TMZ in der TMZ-Gruppe. Die Tiere der TMZ-Gruppe erhielten die auf die Körperoberfläche berechnete Äquivalenzdosis ($60\mu\text{g/g/d}$) zur humanen Maximaldosis von 200mg/m^2 . Die Applikation von SB225002 erfolgte intrathekal, da sich im Rahmen der Auswertungen des Versuchsabschnittes I eine Unterlegenheit der systemischen Applikationsform gegenüber der lokalen Anwendung gezeigt hatte. SB225002 wurde in einer Dosierung von $30\mu\text{g}$ pro Tag kontinuierlich über eine mini-osmotische-Pumpe appliziert. Dabei wurde SB225002 direkt über einen intrathekal im linken Seitenventrikel implantierten Katheter appliziert. Der zeitliche Versuchsaufbau erfolgte analog zu Versuchsabschnitt I, bei dem die Therapie an Tag 14 eingeleitet wurde (Abbildung 5). Im Unterschied zu Versuchsabschnitt I wurden zusätzlich qRT-PCR Analysen durchgeführt (Abbildung 5). Die Gruppenzugehörigkeit wurde per Zufall festgelegt.

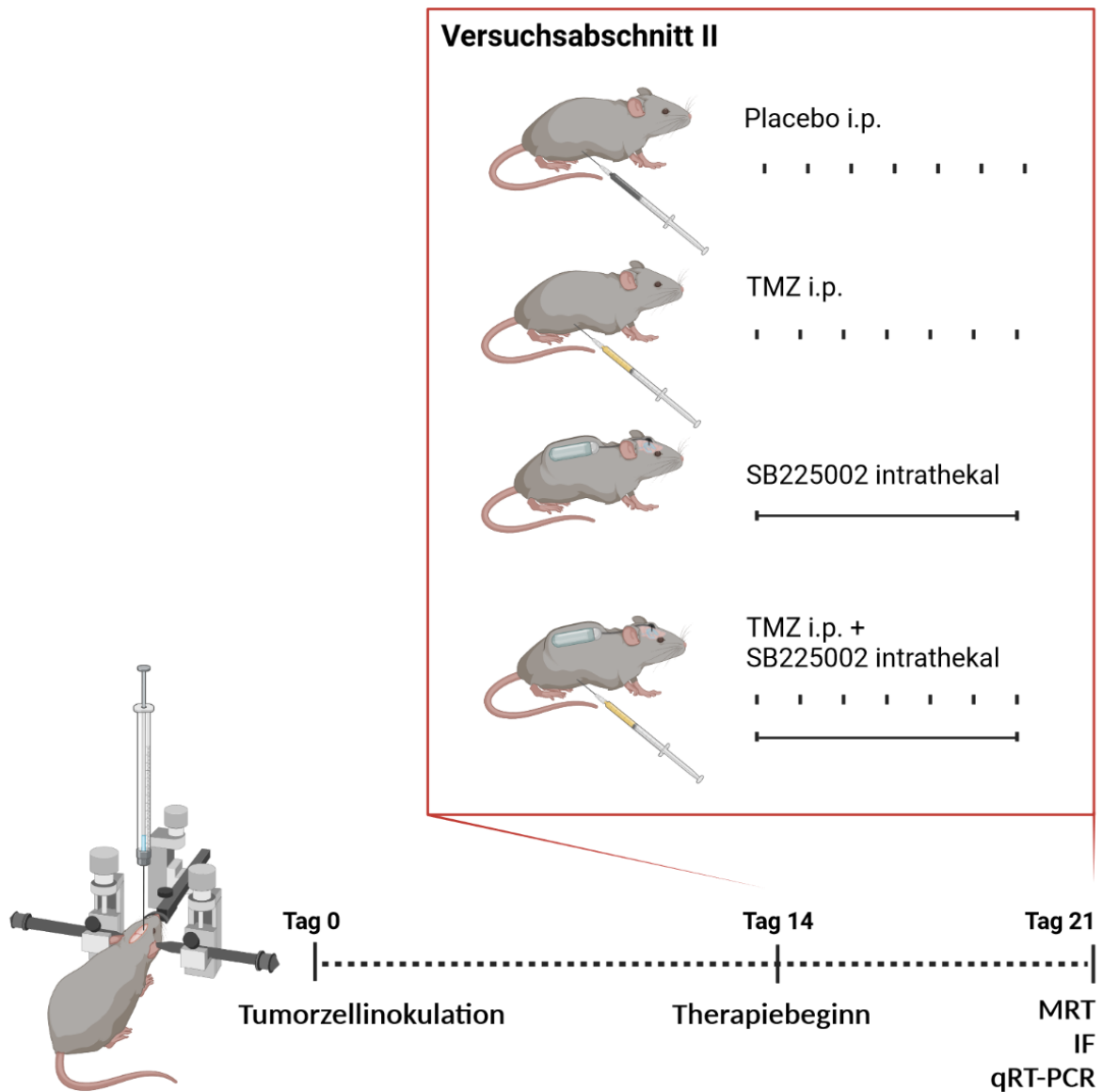


Abbildung 5: Schematischer Versuchsaufbau – Versuchsabschnitt II.

Die stereotaktische Tumorzellinokulation erfolgte an Tag 0. Unmittelbar vor Therapiebeginn an Tag 14 wurde zur Wachstumskontrolle der Tumore eine Tumorumfangmessung mittels MRT-Bildgebung durchgeführt. Nach einer siebentägigen Therapiedauer erfolgte vor Perfusion und Tötung der Tiere an Tag 21 die zweite MRT-Bildgebung. Nach der Perfusion wurde das Gewebe für weitere Analysen mittels Immunfluoreszenz und qRT-PCR aufgearbeitet. Die Tiere erhielten intraperitoneal TMZ, während der CXCR2-Antagonist SB225002 intrathekal über einen Katheter, der mit einer mini-osmotischen Pumpe verbunden war, appliziert wurde. Die Kontrollgruppe erhielt als Placebo intraperitoneal Aqua ad iniectionem (Äquivalenzvolumen zu TMZ). (Abkürzungen: i.p., intraperitoneal; MRT, Magnetresonanztomografie; IF, Immunfluoreszenzfärbung; qRT-PCR, quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion) Die Abbildung wurde mit biorender.com erstellt.

3.5 MRT und Tumorvolumetrie

Zur Kontrolle des Tumorwachstums und zur Bestimmung der Tumorzellvolumina wurde eine Schnittbildgebung mittels 7-Tesla Kleintier-Magnetresonanztomographie durchgeführt. Dazu wurde ein horizontaler Magnet mit einer Bohrung von 16cm und einem Gradientenrohr mit Innendurchmesser von 9cm, ¹H-Resonanzfrequenz 300MHz und einer maximalen Gradientenstärke von 300mT/m verwendet (Pharmascan 70 / 16 AS, Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany und Paravision 5.1 Software). Die Aufnahme erfolgte mit einem ¹H-RF-Quadraturvolumenresonator (Rapid Biomed, Rimpar, Germany) mit einem Innendurchmesser von 20mm. Die Mäuse erhielten intraperitoneal kontrastgebendes Gadolinium (Magnevist®, Bayer AG) in einer Konzentration von 0.5mmol/kg. In Inhalationsnarkose (3.3.4) wurden die Tiere auf einer Wärmematte (37°C) gelagert, um die Körpertemperatur aufrechtzuerhalten. Die Überwachung der Narkose erfolgte mittels Messung der Atemfrequenz (Zielfrequenz 100-120/min, Small Animal Monitoring & Gating System, SA Instruments). Zuerst wurde eine T2 gewichtete Sequenz (T2) und 20-25min nach Kontrastmittelinjektion eine T1 gewichtete Sequenz mit Kontrastmittel (T1+KM) in 32 Schichten mit einer Schichtdicke von 0,5 mm durchgeführt. Die Bildgebungsparameter waren für die T2: Turbo-Spin-Echo Sequenz mit TR / TE = 4200 / 36 ms, RARE Faktor 8, 4 Averages, Scan Zeit 6min 43s und für T1+KM: Turbo-Spin Echo Sequenz mit TR / TE = 975 / 11.5 ms, RARE Faktor 2, 4 Averages, Scan Zeit 8min19s. Das Field of View (Bildausschnitt) betrug jeweils 2,56 x 2,56cm und die Bildmatrix von 256 x 256 ergab eine Auflösung von 0,100mm². Die Tumorzellvolumetrie erfolgte mit Analyze 10.0. (AnalyzeDirect, Inc.). Zur Berechnung des Volumens wurden die Tumorränder in allen vorhandenen Schichten manuell markiert (hyperintense Areale in T2 bzw. T1+KM). Aus den in den Arealen liegenden Voxeln wurde abschließend automatisiert eine dreidimensionale Rekonstruktion des Tumors erstellt und das Volumen in mm³ berechnet. Zur Berechnung des Wachstumsfaktors wurden die Tumore der einzelnen Tiere vor und nach der Behandlung ins Verhältnis gesetzt (Volumen Tag 21/Volumen zu Therapiebeginn).

3.6 Immunfluoreszenzhistologische Analysen

3.6.1 Vorbereitung, Aufarbeitung und Aufbewahrung der Gehirne

Für die Fixierung des Gewebes wurde 4%iges PFA verwendet, in dem die Gehirne für 24 h nach Perfusion verblieben (3.3.8). Im Anschluss wurden die Gehirne in einem

mehrstufigen Prozess durch Einbettung in Saccharose-Lösung unterschiedlicher aufsteigender Konzentrationen (10%ig, 20%ig, 30%ig) entwässert. Die Gehirne verblieben so lange in der jeweiligen Lösung, bis sie von der Oberfläche absanken. Dies dauerte in der Regel 24h bei -8°C. Zum schonenden Einfrieren wurden die Gehirne trocken auf eine sich in Stickstoff (N₂) befindliche Metallplatte gelegt. Dies ermöglichte das Einfrieren ohne direkten Kontakt der Gehirne mit N₂. Die Gehirne verblieben bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C. Zur Anfertigung von Gewebsschnitten wurden die Gehirne in 2%iger Gelatine eingebettet. Das Gewebe wurde mit dem Mikrotom (Microm HM 560, Thermo Scientific) bei einem Temperaturoptimum zwischen -20 bis -32°C und einer 2-3°C wärmeren Klingentemperatur auf eine Schichtdicke von 10µm Dicke zugeschnitten. Auf speziell beschichteten Objektträgern (SuperFrost Plus Objektträger, R. Langenbrinck) wurden drei Schnitte unterschiedlicher Lokalisation innerhalb des Tumors aufgetragen. Die Lagerung der angefertigten Objektträger erfolgte bei -80°C.

3.6.2 Immunfluoreszenzfärbung und Mikroskopie

Die Anfärbung der Zielstrukturen erfolgte mittels Immunmarkierung. Dazu wurden die Zielmoleküle durch spezifische Primärantikörper gebunden. Zur Darstellung erfolgte die Zugabe von Fluorochrom markierten Sekundärantikörpern, die die Zielstrukturen durch emittierendes Licht unterschiedlicher Wellenlänge indirekt sichtbar machten. Die jeweiligen Färbungen sind in den nachfolgenden Unterkapiteln detailliert beschrieben (3.6.3, 3.6.4 und 3.6.5.), während in diesem Absatz die durchgeführten Schritte erläutert werden, die für alle Immunfluoreszenzfärbungen bis auf die Färbung der Apoptose mittels TUNEL zutrafen. Zur Vorbereitung wurden die Objektträger aus -80°C entnommen und an Raumtemperatur (RT) luftgetrocknet. Die Umrandung der einzelnen Schnitte auf dem Objektträger wurde mittels DAKO-Pen durchgeführt. Dies erfolgte, um Färbelösungen auf dem Gewebe zu halten und ein Überlaufen zu verhindern. Durch das Waschen der Schnitte wurden alte Gelatinereste und Verschmutzungen entfernt. Des Weiteren wurde ein Blockierungsschritt mit Casein 1% in PBS durchgeführt, um unspezifische Bindungsstellen zu besetzen und so das Hintergrundrauschen zu reduzieren. Sekundärantikörper wurden bei Mehrfachfärbungen so ausgewählt, dass sie aus unterschiedlichen Spezies abstammten. Dadurch wurde die spezifische Bindung des Zielprimärantikörpers sichergestellt und eine Kreuzreaktivität vermieden. Nach der Inkubation der jeweiligen Antikörper erfolgten erneut Waschschriffe, um nicht gebundene

Antikörper zu entfernen. Am Ende der Färbungsprotokolle wurden Zellkerne durch DAPI in Mounting-Medium (Dianova) angefärbt und eingebettet. Für intrazelluläre Moleküle wurde vor Verwendung der Primärantikörper eine Permeabilisierung mit Triton (Sigma Aldrich) durchgeführt. Zur Verminderung von Verschmutzungen durch verklumpte Sekundärantikörper wurden die Antikörperlösungen kurz zentrifugiert, bevor sie auf den Objektträger aufgebracht wurden. Die Schnitte wurden in der Regel innerhalb einer Woche mikroskopiert, um einem Abblenden der Fluoreszenzintensität zuvorzukommen. Als Negativkontrollen wurden Färbungen ohne Primärantikörper durchgeführt. Dadurch wurde sichergestellt, dass keine unspezifischen Bindungen des Sekundärantikörpers an Hintergrundstrukturen vorhanden waren. Zur Mikroskopie wurde ein Zeiss, Axio Observer Z1 Mikroskop und AxioVision Software verwendet (MicroImaging 217). Die gefärbten Gewebeschnitte wurden, um einen Überblick über die Tumorkonfiguration zu bekommen, in fünf- und zehnfacher Vergrößerung angeschaut. Repräsentative Bilder wurden anschließend in 20-facher Vergrößerung aus der Tumormitte und dem Tumorrand aufgenommen. Es wurden pro Färbung mindestens drei Schnitte unterschiedlicher Tumorregionen pro Tier analysiert. So war es möglich, einen möglichst großen Abschnitt der Tumorfäche abzubilden. Für die Gewebeschnitte der FITC-Lektin-Färbung wurde ein Konfokalmikroskop verwendet (Confocal microscopy system SP8, Leica).

3.6.3 Proliferation und Apoptose

Die Färbung von Proliferation (Ki67) und Apoptose (TUNEL) erfolgte in einer Kombinationsfärbung. Zuerst wurde das ApopTag® Red In Situ Apoptosis Detection Kit (Merck Millipore) verwendet, um die Apoptose darzustellen. Das Kit wurde entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Das Prinzip beruht darauf, dass durch DNA-Fragmentierung während der Apoptose freiwerdende 3'-OH Gruppen an DNA-Strangbrüchen enzymatisch durch Nukleotide markiert werden. Die entstehende Digoxigenin Polymere werden durch Rhodamin gekoppelte Anti-Digoxigenin-Antikörper gebunden und anschließend fluoroskopisch dargestellt. Die Ki67-Färbung erfolgte direkt im Anschluss nach mehrmaligem Waschen der Schnitte in PBS (5 x 2min) und Permeabilisierung mit Triton (0,3% in PBS, 10min, RT). Ki67 ist ein etabliertes Antigen zur Abschätzung der proliferierenden Zellfraktion einer Zellpopulation, genauer der Darstellung der Zellkerne, die sich nicht in der G₀ Ruhephase befinden und gibt somit Aufschluss über die aktuelle Teilungsrate (86, 87). Das Antigen wird an die Oberfläche

von Chromosomen befördert, sobald sich die DNA für Zellteilungsschritte lockert (87). Die Blockung (1% Casein in PBS, RT) erfolgte im Anschluss an die Permeabilisierung. Ki67 Primärantikörper (rabbit anti-Ki67, Thermo Fisher Scientific (RM-9106-S1)) wurden in einer Konzentration von 1:200 in Casein 0,5% in PBS bei 4°C über Nacht in der Feuchtkammer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte vor Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Alexa Fluor® 647 donkey anti rabbit, Jackson ImmunoResearch (711-605-152), 1:200) in Casein 0,5% in PBS (3 x 5min) gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde ebenfalls in einer Konzentration von 1:200 in 0,5% Casein in PBS für 2h bei RT in der Feuchtkammer inkubiert. Vor dem Eindeckeln mit DAPI Mounting Medium (Dianova) wurden überflüssige Antikörperlösungen mit PBS (3 x 5min) ausgewaschen. Die Auswertungskriterien für eine positive proliferierende oder apoptotische Zelle war die Überlappung mit einem DAPI positiv gefärbten Zellkern. Die Angabe der positiven Zellen erfolgte pro mm². Des Weiteren wurde der Quotient zwischen apoptotischen und proliferierenden Zellen berechnet ($((\text{TUNEL+ Zellen/mm}^2)/(\text{Ki67+ Zellen/mm}^2))$).

3.6.4 Angiogenese und TAM-Akkumulation

Zur Bestimmung der Vaskularisation und Angiogenese des Tumors, wurde CD31 als Endothelzellmarker verwendet. TAM wurden mit Iba1 (Ionisiertem Calcium-Bindungs Adapter Molekül 1) gefärbt. Die Objektträger wurden 15min an der Luft bei RT getrocknet, anschließend gewaschen (2 x 5min in PBS) und für 30min mit 1% Casein in PBS geblockt. Primärantikörper wurden in Casein 0,5% in PBS im Verhältnis von 1:50 (CD31, rat anti-CD31, BD Pharmingen™ (550274)) bzw. 1:250 (Iba1, rabbit anti-Iba1, WAKO (019-19741)) über Nacht bei 4°C in der Feuchtkammer inkubiert. Nach dem Waschen in Casein 0,5% in PBS (2 x 5min) wurden die Sekundärantikörper (CyTM3 donkey anti-rat (712-165-153) und Alexa Fluor® 647 donkey anti rabbit (711-605-152), 1:200, Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, USA) für 1,5h in der Feuchtkammer inkubiert. Danach erfolgte das erneute Waschen in PBS (2 x 5min) sowie destilliertem H₂O (2 x 5min). Das Eindeckeln der Objektträger erfolgte wie bereits beschrieben (3.6.3). In der Analyse wurden Zellen als TAM gewertet und gezählt, wenn sie sowohl Iba1 positiv waren als auch eine DAPI-positive Kernfärbung enthielten. Die Analyse der Tumervaskularisation erfolgte anhand der Parameter: Gefäßgesamtfläche in Prozent der ausgewerteten Fläche, durchschnittliche Gefäßgröße in µm² und Gefäßdichte in

Anzahl/mm². Die Gefäße wurden dazu manuell markiert und die Fläche berechnet. Die Interaktion zwischen TAM und den Gefäßen war durch die unmittelbar räumliche Nähe von mindestens zwei TAM pro Gefäß definiert, wie es bereits von unserer Arbeitsgruppe beschrieben wurde (81). Die Berechnung erfolgte als Anteil der interaktionspositiven Gefäße an allen Gefäßen.

Zusätzlich wurde zur Darstellung der Gesamttumervaskularisation einmalig eine FITC-Lektin-Färbung durchgeführt. Im Rahmen der Perfusion (3.3.8) erhielten die Tiere 100µl FITC-Lektin (Vector Laboratories). Die entnommenen Gehirne wurden nach Explantation in 4% PFA in PBS über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach erfolgte eine kurze Dehydrierung über 48h in 30%iger Saccharose-Lösung (4°C) sowie die Lagerung bis zur weiteren Verwendung bei -80°C. Das Gehirn wurde in TissueTek (Sakura) eingebettet und in einer Dicke von 70µm geschnitten (Microm HM 560, Objekt/Klinge -20°C/-20°C). Nach Aufnahme auf den Objektträger wurden die Schnitte 30min bei RT getrocknet und mit PBS gewaschen. Danach erfolgte das Eindeckeln mit ImmuMount (Thermo Scientific) Medium.

3.6.5 CXCR2 und CXCL2

Die Färbung von CXCL2 und CXCR2 erfolgte mit Triton zur Permeabilisierung der Zellmembran. Für die CXCL2-Färbung wurden die Schnitte wie beschrieben 15min an RT getrocknet und in PBS gewaschen (3 x 5min) und anschließend mit Casein 1% und Triton 0,3% in PBS für 30min blockiert. Der CXCL2-Primärantikörper (goat anti CXCL2, R&D Systems AF-452-NA) wurde in einem Verhältnis von 1:20 in 0,5% Casein in PBS gelöst und über Nacht bei 4°C in der Feuchtkammer inkubiert. Vor und nach dem Aufbringen des Sekundärantikörpers (1:200, Alexa647-conjugated Donkey Anti-Goat IgG (705-605-147), Jackson ImmunoResearch) für 1,5h bei RT wurden die Schnitte mit PBS (je 2x 5min davor und danach) sowie mit destilliertem H₂O (2x 5min danach) gewaschen. Die CXCR2-Färbung wurde ähnlich wie die CXCL2-Färbung durchgeführt. Unterschiedlich waren die zusätzlichen Waschschrte (3x) sowie die Inkubationszeit des CXCR2-Primärantikörpers (rabbit anti CXCR2, Abcam (ab14935), 1:200) für 48h bei 4°C. Als Sekundärantikörper wurde hier (Alexa Fluor® 647 donkey anti rabbit (711-605-152), Jackson ImmunoResearch) gewählt. Das Eindeckeln der Objektträger erfolgte wie bereits beschrieben (3.6.3). Um die Vergleichbarkeit der Intensitätsmessungen zu gewährleisten, wurden für alle Aufnahmen eine identische Belichtungszeit gewählt.

3.7 Quantitative Real-Time-PCR

3.7.1 RNA Isolierung und Reverse Transkriptase

Zur Gewinnung der RNA wurden PBS perfundierte Gehirne bzw. isolierte Tumorgewebsproben (siehe 3.3.8) verwendet. Die RNA Isolation wurde mit dem RNeasy Mini Kit von QIAGEN und nach entsprechenden Herstellerangaben durchgeführt. Vor der eigentlichen Isolation der RNA wurde das in PBS bei -80°C tiefgefrorene Tumorgewebe ohne Kühlungsunterbrechung direkt in das vorgelegte Lysat (RLT Buffer + Beta-Mercaptoethanol) in gentleMAC Tubes (M-tubes, Miltenyi Biotec) überführt und grob homogenisiert (40s, Homogenisator dispomix, Xiril). Anschließend wurde das lysierte Gewebe entnommen und erneut mit einer 20G-Kanüle (1ml Spritze) zur feineren Homogenisierung resuspendiert. Nach Zentrifugation (3min, 17g, RT) wurde der Überstand in 70%igen Ethanol zur RNA Präzipitation überführt und resuspendiert. Die RNA wurde anschließend in weiteren Waschschritten in dafür vorgesehenen Minisäulen mit Filtereinheit nach Herstellerangaben aufgereinigt. Zuletzt wurde die RNA durch Zugabe von RNase-freiem destillierten H₂O und Zentrifugation (1min, 10g, RT) eluiert. Die gewonnene RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt oder direkt zur Messung der Konzentration vorbereitet. Die photometrische Konzentrationsmessung sowie die Messung des Reinheitsgrades der RNA erfolgte am Photometer von Tecan (Infinite M200, Tecan) und i-Control Software (Tecan). Hierzu wurde das Gerät mit RNase-freiem H₂O kalibriert und anschließend die optische Dichte der Nukleinsäuren bei 260nm (Absorptionsmaximum) bestimmt. Die Konzentration wurde zweifach gemessen und daraus der Mittelwert gebildet. Die Reinheit der RNA wurde durch den Quotienten aus 260nm und 280nm bestimmt. 280nm ist das Absorptionsmaximum für Proteine. Für die Reinheit wurde ein Wert von 1,8-2 oder höher akzeptiert. Nach Bestimmung des Reinheitsgrades wurde für das Umschreiben von RNA in cDNA (Reverse Transkriptase (RT)) 500ng RNA verwendet. Zur kompletten Entfernung der restlichen genomischen DNA wurde im Zuge der Reversen Transkription das PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser Kit von TaKaRa (RR047A) verwendet. Die Herstellung entsprechender Reaktionsansätze und Mastermixe erfolgte nach Herstellerangaben. Zur DNA-Elimination wurde der in Tabelle 4 aufgeführte Reaktionsansatz hergestellt, der für 2min im Thermocycler (UnoCycler, VWR) bei 42° inkubiert wurde. Nach diesem Schritt wurde zügig der schon vorbereitete Mastermix (Tabelle 4) mit der enthaltenen Reversen Transkriptase hinzu pipettiert. Der Thermocycler wurde mit einem festgelegten Programm eingestellt (42°C

Ausgangstemperatur, 25min 37°C, 5s 85°C, Abkühlung auf 4°C), um komplementäre cDNA herzustellen. Fertige cDNA wurde bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren. Um eine Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen, wurden zur Überprüfung der DNA-Elimination Proben ohne Reverse Transkriptase erstellt, die keine Amplifikate bei der qRT-PCR zeigten.

