

Melanie Schäfer

Dr. med.

**Charakterisierung von fünf Glioblastomzelllinien hinsichtlich des Einflusses einer trimodalen Therapie mit Temozolomid, Radiatio und Cetuximab auf die Zellzyklusprogression in Vitro**

Geboren am 02.02.1980 in Lauffen am Neckar

Staatsexamen am 02.12.2009 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Radioonkologie und Strahlentherapie

Doktormutter: Frau PD Dr. med. Stephanie E. Combs

Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) ist ein interessantes Target für moderne, zielgerichtete Krebstherapien. Zur Inhibition des EGFR bzw. der ihm nachgeschalteten mitogenen Signalwege stehen moderne Arzneistoffe wie der monoklonale Antikörper Cetuximab (Erbix), welcher gegen die ligandenbindende Domäne des Rezeptors gerichtet ist, zur Verfügung. Das Glioblastoma multiforme ist der häufigste primär bösartige Gehirntumor bei Erwachsenen und durch einen raschen Verlauf mit schlechter Prognose gekennzeichnet. In einer in Heidelberg durchgeführten präklinischen Studie zeigten sich an diversen Glioblastomzelllinien gute Ansprechraten der simultanen Radiochemoimmuntherapie mit dem Zytostatikum Temozolomid und dem monoklonalen Antikörper Cetuximab. Die Ergebnisse ermutigten dazu, weitere Untersuchungen zur Wirksamkeit von Cetuximab in der Behandlung des Glioblastoma multiforme durchzuführen. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss dieser trimodalen Kombinationstherapie auf die Zellzyklusprogression, insbesondere im Hinblick auf einen möglichen G2/M-Arrest an fünf verschiedenen Glioblastomzelllinien in Vitro zu untersuchen. Besonders interessant war hierbei welche Veränderungen durch den Einsatz von Cetuximab auftreten. Mittels Durchflusszytometrie wurden die Zellzykluseffekte in den Dosierungen 20  $\mu$ M und 50  $\mu$ M Temozolomid, 2 Gy und 4 Gy Radiatio, 5  $\mu$ g/ml und 15  $\mu$ g/ml Cetuximab und deren Kombinationsmöglichkeiten insgesamt an 5 verschiedenen Zeitpunkten bis maximal 72 h nach Bestrahlung beobachtet.

Der hauptsächliche Effekt von Temozolomid auf den Zellzyklus sowohl bei p53wt-Zellen als auch bei p53-defizienten Zellen beruht auf einem Arrest in der G2/M-Phase und konnte bei den Experimenten an den Zelllinien U87 und LN229 bestätigt werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Temozolomidsensitivität mit der MGMT-Aktivität der Zelllinien korreliert. Unerwarteterweise konnte bei den mit der Radiotherapie behandelten Zellen lediglich ein transienter Arrest in der G2/M-Phase beobachtet werden. Dieser Effekt könnte aber durch die im Hinblick auf die Evaluation der trimodalen Therapie gewählten niedrigen Grayzahlen bedingt gewesen sein. Es konnte bestätigt werden, dass die dem aktuellen Therapiestandard entsprechende Radiochemotherapie mit Temozolomid in den Zelllinien U87, LN18 und NCH82 überadditiv wirkte, welche sich allerdings im Gegensatz zu den Ergebnissen der Monotherapie mit Temozolomid unabhängig vom MGMT-Status der Tumorzellen präsentiert. Eine antiproliferative Therapie mit Cetuximab zeigte sowohl bei der Monotherapie als auch in Kombination mit zytotoxischen Substanzen bei keiner Zelllinie ausgeprägte Veränderungen bzw. ließ sich die Wirkung nicht über eine Akkumulation in der G2/M-Phase darstellen. Möglicherweise werden hier andere Signalpathways vorrangig aktiviert bzw. generiert sich die Wirkung über verschiedenste Interaktionen der einzelnen Pathways miteinander, welche sich nicht in einem Arrest in der G2/M-Phase niederschlagen. Entgegen den Annahmen aus der aktuellen Literatur, konnte der Einsatz von Cetuximab die Wirkungen der zytotoxischen Therapien nicht potenzieren und es stellte sich im Verlauf die Frage, ob eine durch Cetuximab bedingte Verlängerung des G2/M-Arrestes überhaupt sinnvoll ist, da die Tumorzellen dadurch möglicherweise genügend Zeit zur Reparatur ihrer durch die zytotoxische Behandlung ausgelösten DNA-Schäden gewinnen könnten. Zudem hätte o.g. Verhalten den Vorteil, dass durch die Kombination einer antiproliferativen Therapie mit einer zytotoxischen Therapie keine Gefahr besteht, die zytotoxischen Effekte, welche im Idealfall zur mitotischen Katastrophe führen, zu verringern. Durch eine trimodale Therapie konnten keine wesentlichen Unterschiede in der Zellzyklusarrestfunktion im Vergleich zu den Kombinationstherapien nachgewiesen werden. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass sich kein strikt einheitliches Reaktionsmuster für die Einzelsubstanzen bzw. Doppelkombinationen in vitro an den unterschiedlichen Tumorzelllinien finden lässt. Weiterhin sprechen die in dieser Arbeit erhobenen Befunde nicht dafür, daß die trimodale Therapie mit Temozolomid, Radiatio und Cetuximab eine wirksamere Therapieoption als die Radiochemotherapie darstellt, da leider kein signifikant additiver Effekt zu beobachten war. Im Hinblick auf die Diversität der Glioblastome ist jedoch von Vorteil, dass alle fünf Tumorzelllinien in ihrem Zellzyklusverhalten ein homogenes Ansprechen auf die Dreifachkombination zeigten, welche

entweder ein leicht besseres oder aber zumindest ein ähnlich gutes Ergebnis wie die jeweils wirkungsvollste Einzel-, bzw. Kombinationstherapie der jeweiligen Tumorzelllinie erreichte. Für eine sichere Prognose über die Wirkung der trimodalen Therapie auf Glioblastome in vivo ist dies allerdings nicht ausreichend. Um Aussagen über die mögliche Anwendung der Therapie im klinischen Alltag treffen zu können, sind noch weitere Untersuchungen notwendig.