

**Aus der Klinik für Neurochirurgie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. V. Tronnier**

**Untersuchung der Auswirkungen des Chinolin-Derivates
Chloroquin auf das Wachstum und die Überlebensfähigkeit
humaner Glioblastomzellen**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Robin Wüstenberg
aus Talcahuano/ Chile

Lübeck 2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Lübeck

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Alf Giese
2. Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. med. Ingeborg Bos
- Tag der mündlichen Prüfung: 27.08.2010

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 27.08.2010

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
Herstellerverzeichnis.....	IX
1 Einleitung und Fragestellung.....	1
1.1 Einteilung und Inzidenz von Hirntumoren.....	1
1.2 Das Glioblastoma multiforme.....	1
1.2.1 Manifestation von Glioblastomen.....	2
1.2.2 Makroskopische und mikroskopische Merkmale der Glioblastome.....	2
1.2.3 Histologische Subtypen.....	3
1.2.4 Molekulargenetische Merkmale.....	4
1.3 Therapie des Glioblastoms.....	4
1.3.1 Chirurgische Therapie.....	4
1.3.2 Strahlentherapie.....	5
1.3.3 Chemotherapie.....	6
1.4 Neue experimentelle Therapieansätze des Glioblastoms.....	8
1.4.1 Angiogenesehemmer.....	8
1.4.2 Lokale Immuntherapie.....	9
1.4.3 Genterapie.....	9
1.4.3.1 Tumorzell-selektive Suizidvektoren.....	9
1.4.3.2 Das Tumorsuppressorgen TP53 als molekulare Zielstruktur experimenteller Therapiestrategien für das Glioblastoma multiforme.....	10
1.4.4 Nicht-konventionelle Chemotherapeutika.....	12
1.4.4.1 Chloroquin: Ein kleines Molekül mit großem Wirkungsspektrum.....	12
1.4.4.2 Grundlagen, Pharmakokinetik und Nebenwirkungen.....	12
1.4.4.3 Neue Anwendungsmöglichkeiten und Wirkprinzipien: Antineoplastische Mechanismen.....	13
1.5 Experimentelle Grundlagen der Glioblastom-Therapie.....	15
1.5.1 In vitro-Zellkultursysteme.....	15
1.5.2 In vivo-Modelle.....	15
1.5.2.1 Chorion-Allantois-Membran des Hühnerembryonen.....	15
1.5.2.2 Experimentelle Gliome im subkutanen Mausmodell.....	15
1.5.2.3 Experimentelle Gliome im orthotopen Mausmodell.....	16
1.6 Ziel des Versuches und Motivation.....	16

2 Material und Methoden.....	18
2.1 In vitro-Versuche.....	18
2.1.1 Zellen und Antikörper.....	18
2.1.2 Bestimmung von Zellwachstum und Zelltod.....	18
2.2 Orthotopes Mausmodell des malignen Glioms.....	19
2.2.1 Anordnung der Versuche.....	20
2.2.1.1 Mechanische Belastung.....	20
2.2.1.2 Toxizitätstestung.....	21
2.2.1.3 Therapieversuch.....	21
2.2.2 U87MG-Zelllinie und Aufbereitung zur Implantation.....	21
2.2.3 Bereitstellung von Chloroquin und Phosphat-Pufferlösung (PBS).....	22
2.2.4 Hohlschraubensystem.....	23
2.3 Eingriffe an den Versuchstieren.....	23
2.3.1 Betäubung.....	23
2.3.2 Operation.....	23
2.3.3 Behandlung.....	25
2.3.4 Reinigung und Sterilisierung der Instrumente.....	26
2.3.5 Tötung der Versuchstiere und Entnahme des Gehirns.....	26
2.3.6 Histologie und immunhistochemische Auswertung.....	26
2.4 Statistische Auswertung.....	27
3 Vorarbeiten: Effekte des Chloroquin auf Gliomzellen in der Zellkultur.....	28
3.1 Chloroquin hemmt das Zellwachstum von Glioblastomzellen in vitro.....	28
3.2 Die Apoptose trägt zum Chloroquin-induzierten Zelltod der Glioblastomzellen bei.....	28
3.3 Die Induktion der Apoptose durch Chloroquin ist von p53 abhängig.....	29
4 Ergebnisse: Effekte des Chloroquin auf maligne Gliome im orthotopen Mausmodell....	29
4.1 Toxizitätsversuch.....	29
4.2 Therapieversuch.....	30
5 Diskussion.....	35
5.1 p53-abhängige Chloroquinwirkung.....	35
5.2 p53-unabhängige Chloroquinwirkung.....	36
5.3 Neue Einblicke in die Wirkungsweise von Chloroquin am orthotopen Tiermodell....	37
6 Zusammenfassung.....	39
7 Quellenverzeichnis.....	40
8 Anhänge.....	51
9 Danksagungen.....	61
10 Lebenslauf.....	62
11 Publikationen.....	63

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Malignitätsgrade der astrozytären Tumoren nach WHO-Klassifikation.....	2
Tabelle 2: Karnofsky-Index.....	7
Tabelle 3: Gegenüberstellung der Tumorflächen von Kontroll- und Therapiegruppe.....	31
Tabelle 4: Auswertung der Tumorflächen von Kontrollgruppe und Therapiegruppe.....	31
Tabelle 5: t-Test der Tumorflächen der Kontrollgruppe gegenüber der Therapiegruppe...	32
Tabelle 6: Einfaktorielle Varianzanalyse der Tumorflächen.....	32
Tabelle 7: Vergleich der Mitose-Indices bzw. der Apoptose-Indices.....	33
Tabelle 8: Auswertung der Mitose-Indices bzw. Apoptose-Indices.....	33
Tabelle 9: t-Test der Mitose-Indices bzw. Apoptose-Indices.....	34

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Im stereotaktischen Rahmen fixierte Maus präoperativ.....	24
Abbildung 2: Intraoperative Darstellung der Schädelnähte.....	25
Abbildung 3a: Effekt von Chloroquin anhand von Wachstumsraten von Gliomzelllinien mit bekanntem p53-Status.....	52
Abbildung 3b: Effekt von Chloroquin anhand der Zellvitalität von Gliomzelllinien mit wt-p53, mutiertem bzw. ohne p53.....	52
Abbildung 4a: Chloroquin induziert eine zeitabhängige Caspase-3-Aktivierung in U87MG-Zellen mit Expression von wt-p53.....	53
Abbildung 4b: Chloroquin induziert eine zeitabhängige Caspase-3-Aktivierung in U87MG-Zellen mit Expression von wt-p53.....	54
Abbildung 4c: Zusammenfassung der Caspase-3-Aktivierung von Gliomzellen mit unterschiedlichem p53-Status.....	55
Abbildung 4d: Apoptose in U87MG-Zellen in der TUNEL-Färbung und Gegenfärbung mit Propidiumiodid.....	56
Abbildung 5a: Hemmung von endogenem p53 nach Transfektion mit unspezifischer scr-siRNA bzw. p53-siRNA.....	57
Abbildung 5b: Hemmung von p53 durch p53-siRNA vermindert die Caspase-3- Aktivierung in Gliomzellen mit wt-p53, aber nicht in Zellen mit mutiertem p53.....	58
Abbildung 6: Tumorgroße, Mitoseindex sowie Apoptoseindex von U87MG-Tumoren nach Behandlung mit Chloroquin am Mausmodell.....	58
Abbildung 7: HE-Färbung repräsentativer Areale von U87MG-Tumoren.....	59
Abbildung 8: TUNEL-Färbung repräsentativer Areale von U87MG-Tumoren.....	60

Abkürzungsverzeichnis

ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
BCNU	Bis-Chlorethyl-Nitroso-Harnstoff, Carmustin
CIQ	Chloroquin
CYP3A	Cytochrom 450, Familie 3, Subfamilie A
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
de novo	latein., sinngemäß: neu entstehend
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure bzw. Ethylendiamintetraacetat
EGF-R	Epidermal Growth Factor-Rezeptor
et al.	latein., sinngemäß: und andere
FCS	Fetales Kälberserum, Fetal bovine serum
GFAP	astrozytäres saures Gliafaser-Protein
GBM	Glioblastoma multiforme
HE	Hämatoxylin-Eosin
HSV-tk	Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase
IGF-IR	Insulin-like Growth Factor-Rezeptor Typ I
i.p.	Intraperitoneal
<i>in vitro</i>	latein., sinngemäß: im Glas, also im Labor
<i>in vivo</i>	latein., sinngemäß: am lebenden Objekt
MEM	Minimal Essential Medium
MIB	made in Borstel (Ki-67)
MMP	Matrix Metalloproteinase
MRP	Multidrug resistance-associated protein
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NMRI	Naval Medical Research Institute
NSCLC	non-small-cell lung cancer
Nu/Nu	nude/nude, entspricht Homozygotizität für nude-Merkmal
p53-SSDB	sequence-specific DNA-binding
PBS	Phosphatpuffer-Lösung, Phosphate buffer solution

PCV	Chemotherapieschema mit Procarbazin, Lomustin und Vincristin
PDGF	Platelet derived growth factor
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
RNS	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumlaurylsulfat, Sodium Dodecyl Sulfate
siRNA	small interfering ribonucleic acid
scr-siRNA	scrambled-siRNA
TMZ	Temozolomid
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organisation
wt-p53	Wildtyp-p53
ZNS	Zentrales Nervensystem

Herstellerverzeichnis

Aesculap-Werke AG & Co. KG, Tuttlingen, D

ATCC, LGC, Promochem GmbH, Wesel, D

Bayer AG Health Care, Leverkusen, D

Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D

Biochrom AG, Berlin, D

Bode Chemie GmbH Co. KG, Hamburg, D

Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, D

Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA

Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA

Codman & Shurtleff, Inc., Raynham, MA, USA

GMB Glasmechanik AG, Reinach, CH

Graph Pad Software, Inc., La Jolla, CA, USA

Hamilton Company Europe, Bonaduz, CH

Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, D

Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, D

Pharmacia LKB, Freiburg, D

Ratiopharm GmbH, Ulm, D

Taconic, Lille Skensved, Dänemark

Microtron 60

U87MG-Zelllinie

Bepanthen

Falcon Tube

Minimal Essential Medium

Sterilium

Operationsmikroskop S3B

Antikörper gegen gespaltene
Caspase-3

ApoAlert™, DNA Fragmentation
Assay Kit

Greenberg-Retractor

Vortex-Mixer

GraphPad Prism 5

Hamilton-Spritze

CellA

B 40 Mikroskop

Ultrospec II

Novaminsulfon

athymische Nacktmäuse (Nu/Nu,
NMRI)

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Einteilung und Inzidenz von Hirntumoren

Tumoren des Hirns gliedern sich in Metastasen extrazerebraler Tumoren und hirneigene Tumoren (primäre Hirntumoren). Diese umfassen Entartungen, die aus Glia, Meningen, Hirngefäßen und Plexus chorioideus entspringen sowie im Zentralen Nervensystem (ZNS) entstehende Lymphome und Hypophysentumoren. Primäre Hirntumoren können als intrakranielle Raumforderung zu kritischer Hirndrucksteigerung führen, bilden selten eine Tumorkapsel, neigen zu infiltrativem Wachstum und fortschreitender Malignisierung. Insbesondere die Lokalisation des Tumors in funktionell kritischen Hirnbereichen ist für das klinische Bild der Erkrankung entscheidend. Nach hochgerechneten Daten v.a. aus Skandinavien und den USA sind unter den primären Hirntumoren die Gliome, Meningeome und Schwannome die häufigsten mit einer Inzidenz von 9,2 / 100.000 männlicher Einwohner und 8,1 / 100.000 weiblicher Einwohner aller Altersklassen in den USA und skandinavischen Ländern (Schlegel und Westphal, 1998).