Tabelle 4: Reaktionsansätze zur DNA-Elimination und Reversen Transkriptase

Reaktionsansatz DNA-Elimination		Reaktionsansatz Reverse Transkriptase	
5X gDNA eraser buffer	2 µl	Reaktionsansatz aus DNA-Elimination	10 µl
gDNA eraser	1 µl	5X PrimeScript Buffer 2 (for Real Time)	4 µl
RNA	500 ng	PrimeScript RT Enzyme Mix I	1 µl
RNAse free ddH ₂ O		RT Primer Mix	1 µl
		RNAse free dd H ₂ O	4 µl
Totalvolumen (pro Well)	10 µl	Totalvolumen (pro Well)	20 µl

3.7.2 Quantitative Real-Time-PCR

Zur Quantifizierung der unter 3.7.1 umgeschriebenen cDNA wurde eine quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) in Echtzeit durchgeführt. Die verwendete SYBR-Green Methode ist dadurch gekennzeichnet, dass sich ein fluoreszierender Farbstoff an die gebildete doppelsträngige DNA anlagert. Entsprechend der Vervielfältigung der gebildeten DNA wird mehr oder weniger Farbstoff gebunden, was in unterschiedlichen Intensitäten resultiert. Dadurch kann eine Aussage über die Menge der enthaltenen DNA in einem Probenansatz getroffen werden. Die Messung wird in CT-Werten (=Cycle Treshold; Wert, ab dem die exponentielle Phase der Schmelzkurve eintritt und sich von der Hintergrundintensität absetzt bzw. die Anzahl der Replikationszyklen, die bis zu diesem Moment durchgeführt wurden) angegeben. Die Menge der gemessenen DNA wurde ins relative Verhältnis zu dem Housekeeping-Gen 18S gesetzt, das die interne Referenz darstellte, da es nicht durch Pathologien reguliert wird (88). Dadurch konnte der Faktor, um den die Expression der Zielgene verändert war, bestimmt werden. Für die qRT-PCR wurde das SYBR® Premix Ex Taq™ (TaKaRa (RR420A)) verwendet. Spezifische Primer (hergestellt durch TIB Molbiol, Berlin) für entsprechende Zielgene sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Primersequenzen

Zielgen		Primersequenz 5'-3'
18s (62)	forward	AACCCGTTGAACCCCAT
	reverse	CCATCCAATCGGTAGTAGCG
Bax (89)	forward	TGAAGACAGGGGCCTTTTTG
	reverse	AATTCGCCGGAGACTCG
Bcl2 (90)	forward	GTCGCTACCGTCGTGACTTC
	reverse	CAGACATGCACCTACCCAGC
Cxcl2 (62)	forward	CGCTGTCAATGCCTGAAG
	reverse	GGCGTCACACTCAAGCTCT
Cxcr2 (91)	forward	AGCAAACACCTCTACTACCCTCTA
	reverse	GGGCTGCATCAATTCAAATACCA
Cxcr1 (92)	forward	AATCTGTTGTGGCTTCACCCA
	reverse	GCTATCTTCCGCCAGGCATAT
Vegf (62)	forward	GAAGAAGAGGCCTGGTAATGG
	reverse	AAGCCACTCACACACACAGC
Vegfr1 (62)	forward	CTAATGACGATGGCAACAGG
	reverse	GCTAGCATGCTCTGCTCTCC
Vegfr2 (62)	forward	TGGAGGAAGAGGAAGTGTGC
	reverse	TCAGCTCTTCTGATGCAAGG

Die Primer wurden in einer Konzentration von je 10 μ M (forward (fwd), reverse (rev)) in einem Mastermix (Tabelle 6) vorbereitet. Der Mastermix wurde zu den entsprechenden Proben (je 4 μ l cDNA 1:10) in eine 384-Well Platte (MicorAmp Optical Reaction plate, Applied biosystems) pipettiert, wobei jedes Zielgen dreifach (Triplets) abgebildet wurde. Die Platte wurde mit einer Folie versiegelt. Die qRT-PCR wurde mit dem QuantStudio 6 Flex System (Thermo Scientific) durchgeführt. Die Amplifikation und die Messung liefen über 40 Zyklen (Tabelle 6). Anschließend wurde die Amplifikationsqualität überprüft. Dies beinhaltete den Vergleich der Einzelwerte (CT-Werte) der Zielgene in den Triplets sowie die Beurteilung der Schmelzkurven. Dadurch konnten fehlerhafte Messwerte, die beispielsweise durch eine Kontamination zustande gekommen sind, ausgeschlossen werden. Die Expressionsunterschiede wurden nach Mittelwertbildung der Triplets nach der $\Delta\Delta$ CT-Methode berechnet (93). Mittels der DeltaDeltaCT-Methode wird zuerst die Differenz (Δ -CT) des Zielgens zum Housekeeping-Gen in der jeweiligen Gruppe berechnet. Danach wird der errechnete Δ -CT Wert der Kontrolle von den Δ -CT Werten der Gruppen subtrahiert und es ergibt sich $\Delta\Delta$ -CT. Der relative Expressionsunterschied

zwischen der Therapiegruppe und der Kontrolle lässt sich zum Schluss durch Einsetzen in die Formel $2^{-\Delta\Delta CT}$ berechnen (93).

Tabelle 6: qRT-PCR Mastermix (für 384 Wellplatte pro Well) und PCR Programm

<u>Mastermix</u>		<u>PCR-Programm</u>	
SYBR® Premix ExTaq™	5 µl	95°C	30 s
Primer fwd und rev (je 10 µM)	0,8 µl	95°C	5 s
ROX II 1:3	0,2 µl	60°C	30 s
cDNA	4 µl	95°C	15 s
		60°C	1 min
Totalvolumen	10 µl	95°C	15 s

40x

3.8 Datenverarbeitung und Statistik

Die Erstellung der Graphen sowie die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism (v9.1.2, San 224 Diego, CA, USA). Für die Datenerhebung und -verarbeitung wurde Microsoft Excel verwendet. Zur statistischen Testung wurde in Einzelvergleichen der Student's T-Test verwendet. Für den Vergleich aller Gruppen wurde die univariate Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit anschließender Bonferroni-Korrektur verwendet. Es wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ angenommen. Bei nicht-signifikanten Ergebnissen wurde kein p -Wert angegeben. Die Darstellung der Werte entspricht den Mittelwerten \pm Standardabweichungen.

4 Ergebnisse

4.1 Versuchsabschnitt I – Analyse der systemischen Wirksamkeit des CXCR2-Antagonisten SB225002

4.1.1 Einführung Ergebnisse Versuchsabschnitt I

Unsere Arbeitsgruppe zeigte in früheren Studien, dass bei intrathekaler Anwendung eines CXCR2-Antikörpers und des small-molecule CXCR2-Antagonisten SB225002 eine signifikante Volumenreduktion von GBM-Tumoren der Maus *in vivo* erreicht werden konnte (62, 81). Es wurden insbesondere bei der Blockade durch SB225002 antitumorale Effekte im Sinne einer verminderten Vaskularisation und Reduktion der Akkumulation von TAM beobachtet (81). Basierend auf diesen Erkenntnissen sollte in diesem Versuchsabschnitt die Wirksamkeit einer systemischen Therapie mit SB225002 überprüft werden. Hintergrund war zum einen die Handhabbarkeit für die Experimente in der Kombinationstherapie (Versuchsabschnitt II) zu erleichtern. Zum anderen wäre der Transfer in die klinische Anwendung an Patienten*innen vereinfacht, da so eine aufwendigere invasive Katheter- oder Reservoir-Implantation und den damit verbundenen möglichen Komplikationen nicht notwendig wäre.

4.1.2 Tumolvolumenreduktion ohne Dosis-Wirkungszusammenhang bei systemischer Applikation des CXCR2-Antagonisten SB225002

Um die Effektivität von SB225002 bei systemischer intraperitonealer Applikation zu untersuchen, wurden zunächst unterschiedliche Dosierungen appliziert. Diese orientierten sich an der intrathekalen Maximaldosis von 30µg pro Tag wie in Abschnitt 3.4.1 erklärt. Als erster Endpunkt wurde die Tumolvolumenreduktion mittels MRT-Bildgebung bestimmt (Abbildung 6a, c). Die in diesem Abschnitt angegebenen Messwerte der Tumolvolumina beziehen sich auf die T1-Sequenz mit Kontrastmittel. Die Volumetrie-Daten der T2 Gewichtung sind zum Vergleich dargestellt, unterscheiden sich jedoch nicht wesentlich von den gemessenen Volumina der T1-Sequenz (Abbildung 6b, d). Der größte Volumenreduktionseffekt an Tag 21 zeigte sich bei 60µg_{i.p.}, also bei der doppelten Dosis der intrathekalen Anwendung (81). Das Volumen war in der T1-Sequenz mit Kontrastmittel mit 42,87% deutlich reduziert (Abbildung 6b), der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant. Bei einer Dosis von 200µg_{i.p.} deutete sich eine Volumenzunahme an (Abbildung 6e). Aus diesem Grund wurde zusätzlich eine Dosis von 30µg_{i.p.} getestet, um einen mutmaßlichen paradoxen Dosis-Wirkungs-Effekt detektieren

zu können. Hier zeigte sich hingegen kein Unterschied in der Größe der Tumorumfänge (Abbildung 6f).

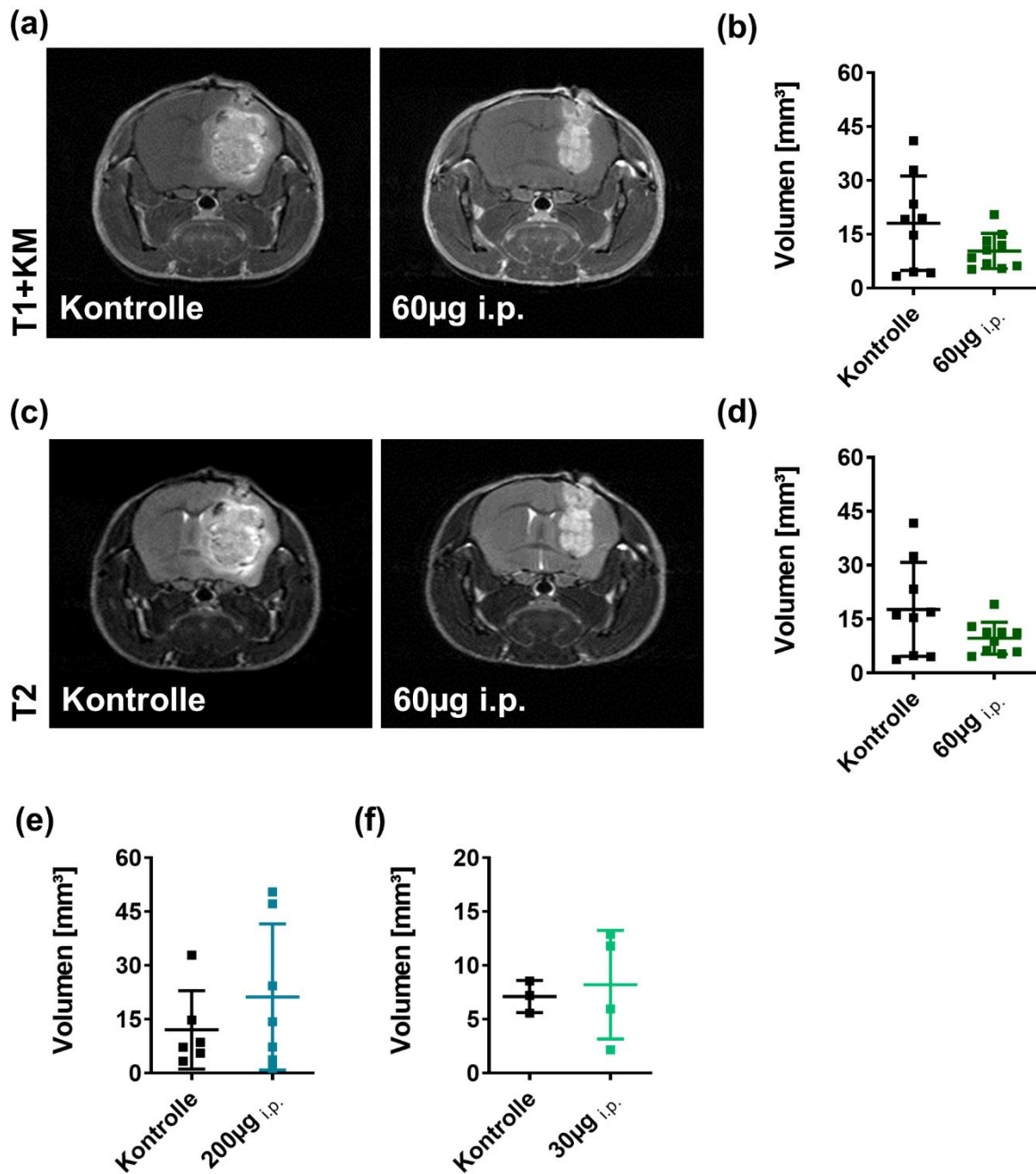


Abbildung 6: Tumorvolumina nach systemischer Applikation von SB225002.

(a) Repräsentative MRT-Schnittbilder in T1+KM-Sequenz der Kontrollgruppe und 60µg_{i.p.}-Gruppe. **(b)** Die quantitative Auswertung der T1+KM-Tumorvolumina an Tag 21 zeigte in der 60µg_{i.p.}-Gruppe eine Volumenreduktion von 42,87% ohne statistische Signifikanz (n= 9-10). **(c)** Repräsentative MRT-Schnittbilder in T2-Sequenz derselben Tiere wie in (a). **(d)** Die quantitative Auswertung der Tumorvolumina in T2-Sequenz zeigte ein vergleichbares Bild zur T1+KM-Sequenz in (b). **(e, f)** Die quantitative Auswertung der T1+KM-Tumorvolumina von 200µg_{i.p.} (n= 6-7) und 30µg_{i.p.} (n= 3-4) zeigten keine bessere Wirksamkeit an Tag 21. Die statistische Testung erfolgte mit dem Student's T-Test. Die Graphen zeigen die Einzelwerte der Tiere als kleine Quadrate und den Gruppenmittelwert ± Standardabweichung als Linien.

Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass der maximal erreichte Volumenreduktionseffekt von 42,87% bei systemischer Applikation von 60µg_{i.p.} SB225002 im Vergleich zur intrathekalen Applikation niedriger war (81). Die Volumenreduktion betrug bei intrathekaler Anwendung 47% und erreichte in Vorarbeiten eine statistische Signifikanz im Vergleich zu der Kontrollgruppe (81).

Um einen Gesamteindruck über die Wirkweise der systemischen Therapie mit SB225002 zu bekommen, wurden trotz unterlegender Wirksamkeit in Bezug auf die Volumenreduktion, histologische Analysen dieser Gruppe durchgeführt. Es wurde die Tumervaskularisation, die Akkumulation von TAM sowie deren Interaktionsprozesse untersucht.

4.1.3 Analyse der Veränderungen in der Tumervaskularisation und TAM-Akkumulation bei systemischer Applikation des CXCR2-Antagonisten SB225002

Die histologische Analyse der systemischen Applikation des CXCR2-Antagonisten wurde für die 60µg_{i.p.}-Gruppe durchgeführt, da diese den größten Tumervolumenreduktionseffekt zeigte (4.1.2). Diese wurde mit der entsprechenden Kontrollgruppe verglichen. Charakteristisch für das Glioblastom ist die ausgeprägte Tumervaskularisation (12). Als alternativer angiogener Signalweg, nimmt CXCR2, wie in 2.2.4 beschrieben, eine zentrale Rolle in der Regulation der Angiogenese ein (59). Unter systemischer Therapie zeigte sich in der 60µg_{i.p.}-Gruppe eine reduzierte Gesamtgefäßfläche (prozentualer Anteil der Gefäßfläche an der gemessenen Gesamtfäche) von 46,8% und eine Reduktion der durchschnittlichen Gefäßgröße um 64% (Abbildung 7a-c). Die Gefäßanzahl war hingegen gering erhöht (+11,8%, Abbildung 7d). Die gemessenen Unterschiede waren statistisch nicht signifikant, wobei eine besonders große Varianz in der Kontrollgruppe, die durch die große Standardabweichung verdeutlicht wurde, zu sehen war.

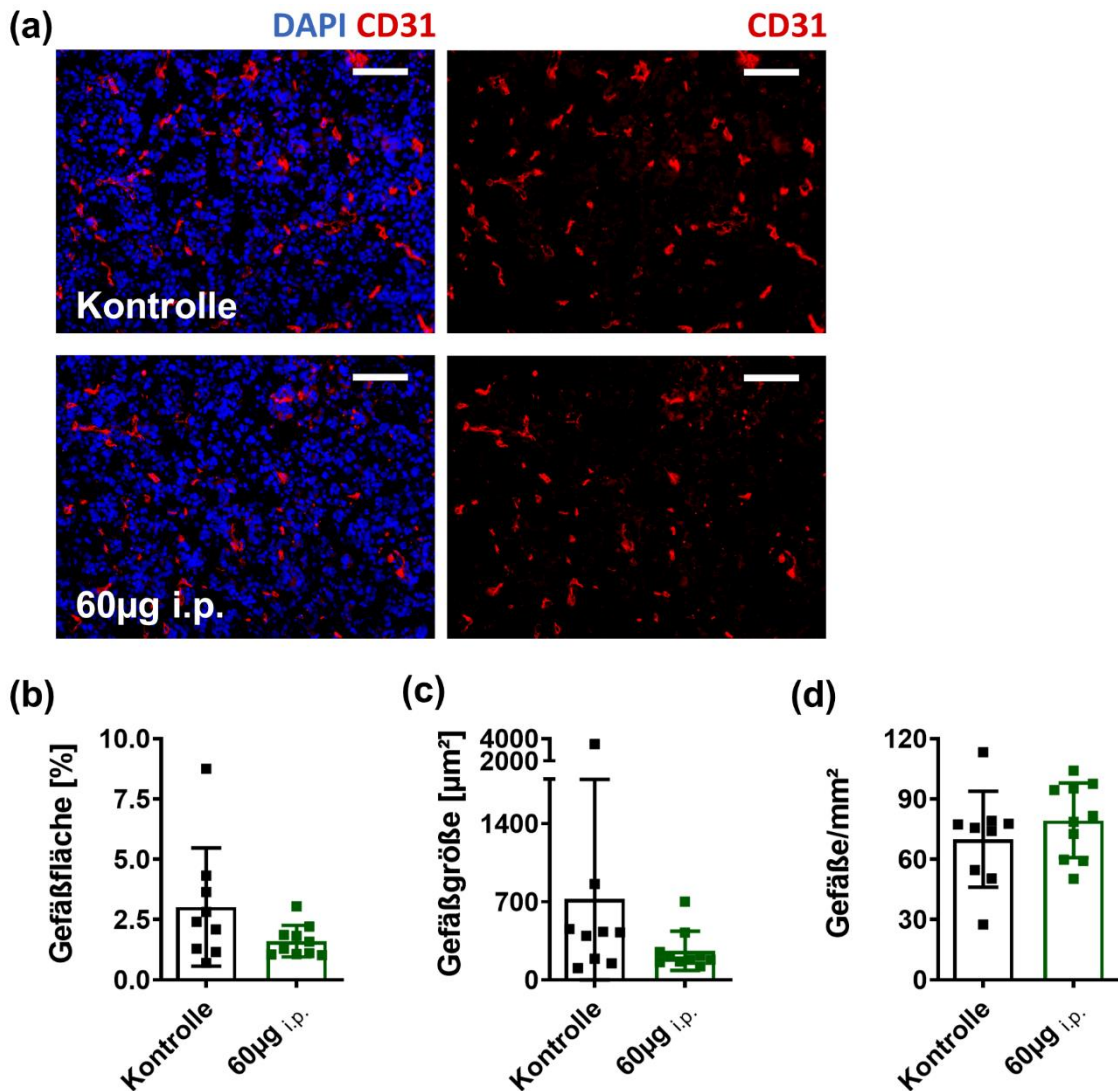


Abbildung 7: Effekte der systemischen Applikation von SB225002 auf die Tumolvaskularisation.

(a) Repräsentative Immunfluoreszenzbilder zeigen geringgradige Veränderungen in der Tumolvaskularisation. (DAPI: blau, CD31: rot; Maßstabsbalken = 100µm) (b) Die Quantifikation der Gefäßfläche zeigt eine schwache, nicht-signifikante Reduktion. ($n=9-10$) (c) Die durchschnittliche Gefäßgröße gemessen in μm^2 war ebenfalls geringgradig reduziert. ($n=9-10$) (d) Die Gefäßdichte blieb zwischen den Gruppen Kontrolle und 60µg_{i.p.} unverändert. ($n=9-10$) Die statistische Testung erfolgte mit dem Student's T-Test. Die Graphen zeigen die Einzelwerte der Tiere (kleine Quadrate) und den Gruppenmittelwert (Balken) \pm Standardabweichung (Linien).

Im nächsten Schritt wurde die Akkumulation von TAM untersucht, da diese nicht nur mit dem histologischen Schweregrad von Gliomen korreliert, sondern auch als eine Hauptquelle von CXCL2 identifiziert werden konnten (62). Aus Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe ist bekannt, dass die intrathekale Applikation des CXCR2-Antagonisten SB225002 die TAM-Akkumulation signifikant reduziert (69, 81). Im Gegensatz dazu, konnte bei systemischer Applikation mit 60µg_{i.p.} pro Tag kein signifikanter Unterschied

gemessen werden (Abbildung 8a, b). Die Analyse der TAM-Gefäß-Interaktion zeigte ebenfalls keine Unterschiede zwischen der 60µg_{i.p.}- und Kontrollgruppe (Abbildung 8a, c).

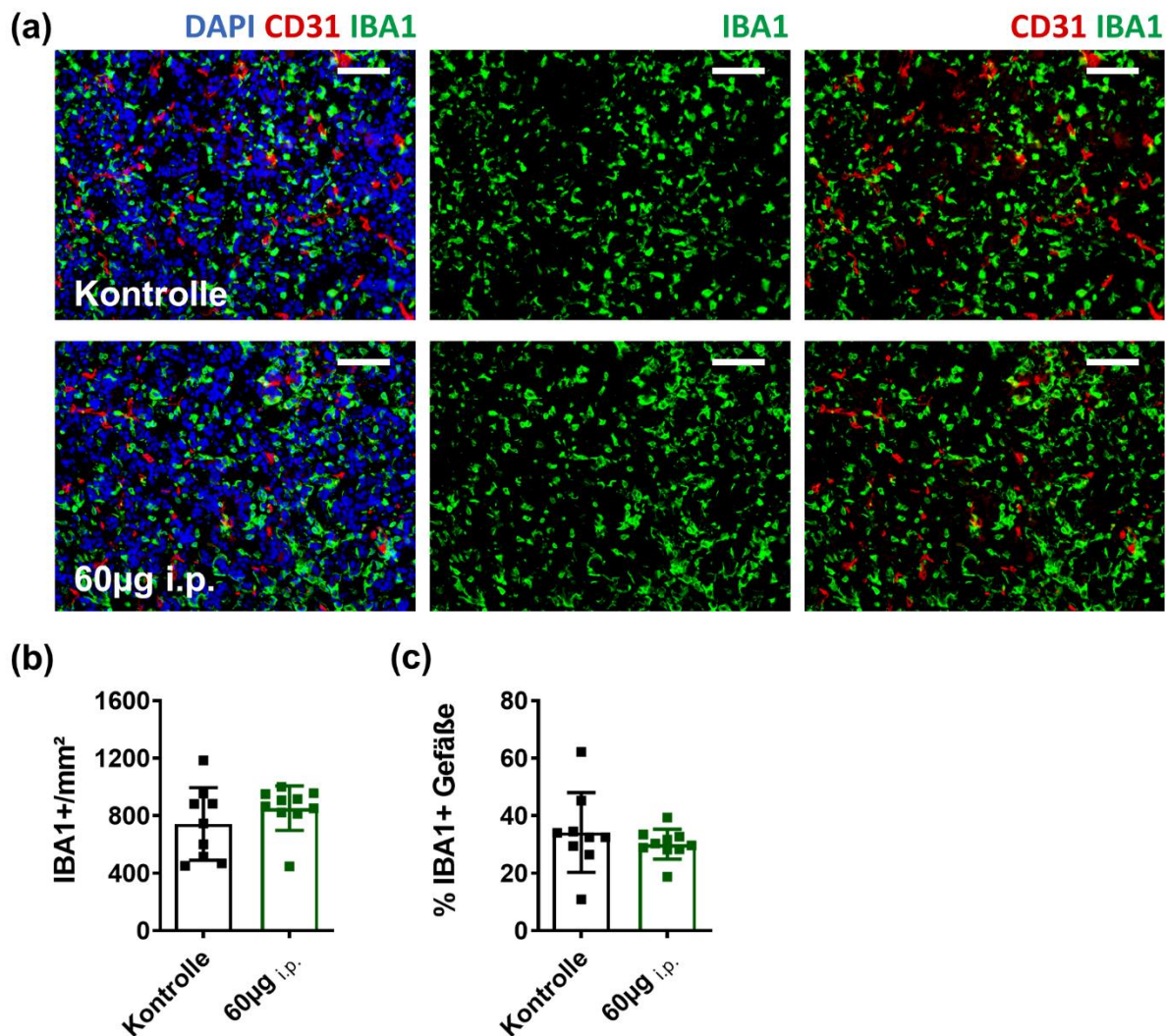


Abbildung 8: Effekte der systemischen Applikation von SB225002 auf die TAM-Akkumulation und TAM-Gefäßinteraktion.

