



**Neue Behandlungsmöglichkeiten des  
Gruppe 3-Medulloblastoms im orthotopen Mausmodell**

**New therapeutic options for  
Group 3-Medulloblastoma in an Orthotopic Mouse Model**

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades  
der Graduate School of Life Sciences,  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,  
Klasse Biomedizin

Vorgelegt von

**Stefanie Schwinn**

**aus**

**Järkendorf**

Würzburg 2020

**Eingereicht am: .....**

Bürostempel

**Mitglieder des Promotionskomitees:**

**Vorsitzende: Prof. Dr. Grit Hein**

**1. Betreuer: Prof. Dr. Matthias Wölfl**

**2. Betreuer: Prof. Dr. Dr. Andreas Beilhack**

**3. Betreuer: Prof. Dr. Manfred Gessler**

**4. Betreuer: Prof. Dr. Ralf-Ingo Ernestus**

**Tag des Promotionskolloquiums: 12.10.2022**

**Doktorurkunden ausgehändigt am: .....**

***Für meine Eltern***

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	7
1.1. Medulloblastom.....	7
1.2. MB3W1 – eine neue Gruppe 3 Tumorzelllinie .....	10
1.2.1. Krankheitsgeschichte des Patienten .....	10
1.2.2. Charakterisierung der Tumorzelllinie.....	11
1.2.3. Andere Medulloblastommodelle .....	13
1.3. Therapieoptionen für das Medulloblastom .....	14
1.4. VEGF und seine Rezeptoren.....	15
1.5. Zytostatika und Inhibitoren .....	16
1.5.1. Standardzytostatika.....	16
1.5.2. Gemcitabin.....	16
1.5.3. Axitinib .....	17
2. Fragestellung.....	19
3. Material und Methoden.....	20
3.1. Material.....	20
3.1.1. Reagenzien und Chemikalien.....	20
3.1.2. Puffer und Lösungen.....	21
3.1.3. Zellkulturmedien.....	21
3.1.4. Inhibitoren .....	23
3.1.5. Antikörper.....	25
3.1.6. Kit`s.....	26
3.1.7. Verbrauchsmaterialien .....	26
3.1.8. Mäuse.....	27
3.1.9. Tumorzelllinien .....	27
3.2. Methoden .....	28
3.2.1. Tumorzelllinien und deren Kultivierung.....	28
3.2.2. Inhibitoren und Zytostatika .....	28
3.2.3. Zellzahlbestimmung mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer .....	29
3.2.4. Toxizitätsversuch mit Zytostatika .....	29

3.2.5.	Durchflusszytometrie (FACS) .....	30
3.2.6.	Biolumineszenzmessung (BLI).....	31
3.2.7.	VEGF-A ELISA.....	31
3.2.8.	Mausmodell .....	32
3.2.9.	Subkutane Tumorzellinjektion .....	33
3.2.10.	Intrakranielle Tumorzellinjektion.....	33
3.2.11.	Immunfluoreszenzfärbung für histologische Analyse (IFM).....	34
3.2.12.	Hypoxyprobe-1 Färbung.....	34
3.2.13.	TUNEL-Färbung.....	35
3.2.14.	Lichtblatmikroskopie der Tumore (LFSM) .....	36
3.2.15.	Statistik.....	37
4.	Ergebnisse.....	38
4.1.	Effekt der Zytostatika auf die Tumorzellen <i>in vitro</i> .....	38
4.2.	Testung von Gemcitabin und Pemetrex im subkutanen Tumormodell .....	43
4.3.	Beobachtung einer Zonenbildung im subkutanen Tumor.....	44
4.4.	Charakterisierung der VEGF-Sekretion und VEGFR-Expression.....	48
4.5.	Wirkung von VEGFR-Inhibitoren auf die Tumorzellen.....	49
4.6.	Wirkung von Axitinib auf die VEGF-Rezeptoren.....	51
4.7.	Mögliche Mechanismen der durch Axitinib/Gemcitabin induzierten Apoptose ...	53
4.8.	Wirkung der Zytostatika und Inhibitoren auf andere Medulloblastom-Zelllinien .	55
4.9.	Zytotoxische Therapie mit VEGFR-Inhibitoren im subkutanen Mausmodell.....	57
4.10.	Zytotoxische Therapie mit VEGFR-Inhibitoren in Kombination mit Gemcitabin im intrakraniellen Mausmodell .....	61
5.	Diskussion .....	66
5.1.	Zytotoxischer Effekt von Gemcitabin und Pemetrex auf die Tumorzellen .....	66
5.3.	Expression von VEGF-Rezeptoren auf Medulloblastom-Tumorzellen.....	70
5.3.1.	Zytotoxischer Effekt der VEGFR-Inhibitoren auf Medulloblastom- Tumorzellen.....	71
5.3.2.	Zytotoxische Wirkung von Gemcitabin und Axitinib auf anderen Subtypen des Medulloblastoms .....	72
5.3.3.	Verminderte VEGF-Sekretion der Tumorzellen nach Axitinib-Behandlung..	73
5.3.4.	Wie selektiv wirkt Axitinib?.....	74
5.6.	Mechanismen die durch Axitinib und Gemcitabin zur Apoptose führen.....	74
5.8.	VEGFR-Inhibitoren im Tiermodell .....	76

5.9. Schlussfolgerung zur Behandlung des Gruppe 3-Medulloblastoms mit Gemcitabin und Axitinib.....	78
5.10. Ausblick.....	80
Zusammenfassung.....	82
Abstract.....	84
Literaturverzeichnis .....	86
Abbildungsverzeichnis .....	96
Tabellenverzeichnis .....	97
Abkürzungsverzeichnis.....	98
Danksagung .....	101
Curriculum vitae.....	103
Eidesstattliche Erklärung (Affidavit).....	104

# 1. Einleitung

## 1.1. Medulloblastom

Das Medulloblastom ist ein hochmaligner primitiver neuroektodermaler Tumor des zentralen Nervensystems. Nach der World Health Organisation (WHO) wird das Medulloblastom den embryonalen Tumoren zugeordnet (Louis et al., 2007). Mit ca. 15-20% aller intrakraniellen, pädiatrischen Tumore ist das Medulloblastom der häufigste Gehirntumor im Kindesalter, wobei Jungen häufiger erkranken als Mädchen. Das mittlere Überleben nach 3 Jahren beträgt durchschnittlich 63%, ist aber stark abhängig vom zu Grunde liegenden Subtyp (Massimino et al., 2016).







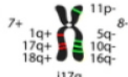
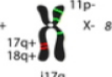
Das klinische Bild bei Diagnosestellung ist sehr variabel, sodass eine durchschnittliche Latenzzeit von 2 bis 2,5 Monaten zwischen den Erstsymptomen und der Diagnosestellung besteht (Dobrovoljac et al., 2002; Halperin et al., 2001). Man unterscheidet zwischen Symptomen, die sekundär durch die intrakranielle Drucksteigerung zustande kommen und den Lokalsymptomen, die durch das direkte Tumorwachstum entstehen. Typische Zeichen einer intrakraniellen Hirndrucksteigerung sind Kopfschmerzen, Nüchternerebrechen, Stauungspapille, Nackensteifigkeit oder Wesensveränderung, die im Verlauf zu einer zunehmenden Bewusstseinsstörung und Funktionsstörung des Hirnstamms führen können. Zu den Lokalsymptomen zählen Ataxie mit Dysmetrie, Dysdiadochokinese und Intentionstremor sowie Nystagmus (Wilne et al., 2007; Wilne et al., 2006).

In der MRT-Bildgebung präsentiert sich das Medulloblastom typischerweise als solide Raumforderung mit starker Kontrastmittelaufnahme. Die makroskopische Struktur des Medulloblastoms ist sehr vielgestaltig, sie reicht von derb und gut abgrenzbar bis zu weich und ohne definierte Tumorgrenzen. Die Histologie des Medulloblastoms ist charakterisiert durch klein-, rund- und blauzellige Tumorzellen, die einen hohen nukleären Pleomorphismus und hohe mitotische

Aktivität zeigen. Immunhistochemisch ist vor allem in der Abgrenzung zum atypisch-teratoiden Rhabdoidtumor eine erhaltene INI1-Färbung von Bedeutung. Entsprechend der WHO wird das Medulloblastom dem Grad IV zugeordnet und aufgrund der histopathologischen Eigenschaften in 5 Subtypen unterteilt: klassisches MB, desmoplastisches MB, MB im extensiver Nodularität, anaplastisches MB und großzelliges MB (Louis et al., 2007).

In den letzten Jahren ist es gelungen, mit Hilfe genomweiter Expressions- und epigenetischer Analysen bzw. CGH-Untersuchungen (komparative genomische Hybridisierung) neben den histologischen Subtypen weitere genetische Untergruppen des Medulloblastoms zu klassifizieren. Man unterscheidet folgende vier genetisch verschiedenen Untergruppen: Shh-Gruppe, Wnt-Gruppe, Gruppe 3 und Gruppe 4 (Kool et al., 2012; Northcott et al., 2012a; Taylor et al., 2012). Die molekulargenetischen Untergruppen werden durch spezifische Gensignaturen sowie klinische und prognostische Eigenschaften charakterisiert.

Tabelle 1: Charakteristika der Untergruppen des Medulloblastom in Anlehnung an die Publikation von M. Taylor und Kollegen und mit dessen Genehmigung (Taylor et al., 2012).

	Wnt	Shh	Gruppe 3	Gruppe 4
<b>Prävalenz</b>	10%	30%	25%	35%
<b>Altersgruppen</b>				
<b>Geschlecht</b>	♀:♂	♀:♂	♀>♂	♀>♂
<b>Histologie</b>	klassisch	großzellig klassisch desmoplastisch nodulär	klassisch großzellig	klassisch großzellig
<b>Metastasenrisiko</b>	gering	gering	hoch	hoch
<b>Rezidiv</b>	wenig	lokal	Metastasen	Metastasen
<b>Prognose</b>	gut	intermediär	schlecht	intermediär
<b>5-Jahres-ÜR</b>	95%	75%	50%	75%
<b>Genetik</b>				
	CTNNB1-Mutation	MYCN-Amplifikation GLI2-Amplifikation PTCH1/SUFU/SMO-Mutation	MYC-Amplifikation	MYCN-Amplifikation CDK6-Amplifikation



Etwa 11% aller Medulloblastome gehören der Wnt-Gruppe an. Sie haben mit einem Überleben von über 90% die beste Prognose aller Medulloblastom-Patienten. Wnt-Tumore sind in der Mittellinie des Kleinhirns lokalisiert und können in den IV. Ventrikel sowie in den Hirnstamm infiltrierend wachsen. Histologisch zeigt sich der Wnt-Tumor als klassisches Medulloblastom und ist in der immunhistologischen Färbung positiv für DKK1, Filamin A, YAP-1 und  $\beta$ -Catenin (Massimino et al., 2011; Taylor et al., 2012).

Das Shh-Medulloblastom umfasst 30% aller Medulloblastome und ist vor allem in den Kleinhirnhemisphären lokalisiert. Die 5-Jahres-Überlebensrate der Patienten liegt bei 75% (Massimino et al., 2011). Der Sonic Hedgehog (Shh) Signalweg spielt eine Schlüsselrolle in der normalen Kleinhirnentwicklung. Dort induziert der Shh-Signalweg die Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen im Kleinhirn und in anderen Geweben. Histologisch zeigt sich die Shh-Untergruppe des Medulloblastom vom desmoplastischen Typ oder von extremer Nodularität (MBEN), immunhistochemisch werden vor allem GAB1, SFRP und GLI1 stark von den Tumorzellen exprimiert.

Die schlechteste Prognose aller Medulloblastome haben die Gruppe 3-Medulloblastome mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 50%. Das Gruppe 3-Medulloblastom betrifft vorwiegend Säuglinge und Kleinkinder und tritt bei Jungen häufiger auf als bei Mädchen. Bei Diagnosestellung haben die Patienten häufig bereits Metastasen, welche ein Kriterium für eine schlechtere Prognose sind. In der histologischen Analyse zeigt sich das Gruppe 3-Medulloblastom als großzelliger oder anaplastischer Typ. Typisch für das Gruppe 3-Medulloblastom ist die hohe Amplifikationsrate der Protoonkogene Myc und OTX-2. Ungefähr jedes vierte Medulloblastom ist ein Gruppe 3-Medulloblastom.

Die größte Untergruppe mit 35% stellen die Gruppe 4-Medulloblastome dar. Diese sind charakterisiert durch eine hohe Amplifikationsrate von MycN und CDK6. In der Histologie stellt sich das Gruppe-4 Medulloblastom als klassischer Typ, großzelliger oder anaplastischer Typ dar. Die Gruppe 3- und Gruppe 4-

Tumore sind vor allem in der Mittellinie des 4. Ventrikels lokalisiert (Massimino et al., 2011; Taylor et al., 2012).

## **1.2. MB3W1 – eine neue Gruppe 3 Tumorzelllinie**

Aus einem malignen Pleuraerguss eines 22-Monate alten Patienten mit einem Gruppe 3-Medulloblastom konnten Tumorzellen gewonnen werden und als permanente Zelllinie MB3W1 (Medulloblastom-Gruppe-3-Würzburg-1) etabliert werden. Die neue Tumorzelllinie wurde in Vorarbeiten, bei denen ich bereits beteiligt war, ausführlich *in vitro* und *in vivo* charakterisiert (Dietl et al., 2016).

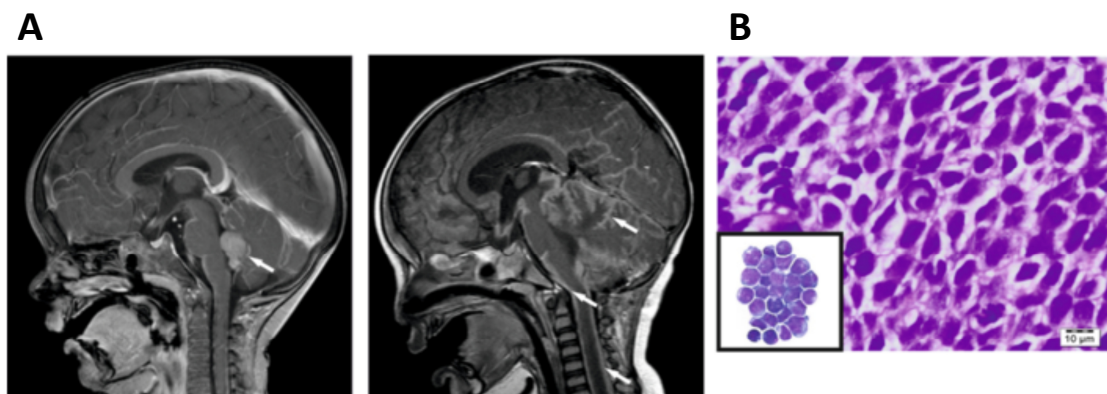
### **1.2.1. Krankheitsgeschichte des Patienten**

Ein 22-Monate altes, männliches Kleinkind stellte sich mit einer schnell fortschreitenden Gangataxie vor. In der Magnetresonanztomographie (MRT) zeigte sich am Boden des IV. Ventrikels ein Kleinhirntumor (Abb. 1A) und in der anschließenden durchgeführten Liquorpunktion konnten bereits maligne Tumorzellen nachgewiesen werden. Der Kleinhirntumor wurde operativ reseziert und durch die Pathologie histologisch untersucht. Hier zeigte sich ein anaplastisches Medulloblastom, welches auch durch die Referenzpathologie (Prof. T. Pietsch in Bonn) bestätigt werden konnte. In der anschließenden postoperativen MRT-Untersuchung konnte kein Resttumor dargestellt werden, jedoch Zeichen einer Meningeose. Postoperativ entwickelte das Kind Zeichen einer intrakraniellen Drucksteigerung, die eine Liquordrainage und einen ventrikuloperitonealen Shunt erforderlich machte.

Drei Wochen nach der stattgehabten Operation entwickelte der Patient Zeichen einer Hirnstammfiltration mit fehlenden Reflexen. Im MRT zeigte sich eine massive leptomenigeale Ausbreitung mit Kompression des Hirnstamms (Abb. 1B). Es erfolgte eine sofortige Bestrahlung des Kopfes mit anfangs 3 Gy/Tag,

gefolgt von 2Gy/Tag und eine anschließende Bestrahlung der gesamten neuronalen Achse (Gesamte Dosis: Tumorregion 53Gy, Kopf 29Gy, Rückenmark 32Gy). Die anschließende Chemotherapie mit Lomustin, Vincristin und Cisplatin (später auch Cyclophosphamid und Etoposid) erfolgte nach dem deutschen Studienprotokoll HIT2000.

Neun Monate nach der Diagnosestellung wurde im ursprünglichen Tumorgebiet und lateral dem linken Ventrikel ein Rezidivtumor festgestellt. Auch die leptomenigeale Ausbreitung war weiter fortgeschritten. Der neue Chemotherapie-Behandlungsplan wurde nun an das HIT-REZ 2005 Studienprotokoll angepasst und beinhaltete eine intraventrikuläre Etoposidgabe. Kurz vor seinem Tod, 10 Monate nach der Diagnosestellung, entwickelte der Junge einen malignen Pleuraerguss, aus dem Tumorzellen gewonnen werden konnte (Dietl et al., 2016).

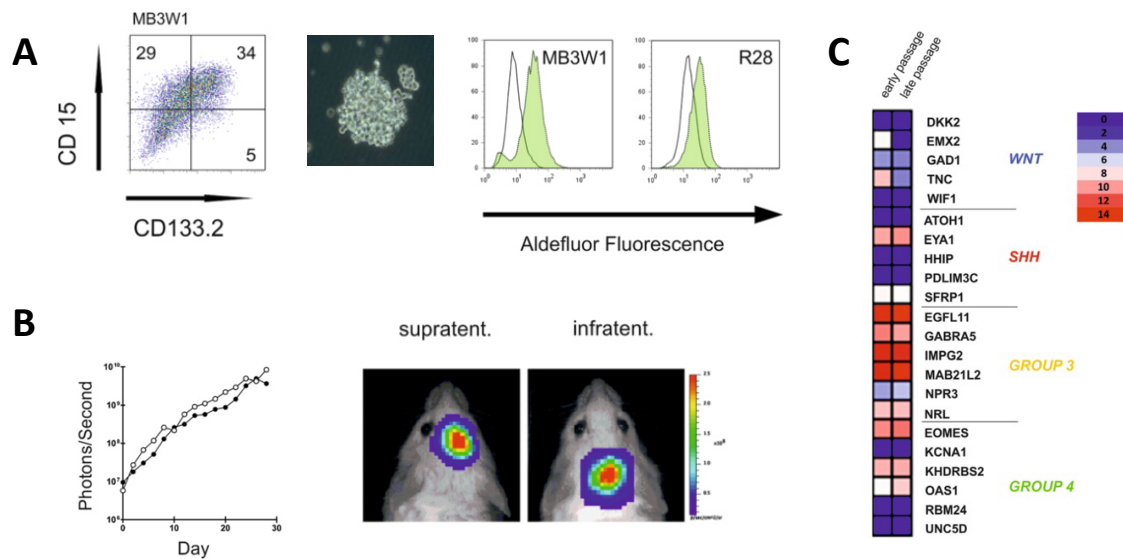


**Abbildung 1: Darstellung des klinischen Falles.** (A) Sagittale Schnittbildgebungen des initialen Gruppe 3-Medulloblastoms im IV. Ventrikel und massive Zeichen einer Meningeose drei Wochen später. (B) HE-Färbung mit typischen Zeichen eines anaplastischen Medulloblastoms. Die kleine Abbildung zeigt Tumorzellen im initialen Liquor (Pappenheimfärbung) (Dietl et al., 2016, mit der freundlichen Genehmigung der BMC-Cancer-Zeitschrift.)

### 1.2.2. Charakterisierung der Tumorzelllinie

Die Tumorzellen waren initial für 3 Tage in RPMI mit 10% FCS kultiviert worden. Auf Grund der Vermutung, die Zellen könnten Charakteristika von Tumor-Stammzellen aufweisen, wurden sie dann aber in FCS-freies Stammzellmedium überführt. Die Tumorzellen konnten erfolgreich im Stammzellmedium kultiviert und anschließend charakterisiert werden. MB3W1-

Zellen exprimieren CD133 und CD15 und zeigen eine hohe Aktivität der Aldehyddehydrogenase (ALDH) (Dietl et al., 2016). CD133, CD15 und ALDH weisen auf Tumorstammzellen hin, welche kennzeichnend sind für eine hohe Bestrahlungs- und Chemotherapieresistenz (Vescovi et al., 2006). MB3W1-Zellen zeigen ein aggressives Tumorstammwachstum in immunsupprimierten Mäusen. Dabei konnte die für ein Anwachsen des Tumors benötigte Zellzahl bis auf 5.000 herab titriert werden, unabhängig davon, ob die Zellen CD133 positiv oder negativ waren. Eines der Hauptkriterien von Tumorstammzellen ist die histologisch exakte Nachbildung des Ursprungstumors im Xenograft-Tiermodell (Singh et al., 2004). In der Arbeit von Dietl et. al. konnte gezeigt werden, dass die meisten im Tier gewachsenen Tumore histologisch dem Ursprungstumor stark ähneln. Auch die Tumore der Maus zeigten histologisch ein anaplastisches Wachstumsverhalten sowie typische nukleäre Polymorphismen und hohe mitotische Aktivität. Darüber hinaus konnte im histologischen Tumorgewebe typische Expressionsmarker für neuronale Stamm- und Vorläuferzellen (Nestin, CD133), neuronale Expressionsmarker (Synaptophysin,  $\beta$ III-Tubulin), oligodendrogliale Marker (Olig2) und Expressionsmarker für reife Astrozyten (Vimentin) nachgewiesen werden. Der Expressionsmarker GFAP, der für die Differenzierung reifer Astrozyten zur Tumorzellen GFAP mitverantwortlich ist, konnte nicht detektiert werden (Eng et al., 2000). Mit dem Medulloblastom der Gruppe 3 sind zahlreiche Eigenschaften assoziiert wie eine hohe Metastasierungsrate, Fehlen des Chromosom 17q und eine hohe Myc Amplifikation (Kool et al., 2012; Northcott et al., 2012b; Pfister et al., 2009; Taylor et al., 2012). Alle diese Eigenschaften fanden sich auch bei der Tumorzelllinie MB3W1 (Dietl et al., 2016).



**Abbildung 2: Charakterisierung der Tumorzelllinie MB3W1.** (A) Repräsentative Darstellung der FACS-Färbung mit CD15 und CD133 in MB3W1 Tumorzellen. Durchlichtmikroskopie der Tumorzellen in Stammzellmedium. Expression der ALDH der MB3W1 und einer Vergleichszelllinie R28. (B) In vivo Wachstum der transduzierten MB3W1 Tumorzellen, die supratentoriell oder infratentoriell injiziert wurden. (C) Heatmap der charakterisierenden Genmarker für die Subtypen des Medulloblastoms (Dietl et al., 2016, mit der freundlichen Genehmigung der BMC-Cancer-Zeitschrift.)

### 1.2.3. Andere Medulloblastommodelle

In den letzten Jahren wurden zwei syngene Medulloblastom-Mausmodelle, basierend auf genetisch modifizierten Kleinhirneurone, generiert. Durch Myc-Überexpression in Kombination mit einer p53-Blockade in Neuronen führen beide Modelle zu einem hochaggressiven Medulloblastom, dass dem humanen Gruppe 3- Medulloblastom ähnelt (Kawauchi et al., 2012; Pei et al., 2012). Neben der humanen Gruppe 3-Medulloblastom-Zelllinie MB3W1 sind noch weitere murine Xenograftmodell etabliert. Milde und Kollegen isolierten aus histologischen Schnitten eines Patienten Tumorzellen und generierten aus diesen eine permanente Zelllinie (HD-MB03), welche Myc überexprimiert. die typischen Eigenschaften eines Gruppe 3 Medulloblastoms zeigt (Milde et al., 2012).

### 1.3. Therapieoptionen für das Medulloblastom

In Deutschland erfolgt die Therapie des Medulloblastoms nach dem aktuellen HIT-Studienprotokoll der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH). Nach der primären chirurgischen Entfernung des Primärtumors erfolgt bei Kindern über 3-5 Jahren eine kraniospinale Bestrahlung mit lokalem Tumorboost und anschließender Erhaltungskemotherapie. Bei Kindern unter 3-5 Jahren wird vorzugsweise auf die Bestrahlung verzichtet, um Störungen der psychomotorischen, mentalen und kognitiven Entwicklung (Rutkowski et al., 2009) sowie neuroendokrine Ausfälle zu vermeiden (Duffner et al., 1993). Im Bereich des Hirnschädels und des Spinalkanals werden Dosierungen zwischen 24 und 36 Gy appliziert, gefolgt von einer Aufsättigung der hinteren Schädelgrube auf 54 bis 60 Gy (Carrie et al., 2009; Kortmann et al., 1999).

Die Chemotherapie für das therapiesensible Medulloblastom besteht aus einer Kombination mehrerer Substanzklassen: Nitroseharnstoffe (Lomustin, Carmustin), Platinderivate (Cisplatin, Carboplatin) und Vincaalkaloide (Vincristin). Zur Hochdosis-Chemotherapie bei beispielsweise partiellem Ansprechen auf die Induktionschemotherapie kommt neben Carboplatin, Cyclophosphamid und Etoposid zusätzlich noch Melphalan oder Thiotepa zum Einsatz (Kuhl et al., 1998).

Die aggressive multimodale Therapie des Medulloblastoms kann jedoch auch negative Auswirkungen auf die Entwicklung der Patienten führen. Hier treten vor allem neurosensitive Defekte, die das Gehör und die Sehfunktion betreffen, neurokognitive Defekte, die sich auf die Lerngeschwindigkeit, Gedächtnis und das Lesen auswirken sowie endokrine Defekte, die zu einem Hormonmangel von Gonadotropine, Wachstumshormone, ACTH, TSH und Prolaktin führen können, auf. Des Weiteren kann die Therapie des Medulloblastoms zu Schilddrüsedefekte, Osteoporose und Adipositas mit Hyperlipidämie und Diabetes mellitus führen (Massimino et al., 2016)

Niedriges Alter, primäre ZNS-Metastasen sowie postoperativer Resttumor zählen zu den ungünstigen, prognostischen Faktoren die das Langzeitüberleben bestimmen (Zeltzer et al., 1999). Vor allem der Einsatz von spezifischen Wirkstoffen, die zielgerichtet Tumor-assoziierte Signalwege beeinflussen können sowie prognostisch relevante Marker zur Therapiestratifizierung, sollen die Therapieoptionen und die Prognose verbessern.

#### **1.4. VEGF und seine Rezeptoren**

In den achtziger Jahren wurde der Gefäßwachstumsfaktor VEGF (vascular endothelial growth factor) zum ersten Mal als Faktor beschrieben, der sowohl das Aussprossen neuer Endothelzellen als auch die Gefäßdurchlässigkeit reguliert (Senger et al., 1983). Bisher sind beim Menschen 5 Subtypen des VEGF bekannt: VEGF's A-D, Plazenta-Wachstumsfaktor PlGF, virale Homologe VEGF-E und VEGF-F aus Schlangengift (Chung and Ferrara, 2011). Die VEGF werden auch von anderen Organen, beispielsweise der Niere, der Lunge, dem zentralen Nervensystem oder der Leber sezerniert und beeinflussen dort die Organentwicklung und -funktion (Chung and Ferrara, 2011; Potente et al., 2011). VEGF binden mit hoher Affinität an deren Rezeptortyrosinkinasen VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3 und vermitteln über die Dimerisierung der Rezeptoren das Signal ins Zellinnere. Die Hauptwirkung des VEGF wird über VEGFR-2 initiiert. Dies führt zur Aktinpolymerisation über den Rho/ROK-Signalweg (Jin et al., 2006), die gerichtete Zellbewegung mittels SAPK2/p38 und der MAP-Kinase, sowie die Angiogenese und Zellproliferation via Raf-Mek-ERK1/2-Kinasen (Rousseau et al., 2000).

## **1.5. Zytostatika und Inhibitoren**

In den aktuellen Studienprotokollen werden für das Medullblastom Nitroseharnstoffe, Platinderivate und Alkaloide verwendet. Im Hochdosis-Chemotherapie Protokoll kommt zusätzlich Cyclophosphamid, Etoposid und Melphalan zum Einsatz.