In Schleswig-Holstein wurden im Jahr 2006 für die Gesamtheit aller Neoplasien von ZNS und Gehirn eine Inzidenz von 8,5 / 100.000 bei Männern bzw. 8,8 / 100.000 bei Frauen und eine Mortalität von 6,8 / 100.000 bzw. 9,1 / 100.000 dokumentiert. In 96% der Fälle bei Männern und in 96,8% der Fälle bei Frauen handelte es sich dabei um Gliome. Im Vergleich dazu liegt der Weltstandard der Inzidenz für Hirn- und ZNS-Tumoren bei 5,0 / 100.000 bzw. 5,3 / 100.000 für Männer bzw. Frauen (Pritzkeleit *et al.*, 2009). Gesamtdeutschen Schätzzahlen wurden bisher nicht veröffentlicht.

1.2 Das Glioblastoma multiforme

Das Glioblastoma multiforme (GBM) hat die höchste Inzidenz hirneigener Tumoren mit 69% aller astrozytären und oligodendroglialen Tumoren bei jährlich 2-3 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohnern in Europa sowie Nordamerika (Kleihues *et al.*, 2000). Außerdem steht das GBM für 15-20% aller intrakraniellen Tumoren und tritt gehäuft jenseits des sechzigsten Lebensjahres auf (Schlegel und Westphal, 1998, Ohgaki und Kleihues, 2007). Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt unter 3%, wobei ein fortgeschrittenes Lebensalter der bedeutsamste prognostische Faktor für eine niedrige Überlebenszeit ist (Ohgaki *et al.*, 2001; Ohgaki *et al.*, 2004, Ohgaki und Kleihues, 2007). Unter Nachweis des astrozytären

ren sauren Gliafaser-Proteins (GFAP) konnte eine Zugehörigkeit zu den astrozytären Malignomen gezeigt werden. Entsprechend der Klassifikation der World Health Organisation der Vereinten Nationen (Louis *et al.*, 2007) erhält das GBM den hochmalignen WHO-Grad IV.

Astrozytäre Tumoren	WHO-Grad	Mediane Überlebenszeit
Pilozytisches Astrozytom	I	(96% in 10 Jahren)
Diffuses Astrozytom	II	5,6 Jahre
Anaplastisches Astrozytom	III	1,6 Jahre
Glioblastoma multiforme	IV	0,4 Jahre

Tabelle 1: Malignitätsgrade der astrozytären Tumoren nach WHO-Klassifikation (Kleihues *et al.*, 2002; Louis *et al.*, 2007)

1.2.1 Manifestation von Glioblastomen

Die Erstmanifestation eines Glioblastoma multiforme äußert sich häufig mit Zeichen der intrakraniellen Drucksteigerung wie Kopfschmerzen, kognitiven Veränderungen, Gedächtnisverlust und/oder epileptischen Anfällen (Chang *et al.*, 2005). Meistens geht der Diagnose des malignen Geschehens eine kurze Anamnese voraus, bei primären Glioblastomen durchschnittlich 6,3 Monate bis zur histologischen Diagnose. In annähernd 70% der Fälle ist die Anamnese jedoch kürzer als drei Monate (Ohgaki und Kleihues, 2007). Zusätzlich kann es zu Wesensveränderungen im Sinne eines Psychosyndroms und neurologischen Defiziten kommen.

1.2.2 Makroskopische und mikroskopische Merkmale der Glioblastome

Die bevorzugten Lokalisationen des Glioblastoms betreffen die Großhirnhemisphären und die temporalen Partien sowie in geringerem Ausmaß Stammganglien, Vierhügelplatte, Thalamus und Pons. Ein beidseitiger Befall der Balkenformation wird als „Schmetterlings-Glioblastom“ bezeichnet. Die Bezeichnung Glioblastoma multiforme leitet sich von der makroskopisch vielgestaltig erscheinenden Schnittfläche des Präparates ab. Dieser Eindruck entsteht durch das Nebeneinander von vitalem Tumorgewebe, nekrotischen Arealen, Einblutungen, glialer Narbenbildung und evtl. zystischen Anteilen. Das Kleinhirn ist nur in Ausnahmefällen betroffen.

Mikroskopisch fallen eine hohe Zelldichte, markante zelluläre und nukleäre Polymorphismen, eine hohe mitotische und proliferative Aktivität, glomeruloide Endothelproliferationen und Nekrosen auf. Die Tumorgefäße haben eine erhöhte Thrombosierungsneigung. Anteilig können bei Glioblastomen, die progredient aus niedriger malignen astrozytären Tumoren entstanden sind, auch Zellhaufen mit Charakteristika des ursprünglichen Tumors vorhanden sein. Solche aus Vorstufen entstandene Malignome werden auch als sekundäre Glioblastome bezeichnet. Das Glioblastoma multiforme wächst invasiv und infiltrativ entlang myelinisierter Fasern und der Basalmembran von Blutgefäßen, so dass bei Erstdiagnose des Tumors die Zellausbreitung den makroskopisch sichtbaren Anteil bereits überschreitet (Giese *et al.*, 1998; Giese, 2003; Giese *et al.*, 2003).

Immunhistochemisch lassen sich mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers Ki-67 (MIB-1) Proliferationsindizes von mehr als 10% nachweisen.

1.2.3 Histologische Subtypen

Von Bedeutung sind hier insbesondere das Gliosarkom mit mesenchymalen Anteilen und das sog. Riesenzell-Glioblastom. Das Gliosarkom hat einen Anteil von 5-10% an allen Glioblastomen und zeigt prognostisch keine signifikanten Unterschiede auf. Das Riesenzellglioblastom entspricht molekulargenetisch dem sekundären Glioblastom und hat tendenziell eine günstigere Prognose. Außerdem enthält ein geringer Prozentsatz der Glioblastome oligodendrogiale Bestandteile. Unklar ist bislang, ob diese Entität einer Progression aus einem Oligodendrogliom oder einer oligodendrogialen Differenzierung des Glioblastoms entspricht. Die Bedeutung dieses Subtyps liegt in dem besseren Ansprechen auf medikamentöse Therapieansätze. Dementsprechend ist die ausgeprägte molekulargenetische Heterogenität von Glioblastomen für die Entwicklung unterschiedlicher Therapiekonzepte möglicherweise von großer Bedeutung (Schlegel und Westphal, 1998).

In Studien zu chemotherapeutischen Ansprechraten maligner Gliome schließt diese Nomenklatur das anaplastische Astrozytom und Oligodendrogliome mit ein, so dass sich die beschriebenen Ergebnisse nicht ohne Weiteres auf das Glioblastom WHO Grad IV übertragen lassen.

1.2.4 Molekulargenetische Merkmale

Maligne Gliome des WHO-Grad IV zeichnen sich durch eine hohe genetische Instabilität aus. Fast alle chromosomalen Abschnitte können bei bis zu jeweils 20% aller untersuchten Glioblastome durch Deletionen betroffen sein. Es gibt dennoch einige als charakteristisch geltende Mutationen, die in ihrer Summe eine molekulargenetische Unterscheidung in zwei Typen des Glioblastoms erlauben:

Bei primären Glioblastomen tritt insbesondere eine Amplifikation des EGF-R-Gens (36% der Fälle) bzw. eine Überexpression von EGF-R (> 60 % der Fälle) auf. Eine Mutation des Tumorsuppressorgens-TP53 kommt dagegen nur in ca. 28% vor. Außerdem sind Phosphatase and Tensin homolog (PTEN)-Mutationen kennzeichnend (25% der Fälle). Weitere Mutationen schließen u.a. die Deletion von p16^{INK4a} ein. Primäre Glioblastome entstehen *de novo* und sind mit einer geringeren medianen Überlebenszeit von 4,7 Monaten assoziiert (Schlegel und Westphal, 1998, Ohgaki und Kleihues, 2007).

Sekundäre Glioblastome entstehen vermutlich progredient aus niedriggradigen Astrozytomen der WHO-Grade II und III. In 65% der Fälle weisen sie einen Allelverlust des TP53 Gens auf Chromosom 17 als charakteristische Läsion auf, jedoch selten mit begleitender Amplifikation des EGF-R-Gens (8% der Fälle). Immerhin kommt es wie auch bei primären Glioblastomen in ca. 60% zu einer Loss of heterozygosity 10q. Außerdem ist das Durchschnittsalter der Patienten mit sekundären Glioblastomen etwa 15 Jahre jünger (mittleres Alter bei Manifestation 45 gegenüber 62 Jahren). Dies gilt als wesentlicher Grund für die längere mediane Überlebenszeit von 7,8 Monaten gegenüber den Patienten mit primären Glioblastomen (Ohgaki und Kleihues, 2007).

Mehr als 90% aller Glioblastome entsprechen dem primären Typ, für sekundäre Glioblastome liegen die Angaben bei 5%.

1.3 Therapie des Glioblastoms

1.3.1 Chirurgische Therapie

Die chirurgische Therapie wird in die makroskopische Teil- und die Komplettresektion (> 98%) des Tumors unterteilt. Obwohl einige Studien einen Überlebensvorteil nach Komplettresektion postulieren (Lacroix *et al.*, 2001), fehlen zum jetzigen Zeitpunkt randomisierte Untersuchungen zu diesem Thema. Insgesamt wird jedoch eine radikale Resektions-

chirurgie befürwortet, da zum einen im Vergleich zur reinen Biopsie oder partiellen Resektion eine repräsentativere histologische Probe gewonnen werden kann und zum anderen bei vergleichbarem operativem Risiko die Patienten im klinischen Verlauf weniger neurologische Komplikation erleiden (Fadul *et al.*, 1988).

Trotz in der bildgebenden Diagnostik untermauerter Komplettresektion finden sich Rezidive in mehr als 95% der Fälle innerhalb von zwei bis drei Zentimetern vom Absetzungsrand der Resektionshöhle entfernt (Burger *et al.*, 1983; Gaspar *et al.*, 1992). Multifokale Läsionen treten in etwa 1-10% der Fälle und vorzugsweise in späteren Stadien der Erkrankung auf (Barnard und Geddes, 1987; Silbergeld *et al.*, 1991). Als Therapiestandard gilt die chirurgische Resektion in Kombination mit adjuvanter Strahlen- und evtl. Chemotherapie.