(a) Repräsentative Immunfluoreszenzbilder zeigen weder eine unterschiedliche TAM-Akkumulation noch eine vermehrte Interaktion von Tumorgefäßen und TAM unter systemischer Therapie mit 60µg_{i.p.}. (DAPI: blau, CD31: rot, Iba1: grün; Maßstabsbalken = 100µm) **(b)** Die systemische Applikation des CXCR2-Antagonisten SB225002 hatte keinen nachweisbaren Effekt auf die TAM-Akkumulation. (n= 9-10) **(c)** In der quantitativen Auswertung der TAM-Gefäß-Interaktion konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. Eine TAM-Gefäßinteraktion war definiert durch den Kontakt von mindestens zwei TAM pro Gefäß. (n= 9-10) Die statistische Testung erfolgte mit dem Student's T-Test. Die Graphen zeigen die Einzelwerte der Tiere (kleine Quadrate) und den Gruppenmittelwert (Balken) ± Standardabweichung (Linien).

4.2 Versuchsabschnitt II – Analyse therapieinduzierter Effekte auf tumorbiologische Charakteristika durch die Kombinationstherapie

4.2.1 Einführung Ergebnisse Versuchsabschnitt II

Aufgrund der zentralen Rolle des CXCL8/CXCL2/CXCR2-Signalwegs in der Pathogenese des GBM und der Veränderung der Expression unter TMZ-Therapie (2.2.1 und 2.1.3), stellt die Blockade des Signalwegs zusätzlich zu TMZ ein vielversprechendes Therapieziel dar. Aus diesem Grund sollte im zweiten Versuchsabschnitt die Wirkung eines kombinatorischen Ansatzes untersucht werden(81).

Die Ergebnisse aus Versuchsabschnitt I haben gezeigt, dass die systemische Therapie in unserem Set-Up der lokalen intrathekalen Applikation unterlegen war (siehe 5.2). Aus diesem Grund wurde sich für die Untersuchung der Kombinationstherapie erneut für eine intrathekale Applikation des CXCR2-Antagonisten SB225002 entschieden, wie sie bereits in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurde (81).

4.2.2 Additiver Tumolvolumenreduktionseffekt durch Kombinationstherapie

Vor Beginn der Therapie erfolgte eine Tumolvolumetrie, um ein vergleichbares Ausgangsniveau für alle Gruppen sicherzustellen und die regelrechte Inokulation in das rechtsseitige Striatum zu überprüfen. Es zeigten sich keine Wachstumsunterschiede (Abbildung 9b). Die zweite MRT-Bildgebung erfolgte nach Therapie an Tag 21, unmittelbar vor der Perfusion und Tötung. Die dargestellten MRT-Sequenzen zeigen repräsentative Bilder der jeweiligen Gruppen an Tag 21 (Abbildung 9a). Die Auswertung der Volumina ergab einen Reduktionseffekt in allen Therapiegruppen, wobei der Effekt zwischen der TMZ-Monotherapie und der Kombinationstherapie jeweils im Vergleich zur Kontrollgruppe am deutlichsten war. Der Volumenreduktionseffekt von TMZ im Vergleich zur Kontrollgruppe betrug in der T1-gewichteten Sequenz mit Kontrastmittel 61,12% ($p=0,017$; $n=7-8$) und in der Kombinationstherapie 75,14% ($p=0,003$; $n=7-8$) (Abbildung 9b). Die Unterschiede zwischen den jeweiligen Monotherapien im Vergleich zur Kombinationstherapie waren jedoch statistisch nicht signifikant. Die Auswertung der T2-gewichteten Sequenz kam zu vergleichbaren Ergebnissen (Abbildung 9c). Der zusätzliche Volumenreduktionseffekt unter Kombinationstherapie im Vergleich zur TMZ Monotherapie betrug 36,1%. Als weiterer Hinweis für ein gutes Therapieansprechen konnte die geringe Standardabweichung und die homogene Verteilung der Volumina der Kombinationsgruppe im Vergleich zu allen anderen Gruppen beobachtet werden

(Abbildung 9b). Die Berechnung der Wachstumsfaktoren der einzelnen Tumore aus den Tumorumfängen vor und nach Therapie (3.5) zeigten ähnliche Unterschiede wie die Auswertung der Tumorumfänge (Abbildung 9d). Die Gruppen, Kontrolle vs. TMZ ($p=0,0068$; $n=7-8$) und Kontrolle vs. Kombinationstherapie ($p=0,0006$; $n=7-8$) waren signifikant unterschiedlich, während sich keine Unterschiede der Monotherapien mit TMZ bzw. dem Antagonisten im Vergleich zur Kombinationstherapie zeigten.

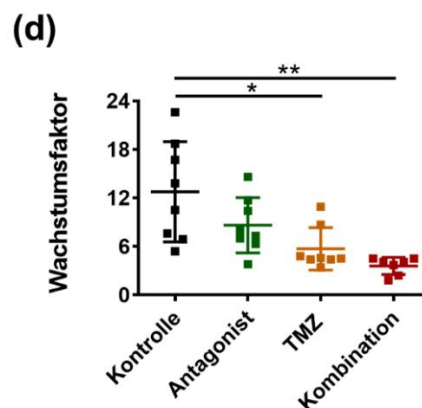
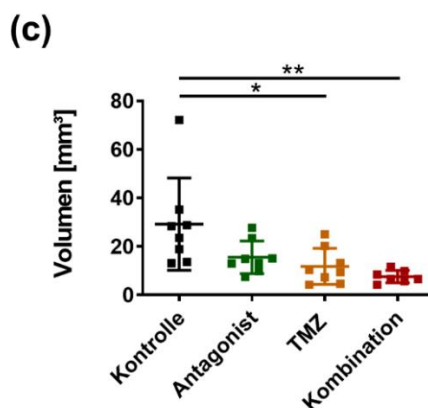
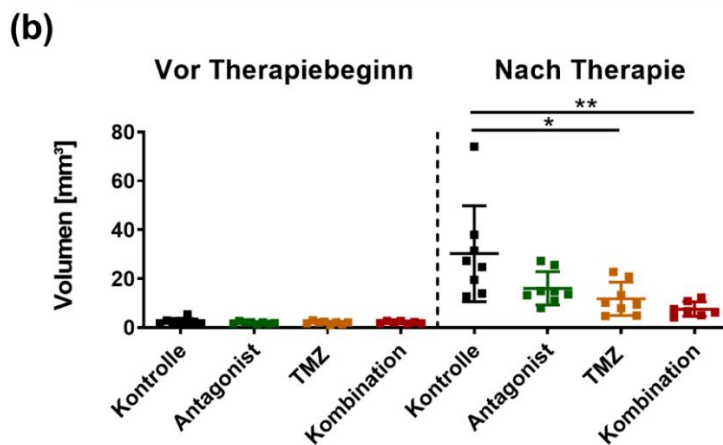
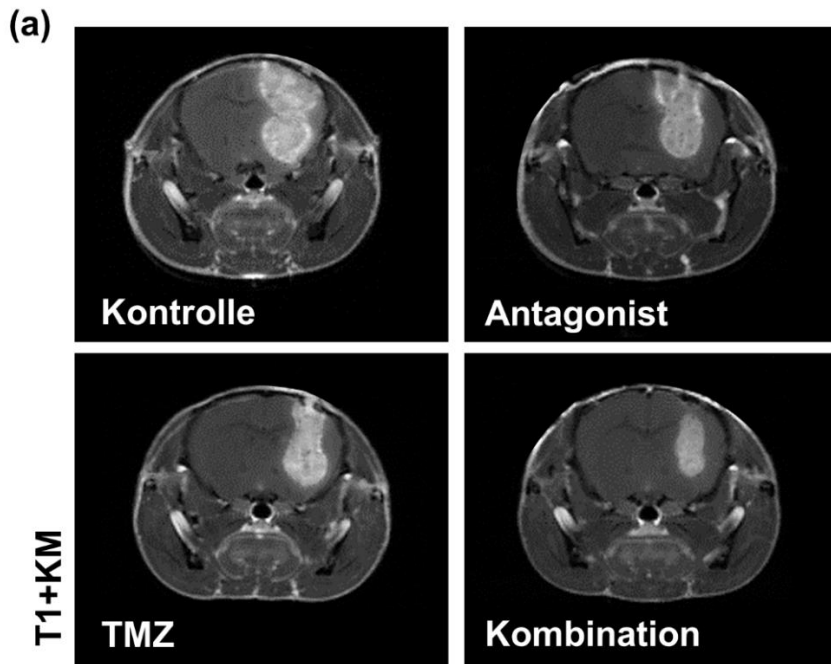


Abbildung 9: Tumorummetrie an Tag 21 nach Kombinationstherapie.

(a) Repräsentative MRT-Schnittbilder in T1+KM-Sequenz. Es zeigte sich eine Volumenreduktion in den Monotherapien und der Kombinationstherapie. (b) Durch Messung der Tumorummetria (T1+KM) vor Therapiebeginn konnte ein vergleichbares Ausgangsniveau sichergestellt werden. Nach sieben-tägiger Therapie (Tag 21) war die größte Tumorummetriareduktion in der Kombinationstherapie zu beobachten. Die Reduktion betrug 75% im Vergleich zur Kontrolle, während die Reduktion in der TMZ-Monotherapie zur Kontrolle nur 61% betrug. ($n=7-8$; * $p<0,05$; ** $p<0,01$) (c) Die quantitative Auswertung der Tumorummetria in T2-Sequenz zeigt vergleichbare Ergebnisse zur T1+KM-Sequenz derselben Tiere. ($n=7-8$; * $p<0,05$; ** $p<0,01$) (d) Der Wachstumsfaktor (Berechnung: Volumen Tag 21/ Volumen zu Therapiebeginn) zeigte ein zur Volumenreduktion konkordantes Bild, wobei sich die TMZ- und Kombinationstherapie signifikant von der Kontrolle unterschieden. ($n=7-8$; * $p<0,05$; ** $p<0,01$) Zur statistischen Testung wurde der One-way ANOVA-Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur verwendet. Die Graphen zeigen die Einzelwerte der Tiere als kleine Quadrate und den Gruppenmittelwert \pm Standardabweichung als Linien.

4.2.3 Verminderte Proliferationsaktivität bei gleichbleibender Apoptose

Sowohl für SB225002 (nur *in vitro*) als auch TMZ konnte in vorangegangenen Studien eine proliferationshemmende Wirkung gezeigt werden (81, 94-97). Aus diesem Grund wurde im folgenden Abschnitt untersucht, ob die simultane Anwendung zu einer Potenzierung der antiproliferativen Wirkung führt. Alle Therapieansätze führten zu einer Reduktion der Proliferationsaktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 10a, b). Die Kombinationstherapie zeigte den größten Unterschied mit 36,8 % und war statistisch im Vergleich zur Kontrolle signifikant ($p=0,033$; $n=4$). Die TMZ-Monotherapie reduzierte die Proliferation um 25,3 % ebenfalls mit Erreichen eines statistischen Signifikanzniveaus ($p=0,026$; $n=4$) wohingegen die SB225002-Monotherapie nur zu einer nicht-signifikanten Reduktion von 12,4 % führte (Abbildung 10b). Darüber hinaus konnte eine signifikante Reduktion der Proliferationsaktivität zwischen Kombinationstherapie im Vergleich zur SB225002-Monotherapie um 27,9% ($p=0,033$; $n=4$) beobachtet werden (Abbildung 10b). Im Vergleich zur TMZ-Monotherapie gab es ebenfalls eine Reduktion um 15,4%, jedoch ohne Erreichen eines statistischen Signifikanzniveaus.

Neben einer verminderten Proliferationsaktivität gilt umgekehrt ein gesteigertes Apoptoseverhalten als Indikator für ein gutes Ansprechen auf Anti-Tumor-Therapien (98, 99). Auf Proteinebene gibt es *in vitro*-Daten, die eine Zunahme der Apoptose bei Behandlung mit dem CXCR2-Antagonisten SB225002 in unterschiedlichen Tumorentitäten beschreiben (94, 100-102). Untersuchungen über die Wirkweise von TMZ ergaben zudem, dass die Induktion von Apoptosevorgängen ein zentraler Wirkmechanismus von TMZ ist (103-105). Die Auswertung der Apoptose anhand der apoptotischen Zellen ergab keinen Unterschied zwischen den Gruppen (Abbildung 10c). Im Gegensatz dazu war das Verhältnis von Apoptose zu Proliferation zugunsten der

Apoptose verschoben (Abbildung 10d). Diese Verschiebung war nur in der Kombinationsgruppe signifikant und unterschied sich sowohl zur Kontrolle ($p=0,0006$; $n=4$) als auch zu den Monotherapien mit SB225002 ($p=0,0102$; $n=4$) bzw. TMZ ($p=0,0389$; $n=4$). Damit zeigte die Kombinationstherapie einen additiven Effekt durch die zusätzliche Blockade des CXCR2-Rezeptors in Bezug auf das Verhältnis von Proliferation und Apoptose im Vergleich zu den Monotherapien.

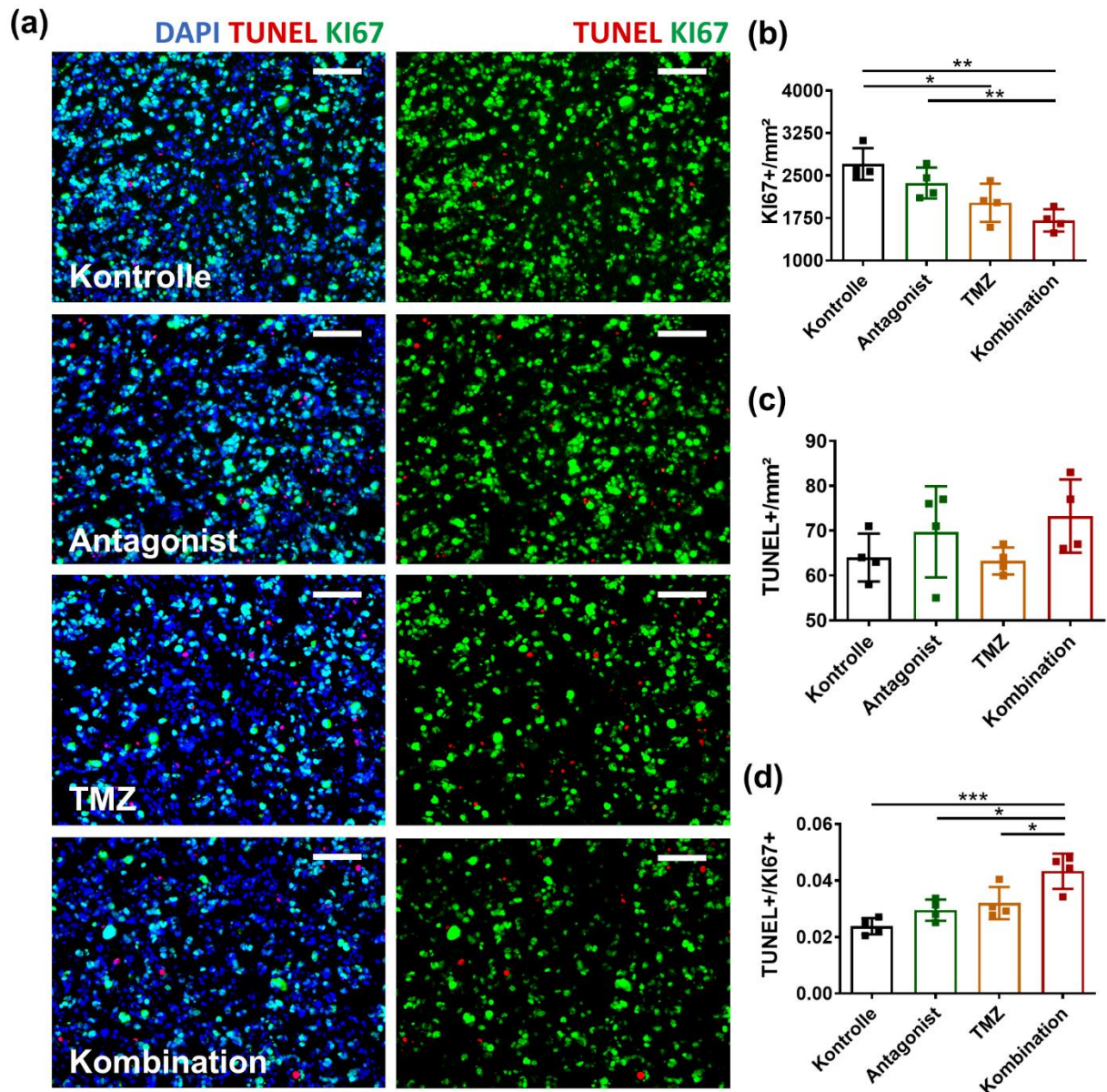


Abbildung 10: Analyse von Proliferationsaktivität und Apoptoseverhalten.

(a) Repräsentative Immunfluoreszenzbilder von Proliferation und Apoptose mit abnehmender Proliferation in allen Gruppen, wobei die größte Reduktion in der Kombinationsgruppe zu sehen ist. Keine der Therapien beeinflusste das Apoptoseverhalten. (DAPI: blau, Ki67: grün, TUNEL: rot; Maßstabsbalken = 100µm) **(b)** Die quantitative Auswertung immunhistologischer Färbungen im Vergleich zur Kontrolle, im Vergleich zum Antagonisten 27,9%. TMZ reduzierte die Proliferation um 25,3%. ($n=4$, * $p<0,05$; ** $p<0,01$) **(c)** Die Apoptose war in der

quantitativen Analyse unverändert zwischen den Gruppen. ($n=4$) **(d)** In der Analyse des Verhältnisses von Apoptose zu Proliferation konnte nur in der Kombinationsgruppe eine signifikante Verschiebung in Richtung Apoptose beobachtet werden. Diese Verschiebung unterschied sich zur Kontrolle sowie zu den jeweiligen Monotherapien und zeigte einen additiven Effekt durch die Applikation beider Wirkstoffe in Kombination. ($n=4$, * $p<0,05$; *** $p<0,001$) Zur statistischen Testung wurde der One-way ANOVA-Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur verwendet. Die Graphen zeigen die Einzelwerte der Tiere (kleine Quadrate) und den Gruppenmittelwert (Balken) \pm Standardabweichung (Linien).

Um die Ergebnisse weiter zu verifizieren, wurden Genexpressionsanalysen durchgeführt. Das Expressionsverhältnis des pro-apoptotischen Moleküls *Bax* zum anti-apoptotischen Molekül *Bcl2* hat regulierenden Einfluss auf die Induktion der Apoptose und kann je nach Expressionsverhältnis als Indiz für das Ansprechen einer Tumorthherapie gewertet werden (98, 99, 106). Die Untersuchung des Tumorgewebes auf Veränderungen der mRNA-Expression von *Bax* und *Bcl2* ergab keinen therapiespezifischen Unterschied (Abbildung 11a, b).

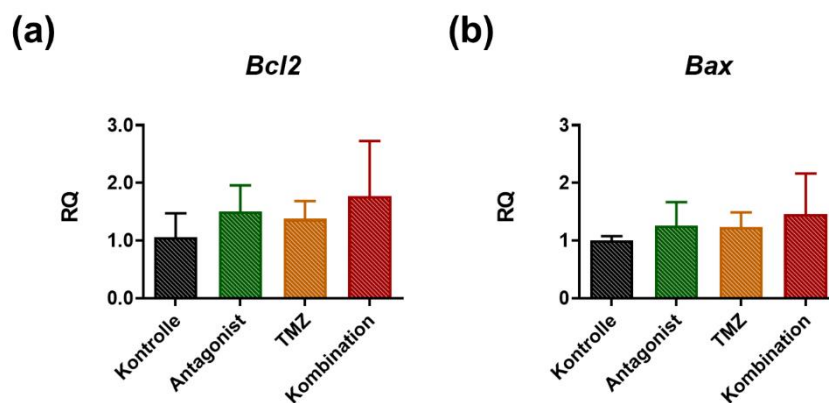


Abbildung 11: Genexpressionsanalyse der Moleküle *Bax* und *Bcl2*.

(a, b) Die Genexpressionsanalyse (qRT-PCR) der Moleküle *Bcl2* (anti-apoptotisch) und *Bax* (proapoptotisch) zeigten keine Hinweise auf therapieinduzierte Veränderungen in den unterschiedlichen Gruppen. ($n=3-4$) Zur statistischen Testung wurde der One-way ANOVA-Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur verwendet. Die Graphen zeigen den Gruppenmittelwert (Balken) \pm Standardabweichung (Linien).

4.2.4 Beginnende Abnahme der Tumolvaskularisation bei unveränderter TAM-Akkumulation

Ein wichtiges Merkmal des GBM ist die ausgeprägte Tumolvaskularisation (12). Um einen Eindruck zu bekommen, inwiefern das verwendete GL261-GBM-Mausmodell dieses Charakteristikum abbildet, wurde einmalig exemplarisch eine FITC-Lektin-Färbung durchgeführt. Auf dem abgebildeten koronaren Anschnitt ist die Gefäßarchitektur zwischen Nicht-Tumor- und Tumorgewebe erkennbar (Abbildung 12).

Die feingliedrige Gefäßarchitektur der kontralateralen Seite steht den chaotisch und destruktiv anmutenden, funktional minderwertigen Gefäßen des Tumors gegenüber (Abbildung 12b, c).

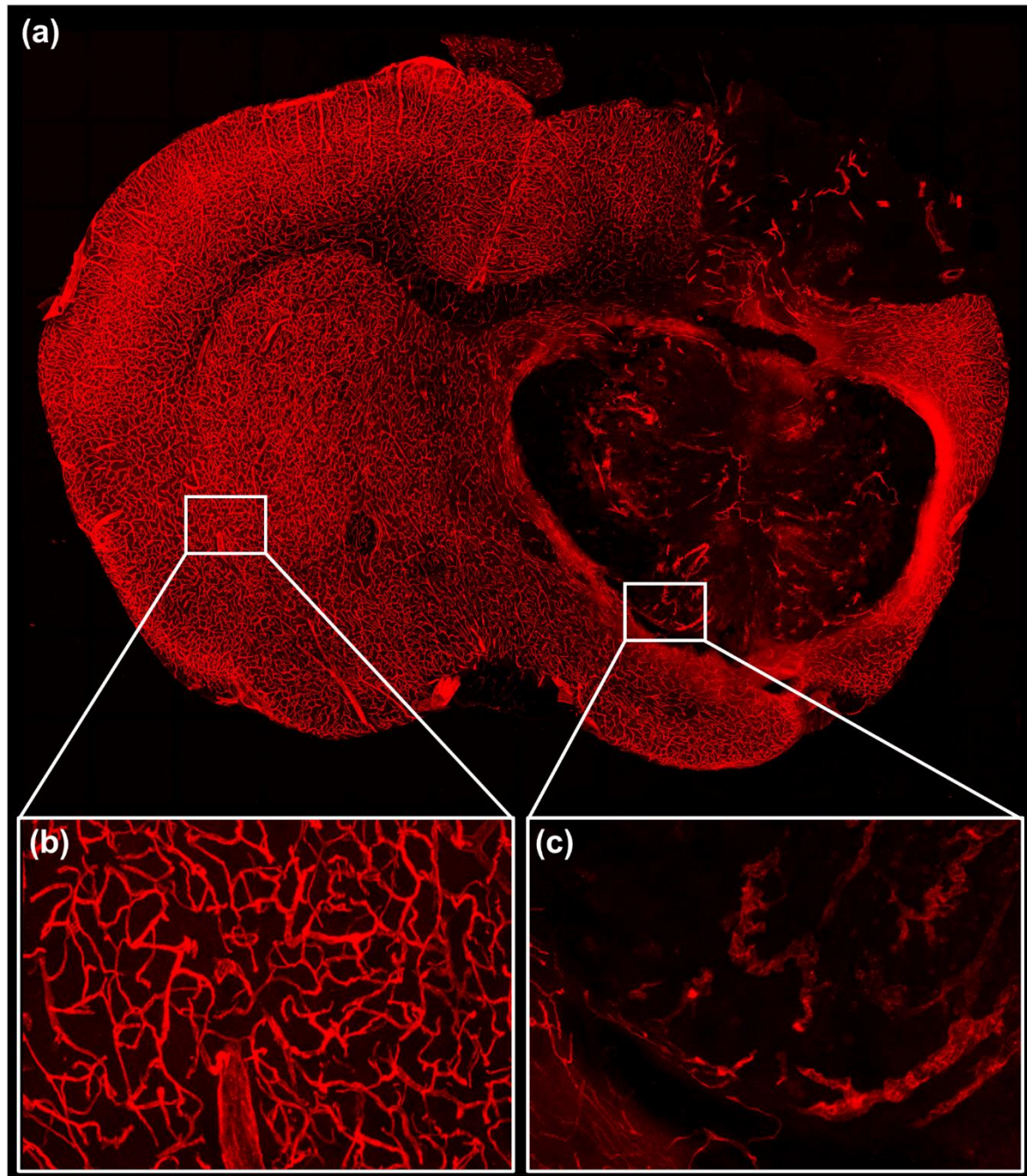


Abbildung 12: Tumorvaskularisation im syngenem orthotopen GL261-Mausmodell.

