

Lara-Marie Schmitt

Dr. med.

**Alectinib als Behandlungsstrategie in *Anaplastic lymphoma kinase*-exprimierenden Glioblastomzellen: Biomarker des Inhibitors, Wirkmechanismus und Resistenzentstehung**

Einrichtung: Neurologie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Wolfgang Wick

Das Glioblastom ist eine Tumorerkrankung mit infauster Prognose, auch unter Einsatz maximaler intermodaler Therapieansätze. Die Relevanz einiger neu etablierter Methylierungsbasierter Subtypen muss in der klinischen Situation noch beurteilt werden. Der zur Zeit einzige prädiktive Marker für das Ansprechen auf alkylierende Substanzen wie Temozolomid ist die *MGMT*-Promotorhypermethylierung. Besonders Patienten ohne Promotorhypermethylierung haben bei schlechtem Ansprechen auf Chemotherapie eine sehr begrenzte Prognose.

Im Rahmen der N<sup>2</sup>M<sup>2</sup>-Studie sollen daher neue molekulare Marker für alternative zielgerichtete Therapien bei Patienten mit nicht *MGMT*-hypermethyliertem Glioblastom etabliert werden, weshalb präklinische Studien zur Wirksamkeit der Inhibitoren notwendig sind.

In dieser Arbeit wurde die ALK-Expression in Glioblastomzellen als Biomarker für die Behandlung mit dem ALK-Inhibitor Alectinib untersucht. ALK-Fusionen und -Mutationen treten in Glioblastomen sehr selten auf. Therapieresistenzen erschweren die Behandlung mit zielgerichteten Substanzen. Daher wurden außerdem molekulare Resistenzmechanismen sowie pharmakologische Überwindungsstrategien für die Resistenzsituation untersucht.

Eine ALK-Expression wurde hauptsächlich in vielen GICs gefunden, jedoch wurden auch ALK-defiziente GICs identifiziert. Diese Ergebnisse passen zu der Literatur basierten Annahme, dass dem Rezeptor eine wichtige Rolle in der physiologischen Neurogenese und pathologischen Gliomagenese zukommt, da er von allen Glioblastomzellen ausschließlich in einigen der Stammzellen exprimiert wird. Alectinib inhibierte wirksam Proliferation,

Klonogenität und induzierte Apoptose in ALK-exprimierenden S24- und T269-Zellen, jedoch nicht in ALK-defizienten T325-Zellen.

Zur Validierung dieser biologischen Effekte und zur Bestätigung, dass ALK als Biomarker für die Inhibitorbehandlung verwendet werden könnte, wurden genomische *knockdowns* von ALK in zwei Zelllinien vorgenommen. Diese ALK-*knockdowns* führten zur stärkeren Resistenz der GICs gegenüber Alectinib.

Zur Identifikation möglicher Kombinationsbehandlungen für die klinische Situation, die der Wirkungsverstärkung dienen sollen, wurden Signalgebungsmechanismen durch Alectinib mithilfe von Genexpressionsanalysen untersucht. Die Hemmung von ALK durch Alectinib führte zu einer relevanten nachgeschalteten Hemmung von cMyc. Eine genomische Überexpression von cMyc induzierte eine primäre Resistenz in ALK-exprimierenden Wildtyp-GICs. Die pharmakologische cMyc-Hemmung wirkte synergistisch zusammen mit Alectinib sowohl in den Wildtyp-Zellen als auch in den resistenten Zellen und könnte in primäre Behandlungsstrategien und sekundäre *Salvage*-Therapien eingebunden werden.

Die langfristige Behandlung mit Alectinib zur Identifikation Resistenz-vermittelnder Mechanismen führt zudem zu einer erworbenen Behandlungsresistenz durch Aktivierung des MAPK-Signalwegs als Haupt-*Bypass*-Signalweg. In der erworbenen Resistenz konnte außerdem eine Hochregulation von cMyc gesehen werden. cMyc scheint somit ebenfalls Teil des Signalwegs zu sein, auch, da durch eine Trametinib-Behandlung cMyc molekular herunterreguliert wurde. Der MAPK-Signalweg ist außerdem über einen Rückkopplungsmechanismus zu EGFR und ALK gekennzeichnet. EGFR und ALK wurden unter MEK-Inhibition wieder hochreguliert und Trametinib resensibilisierte so die resistenten Zellen gegenüber der Alectinib-Behandlung. Die kombinierte Behandlung aus Alectinib und Trametinib wirkte synergistisch auf resistente Zellen, deshalb könnte Trametinib eine sinnvolle *Salvage*-Therapie in der sekundären Resistenzsituation bzw. im Progress sein. Auch Alectinib sollte wegen synergistischer Effekte in der Resistenz weitergegeben werden. Eine Dreifachbehandlung aus Alectinib, Trametinib und einem cMyc-Inhibitor führte zu einer noch effizienteren Resistenzüberwindung als die Zweifach-Behandlungen.

Die vorgelegten Ergebnisse unterstützen außerdem die Hinzunahme einer Strahlentherapie zur Alectinib-Gabe, da diese kombinierte Therapie ebenfalls synergistisch wirkte, sowohl in empfindlichen als auch resistenten Zellen. Die Bestrahlung nimmt eine wichtige Rolle sowohl in der Erstlinientherapie als auch bei progredienter Erkrankung ein, insbesondere, wenn Temozolomid als Standard-Alkylierungssubstanz aufgrund des nicht-hypermethylierten

*MGMT*-Promotors nicht wirksam ist. Die Radiotherapie wäre somit auch im Progress sinnvoll mit der Inhibitorbehandlung zu kombinieren.

Zusammenfassend legen die vorliegenden Ergebnisse nahe, dass die Alectinib-Behandlung in ALK-exprimierenden Glioblastomzellen in klinisch relevanten Dosen effektiv ist. Die ALK-Expression könnte daher in Zukunft als zusätzlicher Biomarker dienen, um die primäre Sensibilität gegenüber Alectinib vorherzusagen. Alectinib ist eine der zielgerichteten Substanzen der N<sup>2</sup>M<sup>2</sup>-Studie, welche eine ideale Möglichkeit bietet, die gewonnenen Ergebnisse im Patienten zu validieren. Weiterhin bleibt es in Zukunft zu untersuchen, ob die hier gefundenen Resistenzmechanismen im Patienten nachgewiesen werden können und ob vorgeschlagene Kombinations- und *Salvage*-Therapien bei Glioblastompatienten die Therapie-Effektivität in der Klinik steigern können.