1.3.2 Strahlentherapie

Die adjuvante Strahlentherapie verlängert die mittlere postoperative Überlebenszeit von 17,5 auf 37,5 Wochen (Schlegel und Westphal, 1998). Unabhängig vom Ausmaß einer chirurgischen Resektion, konnte für postoperativ applizierte Strahlungsdosen von 50-60 Gy gegenüber niedrigeren Dosen bei Patienten mit einem Glioblastoma multiforme eine verlängerte mediane Überlebenszeit von 19 Wochen gegenüber 11 Wochen dokumentiert werden (Batchelor *et al.*, 2007a; UpToDate, 2008). Eine Dosisescalation wiederum konnte keinen weiteren Überlebensvorteil zeigen (Chang *et al.*, 1983; Nelson *et al.*, 1988). Die häufigsten Komplikationen nach Bestrahlung sind die Strahlennekrose mit Gefäßverschlüssen und Demyelinisierung der Nervenfasern sowie sekundäre Neoplasien (Shapiro, 1986; Valk und Dillon, 1991). Da die Zahl der multifokalen Tumoren unter 10% liegt, ist man von der externen Bestrahlung des gesamten Gehirns zur Verabreichung der Strahlendosis auf den Tumor selbst und einem bis zu drei Zentimeter großen Saum übergegangen. Weitere Modalitäten der Strahlenapplikation wurden mit dem Ziel entwickelt, für die makroskopisch nicht befallenen Hirnareale die Therapienebenwirkungen zu minimieren. Hierzu zählen verschiedene dreidimensionale Bestrahlungsmodelle, interstitielle Brachytherapie, stereotaktische Radiochirurgie, die Anwendung von Teilchenbeschleunigern mit z.B. Helium- und Neon-Ionen sowie Strahlensensitizer. Es konnte bislang für keine der Methoden ein klarer Überlebensvorteil gezeigt werden.

Das Auftreten von Strahlennekrosen ist in der bildgebenden Diagnostik nicht sicher von einem Tumorrezidiv zu trennen, so dass letztendlich nur der weitere klinische und bildge-

bende Verlauf oder eine Re-Operation mit Histologiegewinnung eine bessere differential-diagnostische Unterscheidung ermöglichen.

1.3.3 Chemotherapie

Chemotherapeutika müssen sich in den unregelmäßig perfundierten Tumoren gleichmäßig anreichern und bei systemischer Anwendung durch die Blut-Hirn-Schranke gelangen können. Mit Nitrosoharnstoffen konnten die ersten chemotherapeutischen Erfolge verzeichnet werden. Das PCV-Schema (Procarbazin, Lomustin und Vincristin) ist ein repräsentatives Beispiel für eine solche Therapieform. Aktuell ist das bevorzugte Chemotherapeutikum die alkylisierende Substanz Temozolomid (TMZ). Ein Benefit in der adjuvanten Therapie konnte beim Glioblastoma multiforme mit verlängerter absoluter Überlebenszeit, Zwei-Jahres-Überlebenszeit und progressionsfreiem Überleben ohne Einschränkung der Lebensqualität gezeigt werden (Stupp *et al.*, 2005; Taphoorn *et al.*, 2005). Als wesentlicher Funktionsmechanismus wird die Unterstützung pro-apoptotischer Prozesse insbesondere bei migrierenden Glioblastomzellen angenommen (Lefranc und Kiss, 2006).

Bei konventioneller Behandlung mit chirurgischer Resektion sowie adjuvanter Radio- und Chemotherapie haben Glioblastompatienten aktuell eine mittlere Überlebenszeit von etwa 14 Monaten nach Erstdiagnose (Stupp *et al.*, 2005) und eine Fünf-Jahres-Überlebensrate von weniger als 3% (Ohgaki und Kleihues, 2005). Als wichtigste prognostische Faktoren für ein Ansprechen der Therapie stellten sich Lebensalter, Karnofsky-Index, Tumorlokalisation und das Ausmaß der chirurgischen Resektion des Tumors heraus (Lamborn *et al.*, 2004).

Karnofsky-Index	Symptome und Aktivität
100%	Keine Beschwerden, keine Zeichen der Krankheit
90%	Fähig zu normaler Aktivität, kaum oder geringe Symptome
80%	Normale Aktivität mit Anstrengung möglich. Deutliche Symptome
70%	Selbstversorgung. Normale Aktivität oder Arbeit nicht möglich
60%	Einige Hilfestellung nötig, selbständig in den meisten Bereichen
50%	Hilfe und medizinische Versorgung wird oft in Anspruch genommen
40%	Behindert. Qualifizierte Hilfe benötigt
30%	Schwerbehindert. Hospitalisation erforderlich
20%	Schwerkrank. Intensive medizinische Maßnahmen erforderlich
10%	Moribund. Unaufhaltsamer körperlicher Verfall
0%	Tod

Tabelle 2: Karnofsky-Index (<http://de.wikipedia.org> nach Karnofsky und Burchenal, 1949)

Die genetische Heterogenität der Glioblastome stellt ein enormes therapeutisches Problem dar. Die Inhibierung einzelner Zielstrukturen auf molekularer Ebene erscheint vor diesem Hintergrund bislang wenig Erfolg versprechend. Weitere erschwerende Faktoren beinhalten Interaktionen der Chemotherapeutika mit möglicherweise notwendigen CYP3A-induzierenden Antiepileptika sowie eine unzureichende intratumorale Anreicherung des entsprechenden Wirkstoffs (Reardon *et al.*, 2006). Die Fähigkeit zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke und die systemische Toxizität sind dabei limitierende Faktoren.

Durch orthotope Therapiemodelle sollen therapeutisch wirksame intratumorale Konzentrationen erreicht werden: Die intra-arterielle Applikation von Chemotherapeutika konnte bisher in keiner Studie einen Überlebensvorteil zeigen, sondern war vielmehr mit einer erhöhten Komplikationsrate im Vergleich zur konventionellen systemischen Therapie assoziiert (Shapiro *et al.*, 1992). Zu den intrakavitären Modellen zählen Biopolymerscheiben aus denen sich retardiert das Chemotherapeutikum freisetzt. Im klinischen Gebrauch befinden sich bereits Carmustin-Polymerscheiben, deren Nutzen in der Therapie des Glioblastoma multiforme statistisch nicht signifikant war (Westphal *et al.*, 2003). Bei der Convection enhanced delivery wird über einen stereotaktisch platzierten Katheter mit leichtem Überdruck das Chemotherapeutikum lokal intratumoral appliziert und breitet sich in die ödematöse Peripherie des Tumors aus. Nach chirurgischer Resektion kommt es jedoch zu einem Umkehrfluss der Infusion in die Operationshöhle mit entsprechendem Effektivitätsverlust der Therapie. In einer klinischen Studie mit Paclitaxel mit 15 Patienten zeigten

sich Komplikationen in Form von Meningitiden, Infektionen und neurologischen Symptomen bei teilweisem therapeutischem Ansprechen (Lidar et al., 2004). In die Kalotte platzierte Portschrauben zur stereotaktisch geführten lokalen Applikation von Chemotherapeutika bilden einen weiteren, bis jetzt rein experimentellen, Ansatz (Lal et al., 2000; Brockmann et al., 2003).

1.4 Neue experimentelle Therapieansätze des Glioblastoms

1.4.1 Angiogenesehemmer

Lokale Angiogenesehemmer haben zum Ziel, die überschießende Gefäßneubildung im Rahmen des Tumorwachstums zu reduzieren. Damit soll sowohl der Entstehung eines perifokalen Ödems entgegengewirkt, als auch eine homogenere Anreicherung von Chemotherapeutika im Tumor und somit ein synergistischer Effekt erreicht werden (Batchelor und Supko, 2007; UpToDate, 2008). Verschiedene Stoffe zur Behandlung extrakranieller Tumoren sind in klinischer Erprobung. Als Beispiele wären zu nennen:

Bevacizumab, ein monoklonaler Antikörper, der durch Bindung an VEGF eine Interaktion mit VEGF-Rezeptoren verhindert (Pope et al., 2006; Vredenburgh et al., 2007).

Cediranib ist ein Tyrosinkinase-Inhibitor sowohl der VEGF-Rezeptoren, als auch der PDGF-Rezeptoren (Batchelor et al., 2007b).

Enzastaurin ist ein selektiver Inhibitor der Protein Kinase C Beta, einem wichtigen Bestandteil der VEGF-Signalkaskade (Fine et al. 2005).

Erlotinib und Gefinitib sind Inhibitoren des EGF-Rezeptors (Haas-Kogan et al., 2005; Melinghoff et al., 2005).

Imatinib ist ein Tyrosinkinase-Inhibitor und greift u.a. in die Aktivität von PDGF-R ein (Reardon et al., 2005).

Insulin-like Growth Factor-Rezeptor Typ I (IGF-IR), ebenfalls ein Inhibitor der Tyrosinkinase-Aktivität, ist eine weitere getestete Substanz (Andrews et al., 2001).

Farnesyl-Transferase-Inhibitoren hemmen das Onkoprotein Ras, das in bis zu 70% maligner Gliome überexprimiert wird (Boral et al., 1998; Bredel und Pollack, 1999).

Marimastat soll als Inhibitor der Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP-9) die zelluläre Invasivität der Tumoren senken (Levin et al., 2006).

Thalidomid entwickelt durch die verminderte Expression von Leukozyten Beta Integrin-Untereinheiten eine antiangiogene Aktivität (McCarty, 1997).

1.4.2 Lokale Immuntherapie

Die lokale Immuntherapie soll die körpereigene Immunreaktion auf die Tumorzellen im Sinne einer verstärkten Antwort modulieren. Der Einsatz von Interferonen zeigte bislang keine eindeutigen klinischen Erfolge (Buckner *et al.*, 2001). In der experimentellen Phase befindet sich auch die Gabe von Interleukin-2 zur Aktivierung von Lymphokin-aktivierten Killerzellen (Plautz *et al.*, 2000). Außerdem gibt es Ansätze zur Vakzinierung mit Tumorzell-Lysaten.

1.4.3 Gentherapie

Die Gentherapie versucht durch Einbringen von Vektoren u.a. verloren gegangene Gene zu ersetzen, deren Funktion essentiell für die Unterdrückung von Tumorzellwachstum und -entwicklungsfähigkeit ist. Abhängig von der Funktion des wiederherzustellenden bzw. zu supprimierenden Gens, zielen gentherapeutische Strategien auf die Sensibilisierung der Tumorzellen auf zytotoxische Behandlungen, die Induktion einer lokalen Immunantwort oder die Aktivierung zelleigener suizidaler Signalkaskaden ab. Einige Konzepte werden bereits unter klinischen Bedingungen getestet.