(a) Die Immunfluoreszenzaufnahme zeigt eine koronare Übersichtsdarstellung des Gehirns eines unbehandelten Kontrolltieres nach FITC-Lektin-Färbung. Zu erkennen ist die veränderte Gefäßarchitektur der kontralateralen Seite (links im Bild) zum Tumor (rechts im Bild). **(b)** Die Nahaufnahme der kontralateralen Seite zeigt eine geordnete Gefäßarchitektur im tumorfreien Hirnparenchym. **(c)** In der Nahaufnahme des Tumors mit Anschnitt der peritumoralen Umgebung (links unten im Bild) sind chaotisch organisierte, im Kaliber schwankende und destruktiv veränderte Tumorgefäße zu sehen.

Der alternative angiogene Signalweg über CXCR2 wird durch Rezeptoren aktiviert, die sich auf Tumorzellen und Endothelzellen befinden (59, 107). In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte bei intrathekaler Anwendung des CXCR2-Antagonisten SB225002 eine antiangiogene Wirkung erzielt werden (81). In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern sich die antiangiogene Wirkung bei gleichzeitiger Applikation von TMZ verändert. Die Tumolvaskularisation zeigte insgesamt nur geringe therapieinduzierte Veränderung in den analysierten Gefäßparametern Gefäßfläche, Gefäßdichte und durchschnittliche Gefäßgröße (Abbildung 13, 14). Die Veränderungen waren in keiner Gruppe statistisch signifikant. Es zeichnete sich eine Verminderung der Gefäßfläche sowie eine Abnahme der durchschnittlichen Gefäßgröße ab (Abbildung 14a, b). Die zusätzliche Verminderung der Gefäßfläche durch CXCR2-Rezeptorblockade zwischen der Kombinationsgruppe und der TMZ-Gruppe betrug 36,5%. Die Abnahme der durchschnittlichen Gefäßgröße betrug 40,5%. Die Anzahl der Gefäße war in allen Therapiegruppen etwas höher als in der Kontrollgruppe, zwischen den einzelnen Therapien aber ohne einen sich abzeichnenden Trend (Abbildung 14c).

In Kapitel 2.2 wurde bereits erläutert, dass TAM eine Hauptquelle für die Sezernierung von CXCL2 sind und tumorfördernde Eigenschaften besitzen (62). In Vorarbeiten aus unserer Arbeitsgruppe konnte beobachtet werden, dass die lokale intrathekale Anwendung von SB225002 die Akkumulation von TAM vermindert, was ebenfalls mit einer Reduktion der Vaskularisation einherging und als einer der Mechanismen identifiziert wurde, der zur Reduktion des Tumorumfanges führte (81). Für TMZ in Monotherapie gibt es bisher wenig Literatur. Riva et al. untersuchten u.a. den Einfluss von TMZ auf die Modulierung des Tumormikromilieus und fanden heraus, dass auch die TMZ-Monotherapie zu einer Reduktion der TAM führen kann (108). Es konnten in der vorliegenden Arbeit keine Unterschiede in der Akkumulation der TAM zwischen den jeweiligen Monotherapien (SB225002 oder TMZ) bzw. der Kombinationstherapie gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden (Abbildung 13, 14d).

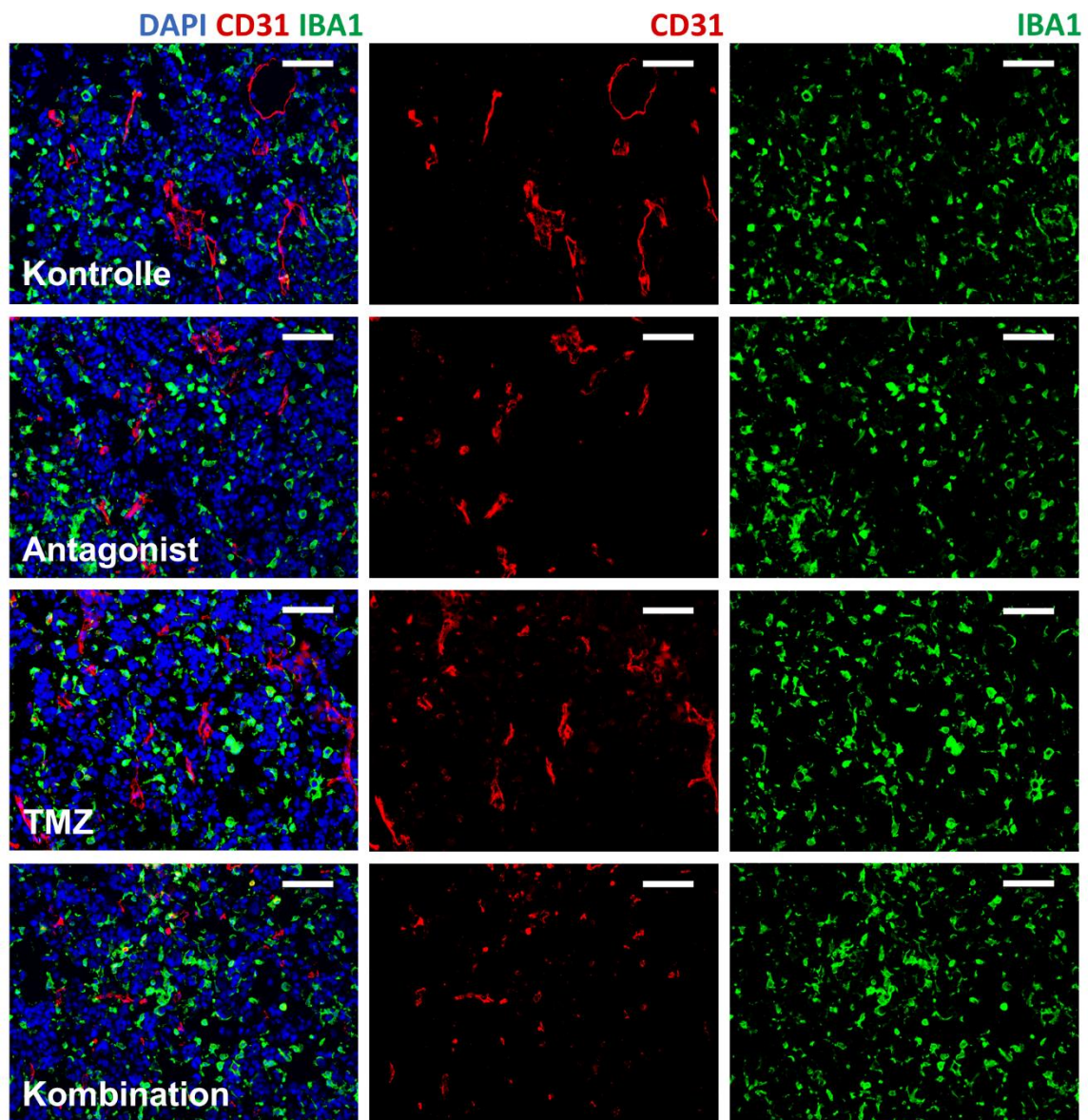


Abbildung 13: Immunfluoreszenzfärbung der Tumervaskularisation und TAM-Akkumulation.

Die repräsentativen Immunfluoreszenzbilder zeigen eine tendenziell abnehmende Tumervaskularisation in der Kombinationsgruppe. Die Akkumulation von TAM ist hingegen unverändert. (DAPI: blau, CD31: rot, Iba1: grün; Maßstabsbalken = 100µm)

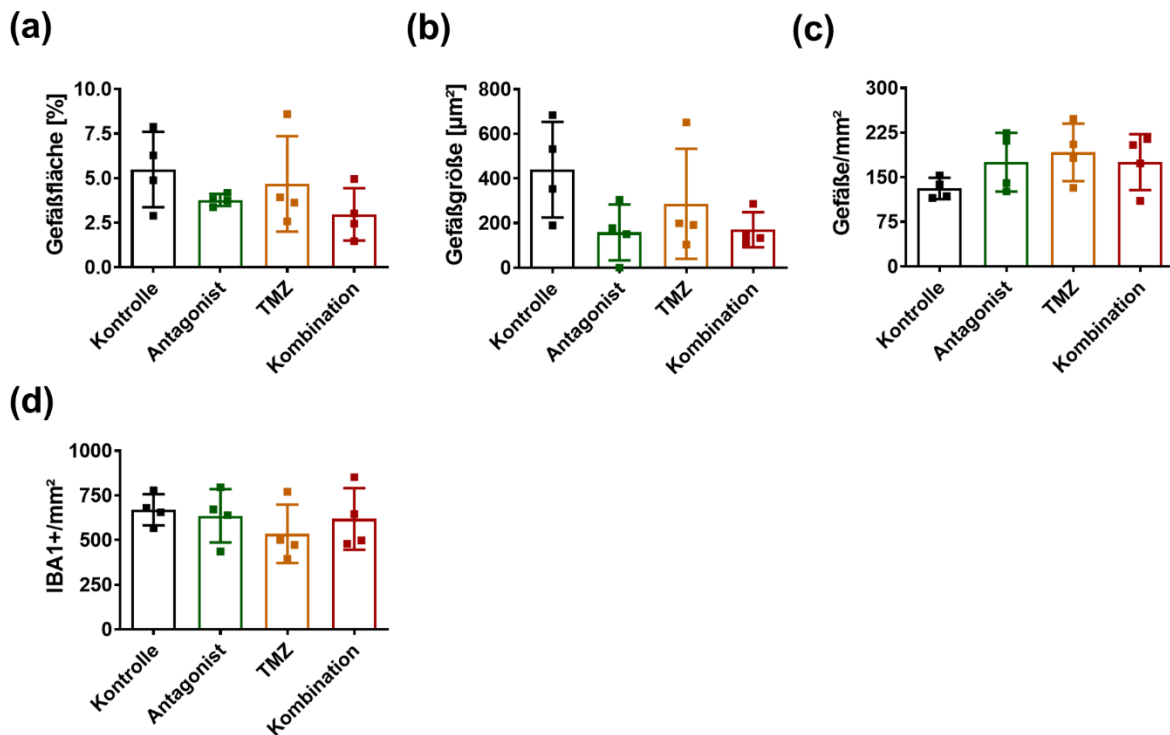


Abbildung 14: Quantitative Analyse der Tumolvaskularisation und TAM-Akkumulation.

(a) Die quantitative Auswertung der Gefäßparameter zeigt tendenziell eine Abnahme der Gefäßfläche, gemessen in Prozent der analysierten Gesamtfläche. Die Reduktion war in der Kombinationstherapie am stärksten ausgeprägt, blieb jedoch ohne statistische Signifikanz. ($n=4$) (b) Weiterhin war eine verminderte durchschnittliche Gefäßgröße messbar. ($n=4$) (c) Die Gefäßdichte, gemessen als Anzahl der Gefäße pro mm^2 blieb unverändert. ($n=4$) (d) Die Akkumulation von TAM zeigte keinen Unterschied zwischen den unterschiedlichen Gruppen. ($n=4$) Zur statistischen Testung wurde der One-way ANOVA-Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur verwendet. Die Graphen zeigen die Einzelwerte der Tiere (kleine Quadrate) und den Gruppenmittelwert (Balken) \pm Standardabweichung (Linien).

4.2.5 Therapieinduzierte Veränderungen des CXCL2/CXCR2-Signalwegs

Um festzustellen, ob der untersuchte CXCL2/CXCR2-Signalweg, in dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten syngenem GL261-Mausmodell, grundlegend verändert bzw. hochreguliert ist, wurde eine Genexpressionsanalyse der Moleküle CXCL2 und CXCR2 durchgeführt. Darüber hinaus sollte auch der Therapieeinfluss auf die Expression unter Therapie untersucht werden. Hierzu wurde Tumorgewebe mit Nicht-Tumorgewebe verglichen. Dabei konnte eine Hochregulation der *Cxcl2*-Expression und *Cxcr2*-Expression in Tumorisolaten im Vergleich zu Nicht-Tumor Gewebe auf der kontralateralen Seite beobachtet werden. *Cxcl2* war dabei um den Faktor ≈ 5 und *Cxcr2* um den Faktor ≈ 7 hochreguliert (Abbildung 15a, b). Dabei war allerdings nur die Hochregulation von *Cxcr2* statistisch signifikant. ($p=0,0434$; $n=4$). Das Verfehlen des

Signifikanzniveaus bei der CXCL2-mRNA-Expression ist am ehesten auf die geringe Anzahl an Tieren pro Gruppe zurückzuführen.

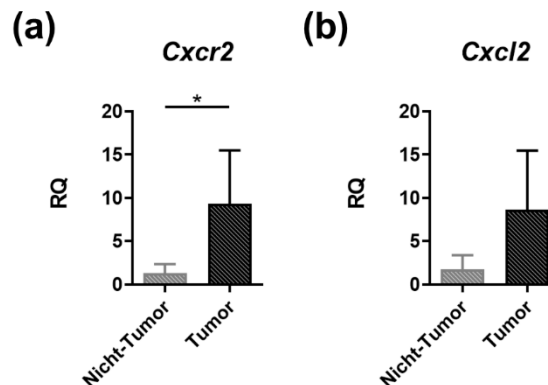


Abbildung 15: Genexpressionsanalyse der Moleküle Cxcl2 und Cxcr2 im Tumor vs. Nicht-Tumor.

(a, b) Die Expression der Moleküle Cxcr2 und Cxcl2 zeigte im Tumorgewebe eine Hochregulation. Die Hochregulation von Cxcr2 erfolgt um den Faktor ≈ 7 und unterschied sich signifikant im Vergleich zum gesunden Gewebe. ($n=4$; * $p<0,05$) Die statistische Testung erfolgte mit dem Student's T-Test. Die Graphen zeigen den Gruppenmittelwert (Balken) \pm Standardabweichung (Linien).

Die Veränderungen des CXCL2/CXCR2-Signalwegs durch TMZ im Rahmen der Entwicklung von Resistenzen und die daraus resultierende Relevanz als potenzieller Angriffspunkt wurde in 2.1.3 erläutert. Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt untersucht, inwiefern sich die Hochregulation der Moleküle CXCL2 und CXCR2 unter Therapie verändert. Die Analyse erfolgte auf Protein- und mRNA Ebene. Für die Analyse der CXCR2-Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche sowie der Expression von CXCL2 wurden zuerst Intensitätsmessungen mit Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt (Abbildung 16 und 17). Der Vergleich der mittleren Intensitäten zeigte bei dieser Analyse keinen Unterschied (Abbildung 16b und 17b). Des Weiteren waren auch in Mosaikaufnahmen, die den gesamten Tumor abbildeten, keine therapiespezifischen Unterschiede bzw. Verteilungsmuster von CXCR2 bzw. CXCL2 innerhalb der Tumoren zu erkennen (Abbildung 16a und 17a). Im Kontrast dazu, konnten therapieinduzierte Veränderungen auf Genexpressionsebene festgestellt werden. Dabei führten sowohl die jeweiligen Monotherapien wie auch die Kombinationstherapie zu einer erheblichen Verminderung der Cxcr2-Expression, die jedoch statistisch nicht signifikant war und sich zwischen den Therapien nicht unterschied (Abbildung 16c). Die Expression war im Vergleich zur Kontrolle bei SB225002 um den Faktor 2,5, bei TMZ um den Faktor 5,6 und

in der Kombinationsgruppe um den Faktor 3,5 reduziert. Die *Cxcl2*-Expression wurde durch keine der Therapien beeinflusst (Abbildung 17c).

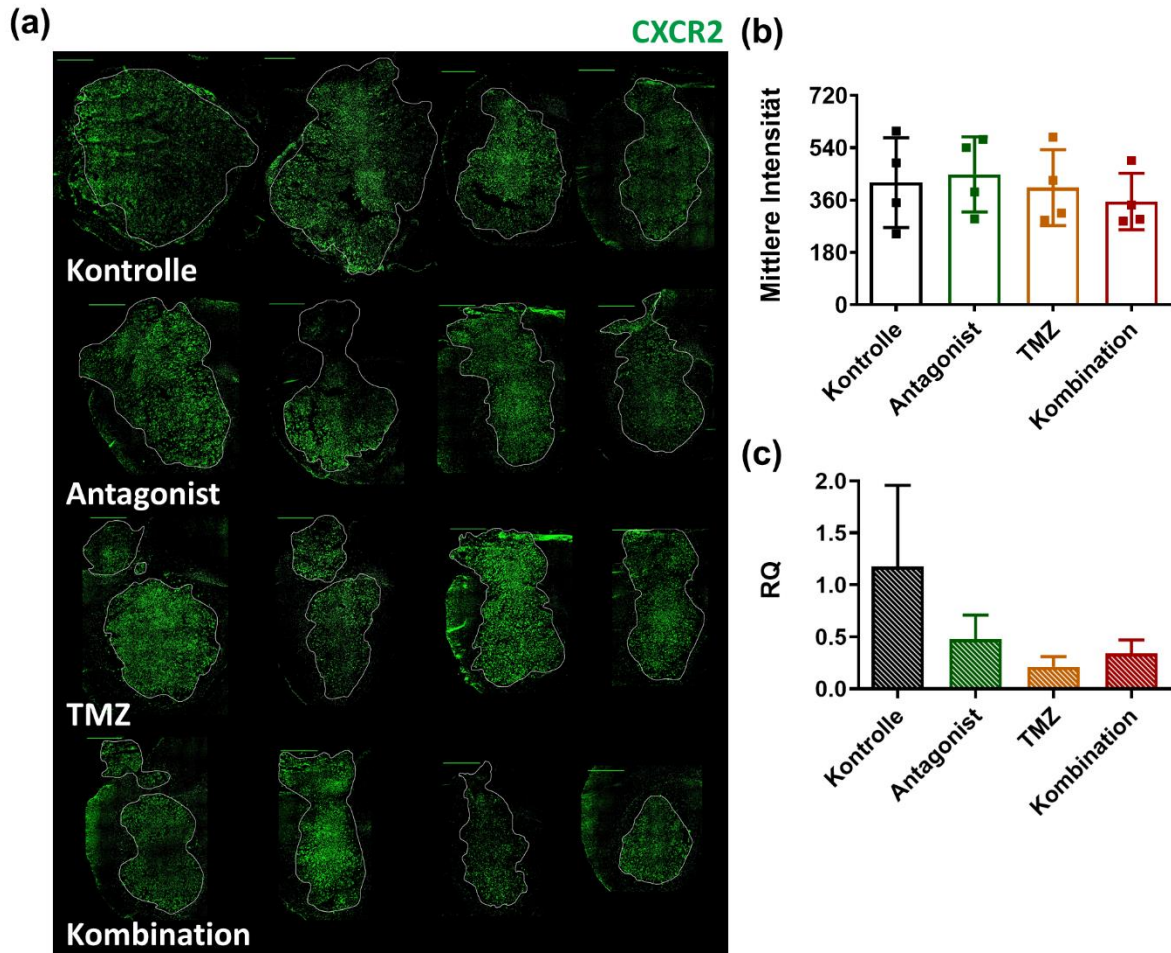


Abbildung 16: Therapieinduzierte Veränderungen des CXCR2-Rezeptors.

(a) Die Übersicht der CXCR2-Immunfluoreszenzfärbungen zeigte keine gruppenspezifischen Unterschiede in der Intensität oder dem Verteilungsmuster des Rezeptors auf der Zelloberfläche. (CXCR2: grün) Die einzelnen Tumore wurden als Mosaikaufnahmen aufgenommen und zur Abgrenzung zum umliegenden Parenchym weiß umrandet. **(b)** Die Quantifizierung der CXCR2-Proteinexpression mittels Intensitätsmessungen an Immunfluoreszenzfärbungen zeigte keine therapieinduzierten Veränderungen. ($n=4$; $n=4$; Einzelwerte der Tiere (kleine Quadrate); Gruppenmittelwert (Balken) \pm Standardabweichung (Linien)) **(c)** Im Vergleich dazu kam es auf Genexpressionsebene (qRT-PCR) zur Runterregulation in allen Therapiegruppen, die jedoch statistisch nicht signifikant war und sich innerhalb der Gruppen nicht unterschied. ($n=3-4$; Gruppenmittelwert (Balken) \pm Standardabweichung (Linien)). Zur statistischen Testung wurde der One-way ANOVA-Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur verwendet.

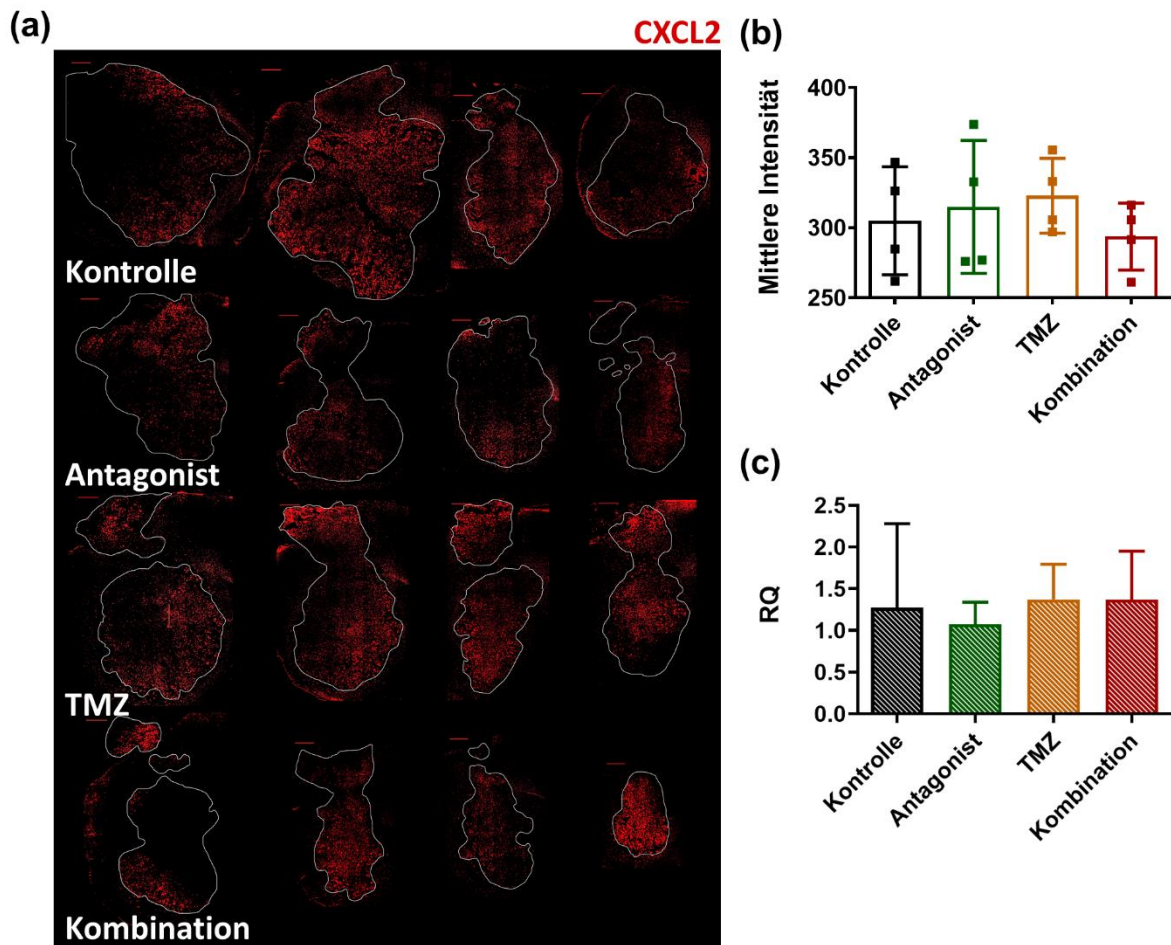


Abbildung 17: Therapieinduzierte Veränderungen des CXCL2-Liganden.

