

Thomas Schmoch
Dr. med.

Wirkung von All-trans-Retinolsäure in Kombination mit epigenetisch wirksamen Substanzen auf Glioblastomstammzell-Xenotransplantate

Promotionsfach: Neurochirurgie
Doktormutter: Frau Prof. Dr. rer. nat. Ch. Herold-Mende

Trotz intensiver Forschung ist die Prognose hochgradiger Gliome auch heute noch infaust. Für Glioblastome (WHO Grad IV) sind dabei besonders schwere Krankheitsverläufe charakteristisch. Selbst unter der Maximaltherapie, bestehend aus einer ausgedehnten chirurgischen Resektion und einer nachfolgenden Strahlen- und Chemotherapie, beträgt die mittlere Lebenserwartung nur 12-15 Monate nach Diagnosestellung. Eine besondere Herausforderung bei der Therapie hochgradiger Gliome stellen dabei sogenannte Glioblastomstammzellen dar. Diese Unterpopulation an Krebszellen zeichnet sich durch stammzellähnliche Eigenschaften, ein hoch-tumorigenes Potential und außergewöhnliche Widerstandskraft gegenüber herkömmlichen Therapieformen, aus. Vieles spricht dafür, dass eine Heilung der Erkrankung erst möglich sein wird, wenn es gelingt, ebendiese unreife Tumorzellpopulation vollständig zu eradizieren.

Eine Substanz, die in diesem Zusammenhang wegen ihrer Erfolge bei der Differenzierung von Stammzellen anderer Krebsarten intensiv diskutiert wurde, ist All-trans-Retinolsäure (ATRA). In ersten klinischen Studien bei Patienten mit rekurrenten Glioblastomen, erzielte die Therapie mit ATRA jedoch, entgegen den Erwartungen, kaum signifikante Erfolge. Nichtsdestoweniger ist bis heute nicht endgültig geklärt, ob einige Patienten mit hochgradigen Gliomen nicht dennoch von einer Therapie mit ATRA profitieren könnten, sofern diese nicht erst nach einer Tumorreklurrezidiv, sondern direkt im Anschluss an die erste Tumoresektion begonnen werden würde. Diese Möglichkeit wurde in einem Teil der Studien postuliert. Passend zu dieser Hypothese konnte gezeigt werden, dass ATRA auf besonders schwer zu behandelnde Glioblastomstammzellen, die während einer Erstresektion gewonnen worden waren, *in vitro* und in Xenograft-Experimenten anti-tumorigene Wirkung hatte. Zudem konnte ATRA in diesen Versuchen die Sensibilität der Zellen gegenüber ionisierender Strahlung steigern.

Darüber hinaus verdichteten sich in den vergangenen Jahren die Hinweise, dass Medikamente, die auf epigenetischer Ebene wirken, die anti-tumorigenen Effekte von ATRA zu steigern vermögen. Vielversprechend schienen dabei insbesondere der HDAC-Inhibitor „SAHA“, der eine Zunahme der Histonacetylierung bewirkt und der DNA-Methyltransferasehemmer „5-AZA“, der den globalen Methylierungsstatus der DNA senkt. Während für andere Krebsentitäten für diese Kombinationen bereits *in vivo*-Daten vorliegen, wurden sie an Glioblastomstammzellen bisher nur *in vitro* getestet. Da jedoch bekannt ist, dass unter anderem das Mikromillieu in Glioblastomen eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von Resistenzmechanismen spielt, besitzen *in vitro*-Versuche lediglich eine begrenzte Aussagekraft über die tatsächliche Wirksamkeit einer Medikation im lebenden Organismus.