1.4.3.1 Tumorzell-selektive Suizidvektoren

Als vielversprechende Möglichkeit erscheint es, ein Herpes simplex Virus-Thymidin Kinase-Gen in die Tumorzelle einzuschleusen (Aghi und Chiocca, 2003). Anschließend könnte mittels eines Virostatikums ein toxischer Effekt vermittelt werden (Ram *et al.*, 1993). Einschränkungen der klinischen Anwendbarkeit ergeben sich u.a. durch die mangelnde Transduktion der Tumorzellen (Chiocca *et al.*, 2003).

1.4.3.2 Das Tumorsuppressorgen TP53 als molekulare Zielstruktur experimenteller Therapiestrategien für das Glioblastoma multiforme

Auch der Tumorsuppressor p53 zählt zu den Proteinen, die im Fokus des Interesses stehen.

In primären Glioblastomen finden sich in weniger als 30% der Fälle Mutationen des TP53 Gens, während sie im Gegensatz dazu mehr als 90% aller Glioblastome stellen (Ohgaki und Kleihues, 2007). Die Unversehrtheit der p53-Funktionalität in der deutlichen Mehrzahl dieser Neoplasien unterstreicht daher die Bedeutung der p53-basierten Therapieansätze und Forschungsbemühungen (Ohgaki *et al.*, 2004). Das humane Tumorsuppressorgen TP53, welches das Protein p53 verschlüsselt, wurde 1979 von den beiden voneinander unabhängigen Forschergruppen Lane und Crawford sowie Linzer und Levine erstmalig beschrieben. Wegen seiner enormen Bedeutung für die Integrität des menschlichen Erbguts wurde es zum Molekül des Jahres 1993 gewählt (Koshland, 1993) und u.a. als „Wächter des Genoms“ (Lane, 1992) bezeichnet. Im Jahr 1989 wurden zum ersten Mal Veränderungen des p53-Gens mit humanen Krebslinien in Verbindung gebracht. P53 enthält lediglich eine Promotorregion, die ein Protein mit 393 Aminosäuren verschlüsselt (Moll und Zaika, 2001). Eine Tumorsuppressorfunktion des p53 wird eher im Zusammenhang mit der Apoptose-Funktion, als mit dem Zellzyklusarrest gesehen. Zusätzlich zeigte sich, dass p53-Proteine, deren Apoptose-Funktion selektiv ausgeschaltet worden war, weiterhin in der Lage waren, den Zellzyklus zu unterbrechen (Friedlander *et al.*, 1996; Rowan *et al.*, 1996).

Wildtyp p53 ist ein Kernprotein mit fünf funktionellen Domänen. Diese beinhalten eine Transaktivierungs-Domäne (Residuen 1-42), eine Polyprolin-reiche Region mit fünf PXXP-Repeats (Residuen 61-94), eine zentrale Kerndomäne als Voraussetzung zum p53-Sequence-Specific DNA-Binding (p53-SSDB) (Residuen 102-292) und eine Oligomerisationsdomäne (Residuen 324-355). Der C-Terminus (Residuen 311-393) ist in der Lage sowohl RNS, als auch nicht-spezifisch DNS zu binden und fungiert außerdem als negativ regulierende Domäne (Vousden und Lu, 2002). Der p53-Spiegel in der Zelle wird durch Zellstress hochreguliert (Vogelstein *et al.*, 2000; Vousden und Lu, 2002). P53 kann in diesem Zusammenhang sowohl die Genexpression steigern, als auch unterdrücken. Das Protein p53 zeichnet in der menschlichen Zelle insbesondere für zwei Funktionen verantwortlich: P53 kann einerseits einen Zellzyklusarrest in der G1- bzw. G2-Phase und eine Reparatur von DNS-Schäden bewirken, zum anderen ist es ein wichtiger Induktor der Apoptose der Zelle. Die Fähigkeit zur Apoptoseinduktion wird auch als die wichtigste Funktion zur Tumorsuppression durch p53 bezeichnet (Slee *et al.*, 2004).

Sowohl die Aktivierung der endogenen wachstumshemmenden p53 Signalkaskade, als auch die Wiederherstellung der p53-Funktion mittels Einbringen von exogenem wt-p53 werden diskutiert (Naumann *et al.*, 2001; Lang *et al.*, 2003; Vecil und Lang, 2003; Cerrato *et al.*, 2004; Nakamizo *et al.*, 2008). Die Überlegungen zu einer p53-basierten Therapie gründen auf den bereits genannten Fähigkeiten des p53, intrazellulär einen Proliferationsstopp zur erwirken bzw. den programmierten Zelltod zu induzieren (Vousden und Prives, 2005; Vousden, 2006; Bossi und Sachhi, 2007). Die gewebespezifischen Nebenwirkungen einer chemo-/radiotherapeutischen Behandlung werden ebenso der p53-Funktion zugeschrieben, so dass ein zielgerichtetes Ansprechen der pro-apoptotischen Funktion von p53 sinnvoll ist (Gudkov und Komarova, 2007). In einem Phase I-Versuch zur Behandlung des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (NSCLC) mit Einbringen von p53 mit Adenoviren als Vektoren wurden nur geringe Nebenwirkungen, insbesondere auch im Vergleich zur intravenösen Cisplatin-Therapie, beobachtet. Als häufigste Nebenwirkung wurde ein transientes Fieber mit bis zu 48 Stunden Dauer beschrieben (Fujiwara *et al.*, 2000). Somit gibt es keinen unmittelbaren Hinweis auf eine generelle Toxizität von p53.

Innerhalb des letzten Jahrzehnts rückte die Bedeutung von p53 im Zusammenhang mit der Behandlung maligner Gliome zunehmend in den Fokus des Interesses. So konnte *in vitro* über das Adenovirus-vermittelte Einbringen von p53 in Glioblastom-Zellen eine Strahlensensibilisierung erreicht werden. Um die wenig effiziente *in vivo*-Transduktion zu simulieren, wurden hierbei geringe p53-Spiegel angewendet (D'Avenia *et al.*, 2006). Durch die Transfektion mit Wildtyp-p53 (wt-p53) ließ sich die Sensibilität von Gliomzellen der C6-Zelllinie auf das Suizidgen Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase (HSV-tk) unter Gabe von Ganciclovir erhöhen (Huang *et al.*, 2007). Außerdem gelang es in einer Phase I-Studie, Gliomzellen über ein Adenovirus mit wt-p53 zu transfizieren und eine Apoptose zu induzieren. Einschränkend muss an dieser Stelle ein eher moderater apoptotischer Effekt auf die Gliomzellen angeführt werden (Lang *et al.*, 2003, Vecil und Lang, 2003). Für das konventionelle Therapieschema hatte bis dahin kein eindeutiger Nachweis einer Wirksamkeit mittels Apoptose erbracht werden können (Steinbach und Weller, 2004). Allerdings unterstützt die p53-Aktivität in erheblich größerem Ausmaß, als bisher angenommen wurde, das Überleben der Zelle (Jänicke *et al.*, 2008). Diese duale Funktionalität des wt-p53 könnte der Grund dafür sein, dass sich kein prognostischer Vorteil für primäre Glioblastome mit erhaltener wt-p53-Expression für eine Bestrahlung nachweisen ließ (Gross *et al.*, 2005). Es müssen also p53-aktivierende Strategien entwickelt werden, die gezielt die apoptotische Aktivität der p53-Signalkaskaden ansprechen. Durch die Stabilisierung der p53-Aktivität ohne vorangegangene DNS-Schädigung kann möglicherweise

das Gleichgewicht der p53-Signalkaskaden zugunsten der Apoptose verschoben werden (Horn und Vousden, 2007).

1.4.4 Nicht-konventionelle Chemotherapeutika

In der Erprobung befindliche Chemotherapeutika haben zu Erfolg versprechenden Ergebnissen geführt. In diesem Zusammenhang erregten die potentiellen antineoplastischen Eigenschaften der Chinolinverbindungen, wie z.B. Chloroquin, Aufmerksamkeit (Rádl, 1996; Savarino *et al.*, 2006; Paul *et al.*, 2007). Chloroquin (ClQ) stellt eine solche Perspektive dar und konnte zusammen mit Carmustin unter Laborbedingungen einen synergistischen Effekt erzielen. Aufgrund der geringen Fallzahl einer doppelt-verblindeten Phase-II-Studie konnten klinisch noch keine eindeutigen Ergebnisse gezeigt werden (Sotelo *et al.*, 2006; Gilbert, 2006, Briceño *et al.*, 2007).

1.4.4.1 Chloroquin: Ein kleines Molekül mit großem Wirkungsspektrum

Chloroquin ist ein Zellmembran-gängiges Aminochinolin, das Doppelstrang-DNS interkalieren kann, ohne sie dabei zu schädigen (Mitscher, 2005). Aufgrund seiner Eigenschaften als schwache Base akkumuliert Chloroquin in Lysosomen und inhibiert dort den autophagozytotischen Proteinabbau. Möglicherweise triggert es über diesen Mechanismus die Apoptose (Boya *et al.*, 2003; Boya *et al.*, 2005; Shacka *et al.*, 2006; Amaravadi *et al.*, 2007; Maclean *et al.*, 2008a+b). Als etabliertes Therapeutikum in der Behandlung der Malaria und der rheumatoiden Arthritis stehen zunehmend die potentiellen antineoplastischen Eigenschaften des Chloroquin im Vordergrund. Eine zytotoxische Wirkung gegenüber verschiedenen humanen Tumorzelllinien wurde mehrfach bewiesen (Boya *et al.*, 2003; Boya *et al.*, 2005; Gurova *et al.*, 2005; Fan *et al.*, 2006). Die Auswirkung von Chloroquin auf Gliomzellen ist bisher nicht systematisch untersucht worden. Es liegen jedoch empirische Daten vor, die eine Unterdrückung des Wachstums von Gliomen über einen unbekannten Zusammenhang unterstützen (Briceño *et al.*, 2003; Briceño *et al.*, 2007).

1.4.4.2 Grundlagen, Pharmakokinetik und Nebenwirkungen

Chloroquin-Diphosphat wird genauso wie das strukturverwandte Chloroquin in der Basistherapie der rheumatoiden Arthritis und der Malariaphylaxe eingesetzt. Zum typischen

dosisabhängigen Nebenwirkungsprofil von Chloroquin zählen insbesondere neurotoxische, hämatologische, ophtalmologische, dermatologische und gastrointestinale Effekte. Die intestinale Resorption ist annähernd vollständig, die Plasma-Protein-Bindung liegt bei 55%. Chloroquinverbindungen werden hepatisch metabolisiert und über die renale Exkretion als Metaboliten sowie unverändert eliminiert. Die Halbwertszeit beträgt 32-50 Tage. Die Einnahme sollte zusammen mit den Mahlzeiten und/oder Milch erfolgen. Zu den charakteristischen Vergiftungserscheinungen zählen Kopfschmerz, Benommenheit, Sehstörungen, kardiovaskulärer Kollaps, Synkopen, respiratorischer und kardialer Arrest. Die Behandlung erfolgt symptomatisch. Es besteht jedoch die Möglichkeit, durch orale Verabreichung von Aktivkohle die intestinale Resorption zu verhindern. Eine Alkalisierung des Harns beschleunigt die Eliminierung.