(a) Die Übersicht der CXCL2 Immunfluoreszenzfärbungen zeigte keine gruppenspezifischen Unterschiede in der Intensität oder dem Verteilungsmuster des Liganden. (CXCL2: rot) Die einzelnen Tumore wurden als Mosaikaufnahmen aufgenommen und zur Abgrenzung zum umliegenden Parenchym weiß umrandet. **(b)** Die Auswertung der CXCL2-Proteinexpression zeigte keine therapieinduzierten Veränderungen. Diese wurde mittels Intensitätsmessungen an Immunfluoreszenzfärbungen gemessen. ($n=4$; Einzelwerte der Tiere (kleine Quadrate); Gruppenmittelwert (Balken) \pm Standardabweichung (Linien)) **(c)** Genauso konnte auf Genexpressionsebene (qRT-PCR) kein therapieinduzierter Unterschied festgestellt werden. ($n=3-4$; Gruppenmittelwert (Balken) \pm Standardabweichung (Linien)). Zur statistischen Testung wurde der One-way ANOVA-Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur verwendet.

4.2.6 Expression klassischer proangiogener Moleküle sowie CXCR1

Um ein Gesamtbild über therapieinduzierte Veränderungen auf Genexpressionsebene zu bekommen, wurde in dieser Arbeit ergänzend einer der „klassischen“ proangiogenen Regulatoren, *Vegf* mit seinen Rezeptoren *Vegfr1* und *Vegfr2*, untersucht (12). Die Expression dieser Moleküle korreliert mit dem histologischen Schweregrad sowie der Tumorgefäßbildung und -progression des GBM (109). Es sollte daher untersucht werden, inwiefern die Blockade des proliferationsfördernden und proangiogenen CXCR2-Rezeptors die VEGF-Genexpression beeinflusst und gegebenenfalls kompensatorisch

hochreguliert. Dies war insbesondere bei der Konstellation des reduzierten Tumolvolumens bei nur geringgradig veränderter Tumolvaskularisation (siehe Kapitel 4.2.2 und 4.2.4) interessant. In der vorliegenden Arbeit konnten keine therapieinduzierten Veränderungen des *Vegf*-Signalwegs und seiner Rezeptoren *Vegfr1* und *Vegfr2* festgestellt werden (Abbildung 18a, b, c).

Als nächstes sollte die Rolle des CXCR1 Rezeptors untersucht werden. Es ist bekannt, dass CXCR1 sehr ähnliche Eigenschaften wie CXCR2 besitzt und ebenfalls, zumindest im humanen Organismus, von CXCL8 stimuliert wird (49, 55, 71). So gibt es Hinweise, dass CXCL8 bei Blockade durch SB225002 vermehrt an CXCR1 bindet (82). Ein Indiz für eine kompensatorische Hochregulation bei SB225002-Monotherapie ergaben sich auch aus *in vitro* Daten unserer Arbeitsgruppe (81). Die Therapie mit SB225002 führte in GL261-Zellen zur *Cxcr1* Überexpression (81). Nicht zuletzt, kann es durch TMZ-induzierten therapeutischen Stress ebenfalls zu einer erhöhten Expression von CXCL8 und den Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 kommen (37). In der vorliegenden Arbeit zeigte die Genexpressionsanalyse aus Tumorisolaten nur eine geringe, nicht signifikante Zunahme der *Cxcr1*-Expression in der SB225002- und Kombinationsgruppe um den Faktor $\approx 1,8$ (Abbildung 18d).

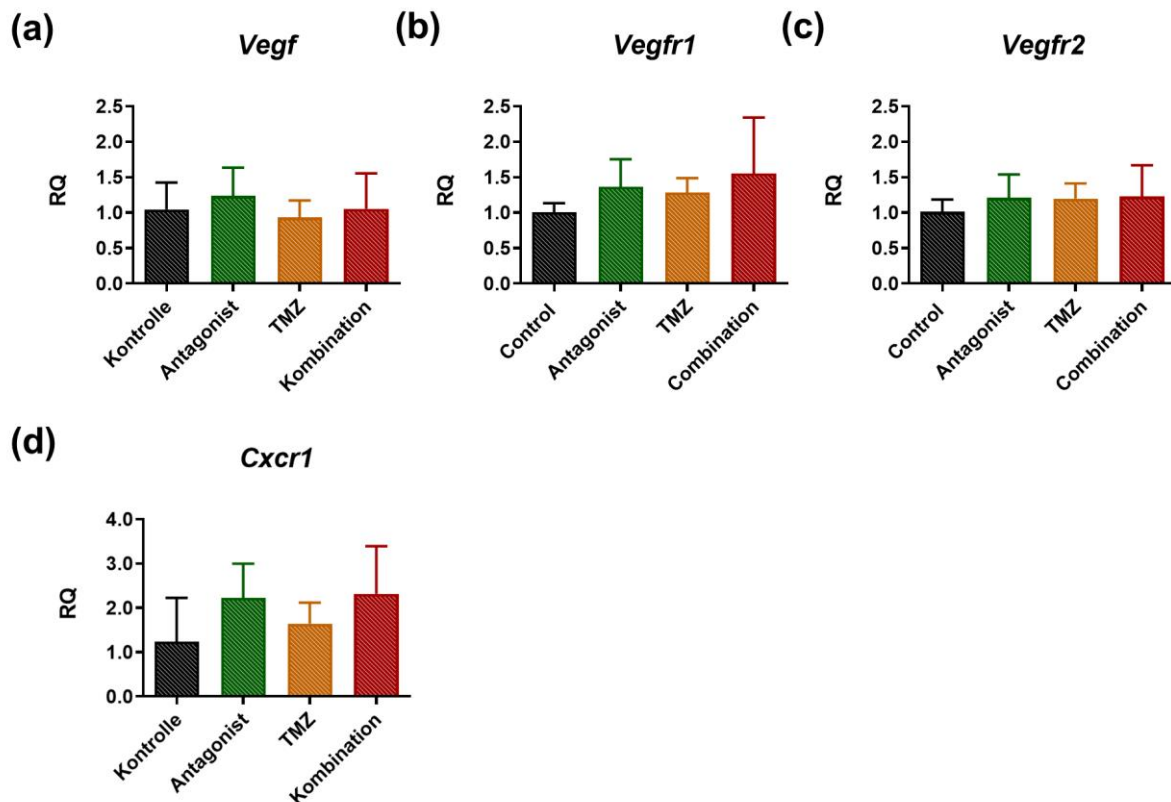


Abbildung 18: Genexpressionsanalyse therapieinduzierter Veränderungen des klassischen angiogenen Signalwegs und *Cxcr1*.

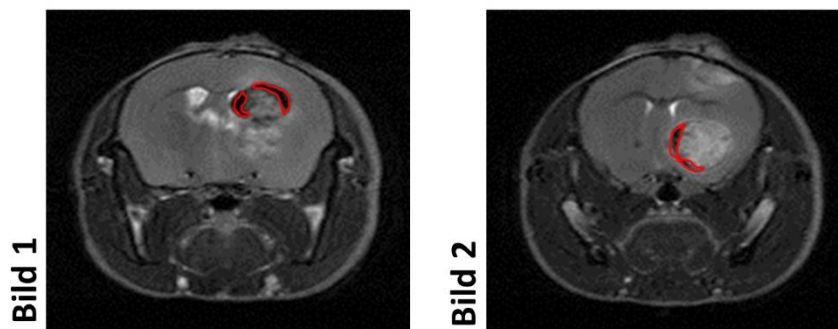
(a-c) Die Analyse der Moleküle des klassischen angiogenen Signalwegs über *Vegf* und seine Rezeptoren *Vegfr1* und *Vegfr2* ergab keinen therapieinduzierten Unterschied. ($n=3-4$) **(d)** Der Chemokinrezeptor *Cxcr1*, der ähnliche Effekte wie CXCR2 vermittelt, wurde nicht durch eine der Therapien kompensatorisch reguliert. In der quantitativen Auswertung gab es keinen Unterschied. ($n=3-4$) Zur statistischen Testung wurde der One-way ANOVA-Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur verwendet. Die Graphen zeigen den Gruppenmittelwert (Balken) \pm Standardabweichung (Linien).

4.3 Therapieverträglichkeit, Verlust und Ausschluss von Tieren

Für diese Arbeit wurden insgesamt 72 Tiere operiert. Die Therapien wurden in beiden Versuchsabschnitten ohne schwerwiegende Nebenwirkungen gut vertragen. Der Gewichtsverlauf war während den Therapien stabil. Es konnten vereinzelt, vom Tumorgewebe getrennte, intrakranielle Blutungen festgestellt werden. Diese traten insbesondere in der peritumoralen Umgebung auf (Abbildung 19a). Eine gruppenspezifische Häufung gab es allerdings nicht. Als gruppenspezifische Nebenwirkung waren die Gruppen, die mit TMZ behandelt wurden, bei der Perfusion und Eröffnung des Abdomens an Tag 21 durch einen geringgradig gereizten Gastrointestinaltrakt auffällig. Dies hatte allerdings keine feststellbaren Auswirkungen auf das Verhalten der Tiere, die Nahrungsaufnahme oder den Gewichtsverlauf.

Insgesamt mussten acht Tiere aus den Analysen ausgeschlossen werden. Im ersten Versuchsabschnitt verstarben zwei Tiere nach Narkoseeinleitung. Ein weiteres Tier wurde ungeklärter Ursache am zweiten postoperativen Tag tot im Käfig aufgefunden. Zwei Tiere mussten aufgrund einer Fehlimplantation der Tumorzellen (extraparenchymatös intraventrikulär (Abbildung 19b) bzw. extradural an der Schädelbasis) ausgeschlossen werden. In Versuchsabschnitt II verstarb ein Tier durch eine infizierte Wundheilungsstörung entlang des Schlauches der implantierten mini-osmotischen Pumpe. Ein Tier musste aufgrund von neurologischen Auffälligkeiten (seitliche Fallneigung) an Tag 20 vor Versuchsende getötet werden. Das Tier war in der Antagonisten Gruppe und erhielt intrathekal SB225002. In der durchgeführten Bildgebung war eine für das GBM typische diffuse Einblutung zu sehen, welche nach unserer Erfahrung auch in Kontrolltieren regelmäßig auftritt. Ein weiteres Tier musste aus der Analyse ausgeschlossen werden, weil an Tag 14 in der Bildgebung vor Therapiebeginn kein eindeutiges Tumorwachstum verifizierbar war.

(a) Peritumorale Blutung



(b) Intraventrikuläre Inokulation

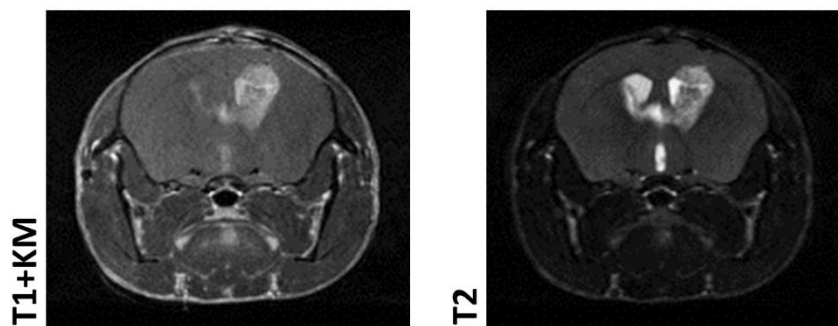


Abbildung 19: Exemplarische MRT-Schnittbilder peritumorale Blutung und Ausschlusstier.

(a) Exemplarische Darstellung einer peritumoralen Blutung (rot umrandet) in 2 Schnittebenen. **(b)** Ausschlusstier: Ausschluss von der Analyse aufgrund der dargestellten intraventrikulären Inokulation von Tumorzellen in T1+KM und T2 Wichtung an Tag 21.

5 Diskussion

Die Relevanz des CXCL8/CXCL2/CXCR2-Signalwegs in der Pathogenese des GBM sowie der Entstehung von Resistenzen unter TMZ-Therapie wurde bereits in der Literatur berichtet (37, 38, 53-59, 81). Der erste Abschnitt dieser Arbeit zeigte, dass die systemische Applikation des CXCR2-Antagonisten SB225002 dosisunabhängig der intrathekalen Applikation unterlegen ist. Im zweiten Abschnitt zeichnete sich durch die zusätzliche Blockade des CXCR2-Rezeptors bei TMZ-Therapie ein verstärkter antitumoraler Effekt ab. Im Vergleich zur TMZ-Monotherapie kam es durch die zusätzliche Applikation von SB225002 zu einer additiven Volumenreduktion und einer reduzierten Proliferationsaktivität. Gleichzeitig konnte ein signifikant verschobener Apoptose-Proliferationsquotient zugunsten der Apoptose beobachtet werden. Die Tumervaskularisation zeigte eine abnehmende Tendenz in der Gefäßgesamtfläche als auch der durchschnittlichen Gefäßgröße, wobei die Unterschiede zwischen den Therapiegruppen insgesamt nur gering ausgeprägt waren. Aufgrund der kurzen Behandlungsdauer von sieben Tagen kann von einem Hinweis auf einen zusätzlichen Effekt durch Blockierung des Signalwegs ausgegangen werden, der aber in weiteren Überlebensversuchen noch tiefergehend verifiziert werden muss.

5.1 Kritische Betrachtung des verwendeten GBM-Mausmodells

In vitro Modelle können heute einzelne Zell-Zell-Interaktionen untersuchen, sind jedoch noch nicht in der Lage, die vollständige Komplexität von Tumoren in ihrer natürlichen Umgebung sowie das spezifische Tumormikromilieu nachzuahmen (110). Aus diesem Grund wurde zur Beantwortung der Fragestellungen in der vorliegenden Arbeit ein tierexperimenteller Versuchsaufbau gewählt. Anforderungen an das Modell waren ein erhaltenes Immunsystem, ein spezifisches Tumormikromilieu und vergleichbare histopathologische Kriterien. Es wurde daher ein orthotopes syngenes GL261-Mausmodell verwendet, das diese Eigenschaften abbildete und somit die bestmögliche Übertragbarkeit ermöglichte (84).

Zur Anwendung kamen immunkompetente C57BL6N Wildtyp-Mäuse die seit Jahrzehnten als Inzucht-Mausstamm aufgrund der Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit in vielen Studien zur Immunologie und Krebsforschung verwendet werden (83). Die Tumore wurden durch Implantation von syngenem GL261-Zellen induziert. GL261-Zellen sind murine GBM-Zellen, die ursprünglich durch 3-

Methylcholanthreninjektion chemisch induziert wurden (111). Der Vorteil syngene Zellen zu verwenden ist, dass es trotz der erhaltenen Immunität zu keiner Abstoßungsreaktion kommt. Des Weiteren zeichnete sich das verwendete Modell durch ähnliche Mutationen und vergleichbare histopathologische Eigenschaften zum humanen GBM aus (112). Dies beinhaltet unter anderem die Bildung von Tumorgefäßen, Nekrosen und Pseudopalisaden (112). Außerdem gab es trotz des invasiven Charakters kein metastatisches Potential (112).

Kritisch muss jedoch erwähnt werden, dass Mäuse kein CXCL8 exprimieren (39). Stellvertretend wurde hier, wie in der Einleitung erläutert, CXCL2 adressiert, das als funktionelles Mausehomolog zu CXCL8 identifiziert werden konnte (81). CXCL2 ist wie CXCL8 ein Ligand des CXCR2-Rezeptors und ist in der Lage, die gleichen Signalkaskaden auszulösen (70, 78). Die durchgeführten Genexpressionsanalysen für *Cxcl2* und *Cxcr2* zwischen Nicht-Tumor- und Tumorgewebe zeigten eine Hochregulation in dem verwendeten GBM-Mausmodell. Dies war eine wichtige Grundlage zur Verifizierung der Tauglichkeit des Mausmodells sowie eine Bestätigung der zentralen Bedeutung in der Pathogenese. Auch wenn aufgrund der erläuterten Eigenschaften das GL261 GBM-Mausmodell repräsentativ für das humane GBM ist, gibt es im Rahmen von tierexperimentellen Versuchen Limitationen. Diese ergaben sich u.a. aus der Festlegung des experimentellen Ablaufs, der Definition des Beobachtungszeitraumes, der Therapiedauer und der Wahl der Analysezeitpunkte.

Orientierung für die Festlegung auf den Beobachtungszeitraum von 21 Tage waren Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe, bei denen die erfolgreiche Monotherapie des CXCR2-Antagonisten SB225002 bei intrathekalen Applikation und einer Therapiedauer von sieben Tagen ab Tag 14 erfolgreich etabliert wurde (81). Eine Limitation an dieser Stelle war die Pumpe, durch die es nicht möglich war einen längeren Versuchszeitraum zu wählen. Das Reservoir ermöglichte eine kontinuierliche Applikation von SB225002 über sieben Tage, hätte aber anschließend unter einer zusätzlichen Narkose und erhöhter Infektionsgefahr gewechselt werden müssen. Aufgrund der schlechten Löslichkeit von SB225002 war es auch nicht möglich eine Pumpe mit längerer Laufzeit zu wählen und eine höhere Konzentration herzustellen. Die Pumpengröße konnte aufgrund der Relation zum Mausgewicht ebenfalls nicht größer gewählt werden. Um die zusätzliche Belastung der Tiere im Rahmen eines Pumpenwechsels zu vermeiden, wurde an der Behandlungsdauer von sieben Tagen festgehalten. So konnten erste Eindrücke von der Wirksamkeit der Kombinationstherapie gewonnen werden.

Ein wichtiger Grundsatz in der experimentellen Forschung mit Tierversuchen ist die Achtung und Einhaltung des 3R-Prinzips („Replacement“, „Reduction“, „Refinement“). Das Ziel war es, den Einsatz und die Benutzung von Versuchstieren auf das absolut Notwendige zu beschränken. Es ist deshalb im Rahmen von Tierexperimenten üblich kleinere Gruppengrößen zu wählen. Daraus ergibt sich die Limitation, dass sich geringgradige Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen aufgrund der kleinen Gruppengröße nicht über das statistische Signifikanzniveau abgrenzen.

5.2 Systemische Effektivität des CXCR2-Antagonisten SB225002

Die intraperitoneale Applikation von SB225002 wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob der systemische Applikationsweg eine Alternative zur intrathekalen Pumpenimplantation darstellt (siehe auch 4.1.1). Vorteile wären eine einfachere Handhabbarkeit sowie eine bessere Übertragbarkeit in die klinische Anwendung an Patienten*innen. Auch die erwähnte Limitation der begrenzten maximalen Laufzeit der Pumpe von sieben Tagen hätte somit umgangen werden können.

Die systemische Applikation des Antagonisten SB225002 erfolgte in unterschiedlichen Dosen (30 μ g_{i.p.}/Tag, 60 μ g_{i.p.}/Tag, 200 μ g_{i.p.}/Tag) über eine intraperitoneale Injektion an sieben aufeinanderfolgenden Tagen einmal pro Tag. Die Dosis mit 60 μ g_{i.p.} pro Tag zeigte die größte Tumolvolumenreduktion und wurde nach histologischen Endpunkten mit der intrathekalen Applikation verglichen (81). Dabei konnte im Gegensatz zu der vorangegangenen Arbeit unserer Arbeitsgruppe zur intrathekalen Anwendung weder eine vergleichbare noch eine statistisch signifikante Reduktion des Tumolvolumens festgestellt werden (81). Es konnte darüber hinaus keine vergleichbare Dynamik hinsichtlich der Reduktion der Gefäßzahl oder der TAM-Akkumulation erreicht werden (81).

Es wurden (drei) wesentliche Faktoren identifiziert, die eine Erklärung für die unterlegene Wirksamkeit sein könnten. In der Literatur gibt es keine pharmakologische Studie an Mäusen, die pharmakokinetische und -dynamische Merkmale des CXCR2-Antagonisten SB225002 untersucht. Es ist unbekannt, welche Metabolisierungs- und Distributionsverluste kalkuliert werden müssen, um eine definierte wirksame Konzentration im Bereich des Tumors zu erreichen. Wir wissen aus *in vitro*-Versuchen, dass die Reduktion der Zellviabilität von GL261-Tumorzellen dosisabhängig zu sein scheint und dass die Aktivierbarkeit des CXCR2-Rezeptors mit höheren Dosen von

SB225002 abnimmt (81). Somit wäre es denkbar, dass im Bereich des Tumors keine wirksame Konzentration erzielt werden konnte. Ein weiterer Hinweis auf die schwere Abschätzbarkeit ist, dass trotz der Verwendung unterschiedlicher Dosen pro Tag, kein Dosis-Wirkungszusammenhang für SB225002 bei systemischer Applikation festgestellt werden konnte. Die 60µg_{i.p} Gruppe zeigte den größten antitumoralen Effekt, während niedrigere (30µg_{i.p}) und höhere (200µg_{i.p}) Konzentrationen keinen Einfluss hatten. Paradoxe Weise waren bei 200µg_{i.p} sogar tendenziell größere Tumoren als in der Kontrollgruppe feststellbar. Dieses Paradoxon wurde in der vorliegenden Arbeit nicht weiterverfolgt. Aufgrund dieser Erkenntnisse wäre es denkbar, dass noch andere Mechanismen die Wirkweise *in vivo* beeinflussen und dazu führen, dass die *in vitro* beobachtete Konzentrationsabhängigkeit nicht einfach übertragbar ist (81, 113).

Außerdem kann zur Debatte gestellt werden, ob durch die intermittierende Gabe bei systemischer Applikation kein vergleichbarer Wirkspiegel wie durch eine kontinuierliche Applikation über die mini-osmotische Pumpe erreicht werden konnte. Es gibt aktuell keine Studien zu der Halbwertszeit von SB225002. Deshalb war es unklar, ob möglicherweise eine zu kurze Halbwertszeit bei intermittierender Gabe zu einem geringeren Wirkspiegel und damit zu Wirkverlusten geführt hat.

Im Literaturvergleich gibt es im Kontext der systemischen Anwendung von SB225002 in experimentellen GBM-Mausmodellen nur eine Studie von Angara et al. (59). Die Arbeitsgruppe verwendete ein xenogenes U251-GBM-Mausmodell mit Nacktmäusen und konnte eine Tumolvolumenreduktion beobachten (59). Angara et al. verwendete eine Dosis von 10mg/kg/Tag intraperitoneal ab dem achten Tag für 2 Wochen an fünf Tagen in der Woche (59). Die Dosis entspricht bei einem angenommenen durchschnittlichen Mausgewicht von 20-25g 200-250µg SB225002 pro Maus pro Tag und kann somit mit der angewandten Dosis von 200µg in dieser Arbeit verglichen werden. Im Gegensatz zu Angara et al. konnte in der vorliegenden Arbeit bei 200µg_{i.p} jedoch keine Volumenreduktion erreicht werden. Auch wenn die Dosis pro Tag vergleichbar war, unterschieden sich die Modelle und Therapieschemata gravierend. Angara et al. verwendeten eine humane Zelllinie in einem immunkompromittierten Mausmodell. Des Weiteren wurde die Therapie mit SB225002 zu einem früheren Zeitpunkt begonnen und über einen längeren Zeitraum appliziert (59).

Ein weiterer Aspekt bezüglich der systemischen Wirksamkeit von SB225002 ist der Einfluss der Bluthirnschranke, der für den Antagonisten noch nicht detailliert untersucht wurde. Aus diesem Grund kann man sich nur an anderen Studien, auch Nicht-Tumor

Studien, orientieren, die genauso wie Angara et al. über eine systemische Applikation eine zentrale Wirkung erzielen konnten (59, 114, 115). Nimmt man eine vergleichbare Permeabilität der Bluthirnschranke bei Mäusen und Menschen an, können Moleküle neben anderen begünstigenden Charakteristika aufgrund ihres molekularen Gewichts von <400-500 kDa die Bluthirnschranke passiv überwinden (116, 117). Der CXCR2-Antagonist SB225002 erfüllte dieses Kriterium mit einem molekularen Gewicht von 352,14 kDa, sodass nach diesen Erkenntnissen von einer prinzipiellen Permeabilität für SB225002 ausgegangen werden konnte.

5.3 Stellenwert kombinatorischer Therapieansätze

Die Herausforderungen, die für eine erfolgreiche Behandlung des GBM überwunden werden müssen, wurden ausführlich in 2.1.2 und 2.1.3 beschrieben. Diese liegen insbesondere in der inter- und intratumoralen Heterogenität, sodass bei Wahl eines monotherapeutischen Ansatzes Zellpopulationen vorhanden sind, die nicht adressiert werden und folgend keine vollständige Tumorkontrolle erreicht werden kann (18). Aldape et al. appellierten deshalb an Kliniker und Forscher, dass die Vorstellung, Hirntumore seien monogenetischen oder monoklonalen Ursprungs, verlassen werden muss (17). Ghosh et al. beschrieben das Potential, durch Kombinationstherapien synergistische Effekte zu erzielen, die den summierten Therapieeffekt der verschiedenen Monotherapien übertreffen (118). Darüber hinaus wird angenommen, dass durch gezieltes Eingreifen in unterschiedliche Signalwege geringere Medikamentendosen verwendet werden können und so spezifische Nebenwirkungen reduziert bzw. der Resistenzentwicklung der Monotherapien entgegen gewirkt werden kann (118). Vor diesem Hintergrund war die Untersuchung eines Kombinationstherapeutischen Ansatzes zeitgemäß und vielversprechend.