### **1.5.1. Standardzytostatika**

Zu den Standardzytostatika in der Behandlung des Medulloblastoms zählen Platinderivate, Vincaalkaloide und Etoposid. Platinderivate sind beispielsweise Cisplatin und Carboplatin, die die DNA-Replikation durch Querverknüpfungen zweier benachbarter Guanin-Basen eines DNA-Strangs hemmen, weswegen die Struktur der DNA gestört wird und letztendlich zur Zellapoptose führt. Vincaalkaloide sind die zweite Substanzklasse, die bei der Therapie des Medulloblastoms eingesetzt werden. Sie binden an das Protein Tubulin und verhindern so die Ausbildung von Mikrotubuli, die während der Mitose für die Aufteilung der Chromosomenpaare verantwortlich sind. Etoposid wird nach der initialen Chemotherapie verwendet und ist ein Glycosid des Podophyllotoxin. Etoposid hemmt das Enzym Topoisomerase II und unterdrückt so die Entspiralisierung der DNA während der Replikation. Des Weiteren führt Etoposid zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen der DNA.

### **1.5.2. Gemcitabin**

Morfouace und Kollegen testeten 2014 über 7000 Substanzen an gentechnisch veränderten, murinen Gruppe 3-Medulloblastom-Tumorzellen und identifizierten Gemcitabin in Kombination mit Pemetrex, einem Methotrexat-Derivat, als die Kombination mit dem besten zytotoxischen Effekt. Basierend auf deren Publikation erfolgte in dieser Dissertation die Auswahl geeigneter Substanzen.



Gemcitabin (2',2'-Difluordesoxycytidin) ist ein difluoriertes Nukleosid aus Cytosin und Desoxyribose. Als Prodrug wird Gemcitabin aufgenommen und mittels einer Deoxycytidinkinase durch Phosphorylierung in die aktive Form umgewandelt. Gemcitabin-Bisphosphat und Gemcitabin-Triphosphat werden während der Replikation in die DNA eingebaut. Nach Einbau der aktiven Form kann im elongierten DNA-Strang noch ein weiteres Desoxynukleotid zugefügt werden, bevor die DNA-Polymerase unfähig ist den Strang weiter zu prozessieren. Durch diese maskierte Termination sind die Proof-reading Enzyme unfähig das eingebaute phosphorylierte Gemcitabin wieder zu entfernen und es erfolgt in der Zelle eine gesamte Inhibition der Enzyme, die für das Zellwachstum benötigt werden (Self potentiation) (Plunkett et al., 1995).

Gemcitabin kommt bei verschiedensten Tumoren zum Einsatz. Beispielsweise wird es beim Adenokarzinom des Pankreas, beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom, beim Mammakarzinom, Harnblasenkarzinom sowie zur Rezidivtherapie von Lymphomen und dem Gallengangskarzinom eingesetzt (Benavides et al., 2015; Guancial and Rosenberg, 2015; Kaye, 1998; Spielmann et al., 2001). Die Therapie mit Gemcitabin im Kindesalter wurde bisher in einer Phase II-Studie vom Europäischen Konsortium innovativer Therapie für Kinder mit Krebs (ITCC) in Kombination mit Oxaliplatin an 14 Kindern, die an einem Rezidiv-Medulloblastom erkrankten, untersucht und zeigte bei der Hälfte der Patienten ein Ansprechen der Therapie (Geoerger et al., 2011).

### **1.5.3. Axitinib**

Axitinib (AG-013736) ist ein potenter und selektiver Inhibitor aller VEGF-Rezeptoren. Das Potential, die Selektivität, die pharmakologische Aktivität und der Antitumoreffekt von Axitinib wurden in mehreren vorklinischen Modellen ausgiebig studiert (He et al., 2014; Hillman et al., 2014; Hu-Lowe et al., 2008). Axitinib inhibiert die zelluläre Autophosphorylierung von VEGF-Rezeptoren, welche zur Hemmung des Zellüberlebens und der Zellformation führen. Weiterhin wird die nachfolgende Signalkaskade durch Blockieren der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (NO-Synthase), Akt und der

extrazellulären signalregulierenden Kinase (ERK), gehemmt (Hu-Lowe et al., 2008). Axitinib hat im Jahr 2012 von der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) die Zulassung für die Behandlung des Nierenzellkarzinom erhalten (MacLean et al., 2016).

## 2. Fragestellung

Das Medulloblastom ist ein hochmaligner primitiv neuroektodermaler Tumor des zentralen Nervensystems im Kindesalter. Nach neuesten Erkenntnissen kann man das Medulloblastom aufgrund der molekulargenetischen Eigenschaften in vier Tumorentitäten einteilen. Das Gruppe 3-Medulloblastom zeigt sich als der aggressivste Subtyp aller Medulloblastome mit der schlechtesten Prognose.

Derzeit ist die Behandlung des Gruppe 3-Medulloblastom durch eine operative Tumoresektion gefolgt von einer Bestrahlungstherapie und Chemotherapie mit Nitroseharnstoffen, Platinderivaten und Alkaloide gekennzeichnet. Trotz der komplexen Behandlungsstrategien liegt die Prognose eines Patienten mit einem Gruppe 3-Medulloblastom bei 50%.

Die in Vorarbeiten etablierte Tumorzelllinie MB3W1 konnte als Medulloblastom-Zelllinie der Gruppe 3 charakterisiert werden. Sie stellt die Grundlage dieser Dissertationsarbeit dar, um die Sensitivität dieser aggressiven Tumorzellart gegenüber verschiedener Chemotherapeutika *in vitro* und in *in vivo* Versuchen zu evaluieren.

## 3. Material und Methoden

### 3.1. Material

#### 3.1.1. Reagenzien und Chemikalien

Benzylalkohol	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Benzylbenzoat	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
B-27 Supplement	Gibco (Darmstadt, Deutschland)
Carboxymethylcellulose	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
D-Luciferin	Biosynth (Staad, Schweiz)
DMEM	Gibco (Darmstadt, Deutschland)
DMEM/F-12	Gibco (Darmstadt, Deutschland)
DNase I	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	Peptrotech (Hamburg, Deutschland)
Entellan	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Fetal Calf Serum (FCS)	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF)	Peptrotech (Hamburg, Deutschland)
MEMalpha	Gibco (Darmstadt, Deutschland)
MEM Vitamins	Gibco (Darmstadt, Deutschland)
Natriumcitrat	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
n-Hexan	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

NMP	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
O.C.T.TissueTek	Sakura (Staufen, Deutschland)
Paraformaldehyd	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Penicillin	Gibco (Darmstadt, Deutschland)
Polyethylenglykol 300	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
RPMI	Gibco (Darmstadt, Deutschland)
Streptomycin	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Triton X 100	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Trypanblau	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Ursotamin	Serumwerk (Bernburg, Deutschland)
Xylavet	CP-Pharma (Burgdorf, Deutschland)

### 3.1.2. Puffer und Lösungen

- PBS (10x): NaCl (80g), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-2H<sub>2</sub>O (14,2g), KCL (2g), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2g) in 1000ml destilliertem Wasser, pH: 6,8
- PFA (4%): 4g PFA in 100ml (1x) PBS, gelöst bei 64°C, pH: 7,4
- Anästhetikum: 2ml Xylavet, 2ml Ursotamin und 21ml (1x) PBS

### 3.1.3. Zellkulturmedien

- Stammzellmedium: DMEM/F-12 Medium ergänzt mit MEM Vitamins (1x), humanes EGF (20ng/ml), humanes FGF (20ng/ml), B-27 Supplement (2%), MEM Vitamins (1%), Penicillin (100U/ml) und Streptomycin (100µg/ml)
- cRPMI-1640: RPMI-1640 Medium ergänzt mit 10% FCS, Penicillin (100U/ml) und Streptomycin (100µg/ml)

- cMEM $\alpha$ : MEMalpha Medium ergänzt mit 20% FCS, Penicillin (100U/ml) und Streptomycin (100 $\mu$ g/ml)
- cDMEM: DMEM Medium ergänzt mit 10% FCS, Penicillin (100U/ml) und Streptomycin (100 $\mu$ g/ml)

### 3.1.4. Inhibitoren

Tabelle 2: Inhibitoren und Zytostatika, die für Toxizitätsversuche und Tierversuche verwendet wurden.

Inhibitor	Zielproteine	Erworben von
AS-605240	PI3K $\gamma$	Selleckchem
Axitinib	VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PDGFR $\beta$ , c-Kit	Selleckchem
A66	PI3K p110 $\alpha$	Selleckchem
Bevacizumab (mAb)	VEGF-A	Apotheke der Universitätsklinik Würzburg
BEZ-235	PI3K p110 $\gamma/\beta/\delta$ , mTOR	Selleckchem
Cabozantinib	VEGFR2, c-Met, Ret, Klt, Flt1/3/4, Tie2, AXL	Selleckchem
CAL-101	PI3K p110 $\delta$	Selleckchem
Cediranib	VEGFR, c-Kit, PDGFR $\beta$ , CSF-1R, Flt3	Selleckchem
Cisplatin	DNA-Synthese	Apotheke der Universitätsklinik Würzburg
Crizotinib	cMET, ALK	Selleckchem
Cyclopamine	smo (Smotherened)-Antagonist	Selleckchem
Dinaciclib	CDK1, CDK2, CDK5, CDK9	Selleckchem

Etopophos	Topoisomerase II Inhibitor	Apotheke der Universitätsklinik Würzburg
Everolimus	mTOR	Selleckchem
Gemcitabin	DNA-Analoga	Apotheke der Universitätsklinik Würzburg
GSK-J1	H3K79 Histon-Demethylase	Tocris
GDC-0941	PI3K $\alpha/\delta$	Selleckchem
Pazopanib	VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PDGFR, FGFR, c-Kit, c-Fms	Selleckchem
Pemetrex	Antifolat für TS, DHFR und GARFT	Apotheke der Universitätsklinik Würzburg
PI-103	PI3K p110 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$	Selleckchem
Quirzatinib	Flt3, KIT, PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$ , RET, CSF-1R	Selleckchem
TGX-221	PI3K p110 $\beta$	Selleckchem
3-Methyl- adenin	Vps34, PI3K $\gamma$	Selleckchem

---



### 3.1.5. Antikörper

Tabelle 3: Humane und murine Antikörper, die für FACS und Immunhistochemiefärbungen verwendet wurden.

Antikörper	Clone	Konjugation	Spezies	Erworben bei
Annexin V		Alexa647	Human	Biolegend
Caspase 3	C92-605	PE	Human	Cell Signaling
Caspase 9	Polyklonal	Unkonjugiert	Human	Cell Signaling
CD15	W6D3	Biotin	Human	Biolegend
CD15	W6D3	Alexa488	Human	Biolegend
CD31	WM59	Alexa488	Human	Biolegend
CD34	581	Alexa647	Human	Biolegend
CD105	MJ7/18	Alexa488	Maus	Biolegend
CD133.1	AC133	APC	Human	Miltenyi
CD171	eBio5G3	APC	Human	eBioscience
CD304	12C2	Alexa647	Human	Biolegend
CD309	7D4-3	Alexa647	Human	Biolegend
F4/80	BM8	Alexa647	Maus	Biolegend
HIF-alpha	546-16	Alexa647	Human	Biolegend
Ki67	Ki-67	PE/Dazzle594	Human	Biolegend
Synaptophysin	EP10	APC	Human	Antikörper- online.de
VEGF-R-3	9D9F9	APC	Human	Biolegend
VEGF-R-1	49560	APC	Human	R&D systems

Sekundäre Reagenzien wie Streptavidin-konjugierter AlexaFluor® 546 und AlexaFluor® 647 wurden bei Invitrogen erworben (Karlsruhe, Deutschland).

**3.1.6. Kits**

Avidin-Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)
Vektashield mounting medium	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)
Hypoxyprobe <sup>TM</sup> -1 Kit	Hypoxyprobe (Burlington, USA)
Human VEGF-A Platinum ELISA	eBioscience (Frankfurt, Deutschland)
LIVE/DEAD® Fixable Blue	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Dead Cell Stain Kit	
In Situ Cell Death Detection Kit	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
ROS Detection Assay Kit	Abcam (Berlin, Deutschland)

**3.1.7. Verbrauchsmaterialien**

6-Well Flachboden Zellkulturplatte	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland) oder Sarstedt (Newton, USA)
96-Well Rundboden Zellkulturplatte	Sarstedt (Newton, USA)
5, 15, 25 ml Einmalpipetten	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
10 µl Spitzen	Sarstedt (Newton, USA)
200µl Spitzen	Sarstedt (Newton, USA)
1000 µl Spitzen	Sarstedt (Newton, USA)
Cryomolds	Sakura (Staufen, Deutschland)
SuperFrost Objektträger	R. Langenbrinck (Emmendingen, Deutschland)

U-100 Insulinspritzen	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
5, 10, 15ml Spritzen	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)

### 3.1.8. Mäuse

Für die Tierexperimente wurden weibliche Nod.CB-17-Prkdc<sup>-scid</sup>/J Mäuse im Alter von 8-10 Wochen verwendet. Die Mäuse im genetischen Non-obese-diabetes Hintergrund sind homozygot für die „Severe Immune Deficiency Spontaneous“ Mutation, die charakterisiert ist durch ein Fehlen von funktionellen T-Zellen und B-Zellen sowie einer Lymphopenie und Hypogammaglobulinämie. Diese Eigenschaften sind entscheidend für das Anwachsen humaner Tumorzellen in der Maus. Die Tiere wurden von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) erworben und in einer IVC-Anlage im Tierstall des Zentrums für experimentelle molekulare Medizin (ZEMM) gehalten. Der Tierstall unterliegt einem 12 Stunden Licht-Dunkelrhythmus. Alle Tierexperimente wurden bei der Regierung von Unterfranken unter dem Aktenzeichen 55.2-DMS-2532-2-42 genehmigt.

### 3.1.9. Tumorzelllinien

Tabelle 4: Verschiedene Medulloblastom Tumorzelllinien und deren Eigenschaften.

Bezeichnung	Untergruppe	Wachstums- Eigenschaften	Medium	Literaturangaben
MB3W1	Gruppe 3	Sphären	SZM	Dietl et al. (2016)
HD-MB03	Gruppe 3	semiadhärent	cRPMI	Milde et al. (2012)
D341 MED	Gruppe 3	semiadhärent	cMEM $\alpha$	Friedman et al. (1988)

---

DAOY	SHH	adhärent	cDMEM	Jacobsen et al. (1985)
CHLA-01R	Gruppe 4	Sphären	SZM	(Xu et al., 2015b)

---

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Tumorzelllinien und deren Kultivierung

Als Grundlage für alle Versuche wurden folgende 5 Medulloblastom-Zelllinien verwendet: MB3W1, DAOY, D341 MED, HD-MB03 und CHLA-01R. D341 MED und CHLA-01R wurden von der American Type Culture Collection (VA, USA) erworben. Die Tumorzelllinie HD-MB03 wurde vom Leibniz-Institut für Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Deutschland) erworben. MB3W1 wurde in unserem Labor aus einem malignen Pleuraerguss eines Patienten etabliert und mit dem Vektor FUGLW transduziert (Dietl et al., 2016). Der Vektor enthält Gene für das grün-fluoreszierende Protein (GFP) und Luziferase, ein Enzym aus dem amerikanischen Glühwürmchen (*Photinus pyralis*), welches durch Lichtanregung fluoresziert. Die Medulloblastom-Zelllinie DAOY wurde freundlicherweise von Prof. C. Hagemann (Neurochirurgie, Universitätsklinikum Würzburg) zur Verfügung gestellt. Alle Tumorzellen wurden bei 37°C und 5% Kohlenstoffdioxidgehalt in Zellkulturinkubatoren kultiviert.

### 3.2.2. Inhibitoren und Zytostatika

Cisplatin, Gemcitabin, Pemetrex und Etopophos wurden durch die Apotheke der Universitätsklinik Würzburg bereits in gelöstem Zustand bezogen. Alle anderen Inhibitoren und Zytostatika wurden bei Selleckchem (München, Deutschland) erworben. Die Inhibitoren von Selleckchem wurden für die in vitro Versuche entsprechend dem Datenblatt in DMSO gelöst. Für die

Tierexperimente wurde Axitinib in 0,5% Carboxymethylcellulose (CMC), Cediranib in 5% DMSO, 50% Polyethylenglycol 300, 5% Tween50, 40% Aqua dest und BEZ-235 in NMP und Polyethylenglykol 300 (10/90 v/v) gelöst.

### 3.2.3. Zellzahlbestimmung mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer

Nach der Aberntung und einem Waschschrift wurden die Tumorzellen zur Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer (Hartenstein, Würzburg, Deutschland) gezählt. Dafür wurden die Zellen 1:10 mit Trypanblau (1:2 mit A. dest verdünnt) verdünnt. Trypanblau wird von allen Zellen aufgenommen, jedoch nur von den lebenden Zellen wieder ausgeschleust, sodass alle toten Tumorzellen blau angefärbt sind. Nach Bestücken der Neubauer-Zählkammer mit 5-10µl wurden in einem Quadranten alle lebenden, nicht-blauen Tumorzellen mäanderförmig und unter Berücksichtigung der L-Form ausgezählt. Mit folgender Formel konnte anschließend die Zellzahl errechnet werden:

$$\text{Zellzahl} = \frac{\text{gezählte Zellen}}{\text{Anzahl ausgezählter Quadrate}} \times 10^4 \times 10 \times \text{Volumen in ml}$$

### 3.2.4. Toxizitätsversuch mit Zytostatika

Grundlegend für die folgenden Tierexperimente war eine genaue Charakterisierung der Wirkung der Zytostatika und Inhibitoren auf die Tumorzellen mit Hilfe der Bestimmung der EC50 (mittlere effektive Konzentration), welche die Menge an Zytostatika entspricht bei der 50% der Tumorzellen gestorben sind. Die EC50 wurde ermittelt, um die Toxizität verschiedener Inhibitoren und Zytostatika miteinander vergleichen zu können.

Dafür wurden 50.000 Tumorzellen in 100µl Medium in einer 96-Well-Platte ausgesät. In einer zweiten 96-Well-Platte wurde eine Verdünnungsreihe von 1M bis 0,1nM des jeweiligen Inhibitors in 8 Verdünnungsstufen hergestellt und anschließend 100µl der Inhibitor-Verdünnungslösung zu den Tumorzellen gegeben. Als Kontrolle wurde jeweils das entsprechende Lösungsmittel der

Inhibitoren verwendet. Die Mischung aus Tumorzellen und Inhibitoren wurde für 48 Stunden bei 37°C im Zellkulturinkubator inkubiert. Im Anschluss wurden die Tumorzellen gewaschen und mit LIVE/DEAD® Fixable Blue Dead Cell Stain Kit und dem monoklonalen Antikörper AnnexinV-APC für 20min bei Raumtemperatur gefärbt. Die gefärbten Zellen wurden anschließend im Durchflusszytometer gemessen. Die Analyse der apoptotischen Zellen erfolgte mit Hilfe der FlowJo Software (Tree Star, Ashland, OR) und der Prism Software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Um die alleinige Wirkung des Lösungsmittels auszuschließen, wurden alle Ergebnisse auf den Prozentsatz der lebenden Zellen der DMSO-Kontrolle bezogen. Mit Hilfe der Prism Software wurde aus den Verdünnungsreihen der Inhibitoren eine sigmoidale Kurve ermittelt, aus der die EC50 berechnet werden konnte.

### **3.2.5. Durchflusszytometrie (FACS)**

Die durchflusszytometrischen Messungen erfolgte am FACS Canto II (BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland). Die Zellen, die mit einem Fluorochrom-markierten Antikörper beladen worden waren, wurden als Einzelzellsuspension durch eine Messkammer geschleust, in der jede Zelle einzeln von einem Laser angestrahlt wird. Aufgrund des Seitwärts- und Vorwärtsstreulicht konnte anschließend die Granularität und die Größe der Zelle bestimmt werden und zusammen mit dem zurück gesandten Licht der angeregten Fluorochromen in mehreren Punktdiagrammen dargestellt werden und anschließend auch quantifiziert werden.

Für die Messung am Durchflusszytometer wurden die Zellen in eine 96-Well Platte pipettiert. Anschließend erfolgte eine 20-minütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur mit dem Antikörper und 1% fetalen Rinderserum (FCS), wobei das FCS zur Blockade der unspezifischen Bindungsstellen am Fc-Rezeptor dient. Nach einem Zentrifugationsschritt (5min, 1500rpm) erfolgte die Messung der gefärbten Zellen am FACS Canto II in einem Volumen von 200µl. Im Anschluss wurden die Daten mit der FlowJo Software (Tree Star, Ashland, OR) ausgewertet und quantifiziert.

### 3.2.6. Biolumineszenzmessung (BLI)

Die *in vivo* Biolumineszenzmessung erfolgte mit dem IVIS Spectrum CCD-Imaging System (CaliperXenogen, Alameda, CA). Dafür wurde den Mäusen eine Injektionsmischung aus Ursotamin (50µg/g), Xylavet (5µg/g) und D-Luciferin (300mg/kg) in PBS (0,1 M Phosphat-gepuffertem Salz) intraperitoneal appliziert. Nach 10-minütiger Inkubationszeit wurden die betäubten Tiere dorsal in die Messkammer des IVIS Geräts eingelegt und die Biolumineszenzaufnahmen für maximal 5 min belichtet. Das entstandene BLI-Signal des injizierten Tumors konnte detektiert und anschließend mit Living Image R4.0 (Caliper, Xenogen) und Prism Software ausgewertet werden.

### 3.2.7. VEGF-A ELISA

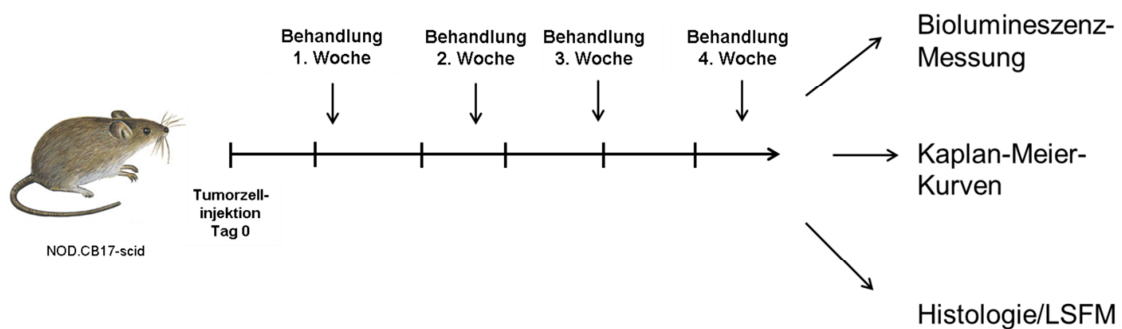
Für die Messung der VEGF-A Produktion wurde ein ELISA-Kit (eBioscience, Frankfurt, Deutschland) verwendet. Zuvor wurde  $1 \times 10^6$  Tumorzellen (MB3W1) in einer 6-Well-Platte für 24h, 48h und 72h mit ausgewählten Inhibitoren (EC50, EC75) inkubiert. Ebenso wurden je 1.000.000 der Tumorzelllinien CHLA-01R-MED, DAOY, D341 MED und HD-MB03 für 24h inkubiert. Nach der Gewinnung des Überstands wurde dieser bei -20°C eingefroren.

Die mit monoklonalen VEGF-A Antikörper beschichtete 96-Well Platte wurde für 2h mit dem Überstand der Tumorzellen inkubiert. Zu gleicher Zeit wurden ebenfalls eine Standardkontrolle, Blank-Kontrolle und eine Kontrolle der jeweiligen Zellkulturmedien mitgeführt, durch diese nach Auswertung des ELISAs die Konzentration der Proben berechnet werden konnte. Nach einem Waschschrift wurde für 1 Stunde ein monoklonaler, anti-VEGF-A Antikörper, der zusätzlich mit Biotin markiert war, dazugegeben, der in der Inkubationszeit an das gebundene VEGF-A binden konnte. Nach einem weiteren Waschschrift wurde die Probe für 60min mit einem Streptavidin-HRP-Komplex (Horse redish peroxidase) inkubiert. Nach Zugabe des Substrats (Tetramethyl-Benzidin) kam

es zu einem Farbumschlag, der nach Abstoppen mit einer 1M Phosphorsäure durch den ELISA-Reader fotometrisch bei 450nm gemessen werden konnte.

### 3.2.8. Mausmodell

In den Tierexperimenten wurden 8 - 10 Wochen alte, weibliche Nod.CB-17.scid Tiere verwendet. An Tag 0 erfolgte die Injektion der Tumorzellen in die rechte Flanke bzw. intrakraniell ins Kleinhirn. Nach 4 bzw. 11 Tagen begann die vierwöchige Behandlung der Tiere mit den verschiedenen Zytostatika und Inhibitoren (siehe Tabelle: Behandlungsplan). Regelmäßige Gewichtskontrollen, Messung der Tumorgöße mit Hilfe des Messschiebers und Biolumineszenzmessungen, die das Wachstum des Tumors detektieren, wurden dreimal pro Woche durchgeführt.



**Abbildung 3: Versuchsaufbau für die Tierversuche.**

Im subkutanen Tumormodell wurden Versuchstiere bei einer Tumorgöße von 0,5 cm euthanasiert. Im intrakraniellen Tumormodell wurde der Versuchsendpunkt durch ein BLI-Signal von  $1 \times 10^{10}$  Photonen/s definiert, bzw. im Falle klinischer Symptome der Maus wie spontaner Gewichtsverlust, Hydrozephalus und Apathie, was aber in keinem der Experimente auftrat. Der Tumor wurde von euthanasierten Mäusen herauspräpariert und entweder für die histologische Untersuchung mit O.C.T. in Cryomolds eingebettet oder in Paraformaldehyd (4% PFA) für die Lichtblattnmikroskopie für 2h fixiert und anschließend in PBS bei 4° C gelagert.



Tabelle 5: Behandlungsplan für die Tierexperimente.

Zytostatika/		Lösungsmittel	Applikationsart
Dosierung			
<b>Inhibitor</b>			
Axitinib	25mg/kg	0,5% Carboxymethylcellulose	oral, 5x Woche
BEZ-235	35mg/kg	NMP/PEG300	oral, 5x Woche
Cediranib	6mg/kg	5%DMSO, 50% PEG300, 5% Tween, 40% A. dest	oral, 5x Woche
Cisplatin	5mg/kg	Wasser für Injektionszwecke	i. p., 1x Woche
Etopophos	15mg/kg	Wasser für Injektionszwecke	i. p., 1x Woche
Gemcitabin	30mg/kg	Wasser für Injektionszwecke	i. p., 1x Woche
Pemetrex	200mg/kg	0,9% Natriumchlorid	i. p., 1x Woche

(i.p. = intraperitoneal)

### 3.2.9. Subkutane Tumorzellinjektion

Für die subkutane Injektion der Tumorzellen wurden die Mäuse mit einer Injektionsmischung aus Ursotamin und Xylavet narkotisiert. Anschließend wurden  $1 \times 10^6$  Tumorzellen (MB3W1) in 100µl PBS subkutan in die rechte Flanke des Tieres injiziert.

### 3.2.10. Intrakranielle Tumorzellinjektion

Für die intrakranielle Injektion von Tumorzellen wurden die Versuchstiere mit Ursotamin und Xylavet narkotisiert. Nach Reflexprüfung zur Sicherstellung einer tiefen Narkose und eingehender Desinfektion wurde die Maus nun in Bauchlage in eine stereotaktische Apparatur für Gehirnopoperationen eingespannt. Anschließend wurde ein Hautschnitt auf Augenhöhe bis Ohrhöhe parasagittal durchgeführt. An der genau definierten Stelle (2mm lateral und 2mm kaudal

vom Lambda, Kreuzung der Sagittal- und Lambdanaht) wurde mittels eines Bohrers ein Trepanationsloch gebohrt, durch das im Anschluss 5.000 Tumorzellen in 3µl PBS mit einer 26G Hamilton-Nadel intrazerebral injiziert wurden. Im Anschluss wurde das Bohrloch mit Knochenwachs versiegelt und die Hautwunde mit einer Einzelknopfnahnt verschlossen. (Messier et al., 1999).

### **3.2.11. Immunfluoreszenzfärbung für histologische Analyse (IFM)**

Für die Herstellung der histologischen Präparate am Kryotom, wurde der Tumor bzw. das Gehirn sofort nach der Präparation aus dem Versuchstier in O.C.T. TissueTek eingebettet und auf Trockeneis bzw. bei -20°C eingefroren. Anschließend wurden am Kryotom 3µm dicke Gewebeschnitte hergestellt und auf Superfrost Objektträger gezogen, die weiter bei -20°C gelagert werden konnten. Nach 10-minütigem Auftauen der Gewebeschnitte wurden diese für 7 Minuten mit Aceton fixiert und anschließend mit 1% PBS (3x5min) gewaschen. Zur Blockade von unspezifischen Bindungsstellen wurden die Gewebeschnitte für 15min mit der Blockierungslösung (PBS + 2% FCS) bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss der monoklonale, Fluorochrom-markierte Antikörper für 60 Minuten bei Raumtemperatur dazu pipettiert. Nach einem Waschschrift mit PBS (3x5min) konnte der Gewebeschnitt mit Vectashield inklusive DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Vectashield, Vector Laboratories, Burlingame, CA) einen Kernfarbstoff, mit Hilfe eines Deckgläschens eingedeckt werden. Die Fluoreszenzmikroskopie wurde am Zeiss-Mikroskop (Axio Imager.M1, Zeiss, Jena, Deutschland) durchgeführt. Dafür wurden folgende Standardobjektive verwendet: 10x mit numerischer Apertur (NA) 0,25, 20x mit NA 0,8 und 40x mit NA 1,3 Öl. Die Ergebnisse wurden mit AxioVision 4.8 (Zeiss, Jena, Deutschland) ausgewertet.