1.4.4.3 Neue Anwendungsmöglichkeiten und Wirkprinzipien: Antineoplastische Mechanismen

Bereits 2001 gelang es, *in vitro* an neuronalen Zellkulturen die Abhängigkeit des Chloroquin-induzierten Zelltodes von der intrazellulären p53- und Bax-Aktivität zu beweisen. Eine Abhängigkeit von Caspase-3 und Caspase-9 bestand aber nicht (Zaidi et al., 2001). Andere Quellen führen den Effekt der Chloroquinanwendung vielmehr auf lysosomotrope Eigenschaften zurück: Als schwache Base akkumuliert Chloroquin intrazellulär und hebt den pH-Wert an. Das Volumen der Lysosomen wird vergrößert und die Membranpermeabilität erhöht (Savarino et al., 2006). Außerdem konnte *in vitro* eine Chemosensibilisierung für Doxorubicin an Zelllinien mit dem Multidrug resistance-associated protein (MRP) durch vier verschiedene Chinolin-Derivate u.a. Chloroquin gezeigt werden (Vezmar und Georges, 2000). Die Ursache einer Radiosensibilisierung *in vitro* unter Chloroquintherapie wird in einer 24 bis 48 Stunden nach Bestrahlung verzögert auftretenden Zellnekrose gesehen, während der Bestrahlungseffekt apoptotisch vermittelt wird (Zhao et al., 2005). An der A549 Lungenkarzinom-Zelllinie konnte eine Chloroquin-vermittelte, dosisabhängige Zellnekrose bei gleichzeitig abnehmender Vakuolisierung des Zytoplasmas beobachtet werden (Fan et al., 2006). An einem Mausmodell konnten subkutan wachsende Lymphome durch Tamoxifen-abhängige p53-Aktivierung in ihrem Wachstum gehemmt werden. Dieser Effekt ließ sich unter systemischer Gabe von Chloroquin signifikant verstärken. Als hauptverantwortlicher Mechanismus wird hierfür die Chloroquin-abhängige intrazelluläre Anhäufung ineffektiver Autophagosomen gesehen. Die Autophagie wird von den Autoren als Überlebensstrategie der neoplastischen Zellen z.B. im Rahmen einer chemotherapeutischen Behandlung beschrieben (Amaravadi et al., 2007).

Allerdings ließen sich von Zhou *et al.* sowohl ein Zellzyklusarrest und eine Ausdifferenzierung von Mamma-Karzinomzellen der MCF-7 Reihe *in vitro*, als auch eine p53-abhängige Apoptose unter Gabe von Chloroquin induzieren. Im Rahmen der Versuche wurden intrazellulär konzentrationsabhängig erhöhte Aktivitäten von p21 und p53 gemessen (Zhou *et al.*, 2002). Es wird postuliert, dass Chloroquin aufgrund DNS-interkalierender Eigenschaften und damit verbundener Hemmung der Topoisomerase II durch DNS-Schädigung p53 aktiviert (Snyder und Arnone, 2002; Zhou *et al.*, 2002). Ebenso konnte ein p53-abhängiger protektiver Effekt von Chloroquin gegenüber N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff-induzierten Mamma-Karzinomen der MCF10A-Zelllinie nachgewiesen werden. Bemerkenswert ist, dass sich in diesem Experiment keine Hinweise auf eine Beschädigung der DNS als mögliche p53-Aktivierung erbringen ließen. Über p53 und p21 wurde ein Zellzyklusarrest in der G1-Phase erreicht (Loehberg *et al.*, 2007). Zusätzlich konnte für Quinacrine, einen Vorläufer des Chloroquin, eine Hemmung der Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B an Nierenzellkarzinomen dokumentiert werden (Gurova *et al.*, 2005). Briceño, Sotelo *et al.* hatten in mehreren Publikationen seit 2003 auf den Überlebensvorteil von Glioblastompatienten bei systemischer Gabe von Chloroquin zusammen mit Carmustin (BCNU) gegenüber der BCNU-Monotherapie hingewiesen (Briceño *et al.*, 2003, Sotelo *et al.*, 2006, Briceño *et al.*, 2007). Die medikamentöse Wirksamkeit wird von dieser Gruppe auf eine Antimutagenität von Chloroquin zurückgeführt. Aufgrund niedriger Studienfallzahlen konnte noch kein eindeutiger Therapieeffekt bewiesen werden.

Diese Aussagen unterstützend hat sich Chloroquin in der Prävention des Burkitt-Lymphoms und Ataxia Telangiectasia am Mausmodell als effektiv erwiesen. Der Effekt wird auf die Induktion eines lysosomalen Zellstress und eine nicht-Caspase-vermittelte, p53-abhängige Apoptose zurück geführt (Maclean *et al.*, 2008). Seit Jahren wird ein Zusammenhang zwischen einer manifesten Infektion mit Plasmodium falciparum und dem Burkitt-Lymphom vermutet, ohne dass bislang statistisch signifikante Nachweise dafür erbracht werden konnten. Zwischen 1977 und 1982 waren in Nord-Tansania unter zehnjährige Kinder der Mara-Population mit Chloroquin zur Eindämmung der Malaria behandelt worden. Es zeigte sich zunächst ein sprunghafter Rückgang der Malaria-Inzidenz, die sich nach etwa zwei Jahren wieder annähernd dem Vorniveau anglich. Allerdings sank auch die Rate der Burkitt-Lymphom-Neuerkrankungen. Nach Beenden des Versuchs und damit der Chloroquin-Gaben erreichte auch die Inzidenz des Burkitt-Lymphoms wieder das Vorniveau (Geser *et al.*, 1989). Retrospektiv wird dieses Ereignis zunehmend mit einer präventiven Wirkung des Chloroquins in Verbindung gebracht, so auch von der Forschergruppe um Maclean und Kastan. Eine Behandlung des manifesten Malignoms wird nicht beschrieben.

1.5 Experimentelle Grundlagen der Glioblastom-Therapie

1.5.1 *In vitro*-Zellkultursysteme

Nach wie vor sollte die Erforschung neuer Therapiemöglichkeiten an *in vitro*-Zellkultursystemen beginnen. Primäre Zellkulturen oder aus resezierten Glioblastomen abgeleitete Zelllinien sind ein hervorragendes experimentelles System zur Erforschung der Biologie der glialen Tumore und bieten weitreichende Möglichkeiten zur Identifikation und zum Testen potentieller Therapeutika. Der Vorteil besteht in der Möglichkeit zur Manipulation von intrazellulären Signalkaskaden, der Aktivität von Transkriptionsfaktoren etc. in einem klar definierten genetischen Rahmen. Einschränkend wirkt sich die Zwei-Dimensionalität der sog. Monolayer-Zellkulturen aus. Da aber die im Fokus stehenden Abläufe isoliert betrachtet werden können, sind diese Systeme eine notwendige Vorstufe, die anschließend einer Validierung durch *in vivo*-Modelle bedürfen.

1.5.2 *In vivo*-Modelle

1.5.2.1 Chorion-Allantois-Membran des Hühnerembryonen

Zur Beurteilung der Wachstumscharakteristiken humaner Tumorzellen werden sowohl Modelle an Säugetieren, als auch an Nicht-Säugetieren angewandt. Beispielsweise wurden Neuroblastomzellen der Zelllinie IMR-32 auf einer Chorion-Allantois-Membran des Hühnerembryonen ausgebracht, um die Angiogenese humaner Neuroblastome einschätzen zu können (Mangieri *et al.*, 2009).

1.5.2.2 Experimentelle Gliome im subkutanen Mausmodell

Als klassisches Modell am Säugetier haben Tumormodelle an athymischen Mäusen seit 1969 ihren unbestrittenen Stellenwert in der onkologischen Forschung. Auf der Grundlage solcher Tierversuche wurden mittlerweile zahlreiche Möglichkeiten entwickelt, aus unterschiedlichen Xenograft-Tumorzelllinien experimentelle Tumore an *in vivo*-Modellen zu implantieren und zu evaluieren. Zusätzlich entstanden in diesem Rahmen allgemein anerkannte zytotoxische und pharmakologische Therapien sowie präklinische Modelle (Kelland, 2004). Aktuell treten zunehmend definierte molekulare Zielstrukturen als Angriffspunkte für antitumorale Therapieansätze in den Vordergrund, die *in vivo* ihre Wirksamkeit

erweisen müssen. Es zeigte sich außerdem, dass die gleichen Dysregulationen der Signaltransduktion und des Zell-Zyklus-Arrestes bei Gliomen im Mausmodell zur Induktion von histologisch gleichartigen Tumoren wie beim Menschen führten (Holland, 2001). Subkutane Tumormodelle wiesen gegenüber orthotopen Modellen im Tierversuch zahlreiche abweichende biologische Charakteristika in Wachstum und Metastasierung auf (Eccles, 2002). Vor diesem Hintergrund sollen orthotope Versuchsanordnungen eine bestmögliche Voraussage über eine Wirksamkeit am Menschen ergeben (Fomchenko und Holland, 2006). Neben der Verwendung von aus Patientenproben gewonnenen Xenografts konnten standardisierte *in vitro*-Zelllinien als erneuerbare Quellen für biochemische und molekulare Experimente etabliert werden, die eine Vergleichbarkeit von Ergebnissen sowohl unterschiedlicher Versuche, als auch Studiengruppen ermöglichen. Bereits 1992 ließen sich positive Korrelationen zwischen der Therapieantwort einzelner *in vitro*-Zelllinien mit den davon abgeleiteten Xenografts in *in vivo*-Modellen beweisen (Kelland *et al.*, 1992).

1.5.2.3 Experimentelle Gliome im orthotopen Mausmodell

In vivo-Modelle sind in der Lage die Dreidimensionalität und die Komplexität des menschlichen Organismus zu simulieren. Eine Sonderform stellen die orthotopen Modelle dar: Die Inokulation des Versuchstiers mit einem definierten Zellmodell, z.B. einem Malignom, wird in der vergleichbaren anatomischen Lage bzw. organspezifisch durchgeführt. Schwierigkeiten ergeben sich durch die Zugänglichkeit der entsprechenden Organsysteme und des geplanten Behandlungsweges. Das Ziel orthotoper Modelle von Hirntumoren ist, durch die Umgehung der Blut-Hirn-Schranke eine hohe Wirkstoffkonzentration am Zielort bei gleichzeitig möglichst gering ausgeprägten systemischen Nebenwirkungen zu erzielen.

1.6 Ziel des Versuches und Motivation

Nach wie vor stellen hirneigene Tumoren unmittelbar lebensbegrenzende Krankheitsbilder dar. Ungeachtet der Behandlungsfortschritte der letzten Jahrzehnte beträgt die mittlere Überlebenszeit bei Patienten mit Glioblastomen etwa 14 Monate. Die Konstitution und das Lebensalter spielen hierbei eine entscheidende Rolle. Daher ist die Entwicklung von effektiveren und die Lebensqualität so wenig wie möglich beeinträchtigenden Behandlungsformen eine absolute Notwendigkeit. Diese Studie hat zum Ziel, den Tumor-reduzierenden

Effekt von Chloroquin systematisch zu untersuchen, bevor eine klinische Studie am Menschen geplant werden kann.