Die Kombination des Standardtherapeutikums TMZ mit additiven Substanzen konnte bereits in anderen Kleintierstudien einen Vorteil gegenüber der alleinigen Monotherapie zeigen (118-120). Dabei wurden unterschiedlichste additive Substanzen verwendet, zu denen u.a. antiangiogene Therapien, Immuntherapien, Strahlentherapie und Therapien, die sich gegen spezifische Moleküle richten, gehören. Jedoch zeigt die klinische Praxis, dass *in vivo* beobachtete Vorteile nicht immer auf den Menschen übertragbar sind. Am Beispiel von Bevacizumab (Anti-VEGF Antikörper) in Kombination mit TMZ, konnte der in *in vivo*-Tierexperimenten beobachtete Überlebensvorteil in humanen Studien nicht

bestätigt werden und führte lediglich zu einer Verlängerung des progressionsfreien Intervalls (24, 119). Es muss deshalb parallel weiter an Mechanismen geforscht werden, die auf lange Sicht auch in der Klinik einen entscheidenden Behandlungsvorteil generieren können. Wie in 2.1.3 und 2.2 erläutert, hat der CXCL8/CXCL2/CXCR2-Signalweg eine wichtige Rolle in der Pathogenese des GBM und wird durch die Standardtherapie mit TMZ beeinflusst (37, 38). Aus diesem Grund war gerade diese Kombinationsbehandlung aus zusätzlicher Blockade des Signalwegs kombiniert mit TMZ ein vielversprechender Ansatz, um die Effektivität von TMZ zu erhöhen und der Entwicklung von Resistenzen entgegenzuwirken.

5.4 Auswirkungen der zusätzlichen CXCR2-Antagonisierung bei TMZ-Therapie im GBM

5.4.1 Effekte auf das Tumolvolumen

In der Literatur wurde sowohl für SB225002 als auch TMZ ein volumenreduzierender Effekt beschrieben (81, 85, 121, 122). Für SB225002 konnte unsere Arbeitsgruppe in Vorarbeiten einen Reduktionseffekt von 47% bei intrathekaler SB225002-Monotherapie zeigen (81). Dies ist konkordant mit der aus dieser Arbeit erhobenen Reduktion um \approx 53% verglichen zur Kontrolle. Entgegen der Erwartung war das Ergebnis, trotz des starken Reduktionseffektes, nicht signifikant. Dies lässt sich am ehesten durch die geringe Anzahl der Tiere ($n=4$), die große Standardabweichung in der Kontrollgruppe bzw. der Absenkung des Signifikanzniveaus bei dem hier verwendeten Einfaktoriellen ANOVA-Test mit nachfolgender Bonferroni-Korrektur zum Vergleich aller Gruppen erklären. Am eindrucklichsten war die Volumenreduktion in der Kombinationstherapie mit \approx 75%, die noch höher als die der TMZ-Monotherapie (\approx 61%) im Vergleich zu Kontrolle war. Die Kombinationsgruppe wies außerdem eine sehr homogene Verteilung einhergehend mit der kleinsten Standardabweichung auf, was ebenfalls auf einen zuverlässigen Therapieeffekt schließen lässt. Aus diesen Erkenntnissen lässt sich ein Vorteil der Kombinationstherapie in der Volumenreduktion gegenüber den Monotherapien erkennen. Der Unterschied ist zu der schon sehr potenten Wirkung der TMZ-Monotherapie aber als gering additiv einzuschätzen, da das Signifikanzniveau in dem verwendeten Versuchsaufbau mit der kleinen Gruppenstärke das festgelegte Signifikanzniveau nicht unterschritt. Allerdings ist aufgrund des gewählten Therapieschemas und der kurzen Beobachtungszeit keine definitive Interpretation

möglich. Daraus folgend, wäre für zukünftige Studien die Untersuchung des kombinatorischen Therapieansatzes in Überlebensexperimenten oder/und unterschiedlichen Therapieschemata notwendig, die im Rahmen dieser Arbeit aufgrund der Limitation durch die Pumpenlaufzeit (5.1) nicht möglich waren. Das Kapitel 5.5 beschreibt tiefgehend den möglichen Einfluss des Therapieschemas auf die Wirksamkeit und Therapiestrategien, die das Potential der zusätzlichen CXCR2-Antagonisierung weiter ausschöpfen könnten.

Um den Mechanismus hinter der beobachteten Tumolvolumenreduktion zu verstehen, wurden in dieser Arbeit u.a. Charakteristika wie das Proliferations- und Apoptoseverhalten, die Veränderung der Vaskularisation unter Therapie sowie der Einfluss des Immunsystems im Sinne der TAM-Akkumulation untersucht.

5.4.2 Therapieinduzierte Effekte auf tumorbiologische Charakteristika

5.4.2.1 Proliferation

In Kapitel 2.2.4 wurde detailliert erläutert welche tumorfördernden Effekte über den CXCR2-Rezeptor ausgelöst werden. Dazu gehören insbesondere Proliferation, Apoptose, Migration und Angiogenese (70, 71). Die Kombinationstherapie zeigte im Vergleich zu beiden Monotherapien weniger Proliferationsaktivität, war jedoch nur zum CXCR2-Antagonist SB225002 statistisch signifikant. Der geringere Reduktionseffekt der SB225002-Monotherapie war rechnerisch zwischen Kontrolle und SB225002-Monotherapie genauso groß wie zwischen TMZ- und Kombinationstherapie. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Hemmung der Proliferation überwiegend von TMZ ausgeht und weniger durch Blockade des CXCR2-Rezeptors mittels SB225002. Passend dazu, lässt sich in der Literatur in *in vivo* GBM-Studien lediglich für TMZ-Monotherapie eine Reduktion finden (96, 97). Ein Hinweis, dass TMZ in der vorliegenden Arbeit einen sehr guten antiproliferativen Effekt zeigte, war der Vergleich zu Delgado-Goni et al., die erst nach mehreren Zyklen eine Reduktion erzielen konnten (121).

Die Ergebnisse der Wirkung des CXCR2-Antagonisten in Monotherapie konnten mit Analysen unserer Arbeitsgruppe verglichen werden. Diese zeigten ebenfalls *in vivo* keine Wirkung auf die Proliferationsaktivität durch SB225002 (81). Im Gegensatz zu der eher geringen Auswirkung auf die Proliferationsaktivität *in vivo*, zeigte SB225002 *in vitro* eindeutigere antiproliferative Eigenschaften (81, 100, 113, 123). Goda et al. beschrieben, dass SB225002 durch Hyperphosphorylierung einen destabilisierenden Effekt auf

Mikrotubulusstrukturen hat und so die Polymerisation in der Prometaphase verhindert (100). Dies führt zum Zellzyklusarrest und später zur Apoptose (100). Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass die immunhistochemische Färbung von Ki67 in den mit SB225002 behandelten Tieren die Hemmung auf die Proliferationsaktivität unterschätzt haben könnte. Ki67 befindet sich als Protein auf der Oberfläche von Chromosomen und ist in allen Zellzyklusphasen außer der G0-Phase exprimiert (87). Somit auch in der Prometaphase, in der die SB225002-induzierte Polymerisation und Destabilisierung von Mikrotubulusstrukturen stattfindet (87, 100). Zellen die Ki67-positiv sind, befinden sich gegebenenfalls schon im Zellzyklusarrest und gehen im nächsten Schritt in die Apoptose über, aber könnten so fälschlicherweise noch zu der proliferierenden Zellpopulation zählen.

Der antiproliferative Effekt von SB225002 ist *in vitro* wie auch in anderen Entitäten *in vivo* messbar, spielt aber unter Berücksichtigung der Literatur und den hier erhobenen Ergebnissen im Gegensatz zu TMZ vermutlich eine eher untergeordnete Rolle in seiner antitumoralen Wirkung auf das GBM im Mausmodell (81, 101).

5.4.2.2 Apoptose

Wie in 4.2.3 aufgeführt, wurde in der Literatur prinzipiell die Zunahme der Apoptose unter Behandlung mit SB225002 beziehungsweise TMZ beobachtet.

Für TMZ wurde darüber hinaus die Induktion der Apoptose als ein zentraler Wirkmechanismus beschrieben (103, 104). Im Vergleich zu TMZ, ist für den CXCR2-Antagonisten SB225002 in der Literatur lediglich *in vitro* ein positiver Einfluss beschrieben (94, 102). Dabei ist der Mechanismus zwischen den Studien und Entitäten der verwendeten Zellen unterschiedlich erklärt. Die Autoren interpretieren, dass Apoptose z.B. über die Aktivierung von p53 oder eines seiner Zielgene GLIPR1 (Glioma pathogenesis-related protein1) induziert wird (94, 102). Darüber hinaus kann Apoptose durch SB225002 induzierte PARP (Poly (ADP-ribose) polymerase)-Spaltung ausgelöst werden (101). TMZ verändert hingegen u.a. die zelluläre Balance von pro- und anti-apoptotischen Molekülen infolge von Einfach- und Doppelstrangbrüchen, die durch Methylierung und Störung der DNA-Integrität hervorgerufen werden (124).

In der selektiven Betrachtung des Apoptoseverhaltens zwischen den Gruppen konnte in der vorliegenden Arbeit kein Unterschied festgestellt werden. In der Literatur gibt es vergleichbare Studien, die ebenfalls ein syngenes GL261-Mausmodell verwendeten und

zumindest unter TMZ-Monotherapie keinen Unterschied *in vivo* beobachteten (122). Für SB225002 kann als interne Kontrolle die SB225002-Monotherapie aus Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe verglichen werden (81). Dort blieb das Apoptoseverhalten übereinstimmend unbeeinflusst von SB225002 (81).

Ein Aspekt, der auf die Limitation der Analyse apoptotischer Zellen hinweist, wurde von Holdenrieder et al. aufgegriffen. Die Studie beschreibt, dass der Nachweis von Apoptosevorgängen zeitabhängig ist und je nach Zelltyp und Gewebe bereits nach Minuten bis Stunden abgelaufen sein kann (98). Bei einmaliger Gabe von TMZ alle 24 Stunden könnte so eine Verzerrung stattgefunden haben, die nur einen Teil der Apoptose Dynamik als Momentaufnahme darstellt. Das Zeitfenster zwischen der letzten TMZ Applikation und der endgültigen Perfusion der Tiere betrug in unserem Versuch 22-26h. Damit ließe sich auch die unveränderte *Bax*- und *Bcl2*-Genexpression in unserem Modell erklären, die durch den schnellen Ablauf der Prozesse die Messbarkeit erschwert haben könnte. Über den Quotienten von *Bax* zu *Bcl2* ließe sich bei Zunahme von *Bax* (pro-apoptotisch) und gleichzeitiger Abnahme von *Bcl2* (anti-apoptotisch), im Sinne eines erhöhten *Bax/Bcl2*-Quotienten, ein gutes Therapieansprechen ableiten (97, 105, 124). Interessanterweise demaskierte sich bei der Berechnung des Verhältnisses von apoptotischen zu proliferierenden Zellen auf Proteinebene eine Verschiebung der Balance in der Kombinationsgruppe Richtung Apoptose. Dieser Trend wurde als zusätzlicher Hinweis auf eine additive Wirksamkeit der Therapien durch die Kombination beider Substanzen gewertet (99). Im statistischen Vergleich war nur die Kombinationsgruppe im Vergleich zu den Einzeltherapien und der Kontrolle signifikant unterschiedlich, was zusätzlich für einen Nutzen der Kombinationstherapie spricht.

5.4.2.3 Tumervaskularisation

Das GBM besitzt charakteristisch eine starke Tumervaskularisation, die bereits in verschiedenen Therapieansätzen als mögliches Angriffsziel definiert wurde (12, 23). Bisher angewandte antiangiogene Therapieansätze im GBM, die insbesondere den klassischen angiogenen VEGF-Signalwegs als Angriffsziel definierten, stellten sich allerdings als erfolglos in Bezug auf ein verlängertes Gesamtüberleben dar (23, 24). Aus diesem Grund war die Blockade des CXCR2-Signalwegs, der als alternativer angiogener Signalweg identifiziert wurde, eine mögliche Option die dysregulierte Tumervaskularisation therapeutisch zu beeinflussen (59, 81).

5.4.2.3.1 Der unterschiedliche Einfluss von SB225002 und TMZ auf die Tumervaskularisation

Im Vergleich zu der eher untergeordneten Rolle des CXCR2-Antagonisten SB225002 in der Beeinflussung der Proliferationsaktivität (4.2.3) kann SB225002 vielmehr eine antiangiogene Wirkung zugesprochen werden (81, 101). Die antiangiogene Wirkung von SB225002 konnte experimentell *in vivo* beim GBM sowie beim Nierenzellkarzinom beobachtet werden (81, 101). Endothelzellen exprimieren selbst CXCR2, sodass die Hemmung unmittelbar an den Gefäßen stattfindet (107). Als messbares Korrelat konnte unsere Arbeitsgruppe im GBM-Mausmodell bei intrathekaler Applikation von SB225002 zeigen, dass die Gesamtzahl der Tumorgefäße verringert wird (81). Ebenfalls wurde in anderen Studien der Mechanismus des VM beeinträchtigt, bei dem die Bildung von gefäßähnlichen Strukturen von Tumorzellen ausgeht (59, 74, 75). Angara et al. beobachteten, dass die vermehrte Bildung von VM insbesondere durch Tumorzellen mit CXCR2 positivem Rezeptorstatus mit endothelartigen Eigenschaften ausging (59). Passend dazu beschrieben sie, dass die *in vitro*-Blockade des Rezeptors durch SB225002 zur Abnahme der Bildung von „Tubes“ durch Tumorzellen führte (59).

Im Gegensatz dazu, gibt es für TMZ in Monotherapie, insbesondere im experimentellen Kontext, keine eindeutigen Beobachtungen bezüglich einer antiangiogenen Wirksamkeit. *In vivo* wurde insbesondere in GBM-Xenograft-Modellen die Abnahme der Gefäßdichte beobachtet (96, 104, 125). In GL261-Mausmodellen konnte hingegen keine Auswirkung von TMZ als Monotherapie auf die Angiogenese festgestellt werden (126, 127).

5.4.2.3.2 Therapieeffekte der Kombinationstherapie auf die Tumervaskularisation

In der Analyse der Effekte der Kombinationstherapie auf die Tumervaskularisation war keiner der Gefäßparameter signifikant verändert. Es konnte jedoch für die Kombinationstherapie die größte Abnahme der Gefäßgesamtfläche gemessen werden, was auf einen additiven Effekt durch zusätzliche Blockade des CXCR2-Rezeptors in Kombination mit TMZ hinweisen könnte. Die Interpretation wird hier in Bezug auf die kleinen Gruppengrößen mit Vorsicht vorgenommen.

Eine weitere Beobachtung war die tendenzielle Zunahme der Gefäßzahl in allen Therapiegruppen. Diese Beobachtung steht im Kontrast zu den Ergebnissen aus Vorarbeiten, die bei intrathekaler SB225002-Monotherapie eine Abnahme der Gefäßdichte und eine tendenzielle Zunahme der durchschnittlichen Gefäßgröße zeigten (81). Der wichtigste methodische Unterschied zwischen den beiden Arbeiten lag in der

Zahl der inokulierten Zellen. Diese war in der vorliegenden Arbeit um ein 5-faches höher, was als Lösung von aufgetretenen Wachstumsprobleme der Tumore durchgeführt werden musste. Nur dadurch konnten vergleichbare Tumorgrößen vor Therapiebeginn sichergestellt werden. Möglicherweise kann aber die abweichende Ausgangssituation ein Grund für die beschriebenen Beobachtungen sein. Für eine unterschiedliche Tumormorphologie zwischen den zwei Studien spricht ebenfalls, dass die Kontrolltumore dieser Arbeit deutlich mehr proliferierende Zellen und weniger TAM enthielten. Die Proliferationsaktivität war um das 1,9-fache höher, während TAM um die Hälfte reduziert waren. Aufgrund dieser wesentlichen morphologischen Unterschiede in der Ausgangssituation der Tumore ist die Vergleichbarkeit der Experimente im Allgemeinen nur eingeschränkt möglich.

Die Konstellation aus reduzierter Gefäßfläche bei Zunahme der Gefäßanzahl und geringgradig abnehmenden Gefäßdurchmessern könnte hier in den Kontext einer beginnenden Normalisierung des Gefäßsystems eingeordnet werden (128). Jain et al. beschrieben in einer ausführlichen Übersichtsarbeit, dass sich im Rahmen der Gefäßnormalisierung beobachtete Gefäßparameter unter der Therapie verändern und sehr heterogen sein können, bevor erst bei späterer Tumorregression die endgültige Abnahme der Gefäßdichte und des Gefäßdurchmessers beobachtet werden kann (75, 128). Dies wäre zumindest eine mögliche Erklärung für die widersprüchlich wirkende Abnahme des hier beobachteten Gefäßdurchmessers bei Zunahme der Gefäßdichte. Nimmt man das Prinzip der Gefäßnormalisierung an, ließen sich die beobachteten Veränderungen der Anfangsphase zuordnen (74, 76). Aufgrund der fehlenden Signifikanz sollte der Effekt aber in einem verlängerten Beobachtungszeitraum verifiziert werden.

Die geringe Gefäßdichte bei großem Gefäßdurchmesser, die insbesondere in der Kontrollgruppe zu beobachten war, könnten außerdem als Resultat des VM erklärt werden. Es wurde beschrieben, dass in Bereichen mit VM-Strukturen, die Gefäßdichte geringer ist (128). Liu et al. beobachteten, dass dies insbesondere auf höhergradige Gliome zutrifft (55, 59).

5.4.2.3.3 Der Einfluss der Kombinationstherapie auf die Angiogenese über VEGF und CXCR1

In dem Behandlungszeitraum von sieben Tagen waren die Effekte der Therapien, insbesondere die Effekte von SB225002, auf die Tumolvaskularisation, nur geringgradig ausgeprägt. Um eine kompensatorische Hochregulation der anderen Signalwege

auszuschließen, wurden Genexpressionsanalysen des klassischen angiogenen VEGF-Signalwegs und CXCR1 durchgeführt. Es wurden zuerst die klassische Angiogenese-Moleküle *Vegf* und die dazugehörigen Rezeptoren *Vegfr1* und *Vegfr2* untersucht. Die durchgeführten PCR-Analysen zeigten allerdings keine therapieinduzierten Veränderungen der mRNA-Expression der Moleküle. Daraus lässt sich ableiten, dass keine therapieinduzierte kompensatorische Regulation des *Vegf*-Signalwegs stattfand. Vorangegangene *in vitro*-Versuche unserer Arbeitsgruppe unterstützen dieses Ergebnis (81). Es konnte zumindest für SB225002 in Monotherapie keine Regulation dieser Achse an GL261-Tumorzellen oder Endothelzellen *in vitro* festgestellt werden (81).

Eine weitere Überlegung war, ob eine alternative Regulierung der Angiogenese, spezifischer des VM, über den CXCR1 Rezeptor erfolgte (55, 82). SB225002 besitzt eine 150-fach höhere Affinität zu CXCR2 im Vergleich zu CXCR1 (82). Das bedeutet, dass CXCR1 trotz SB225002 weiterhin durch Liganden gebunden werden konnte. Vorarbeiten zeigten zumindest *in vitro* eine Hochregulation von *Cxcr1* unter SB225002-Monotherapie (81). In den durchgeführten Genexpressionsanalysen von Tumorgewebe konnte dies jedoch nicht bestätigt werden. Deshalb kann dieser Mechanismus nicht als Erklärung für das geringe antiangiogene Ansprechen *in vivo* von SB225002 in Betracht gezogen werden.

5.4.2.4 Akkumulation Tumorassoziierter Mikroglia und Makrophagen

Die enge Verbindung und Beeinflussung des Tumors durch das Tumormikromilieu wurde in 2.2 beschrieben. Ein besonderer Aspekt in der Pathogenese des GBM ist die Rekrutierung von TAM, die durch die Veränderung ihres Status aus einem tumorhemmenden proinflammatorische M1-Status in den tumorfördernden M2-Status wechseln und die Tumorprogression befeuern (64). Eine wichtige Rolle spielt dabei die enge Interaktion mit dem Gefäßsystem (127). Als alternative Quelle von proangiogenen Faktoren, darunter CXCL2, unterstützen TAM die Gefäßbildung und fördern die Migration von Tumorzellen (62, 129). Entgegen der Beobachtung aus Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe, in denen SB225002 zu einer Reduktion von TAM geführt hat, war die TAM-Akkumulation in der vorliegenden Arbeit in allen Gruppen unverändert (81). Die in dieser Arbeit fehlende Reduktion von TAM durch SB22500 kann am ehesten auch durch die morphologischen Unterschiede der Tumoren erklärt werden. In den Kontrollgruppen lag die Anzahl der TAM in der vorliegenden Arbeit im Mittel bei 670,2/mm² und in der

Vorarbeit bei 1304/mm², was ungefähr dem Doppelten entspricht (81). Die erhöhte initiale Zellzahl bei der Tumorzellinokulation stellt somit einen wesentlichen Unterschied zu der Vorarbeit dar, wodurch ein dichter Zellverbund ein Migrationshindernis für TAM dargestellt haben könnte (81).

Ein weiterer in der Literatur beschriebener Aspekt ist die immunmodulatorische Eigenschaft von TMZ auf das Tumormikromilieu, was sich insbesondere durch die Erzeugung eines tumorfördernden M2-Phenotyps der TAM manifestiert (130). Die Untersuchung des Status der TAM (M1 oder M2) zur Abschätzung der Dynamik stand nicht im Fokus dieser Arbeit, wäre jedoch ein interessanter Ansatzpunkt für zukünftige Projekte.

5.4.2.5 Therapieinduzierte Auswirkungen auf die zentralen Moleküle des Signalwegs: CXCL2 und CXCR2

Eine wichtige Grundlage für die Analyse therapieinduzierter Veränderungen war die Hochregulation der *Cxcr2*- bzw. *Cxcl2*-mRNA-Expression, die im Tumorgewebe des verwendeten GBM-Mausmodells beobachtet werden konnte.

Auf Genexpressionsebene reduzierten alle Therapien die *Cxcr2*-Expression bei gleichbleibender *Cxcl2*-Expression. Die *Cxcr2*-Expression war je nach Therapie, um den Faktor 2,5 bis 5,6 reduziert und damit deutlich ausgeprägt, erreichte aber keine statistische Signifikanz. Hier könnten die kleinen Gruppengrößen von drei bis vier Tieren pro Gruppe Grund für die ausbleibende Signifikanz gewesen sein. In der Literatur ist ebenfalls eine Reduktion von CXCR2 durch SB225002 beschrieben, die in FACS-Analysen und auf mRNA-Ebene beobachtet werden konnte (59, 131). Dem gegenüber steht die Beobachtung aus Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe, bei denen es *in vitro* in GL261-Zellen und Endothelzellen zu einer Hochregulation kam (81). Unklar bleibt die Situation auch für TMZ. In dieser Arbeit wurde *in vivo* eine Reduktion in der TMZ-Gruppe beobachtet. Das steht aber im Kontrast zu Hasan et al. (37). Die Arbeitsgruppe beschrieb eine CXCR2-Hochregulation *in vitro* (in „*in vitro* FACS“ Analysen), die als adaptiver Mechanismus auf den therapeutischen Stress durch TMZ im längeren Zeitverlauf zur Rezidiventstehung beiträgt (37).

Auch die in der Literatur beschriebene TMZ-induzierte Hochregulation von CXCL2 *in vitro* konnte in dem GBM-Mausmodell nicht beobachtet werden (38). Neben der Verwendung von unterschiedlichen Modellen, war allerdings auch der Behandlungszeitraum von

sieben Tagen deutlich kürzer. Die CXCL2-Hochregulation, die an GBM Zellen astroglialen Ursprungs (U373 und T98G) *in vitro* gemessen wurde, konnte erst nach einer mehrwöchigen Behandlungsdauer festgestellt werden (38).

Aufgrund der unklaren Ergebnisse war es von besonderem Interesse, die Expression von CXCR2 und CXCL2 auch auf Proteinebene zu messen. Mittels Intensitätsmessungen konnte jedoch kein Unterschied zwischen den unterschiedlichen Therapien nachgewiesen werden. Allerdings ist hier auf die methodenbedingte Limitation hinzuweisen. Es ist nicht auszuschließen, dass trotz großer Sorgfalt und der Aufnahme der Bilder mit gleicher Belichtungszeit, geringgradige Effekte durch Artefakte überlagert wurden.