### **3.2.12. Hypoxyprobe-1 Färbung**

Für die Darstellung der hypoxischen Regionen im Tumor wurde den Versuchstieren 60mg/kg Pimonidazol (Hypoxyprobe, Burlington, USA) intraperitoneal 75min vor der Euthanasie injiziert. Pimonidazol ist nur in

hypoxischen Zellen aktiv und stabilisiert dort kovalent gebunden Thiolgruppen in Proteinen, Peptiden und Aminosäuren, dessen Komplex wiederum durch den Hypoxyprobe-RedAPC Antikörper markiert werden kann. Nach der Injektion wurde der Tumor entnommen und in Cryomolds eingebettet. Nach der Herstellung histologischer Präparate am Kryotom wurden die Gewebeschnitte für 7min mit Aceton fixiert, anschließend für 5min Luft getrocknet und mit PBS (3x5 Minuten) gewaschen. Nach Zugabe des monoklonalen Hypoxyprobe-RedAPC-Antikörpers wurden die Gewebeschnitte bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift (3x5 Minuten mit PBS) wurden die Gewebeschnitte mit Vectashield inklusive DAPI eingedeckt.

Zur hypoxischen Darstellung im Sphäreninneren der Tumorzellen wurden diese für 1,5h mit 150µM Pimonidazol bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden mittels Zentrifugation Zytospins hergestellt und diese über Nacht mit Hypoxyprobe-RedAPC Antikörper bei 4°C inkubiert. Nach dem Eindecken mit Vectashield inklusive DAPI werden die Zytospins am Zeiss-Mikroskop (Axio Imager.M1, Zeiss, Jena, Deutschland) mikroskopiert und beurteilt.

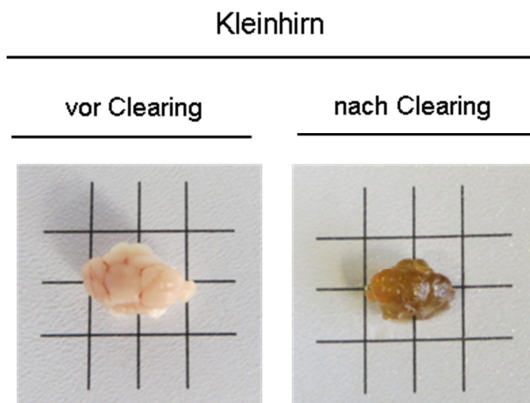
### **3.2.13. TUNEL-Färbung**

Die Apoptose von Zellen kann durch viele verschiedene Noxen ausgelöst werden. Jedoch ist bei allen Aktivierungswegen die Endstrecke der Apoptose in der Zelle gleich. Intrazellular erfolgt die Spaltung der DNA in Doppel- und Einzelstränge durch Endonukleasen. Morphologisch lässt sich eine Fragmentierung des Zellkerns darstellen. TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine-triphosphat nick end-labeling) ist eine Technik zum Nachweis von Apoptosen im konserviertem Gewebe. Dabei werden die freien DNA-Strangbrüche durch eine terminale Desoxynukleotidyltransferase mit Fluoreszein-markierter dUTP-Moleküle markiert, die später in einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden können. Für die TUNEL-Färbung zur Detektion apoptotischer Areale im Tumorgewebe wurden 3 µm dicke Gewebeschnitte für 20 min mit 4% PFA fixiert (Sigma, Deisenhofen, Deutschland). Nach einem Waschschrift (30 min

mit PBS) wurden die Zellen für 2 min in einer Permeabilitätslösung (0,5g Natriumcitrat + 0,5ml Triton X in 500ml dest. Wasser) inkubiert. Es wurden Negativ- und Positivkontrollen mitgeführt. Die Negativkontrolle wurde nur mit Label-Mix behandelt während die Positivkontrolle zuvor noch mit 100µl DNase I behandelt wurde. Nach Zugabe der Enzym-Label-Mix wurden die Gewebeschnitte für 60min bei 37°C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift konnten die Objektträger mit Vectashield inklusive DAPI eingedeckt und am Zeiss-Mikroskop (Axio Imager.M1, Zeiss, Jena, Deutschland) beurteilt werden.

### **3.2.14. Lichtblattmikroskopie der Tumore (LFSM)**

Um eine gute Gewebefärbung mittels Lichtblattmikroskopie zu erzielen, wurde den Versuchstieren 100µg monoklonaler Antikörper (Antikörper, die Tumor oder Gehirn anfärben) bzw. 20µg monoklonaler Antikörper (Antikörper, die an Blutgefäße binden) zwei Stunden vor der Perfusion intravenös injiziert. Nach Entnahme des Tumors bzw. Gehirns erfolgte die optische Clearing-Prozedur der Organe. Zuerst wurden die Organe jeweils für 2 Stunden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100% Alkohol) überführt, um diese anschließend für 2h in n-Hexan (Sigma, München, Deutschland) zu inkubieren. Im nächsten Schritt wird n-Hexan durch eine Clearing-Lösung (1 Teil Benzylalkohol und 2 Teile Benzylbenzoat, Sigma, München, Deutschland) ersetzt. Ziel dieses Schrittes war es, die Gewebeproben optisch durchsichtig zu machen, damit das Lichtblatt möglichst tief in das Gewebe eindringen kann. Für die 3D-Mikroskopie wurde ein eigens gebautes Lichtblattmikroskop benutzt, das dem bereits beschriebenen Setup entsprach (Brede et al., 2012). Nach Durchdringen eines optischen Scanners (Electro-Optical Products Crp.) entstand ein Lichtblatt, das schließlich zur Mikroskopie der durchsichtigen Proben genutzt wurde. Nach der Aufnahme eines Multicolor Stacks, der 1 bis 5µm dicke optische Schnitte unterschiedlicher Wellenlängen enthielt, wurden die Proben mit Imaris Software (Version 7.7.2, Bitplane, Zürich, Schweiz) weiter prozessiert und analysiert.



**Abbildung 4: Darstellung des Clearings am Kleinhirn.**

### **3.2.15. Statistik**

Alle Ergebnisse dieser Arbeit sind als Mittelwert der Standardabweichung dargestellt. Zuerst wurde die Normalverteilung der einzelnen Daten mit dem Kolmogorov-Smirnov Test berechnet. Im Anschluss wurde die Signifikanz der Daten mit Normalverteilung mit dem ungepaarten bzw. gepaarten Student's t-test und die Daten berechnet. Die Signifikanz der nicht normalverteilten Daten wurde mit Hilfe des Mann-Whitney Test analysiert. Für die Auswertung der Tierexperimente erfolgte die Berechnung der Statistik mit Hilfe des two-way ANOVA Tests. In den Abbildungen erfolgte lediglich die Darstellung signifikanter Daten.

## 4. Ergebnisse

Das Medulloblastom ist ein hochmaligner Tumor im zentralen Nervensystem des Kindesalters mit einer Gesamtüberlebensprognose von 63% nach 3 Jahren (Massimino et al., 2016). Nach neueren Erkenntnissen lässt sich das Medulloblastom aufgrund molekulargenetischer Eigenschaften in vier Tumorentitäten einteilen, wobei das Gruppe 3-Medulloblastom zu den aggressivsten Subtypen mit der schlechtesten Prognose zählt. Die aus einem malignen Pleuraerguss gewonnenen Tumorzellen eines Gruppe 3-Medulloblastom Patienten konnten erfolgreich kultiviert und charakterisiert werden (Dietl et al., 2016) und bildeten die Grundlage für die experimentelle Arbeit in Rahmen dieses Dissertationsprojekts, um die Sensitivität gegenüber verschiedenen neuartigen Chemotherapeutika zu testen.

### 4.1. Effekt der Zytostatika auf die Tumorzellen *in vitro*

Bei der Auswahl der Zytostatika halfen uns Vorarbeiten von Morfouace und Kollegen, die ein Screening von 7.000 Substanzen an einer murinen, gentechnisch modifizierten Gruppe 3-Medulloblastom-Tumorzelllinie durchgeführt hatten und Gemcitabin und Pemetrex als die beste Kombination identifizieren konnten (Morfouace et al., 2014). Als Vergleichsgruppe wählten wir die Kombination aus Cisplatin und Etoposid, da diese beiden Zytostatika in den aktuellen Studienprotokollen die Basis der Therapie darstellen. Um den toxischen Effekt der Zytostatika auf die mit Luziferase transduzierten Tumorzellen zu untersuchen, inkubierten wir 23 verschiedene Zytostatika für 48h mit den Tumorzellen und analysierten anschließend die Vitalität der Tumorzellen mittels Durchflusszytometrie oder Biolumineszenzmessung (Abb. 4A und 4B), um daraus die effektive Dosis zu berechnen, bei der 50% der Zellen in einem Well abgestorben sind. Es wurde je Versuchsansatz für die Behandlung mit Einzelzytostatika oder der Kombination zweier Zytostatika eine  $EC_{50}$  berechnet, um diese dann miteinander zu vergleichen. In unseren

Untersuchungen konnten wir zeigen, dass Gemcitabin alleine mit einer  $EC_{50}$  von 5,82 nM, aber auch in Kombination mit anderen Zytostatika, wie beispielsweise Gemcitabin/GSKJ1 ( $EC_{50}=1,5nM$ ), Gemcitabin/BEZ235 ( $EC_{50}=0,06nM$ ) oder Gemcitabin/A66 ( $EC_{50}=2,59nM$ ), eine niedrigere  $EC_{50}$  als die Kombination aus Cisplatin und Etoposid ( $EC_{50}$  808,3nM) hat. Im direkten Vergleich von Gemcitabin mit der Standardtherapie zeigte sich eine 160-fach niedrigere  $EC_{50}$ , damit war Gemcitabin in vitro deutlich toxischer gegenüber den Tumorzellen als die Kombination mit Cisplatin und Etoposid (Abb. 4C und 4D).

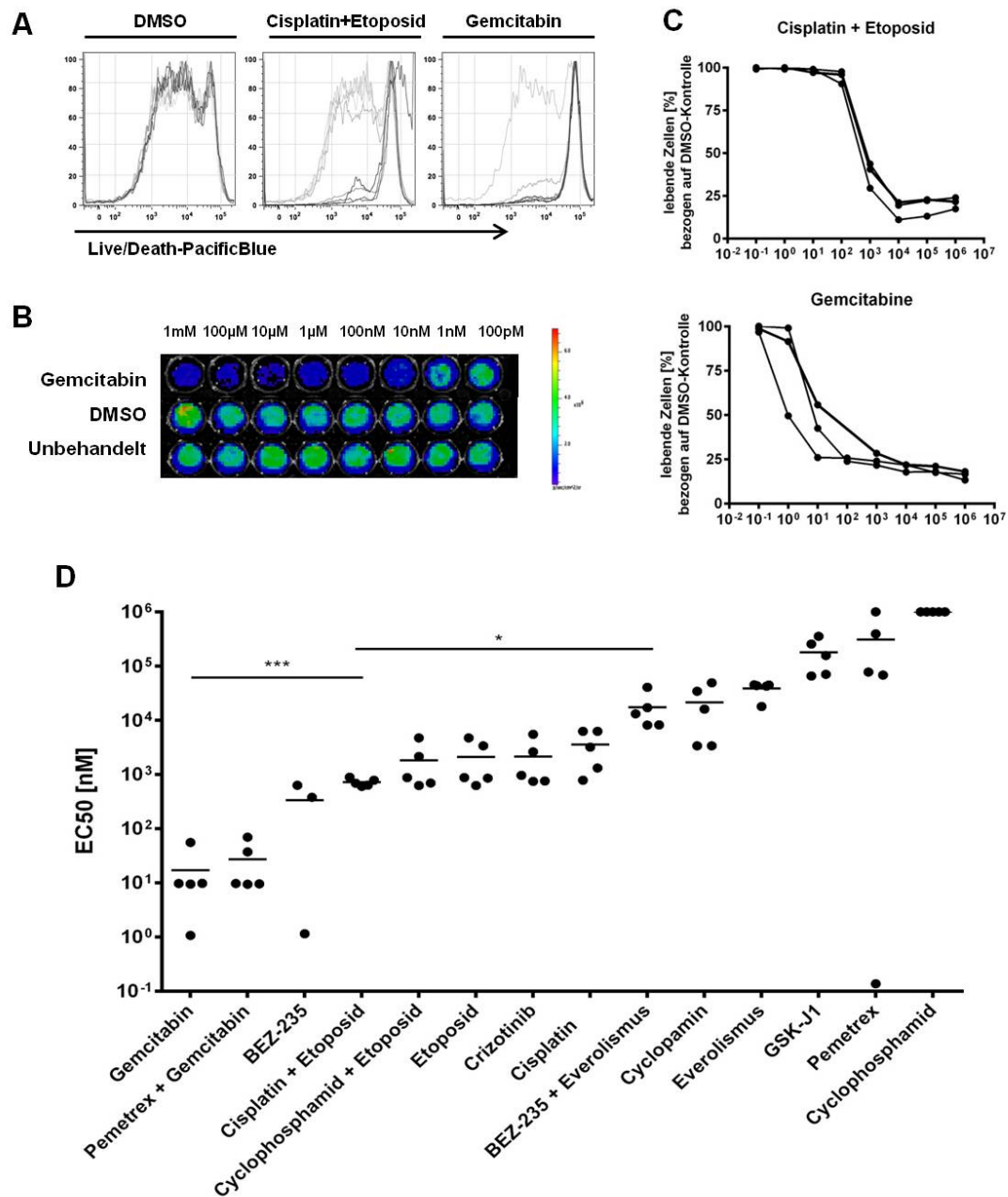


Abbildung 5: Darstellung der Toxizitätsversuche mit den Zytostatika. MB3W1 wurde mit verschiedenen Zytostatika für 48h inkubiert und anschließend die lebenden Zellen mit BLI-Messung oder FACS-Analyse bestimmt. A: FACS-Analyse der mit Lebend/Tot-Farbstoff gefärbten Tumorzellen mit Standardtherapie- und Gemcitabin-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle mit dem Lösungsmittel DMSO. B: Darstellung des BLI-Signals einer Verdünnungsreihe mit verschiedenen Zytostatika im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle. C: Sigmoidaler Kurvenlauf der einzelnen Zytostatika. D:  $EC_{50}$  Darstellung einer Auswahl an Zytostatika in Einzeldosis oder in Kombination.  $n=5$ . Ungepaarter students's t-test. \*,  $p=0,0243$ , \*\*\*,  $p<0,0001$ .



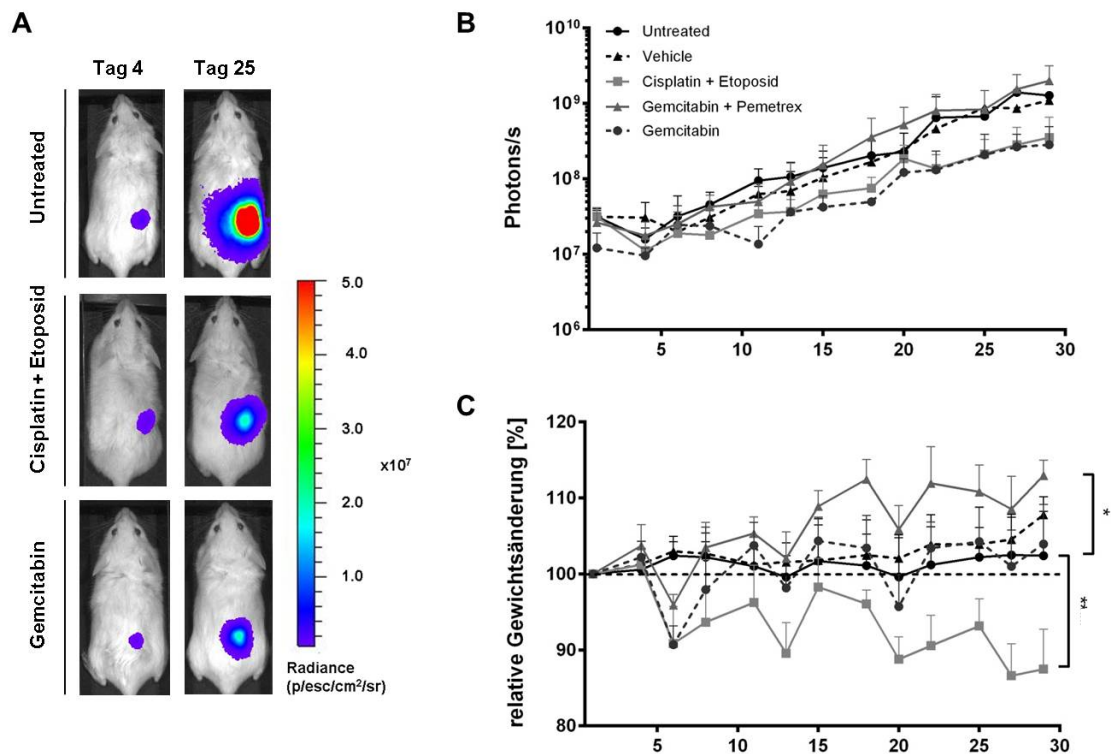
Tabelle 6: Ermittelte EC<sub>50</sub> der verschiedenen Einzelsubstanzen und Kombinationen.

<b>Zytostatika – Einzel</b>	<b>EC<sub>50</sub> [nM]</b>	<b>Zytostatika – Einzel</b>	<b>EC<sub>50</sub> [nM]</b>
Pemetrex	152612,0	A66	25400,4
Gemcitabin	5,82	TGX-221	43167,6
GSK-J1	59041,9	AS-605240	7358,3
Dinaciclib	41200,9	CAL-101	94710,6
Etopophos	9251,1	PI-103	2192,6
Everolimus	15248,7	3-Methyladenin	285714,3
Cyclopamin	7676,3	Pazopanib	51824,5
Cisplatin	4956,3	Axitinib	1461,7
Crizotinib	1282,0	Cediranib	549,6
GDC-0941	208610,7	Cabozantinib	104398,4
BEZ235	83595,6	Quirzatinib	9635,6
<b>Zytostatika – Kombinationen</b>	<b>EC<sub>50</sub> [nM]</b>	<b>Zytostatika – Kombinationen</b>	<b>EC<sub>50</sub> [nM]</b>
GSKJ1 + Gemcitabin	1,5	Cabozantinib + Etoposid	1222

Pemetrex + Gemcitabin	4,18	Pazopanib + Etoposid	1240,29
Gemcitabin + Cisplatin	165,6	AS-605240 + Cisplatin	504,43
Cisplatin + Etoposid	808,3	BEZ-235 + Cisplatin	1795,71
Axitinib + Gemcitabin	0,03	PI-103 + Etoposid	1497,43
BEZ235 - Gemcitabin	0,06	AS-605240 + Etoposid	1791,86
TGX-221 + Gemcitabin	0,13	BEZ-235 + Etoposid	2102,43
Cediranib + Gemcitabin	0,28	A66 + Etoposid	1827,29
Gemcitabin + Etoposid	2,92	CAL-101 + Etoposid	2405
A66 + Gemcitabin	2,59	GDC-0941 + Cisplatin	2501,36
Cabozantinib + Gemcitabin	11,45	GDC-0941 + Gemcitabin	7858,85
Pazopanib + Gemcitabin	11,47	GDC-0941 + Etoposid	6079,71
CAL-101 + Gemcitabin	57,72	PI-103 + Cisplatin	9869,71
AS-605240 + Gemcitabin	73,82	PI-103 + Gemcitabin	7581,29
A66 + Cisplatin	85,80	BEZ-235 + Axitinib	100,87
Axitinib + Cisplatin	187,11	Crizotinib + Gemcitabin	58,83
Cediranib + Cisplatin	249,71	Crizotinib + Etoposid	189,84
Cabozantinib + Cisplatin	210,77	Dinaciclib + Cisplatin	16664,71
CAL-101 + Cisplatin	235,85	Dinaciclib + Gemcitabin	157142,86
Axitinib + Etoposid	525,68	BEZ-235 + Everolimus	5530,71
TGX-221 + Cisplatin	635,69	Gemcitabin + Cyclopamin	115,15
Pazopanib + Cisplatin	748	Gemcitabin + Quirzatinib	28,9

## 4.2. Testung von Gemcitabin und Pemetrex im subkutanen Tumormodell

Im zweiten Schritt testeten wir die besten Kandidaten aus den *in vitro* Toxizitätsversuchen im subkutanen MB3W1-Tiermodell. Dazu zählten Gemcitabin in Kombination mit Pemetrex (200mg/kg) und Gemcitabin (30mg/kg) in Kombination mit Cisplatin (5mg/kg). Als Kontrolle verwendeten wir jeweils die Zytostatika alleine, die Kombination aus Cisplatin (5mg/kg) und Etoposid (15mg/kg) als Standardtherapie und eine Vehicle Gruppe, die einen Effekt des Lösungsmittels der Zytostatika ausschließen sollte. Für die optimale Dosis in der Maus orientierten wir uns an der aktuellen Literatur und führten ebenso in einem Vorversuch eine Titrationsreihe *in vivo* durch (Daten nicht gezeigt). Da Etoposid von der Firma Selleckchem weniger gut von den Mäusen toleriert wurde, verwendeten wir für alle weiteren Tierversuche Etoposid an dem ein zusätzliche Phosphatgruppe kovalent gebunden ist. Etopophos wurde aus der Apotheke der Universitätsklinik Würzburg bezogen. Ab einer gemessenen Tumorgröße von 0,5 cm wurde die Maus euthanisiert und der Tumor für die histologische Analyse entnommen. Gemcitabin zeigte auch im subkutanen Tiermodell eine Reduktion der Tumorlast im Vergleich zu der Vehicle-Gruppe. Allerdings erbrachte Gemcitabin in Kombination mit Cisplatin oder Pemetrex keinen besseren tumor-reduzierenden Effekt als die Standardtherapie mit Cisplatin und Etoposid (Daten nicht gezeigt). Die Tiere, die mit Cisplatin/Etoposid behandelt wurden verloren während der Therapie mehr an Gewicht, als die Vergleichsgruppen (Cisplatin/Etoposid vs. Vehicle  $p=0,0038$ ). Die Versuchsgruppe die nur Gemcitabin erhalten hat, konnte das Ausgangsgewicht halten bzw. sogar während der Behandlung an Gewicht zunehmen. Daraus lässt sich schließen, dass die Standardtherapie schlechter toleriert wird und die Tiere unter der Standardtherapie mehr leiden mussten, als die Vergleichsgruppen.



**Abbildung 6: Zytotoxische Therapie der subkutanen Tumoren in der Maus.** Es wurden  $1 \times 10^6$  Tumorzellen in die rechte Flanke von Nod.CB17-scid Mäusen an Tag 0 injiziert. Ab Tag 4 wurde den Tieren einmal wöchentlich in 4 aufeinanderfolgenden Zyklen mit den ausgewählten Zytostatika injiziert. In regelmäßigen Abständen wurde das Tumorstadium mit BLI kontrolliert. **A:** Exemplarische Darstellung des BLI-Signals von drei Mäusen zu Beginn der Therapie und im Verlauf an Tag 25. **B:** Quantitative Analyse des BLI-Signals der unterschiedlich behandelten Tiere.  $n=5$ . **C:** Relativer Gewichtsverlust der unterschiedlich behandelten Tiere. Two-way ANOVA Test, Vehicle vs. Cisplatin/Etoposid \*\*  $p=0,0038$ , Vehicle vs. Gemcitabin/Pemetrex \*,  $p=0,0268$ .

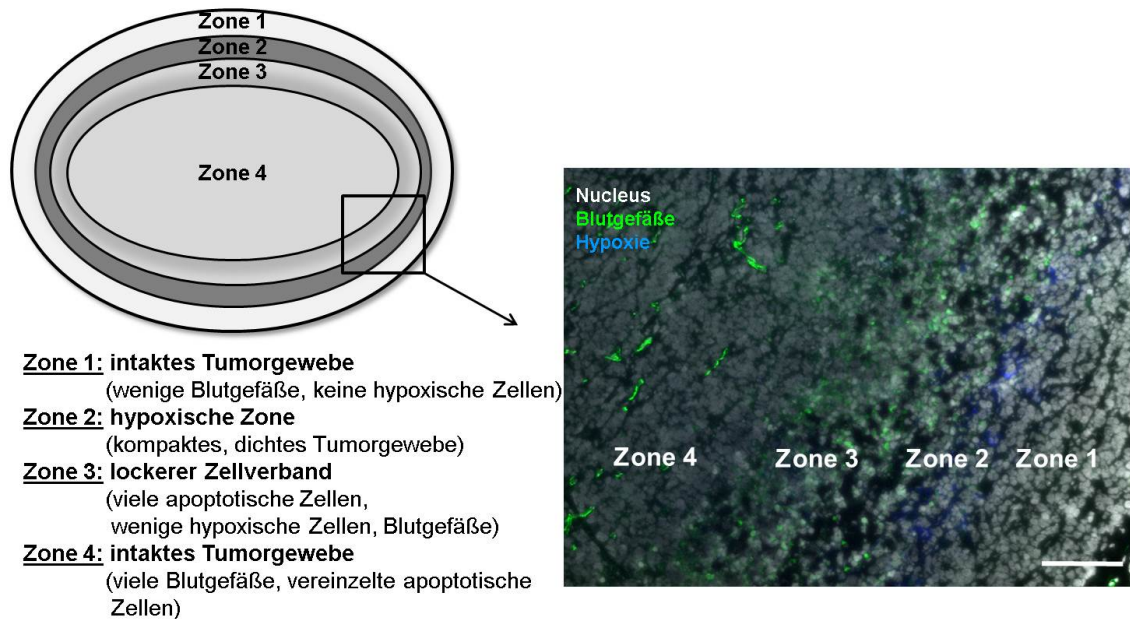
### 4.3. Beobachtung einer Zonenbildung im subkutanen Tumor

Bei einigen Mäusen sollte am Endpunkt des Versuches die genauere Tumorarchitektur und vor allem hypoxische und nekrotische Areale des subkutanen Tumors charakterisiert werden. Dazu wurde den Tieren aus der Vehicle-Gruppe Pimonidazol injiziert und nach einer 1,25-stündigen Inkubationszeit der Tumor entnommen.

Pimonidazol ist ein Reagenz, das nur in sauerstoffarmen Bereichen des Tumors an Proteine, Peptide und Aminosäuren binden kann und dann *ex vivo* mit Hilfe eines Sekundärantikörpers detektiert werden kann. Für den Nachweis

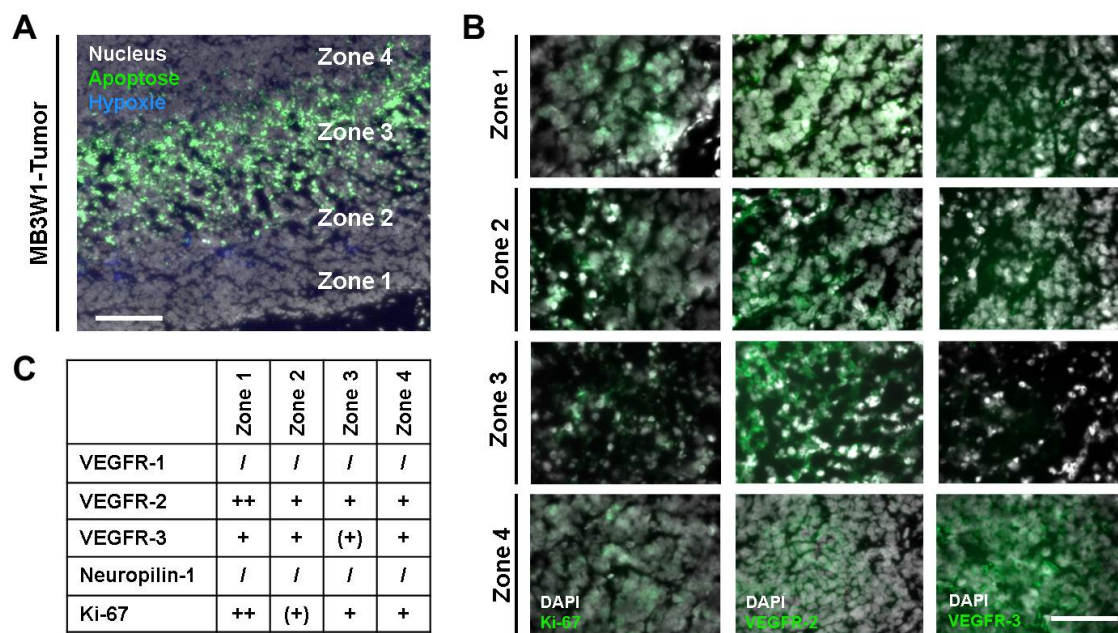
apoptotischer Bereiche im Tumor färbten wir die histologischen Präparate mit dem Enzym terminale Desoxynucleotidyltransferase (TdT), das an den Bruchenden in apoptotischen Zellen fluoreszenzmarkierte Nukleotide synthetisiert und diese dann im entsprechenden Fluoreszenzmikroskop detektiert werden kann.