Der Anteil primärer Glioblastome liegt bei über 90% aller Fälle. Eine Funktionseinschränkung der p53-Aktivität durch Mutation liegt bei ihnen in weniger als 30% vor, d.h. nur in etwa einem Viertel aller Glioblastome. Daher liegt der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Beeinflussung der intrazellulären p53-Aktivität durch die Gabe von Chloroquin sowohl *in vitro*, als auch im Tierversuch. Der Einfluss wiederholter lokaler intratumoraler Applikationen auf das Wachstum von Glioblastomen wird überprüft. Nacktmäuse werden über eine stereotaktisch platzierte Hohlschraube in der Kalotte mit humanen Glioblastomzellen der Reihe U87MG beimpft und über dasselbe System chemotherapeutisch ähnlich der Convection enhanced delivery per Injektion behandelt. Die Umgehung der Blut-Hirn-Schranke und die nicht-vasale Applikation neutralisieren zwei bereits genannte Probleme der systemischen Anwendung.

Als bereits etabliertes Medikament sind die charakteristischen Nebenwirkungen von Chloroquin hinlänglich bekannt. Außerdem handelt es sich im Vergleich zu gängigen Chemotherapeutika um ein relativ preisgünstiges Präparat. In zahlreichen Studien verdichten sich die Hinweise darauf, dass eine nicht-DNS-schädigende antineoplastische Wirksamkeit vorliegt. Eine zufriedenstellende Erklärung des zugrunde liegenden Mechanismus konnte bisher nicht gegeben werden. Die vorliegende Arbeit stellt sich der Frage nach dem Wirkungsprinzip und einer möglichen rein toxischen Wirkung des Chloroquins.

2 Material und Methoden

2.1 *In vitro*-Versuche

Die *in vitro*-Versuche wurden mit Hilfe der Mitarbeiter des Neuro-Onkologischen Labors der Universität zu Lübeck bzw. des Neuro-Onkologischen Labors der Universität Göttingen durchgeführt.

2.1.1 Zellen und Antikörper

Die verwendeten humanen Glioblastom-Zelllinien wurden bezüglich ihrer p53-Aktivität allesamt charakterisiert (Kim *et al.*, 2005). Dazu zählen G44 (gekürztes p53), G59 (mutiertes p53), G112 (mutiertes p53), G120 (wt-p53), G130 (p53-defizitär), G168 (wt-p53), und U87MG (wt-p53). Die Zellen wurden in Minimal Essential Medium (MEM; Biochrom AG, Berlin) mit zugesetztem 10%igem fetalen Kälberserum (FCS) gehalten. Für jede Zellbehandlung wurde die zugesetzte Chloroquin-Diphosphat-Lösung frisch angefertigt (s. 2.2.3 Bereitstellung von Chloroquin und Phosphat-Pufferlösung (PBS)). Zur Markierung der apoptotischen Zellen wurde der Antikörper gegen gespaltene Caspase-3 (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) verwendet.

2.1.2 Bestimmung von Zellwachstum und Zelltod

Die Zellen wurden auf 96-Loch-Mikrotiterplatten in einer Dichte von $2,5 \times 10^3$ Zellen pro Well mit einer Inkubationszeit von 24 Stunden vor der Behandlung ausgesät. Als Behandlung wurde jeweils Chloroquin-Diphosphat in der geplanten Verdünnung zum Medium dazu gegeben. Jeden Tag wurden jeweils vier Wells einer Versuchsreihe für 15 Minuten bei Raumtemperatur in 3%igem Glutaraldehyd fixiert. Die Fixierung wurde unter der Werkbank mit laminarer Strömung unter sterilen Bedingungen bei geöffneten Wells durchgeführt. Um eine Intoxikation unfixierter Zellen mit Glutaraldehyd zu vermeiden, wurden die Zellen drei Mal mit steriler Phosphat-Pufferlösung (PBS) gewaschen. Nach 8 aufeinander folgenden Tagen konnten alle so gewonnenen Zellen einer Färbung mit Kristallviolett zugeführt werden. Die Zellen wurden erneut mit PBS gespült, luftgetrocknet und in 1%igem Natriumlaurylsulfat (SDS, Sodium Dodecyl Sulfate)-Lösungspuffer gelöst. Die Absorption

zur Bestimmung des Proteingehaltes im Zelllysate wurde bei einer Wellenlänge von 560 nm mit Hilfe eines Spektrometers vom Typ Ultrospec II (Pharmacia LKB, Freiburg) bestimmt.

Der relative Anteil der abgestorbenen Zellen wurde mittels Trypan Blue Exclusion, einer Färbung zum Zellvitalitätsnachweis, gemessen. Apoptotische Zellen wurden mit einem Antikörper gegen aktivierte Caspase-3 mittels einer Immunfluoreszenzfärbung markiert und ausgezählt. Die durch die Apoptose bedingte DNS-Fragmentierung wurde durch die TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling)-Immunfluoreszenz abgeschätzt (ApoAlert™ DNA Fragmentation Assay Kit, Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA).

2.2 Orthotopes Mausmodell des malignen Glioms

Für die vorliegende Arbeit wurde ein orthotopes Modell an athymischen Nacktmäusen (Nu/Nu, NMRI, Taconic, Lille Skensved, Dänemark) mit der U87MG-Zelllinie maligner Gliome gewählt. Es wurden die von der Tierschutzkommission der Landesregierung Schleswig-Holstein genehmigten Rahmenbedingungen für Tierversuche unter der Protokollnummer 35/f/03 eingehalten.

Für die Versuche wurden 6-8 Wochen alte, weibliche Nacktmäuse (Nu/Nu, NMRI, Taconic) verwendet. Die Tiere wurden in Polycarbonat-Käfigen im 12 Stunden-Hell-/Dunkelrhythmus zu maximal fünf Tieren pro Käfig gehalten. Spezialfutter und Trinkwasser waren in der Menge nicht beschränkt. Alle Tiere wurden in Laminar-Flow-Gestellen in Räumen der gentechnischen Sicherheitsstufe 2 (nach §7 Abs. 4 Nr. 2 der Verordnung über die Sicherheitsstufen und Sicherheitsmaßnahmen bei gentechnischen Arbeiten in gentechnischen Anlagen (Gentechnik-Sicherheitsverordnung – GenTSV) in der Fassung der Bekanntmachung vom 14. März 1995 (BGBl. I S. 297), zuletzt geändert durch Artikel 3 der Verordnung vom 6. März 2007 (BGBl. I S. 261)) gehalten. Käfige und Trinkwasserflaschen wurden autoklaviert, die Behandlungen wurden jeweils unter keimreduzierten Bedingungen durchgeführt, sowohl Wasser als auch Spezialfutter wurden nicht autoklaviert. Es wurde eine tägliche Kontrolle des körperlichen und Verhaltenszustandes der Versuchstiere über den kompletten Zeitraum des Versuchsaufbaus vorgenommen. Fress- und Bewegungsverhalten sowie der Gewichtsverlauf wurden beobachtet und dokumentiert. Bei Auftreten eines übermäßigen Gewichtsverlusts einhergehend mit einer Verschlechterung des Allgemeinzustandes oder bei Auftreten einer neurologischen Sympto-

matik wurden die betroffenen Tiere getötet. Da lediglich die Meningen, aber nicht das Hirngewebe selbst von Schmerzrezeptoren innerviert werden, entstehen allein durch die Anwesenheit des Tumors, der zentral im Gehirn wächst, keine Schmerzen.

2.2.1 Anordnung der Versuche

Der generelle Versuchsaufbau orientierte sich an folgendem Schema: An Tag 1 des Versuches wurde den Nacktmäusen nach mindestens viertägiger (besser einwöchiger) Erholungsphase nach Anlieferung in den Tierstall das stereotaktische Hohlschraubensystem eingesetzt. Die Tiere erhielten anschließend für bis zu drei Tage eine orale Schmerzmedikation über das Trinkwasser (s. 2.3.1 Betäubung und 2.3.2 Operation). Frühestens vier Tage nach der Operation wurde die Beimpfung mit einer beim jeweiligen Versuch benannten Anzahl an Tumorzellen der U87MG-Zelllinie durchgeführt (s. 2.2.2 U87MG-Zelllinie und Aufbereitung zur Implantation). Je nach Versuchsaufbau wurde entweder ab dem Folgetag oder erst im weiteren Verlauf die Behandlung begonnen (s. 2.3.3 Behandlung). Diese erstreckte sich über einen Zeitraum von 7 bis 18 Tagen. Die Versuchsgruppen setzten sich aus zufällig ausgesuchten Tieren zusammen. Die tägliche Injektionsmenge betrug in allen Versuchen 5 µl. Als Placebo-Injektionslösung wurde sterile PBS, pH-Wert 7,4, verwendet. Anschließend wurden die Mäuse nach einem vorher definierten Zeitintervall getötet und die Hirne zur histologischen Aufarbeitung entnommen (s. 2.3.5 Tötung der Versuchstiere und Entnahme des Gehirns und 2.3.6 Histologie und immunhistochemische Auswertung). Verstarben Versuchstiere bereits bei der Hohlschraubenimplantation, wurden sie nicht in die Versuchsergebnisse mit eingebracht.

2.2.1.1 Mechanische Belastung

Dieser Versuch wurde durchgeführt, um das Ausmaß der mechanischen Irritation durch die täglichen stereotaktischen Injektionen auf das Tumorgewebe festzustellen. Zwei Nacktmäuse wurden mit je $0,7 \times 10^6$ U87MG-Zellen beimpft. Eine Maus erhielt ab dem ersten Tag nach Tumorimplantation für 15 Tage tägliche intrazerebrale Injektionen mit jeweils 5 µl 0,9% NaCl, die andere Maus wurde nicht behandelt. Sechs Tage nach Abschluss der Behandlung wurden beide Mäuse getötet und die Großhirne histologisch aufgearbeitet. In der HE-Färbung zeigten sich hinsichtlich Tumorgroße oder intratumoraler Nekrosen keine lichtmikroskopischen Unterschiede.

2.2.1.2 Toxizitätstestung

Zur Dosisfindung und Toxizitätstestung von Chloroquin-Diphosphat wurden wiederholt Versuche ohne Implantation von Tumorzellen durchgeführt. In Versuchsgruppen von jeweils zwei bis drei Mäusen wurde beginnend bei Konzentrationen von 0,5 µmol/l bis hin zu maximal 40 mmol/l Chloroquin-Diphosphat bei täglichen stereotaktischen Injektionen eine Dosisescalation betrieben. Die Behandlungsdauer bewegte sich zwischen 8 d und 14 d.