Der Vergleich der *in vivo*-Ergebnisse dieser Arbeit mit den vorrangig *in vitro* erhobenen Daten in der Literatur ist nur eingeschränkt möglich. Dennoch lässt sich anhand der erhobenen Daten und den Erkenntnissen aus der Literatur zusammenfassen, dass sowohl SB225002 als auch TMZ in der Lage sind, Veränderungen der zentralen Moleküle des Signalwegs hervorzurufen. Die in dieser Arbeit beobachteten antitumoralen Effekte (Volumenreduktion und Rückgang der Proliferation) durch zusätzliche CXCR2-Blockade waren nur schwach ausgeprägt. Dies passt zu der ausgebliebenen Hochregulation der CXCL2/CXCR2-Achse durch TMZ, die am wahrscheinlichsten durch die kurze Behandlungsdauer von sieben Tagen bedingt war. Für weitere Projekte wäre es deshalb sehr interessant, die Behandlungsdauer zu verlängern und den genauen Zeitpunkt der Hochregulation *in vivo* zu bestimmen.

5.5 Einfluss des Therapieschemas und Strategien zur Steigerung des Effektes der zusätzlichen CXCR2-Antagonisierung

In dieser Arbeit ist deutlich geworden, dass sich durch zusätzliche CXCR2-Blockade ein additiver Effekt abzeichnete, dessen Potential aber in dem Behandlungszeitraum von sieben Tagen nicht abschließend evaluiert werden konnte.

In Anbetracht der guten Verträglichkeit wäre als nächster Schritt vorzuschlagen, den Beobachtungszeitraum nach Therapie zu verlängern. Es könnte auf diese Weise die Wirksamkeit der Kombinationstherapie mit aussagekräftigeren Endpunkten wie dem Gesamtüberleben validiert werden.

Neben dieser Option steht zur Diskussion, wie die Effektivität der Kombinationstherapie weiter gesteigert werden kann. Durch die Unterlegenheit der systemischen Therapie von

SB225002 besteht aktuell die Notwendigkeit, SB225002 intrathekal zu applizieren. Die Therapiedauer ist dadurch aber auf sieben Tage begrenzt. Wie in 5.1 beschrieben, wäre andernfalls ein invasiver Pumpenwechsel mit einem erhöhten Infektionsrisiko notwendig. Eine Möglichkeit wäre es, den Stellenwert eines systemischen Applikationsweges erneut zu überprüfen, um die limitierte Behandlungsdauer durch die begrenzte Pumpenlaufzeit zu umgehen. Dies könnte beispielsweise mit einem CXCR2-Antagonisten überprüft werden, über dessen Wirkung bei systemischer Applikation und dem Übertritt über die Bluthirnschranke schon mehr Erkenntnisse vorliegen (132). Ebenfalls wäre es denkbar, den systemischen Effekt von SB225002 in Rahmen von „Targeted Therapies“ zu erhöhen. Durch Kopplung an ausgewählte Moleküle (L19-SIP, F8-SIP) kann spezifisch die Wirkstoffkonzentration in Tumorgefäßen erhöht werden (50, 133). Die Spezifität wird durch das Vorhandensein von Molekülen gewährleistet, die insbesondere im Zusammenhang mit der Tumervaskularisation auftreten (134, 135).

Ein weiterer Schritt, der trotz Limitation durch die Pumpe durchgeführt werden könnte, ist die Verbesserung der TMZ Wirksamkeit. Die Wirksamkeit wird maßgeblich durch das angewandte Therapieschema beeinflusst. Goldstandard in der klinischen Anwendung ist die zyklische TMZ-Therapie (8). Im Kontrast dazu, lassen sich verschiedene Schemata in der GBM-Grundlagenforschung an Mäusen finden (85, 97, 121, 122, 136, 137). Delgado-Moni et al. sowie D'Alessandro et al., die beide vergleichbar GL261-Tumormodelle verwendeten beschrieben, dass die zyklische Therapie, der kontinuierlichen Applikation (bzw. entsprechend einem Zyklus bei Anwendung an mehreren aufeinander folgenden Tagen) überlegen ist (121, 122). Dies lässt sich insbesondere in Bezug auf das Gesamtüberleben feststellen. So überlebten Mäuse nach Anwendung von drei Zyklen a fünf Tagen (60mg/kg/Tag p.o.) mit einer Pause von vier Tagen zwischen den Zyklen \approx 13 Tage länger (121). Bei D'Alessandro et al. sogar 24 Tage länger (50mg/kg/Tag i.p., vier mal alle zwei Tage, danach zwei Wochen Pause) (122). In der vorliegenden Arbeit wurde TMZ zeitgleich zur kontinuierlichen Applikation von SB225002 verabreicht. Eine weitere Alternative wäre die Evaluation des Wirkeffektes im Rahmen eines sequenziellen Therapieschemas. Auch wenn bei einer anderen Studie, die gleichzeitige Applikation von TMZ und eines weiteren antiangiogenen Wirkstoffes (Sunitinib) gegenüber den Einzeltherapien in unterschiedlicher aufeinanderfolgender Reihenfolge überlegen war, gibt es Argumente, die für ein sequenzielles Schema bei der zusätzlichen Anwendung der CXCR2-Antagonisierung bei TMZ-Therapie sprechen (85). Im Rahmen dieser Arbeit zeigte die TMZ-Monotherapie in dem kurzen

Behandlungszeitraum von sieben Tagen keine adaptive Hochregulation des CXCL2/CXCR2-Signalwegs wie es im Rahmen der Entstehung von Resistenzen beobachtet wurde (37, 38). Somit ist es vorstellbar, dass die Modifikation des Signalwegs in dem verwendeten Modell erst zu einem späteren Zeitpunkt auftreten wird. Möglicherweise würde der Effekt der CXCR2-Blockade zu diesem Zeitpunkt eine stärkere Wirkung haben, da die antitumorale Wirkung von TMZ erhalten und verlängert werden kann. Hasan et al. beobachteten, dass durch verminderte Wirkung des CXCR2-Rezeptors ein besseres Ansprechen der TMZ-Therapie mit verlängertem Überleben der Tiere erzielt werden kann (37). Sie reduzierten durch einen shRNA Knock-down CXCL8 und damit die Aktivierung des CXCR2-Rezeptors, was mechanistisch aber auch durch andere Substanzen wie dem CXCR2-Rezeptorantagonist SB225002 erreicht werden kann (37).

Ein wichtiger Aspekt, der in dem Versuchsaufbau noch nicht berücksichtigt wurde, ist der Einsatz der Radiotherapie wie sie standardmäßig nach Stupp in der Klinik angewandt wird (2.1.1). Bisher gab es kein etabliertes Bestrahlungsmodell für intrakranielle Tumoren der Maus an unserem Institut. Dieses wurde von unserer Arbeitsgruppe in dem letzten Jahr etabliert und im Juli 2021 publiziert (138). Grundlage ist ein stereotaktisches Radiochirurgieverfahren mittels CyberKnife System, das unter Schonung des umliegenden Gewebes Tumore mit einer hohen Präzision bestrahlt (138). Die Integration der Radiotherapie in den kombinatorischen Therapieansatz ist nicht nur zur Verbesserung der TMZ-Wirksamkeit notwendig, sondern auch interessant, da für SB225002 ein radiosensitivierender Effekt beschrieben wurde (8, 139). Der radiosensitivierende Effekt wurde an subkutan implantierten Nasopharynxkarzinomen in einem Xenograft-Mausmodell beobachtet, sodass die Wirkung erst für das GBM überprüft werden müsste (139). Durch CXCR2-Antagonisierung mit SB225002 ließe sich dann nicht nur die TMZ-Wirksamkeit verbessern und die Resistenzentwicklung verzögern, sondern auch ein synergistischer Effekt in Kombination mit der Radiotherapie erzeugen. Ein letzter aussichtsreicher Aspekt sind CXCR2-Antagonisten, die sich bereits für andere Erkrankungen in klinischen Phase II und Phase III Studien befinden (50, 133). Wenn sich der Vorteil der zusätzlichen CXCR2-Rezeptorblockade in weiteren Studien bestätigt, könnte so die Übertragbarkeit der CXCR2-Antagonisten auf das GBM überprüft und der Transfer in die Klinik beschleunigt werden. Patienten*innen könnten so zügig neue Therapiemöglichkeiten eröffnet und zugänglich gemacht werden.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Aus der Gesamtinterpretation der erhobenen Daten lässt sich schlussfolgern, dass die Kombinationstherapie eine gute Verträglichkeit zeigte und innerhalb einer Behandlungsdauer von sieben Tagen zu einem additiven Effekt durch die zusätzliche Blockierung des CXCR2-Rezeptors bei TMZ-Therapie führte. Auch wenn der reduzierende Effekt der Kombinationstherapie auf die Tumorgroße im Vergleich zur TMZ-Monotherapie nicht signifikant war, spricht die homogene Verteilung und die geringe Standardabweichung der Einzelwerte in dieser Gruppe sowie die beobachteten histologischen Effekte für eine Überlegenheit gegenüber den jeweiligen Monotherapien. Die Forschungsziele dieser Arbeit lassen sich abschließend wie folgt beantworten:

- 1) Die systemische Applikation des CXCR2-Antagonisten SB225002 war in unserem experimentellen Modell der intrathekalen Applikation unterlegen, da sie keine vergleichbare Wirkung in Bezug auf die antitumoralen Effekte zeigte.**
- 2) Die zusätzliche Blockade des CXCL8/CXCL2/CXCR2-Signalwegs mit dem CXCR2-Antagonisten SB225002 bei TMZ-Therapie führte innerhalb des beobachteten Zeitraums zu einer verstärkten antitumoralen Antwort, deren Wirksamkeit im Vergleich zur TMZ-Monotherapie geringgradig überlegen war und in weiteren Versuchen mit längerem Beobachtungszeitraum verifiziert werden muss.**

7 Literaturverzeichnis

1. Ostrom QT, Gittleman H, Truitt G, Boscia A, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011–2015. *Neuro-Oncology*. 2018;20(suppl_4):iv1-iv86.
2. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*. 2016;131(6):803-20.
3. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 2007;114(2):97-109.
4. Molinaro AM, Taylor JW, Wiencke JK, Wrensch MR. Genetic and molecular epidemiology of adult diffuse glioma. *Nature Reviews Neurology*. 2019;15(7):405-17.
5. Wirsching HG, Galanis E, Weller M. Glioblastoma. *Handbook of clinical neurology*. 2016;134:381-97.
6. Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Vecchione-Koval T, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010-2014. *Neuro Oncol*. 2017;19(suppl_5):v1-v88.
7. Tamimi AF, Juweid M. *Epidemiology and Outcome of Glioblastoma*. Codon Publications; 2017. p. 143-53.
8. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England journal of medicine*. 2005;352(10):987-96.
9. Weller M, Butowski N, Tran DD, Recht LD, Lim M, Hirte H, Ashby L, Mechtler L, Goldlust SA, Iwamoto F, Drappatz J, O'Rourke DM, Wong M, Hamilton MG, Finocchiaro G, Perry J, Wick W, Green J, He Y, Turner CD, Yellin MJ, Keler T, Davis TA, Stupp R, Sampson JH. Rindopepimut with temozolomide for patients with newly diagnosed, EGFRvIII-expressing glioblastoma (ACT IV): a randomised, double-blind, international phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2017;18(10):1373-85.
10. Stupp R, Taillibert S, Kanner AA, Kesari S, Steinberg DM, Toms SA, Taylor LP, Lieberman F, Silvani A, Fink KL, Barnett GH, Zhu JJ, Henson JW, Engelhard HH, Chen TC, Tran DD, Sroubek J, Tran ND, Hottinger AF, Landolfi J, Desai R, Caroli M, Kew Y, Honnorat J, Idbaih A, Kirson ED, Weinberg U, Palti Y, Hegi ME, Ram Z. Maintenance Therapy With Tumor-Treating Fields Plus Temozolomide vs Temozolomide Alone for Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *Jama*. 2015;314(23):2535-43.
11. Stupp R, Taillibert S, Kanner A, Read W, Steinberg D, Lhermitte B, Toms S, Idbaih A, Ahluwalia MS, Fink K, Di Meo F, Lieberman F, Zhu JJ, Stragliotto G, Tran D, Brem S, Hottinger A, Kirson ED, Lavy-Shahaf G, Weinberg U, Kim CY, Paek SH, Nicholas G, Bruna J, Hirte H, Weller M, Palti Y, Hegi ME, Ram Z. Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *Jama*. 2017;318(23):2306-16.
12. Fischer I, Gagner JP, Law M, Newcomb EW, Zagzag D. Angiogenesis in gliomas: biology and molecular pathophysiology. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*. 2005;15(4):297-310.

13. Wippold FJ, 2nd, Lammle M, Anatelli F, Lennerz J, Perry A. Neuropathology for the neuroradiologist: palisades and pseudopalisades. *AJNR American journal of neuroradiology*. 2006;27(10):2037-41.
14. Vleeschouwer SD, Bergers G. Glioblastoma: To Target the Tumor Cell or the Microenvironment? : Codon Publications; 2017. p. 315-40.
15. Brown TJ, Brennan MC, Li M, Church EW, Brandmeir NJ, Rakszawski KL, Patel AS, Rizk EB, Suki D, Sawaya R, Glantz M. Association of the Extent of Resection With Survival in Glioblastoma. *JAMA Oncology*. 2016;2(11):1460.
16. Jackson C, Choi J, Khalafallah AM, Price C, Bettgowda C, Lim M, Gallia G, Weingart J, Brem H, Mukherjee D. A systematic review and meta-analysis of supratotal versus gross total resection for glioblastoma. *Journal of Neuro-Oncology*. 2020;148(3):419-31.
17. Aldape K, Brindle KM, Chesler L, Chopra R, Gajjar A, Gilbert MR, Gottardo N, Gutmann DH, Hargrave D, Holland EC, Jones DTW, Joyce JA, Kearns P, Kieran MW, Mellinghoff IK, Merchant M, Pfister SM, Pollard SM, Ramaswamy V, Rich JN, Robinson GW, Rowitch DH, Sampson JH, Taylor MD, Workman P, Gilbertson RJ. Challenges to curing primary brain tumours. *Nature reviews Clinical oncology*. 2019;16(8):509-20.
18. Noch EK, Ramakrishna R, Magge R. Challenges in the Treatment of Glioblastoma: Multisystem Mechanisms of Therapeutic Resistance. *World Neurosurg*. 2018;116:505-17.
19. Perrin SL, Samuel MS, Koszyca B, Brown MP, Ebert LM, Oksdath M, Gomez GA. Glioblastoma heterogeneity and the tumour microenvironment: implications for preclinical research and development of new treatments. *Biochemical Society transactions*. 2019;47(2):625-38.
20. Ramos AD, Magge RS, Ramakrishna R. Molecular Pathogenesis and Emerging Treatment for Glioblastoma. *World Neurosurg*. 2018;116:495-504.
21. Puduvalli VK, Chaudhary R, McClugage SG, Markert J. Beyond Alkylating Agents for Gliomas: Quo Vadimus? 2017(37):175-86.
22. van Tellingen O, Yetkin-Arik B, de Gooijer MC, Wesseling P, Wurdinger T, de Vries HE. Overcoming the blood-brain tumor barrier for effective glioblastoma treatment. *Drug Resist Updat*. 2015;19:1-12.
23. Anthony C, Mladkova-Suchy N, Adamson DC. The evolving role of antiangiogenic therapies in glioblastoma multiforme: current clinical significance and future potential. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2019;28(9):787-97.
24. Marenco-Hillebrand L, Wijesekera O, Suarez-Meade P, Mampre D, Jackson C, Peterson J, Trifiletti D, Hammack J, Ortiz K, Lesser E, Spiegel M, Prevatt C, Hawayek M, Quinones-Hinojosa A, Chaichana KL. Trends in glioblastoma: outcomes over time and type of intervention: a systematic evidence based analysis. *J Neurooncol*. 2020.
25. Lassman AB, Joanta-Gomez AE, Pan PC, Wick W. Current usage of tumor treating fields for glioblastoma. *Neuro-Oncology Advances*. 2020;2(1).
26. Fernandes C, Costa A, Osório L, Lago RC, Linhares P, Carvalho B, Caeiro C. Current Standards of Care in Glioblastoma Therapy. Codon Publications; 2017. p. 197-241.
27. Li Y, Ali S, Clarke J, Cha S. Bevacizumab in Recurrent Glioma: Patterns of Treatment Failure and Implications. *Brain Tumor Research and Treatment*. 2017;5(1):1.
28. Weenink B, French PJ, Sillevs Smitt PAE, Debets R, Geurts M. Immunotherapy in Glioblastoma: Current Shortcomings and Future Perspectives. *Cancers*. 2020;12(3).
29. Razavi S-M, Lee KE, Jin BE, Aujla PS, Gholamin S, Li G. Immune Evasion Strategies of Glioblastoma. 2016;3(11).

30. Mende AL, Schulte JD, Okada H, Clarke JL. Current Advances in Immunotherapy for Glioblastoma. *Current Oncology Reports*. 2021;23(2).
31. Lim M, Xia Y, Bettgowda C, Weller M. Current state of immunotherapy for glioblastoma. *Nature reviews Clinical oncology*. 2018;15(7):422-42.
32. Chaul-Barbosa C, Marques DF. How We Treat Recurrent Glioblastoma Today and Current Evidence. *Current Oncology Reports*. 2019;21(10).
33. Osuka S, Van Meir EG. Overcoming therapeutic resistance in glioblastoma: the way forward. *J Clin Invest*. 2017;127(2):415-26.
34. Stepanenko AA, Andreieva SV, Korets KV, Mykytenko DO, Baklaushev VP, Huleyuk NL, Kovalova OA, Kotsarenko KV, Chekhonin VP, Vassetzky YS, Avdieiev SS, Dmitrenko VV. Temozolomide promotes genomic and phenotypic changes in glioblastoma cells. *Cancer Cell Int*. 2016;16:36.
35. Jiapaer S, Furuta T, Tanaka S, Kitabayashi T, Nakada M. Potential Strategies Overcoming the Temozolomide Resistance for Glioblastoma. *Neurologia medico-chirurgica*. 2018;58(10):405-21.
36. Fidoamore A, Cristiano L, Antonosante A, d'Angelo M, Di Giacomo E, Astarita C, Giordano A, Ippoliti R, Benedetti E, Cimini A. Glioblastoma Stem Cells Microenvironment: The Paracrine Roles of the Niche in Drug and Radioresistance. *Stem Cells Int*. 2016;2016:6809105.
37. Hasan T, Caragher SP, Shireman JM, Park CH, Atashi F, Baisiwala S, Lee G, Guo D, Wang JY, Dey M, Wu M, Lesniak MS, Horbinski CM, James CD, Ahmed AU. Interleukin-8/CXCR2 signaling regulates therapy-induced plasticity and enhances tumorigenicity in glioblastoma. *Cell Death Dis*. 2019;10(4):292.
38. Bruyere C, Mijatovic T, Lonez C, Spiegl-Kreinecker S, Berger W, Kast RE, Ruyschaert JM, Kiss R, Lefranc F. Temozolomide-induced modification of the CXC chemokine network in experimental gliomas. *International journal of oncology*. 2011;38(5):1453-64.
39. Hughes CE, Nibbs RJB. A guide to chemokines and their receptors. *The FEBS journal*. 2018;285(16):2944-71.
40. Hol J, Wilhelmsen L, Haraldsen G. The murine IL-8 homologues KC, MIP-2, and LIX are found in endothelial cytoplasmic granules but not in Weibel-Palade bodies. *Journal of leukocyte biology*. 2010;87(3):501-8.
41. Charles NA, Holland EC, Gilbertson R, Glass R, Kettenmann H. The brain tumor microenvironment. *Glia*. 2011;59(8):1169-80.
42. Yeung YT, McDonald KL, Grewal T, Munoz L. Interleukins in glioblastoma pathophysiology: implications for therapy. *British journal of pharmacology*. 2013;168(3):591-606.
43. Urbantat RM, Vajkoczy P, Brandenburg S. Advances in Chemokine Signaling Pathways as Therapeutic Targets in Glioblastoma. *Cancers*. 2021;13(12):2983.
44. Nagarsheth N, Wicha MS, Zou W. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nature reviews Immunology*. 2017;17(9):559-72.
45. Lazennec G, Richmond A. Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. *Trends Mol Med*. 2010;16(3):133-44.
46. Groblewska M, Litman-Zawadzka A, Mroczko B. The Role of Selected Chemokines and Their Receptors in the Development of Gliomas. *Int J Mol Sci*. 2020;21(10).
47. Marcuzzi E, Angioni R, Molon B, Cali B. Chemokines and Chemokine Receptors: Orchestrating Tumor Metastasis. *Int J Mol Sci*. 2018;20(1).

48. Lacalle RA, Blanco R, Carmona-Rodríguez L, Martín-Leal A, Mira E, Mañes S. Chemokine Receptor Signaling and the Hallmarks of Cancer. *International Review of Cell and Molecular Biology* 2017. p. 181-244.
49. Brat DJ, Bellail AC, Van Meir EG. The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro Oncol.* 2005;7(2):122-33.
50. Cheng Y, Ma XL, Wei YQ, Wei XW. Potential roles and targeted therapy of the CXCLs/CXCR2 axis in cancer and inflammatory diseases. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2019;1871(2):289-312.
51. Alfaro C, Sanmamed MF, Rodriguez-Ruiz ME, Teixeira A, Onate C, Gonzalez A, Ponz M, Schalper KA, Perez-Gracia JL, Melero I. Interleukin-8 in cancer pathogenesis, treatment and follow-up. *Cancer treatment reviews.* 2017;60:24-31.
52. Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, Kracht M. Multiple control of interleukin-8 gene expression. *Journal of leukocyte biology.* 2002;72(5):847-55.
53. Sharma I, Singh A, Sharma K, Saxena S. Gene Expression Profiling of Chemokines and Their Receptors in Low and High Grade Astrocytoma. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017;18(5):1307-13.
54. Urbantat RM, Blank A, Kremenetskaia I, Vajkoczy P, Acker G, Brandenburg S. The CXCL2/IL8/CXCR2 Pathway Is Relevant for Brain Tumor Malignancy and Endothelial Cell Function. *Int J Mol Sci.* 2021;22(5).
55. Sharma I, Singh A, Siraj F, Saxena S. IL-8/CXCR1/2 signalling promotes tumor cell proliferation, invasion and vascular mimicry in glioblastoma. *Journal of biomedical science.* 2018;25(1):62.
56. Chen Z, Mou L, Pan Y, Feng C, Zhang J, Li J. CXCL8 Promotes Glioma Progression By Activating The JAK/STAT1/HIF-1alpha/Snail Signaling Axis. *Onco Targets Ther.* 2019;12:8125-38.
57. Yang L, Liu Z, Wu R, Yao Q, Gu Z, Liu M. Correlation of C-X-C chemokine receptor 2 upregulation with poor prognosis and recurrence in human glioma. *Onco Targets Ther.* 2015;8:3203-9.
58. Korkolopoulou P, Levidou G, El-Habr EA, Adamopoulos C, Samaras V, Zisakis A, Kavantzias N, Boviatsis E, Fragkou P, Papavassiliou AG, Patsouris E, Piperi C. Expression of interleukin-8 receptor CXCR2 and suppressor of cytokine signaling-3 in astrocytic tumors. *Mol Med.* 2012;18:379-88.
59. Angara K, Borin TF, Rashid MH, Lebedyeva I, Ara R, Lin PC, Iskander A, Bollag RJ, Achyut BR, Arbab AS. CXCR2-Expressing Tumor Cells Drive Vascular Mimicry in Antiangiogenic Therapy-Resistant Glioblastoma. *Neoplasia.* 2018;20(10):1070-82.
60. Yamanaka R, Tanaka R, Saitoh T, Okoshi S. Cytokine gene expression on glioma cell lines and specimens. *J Neurooncol.* 1994;21(3):243-7.
61. Hong TM, Teng LJ, Shun CT, Peng MC, Tsai JC. Induced interleukin-8 expression in gliomas by tumor-associated macrophages. *J Neurooncol.* 2009;93(3):289-301.
62. Brandenburg S, Muller A, Turkowski K, Radev YT, Rot S, Schmidt C, Bungert AD, Acker G, Schorr A, Hippe A, Miller K, Heppner FL, Homey B, Vajkoczy P. Resident microglia rather than peripheral macrophages promote vascularization in brain tumors and are source of alternative pro-angiogenic factors. *Acta Neuropathol.* 2016;131(3):365-78.
63. Watters JJ, Schartner JM, Badie B. Microglia function in brain tumors. *J Neurosci Res.* 2005;81(3):447-55.
64. Strepkos D, Markouli M, Klonou A, Piperi C, Papavassiliou AG. Insights in the immunobiology of glioblastoma. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany).* 2020;98(1):1-10.