Mit diesen Analysen konnten wir im subkutanen Tumor vier verschiedene Zonen der Gewebearchitektur charakterisieren (Abb. 7). In Zone 1 zeigt sich vor allem ein intaktes, homogenes Tumorgewebe mit sehr wenigen Blutgefäßen, während in Zone 2 ausschließlich hypoxische Tumorzellen vorhanden sind. Die Zone 3 stellte sich als lockerer Zellverband dar, in dem vor allem stark fluoreszierende, apoptotische Tumorzellen zu finden sind. Erst in Zone 4 zeigt der Tumor wieder intakte Gewebestrukturen und ist gekennzeichnet durch starke Vaskularisierung bis ins Tumoriinnere. Diese besondere Tumorarchitektur führt uns zu der Annahme, dass das Größenwachstum des Tumors überproportional schnell im Vergleich zum normalen Gewebe verläuft und somit die Sauerstoffversorgung und Angiogenese nicht gleichermaßen gewährleistet werden kann und deshalb in Zone 2 sehr viele hypoxische Zellen und in Zone 3 sehr viele apoptotische Zellen sind.



**Abbildung 7: Beobachtung einer Zonenbildung im subkutanen Tumor.** Als der Tumor eine Größe von 0,5 cm erreicht hatte (Endpunkt im Versuch), wurde den Tiere 60mg/kg Pimonidazol injiziert und nach 75 min das Gewebe entnommen und histologisch aufgearbeitet. Nach der Analyse der Immunfluoreszenzfärbung mit CD31-AlexaFluor488 und Hypoxyprobe-APC fiel eine Zonenbildung auf, die in der schematischen Skizze dargestellt ist. Demnach zeigt der Tumor vor allem in Zone 1 und Zone 4 intaktes Tumorgewebe, jedoch besonders im Tumorrinneren starke Blutgefäßbildung. Die Zone 2 ist definiert durch Hypoxie und in Zone 3 findet sich lockeres Tumorgewebe das stark apoptotisch ist (Maßstab: 100µm).

Nach einer Immunfluoreszenzfärbung des subkutanen Tumors mit VEGFR-2, bei der initial die Blutgefäße detektiert werden sollten, fiel auf, dass vor allem die Tumorzellen positiv für den VEGFR-2 waren. Dies konnte in der folgenden FACS-Analyse bestätigt werden. In der anschließenden histologischen Analyse der Tumore zeigte sich eine VEGFR-2 und VEGFR-3 Expression in allen vier Zonen, jedoch keine VEGFR-1 oder Neuropilin-1 Expression. Die Tumorzellen waren in Zone 1 stark positiv gefärbt für Ki-67, jedoch zeigten auch alle anderen Zonen eine positive Expression des Proliferationsmarkers. Ki-67 ist ein Protein, welches sich während der G1-, S- und Mitosephase des Zellzyklus auf die Oberfläche der Chromosomen anlagert und detektiert werden kann. In der G0-Phase von ruhenden Zellen ist es nicht vorhanden, weswegen es ein guter Marker für die proliferierende Fraktion einer Zellpopulation darstellt.



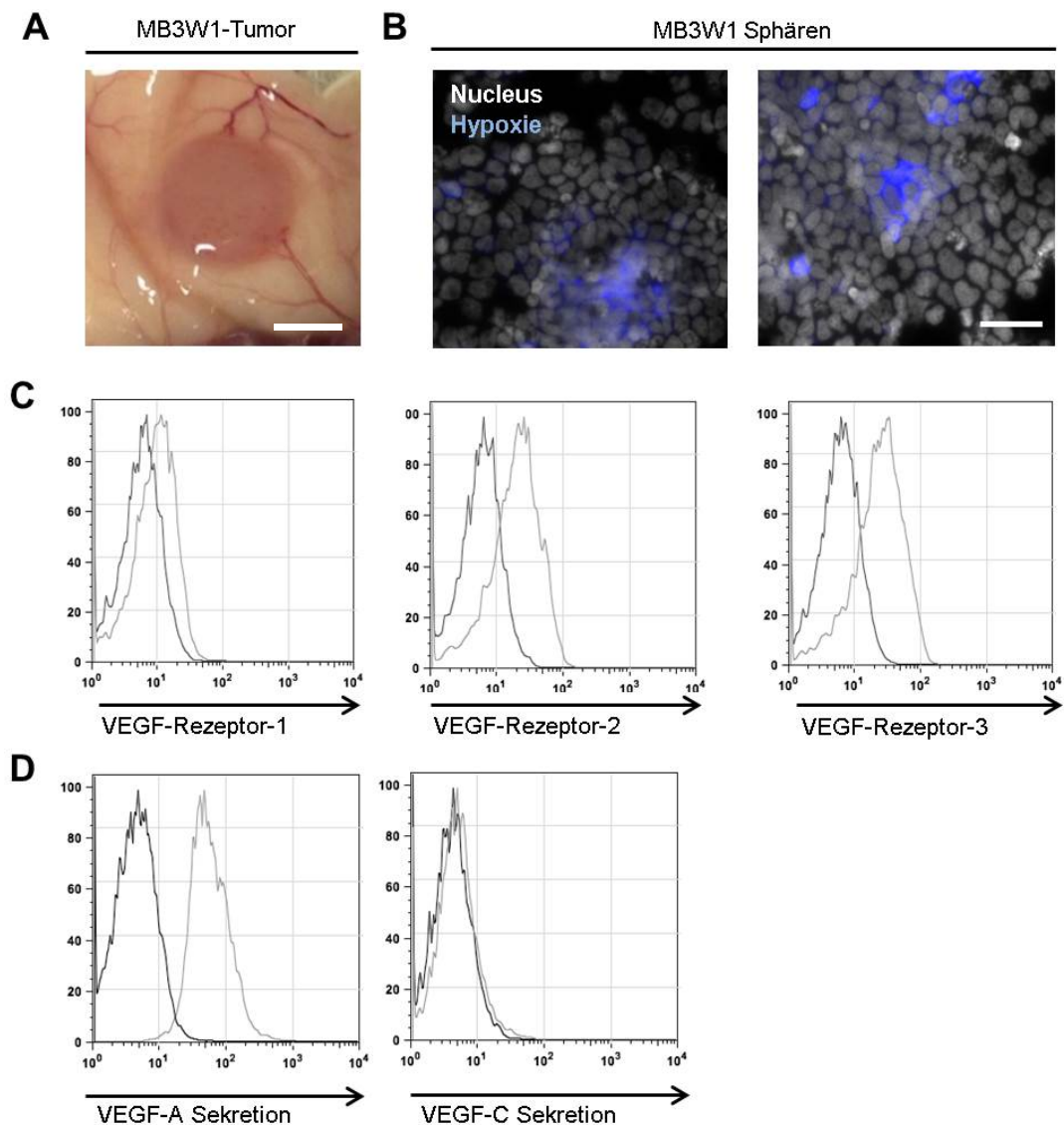
**Abbildung 8: Immunfluoreszenzfärbungen der verschiedenen Zonen des subkutanen Tumors.** **A:** Simultane TUNEL-Färbung und Hypoxie-Färbung mit Hypoxyprobe-1 im subkutanen MB3W1-Tumor zur Darstellung der Zonenbildung (Maßstab: 100µm). **B:** Exemplarische Darstellung der Immunfluoreszenzfärbung der Zonen im subkutanen MB3W1-Tumor mit dem Proliferationsmarker Ki-67, VEGFR-2 und VEGFR-3 (Maßstab: 25µm). **C:** Tabelle über die Charakterisierung der verschiedenen Zonen im subkutanen MB3W1-Tumor durch Immunfluoreszenzfärbungen.

#### 4.4. Charakterisierung der VEGF-Sekretion und VEGFR-Expression

Aus früheren histologischen Untersuchungen ist bekannt, dass das Medulloblastom stark vaskularisiert ist (Grotzer et al., 2001; Huber et al., 2001; Ozer et al., 2004). Auch in unserem Tumormodell fiel uns während der Präparation auf, dass der Tumor stark mit Blutgefäßen durchsetzt ist (Abb. 8A). In einer immunhistologischen Färbung der Blutgefäße fiel uns auf, dass nicht nur die Blutgefäße im Tumor, sondern auch die Tumorzellen selbst VEGFR-2 und VEGFR-3 exprimieren (Abb. 8C). Die anschließende FACS-Analyse zeigte, dass die MB3W1-Tumorzellen alle drei VEGF-Rezeptoren exprimieren und auch selbst VEGF-A, jedoch nicht VEGF-C produzieren (Abb. 8D). Damit lag die Schlussfolgerung nahe, dass die Tumorzellen unter anderem durch VEGF-A stimuliert werden.

Im nächsten Schritt konnten wir zeigen, dass die kultivierten Tumorsphären, vor allem im Inneren hypoxisch sind. Dafür inkubierten wir für 75min die Tumorzellen mit Pimonidazol, ein Reagenz, welches nur in hypoxischen Arealen an Aminosäuren, Peptide und Proteine binden kann, und konnten dann die hypoxischen Bereiche innerhalb der Zellen mit einem Sekundärantikörper detektieren (Abb. 8B). Möglicherweise war die Sauerstoffarmut im Sphäreninneren der Tumorzellen ein Grund für die Hochregulierung der VEGF-Rezeptoren *in vitro*.





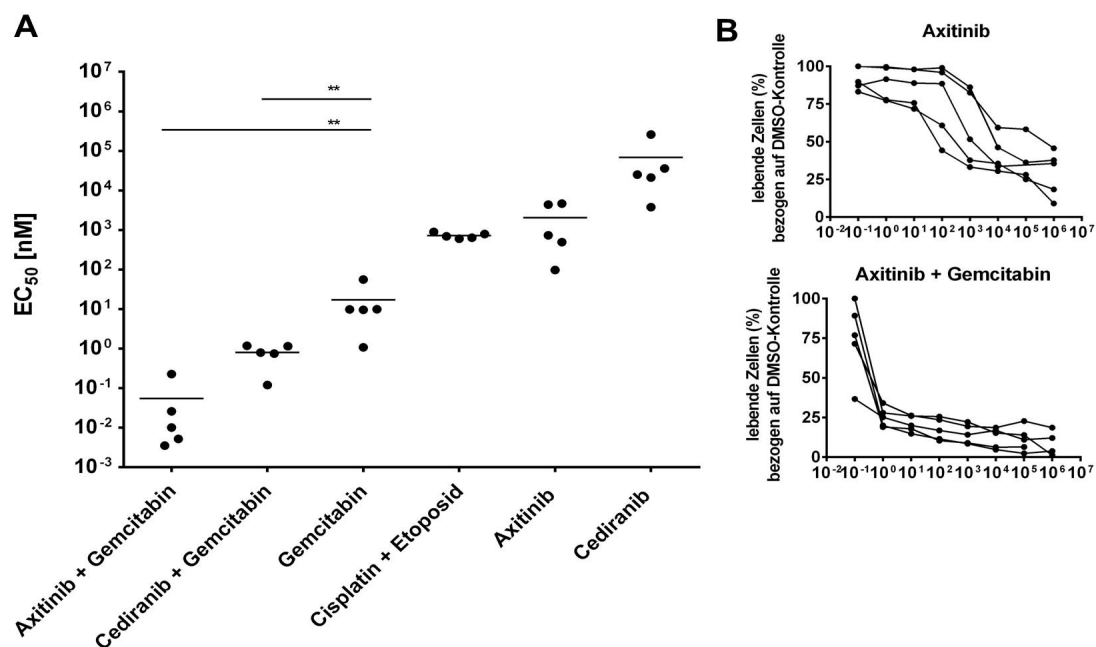
**Abbildung 9: Charakterisierung der VEGF-Sekretion und VEGF-Rezeptor Expression der Tumorzellen.** **A:** Makroskopische Darstellung der starken Vaskularisierung eines subkutanen MB3W1-Tumors (Maßstab: 2,5mm). **B:** Hypoxische Zellen im Sphäreninnere der MB3W1 Tumorzellen (Maßstab: 50µm). **C:** FACS-Analyse der VEGF-Rezeptor Expression. MB3W1 Tumorzellen exprimieren alle drei Rezeptoren für VEGF auf deren Oberfläche. **D:** Intrazelluläre FACS-Färbung der VEGF-A und VEGF-C Produktion. MB3W1 produzieren nur VEGF-A, aber nicht VEGF-C.

#### 4.5. Wirkung von VEGFR-Inhibitoren auf die Tumorzellen

Als nächstes erweiterten wir die Suche nach geeigneten Partnersubstanzen für Gemcitabin um Multikinaseinhibitoren, die zusätzlich VEGF-Rezeptoren inhibieren. Wir wählten dafür Axitinib und Cediranib aus, die beide pan-VEGFR-

Inhibitoren sind. Die VEGFR-Inhibitoren wurden in einigen präklinischen Modellen ausführlich evaluiert (He et al., 2014; Hillman et al., 2014; Hu-Lowe et al., 2008) und Axitinib ist seit 2012 bereits für das Nierenzellkarzinom zugelassen (MacLean et al., 2016).

Im nächsten Schritt untersuchten wir die zytotoxische Wirkung der VEGFR-Inhibitoren auf die Tumorzellen. Dafür wurden die Tumorzellen mit Axitinib und Cediranib alleine, aber auch in Kombination mit Gemcitabin inkubiert und die Vitalität der Tumorzellen mit der Durchflusszytometrie analysiert. Betrachteten wir die  $EC_{50}$  der VEGFR-Inhibitoren alleine, konnten wir nur einen sehr geringen zytotoxischen Effekt erkennen. Jedoch zeigte sich bei der Kombination Gemcitabin und den VEGFR-Inhibitoren eine signifikant niedrigere  $EC_{50}$  im Vergleich zur Monotherapie mit Gemcitabin und zur Standardtherapie (Axitinib/Gemcitabin  $EC_{50}=0,03$  nM; Cediranib/Gemcitabin  $EC_{50}=0,28$  nM). Daraus schlossen wir, dass die Kombination aus Gemcitabin und VEGFR-Inhibitoren in den Tumorzellen zu toxischen Synergismen führen könnte. In diesem Versuchssystem wurde vor allem die direkte Wirkung auf die Tumorzellen analysiert.



**Abbildung 10: Untersuchung der Toxizität der VEGFR-Inhibitoren in Kombination mit Gemcitabin.** A:  $EC_{50}$  der verschiedenen Kombination mit Gemcitabin nach einer

Inkubationszeit von 48h.  $n=5$ . Ungepaarter Student's t-test, \*\*,  $p=0,0079$  **B**: Sigmoidaler Kurvenverlauf von Axitinib und der Kombination Axitinib/Gemcitabin.

#### 4.6. Wirkung von Axitinib auf die VEGF-Rezeptoren

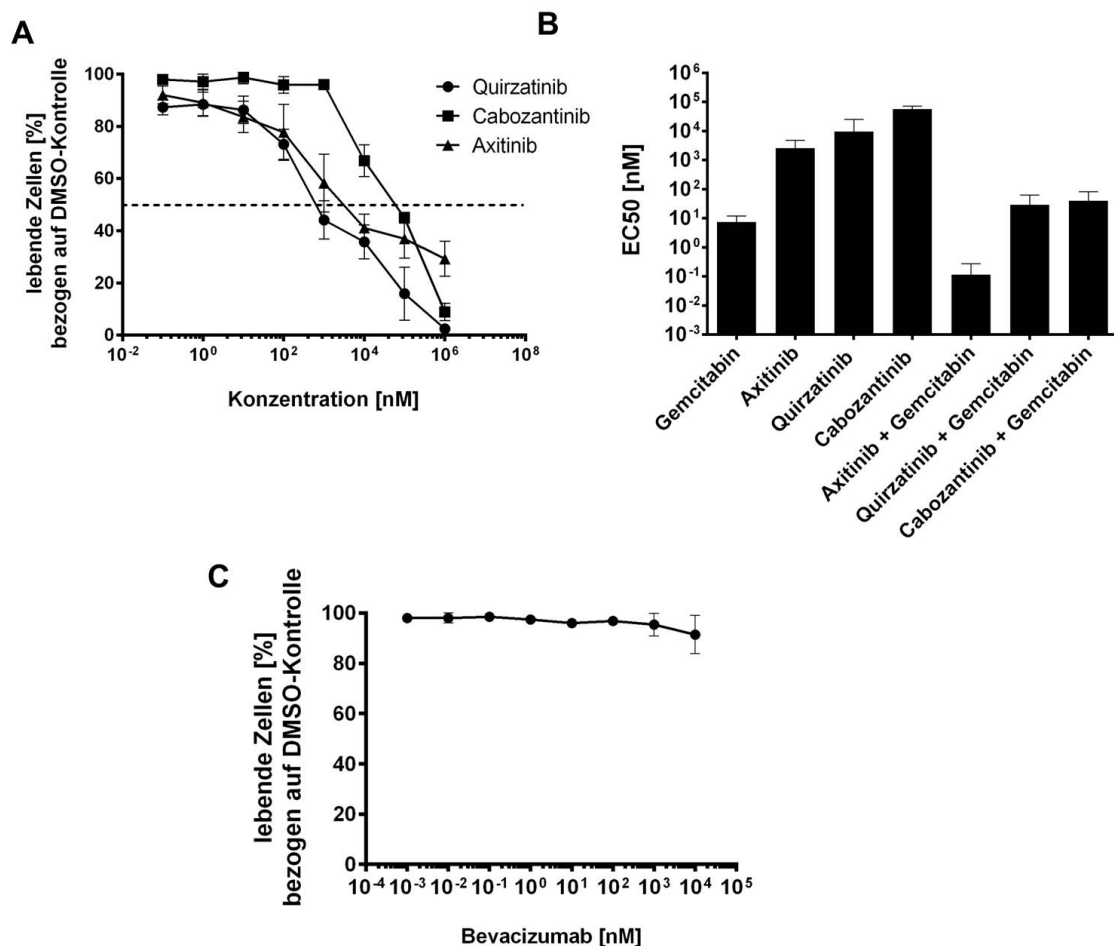
Bisher konnten wir zeigen, dass die Kombination von Axitinib und Gemcitabin eine signifikante zytotoxische Wirkung auf die MB3W1 Tumorzellen hat. Als Nächstes stellten wir die Frage: Wirkt Axitinib selektiv über die VEGF-Rezeptoren auf die Tumorzellen oder wird der zytotoxische Effekt durch eine Vielzahl an Zielproteinen auf den Zellen vermittelt? Axitinib ist nicht nur ein pan-VEGFR-Inhibitor (Wirkung gegen VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-2), sondern hat als Angriffspunkte auch noch andere zelluläre Strukturen wie PDGF-Rezeptoren, FGF-Rezeptor, c-Kit und c-FMS. Es ist daher schwierig, einen alleinigen Mechanismus durch den Axitinib toxisch wirkt, festzumachen. Um uns der Frage experimentell zumindest anzunähern, wählten wir den Flt3-Inhibitor Quirzatinib, der ein mit Axitinib überlappendes Wirkspektrum hat (c-Kit und PDGF-Rezeptoren), aber eben keine VEGFR-Blockade.

Mit Quirzatinib, einem FLT3-Inhibitor, der aber auch zusätzlich noch PDGF-Rezeptoren und Kit blockiert, zeigte sich vor allem in Kombination mit Gemcitabin eine  $EC_{50}$  von 28,9 nM, die deutlich höher war als die  $EC_{50}$  der Kombination Gemcitabin und Axitinib ( $EC_{50}=0,03$  nM) (Abb. 10A und 10B). Das bedeutet, dass die beobachtete Toxizität durch Axitinib nicht von VEGF-A abhängig war, was wiederum dafür sprechen könnte, dass der direkte toxische Effekt von Axitinib nicht auf die VEGFR-Blockade zurückzuführen ist.

Wir untersuchten auch die Wirkung eines selektiven VEGFR-2-Inhibitors im Vergleich zu den pan-VEGFR-Inhibitoren. Cabozantinib, ein VEGFR-2-Inhibitor, in Kombination mit Gemcitabin (Cabozantinib/Gemcitabin  $EC_{50}=11,45$  nM) hat im Vergleich zu der Kombination aus Axitinib und Gemcitabin eine höhere  $EC_{50}$ . Damit liegt die Schlussfolgerung nahe, dass der zytotoxische Effekt der VEGFR-Inhibitoren in Kombination mit Gemcitabin nicht nur alleine durch den VEGFR-2 vermittelt wird, sondern durch alle drei VEGF-Rezeptoren (Abb. 10A

und 10B). Denn Cabozantinib in Kombination mit Gemcitabin hatte eine weniger toxische Wirkung als Axitinib in Kombination mit Gemcitabin.

Bevacizumab ist ein monoklonaler Antikörper, der das sezernierte VEGF-A bindet, die autokrine Feedback-Schleife unterbricht und somit die Angiogenese hemmen kann. Bevacizumab hatte nach einer 48h Inkubationszeit keinen zytotoxischen Effekt auf die Tumorzellen (Abb. 10C). Jedoch können wir in dem *in vitro* Testsystem auch nur den direkten Effekt auf die Tumorzellen untersuchen und nicht eine mögliche antiangiogenetische Wirkung auf die Tumorumgebung.



**Abbildung 11: Selektive Wirkung von Axitinib auf die VEGF-Rezeptoren.** **A:** Sigmoidaler Kurvenverlauf von Quirzatinib, Cabozantinib und Axitinib. **B:** EC<sub>50</sub> verschiedener Inhibitoren, wie Quirzatinib, welches FLT-3, CSF-1R, PDGF-Rezeptoren und Kit blockiert sowie Cabozantinib, welcher ein selektiver VEGFR-2 Inhibitor ist. Bei beiden Inhibitoren zeigt sich in

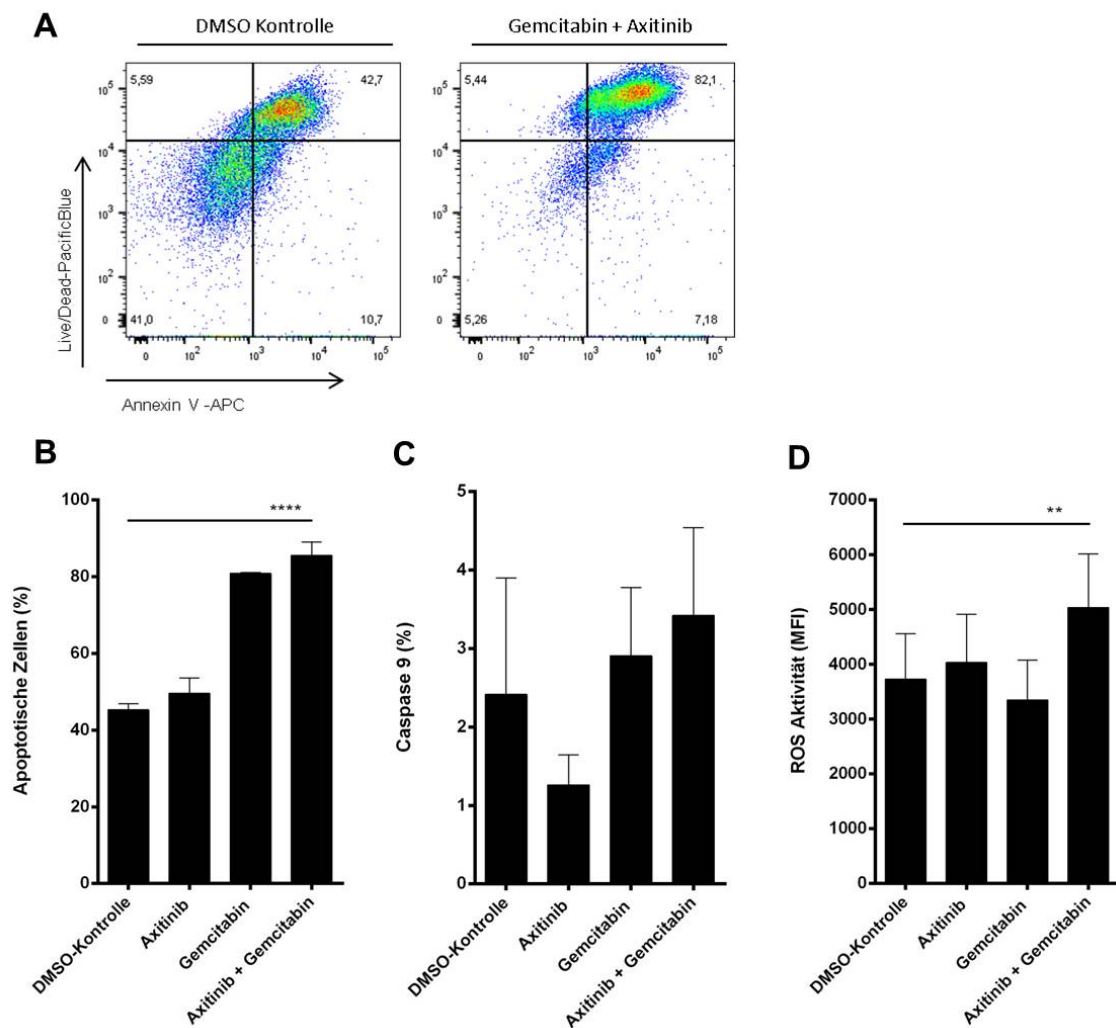
Kombination mit Gemcitabin eine höhere EC50 als mit Axitinib/Gemcitabin.  $n=5$ . **C:** Zytotoxische Wirkung von Bevacizumab, einem monoklonalen Antikörper gegen VEGF-A.

#### **4.7. Mögliche Mechanismen der durch Axitinib/Gemcitabin induzierten Apoptose**

In den vorherigen FACS- und BLI-Analysen zeigte sich eine zytotoxische Wirkung von Gemcitabin und Axitinib. Bisher untersuchten wir die lebenden im Vergleich zu den toten Tumorzellen. In dem nächsten Schritt betrachten wir die Toxizität etwas genauer und analysieren dafür die Apoptoserate der Tumorzellen mittels Annexin-V und Live-Dead-Färbung im FACS. Die Kombination aus Axitinib und Gemcitabin zeigten auch hier einen signifikant höheren Prozentsatz an apoptotischen Zellen als die Vergleichsgruppe mit unbehandelte Tumorzellen.

Nabhan und Kollegen postulierten, dass Caspase 9 durch Gemcitabin aktiviert wird und so zum Zelltod in Zellen des Multiplen Myelom führt (Nabhan et al., 2002). Um die Apoptose der Tumorzellen genauer zu verstehen, untersuchten wir die Caspase 9-Aktivität in den Tumorzellen nach einer Behandlung mit Gemcitabin. In der darauffolgenden intrazellulären FACS-Analyse zeigten sich mehr Caspase 9-positive Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Abb. 12).

Für den pan-VEGFR-Inhibitor Axitinib wurde in der Literatur beschrieben, dass er unter anderem die reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in den Zellen aktivieren kann. Ein Überangebot von ROS bewirkt in den Tumorzellen eine Makromolekülzerstörung durch Reaktion mit der DNA, Proteinen und Lipiden, die den Zelltod zur Folge hat (Morelli et al., 2015). Nach einer 24h Inkubation von Axitinib untersuchten wir für die Tumorzellen mittels FACS-Analyse auf die ROS-Aktivität. Axitinib als Monotherapie und in Kombination mit Gemcitabin hatte signifikant höhere ROS-Aktivität als die unbehandelte Kontrollgruppe (DMSO vs. Gemcitabin/Axitinib  $p=0,0089$ ).