2.2.1.3 Therapieversuch

Die Aufteilung erfolgte in zwei Gruppen zu je 10 Tieren für die Behandlung mit PBS bzw. 30 mM Chloroquin-Diphosphat. Zehn Tage nach Implantation von jeweils 5×10^5 U87MG-Zellen wurde die Behandlung aufgenommen und sollte für 21 Tage fortgeführt werden. Im Vergleich zu den Vorversuchen wurde auf eine niedrigere zu implantierende Zellzahl einer U87MG-Zelllinie mit hoher Proliferationsrate zurückgegriffen, um einen möglichen Therapieeffekt besser dokumentieren zu können. Die Zellzahl wurde hoch genug gewählt, um das Risiko einer Fehlimplantation zu minimieren. Bei Verkleinerung einer Versuchsgruppe auf sechs oder weniger Tiere oder in der Breite zu kleinen Gruppen und somit verminderter Signifikanz sowie bei deutlicher Beeinträchtigung der Mäuse in Kombination mit einem signifikanten Gewichtsverlust wurde eine Tötung aller verbliebenen Tiere als vorzeitiger Endpunkt definiert.

2.2.2 U87MG-Zelllinie und Aufbereitung zur Implantation

Für die Versuche wurde die humane Glioblastom-Zelllinie U87MG (ATCC, LGC Promochem GmbH, Wesel) benutzt. Die Zelllinie wurde in den sechziger Jahren aus dem Glioblastom einer 44jährigen, dem kaukasischen Typ zugeordneten Patientin gewonnen. Seitdem hat sich U87MG in der experimentellen neuroonkologischen Forschung als beliebtes Zellmodell etabliert. Die im Tierversuch entstehenden Tumoren zeichnen sich durch geringe Invasivität und verdrängendes Wachstum, ähnlich einer Metastase, aus.

Bei der Aufbereitung der Zellen zur Implantation in die Maushirne wurde zunächst der Überstand aus Nährmedium mit einer Pipette abgesaugt. Es folgte das Spülen mit 2-3 ml und anschließend das trypsinieren mit 5 ml einer Lösung aus Trypsin 0,25%/ EDTA

0,03%. Unter dem Mikroskop wurde das Lösen der Zellen vom Untergrund der Kulturflasche überprüft. Danach wurde mit MEM (Biochrom AG) mit zugesetztem 10%igem FCS je nach gewünschtem Endvolumen gelöscht. Die Suspension wurde in der Zentrifuge bei 1000 Umdrehungen pro Minute für 5 Minuten bei 4°C geschleudert. Der flüssige Überstand wurde aspiriert und verworfen. Das Zellpellet wurde erneut in 25 ml MEM (ohne FCS) suspendiert und wiederum nach dem bereits erwähnten Schema zentrifugiert. In mehreren Wiederholungen dieses Vorgangs konnten die entstehenden Zellpellets mit denen anderer Kulturflaschen zusammengelegt und konzentriert werden. Um die Zellkonzentration zu quantifizieren wurde die Summe aller gewonnenen Zellen in 50 ml Nährmedium gelöst und daraus 20 µl in der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Zellen auf Eis gelagert.

Anschließend konnten die Zellen den betäubten Versuchstieren mittels einer Hamilton-Spritze (Hamilton Company) über das stereotaktische Hohlschraubensystem implantiert werden. Die Injektion der Zellpellets erfolgte über einen Zeitraum von etwa fünf Minuten.

2.2.3 Bereitstellung von Chloroquin und Phosphat-Pufferlösung (PBS)

Das Chloroquin wurde in Form des Chloroquin-Diphosphat verwendet und für jede Behandlung frisch angefertigt. Bei einer molaren Masse des Moleküls von 515,90 g/mol wurden zur Aufbereitung 0,26 g ausgewogen und auf 5 ml destilliertes Wasser gegeben. Alle weiteren Arbeitsschritte fanden unter einer Werkbank mit laminarer Luftströmung statt. Zur Ausbildung einer makroskopisch homogenen Verteilung wurde die Lösung auf der höchsten Stufe des Vortex-Schüttelmixers (GMB Glasmechanik AG, Reinach, Schweiz) durchmischt. Anschließend wurden z.B. für 30 mM Chloroquin-Diphosphat 300 µl der entstandenen Lösung mit 700 µl PBS vermengt. Es wurde ausschließlich auf pH 7,4 titrierte PBS-Lösung benutzt. Chloroquin-Diphosphat und PBS mussten erneut auf dem Vortex-Mixer (GMB Glasmechanik AG) geschüttelt werden. Danach folgte eine weitere Durchmischung durch zehnfaches Auf- und Abziehen mit der Pipette. Abschließend wurde die Flüssigkeit mit einer Spritze aufgezogen und steril durch einen Porenfilter in ein steriles Falcon-Röhrchen (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) abgepresst, luftdicht verschlossen und zum Schutz vor Lichteinstrahlung mit Aluminiumfolie umwickelt.

Das PBS wurde ebenfalls unter der Werkbank mit laminarer Strömung mit einer Spritze aufgezogen und steril durch einen Porenfilter in ein steriles Falcon-Röhrchen (Becton Dickinson GmbH) abgepresst.

2.2.4 Hohlschraubensystem

Für die orthotope und stereotaktische Implantation von Tumorzellen und Applikation von Versuchssubstanzen wurde ein Hohlschraubensystem mit einer Länge von 2,6 mm und einem Durchmesser von 1,0 mm benutzt (Plastics One, Roanoke, VA, USA). Dieses System lässt sich wie ein Portsystem verwenden, ermöglicht eine zuverlässige stereotaktische Orientierung im Maushirn und lässt sich nach jeder Anwendung mit einem magnetischen Mandrin steril verschließen. Durch die geringe Länge liegt das System der Großhirnhemisphäre lediglich auf.

2.3 Eingriffe an den Versuchstieren

2.3.1 Betäubung

Als Anästhetikum für die Mäuse wurden 0,8 ml Rompun (20 mg/ml, Wirkstoff: Xylazin, Bayer AG, Leverkusen) und 1,2 ml Ketavet (100 µg/ml, Wirkstoff: Ketamin, Pfizer Inc., New York, NY, USA) auf 8,0 ml Natriumchlorid-Lösung 0,9% (Injektionslösung enthält 16 mg Xylazin, 120 mg Ketamin) als intraperitoneale Injektion (i.p.) bei einer Dosierung von 0,01 ml/g Körpergewicht der Maus verwendet. Um die Belastung durch die Narkose für die Mäuse zu reduzieren, wurde die Dosierung im Laufe der Behandlung mit Chloroquin-Diphosphat auf bis zu 80% der Ausgangsdosis herabgesetzt. Während der Betäubung wurden die Versuchstiere auf einer elektrischen Wärmematte gelagert.

2.3.2 Operation

Das Versuchstier wurde durch eine i.p.-Injektion betäubt. Im Anschluss wurde der Kopf in einem stereotaktischen Rahmen (TSE Systems, Bad Homburg) fixiert (s. Abbildung 1) und auf die Augen jeweils etwas Bepanthen-Salbe (Bayer AG, Leverkusen) gegeben, um ein Austrocknen der Bindehäute zu vermeiden. Nach Desinfektion der Kopfhaut mit Sterili-um (Bode Chemie, Hamburg) wurde unter dem Operationsmikroskop S3B (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena) mit einer chirurgischen Schere ein Hautlappen von den Ohren bis zu den Augenhöhlen in der Breite der Kalotte entnommen. Mit Skalpell und Wattetupfer erfolgte die Abtragung des Periosts des Hautdefektes, so dass sich die Schädelnähte darstellten und die Kalotte aufgeraut wurde (s. Abbildung 2). 3 mm rechts lateral und 1 mm

posterior des Bregma wurde dann mit einem diamantbeschichteten 1,0 mm-Kugelbohrer (Aesculap Microtron 60, Tuttlingen) ein Loch durch die Kalotte gebohrt.



Abbildung 1: Im stereotaktischen Rahmen fixierte Maus präoperativ

Nach Säuberung des Bohrlochs konnte eine Hohlschraube (Plastics One, Roanoke, VA, USA) mit Hilfe eines speziellen Schraubendrehers (Plastics One) senkrecht zur Oberfläche eingesetzt werden, so dass die Stichrichtung eine stereotaktische Lokalisierung der rechtshirnigen Basalganglien vorgab. Der freigelegte Schädelknochen wurde unter Aussparung des Bohrlochs mit Zwei-Komponenten-Kleber (UHU GmbH, Bühl, Deutschland) überzogen, so dass die Kleberänder den Schraubenkopf seitlich mit erfassten. Der aushärtende Klebstoff fixierte die Hohlschraube im Bohrloch. Der Behandlungskanal der Schraube wurde anschließend mit einem magnetischen Mandrin (Plastics One) verschlossen und die Maus aus dem stereotaktischen Rahmen gelöst. Postoperativ erhielten die Mäuse über ein bis drei Tage eine Schmerzmedikation von 0,375 ml Novaminsulfon-Tropfen (Wirkstoff: Metamizol, ratiopharm GmbH, Ulm) pro 100 ml Trinkwasser. In diesem Zeitraum wurde täglich das Trinkwasser gewechselt und neu mit Novaminsulfon-Tropfen versetzt.

Der gesamte Vorgang ist an das Versuchsprotokoll von Brockmann *et al.* angelehnt (Brockmann *et al.*, 2003).



Abbildung 2: Intraoperative Darstellung der Schädelnähte (Bohrstelle rechts posterolateral des Bregma markiert)

2.3.3 Behandlung

Die Maus wurde durch eine intraperitoneale Injektion narkotisiert und dann mit einer spitzen Pinzette der Mandrin aus der Hohlschraube entfernt. Eine Hamilton-Spritze (Hamilton Company Europe, Bonaduz, Schweiz) mit 50 μ l-Skalierung wurde entweder mit PBS oder mit 0,3 mM Chloroquin-Diphosphat befüllt. Die Spritze war mit einer 26 Gauge-Kanüle (0,45 mm Außendurchmesser) bestückt und die Einstichtiefe durch einen aufgesetzten Stopper auf 2,5 mm begrenzt. Mit Hilfe eines Greenberg-Retractors (Codman & Shurtleff Inc., Raynham, MA, USA) wurde die Hamilton-Spritze (Hamilton Company) in den Stichkanal der Hohlschraube eingeführt und in dieser Position arretiert. Ein Volumen von 5 μ l wurde über einen Zeitraum von etwa einer Minute injiziert und danach weitere zwei Minuten abgewartet, bis sich die Flüssigkeit im Gewebe verteilt hatte. Anschließend wurde die Hamilton-Spritze (Hamilton Company) entfernt und der Stichkanal mit einem sterilen Mandrin verschlossen.