65. Roesch S, Rapp C, Dettling S, Herold-Mende C. When Immune Cells Turn Bad-Tumor-Associated Microglia/Macrophages in Glioma. *Int J Mol Sci.* 2018;19(2).
66. Matias D, Balca-Silva J, da Graca GC, Wanjiru CM, Macharia LW, Nascimento CP, Roque NR, Coelho-Aguiar JM, Pereira CM, Dos Santos MF, Pessoa LS, Lima FRS, Schanaider A, Ferrer VP, Moura-Neto V. Microglia/Astrocytes-Glioblastoma Crosstalk: Crucial Molecular Mechanisms and Microenvironmental Factors. *Front Cell Neurosci.* 2018;12:235.
67. Muller A, Brandenburg S, Turkowski K, Muller S, Vajkoczy P. Resident microglia, and not peripheral macrophages, are the main source of brain tumor mononuclear cells. *Int J Cancer.* 2015;137(2):278-88.
68. Sorensen MD, Dahlrot RH, Boldt HB, Hansen S, Kristensen BW. Tumour-associated microglia/macrophages predict poor prognosis in high-grade gliomas and correlate with an aggressive tumour subtype. *Neuropathology and applied neurobiology.* 2018;44(2):185-206.
69. Yi L, Xiao H, Xu M, Ye X, Hu J, Li F, Li M, Luo C, Yu S, Bian X, Feng H. Glioma-initiating cells: a predominant role in microglia/macrophages tropism to glioma. *J Neuroimmunol.* 2011;232(1-2):75-82.
70. Liu Q, Li A, Tian Y, Wu JD, Liu Y, Li T, Chen Y, Han X, Wu K. The CXCL8-CXCR1/2 pathways in cancer. *Cytokine & growth factor reviews.* 2016;31:61-71.
71. Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14(21):6735-41.
72. Infanger DW, Cho Y, Lopez BS, Mohanan S, Liu SC, Gursel D, Boockvar JA, Fischbach C. Glioblastoma stem cells are regulated by interleukin-8 signaling in a tumoral perivascular niche. *Cancer research.* 2013;73(23):7079-89.
73. Dwyer J, Hebda JK, Le Guelte A, Galan-Moya EM, Smith SS, Azzi S, Bidere N, Gavard J. Glioblastoma cell-secreted interleukin-8 induces brain endothelial cell permeability via CXCR2. *PLoS One.* 2012;7(9):e45562.
74. Wang SY, Ke YQ, Lu GH, Song ZH, Yu L, Xiao S, Sun XL, Jiang XD, Yang ZL, Hu CC. Vasculogenic mimicry is a prognostic factor for postoperative survival in patients with glioblastoma. *J Neurooncol.* 2013;112(3):339-45.
75. Viallard C, Larrivee B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis.* 2017;20(4):409-26.
76. Liu XM, Zhang QP, Mu YG, Zhang XH, Sai K, Pang JC, Ng HK, Chen ZP. Clinical significance of vasculogenic mimicry in human gliomas. *J Neurooncol.* 2011;105(2):173-9.
77. Ahn SH, Park H, Ahn YH, Kim S, Cho MS, Kang JL, Choi YH. Necrotic cells influence migration and invasion of glioblastoma via NF-kappaB/AP-1-mediated IL-8 regulation. *Sci Rep.* 2016;6:24552.
78. Ha H, Debnath B, Neamati N. Role of the CXCL8-CXCR1/2 Axis in Cancer and Inflammatory Diseases. *Theranostics.* 2017;7(6):1543-88.
79. Zhang X, Guo R, Kambara H, Ma F, Luo HR. The role of CXCR2 in acute inflammatory responses and its antagonists as anti-inflammatory therapeutics. *Curr Opin Hematol.* 2019;26(1):28-33.
80. Razpotnik R, Novak N, Čurin Šerbec V, Rajcevic U. Targeting Malignant Brain Tumors with Antibodies. *Frontiers in Immunology.* 2017;8.
81. Acker G, Zollfrank J, Jelgersma C, Nieminen-Kelha M, Kremenetskaia I, Mueller S, Ghorri A, Vajkoczy P, Brandenburg S. The CXCR2/CXCL2 signalling pathway - An alternative therapeutic approach in high-grade glioma. *Eur J Cancer.* 2020;126:106-15.
82. White JR, Lee JM, Young PR, Hertzberg RP, Jurewicz AJ, Chaikin MA, Widdowson K, Foley JJ, Martin LD, Griswold DE, Sarau HM. Identification of a potent,

- selective non-peptide CXCR2 antagonist that inhibits interleukin-8-induced neutrophil migration. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(17):10095-8.
83. Song HK, Hwang DY. Use of C57BL/6N mice on the variety of immunological researches. *Lab Anim Res*. 2017;33(2):119-23.
84. Kijima N, Kanemura Y. *Mouse Models of Glioblastoma*. Codon Publications; 2017. p. 131-9.
85. Czabanka M, Bruenner J, Parmaksiz G, Broggin T, Topalovic M, Bayerl SH, Auf G, Kremenetskaia I, Nieminen M, Jabouille A, Mueller S, Harms U, Harms C, Koch A, Heppner FL, Vajkoczy P. Combined temozolomide and sunitinib treatment leads to better tumour control but increased vascular resistance in O6-methylguanine methyltransferase-methylated gliomas. *Eur J Cancer*. 2013;49(9):2243-52.
86. Li LT, Jiang G, Chen Q, Zheng JN. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (Review). *Molecular Medicine Reports*. 2015;11(3):1566-72.
87. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000;182(3):311-22.
88. Boda E, Pini A, Hoxha E, Parolisi R, Tempia F. Selection of reference genes for quantitative real-time RT-PCR studies in mouse brain. *J Mol Neurosci*. 2009;37(3):238-53.
89. Tao J, Shen X, Ai Y, Han X. Tea polyphenols protect against ischemia/reperfusion-induced liver injury in mice through anti-oxidative and anti-apoptotic properties. *Exp Ther Med*. 2016;12(5):3433-9.
90. Huang Q, Xiong H, Yang H, Ou Y, Zhang Z, Chen S, Ye Y, Zheng Y. Differential Expression of Bcl-2 in the Cochlea and Auditory Cortex of a Mouse Model of Age-Related Hearing Loss. *Audiology & neuro-otology*. 2016;21(5):326-32.
91. Reutershan J. Critical role of endothelial CXCR2 in LPS-induced neutrophil migration into the lung. *Journal of Clinical Investigation*. 2006;116(3):695-702.
92. Fan X, Patera AC, Pong-Kennedy A, Deno G, Gonsiorek W, Manfra DJ, Vassileva G, Zeng M, Jackson C, Sullivan L, Sharif-Rodriguez W, Opdenakker G, Van Damme J, Hedrick JA, Lundell D, Lira SA, Hipkin RW. Murine CXCR1 Is a Functional Receptor for GCP-2/CXCL6 and Interleukin-8/CXCL8. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(16):11658-66.
93. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
94. de Vasconcellos JF, Laranjeira AB, Leal PC, Bhasin MK, Zenatti PP, Nunes RJ, Yunes RA, Nowill AE, Libermann TA, Zerbini LF, Yunes JA. SB225002 Induces Cell Death and Cell Cycle Arrest in Acute Lymphoblastic Leukemia Cells through the Activation of GLIPR1. *PLoS One*. 2015;10(8):e0134783.
95. Sueoka H, Hirano T, Uda Y, Iimuro Y, Yamanaka J, Fujimoto J. Blockage of CXCR2 suppresses tumor growth of intrahepatic cholangiocellular carcinoma. *Surgery*. 2014;155(4):640-9.
96. Jo MY, Kim YG, Kim Y, Lee SJ, Kim MH, Joo KM, Kim HH, Nam DH. Combined therapy of temozolomide and ZD6474 (vandetanib) effectively reduces glioblastoma tumor volume through anti-angiogenic and anti-proliferative mechanisms. *Mol Med Rep*. 2012;6(1):88-92.
97. Shi L, Sun G. DMC is not better than TMZ on intracranial anti-glioma effects. *J Cell Biochem*. 2018.
98. Holdenrieder S, Stieber P. Apoptotic markers in cancer. *Clin Biochem*. 2004;37(7):605-17.
99. Kuriyama H, Lamborn KR, O'Fallon JR, Iturria N, Sebo T, Schaefer PL, Scheithauer BW, Buckner JC, Kuriyama N, Jenkins RB, Israel MA. Prognostic

- significance of an apoptotic index and apoptosis/proliferation ratio for patients with high-grade astrocytomas. *Neuro-Oncology*. 2002;4(3):179-86.
100. Goda AE, Koyama M, Sowa Y, Elokely KM, Yoshida T, Kim BY, Sakai T. Molecular mechanisms of the antitumor activity of SB225002: a novel microtubule inhibitor. *Biochemical pharmacology*. 2013;85(12):1741-52.
101. Grepin R, Guyot M, Giuliano S, Boncompagni M, Ambrosetti D, Chamorey E, Scoazec JY, Negrier S, Simonnet H, Pages G. The CXCL7/CXCR1/2 Axis Is a Key Driver in the Growth of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancer research*. 2014;74(3):873-83.
102. Du M, Qiu Q, Gruslin A, Gordon J, He M, Chan CC, Li D, Tsang BK. SB225002 Promotes Mitotic Catastrophe in Chemo-Sensitive and -Resistant Ovarian Cancer Cells Independent of p53 Status In Vitro. *PLoS ONE*. 2013;8(1):e54572.
103. Roos WP, Batista LFZ, Naumann SC, Wick W, Weller M, Menck CFM, Kaina B. Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine. *Oncogene*. 2007;26(2):186-97.
104. Kim JT, Kim JS, Ko KW, Kong DS, Kang CM, Kim MH, Son MJ, Song HS, Shin HJ, Lee DS, Eoh W, Nam DH. Metronomic treatment of temozolomide inhibits tumor cell growth through reduction of angiogenesis and augmentation of apoptosis in orthotopic models of gliomas. *Oncology reports*. 2006;16(1):33-9.
105. Sur P, Sribnick EA, Patel SJ, Ray SK, Banik NL. Dexamethasone decreases temozolomide-induced apoptosis in human glioblastoma T98G cells. *Glia*. 2005;50(2):160-7.
106. Oltval ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 1993;74(4):609-19.
107. Wu F, Zhao Y, Jiao T, Shi D, Zhu X, Zhang M, Shi M, Zhou H. CXCR2 is essential for cerebral endothelial activation and leukocyte recruitment during neuroinflammation. *J Neuroinflammation*. 2015;12:98.
108. Riva M, Wouters R, Sterpin E, Giovannoni R, Boon L, Himmelreich U, Gsell W, Van Ranst M, Coosemans A. Radiotherapy, Temozolomide, and Antiprogrammed Cell Death Protein 1 Treatments Modulate the Immune Microenvironment in Experimental High-Grade Glioma. *Neurosurgery*. 2020.
109. Ahir BK, Engelhard HH, Lakka SS. Tumor Development and Angiogenesis in Adult Brain Tumor: Glioblastoma. *Molecular Neurobiology*. 2020;57(5):2461-78.
110. Devarasetty M, Forsythe SD, Shelkey E, Soker S. In Vitro Modeling of the Tumor Microenvironment in Tumor Organoids. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2020;17(6):759-71.
111. Szatmari T, Lumniczky K, Desaknai S, Trajcevski S, Hidvegi EJ, Hamada H, Safrany G. Detailed characterization of the mouse glioma 261 tumor model for experimental glioblastoma therapy. *Cancer science*. 2006;97(6):546-53.
112. Oh T, Fakurnejad S, Sayegh ET, Clark AJ, Ivan ME, Sun MZ, Safaee M, Bloch O, James CD, Parsa AT. Immunocompetent murine models for the study of glioblastoma immunotherapy. *J Transl Med*. 2014;12:107.
113. Catusse J, Liotard A, Loillier B, Pruneau D, Paquet J-L. Characterization of the molecular interactions of interleukin-8 (CXCL8), growth related oncogen α (CXCL1) and a non-peptide antagonist (SB 225002) with the human CXCR2. *Biochemical pharmacology*. 2003;65(5):813-21.
114. Xu T, Yu X, Wang T, Liu Y, Liu X, Ou S, Chen Y. The effect of CXCR2 inhibition on seizure activity in the pilocarpine epilepsy mouse model. *Brain Res Bull*. 2017;134:91-8.

115. Herz J, Sabellek P, Lane TE, Gunzer M, Hermann DM, Doeppner TR. Role of Neutrophils in Exacerbation of Brain Injury After Focal Cerebral Ischemia in Hyperlipidemic Mice. *Stroke*. 2015;46(10):2916-25.
116. De Vries NA, Beijnen JH, Boogerd W, Van Tellingen O. Blood–brain barrier and chemotherapeutic treatment of brain tumors. *Expert Review of Neurotherapeutics*. 2006;6(8):1199-209.
117. Pardridge WM. Drug Transport across the Blood–Brain Barrier. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2012;32(11):1959-72.
118. Ghosh D, Nandi S, Bhattacharjee S. Combination therapy to checkmate Glioblastoma: clinical challenges and advances. *Clinical and Translational Medicine*. 2018;7(1):33.
119. Grossman R, Brastianos H, Blakeley JO, Mangraviti A, Lal B, Zadnik P, Hwang L, Wicks RT, Goodwin RC, Brem H, Tyler B. Combination of anti-VEGF therapy and temozolomide in two experimental human glioma models. *Journal of Neuro-Oncology*. 2014;116(1):59-65.
120. Wang H, Cai S, Bailey BJ, Reza Saadatzadeh M, Ding J, Tonsing-Carter E, Georgiadis TM, Zachary Gunter T, Long EC, Minto RE, Gordon KR, Sen SE, Cai W, Eitel JA, Waning DL, Bringman LR, Wells CD, Murray ME, Sarkaria JN, Gelbert LM, Jones DR, Cohen-Gadol AA, Mayo LD, Shannon HE, Pollok KE. Combination therapy in a xenograft model of glioblastoma: enhancement of the antitumor activity of temozolomide by an MDM2 antagonist. *J Neurosurg*. 2017;126(2):446-59.
121. Delgado-Goni T, Julia-Sape M, Candiota AP, Pumarola M, Arus C. Molecular imaging coupled to pattern recognition distinguishes response to temozolomide in preclinical glioblastoma. *NMR Biomed*. 2014;27(11):1333-45.
122. D'Alessandro G, Grimaldi A, Chece G, Porzia A, Esposito V, Santoro A, Salvati M, Mainiero F, Ragozzino D, Di Angelantonio S, Wulff H, Catalano M, Limatola C. KCa3.1 channel inhibition sensitizes malignant gliomas to temozolomide treatment. *Oncotarget*. 2016;7(21):30781-96.
123. Grépin R, Guyot M, Giuliano S, Boncompagni M, Ambrosetti D, Chamorey E, Scoazec J-Y, Negrier S, Simonnet H, Pagès G. The CXCL7/CXCR1/2 Axis Is a Key Driver in the Growth of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancer research*. 2014;74(3):873-83.
124. Hombach-Klonisch S, Mehrpour M, Shojaei S, Harlos C, Pitz M, Hamai A, Siemianowicz K, Likus W, Wiechec E, Toyota BD, Hoshyar R, Seyfoori A, Sepehri Z, Ande SR, Khadem F, Akbari M, Gorman AM, Samali A, Klonisch T, Ghavami S. Glioblastoma and chemoresistance to alkylating agents: Involvement of apoptosis, autophagy, and unfolded protein response. *Pharmacol Ther*. 2017.
125. Mathieu V, De Neve N, Le Mercier M, Dewelle J, Gaussin JF, Dehoux M, Kiss R, Lefranc F. Combining bevacizumab with temozolomide increases the antitumor efficacy of temozolomide in a human glioblastoma orthotopic xenograft model. *Neoplasia*. 2008;10(12):1383-92.
126. Park JS, Kim IK, Han S, Park I, Kim C, Bae J, Oh SJ, Lee S, Kim JH, Woo DC, He Y, Augustin HG, Kim I, Lee D, Koh GY. Normalization of Tumor Vessels by Tie2 Activation and Ang2 Inhibition Enhances Drug Delivery and Produces a Favorable Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*. 2016;30(6):953-67.
127. Mathivet T, Bouleti C, Van Woensel M, Stanchi F, Verschuere T, Phng LK, Dejaegher J, Balcer M, Matsumoto K, Georgieva PB, Belmans J, Sciort R, Stockmann C, Mazzone M, De Vleeschouwer S, Gerhardt H. Dynamic stroma reorganization drives blood vessel dysmorphia during glioma growth. *EMBO Mol Med*. 2017;9(12):1629-45.
128. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science (New York, NY)*. 2005;307(5706):58-62.

129. Bettinger I, Thanos S, Paulus W. Microglia promote glioma migration. *Acta Neuropathologica*. 2002;103(4):351-5.
130. De Leo A, Ugolini A, Veglia F. Myeloid Cells in Glioblastoma Microenvironment. *Cells*. 2020;10(1):18.
131. Brait VH, Rivera J, Broughton BR, Lee S, Drummond GR, Sobey CG. Chemokine-related gene expression in the brain following ischemic stroke: no role for CXCR2 in outcome. *Brain Res*. 2011;1372:169-79.
132. Lu H, Yang T, Xu Z, Lin X, Ding Q, Zhang Y, Cai X, Dong K, Gong S, Zhang W, Patel M, Copley RCB, Xiang J, Guan X, Wren P, Ren F. Discovery of Novel 1-Cyclopentenyl-3-phenylureas as Selective, Brain Penetrant, and Orally Bioavailable CXCR2 Antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2018;61(6):2518-32.
133. Che J, Wang Z, Sheng H, Huang F, Dong X, Hu Y, Xie X, Hu Y. Ligand-based pharmacophore model for the discovery of novel CXCR2 antagonists as anti-cancer metastatic agents. *R Soc Open Sci*. 2018;5(7):180176.
134. Czabanka M, Parmaksiz G, Bayerl SH, Nieminen M, Trachsel E, Menssen HD, Erber R, Neri D, Vajkoczy P. Microvascular biodistribution of L19-SIP in angiogenesis targeting strategies. *Eur J Cancer*. 2011;47(8):1276-84.
135. Acker G, Palumbo A, Neri D, Vajkoczy P, Czabanka M. F8-SIP mediated targeted photodynamic therapy leads to microvascular dysfunction and reduced glioma growth. *Journal of Neuro-Oncology*. 2016;129(1):33-8.
136. Weiss T, Schneider H, Silginer M, Steinle A, Pruschy M, Polic B, Weller M, Roth P. NKG2D-Dependent Antitumor Effects of Chemotherapy and Radiotherapy against Glioblastoma. *Clin Cancer Res*. 2018;24(4):882-95.
137. Kumari S, Ahsan SM, Kumar JM, Kondapi AK, Rao NM. Overcoming blood brain barrier with a dual purpose Temozolomide loaded Lactoferrin nanoparticles for combating glioma (SERP-17-12433). *Sci Rep*. 2017;7(1):6602.
138. Jelgersma C, Senger C, Kluge AK, Janas A, Nieminen-Kelhä M, Kremenetskaia I, Mueller S, Brandenburg S, Loebel F, Tinhofer I, Conti A, Budach V, Vajkoczy P, Acker G. Establishment and Validation of CyberKnife Irradiation in a Syngeneic Glioblastoma Mouse Model. *Cancers*. 2021;13(14):3416.
139. Liu X, Lan T, Mo F, Yang J, Wei Y, Wei X. Antitumor and Radiosensitization Effects of a CXCR2 Inhibitor in Nasopharyngeal Carcinoma. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:689613.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Claudius Jelgersma, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Blockierung des CXCL2/CXCR2-Signalwegs bei gleichzeitiger Temozolomid-Therapie als kombinierter Therapieansatz im Glioblastoma multiforme“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

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

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

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

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

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Claudius Jelgersma hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

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

Beitrag im Einzelnen: Praktische Durchführung der Tierversuche, Aufarbeitung der Proben und Auswertung der Ergebnisse die sich auf die systemische Applikation von SB225002 beziehen.

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

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Originalarbeiten

Jelgersma C, Senger C, Kluge AK, Janas A, Nieminen-Kelhä M, Kremenetskaia I, Mueller S, Brandenburg S, Loebel F, Tinhofer I, Conti A, Budach V, Vajkoczy P, Acker G. Establishment and Validation of CyberKnife Irradiation in a Syngeneic Glioblastoma Mouse Model. *Cancers*. 2021;13(14):3416. <https://doi.org/10.3390/cancers13143416>

Jelgersma C, Vajkoczy P. How to Target Spinal Metastasis in Experimental Research: An Overview of Currently Used Experimental Mouse Models and Future Prospects. *Int J Mol Sci* **2021**, 22, doi:10.3390/ijms22115420.

Acker G, Zollfrank J, **Jelgersma C**, Nieminen-Kelha M, Kremenetskaia I, Mueller S, Ghori A, Vajkoczy P, Brandenburg S. The CXCR2/CXCL2 signalling pathway - An alternative therapeutic approach in high-grade glioma. *Eur J Cancer*. **2020**; 126:106-15. doi:10.1016/j.ejca.2019.12.005

Acker G, Meinert F, Conti A, Kufeld M, **Jelgersma C**, Nguyen P, Kluge A, Lukas M, Loebel F, Pasemann D, Kaul D, Budach V, Vajkoczy P, Senger C. Guided Robotic Radiosurgery for Treatment of Recurrent Grade II and III Meningiomas. A Single-Center Study. *World Neurosurg* **2019**, 131, e96-e107, doi:10.1016/j.wneu.2019.07.058.

Acker G, Kluge A, Lukas M, Conti A, Pasemann D, Meinert F, Anh Nguyen P. T, **Jelgersma C**, Loebel F, Budach V, Vajkoczy P, Furth C, Baur A. D. J, Senger C. Impact of 68Ga-DOTATOC PET/MRI on robotic radiosurgery treatment planning in meningioma patients: first experiences in a single institution. *Neurosurg Focus*, 46(6), E9. doi:10.3171/2019.3.Focus1925

Wissenschaftliche Beiträge

C. Jelgersma, C. Senger, A. Janas, A. Kluge, S. Brandenburg, M. Nieminen-Kelhä, I. Kremenetskaia, F. Löbel, V. Budach, P. Vajkoczy, G. Acker. „Technical establishment and validation of Cyberknife stereotactic radiosurgery on syngeneic Glioblastoma mouse model and analysis of early radiobiological effects“. 72. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie 2021. Vortrag 07.06.2021

C. Jelgersma, J. Zollfrank, S. Brandenburg, P. Vajkoczy, G. Acker. „Blockierung des CXCL2/CXCR2 Signalwegs bei gleichzeitiger Temozolomid Therapie als kombinierter Therapieansatz im Glioblastoma multiforme“. Jahrestagung Sektion Neuroonkologie der DGNC 2020. Vortrag 18.10.2020

C. Jelgersma, J. Zollfrank, S. Brandenburg, P. Vajkoczy, G. Acker. „Synergistic effects of blocking the CXCL2/CXCR2 pathway in combination with Temozolomide therapy in glioblastoma multiforme as a combined therapeutic approach“. 71. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie 2020. Poster 23.06.2020

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt an erster Stelle Frau PD Dr. med. Güliz Acker für die unvergleichbar gute Betreuung und die unermüdliche Unterstützung während der gesamten Zeit der Promotion. Darüber hinaus bedanke ich mich für den guten wissenschaftlichen Austausch, der sich bereits über die Promotion hinaus in weiteren Projekten fortgesetzt hat.

Prof. Dr. med. Vajkoczy danke ich für die Überlassung des Promotionsthemas und dem konstruktiven wissenschaftlichen Austausch während den regelmäßigen Laborsitzungen. Neben der Möglichkeit in der Klinik für Neurochirurgie zu promovieren, bedanke ich mich auch für die Möglichkeit, die Facharztausbildung dort beginnen zu dürfen und weiterhin von der wissenschaftlichen Ausbildung zu profitieren.

Ich danke Dr. rer. nat. Susan Brandenburg für die produktiven Gespräche und den wissenschaftlichen Beistand sowie für die unersetzbaren Hilfestellungen im Labor, durch die akute Probleme schnell überwunden werden konnten.

Für die Erlernung von neuen tierexperimentellen Techniken, die Unterstützung im Labor und die notwendige Versorgung mit Materialien danke ich Melina Nieminen-Kelhä, Irina Kremenetskaia und Sabine Seidlitz.

Meinen Mitstreiterinnen Ruth Urbantat und Julia Zollfrank bin ich für den niedrigschwelligen Support im Labor und die darüber hinaus entstandenen Freundschaften dankbar.

Neben der Unterstützung durch meine Familie möchte ich mich auch für die Unterstützung durch die Familie Pawlowsky/Steinberg-Pawlowsky/Steinberg bedanken, die mir den Rücken freigehalten hat und immer ein schöner Ausgleich zu der Zeit im Labor war. Ein besonderer Dank gilt Anna Pawlowsky für das entgegengebrachte Verständnis und den Verzicht, der sich aus der für das Labor aufgewendeten Zeit ergeben hat.

Abschließend danke ich Dr. med. Lisa-Maria Rosenthal für die wissenschaftlichen Unterstützung und meinen engen Freunden für den Rückhalt in der letzten Phase der Fertigstellung der Promotion.