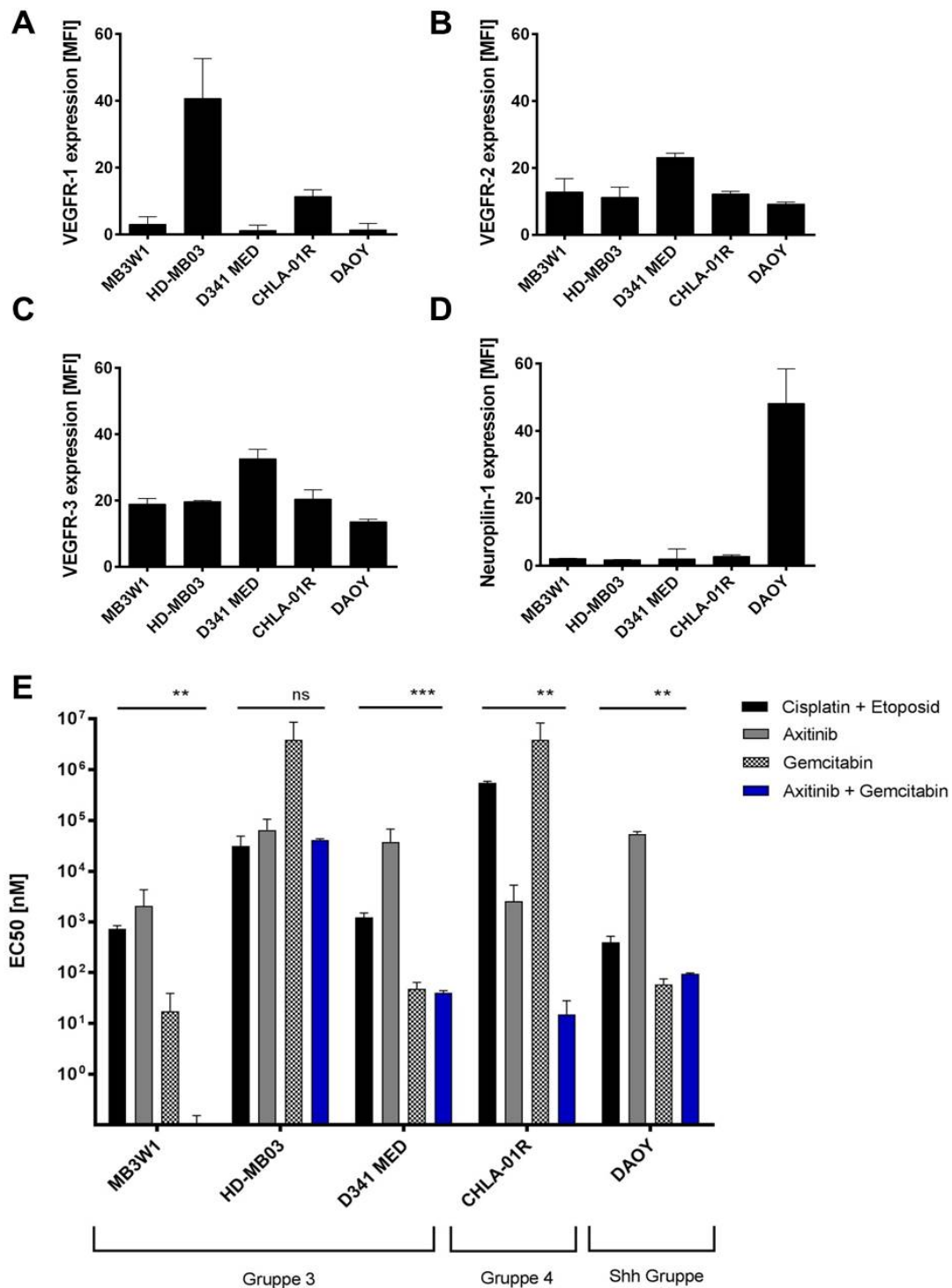
**Abbildung 12: Gemcitabin/Axitinib Behandlung induzieren eine höhere Apoptoserate. A:** Exemplarische Darstellung der FACS-Plots – DMSO-Kontrolle und Gemcitabin + Axitinib – gefärbt mit AnnexinV-APC und Live/Death-PacificBlue. **B:** MB3W1 wurden für 48h mit verschiedenen Zytostatika ( $EC_{50}$ ) behandelt. Die Apoptoserate wurde nach einer FACS-Färbung mit AnnexinV-APC und Live/Death-PacificBlue ermittelt.  $n=5$ . Gepaarter Student's t-test \*\*\*\*,  $p>0,0001$ . **C:** Caspase-9 Analyse der Tumorzellen nach einer 24-stündigen Inkubation mit den Zytostatika ( $EC_{50}$ ),  $n=5$ . **D:** Darstellung der ROS-Aktivität in behandelten Tumorzellen nach 24h Inkubation ( $EC_{50}$ ),  $n=5$ , Gepaarter Student's t-test, \*\*,  $p=0,0089$ .

#### 4.8. Wirkung der Zytostatika und Inhibitoren auf andere Medulloblastom-Zelllinien

Nachdem Axitinib und Gemcitabin eine deutliche zytotoxische Wirkung auf die MB3W1 Tumorzellen gezeigt hatte, fragten wir uns, ob andere Subtypen des Medulloblastoms auch VEGF-Rezeptoren exprimieren und wie diese auf die Therapie mit Gemcitabin und Axitinib reagieren. Für die weiteren Untersuchungen wählten wir die Zelllinien D341 MED (Gruppe 3), HD-MB03 (Gruppe 3), CHLA-01R (Gruppe 4) und DAOY (Shh-Gruppe) aus. In den FACS-Analysen dieser Medulloblastom-Zelllinien konnten wir bestätigen, dass alle Medulloblastom-Zelllinien VEGFR-2 und VEGFR-3 exprimieren. VEGFR-1 wird vor allem von HD-MB03 und CHLA-01R exprimiert und Neuropilin-1, ein Co-Faktor von VEGFR-2, wird vor allem von DAOY stark exprimiert (Abb. 13 A-D).

In der *in vitro*-Prüfung zeigte Gemcitabin nicht nur zytotoxische Effekte bei der Gruppe 3, sondern auch der Zelllinie DAOY, welche zum Shh-Subtyp gehört. Auch die Kombination mit VEGFR-Inhibitoren war nicht nur selektiv bei Gruppe 3-Medulloblastome wirksam, sondern hatte ebenso eine toxische Wirkung bei Gruppe 4 und bei Tumorzellen der Shh-Gruppe. Alle Daten erhoben wir im Vergleich zur Standardtherapie mit Cisplatin und Etoposid (Abb. 13 E).

Die Tumorzelllinie HD-MB03 aus der Gruppe 3 sprach in den Toxizitätsversuchen deutlich schlechter auf die Zytostatika und Inhibitoren an. Möglicherweise gibt es in den Untergruppen des Medulloblastoms noch weitere resistenter Subtypen gegenüber Zytostatika. Dies könnte das unterschiedliche Therapieansprechen innerhalb der Gruppe 3-Medulloblastome erklären.



**Abbildung 13: VEGFR-Expression und zytotoxischer Effekt der verschiedenen Zytostatika auf andere Medulloblastom-Zelllinien.** A – D: Durchflusszytometrie der VEGFR-Expression und Neuropilin-1-Expression verschiedener Medulloblastom-Zelllinien. E: Inkubation der ausgewählten Zytostatika mit den unterschiedlichen Medulloblastom-Zelllinien für 48h im Vergleich zur Standardtherapie und anschließende Bestimmung der EC<sub>50</sub>. MB3W1, HD-MB03 und D341 MED gehören der Gruppe 3 an, CHLA-01R der Gruppe 4 und DAOY der Shh Gruppe.  $n=5$ . Gepaarter Student's Test und Mann-Whitney-Test, \*\*,  $p=0,0079$ , \*\*\*,  $p=0,0009$ .



#### 4.9. Zytotoxische Therapie mit VEGFR-Inhibitoren im subkutanen Mausmodell

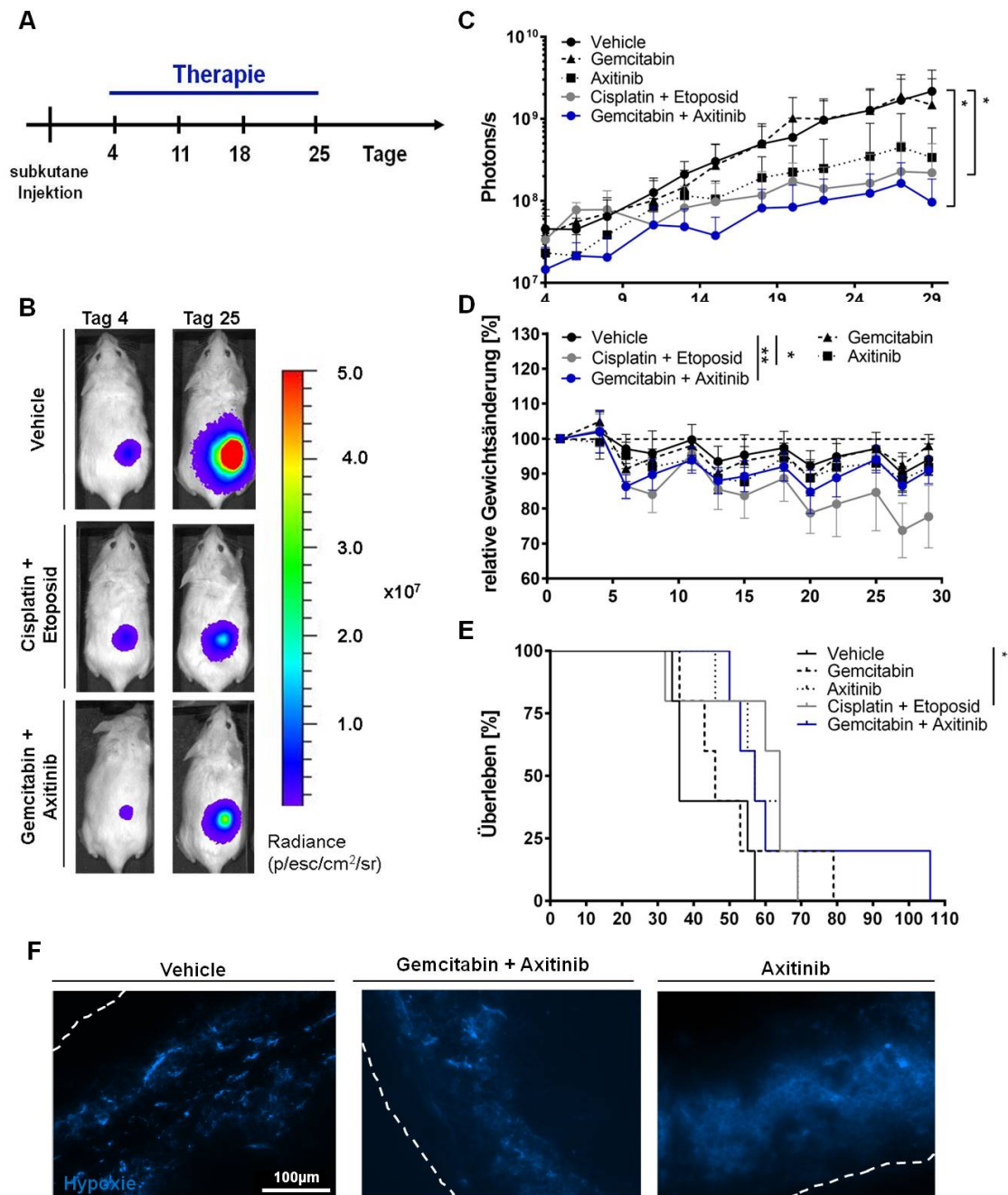
Aus unseren bisherigen *in vitro* Experimenten konnten wir schließen, dass Axitinib in Kombination mit Gemcitabin den besten zytotoxischen Effekt auf Medulloblastom-Tumorzellen hat. Den Hauptangriffspunkt der VEGFR-Inhibitoren auf die Tumorangio-genese konnte jedoch mit den *in vitro* Experimenten nicht analysiert werden, deshalb sollen nun die Substanzen im subkutanen Mausmodell getestet werden. Dafür wurde den Tieren jeweils  $1 \times 10^6$  Tumorzellen subkutan in die rechte Flanke injiziert. Ab Tag 4 begann eine vierwöchige Therapie mit Gemcitabin (1x wöchentlich, i.p.) und Axitinib (5x wöchentlich, oral). Als Kontrollen wurden eine unbehandelte Gruppe, eine Vehicle-Gruppe, Gemcitabin, Axitinib und die Kombination aus Cisplatin und Etoposid als Standardtherapie mitgeführt (Cisplatin und Etoposid, jeweils 1x wöchentlich, i.p.). Wie auch in den vorherigen Versuch war der Endpunkt des Experiments definiert durch einen 0,5 cm großen Tumor der Maus.

In der mit Axitinib und Gemcitabin behandelten Versuchsgruppe zeigt sich ein signifikant niedrigeres BLI-Signal als in der Standardtherapie ( $p=0,0246$ ). Dementsprechend wurde das Tumorwachstum in den Tieren mit Therapie verlangsamt. Dies spiegelt sich auch im Gesamtüberleben der Tiere wieder, denn auch hier zeigt sich ein tendenziell längeres Überleben unter der Therapie mit Gemcitabin und Axitinib. Axitinib als Monotherapie wie auch Gemcitabin als Monotherapie zeigten ein höheres BLI-Signal und damit ein stärkeres Tumorwachstum als die beiden Substanzen in Kombination. Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass die Toxizität der beiden Substanzen auf die Tumorzellen auch ein Synergismus zugrunde liegt.

In Hinblick auf die Verträglichkeit verloren die Tiere unter der Standardtherapie (Cisplatin und Etoposid) mit Abstand am meisten Gewicht. Daraus lässt sich schließen, dass die Standardtherapie belastender für die war. Die Tiere, die mit Gemcitabin und Axitinib behandelt wurden, hatten während der vierwöchigen Therapie ähnlich wenig Gewicht verloren wie auch die Vehicle-behandelten

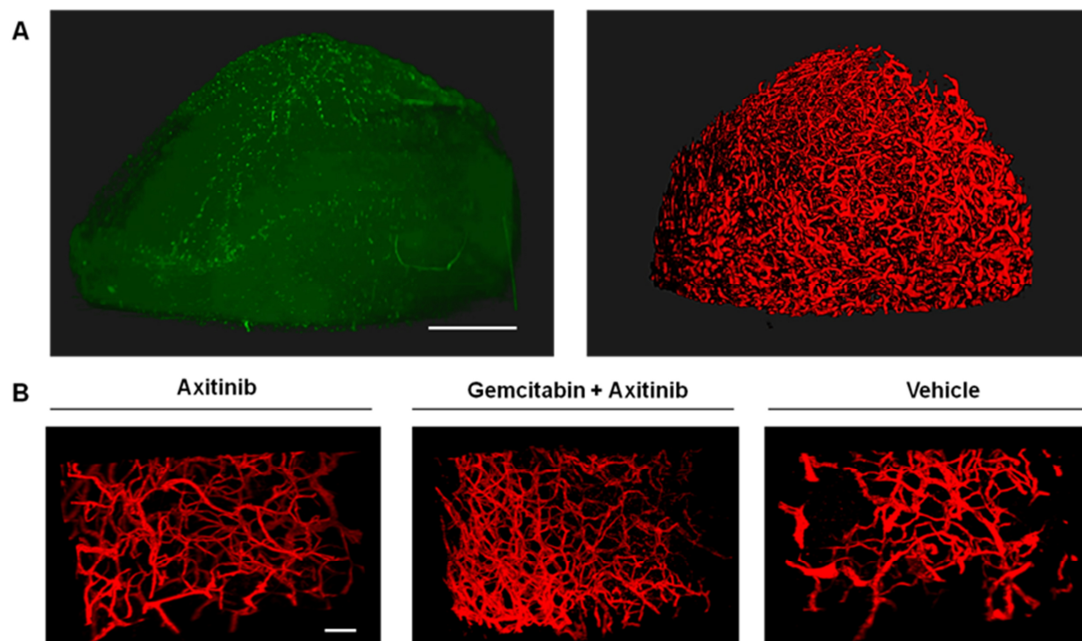
Tiere (Kontrollgruppe mit Lösungsmittel). Zusammenfassend wurde die Therapie mit Gemcitabin und Axitinib im subkutanen Tumormodell von den Mäusen besser toleriert und zeigte zudem auch einen signifikanten tumorreduzierenden Effekt.

In der anschließenden immunhistologischen Analyse des Tumors nach Therapieende konnten wir eine destruierte Tumorarchitektur in den behandelten Gruppen im Vergleich zur Vehicle-Gruppe nachweisen. Auch die hypoxische Zone des Tumors war in den mit Axitinib-behandelten Gruppen deutlich verbreitert und es zeigten sich zudem hypoxische Areale im Tumorinneren.



**Abbildung 14: Zytotoxischer Effekte im subkutanen Tiermodell.** Es wurden  $1 \times 10^6$  Tumorzellen in die rechte Flanke von Nod.CB17-scid Mäusen an Tag 0 injiziert. Ab Tag 4 wurden den Tieren 1x bzw. 5x wöchentlich in 4 aufeinanderfolgenden Zyklen die ausgewählten Zytostatika injiziert. In regelmäßigen Abständen wurde das Tumorstadium mittels BLI kontrolliert. **A:** Zeitstrahl des Tierexperiments. **B:** Exemplarische Darstellung des BLI-Signals von drei Mäusen zu Beginn der Therapie und im Verlauf an Tag 25. **C:** Quantitative Analyse des BLI-Signals der unterschiedlich behandelten Tiere.  $n=5$ . Two-way ANOVA. Vehicle vs. Gemcitabin/Axitinib \*,  $p=0,0246$ , Vehicle vs. Cisplatin/Etoposid \*,  $p=0,0381$ . **D:** relativer Gewichtsverlust der unterschiedlich behandelten Tiere.  $n=5$ . Two-way ANOVA. Vehicle vs. Cisplatin/Etoposid \*\*,  $p=0,0075$ , Vehicle vs. Gemcitabin/Axitinib \*,  $p=0,0461$ . **E:** Kaplan-Meier-Kurven der unterschiedlich behandelten Tiere.  $n=5$ . \*  $p=0,0350$ . **F:** Histologische Analyse der Hypoxie in den Tumorrändern der verschieden behandelten Tiere nach Injektion von Pimonidazol (Maßstab: 50µm).

Die speziell im Labor entwickelte Lichtblattmikroskopie eignet sich zur dreidimensionalen Darstellung eines Tumors, um so die Gefäßarchitektur besser zu visualisieren und zu analysieren. Zur 3D-Darstellung des Tumors wurde einigen Tieren am Endpunkt 20µg eines monoklonalen VE-Cadherin-AlexaFluor647-Antikörpers injiziert und nach einer zweistündigen Inkubationszeit, der mit Paraformaldehyd perfundierte Tumor, aus den euthanasierten Tieren herauspräpariert. Nach weiteren Dehydratisierungsschritten und einer Clearing-Prozedur konnte der Tumor am Lichtblattmikroskop mikroskopiert werden. In der 3D-Rekonstruktion der einzelnen Schnittbilder konnten wir eine ausgeprägte Neoangiogenese des Tumors visualisieren. Es fanden sich multiple, stark verzweigte Blutgefäße, die den gesamten Tumor durchsetzt hatten.

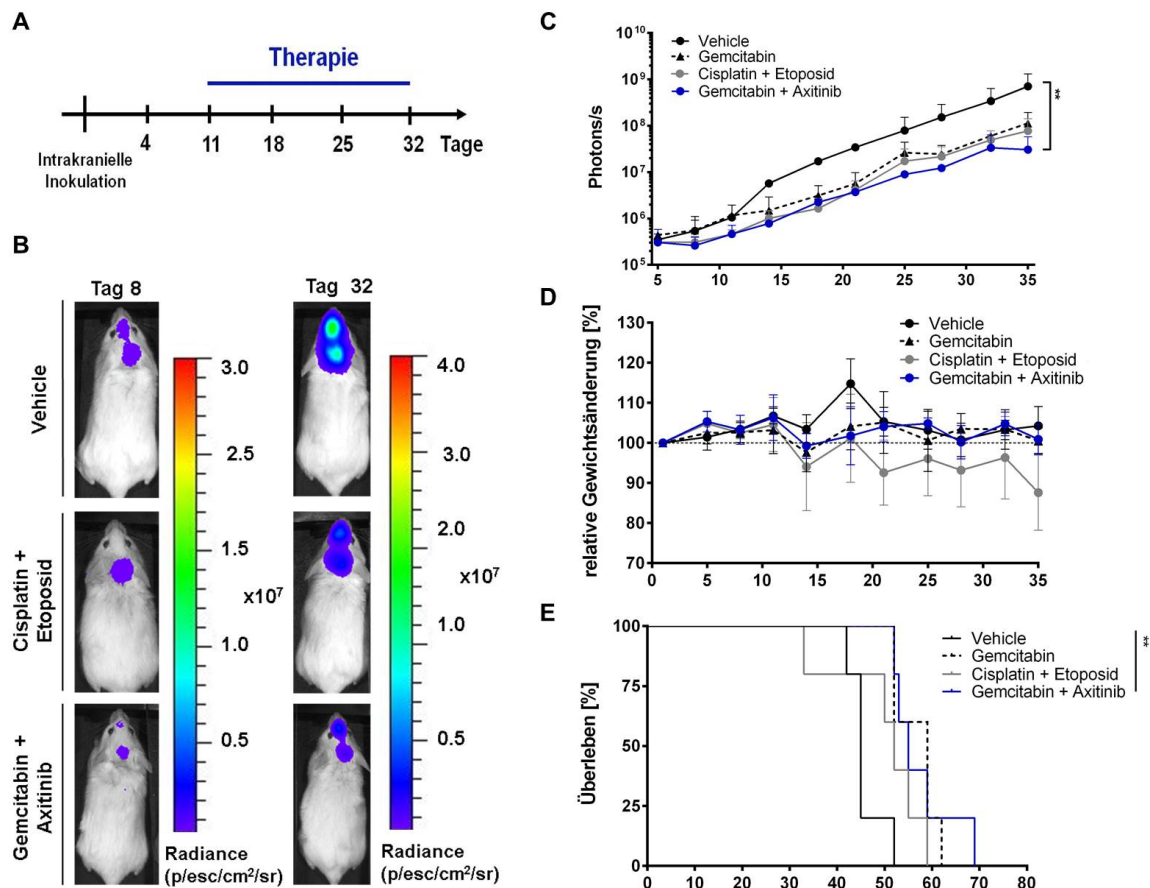


**Abbildung 15: Darstellung der Vaskularisierung des subkutanen Tumors mit Hilfe des LSFM.** Am Endpunkt des Versuches wurde dem Tier der Vehicle-Gruppe VE-Cadherin i.v. injiziert und nach zweistündiger Inkubation in vivo das Tier mit PFA (4%) perfundiert und der Tumor entnommen. Nach weiteren Waschschritten wurde der Tumor dehydriert und optische aufgeklärt und anschließend im LSFM mikroskopiert. **A:** 3D-Rekonstruktion der subkutanen Tumore nach Detektion der Autofluoreszenz (grün) und Blutgefäße (rot) mit dem 5x Objektiv (Maßstab: 500µm). **B:** Darstellung der Blutgefäßversorgung der subkutanen Tumore in den verschiedenen Versuchsgruppen mit dem 20x Objektiv (Maßstab: 100µm).

#### **4.10. Zytotoxische Therapie mit VEGFR-Inhibitoren in Kombination mit Gemcitabin im intrakraniellen Mausmodell**

Im nächsten Versuch untersuchten wir den therapeutische Effekt der neuen Kombination mit Axitinib und Gemcitabin im Vergleich zur Standardtherapie im intrakraniellen Mausmodell. Dafür wurden den Tieren in einer mikrochirurgischen Operation 5.000 Luciferase-markierte Tumorzellen orthotop in die rechte Kleinhirnhemisphäre injiziert. Nach einer Woche Erholungsphase für die Tiere und zum Anwachsen des Tumors, begann ab Tag 11 eine vierwöchige Therapie analog zum subkutanen Tumormodell mit Axitinib und Gemcitabin, Gemcitabin, Cisplatin und Etoposid und in einer Kontrollgruppe die alleinige Verabreichung des Lösungsmittels ohne Wirkstoff (Vehicle Kontrolle). Als Versuchsendpunkt definierten wir erstens ein durch den Tumor verursachtes BLI-Signal von  $1 \times 10^{10}$  Photonen/s und zweitens durch klinische Zeichen der Erkrankung des Tieres (Gewichtsverlust, Hydrozephalus, Apathie).

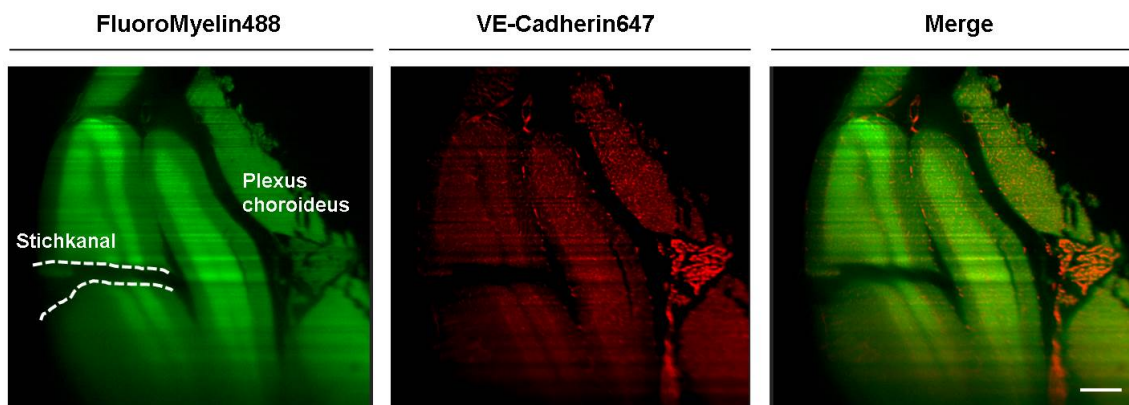
Die Kombination aus Axitinib und Gemcitabin im intrakraniellen, orthotopen Tumormodell zeigte auch hier den besten tumorreduzierenden Effekt. Die mit Gemcitabin/Axitinib behandelten Tiere hatten gegenüber der mit Cisplatin/Etoposid-Vergleichsgruppe ein tendenziell niedrigeres Tumorstadium. Wie auch schon in den vorherigen Versuchen waren die Tiere mit Gemcitabin/Axitinib Behandlung in deren Gewicht stabil. Wohingegen die mit Cisplatin/Etoposid behandelten Vergleichstiere deutlich an Gewicht verloren hatten und somit maßgeblich unter den Nebenwirkungen der Therapie gelitten hatten. In der Kaplan-Meier-Kurve konnte ein signifikantes Überleben der Tiere mit der Behandlung von Gemcitabin und Axitinib im Vergleich zu den Vehicle-behandelten Tieren gezeigt werden.



**Abbildung 166: Zytotoxischer Effekte im orthotopen Tiermodell.** Es wurden  $5 \times 10^3$  Tumorzellen in die rechte Kleinhirnhemisphäre von Nod.CB17-scid Mäusen an Tag 0 injiziert. Ab Tag 11 wurden den Tieren 1x bzw. 5x wöchentlich in 4 aufeinanderfolgenden Zyklen die ausgewählten Zytostatika injiziert. In regelmäßigen Abständen wurde das Tumorzellwachstum mittels BLI kontrolliert. **A:** Zeitstrahl des Tierexperiments. **B:** Exemplarische Darstellung des BLI-Signals von drei Mäusen zu Beginn der Therapie und im Verlauf an Tag 32. **C:** Quantitative Analyse des BLI-Signals der unterschiedlichen behandelten Tiere.  $n=5$ . Two-way ANOVA. Vehicle vs. Gemcitabin/Axitinib \*\*,  $p=0,0435$ . **D:** relativer Gewichtsverlust der unterschiedlich behandelten Tiere.  $n=5$ . **E:** Kaplan-Meier-Kurven der unterschiedlich behandelten Tiere.  $n=5$ . \*\*,  $p=0,0052$ .

Nach den ersten BLI-Analysen an Tag 4 und Tag 7 fiel auf, dass das BLI-Signal der Tumorzellen nicht nur an der ursprünglichen Inokulationsstelle im Kleinhirn sichtbar war, sondern bei ca. 60% der Tiere auch im frontalen Bereich des Großhirns und in einzelnen Fällen auch in der kaudalen Wirbelsäule, was einem Tumormodell im metastasierten Stadium entspricht. Wir vermuteten, dass in einige Fällen versehentlich die Tumorzellen direkt in den Subarachnoidalraum injiziert wurden und sich die Tumorzellen dann durch den Liquor cerebrospinalis im gesamten Gehirn absiedeln konnten. Wir untersuchten deshalb die

Gehirngewebe mit LSMF und fanden die Injektionsstelle im Kleinhirn direkt vor dem Plexus choroideus des IV. Ventrikels liegend. Diese Beobachtung könnte erklären, dass je nach anatomischen Gegebenheiten es durchaus vorkommen kann, dass auch Tumorzellen direkt in den Subarachnoidalraum injiziert werden könnten. In weiteren Experimenten könnte man die Injektionstiefe noch weiter reduzieren um sicher zu gehen, dass die Tumorzellen lediglich im Kleinhirn anwachsen.