Die vorliegende Arbeit ist die erste, die die Wirkung der Kombinationstherapien von ATRA und SAHA sowie von ATRA und 5-AZA auf Glioblastomstammzelltumore *in vivo* untersucht. In einem ersten Teilversuch wurde dabei die Wirkung dieser beiden Therapieansätze auf das Wachstum und das histopathologische Erscheinungsbild der Tumore in einem intrakraniellen Langzeitmodell in Mäusen untersucht. Dabei wurde zunächst mittels spezifischer immunhistochemischer Färbungen gegen Ki-67 und menschliche

Zellkernbestandteile nachgewiesen, dass es sich bei den in den H&E-gefärbten Kryo-Schnitten der Mäusehirne als Glioblastome imponierenden Tumoren, tatsächlich um menschliche, hochproliferative Tumore handelt. Dann wurden die Tumorumfänge nach Vermessung der Tumorflächen auf allen Schnittebenen approximiert und ihre ordinale Verteilung innerhalb einer Gruppe anschließend mit den Verteilungen innerhalb der anderen Gruppen verglichen. Des Weiteren wurden die Häufigkeit und Ausdehnung von Nekrosen sowie die Invasivität der Tumore anhand H&E-gefärbter Kryo-Schnitte evaluiert. Eine TUNEL-Färbung gab schließlich Aufschluss über die Wirkung der Mono- und Kombinationstherapien auf die Apoptoserate der Tumore. In einem zweiten Teilversuch wurde in einem chronischen Schädelfensterkammer-Modell die Veränderung der migratorischen und neoangiogenen Aktivität der Glioblastomstammzell-Xenotransplantate unter Therapie mit den Substanzkombinationen in den ersten zehn Tagen nach Implantation intravitalmikroskopisch analysiert. Die Substanzkombinationen wurden dabei sowohl gegen die Kontrolle als auch im Vergleich zu den jeweiligen Monotherapien getestet.

Weder die Kombination von ATRA mit dem HDAC-Inhibitor SAHA, noch mit dem DNA-Methyltransferasehemmer 5-AZA erzielte eine signifikante Reduktion des Tumorumfanges gegenüber den mit ATRA-Monotherapie behandelten Tumoren oder der Kontrollgruppe. Stattdessen schien sich das histopathologische Bild der Tumore unter beiden Kombinationstherapien im Trend sogar zu verschlechtern und aggressiver zu werden. So wiesen die Tumore unter beiden Kombinationstherapien signifikant mehr Nekrosen auf und waren im Trend invasiver als die ausschließlich mit ATRA behandelten Tumore und als die Tumore der Kontrollgruppe. Eine Auswirkung der Kombinationstherapien auf die Apoptoserate war nicht festzustellen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen in Kombinationstherapiegruppen, kam es in der Gruppe, die mit einer ATRA-Monotherapie behandelt wurde, im Trend zu einer leichten, wenn auch nicht statistisch signifikanten, Reduktion des Tumorumfanges. Darüber hinaus kam es in dieser Gruppe auch seltener zur Bildung von Nekrosen, die im Trend zudem kleiner waren als die der Vergleichsgruppen. Auch Tumore, die mit einer SAHA-Monotherapie behandelt wurden, wiesen tendenziell ein geringeres Volumen auf als die Kontrolltumore. Allerdings wurde auch in dieser Monotherapiegruppe kein statistisch signifikantes Maß erreicht. Durch den Nachweis einer signifikanten Zunahme der Histonacetylierung in allen SAHA behandelten Tumoren mittels immunhistochemischer Färbung und einer hochsignifikanten Abnahme der DNA-Methylierung in allen 5-AZA behandelten Tumoren mittels MassARRAY, konnte ein Therapieversagen aufgrund einer zu geringen Verfügbarkeit der getesteten Medikamente am Wirkort weitgehend ausgeschlossen werden.

Insgesamt bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit die vorsichtige Hoffnung, dass eine Untergruppe von Glioblastompatienten von einer Therapie mit ATRA profitieren könnte. Allerdings bleibt weiterhin unklar, wie man diese moderaten Effekte von ATRA-Behandlung verbessern beziehungsweise wie man Patienten, die von einer derartigen Therapie signifikant profitieren identifizieren könnte. Eine alleinige Kombination von ATRA mit den epigenetisch wirksamen Substanzen SAHA und 5-AZA hat sich in der vorliegenden Arbeit dabei als nicht sinnvoll und im Trend sogar als kontraproduktiv erwiesen.