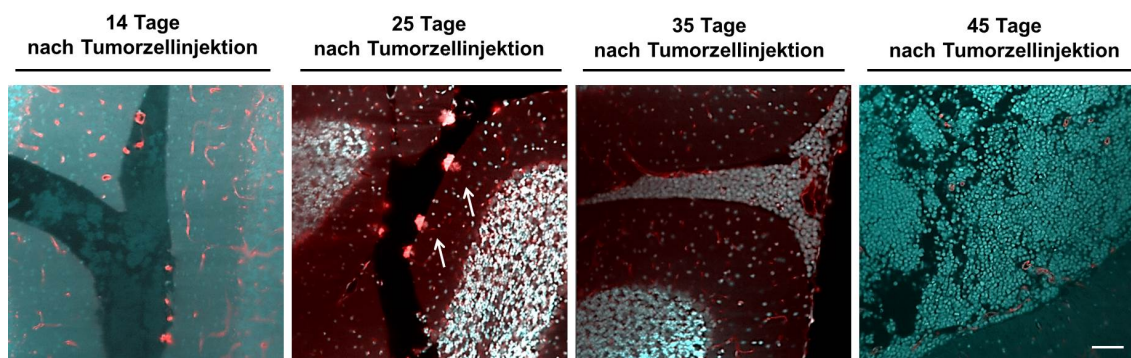
**Abbildung 177: Darstellung des Stichkanals im Kleinhirn.** In der dargestellten LSMF-Analyse des Kleinhirns einer Maus ohne Metastasenbildung nach einer Blutgefäßfärbung zeigt sich in direkter Nähe des Stichkanals dorsalliegend der Plexus choroideus (Maßstab: 100µm).

Aufgrund der Hypoxie- und Blutgefäßdarstellung und der daraus resultierenden Zonenbildung im subkutanen Tumor, untersuchten wir, ob wir auch im orthotopen Kleinhirntumor ähnliche Beobachtungen machen würden. Nach Injektion von Pimonidazol wurden die Tiere euthanisiert. Im Gegensatz zum subkutanen Modell waren bei den orthotopen Tumoren keine hypoxischen oder nekrotischen Zonen nachweisbar. Es fanden sich lediglich vereinzelte nekrotische bzw. hypoxische Zellen über den ganzen Tumor verteilt (Daten nicht gezeigt).

Nach mehreren Zeitpunkten wurde jeweils ein Tier für weitere LSMF-Analysen geopfert, um die Entstehung des Tumors im Kleinhirn nach der Zellinjektion nachzuvollziehen. Dafür applizierten wir den Tieren 2h vor der Perfusion ein monoklonaler VE-Cadherin-AlexaFluor-647-Antikörper intravenös. Nach der Gehirnentnahme färbten wir zur Zellkerndarstellung das Gewebe zusätzlich mit



Propidiumiodid und prozessierten es anschließend weiter. In den LSM-Analysen des Kleinhirns konnten wir darstellen, dass die Tumorzellen zur Etablierung zuerst im Stichkanal verweilten, bevor sie bis Tag 25 kleine Sphären bildeten, aus denen dann im Verlauf immer mehr Tumorzellen proliferierten, bis letztendlich der komplette Stichkanal gefüllt war und sich der Tumor auch in die umliegenden Sulci des Kleinhirns ausbreitete. Tag 45 spiegelte den Endpunkt des Versuches wieder, bei dem die Tiere bereits beginnende Symptomatik zeigen. Zu diesem Zeitpunkt war der Tumor bereits massiv gewachsen und dem Kleinhirn aufgelagert.

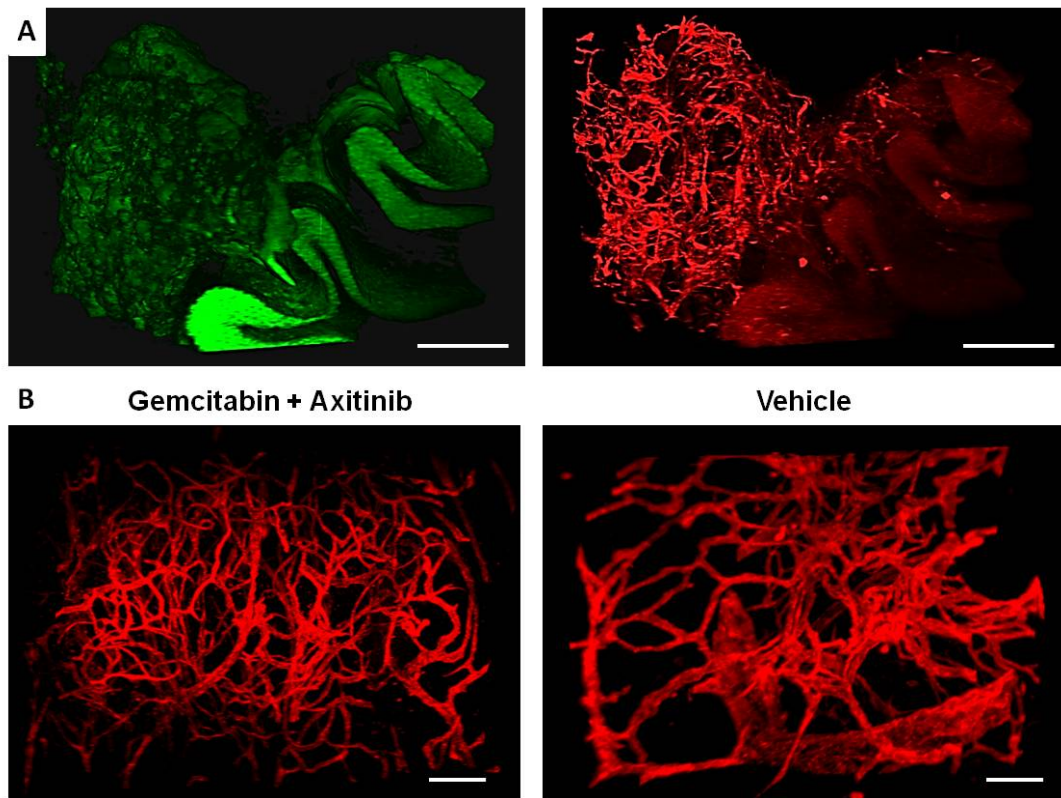


**Abbildung 188: Tumorentstehung im Kleinhirn.** LSM-Analysen des Tumors zu verschiedenen Zeitpunkten nach VE-Cadherin- (rot) und Propidiumiodid (cyan)-färbung (Maßstab: 50µm).

Auch im orthotopen Tumormodell behandelten wir die Tiere unter anderem mit Axitinib b, welches nicht nur für die Tumorzellen zytotoxisch ist, sondern auch durch inhibitorische Effekte auf die Angiogenese des Tumors auswirkt, wie wir bereits im subkutanen Tumormodell zeigen konnten. Deshalb untersuchten wir im orthotopen Tiermodell am Versuchsendpunkt die Angiogenese der verschieden behandelten Tumorgewebe. Nach Antikörperfärbungen und weiterer Prozessierung mikroskopierten wir die Tumore am LSM.

Die Blutgefäße stellten sich in der Vehicle-Gruppe als kräftig und weniger verzweigte Strukturen dar. Wohingegen die Blutgefäße, in der mit Gemcitabin und Axitinib behandelten Tiere eher dünner und diffuser verteilt waren.





**Abbildung 1919: Darstellung und Quantifizierung der Angiogenese des orthotopen Tumors nach LSM-Färbungen.** Am Endpunkt des Versuches wurden die Blutgefäße der Tiere mit VE-Cadherin gefärbt, bevor diese mit PFA perfundiert wurden. Nach der Tumorentnahme wurden die Proben zusätzlich für 1h mit Propidiumiodid gefärbt und anschließend für die LSM-Analysen präpariert. **A:** 3D Rekonstruktion des orthotopen Tumors, der dem Kleinhirn angelagert ist und infiltrierend in die Sulci des Kleinhirns gewachsen ist. Grün: Propidiumiodid. Rot: VE-Cadherin (Maßstab: 500µm). **B:** Blutgefäßfärbung der orthotopen Tumor nach Gemcitabin/Axitinib Behandlung im Vergleich zu Vehicle-behandelten Tieren (Maßstab: 100µm).

## 5. Diskussion

Das Medulloblastom ist der häufigste maligne Gehirntumor im Kindesalter mit einem mittleren Überleben nach 3 Jahren von durchschnittlich 63% (Massimino et al., 2016). In den letzten Jahren ist es gelungen mit Hilfe genomweiter Expressions- und epigenetischer Analysen neben den histologischen Subtypen folgende genetische Untergruppen des Medulloblastoms zu klassifizieren: Shh-Gruppe, Wnt-Gruppe, Gruppe 3 und Gruppe 4 (Kool et al., 2012; Northcott et al., 2012a; Taylor et al., 2012). Ungefähr jeder vierte Patient mit einem Medulloblastom hat ein Gruppe 3-Medulloblastom und mit ca. 50% Überlebenschance hat dieses Patientenkollektiv die schlechteste Prognose (Massimino et al., 2011; Taylor et al., 2012).

In dieser Dissertationsarbeit ist es gelungen, neue Therapieansätze zu finden. Wir konnten zeigen, dass Gemcitabin in Kombination mit Axitinib im Vergleich zur bisherigen Therapie mit Cisplatin und Etoposid einen signifikanten Unterschied in der Toxizität und im Tumorwachstum *in vitro* als auch im Tiermodell hat.

### 5.1. Zytotoxischer Effekt von Gemcitabin und Pemetrex auf die Tumorzellen

Die bisherige Therapie eines Patienten, der an einem Gruppe 3-Medulloblastom erkrankte, erfolgt in Deutschland nach dem aktuellen HIT-Studienprotokoll (HIT-Med Study Protocol). Bisher gibt es noch keine Therapiestrategien bei der nach molekularen Subgruppen stratifiziert wird. Deshalb haben wir in dieser Arbeit versucht Substanzklassen zu finden, die im besten Fall bereits in klinischer Anwendung sind, um neue Therapieoptionen für die Patienten zu identifizieren. Ziel war es sowohl Therapieansprechen, als auch Verträglichkeit in präklinischen Modellen zu evaluieren.

Nach ausgiebiger Literaturrecherche wurden wir auf eine Publikation von Morfouace und Kollegen aufmerksam, die erstmals die Behandlung von gentechnisch veränderten, murine Gruppe 3-Medulloblastom-Tumorzellen mit über 7.000 verschiedene Substanzen verglich und Gemcitabin sowie Pemetrex als die Kombination mit dem besten zytotoxischen Effekt identifizierte (Morfouace et al., 2014). Diese Arbeit bildete die Grundlage unserer Suche nach geeigneten Substanzen und Inhibitoren für die Experimente mit den humanen Medulloblastom-Zellen. Wir untersuchten über 20 unterschiedliche Inhibitoren und Zytostatika, die teilweise bereits bei anderen Tumorarten im klinischen Einsatz sind oder bereits in Studien evaluiert wurden. Darunter waren verschiedenste Inhibitoren, die an unterschiedlichen Stellen im Zellzyklus oder der Signalkaskade der Tumorzellen eingreifen, wie platinhaltige Zytostatika, Nukleosidanaloga, PI3K-Inhibitoren, Topoisomerase-Inhibitoren, c-MET und ALK-Inhibitoren.

Die kürzlich publizierte Würzburger Gruppe 3-Medulloblastom-Tumorzelllinie MB3W1 wurde aus einem malignen Pleuraerguss eines Patienten isoliert und erfolgreich kultiviert. Sie konnte dem Gruppe 3-Medulloblastom mit Hilfe von RNA-Analysen zugeordnet werden und zeigt auch im Tiermodell typische histologische Eigenschaften und Wachstumsverhalten, die dem Gruppe 3-Medulloblastom entsprechen (Dietl et al., 2016). Mit Hilfe dieser Tumorzelllinie sollten nun die gefundenen Zytostatika evaluiert werden.

Nach einer 48-stündigen Inkubation der MB3W1-Tumorzellen mit den Inhibitoren und Zytostatika untersuchten wir die Vitalität der Tumorzellen mittels Durchflusszytometrie oder Biolumineszenzmessung. Durch eine Titrationsreihe der Substanzen konnten wir die effektive Dosis 50 ( $EC_{50}$ ) berechnen um die einzeln- und verschieden kombinierten Zytostatika miteinander vergleichen zu können.

Wir konnten ebenso die Ergebnisse von Morfouace und Kollegen bestätigen und zeigen, dass Gemcitabin alleine, aber auch in Kombination mit Pemetrex im Vergleich zur Standardtherapie eine 100-fach niedrigere  $EC_{50}$  hat. Bereits im Jahr 2010 wurde von dem Europäischen Konsortium innovativer Therapien

für Kinder mit Krebs (ITCC) eine Phase II-Studie mit Gemcitabin und Oxaliplatin an 14 Kindern durchgeführt, die an einem Rezidiv-Medulloblastom erkrankten. Bei 6 der Kinder ergab sich eine stabile Erkrankung, bei 7 der Kinder war ein Progress ihrer Erkrankung zu verzeichnen und ein Kind hatte ein partielles Ansprechen auf die Therapie mit Gemcitabin und dem platinhaltigen Zytostatikum (Georger et al., 2011), sodass Gemcitabin als ein mögliches neues Zytostatikum zur Behandlung des Medulloblastoms geeignet scheint und bereits in der palliativen Situation eingesetzt wird. Darüber hinaus wird aktuell für eine Phase II-Studie für Medulloblastom erkrankte Kinder rekrutiert, die mit verschiedenen Zytostatika unter anderem Pemetrex und Gemcitabin behandelt werden.

Bisher gibt es nur wenige Mausmodelle für das Gruppe 3-Medulloblastom (Lau et al., 2012), deshalb ist es umso wichtiger neue zusätzliche Tiermodelle zu etablieren (Xu et al., 2015a). Es gibt nur wenige syngene Mausmodelle, die in den MYC- und TP53-Signalweg eingreifen und damit die Eigenschaften des Gruppe 3-Medulloblastoms imitieren (Kawauchi et al., 2012; Pei et al., 2012). 2012 veröffentlichte eine Heidelberger Forschungsgruppe um Milde und Kollegen eine neue humane Gruppe 3-Medulloblastom Tumorzelllinie. Die aus einem Patienten gewonnenen Tumorzellen entstammen aus frischen Tumorschnitten, während der Behandlung des Patienten (Milde et al., 2012). Wir testeten diese Tumorzellen HD-MB03 ebenfalls mit den Zytostatika und stellten fest, dass die Tumorzelllinie im Allgemeinen sehr resistent gegen verschiedene Zytostatika ist.

Im Tiermodell untersuchten wir die Wirkung von Gemcitabin und Pemetrex – zuerst mit subkutaner, ektooper Tumorzellinjektion und später dann im orthotopen Tumormodell. Für die optimale Dosis orientierten wir uns an der aktuellen Literatur und führten im Vorfeld eine Titrationsreihe mit ausgewählten Konzentrationen *in vivo* durch (Daten nicht gezeigt).

Vor allem Gemcitabin zeigte im ersten Tierexperiment eine signifikante Tumorreduktion im Vergleich zur der Lösungsmittelkontrolle. Morfouce und Kollegen zeigten in ihrer Publikation den besten Effekt auf das Tumorstadium

durch die Substanzkombination aus Gemcitabin und Pemetrex (Morfouace et al., 2014). Wir untersuchten auch diese Kombination mit unserem Tumormodell und konnten keinen tumorreduzierenden Effekt darstellen. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, eine Heterogenität der Tumorzellen innerhalb des Gruppe 3-Medulloblastoms. Wahrscheinlich gibt es noch weitere Untergruppen innerhalb bisher bestehenden Subgruppen des Medulloblastoms, die auf molekularbiologischer Ebene weiter unterscheiden und dann auch verschiedenartig auf Zytostatika reagieren. Zusammenfassend stellte sich in der Behandlung mit Gemcitabin im Vergleich zur Standardtherapie (Cisplatin und Etoposid) in beiden Gruppen eine gleiche Reduktion des Tumorwachstums dar. Jedoch war die Therapie mit Cisplatin und Etoposid für die Mäuse weitaus toxischer als die Monotherapie mit Gemcitabin.

In der anschließenden histologischen Analyse der subkutanen Tumore fiel eine besondere Architektur des Tumors auf, der sich in vier verschiedenen Zonen, basierend auf dem Hypoxie- und Apoptoseverhalten, darstellte. Diese Beobachtung der vier verschiedenen Zonen führt uns zu der Annahme, dass die Proliferationsrate der Tumorzellen und damit das Größenwachstum des Tumors an der Oberfläche überproportional schnell im Vergleich zum normalen Gewebe verläuft und somit die Sauerstoffversorgung und Angiogenese nicht gleichermaßen durch alle Schichten des Tumors gewährleistet werden kann. Dies könnte erklären, dass in Zone 3 sehr viele apoptotische Zellen sind. In der bisherigen Literatur zum Aufbau und Wachstum von Tumoren wurde beschrieben, dass vor allem das Tumoriinnere unter dem schnellen Tumorwachstum leidet und dort apoptotische und nekrotische Areale entstehen (Cappellari et al., 2015; Chang et al., 2007; Giangaspero et al., 2006). Konträr zur Literatur könnte unsere Beobachtung aber auch basierend auf einem Artefakt entstanden sein, beispielsweise durch die ektope Tumorzellinjektion in die Flanken der Tiere.

### 5.3. Expression von VEGF-Rezeptoren auf Medulloblastom-Tumorzellen

Wir untersuchten in den ersten Tierversuchen verschiedene Chemotherapeutika alleine und in Kombination, jeweils im Vergleich zur Standardtherapie und konnten aufzeigen, dass Gemcitabin den gleichen tumorreduzierenden Effekt hat wie die Kombination aus Cisplatin und Etoposid. Nun galt es eine geeignete Partnersubstanz für Gemcitabin zu finden, die dann in Kombination einen besseren Therapieerfolg zeigen würde als die Standardtherapie. Dies wäre auch für ein Therapieregime in der Klinik gut geeignet, denn dort werden oftmals verschiedene Zytostatika kombiniert.

Während der Tumorpräparation zeigte sich eine starke Vaskularisierung des subkutanen Tumors. Diese Beobachtung führte uns zu folgender Hypothese: Hat die Inhibition des Vaskularisierungsvorgangs im Tumor einen additiven therapeutischen Effekt auf das Tumorwachstum?

In den folgenden Immunfluoreszenzfärbungen mit VEGFR-2 fiel uns auf, dass nicht nur die Blutgefäße den Rezeptor exprimierten, sondern die Tumorzellen selbst auch. Auch in der Durchflusszytometrie konnten wir bestätigen, dass die Medulloblastom-Tumorzellen alle drei VEGF-Rezeptoren auf deren Oberfläche exprimieren. Slongo und Kollegen untersuchten 2007 die VEGF-Rezeptor-Expression und VEGF-A-Sekretion von DAOY, eine Medulloblastom-Tumorzelllinie von der Shh-Gruppe und konnten zeigen, dass VEGF-A die Phosphorylierung der VEGFR-2 und auch von weiterführenden Proteinen der Signalkaskade stimuliert, welches eine autokrine Rückkoppelung der Tumorzellen suggeriert (Slongo et al., 2007). Jedoch gibt es auch andere Untersuchungen von primären Medulloblastom-Tumoren, die keine oder nur sehr schwache VEGFR-2 Expression in histologischen Analysen von Primärmaterial fanden (Blom et al., 2010). Andere Publikationen beschreiben eine alleinige VEGFR-1-Expression auf primären Tumorproben, jedoch keine VEGFR-2-Expression (Virag et al., 2014). Mittels ELISA- und FACS-Analysen konnten wir ebenso zeigen, dass die Tumorzellen MB3W1 VEGF-A, jedoch nicht VEGF-C produzieren.

### **5.3.1. Zytotoxischer Effekt der VEGFR-Inhibitoren auf Medulloblastom-Tumorzellen**

Die Analyse des VEGF-Systems der Tumorzellen erbrachte uns ein neues Zielprotein als Kombinationspartner für Gemcitabin zur Therapie des Gruppe 3-Medulloblastoms. Zur Inhibition der Vaskularisierung im Tumor gibt es zwei Möglichkeiten: Entweder wird das Substrat VEGF-A inhibiert oder der Rezeptor selbst wird inhibiert. Bevacizumab (Handelsname: Avastin®, Hersteller: Roche) ist ein humanisierter, monoklonaler Antikörper der bereits in Europa zur Therapie von verschiedenen fortgeschrittenen Tumorentitäten, wie das Colon-, Bronchial-, Mamma-, Nierenzell- und ovarielles Karzinom, zugelassen wurde (Burger et al., 2011; Escudier, 2007; Escudier et al., 2007; Gray et al., 2009; Hurwitz et al., 2004; Pinter et al., 2016; Sandler et al., 2004). Bevacizumab inhibiert VEGF-A, welches dann nicht mehr an dessen VEGF-Rezeptor binden kann und damit die Wachstumssignale und die Angiogenese unterbunden werden können (Kim et al., 1992; Presta et al., 1997). Wir untersuchten zuerst die Wirkung des Antikörpers Bevacizumab und konnten keinen zytotoxischen Effekt auf die Tumorzellen zeigen. Möglicherweise produzieren die Tumorzellen zu schnell VEGF-A nach bzw. speichern dies in ihren intrazellulären Speichern, dass die Wirkung von Bevacizumab auf das Tumorstadium damit aufgehoben werden kann.

Allerdings wurde in unserem Versuchssetting nur der direkte Effekt auf die Tumorzellen untersucht und nicht die Blockade der Angiogenese, welche in der Literatur als Hauptwirkung auf die Tumorgewebe beschrieben ist. Um dies genauer zu untersuchen, müsste Bevacizumab im Tiermodell analysiert werden.

Auch in weiteren Experimenten, bei denen VEGF-A und VEGF-C mittels blockierenden Antikörpern inhibiert wurde, konnte kein Effekt auf das Tumorstadium bzw. das Tumorüberleben festgestellt werden (Daten nicht gezeigt), sodass die Inhibition des Substrats VEGF für eine Therapie des Medulloblastoms nicht zielführend wäre. Jedoch wurde die Blockade von VEGF-A und VEGF-C auch nicht in Kombination mit Gemcitabin getestet.

Deshalb untersuchten wir nun die Inhibition der VEGF-Rezeptoren der Tumorzellen. Dafür wählten wir zwei pan-VEGFR-Inhibitoren Axitinib und Cediranib für die weiteren Versuche aus. Die Wirkung von Axitinib (Handelsname: Inlyta ®, Hersteller: Pfizer) beruht auf der Hemmung der zellulären Autophosphorylierung aller VEGF-Rezeptoren, welches zur Apoptose der Zielzellen führt. Axitinib hat im Jahr 2012 von der FDA die Zulassung für die Behandlung des Nierenzellkarzinom erhalten (MacLean et al., 2016). Cediranib (Handelsname: Recentin ®, Hersteller: AstraZeneca) ist ebenso ein potenter Inhibitor aller VEGF-Rezeptoren und wurde 2008 von Maris und Kollegen an einer Vielzahl von soliden, pädiatrischen Tumor-Xenografts im pädiatrisch präklinischen Testprogramm (PPTP) getestet, darunter waren Rhabdoidtumore, Wilmstumore, Rhabdomyosarkome, Medulloblastome, Neuroblastome und Osteosarkome. Maris und Kollegen konnten zeigen, dass Cediranib eine breite, tumorhemmende Wirkung gegen verschiedenen Tumorarten aufzeigt (Maris et al., 2008). In klinischen Studien wurde Cediranib im Vergleich zu Bevacizumab gegen das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom und das kolorektale Karzinom im Erwachsenen getestet. Dort hatte Cediranib im Vergleich zum Marktführer der antiangiogenetischen Therapie Bevacizumab einen schlechteren tumorreduzierenden Effekt (Aggarwal et al., 2012).

In unseren Experimenten testeten wir beide pan-VEGFR-Inhibitoren gegen die Medulloblastom-Tumorzellen als Kombinationspartner für Gemcitabin. Axitinib und Cediranib in Kombination mit Gemcitabin zeigten beide einen 10.000-fach niedrigere EC50 im Vergleich zur Standardtherapie. Beide Inhibitoren alleine hatten jedoch nur eine geringe zytotoxische Wirkung auf die Tumorzellen, welches eine synergistische Wirkung der Substanzen suggeriert.

### **5.3.2. Zytotoxische Wirkung von Gemcitabin und Axitinib auf anderen Subtypen des Medulloblastoms**

Hierfür wurden drei weitere Tumorzelllinien des Medulloblastoms eingesetzt. HD-MB03 (Milde et al., 2012) und D341MED (Friedman et al., 1988) gehören der Gruppe 3 an, CHLA-01R-MED (Xu et al., 2015b) ist vom Subtyp Gruppe 4



und DAOY (Jacobsen et al., 1985) ist ein Shh-Medulloblastom. Die vier untersuchten Tumorzelllinien des Medulloblastoms exprimierten alle drei VEGF-Rezeptoren. Dies unterstützt die Aussagen und Hypothesen der Publikation von Slongo und Kollegen.

Die Kombination von Gemcitabin und den VEGFR-Inhibitoren zeigte in unseren Experimenten auch bei allen anderen Subtypen einen besseren zytotoxischen Effekt als die Standardtherapie mit Cisplatin und Etoposid. Gemcitabin alleine hingegen hatte lediglich bei der Shh-Gruppe zytotoxische Effekte, jedoch nicht bei der Zelllinie des Gruppe 4-Medulloblastoms. Da wir jedoch lediglich eine Zelllinie der Gruppe 4 getestet hatten, kann man hier noch keine aussagekräftigen Rückschlüsse auf das Therapieansprechen ziehen. Auch sollte berücksichtigt werden, dass es möglicherweise noch weitere molekulare Untergruppen gibt, die bisher noch nicht identifiziert sind und deren molekularen Eigenschaften weitere Hinweise auf weitere therapeutische Ansätze geben könnte. Zudem wirken die unterschiedlichen Zytostatika auch an verschiedenen Signalwegen in der Zelle, sodass es möglicherweise schwierig ist für jeden Subtyp eine maßgeschneiderte Substanzkombination zu finden.

Bei den *in vitro* Zytotoxizitätsversuchen fiel uns auf, dass die Tumorzelllinie HD-MB03 (Milde et al., 2012) ein anderes Ansprechen auf die Zytostatika hatte als die anderen Zelllinien der Gruppe 3. Die Tumorzelllinie hatte für alle Zytostatika eine deutlich höhere  $EC_{50}$  als alle anderen Tumorzelllinien. Möglicherweise gibt es in den Subgruppen des Medulloblastoms noch weitere Untergruppen, die unterschiedliche Resistenzen gegenüber den Zytostatika aufweisen.

### **5.3.3. Verminderte VEGF-Sekretion der Tumorzellen nach Axitinib-Behandlung**

Zuerst untersuchten wir die Expression der Rezeptoren auf den MB3W1-Tumorzellen nach einer Inkubation mit Axitinib und konnten keine Herunterregulierung des Rezeptors nachweisen (Daten nicht gezeigt). Im nächsten Schritt wurde die VEGF-A-Sekretion nach einer Inkubation mit Axitinib analysiert und wir konnten nachweisen, dass die Behandlung mit Axitinib

alleine, aber auch in Kombination mit Gemcitabin zu einer signifikanten Reduktion der VEGF-A-Sekretion führt. Canu und Kollegen untersuchten die VEGF-Sekretion nach einer Axitinib Behandlung mit Pankreaskarzinom-Tumorzelllinien und zeigten ebenso wie in unseren Experimente eine Reduktion der VEGF-Sekretion (Daten nicht gezeigt) (Canu et al., 2011).

#### **5.3.4. Wie selektiv wirkt Axitinib?**

Hu-Lowe und Kollegen, die Axitinib erstmals 2008 auf dessen anti-angiogenetische Wirkung und Antitumoraktivität untersuchten, zeigten ebenso, dass die Wirkung von Axitinib selektiv durch die VEGF-Rezeptoren vermittelt wird und weniger durch die Proteine Kit oder PDGFR- $\beta$  (Hu-Lowe et al., 2008). Mit Quirzatinib, einem Multikinase-Inhibitor, dessen Zielproteine unter anderem Kit und PDGFR- $\beta$  sind, konnten wir zeigen, dass dessen Wirkung auch in Kombination mit Gemcitabin eine deutlich schlechter ist als Axitinib und Gemcitabin. Daraus schließen wir, dass Kit bzw. PDGFR- $\beta$  für die beobachtete Zytotoxizität nachrangig von Bedeutung sind. Die Vermutung, dass Axitinib also tatsächlich vor allem über VEGFR-Blockade wirkt, liegt somit nahe.

#### **5.6. Mechanismen die durch Axitinib und Gemcitabin zur Apoptose führen**

Bisher wurde die zytotoxische Wirkung von Axitinib und Gemcitabin nur durch den Zelltod der Tumorzellen im FACS oder im BLI nachgewiesen. In der nachfolgenden Apoptosefärbung mit Annexin V- und Live/Dead-Färbung zeigte sich ebenfalls eine deutlich höhere Apoptoserate bei der Behandlung mit Gemcitabin und Axitinib im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Im nächsten Schritt fokussierten wir uns auf die apoptotische Signalkaskade, bei der vor allem Proteasen wie die Familie der Caspasen eine wichtige Schlüsselrolle spielen. In einer Publikation von 2002 untersuchten Nabhan und Kollegen die Aktivierung des apoptotischen Signalweges in Multiplen Myelom-Tumorzellen nach Behandlung mit Gemcitabin. Die Forschungsgruppe zeigte,

dass vor allem die Initiatorcaspase Caspase 9 durch das Nukleosidanalogon Gemcitabin aktiviert wird und damit zu vermehrter Apoptose führt (Nabhan et al., 2002). Aufbauend auf den Erkenntnissen dieser Publikation untersuchten wir die Caspase 9-Aktivität in den Tumorzellen nach einer 24-stündigen Inkubation mit Gemcitabin, Axitinib und deren Kombination. Die Aktivität von Caspase 9 ist in den Tumorzellen mit Gemcitabin-Therapie tendenziell höher als in der unbehandelten Kontrollgruppe, allerdings zeigen sich keine signifikanten Unterschiede. Möglicherweise ist es ein komplexeres Zusammenspiel verschiedener Caspasen, die letztendlich durch Gemcitabin aktiviert werden und die Tumorzellen zur Apoptose führen.

Eine weitere Möglichkeit, weshalb die Tumorzellen in den Zelltod gehen können ist die Aktivierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Diese Sauerstoffradikale entstehen zum größten Teil in den Mitochondrien als Nebenprodukt der Atmungskette durch Monoaminoxidasen an Komplex I und Komplex III. In Tumorzellen ist ROS im Zellzyklus, der Proliferation der Zellen, im Zellüberleben, der Apoptose und Angiogenese involviert (Liou and Storz, 2010). Morelli und Kollegen untersuchten die apoptotische Wirkung von Axitinib in Tumorzellen des Nierenzellkarzinoms und konnten zeigen, dass Axitinib reaktive Sauerstoffspezies aktiviert. ROS reagieren in den Tumorzellen mit der DNA, den Proteinen und den Lipiden, was eine Makromolekülzerstörung mit anschließender Apoptose der Zellen zur Folge hat (Morelli et al., 2015). Basierend auf den Untersuchungen von Morelli und Kollegen untersuchten wir die ROS-Aktivität in den Medulloblastom-Tumorzellen nach einer 24-stündigen Inkubationszeit mit Axitinib, alleine und in Kombination mit Gemcitabin. In den Tumorzellen, die mit Axitinib und Gemcitabin behandelt wurden, zeigte sich eine signifikant höhere ROS-Aktivität als in der unbehandelten Kontrollgruppe.

Zusammenfassend konnten wir durch die Behandlung mit Gemcitabin und Axitinib eine tendenziell höhere Caspase 9 und eine signifikant höhere ROS-Aktivität in den Tumorzellen nachweisen. Jedoch ist es durchaus möglich, dass hier noch einige andere Enzyme des Signalwegs während der Apoptose

aktiviert werden, sodass es hier noch Anknüpfungspunkte für weitere Untersuchungen gibt.

## 5.8. VEGFR-Inhibitoren im Tiermodell

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse und der Literaturrecherche wählten wir als Kombinationspartner für Gemcitabin für die Evaluation im Tiermodell den pan-VEGFR-Inhibitor Axitinib aus, weil dieser bereits in klinischen Studien getestet wurde und seit 2012 für das Nierenzellkarzinom zugelassen ist. Cediranib hatte in Kombination mit Gemcitabin in den *in vitro* Zytotoxizitätsversuchen eine ähnliche niedrige EC50 wie die Axitinib, allerdings wurde die tumorreduktive Wirkung von Cediranib in einigen Patientenstudien in Frage gestellt (Aggarwal et al., 2012; Batchelor et al., 2013).

Nach einer 4-wöchentlichen Therapie mit Axitinib und Gemcitabin im ektopen, subkutanen Tumormodell konnten wir eine signifikante Tumorreduktion im Vergleich zur Vehicle-Gruppe zeigen. Im Vergleich zur Standardtherapie mit Cisplatin und Etoposid fand sich ebenfalls ein tendenziell niedriges Tumorwachstum. Darüber hinaus wurde die Therapie mit Gemcitabin und Axitinib von den Tieren besser toleriert als die Behandlung mit Cisplatin und Etoposid, unter denen die Tiere bis zu 25% Gewichtsverlust erlitten. Auch bei Kindern, die mit Cisplatin behandelt wurden, ist die deutliche Toxizität mit Hinblick auf Übelkeit, Appetitlosigkeit, Hochtenschwerhörigkeit und Aplasie sehr gut bekannt. Diese Nebenwirkungen sieht man bei der Behandlung mit Gemcitabin nicht.

Die Versuchsgruppen, die mit der Standardtherapie und auch mit Gemcitabin und Axitinib behandelt wurden, zeigten ein deutlich längeres Überleben als die Vehicle-Gruppe.

In der histologischen Analyse der hypoxischen Areale des subkutanen Tumors zeigte sich eine größere Destruktion in der Tumorarchitektur in den behandelten Gruppen als im Vergleich zur Vehicle-Gruppe. Wir schlussfolgern, dass die Behandlung mit Zytostatika und VEGFR-Inhibitoren in den Tumoren zu einer

höheren Destruktion führt, die wiederum ein höheres Sauerstoffangebot mit einer daraus resultierenden erhöhten Hypoxie zur Folge hat. Erst 2017 wurde eine Arbeit von Yu und Kollegen veröffentlicht, die beschreibt, dass nach einer Behandlung mit Sorafenib, einem Multikinaseinhibitor, der die intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne des VEGF-Rezeptors inhibiert, die Hypoxie in Nierenzellkarzinomen im Tiermodell erhöht wird (Yu et al., 2017).

Im finalen Versuch wurde nun die Behandlung mit Gemcitabin und Axitinib im intrakraniellen Tiermodell evaluiert. Die Therapie der Versuchstiere erfolgte analog zum subkutanen Modell. Auch in diesem Tiermodell konnte eine Tumorreduktion in den mit Gemcitabin/Axitinib-behandelten Tieren im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen detektiert werden. Wie bereits bei den anderen Tierversuchen wurde die Behandlung mit Gemcitabin/Axitinib besser toleriert als die Standardtherapie mit Cisplatin/Etoposid und auch das Gesamtüberleben der Tiere mit der neuen Therapiekombination war signifikant länger im Vergleich zur bisherigen Standardtherapie. Ein Vorteil dieser neuen Kombination könnte sein, dass die Therapie mit Gemcitabin/Axitinib bereits kurz nach der operativen Entfernung des Tumors beginnen könnte, da sie besser toleriert wird, als die bisherige Standardtherapie. Dies wiederum könnte dann nochmals den Therapieansprechen verstärken. Am Endpunkt des Versuches wurde der Kleinhirntumor entnommen und das Gewebe histologisch aufgearbeitet. In den orthotopen Tumoren konnten wir allerdings keine Tumorarchitektur mit Zonenbildung oder hypoxische bzw. apoptotische Areale innerhalb des Tumors nach TUNEL- bzw. Hypoxiefärbung nachweisen.

Darüber hinaus wurde den Tieren, analog zum subkutanen Tumormodell ein Blutgefäß-detektierender Antikörper injiziert und die Gewebeproben anschließend im Lichtblatfluoreszenzmikroskop analysiert. Auch hier zeigt sich eine deutliche Neoangiogenese im Kleinhirn, die durch den Tumor initiiert wurde.

Neben dem BLI-Signal, der Kaplan-Meier-Kurve und der histologischen Analyse der Tumorproben – im subkutanen Modell sowie im orthotopen Modell - analysierten wir am Endpunkt des Versuches zusätzlich die makroskopischen

Gefäßstrukturen im Tumor mit Hilfe des Lichtblattfluoreszenzmikroskops. Wir fanden in den behandelten Tieren weniger stark verzweigte Gefäße im Vergleich zur Vehicle-Gruppe. Das schlossen wir, dass dieser Effekt durch die natürliche Angiogenese in der Vehicle-Gruppe entsteht, da sich dort die Blutgefäße ungehindert ohne Zytostatika und Inhibitoren von Beginn an ausbilden konnten. In den behandelten Tumoren erfolgte initial während der Therapie eine Inhibierung der Neoangiogenese und die Blutgefäßneubildung konnte erst nach vollständiger Elimination der Substanzen aus dem Organismus initiiert werden.

### **5.9. Schlussfolgerung zur Behandlung des Gruppe 3-Medulloblastoms mit Gemcitabin und Axitinib**

Mit der aus einem Patienten gewonnenen Tumorzelllinie MB3W1 (Dietl et al., 2016) wurden über 20 unterschiedliche Zytostatika und Inhibitoren gegen unterschiedliche Signalwege alleine sowie in Kombination getestet. Letztendlich hatte die Kombination aus Gemcitabin - einem Nukleosidanalogen - und Axitinib - einem pan-VEGFR-Inhibitor - die beste zytotoxische Wirkung auf die Gruppe 3-Tumorzellen *in vitro*, auf andere Medulloblastom-Tumorzelllinien als auch im subkutanen und orthotopen Tiermodell im Vergleich zur Standardtherapie aus Cisplatin und Etoposid. Diese neuartige Kombination aus Gemcitabin und Axitinib wurde in Patienten bisher noch nicht an Gehirntumoren getestet, sondern nur an anderen Tumorentitäten wie dem Pankreaskarzinom und dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom. In einer randomisierten Phase III-Studie von Ottaiano und Kollegen mit über 4.500 Patienten wurde Gemcitabin als Monotherapie im Vergleich zu Gemcitabin und verschiedenen Inhibitoren wie Axitinib, Erlotinib, Cetuximab, Bevacizumab, Masitinib, Ganitumab und Rigosertib am fortgeschrittenen Pankreaskarzinom evaluiert. Es zeigten sich keine signifikanten Überlebensvorteile für die Patienten mit der Therapie aus Gemcitabin und Inhibitoren im Vergleich zur Monotherapie, was wiederum von den Autoren durch das hochaggressive Wachstum des Pankreastumors und die

späte Diagnosestellung im fortgeschrittenen Stadium begründet wurde (Ottaiano et al., 2017). Bondarenko und Kollegen führten 2013 eine Phase II-Studie zur Verträglichkeit von Axitinib in Kombination mit Chemotherapeutika wie Cisplatin und Gemcitabin an Patienten mit einem fortgeschrittenen, nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom durch. Axitinib in Kombination mit den Chemotherapeutika wurde von 78,9% der Patienten ohne gesundheitliche Einschränkungen gut vertragen, 13,2% zeigten eine Hypertonie und eine Neutropenie, 7,9% zeigten Hämoptysen. Jedoch wurde in der Studie keine Referenzgruppe mitgeführt, weshalb die Beurteilbarkeit des Effekts eingeschränkt ist (Bondarenko et al., 2015). In den USA und Kanada wurde von 2014 bis 2017 die erste Studie der Children's Oncology Group über die Wirksamkeit und das Toxizitätsprofil von Axitinib bei Kindern und Jugendlichen mit soliden Tumoren initiiert. In der Studie wurden 19 Kinder und Jugendliche im Alter von 5 bis 17 Jahren mit einem Rezidivtumor mit Axitinib behandelt. Zu den häufigsten Nebenwirkungen zählten Anämie, Fatigue, Diarrhoe und Hypertonie, die alle behandelbar waren. Bei einigen Patienten die mit 6 Zyklen Axitinib behandelt wurden, konnte sogar eine Stabilisierung der Erkrankung erzielt werden (Geller et al., 2018).

Axitinib wurde bereits als Monotherapie in präklinischen Gehirntumormodellen wie das Glioblastoma multiforme-Modell, mit Erfolg getestet (Lu et al., 2015; Morelli et al., 2017). 2015 erschien eine Publikation von Lu und Kollegen, in der erstmals der signifikante zytotoxische Effekt von systemisch applizierten Inhibitoren wie Axitinib an verschiedenen primären Glioblastom-Tumorzellen und auch im Tiermodell mit humanen U87 Gliomzellen, MGG4-Gliomstammzellen und murinen Gliomstammzellen dargestellt wurde (Lu et al., 2015). Auch in der randomisierten Phase II-Studie von Duerinck und Kollegen, in der Patienten mit einem rezidivierenden Glioblastoma multiforme eingeschlossen wurde, zeigte sich die Therapie Axitinib im Vergleich zur besten medizinischen Alternativtherapie, die aus Bevacizumab oder Lomustin besteht, durch ein längeres Überleben der Patienten (Duerinck et al., 2016).

Zusammenfassend konnten wir eine neue Kombination eines Zytostatikums und einem zielgerichteten Inhibitor mit einem positiven Wirkungsprofil für ein präklinisches Gruppe 3-Medulloblastommodell finden. Gemcitabin und Axitinib werden beide bereits in der Klinik als Therapie bei unterschiedlichen Tumorentitäten eingesetzt und gut vertragen. Die Wirksamkeit von Gemcitabin und Axitinib jeweils als Monotherapie konnte in einigen präklinischen Modellen als auch in Studien an erkrankten Patienten gezeigt werden. Kürzlich wurde ein Phase-II-Studie von Park und Kollegen veröffentlicht, die die Kombination aus Gemcitabin und Axitinib an adulten Patienten mit metastasierten Nierenzellkarzinom bzw. in der Rezidivsituation evaluiert haben. Die häufigsten Nebenwirkungen waren Neutropenie, Hypertonie und Gewichtsverlust, jedoch waren alle Nebenwirkungen gut therapierbar und es ergab sich keine unerwartete Toxizität (Park et al., 2019). 28% der Patienten erlangten durch die Therapie eine stabile Erkrankung.

Letztendlich ist diese neuartige Kombination aus Gemcitabin und Axitinib eine therapeutische Option für Patienten, die die bisherige Standardtherapie aufgrund der Toxizität nicht tolerieren oder bei denen bereits irreversible Nebenwirkungen aufgetreten sind.

## **5.10. Ausblick**

Bisher haben wir die neue Kombination aus Gemcitabin und Axitinib in den *in vitro* Experimenten an mehreren Tumorzelllinien getestet und es fand sich auch an anderen Tumorzelllinien des Medulloblastoms ein zytotoxischer Effekt. Jedoch wurde in dieser Arbeit die Kombination aus Gemcitabin und Axitinib lediglich an den MB3W1 Tumorzellen im Tierversuch untersucht. Um die neue Kombination noch weiter zu verifizieren, könnte man als nächsten Schritt die Behandlung mit Gemcitabin und Axitinib auch an anderen Tumorzelllinien im subkutanen wie orthotopen Tiermodell evaluieren und das Therapieansprechen miteinander zu vergleichen.



Eine weitere Möglichkeit die Wirksamkeit und das Therapieansprechen zu verbessern, wäre die Kombination aus Gemcitabin/Axitinib parallel zur Bestrahlung zu verabreichen als Radiochemotherapie. Dies könnte man zuerst in *in vitro* Experimenten untersuchen und bei vielversprechenden Ergebnissen wäre es auch denkbar, die etablierten Tumore im Tierversuch mit einer simultanen Radiochemotherapie zu behandeln. Alternativ wäre es auch denkbar, zuerst die Radiatio durchzuführen und direkt im Anschluss die Chemotherapie zu erproben.

Als nächster Schritt wäre es denkbar, die Substanzkombination in einer Rezidivsituation an Patienten zu evaluieren. Die Kombination aus Gemcitabin und Axitinib wurde bereits an adulten Tumorpatienten untersucht und es zeigte sich eine vielversprechende Effektivität in Bezug auf das Gesamtüberleben nach 24 Monaten und die Therapie wurde gut toleriert (Park et al., 2019). Eine weitere Möglichkeit die Substanzkombination klinisch zu untersuchen, wäre ein vorgeschalteter Zyklus mit Gemcitabin und Axitinib vor der Standardtherapie als sog. window of opportunity. Nach der Gehirnoperation benötigen die Patienten in der Regel einige Woche zur Rekonvaleszenz bevor sie wieder Chemotherapie fähig sind. Da sich allerdings die Substanzkombination aus Gemcitabin und Axitinib in den Tierversuchen weniger toxisch zeigte und auch in klinischen Studien gezeigt wurde, dass die Kombination bei adulten Patienten gut vertragen wurde (Park et al., 2019), wäre es durchaus denkbar diese Therapie bereits postoperativ früher zu beginnen, um ein besseres Behandlungsergebnis für die Patienten zu erzielen.

## Zusammenfassung

Das Medulloblastom ist der häufigste, maligne Hirntumor des Kindesalters. In den letzten Jahren ist es gelungen, molekularbiologisch definierte Subgruppen innerhalb dieser Tumorentität zu definieren, die sich durch ein unterschiedliches therapeutisches Ansprechen differenzieren lassen. Es werden vier Gruppen abgegrenzt: Tumore mit Aktivierung des WNT-Signalwegs, des SHH-Signalwegs, sowie der Gruppe 3, die sich vor allem durch eine Myc-Amplifikation auszeichnen und Gruppe 4, in der MycN amplifiziert wird. Während Patienten mit SHH- und WNT-Tumoren eher eine günstige Prognose haben, ist der Bedarf an neuen Therapieansätzen für Patienten mit Gruppe 3- und Gruppe 4-Tumoren auf Grund der schlechten Prognose sehr hoch.

Die aus einem malignen Pleuraerguss eines Gruppe 3-Medulloblastom Patienten gewonnenen Tumorzellen konnten erfolgreich als permanente Zelllinie etabliert sowie *in vitro* und *in vivo* charakterisiert werden (Dietl et al., 2016). Dieses Tumormodell habe ich in meiner Dissertationsarbeit genutzt um die zytotoxische Wirkung neuer Zytostatika und Inhibitoren Kombinationen auf das Gruppe-3 Medulloblastom *in vitro* und im Tiermodell zu untersuchen. Bei der Auswahl neuer Therapieansätze galt die Maßgabe, Substanzen zu wählen, die für den klinischen Einsatz geeignet sind, neue gezielte zytostatische Mechanismen aufweisen und bei denen bereits publizierte Vorarbeiten nahelegen, dass diese das ZNS tatsächlich erreichen. In unserem *in vitro* Modell testeten wir 23 Substanzen und wählten dann die fünf vielversprechendsten für das subkutane Tumormausmodell aus. Als Vergleichsgruppen für das Therapieansprechen wählten wir die Kombination aus Cisplatin und Etoposid, die gerade bei den Patienten mit einem Hochrisiko-Medulloblastom die Therapie der Wahl ist. Im ersten Tierversuch konnte gezeigt werden, dass Gemcitabin als Monotherapie den gleichen zytotoxischen Therapieeffekt zeigt, wie Cisplatin und Etoposid in Kombination. Deshalb war nun das Ziel eine Substanz zu finden, welche dann in Kombination mit Gemcitabin einen besseres Therapieansprechen als die Standardtherapie zeigt.

Bei der Tumorpräparation im initialen Tierversuch fiel auf, dass die Tumoren stark vaskularisiert sind. Nach dieser Beobachtung stellten wir uns die Fragen, ob die Inhibition des Vaskularisierungsvorgangs im Tumor einen additiven zytotoxischen Effekt auf das Tumorstadium hat. Daraufhin erweiterten wir die Suche nach geeigneten Substanzen für das Gruppe 3-Medulloblastom um Multikinaseinhibitoren, die auch VEGF-Rezeptoren inhibieren. Überraschenderweise konnten wir zeigen das Gemcitabin in Kombination mit verschiedenen VEGF-Rezeptor-Inhibitoren in den Toxizitätsversuchen *in vitro* eine 10.000fach niedrigere EC50 hat als die Kombination aus Cisplatin und Etoposid. Auch in den anschließenden Tierversuchen konnten wir zeigen, dass Gemcitabin in Kombination mit Axitinib einen besseren Therapieerfolg bezogen auf das Tumorstadium zeigt, als die bisherige Standardtherapie. Darüber hinaus verloren die Tiere, die mit Gemcitabin und Axitinib behandelt wurden deutlich weniger an Gewicht, als die Tiere die die Standardtherapie erhielten.

Zusammenfassend können wir zeigen, dass Axitinib, ein neuer pan-VEGF-Rezeptor-Inhibitor der bisher nur in anderen Tumorentitäten wie dem Nierenzellkarzinom zum Einsatz kommt, in Kombination mit Gemcitabin, einem Nukleosidanalogen, einen deutlichen zytotoxischen Effekt an Medulloblastom Zelllinien *in vitro* als auch im subkutanen und orthotopen Tiermodell hat. Diese Ergebnisse könnten die Basis sein für neue therapeutische Strategien gegen das Gruppe 3-Medulloblastom bei Kindern, die die bisherige Therapie nicht mehr tolerieren oder bereits irreversible Nebenwirkungen der Standardtherapie entwickelt haben.

## Abstract

Medulloblastoma is the most common malignant brain tumor in childhood. In the last few years, it could be successfully defined new molecular subgroups within this tumor entity, which also were defined through a different response to therapy. Four groups are delineated: tumors with activation of the WNT signaling pathway, the SHH signaling pathway, group 3, which are mainly characterized by *myc-c* amplification and group 4, in which *myc-n* is amplified. While patients with SHH and WNT tumors tend to have a favorable prognosis, the need for new therapeutic approaches for patients with group 3 and group 4 tumors is very high due to the poor prognosis.

The tumor cells obtained from a malignant pleural effusion of a group 3 medulloblastoma patient were successfully established as a permanent cell line and characterized *in vitro* and *in vivo* (Dietl et al., 2016). I used this tumor model in my thesis project to investigate the cytotoxic effects of new cytostatics and inhibitor combinations on the group 3 medulloblastoma *in vitro* and in the animal models. When selecting new therapeutic approaches, the requirement was to choose substances that are suitable for clinical purposes. Furthermore, they need to have new selective cytostatic mechanisms and for which previously published preparatory work suggests that they reach the CNS.

In our *in vitro* model, we tested 23 substances and then selected the five most promising ones for the subcutaneous tumor mouse model. We chose the combination of cisplatin and etoposide as a comparison group for the therapy response, which is used in the clinics for the therapy in high-risk medulloblastoma patients. In the first animal experiment, we could show that gemcitabine as a monotherapy shows the same cytotoxic effect on tumors as cisplatin and etoposide in combination. Therefore, the subsequent goal was to find a substance, that in combination with gemcitabine could achieve a better therapy outcome than the current standard therapy.

During the tumor preparation in the initial animal experiment, we noticed that the tumors were strongly vascularized. After this observation, we asked whether the inhibition of vascularization in the tumor would have an additive therapeutic effect on tumor growth. We then expanded the search for suitable substances for group 3 medulloblastoma to include multikinase inhibitors that also inhibit VEGF receptors. Surprisingly we found a 10.000-fold lower EC50 of gemcitabine in combination with axitinib in comparison to the standard therapy with cisplatin and etoposide. In the following animal experiments we could corroborated these findings and showed a significant reduction on tumor growth after Gemcitabine and axitinib treatment, in comparison to the control group. In addition, the animals treated with gemcitabine and axitinib lost less weight than the animals receiving standard therapy.

In summary, we can show that axitinib, a new pan-VEGF receptor inhibitor that has so far only been used in other tumor entities such as renal cell carcinoma, in combination with gemcitabine, a nucleoside analogue, has a clear cytotoxic effect on medulloblastoma cell lines in vitro as well as in subcutaneous and orthotopic animal models. These results could form the basis for new therapeutic strategies against group 3 medulloblastoma in children who no longer tolerate the previous therapy or who have already developed irreversible side effects of standard therapy.

## Literaturverzeichnis

- Aggarwal, C., N. Somaiah, and G. Simon. 2012. Antiangiogenic agents in the management of non-small cell lung cancer: where do we stand now and where are we headed? *Cancer Biol Ther* 13:247-263.
- Batchelor, T.T., P. Mulholland, B. Neyns, L.B. Nabors, M. Campone, A. Wick, W. Mason, T. Mikkelsen, S. Phuphanich, L.S. Ashby, J. Degroot, R. Gattamaneni, L. Cher, M. Rosenthal, F. Payer, J.M. Jurgensmeier, R.K. Jain, A.G. Sorensen, J. Xu, Q. Liu, and M. van den Bent. 2013. Phase III randomized trial comparing the efficacy of cediranib as monotherapy, and in combination with lomustine, versus lomustine alone in patients with recurrent glioblastoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 31:3212-3218.
- Benavides, M., A. Anton, J. Gallego, M.A. Gomez, A. Jimenez-Gordo, A. La Casta, B. Laquente, T. Macarulla, J.R. Rodriguez-Mowbray, and J. Maurel. 2015. Biliary tract cancers: SEOM clinical guidelines. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* 17:982-987.
- Blom, T., A. Roselli, V. Hayry, O. Tynninen, K. Wartiovaara, M. Korja, K. Nordfors, H. Haapasalo, and N.N. Nupponen. 2010. Amplification and overexpression of KIT, PDGFRA, and VEGFR2 in medulloblastomas and primitive neuroectodermal tumors. *Journal of neuro-oncology* 97:217-224.
- Bondarenko, I.M., A. Ingrosso, P. Bycott, S. Kim, and C.L. Cebotaru. 2015. Phase II study of axitinib with doublet chemotherapy in patients with advanced squamous non-small-cell lung cancer. *BMC Cancer* 15:339.
- Brede, C., M. Friedrich, A.L. Jordan-Garrote, S.S. Riedel, C.A. Bauerlein, K.G. Heinze, T. Bopp, S. Schulz, A. Mottok, C. Kiesel, K. Mattenheimer, M. Ritz, V. von Krosigk, A. Rosenwald, H. Einsele, R.S. Negrin, G.S. Harms, and A. Beilhack. 2012. Mapping immune processes in intact tissues at cellular resolution. *The Journal of clinical investigation* 122:4439-4446.
- Burger, R.A., M.F. Brady, M.A. Bookman, G.F. Fleming, B.J. Monk, H. Huang, R.S. Mannel, H.D. Homesley, J. Fowler, B.E. Greer, M. Boente, M.J. Birrer, S.X. Liang, and G. Gynecologic Oncology. 2011. Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *N Engl J Med* 365:2473-2483.

- Canu, B., A. Fioravanti, P. Orlandi, T. Di Desidero, G. Ali, G. Fontanini, A. Di Paolo, M. Del Tacca, R. Danesi, and G. Bocci. 2011. Irinotecan synergistically enhances the antiproliferative and proapoptotic effects of axitinib in vitro and improves its anticancer activity in vivo. *Neoplasia* 13:217-229.
- Cappellari, A.R., M.M. Pillat, H.D. Souza, F. Dietrich, F.H. Oliveira, F. Figueiro, A.L. Abujamra, R. Roesler, J. Lecka, J. Sevigny, A.M. Battastini, and H. Ulrich. 2015. Ecto-5'-Nucleotidase Overexpression Reduces Tumor Growth in a Xenograph Medulloblastoma Model. *PloS one* 10:e0140996.
- Carrie, C., J. Grill, D. Figarella-Branger, V. Bernier, L. Padovani, J.L. Habrand, M. Benhassel, M. Mege, M. Mahe, P. Quetin, J.P. Maire, M.H. Baron, P. Clavere, S. Chapet, P. Maingon, C. Alapetite, L. Claude, A. Laprie, and S. Dussart. 2009. Online quality control, hyperfractionated radiotherapy alone and reduced boost volume for standard risk medulloblastoma: long-term results of MSFOP 98. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27:1879-1883.
- Chang, Y.S., J. Adnane, P.A. Trail, J. Levy, A. Henderson, D. Xue, E. Bortolon, M. Ichetovkin, C. Chen, A. McNabola, D. Wilkie, C.A. Carter, I.C. Taylor, M. Lynch, and S. Wilhelm. 2007. Sorafenib (BAY 43-9006) inhibits tumor growth and vascularization and induces tumor apoptosis and hypoxia in RCC xenograft models. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 59:561-574.
- Chung, A.S., and N. Ferrara. 2011. Developmental and pathological angiogenesis. *Annual review of cell and developmental biology* 27:563-584.
- Dietl, S., S. Schwinn, S. Dietl, S. Riedel, F. Deinlein, S. Rutkowski, A.O. von Bueren, J. Krauss, T. Schweitzer, G.H. Vince, D. Picard, M. Eyrich, A. Rosenwald, V. Ramaswamy, M.D. Taylor, M. Remke, C.M. Monoranu, A. Beilhack, P.G. Schlegel, and M. Wolfli. 2016. MB3W1 is an orthotopic xenograft model for anaplastic medulloblastoma displaying cancer stem cell- and Group 3-properties. *BMC Cancer* 16:115.
- Dobrovoljac, M., H. Hengartner, E. Boltshauser, and M.A. Grotzer. 2002. Delay in the diagnosis of paediatric brain tumours. *Eur J Pediatr* 161:663-667.
- Duerinck, J., S. Du Four, F. Vandervorst, N. D'Haene, M. Le Mercier, A. Michotte, A.M. Van Binst, H. Everaert, I. Salmon, F. Bouttens, V. Verschaeve, and B. Neyns. 2016. Randomized phase II study of axitinib versus physicians best alternative choice of therapy in patients with recurrent glioblastoma. *Journal of neuro-oncology* 128:147-155.
- Duffner, P.K., M.E. Horowitz, J.P. Krischer, H.S. Friedman, P.C. Burger, M.E. Cohen, R.A. Sanford, R.K. Mulhern, H.E. James, C.R. Freeman, and et

- al. 1993. Postoperative chemotherapy and delayed radiation in children less than three years of age with malignant brain tumors. *The New England journal of medicine* 328:1725-1731.
- Eng, L.F., R.S. Ghirnikar, and Y.L. Lee. 2000. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochemical research* 25:1439-1451.
- Escudier, B. 2007. Anti-VEGF therapy for renal cell carcinoma. *Clin Adv Hematol Oncol* 5:530-531.
- Escudier, B., A. Pluzanska, P. Koralewski, A. Ravaud, S. Bracarda, C. Szczylik, C. Chevreau, M. Filipek, B. Melichar, E. Bajetta, V. Gorbunova, J.O. Bay, I. Bodrogi, A. Jagiello-Gruszfeld, N. Moore, and A.T. investigators. 2007. Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet* 370:2103-2111.
- Friedman, H.S., P.C. Burger, S.H. Bigner, J.Q. Trojanowski, G.M. Brodeur, X.M. He, C.J. Wikstrand, J. Kurtzberg, M.E. Berens, E.C. Halperin, and et al. 1988. Phenotypic and genotypic analysis of a human medulloblastoma cell line and transplantable xenograft (D341 Med) demonstrating amplification of c-myc. *Am J Pathol* 130:472-484.
- Geller, J.I., E. Fox, B.K. Turpin, S.L. Goldstein, X. Liu, C.G. Minard, R.A. Kudgus, J.M. Reid, S.L. Berg, and B.J. Weigel. 2018. A study of axitinib, a VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, in children and adolescents with recurrent or refractory solid tumors: A Children's Oncology Group phase 1 and pilot consortium trial (ADVL1315). *Cancer* 124:4548-4555.
- Geoerger, B., J. Chisholm, M.C. Le Deley, J.C. Gentet, C.M. Zwaan, N. Dias, T. Jaspán, K. Mc Hugh, D. Couanet, S. Hain, A. Devos, R. Riccardi, C. Cesare, J. Boos, D. Frappaz, P. Leblond, I. Aerts, G. Vassal, and C. European Consortium Innovative Therapies for Children with. 2011. Phase II study of gemcitabine combined with oxaliplatin in relapsed or refractory paediatric solid malignancies: An innovative therapy for children with Cancer European Consortium Study. *European journal of cancer* 47:230-238.
- Giangaspero, F., S. Wellek, J. Masuoka, M. Gessi, P. Kleihues, and H. Ohgaki. 2006. Stratification of medulloblastoma on the basis of histopathological grading. *Acta neuropathologica* 112:5-12.
- Gray, R., S. Bhattacharya, C. Bowden, K. Miller, and R.L. Comis. 2009. Independent review of E2100: a phase III trial of bevacizumab plus paclitaxel versus paclitaxel in women with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 27:4966-4972.



- Grotzer, M.A., R. Wiewrodt, A.J. Janss, H. Zhao, A. Cnaan, L.N. Sutton, L.B. Rorke, and P.C. Phillips. 2001. High microvessel density in primitive neuroectodermal brain tumors of childhood. *Neuropediatrics* 32:75-79.
- Guancial, E.A., and J.E. Rosenberg. 2015. The role of genomics in the management of advanced bladder cancer. *Current treatment options in oncology* 16:319.
- Halperin, E.C., D.M. Watson, and S.L. George. 2001. Duration of symptoms prior to diagnosis is related inversely to presenting disease stage in children with medulloblastoma. *Cancer* 91:1444-1450.
- He, Q., J. Gao, S. Ge, T. Wang, Y. Li, Z. Peng, Y. Li, and L. Shen. 2014. Axitinib alone or in combination with chemotherapeutic drugs exerts potent antitumor activity against human gastric cancer cells in vitro and in vivo. *Journal of cancer research and clinical oncology* 140:1575-1583.
- Hillman, G.G., F. Lonardo, D.J. Hoogstra, J. Rakowski, C.K. Yunker, M.C. Joiner, G. Dyson, S. Gadgeel, and V. Singh-Gupta. 2014. Axitinib Improves Radiotherapy in Murine Xenograft Lung Tumors. *Translational oncology*
- Hu-Lowe, D.D., H.Y. Zou, M.L. Grazzini, M.E. Hallin, G.R. Wickman, K. Amundson, J.H. Chen, D.A. Rewolinski, S. Yamazaki, E.Y. Wu, M.A. McTigue, B.W. Murray, R.S. Kania, P. O'Connor, D.R. Shalinsky, and S.L. Bender. 2008. Nonclinical antiangiogenesis and antitumor activities of axitinib (AG-013736), an oral, potent, and selective inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases 1, 2, 3. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14:7272-7283.
- Huber, H., A. Eggert, A.J. Janss, R. Wiewrodt, H. Zhao, L.N. Sutton, L.B. Rorke, P.C. Phillips, and M.A. Grotzer. 2001. Angiogenic profile of childhood primitive neuroectodermal brain tumours/medulloblastomas. *European journal of cancer* 37:2064-2072.
- Hurwitz, H., L. Fehrenbacher, W. Novotny, T. Cartwright, J. Hainsworth, W. Heim, J. Berlin, A. Baron, S. Griffing, E. Holmgren, N. Ferrara, G. Fyfe, B. Rogers, R. Ross, and F. Kabbinavar. 2004. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 350:2335-2342.
- Jacobsen, P.F., D.J. Jenkyn, and J.M. Papadimitriou. 1985. Establishment of a human medulloblastoma cell line and its heterotransplantation into nude mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 44:472-485.

- Jin, K., X.O. Mao, and D.A. Greenberg. 2006. Vascular endothelial growth factor stimulates neurite outgrowth from cerebral cortical neurons via Rho kinase signaling. *Journal of neurobiology* 66:236-242.
- Kawauchi, D., G. Robinson, T. Uziel, P. Gibson, J. Rehg, C. Gao, D. Finkelstein, C. Qu, S. Pounds, D.W. Ellison, R.J. Gilbertson, and M.F. Roussel. 2012. A mouse model of the most aggressive subgroup of human medulloblastoma. *Cancer cell* 21:168-180.
- Kaye, S.B. 1998. New antimetabolites in cancer chemotherapy and their clinical impact. *British journal of cancer* 78 Suppl 3:1-7.
- Kim, K.J., B. Li, K. Houck, J. Winer, and N. Ferrara. 1992. The vascular endothelial growth factor proteins: identification of biologically relevant regions by neutralizing monoclonal antibodies. *Growth Factors* 7:53-64.
- Kool, M., A. Korshunov, M. Remke, D.T. Jones, M. Schlanstein, P.A. Northcott, Y.J. Cho, J. Koster, A. Schouten-van Meeteren, D. van Vuurden, S.C. Clifford, T. Pietsch, A.O. von Bueren, S. Rutkowski, M. McCabe, V.P. Collins, M.L. Backlund, C. Haberler, F. Bourdeaut, O. Delattre, F. Doz, D.W. Ellison, R.J. Gilbertson, S.L. Pomeroy, M.D. Taylor, P. Lichter, and S.M. Pfister. 2012. Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas. *Acta Neuropathol* 123:473-484.
- Kortmann, R.D., B. Timmermann, J. Kuhl, N. Willich, M. Flentje, C. Meisner, and M. Bamberg. 1999. HIT '91 (prospective, co-operative study for the treatment of malignant brain tumors in childhood): accuracy and acute toxicity of the irradiation of the craniospinal axis. Results of the quality assurance program. *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Rontgengesellschaft ... [et al]* 175:162-169.
- Kuhl, J., H.L. Muller, F. Berthold, R.D. Kortmann, F. Deinlein, E. Maass, N. Graf, A. Gnekow, W. Scheurlen, U. Gobel, J.E. Wolff, M. Bamberg, P. Kaatsch, P. Kleihues, D. Rating, N. Sorensen, and O.D. Wiestler. 1998. Preradiation chemotherapy of children and young adults with malignant brain tumors: results of the German pilot trial HIT'88/'89. *Klinische Padiatrie* 210:227-233.
- Lau, J., C. Schmidt, S.L. Markant, M.D. Taylor, R.J. Wechsler-Reya, and W.A. Weiss. 2012. Matching mice to malignancy: molecular subgroups and models of medulloblastoma. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery* 28:521-532.
- Liou, G.Y., and P. Storz. 2010. Reactive oxygen species in cancer. *Free radical research* 44:479-496.

- Louis, D.N., H. Ohgaki, O.D. Wiestler, W.K. Cavenee, P.C. Burger, A. Jouvett, B.W. Scheithauer, and P. Kleihues. 2007. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114:97-109.
- Lu, L., D. Saha, R.L. Martuza, S.D. Rabkin, and H. Wakimoto. 2015. Single agent efficacy of the VEGFR kinase inhibitor axitinib in preclinical models of glioblastoma. *J Neurooncol* 121:91-100.
- MacLean, E., J. Mardekian, L.A. Cisar, C.J. Hoang, and J. Harnett. 2016. Real-World Treatment Patterns and Costs for Patients with Renal Cell Carcinoma Initiating Treatment with Sunitinib and Pazopanib. *J Manag Care Spec Pharm* 22:979-990.
- Maris, J.M., J. Courtright, P.J. Houghton, C.L. Morton, R. Gorlick, E.A. Kolb, R. Lock, M. Tajbakhsh, C.P. Reynolds, S.T. Keir, J. Wu, and M.A. Smith. 2008. Initial testing of the VEGFR inhibitor AZD2171 by the pediatric preclinical testing program. *Pediatr Blood Cancer* 50:581-587.
- Massimino, M., V. Biassoni, L. Gandola, M.L. Garre, G. Gatta, F. Giangaspero, G. Poggi, and S. Rutkowski. 2016. Childhood medulloblastoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 105:35-51.
- Massimino, M., F. Giangaspero, M.L. Garre, L. Gandola, G. Poggi, V. Biassoni, G. Gatta, and S. Rutkowski. 2011. Childhood medulloblastoma. *Critical reviews in oncology/hematology* 79:65-83.
- Messier, C., S. Emond, and K. Ethier. 1999. New techniques in stereotaxic surgery and anesthesia in the mouse. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 63:313-318.
- Milde, T., M. Lodrini, L. Savelyeva, A. Korshunov, M. Kool, L.M. Brueckner, A.S. Antunes, I. Oehme, A. Pekrun, S.M. Pfister, A.E. Kulozik, O. Witt, and H.E. Deubzer. 2012. HD-MB03 is a novel Group 3 medulloblastoma model demonstrating sensitivity to histone deacetylase inhibitor treatment. *J Neurooncol* 110:335-348.
- Morelli, M.B., C. Amantini, M. Nabissi, C. Cardinali, M. Santoni, G. Bernardini, A. Santoni, and G. Santoni. 2017. Axitinib induces senescence-associated cell death and necrosis in glioma cell lines: The proteasome inhibitor, bortezomib, potentiates axitinib-induced cytotoxicity in a p21(Waf/Cip1) dependent manner. *Oncotarget* 8:3380-3395.
- Morelli, M.B., C. Amantini, M. Santoni, A. Soriani, M. Nabissi, C. Cardinali, A. Santoni, and G. Santoni. 2015. Axitinib induces DNA damage response leading to senescence, mitotic catastrophe, and increased NK cell recognition in human renal carcinoma cells. *Oncotarget* 6:36245-36259.

- Morfouace, M., A. Shelat, M. Jacus, B.B. Freeman, 3rd, D. Turner, S. Robinson, F. Zindy, Y.D. Wang, D. Finkelstein, O. Ayrault, L. Bihannic, S. Puget, X.N. Li, J.M. Olson, G.W. Robinson, R.K. Guy, C.F. Stewart, A. Gajjar, and M.F. Roussel. 2014. Pemetrexed and gemcitabine as combination therapy for the treatment of Group3 medulloblastoma. *Cancer Cell* 25:516-529.
- Nabhan, C., D. Gajria, N.L. Krett, V. Gandhi, K. Ghias, and S.T. Rosen. 2002. Caspase activation is required for gemcitabine activity in multiple myeloma cell lines. *Molecular cancer therapeutics* 1:1221-1227.
- Northcott, P.A., A.M. Dubuc, S. Pfister, and M.D. Taylor. 2012a. Molecular subgroups of medulloblastoma. *Expert Rev Neurother* 12:871-884.
- Northcott, P.A., D.J. Shih, M. Remke, Y.J. Cho, M. Kool, C. Hawkins, C.G. Eberhart, A. Dubuc, T. Guettouche, Y. Cardentey, E. Bouffet, S.L. Pomeroy, M. Marra, D. Malkin, J.T. Rutka, A. Korshunov, S. Pfister, and M.D. Taylor. 2012b. Rapid, reliable, and reproducible molecular sub-grouping of clinical medulloblastoma samples. *Acta Neuropathol* 123:615-626.
- Ottaiano, A., M. Capozzi, C. De Divitiis, A. De Stefano, G. Botti, A. Avallone, and S. Tafuto. 2017. Gemcitabine mono-therapy versus gemcitabine plus targeted therapy in advanced pancreatic cancer: a meta-analysis of randomized phase III trials. *Acta Oncol* 56:377-383.
- Ozer, E., F. Sarialioglu, R. Cetingoz, N. Yuceer, H. Cakmakci, S. Ozkal, N. Olgun, K. Uysal, F. Corapcioglu, and S. Canda. 2004. Prognostic significance of anaplasia and angiogenesis in childhood medulloblastoma: a pediatric oncology group study. *Pathology, research and practice* 200:501-509.
- Park, I., H.J. Lee, W.K. Bae, S. Yoon, and J.L. Lee. 2019. A multicenter, prospective phase II trial of gemcitabine plus axitinib in patients with renal cell carcinoma with a predominant sarcomatoid component. *Invest New Drugs* 37:1239-1246.
- Pei, Y., C.E. Moore, J. Wang, A.K. Tewari, A. Eroshkin, Y.J. Cho, H. Witt, A. Korshunov, T.A. Read, J.L. Sun, E.M. Schmitt, C.R. Miller, A.F. Buckley, R.E. McLendon, T.F. Westbrook, P.A. Northcott, M.D. Taylor, S.M. Pfister, P.G. Febbo, and R.J. Wechsler-Reya. 2012. An animal model of MYC-driven medulloblastoma. *Cancer cell* 21:155-167.
- Pfister, S., M. Remke, A. Benner, F. Mendrzyk, G. Toedt, J. Felsberg, A. Wittmann, F. Devens, N.U. Gerber, S. Joos, A. Kulozik, G. Reifenberger, S. Rutkowski, O.D. Wiestler, B. Radlwimmer, W. Scheurlen, P. Lichter, and A. Korshunov. 2009. Outcome prediction in pediatric medulloblastoma based on DNA copy-number aberrations of chromosomes 6q and 17q and the MYC and MYCN loci. *Journal of*

- clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27:1627-1636.
- Pinter, T., Z. Klippel, A. Cesas, A. Croitoru, J. Decaestecker, P. Gibbs, Y. Hotko, J. Jassem, G. Kurteva, J. Novotny, S. O'Reilly, T. Salek, M. Reiner, P.K. Morrow, M.R. Choi, S. Whittaker, and C. Blanke. 2016. A Phase III, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Pegfilgrastim in Patients Receiving First-Line FOLFOX/Bevacizumab or FOLFIRI/Bevacizumab for Locally Advanced or Metastatic Colorectal Cancer: Final Results of the Pegfilgrastim and Anti-VEGF Evaluation Study (PAVES). *Clin Colorectal Cancer*
- Plunkett, W., P. Huang, Y.Z. Xu, V. Heinemann, R. Grunewald, and V. Gandhi. 1995. Gemcitabine: metabolism, mechanisms of action, and self-potentialiation. *Seminars in oncology* 22:3-10.
- Potente, M., H. Gerhardt, and P. Carmeliet. 2011. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* 146:873-887.
- Presta, L.G., H. Chen, S.J. O'Connor, V. Chisholm, Y.G. Meng, L. Krummen, M. Winkler, and N. Ferrara. 1997. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res* 57:4593-4599.
- Rousseau, S., F. Houle, H. Kotanides, L. Witte, J. Waltenberger, J. Landry, and J. Huot. 2000. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-driven actin-based motility is mediated by VEGFR2 and requires concerted activation of stress-activated protein kinase 2 (SAPK2/p38) and geldanamycin-sensitive phosphorylation of focal adhesion kinase. *The Journal of biological chemistry* 275:10661-10672.
- Rutkowski, S., N.U. Gerber, K. von Hoff, A. Gnekow, U. Bode, N. Graf, F. Berthold, G. Henze, J.E. Wolff, M. Warmuth-Metz, N. Soerensen, A. Emser, H. Ottensmeier, F. Deinlein, P.G. Schlegel, R.D. Kortmann, T. Pietsch, J. Kuehl, and G. German Pediatric Brain Tumor Study. 2009. Treatment of early childhood medulloblastoma by postoperative chemotherapy and deferred radiotherapy. *Neuro-oncology* 11:201-210.
- Sandler, A.B., D.H. Johnson, and R.S. Herbst. 2004. Anti-vascular endothelial growth factor monoclonals in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 10:4258s-4262s.
- Senger, D.R., S.J. Galli, A.M. Dvorak, C.A. Perruzzi, V.S. Harvey, and H.F. Dvorak. 1983. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219:983-985.

- Singh, S.K., C. Hawkins, I.D. Clarke, J.A. Squire, J. Bayani, T. Hide, R.M. Henkelman, M.D. Cusimano, and P.B. Dirks. 2004. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432:396-401.
- Slongo, M.L., B. Molena, A.M. Brunati, M. Frasson, M. Gardiman, M. Carli, G. Perilongo, A. Rosolen, and M. Onisto. 2007. Functional VEGF and VEGF receptors are expressed in human medulloblastomas. *Neuro Oncol* 9:384-392.
- Spielmann, M., A. Llombart-Cussac, S. Kalla, M. Espie, M. Namer, J.M. Ferrero, V. Dieras, P. Fumoleau, C. Cuvier, G. Perrocheau, A. Ponzio, L. Kayitalire, and P. Pouillart. 2001. Single-agent gemcitabine is active in previously treated metastatic breast cancer. *Oncology* 60:303-307.
- Taylor, M.D., P.A. Northcott, A. Korshunov, M. Remke, Y.J. Cho, S.C. Clifford, C.G. Eberhart, D.W. Parsons, S. Rutkowski, A. Gajjar, D.W. Ellison, P. Lichter, R.J. Gilbertson, S.L. Pomeroy, M. Kool, and S.M. Pfister. 2012. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol* 123:465-472.
- Vescovi, A.L., R. Galli, and B.A. Reynolds. 2006. Brain tumour stem cells. *Nature reviews. Cancer* 6:425-436.
- Virag, J., I. Kenessey, C. Haberler, V. Piurko, K. Balint, B. Dome, J. Timar, M. Garami, and B. Hegedus. 2014. Angiogenesis and angiogenic tyrosine kinase receptor expression in pediatric brain tumors. *Pathology oncology research : POR* 20:417-426.
- Wilne, S., J. Collier, C. Kennedy, K. Koller, R. Grundy, and D. Walker. 2007. Presentation of childhood CNS tumours: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol* 8:685-695.
- Wilne, S.H., R.C. Ferris, A. Nathwani, and C.R. Kennedy. 2006. The presenting features of brain tumours: a review of 200 cases. *Arch Dis Child* 91:502-506.
- Xu, J., A. Margol, S. Asgharzadeh, and A. Erdreich-Epstein. 2015a. Pediatric brain tumor cell lines. *Journal of cellular biochemistry* 116:218-224.
- Xu, J., A.S. Margol, A. Shukla, X. Ren, J.L. Finlay, M.D. Krieger, F.H. Gilles, F.J. Couch, M. Aziz, E.T. Fung, S. Asgharzadeh, M.T. Barrett, and A. Erdreich-Epstein. 2015b. Disseminated Medulloblastoma in a Child with Germline BRCA2 6174delT Mutation and without Fanconi Anemia. *Front Oncol* 5:191.
- Yu, W., S. Zhao, Y. Zhao, C.N. Fatema, M. Murakami, K.I. Nishijima, Y. Kitagawa, N. Tamaki, and Y. Kuge. 2017. Changes in tumor oxygen state after sorafenib therapy evaluated by <sup>18</sup>F-fluoromisonidazole

hypoxia imaging of renal cell carcinoma xenografts. *Oncology letters* 14:2341-2346.

Zeltzer, P.M., J.M. Boyett, J.L. Finlay, A.L. Albright, L.B. Rorke, J.M. Milstein, J.C. Allen, K.R. Stevens, P. Stanley, H. Li, J.H. Wisoff, J.R. Geyer, P. McGuire-Cullen, J.A. Stehbens, S.B. Shurin, and R.J. Packer. 1999. Metastasis stage, adjuvant treatment, and residual tumor are prognostic factors for medulloblastoma in children: conclusions from the Children's Cancer Group 921 randomized phase III study. *J Clin Oncol* 17:832-845.

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung des klinischen Falles. ....	11
Abbildung 2: Charakterisierung der Tumorzelllinie MB3W1 .....	13
Abbildung 3: Versuchsaufbau für die Tierversuche. ....	32
Abbildung 4: Darstellung des Clearings am Kleinhirn. ....	37
Abbildung 5: Darstellung der Toxizitätsversuche mit den Zytostatika. 1. ....	40
Abbildung 6: Zytotoxische Therapie der subkutanen Tumoren in der Maus. ....	44
Abbildung 7: Beobachtung einer Zonenbildung im subkutanen Tumor. ....	46
Abbildung 8: Immunfluoreszenzfärbungen der verschiedenen Zonen des subkutanen Tumors. ....	47
Abbildung 9: Charakterisierung der VEGF-Sekretion und VEGF-Rezeptor Expression der Tumorzellen. ....	49
Abbildung 10: Toxizitätsversuch der VEGFR-Inhibitoren in Kombination mit Gemcitabin. ....	50
Abbildung 11: Selektive Wirkung von Axitinib auf die VEGF-Rezeptoren. ....	52
Abbildung 12: Gemcitabin/Axitinib Behandlung induzieren eine höhere Apoptoserate. ....	54
Abbildung 14: Zytotoxischer Effekte im subkutanen Tiermodell. ....	59
Abbildung 15: Darstellung der Vaskularisierung des subkutanen Tumors mit Hilfe des LSFM. ....	60
Abbildung 16: Zytotoxischer Effekte im orthotopen Tiermodell. ....	62
Abbildung 17: Darstellung des Stichkanals im Kleinhirn. ....	63
Abbildung 18: Tumorentstehung im Kleinhirn. ....	64
Abbildung 19: Darstellung und Quantifizierung der Angiogenese des orthotopen Tumors nach LSFM-Färbungen. ....	65



# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Charakteristika der Untergruppen des Medulloblastom.....	8
Tabelle 2: Inhibitoren und Zytostatika, die für Toxizitätsversuche und Tierversuche verwendet wurden. ....	23
Tabelle 3: Humane und murine Antikörper, die für FACS und Immunhistochemiefärbungen verwendet wurden.....	25
Tabelle 4: Verschiedene Medulloblastom Tumorzelllinien und deren Eigenschaften. ...	27
Tabelle 5: Behandlungsplan für die Tierexperimente. ....	33
Tabelle 6: Ermittelte EC <sub>50</sub> der verschiedenen Einzelsubstanzen und Kombinationen. .	41

## Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ALDH	Aldehyddehydrogenase
APC	Allophycocyanine
BLI	Biolumineszenz-Imaging
CD	Cluster of differentiation
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
CGH	Comparative genomic hybridization
CMC	Carboxymethylcellulose
CSF-1R	Colony-stimulating factor-1 receptor
CTNNB1	Catenin Beta 1
DAPI	4', 6'-Diamidino-2-phenylindole
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DKK1	Dickkopf-related protein 1
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
EC50	Mittlere effektive Konzentration
ELISA	Enzym-linked Immunsorbent Assay
ERK	Extracellular-signal regulated Kinase
FACS	Fluorescence activated cell sorting

FCS	Fetal calf serum
FDA	Amerikanische Food und Drug Administration
FGFR	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
GARFT	Glycinamide ribonucleotide formyltransferase
GFAP	Saures Gliafaserprotein
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GLI2	GLI family zinc finger 2
GPOH	Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie
Gy	Gray
HRP	Horse Redish Peroxidase
ITCC	European Consortium Innovative Therapies for Children with Cancer
LSFM	Light Sheet Fluorescence Microscopy
MAP	Mitogen-activated protein
MB	Medulloblastom
MBEN	Medulloblastom mit extremer Nodularität
MB3W1	Medulloblastom-Gruppe-3-Wuerzburg-1
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin
NA	Numerische Apertur
NMP	N-Methyl-2-pyrrolidon
Olig2	Oligodendrocyte transcription factor 2
OTX-1	Orthodenticle Homeobox 1

PBS	Phosphat-buffered Saline
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PTCH1	Protein patched homolog 1
PPTP	Pediatric Preclinical Testing Program
PIGF	Placenta growth factor
Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma
SAPK2	Serin/Threonin protein kinase 2
Shh	Sonic Hedgehog
Smo	Smoothened
Sufu	Suppressor of fused homolog
TdT	Terminale Desoxynukleotidyltransferase
Tle	Transducin-like enhancer protein
TS	Thymidylat-Synthase
TSH	Thyreoidea stimulierendes Hormon
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
WHO	World Health Organisation
WNT	Wingless
YAP-1	Yes-associated protein 1

# Danksagung

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person, deshalb ist es jetzt an der Zeit, mich bei allen Menschen zu bedanken, die mir die Erstellung meiner Dissertation ermöglicht haben.

Zuallererst gilt mein besonderer Dank meinen beiden Betreuern Prof. Dr. Matthias Wöfl aus der Universitätskinderklinik Würzburg und Prof. Dr. Dr. Andreas Beilhack aus der Medizinischen Klinik II der Universitätsklinik Würzburg, die mir die Möglichkeit gaben unter deren Betreuung meine Dissertation zu realisieren.

Prof. Dr. Matthias Wöfl danke ich besonders für die Überlassung des interessanten Projektes aus der Kinderonkologie. Prof. Dr. Dr. Andreas Beilhack möchte ich besonders danken, dass ich all die Jahre ein Mitglied in seiner Arbeitsgruppe sein durfte. Ohne deren wissenschaftliche Unterstützung und deren kompetenter Rat, zahlreiche anregende Diskussionen und deren Hilfestellung durch konstruktive Kritik hätte ich die vorliegende Arbeit in dieser Weise nicht fertig stellen können. Besonders bedanken will ich mich auch für die Freiheit, die mir während des gesamten Forschungsprojektes gewährt wurde.

Ein herzliches Dankeschön geht an alle Mitglieder der Arbeitsgruppe Beilhack für die harmonische Arbeitsatmosphäre, für deren Hilfe bei Experimenten und konstruktiven Diskussionen und Anregungen während des Laboralltags. Mein besonderer Dank gilt Sina Thusek, die mich bei den Tierversuchen und LSM- Analysen tatkräftig unterstützt hat – Vielen Dank!

Der Manfred-Lautenschläger-Stiftung und der Graduiertenschule der Lebenswissenschaften in Würzburg danke ich besonders für die Verleihung der Stipendien und die damit verbundene finanzielle Unterstützung, welche mir ermöglichte die zeitintensive Dissertation durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich auf meinem langen Weg begleitet hat und mich immer bestärkt hat Medizin zu studieren. Danke, dass Ihr immer an mich geglaubt habt und mir zu jeder Zeit zur Seite standet.

# Curriculum vitae

## **Eidesstattliche Erklärung (Affidavit)**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Neue Behandlungsmöglichkeiten des Gruppe 3 Medulloblastoms im orthotopen Xenograftmodell“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

I hereby confirm that my thesis entitled “New therapeutic options for Group 3 Medulloblastoma in an Orthotopic Mouse Model” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Ort, Datum

Unterschrift