2.3.4 Reinigung und Sterilisierung der Instrumente

Die Reinigung des Operationsbestecks und der Hamilton-Spritzen fanden unter fließendem Wasser mit einer Bürste statt. Anschließend erfolgte die Autoklavierung in einer Labor-Autoklave im Festkörpermodus. Hohlschrauben und Mandrins wurden zur Reinigung von organischen Resten über Nacht in 65%iger Salpetersäure eingelegt, unter fließendem Wasser abgespült und zur Anwendung ebenfalls im Festkörpermodus autoklaviert.

2.3.5 Tötung der Versuchstiere und Entnahme des Gehirns

Den Mäusen wurden intraperitoneal Überdosen des Betäubungsmittels verabreicht und im Anschluss daran die Halswirbelsäule gebrochen. Anschließend wurde nach Entfernung der Hohlschraube aus der Kalotte mit der chirurgischen Schere Haut, Nackenmuskulatur und Halswirbelsäule quer durchtrennt sowie längs die Kopfhaut und Muskulatur bis zum Kalottenhautdefekt eröffnet. Mit der chirurgischen Schere wurde die Kalotte entlang der Sagittalnaht eröffnet und mit einer anatomischen Pinzette die einzelnen Fragmente abgehoben. Danach erfolgte die Abtrennung des Riechhirns und des Kleinhirns vom Großhirn, so dass mit der anatomischen Pinzette das Großhirn aus der Kalotte heraus geschält und in ein Falcon Tube (Becton Dickinson GmbH) mit Formaldehydlösung 4,5% (nach Lille) gegeben werden konnte.

2.3.6 Histologie und immunhistochemische Auswertung

Die Maushirne wurden nach mindestens vier Tagen in Formaldehydlösung 4,5% (nach Lille) unmittelbar angrenzend an die Stichkanal-Läsion in koronarer Ebene mit einem Skalpell geteilt und mit beiden Schnittflächen in derselben Ausrichtung in die Einbettungskapseln gelegt. Das Einbetten in Paraffin wurde vom Institut für Pathologie der Universität Lübeck durchgeführt. Anschließend wurden mit dem Mikrotom aus den Präparaten histologische Schnitte mit einer Schichtdicke von ca. 3 µm angefertigt und über Nacht im Brutschrank bei 65°C bzw. 37°C auf die Objektträger gebacken. Von allen Präparaten wurden standardmäßig Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbungen hergestellt. Für die Färbung wurden die Schnitte in die wässrige Phase überführt und dabei für je zwei Minuten in vier Xylol-Bäder, zweimal 100% Alkohol, 96% Alkohol, 70% Alkohol und destilliertes Wasser getaucht. Es folgten die erste Färbung für 5 Minuten in Hämatoxylin nach Mayer und danach

für 5-10 Minuten das Bläuen in fließendem Leitungswasser. Hierauf schloss sich für anderthalb Minuten ein Bad in 1% wässriger Eosin-Lösung an. Dann wurden die Schnitte über die aufsteigende Ethanolreihe mit kurzen Einwirkzeiten von jeweils wenigen Sekunden bis hin zu 100% Alkohol wieder in die hydrophobe Phase zurückgeführt. Für jeweils zwei Minuten wurden die histologischen Schnitte in 100% Alkohol und vier Xylol-Bädern belassen. Mit Eukitt-Harz (Riedel-de Haën, Seelze) wurden die Deckgläser auf den Präparaten fixiert und diese abschließend getrocknet.

An den erhaltenen koronaren Stufenschnitten der Maushirne wurde der jeweils größte Anschnitt des Tumors ermittelt. Anschließend wurden grafischer Umriss und Tumorfläche errechnet. Die lichtmikroskopische Auswertung erfolgte an einem Olympus B40 (Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg) unter Zuhilfenahme der Auswertungssoftware Cell^A (Olympus) durch die Abteilung Neuropathologie des Zentrums Rechtsmedizin und Pathologie der Universität Göttingen. Es wurden für die Kriterien Tumorfläche, Apoptose-Index (mittels TUNEL-Färbung) und Mitose-Index an bis zu drei Schnittstufen und jeweils bis zu 49 Zählfeldern die Mittelwerte bestimmt.

2.4 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm GraphPad Prism 5 (Graph Pad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) benutzt. Es wurden der t-Test inklusive Signifikanzniveau sowie die einfaktorielle Varianzanalyse errechnet.

3 Vorarbeiten: Effekte des Chloroquin auf Gliomzellen in der Zellkultur

Die beschriebenen Vorarbeiten wurden mit Hilfe der Mitarbeiter des Neuro-Onkologischen Labors der Universität zu Lübeck bzw. des Neuro-Onkologischen Labors der Universität Göttingen durchgeführt.

3.1 Chloroquin hemmt das Zellwachstum von Glioblastomzellen *in vitro*

Die Auswirkungen von Chloroquin auf das Zellwachstum wurden an verschiedenen Zelllinien mit unterschiedlichem funktionellem p53-Status untersucht. Bei steigender Chloroquinkonzentration konnte eine dosisabhängige Wachstumshemmung nachvollzogen werden (s. Anhang, Abbildung 3a). Obwohl die Proliferationshemmung an allen Zellsystemen beobachtet werden konnte, sprachen Zelllinien mit wt-p53 (U87MG und G120) bei niedrigen Chloroquinkonzentrationen von 5 bzw. 10 µg/ml deutlich besser auf die Behandlung an, als diejenigen Zellen mit mutiertem (G44, G59 und G112) oder deletiertem p53 (G130). In der Trypan Blue Exclusion wurde eine von der Chloroquindosis abhängige Beziehung zum induzierten Zelltod gesehen (s. Anhang, Abbildung 3b). Im Rahmen der getesteten Chloroquinkonzentrationen trat der Zelltod in den Zelllinien mit wt-p53 signifikant häufiger als in den anderen Zelllinien auf. Diese Beobachtung unterstützt die These, dass die Funktionalität des p53 in der Glioblastomzelle ein wichtiger Faktor für das Ansprechen auf Chloroquin ist.

3.2 Die Apoptose trägt zum Chloroquin-induzierten Zelltod der Glioblastomzellen bei

Für Chloroquin wurden verschiedene antineoplastische Wirkprinzipien beschrieben: Dazu gehören ein lysosomotroper Mechanismus, der durch eine Hemmung der Autophagozytose den Zelltod herbeiführt sowie die Induktion der Caspase-abhängigen Apoptose (Boya *et al.*, 2003). Um die Wirkungsmechanismen des Chloroquin-induzierten Zelltodes von Glioblastomzellen nachzuvollziehen, wurden die Aktivierung der Caspase-3 und die Fragmentierung der DNS als Bestandteile der apoptotischen Signalkaskade quantifiziert. Die Immunfluoreszenzfärbung der gespaltenen Caspase-3 zeigte eine deutliche Aktivierung des Enzyms unter Chloroquinbehandlung (s. Anhang, Abbildung 4a). Die durch Chloroquin hervorgerufene Aktivierung der Caspase-3 ließ sich zeitabhängig und erst nach 48

Stunden Behandlung nachweisen. Nach 96 Stunden war die Mehrzahl der Zellen positiv für die gespaltene Caspase-3. Analog zur Proliferationshemmung fiel die Aktivierung der Caspase-3 unter Chloroquinbehandlung in den Zelllinien mit wt-p53 erheblich höher aus (s. Anhang, Abbildung 4b und 4c). Zusätzlich erbrachte die TUNEL-Färbung in den Chloroquin-behandelten Zelllinien den Nachweis der DNS-Fragmentierung, die charakteristisch für das Spätstadium der Apoptose ist (s. Anhang, Abbildung 4d).

3.3 Die Induktion der Apoptose durch Chloroquin ist von p53 abhängig

Um den Zusammenhang der Chloroquin-induzierten Apoptose und der p53-Funktionalität näher zu beleuchten, wurde ein Versuch mit p53-Knockdown-Zellen durchgeführt. Die Glioblastomzellen wurden mit p53-siRNA bzw. mit unspezifischer siRNA (scr-siRNA) transfiziert. Durch die p53-siRNA konnte die endogene p53-Expression deutlich inhibiert werden (s. Anhang, Abbildung 5a). Es folgten für alle Zelllinien eine Behandlung mit Chloroquin über 72 Stunden und anschließend der Nachweis von aktivierter Caspase-3. In den jeweiligen Zelllinien mit wt-p53 (U87MG und G120), die mit p53-siRNA behandelt worden waren, ließ sich eine signifikante Reduktion der Caspase-3 Aktivierung nachweisen (s. Anhang, Abbildung 5b). Die Hemmung von mutiertem p53 hatte keinen quantifizierbaren Effekt auf die Apoptoserate. Voraussetzung für die Induktion einer Apoptose durch Chloroquin ist also eine erhaltene p53-Funktionalität.

4 Ergebnisse: Effekte des Chloroquin auf maligne Gliome im orthotopen Mausmodell

4.1 Toxizitätsversuch

Es fanden sich in der HE-Färbung keine Anzeichen für Toxizität gegenüber dem hirneigenen Gewebe außer einer unspezifischen Fremdkörperreaktion mit Anreicherung von Makrophagen mit unregelmäßig schaumig-scholligem, stark basophilem Zytoplasma sowohl mikroglialer als auch monozytärer Herkunft, die bereits bei den NaCl-Injektionen aufgetreten war. Bei mit Chloroquin behandelten Hirnen zeigte sich vereinzelt nicht anfärbbares, flüssiges Fremdmaterial in den Vakuolen sowie teils pigmentartige, feste Ablagerungen. Klinisch ließ sich bei intrazerebraler Gabe von 30 mmol/l Chloroquin-Diphosphat periinterventionell vereinzelt eine Schnappatmung der Versuchstiere beobachten, eine Erhöhung

der Dosis auf 40 mmol/l wurde bei Schnappatmung und Tod der Versuchstiere nicht toleriert. Daher wurde eine Konzentration von 30 mmol/l in 5 µl Volumen täglich als maximal verträgliche Dosis definiert. Auch hier fand sich mikroskopisch kein Hinweis auf eine Gewebeunverträglichkeit.

4.2 Therapieversuch

Aufgrund der körperlichen Belastung der Tiere durch die Behandlung wurde am 14. Behandlungstag eine außerplanmäßige Therapiepause eingelegt. Um den maximal möglichen Therapieeffekt erreichen zu können, war die von den Nacktmäusen maximal verträgliche Chloroquindosis gewählt worden, so dass die Versuchsanordnung hohe Anforderungen an die Tiere stellte.

An den untersuchten koronaren Hirnschnitten ließ sich in der Kontroll-Gruppe in vier von zehn Fällen kein Nachweis für ein erfolgreiches Anwachsen der Tumorzellen erbringen. In der Therapiegruppe handelte es sich um lediglich zwei von zehn Mäusen. Diese Versuchstiere wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

In der Kontrollgruppe stellten wir eine durchschnittliche Tumorfläche von 7,027 mm² bei einem von Median 7,325 mm² fest. Die Standardabweichung betrug 4,872, der Standardfehler 1,989. Für die Therapiegruppe wurde eine durchschnittliche Tumorfläche von 1,219 mm² bei einem Median von 0,870 mm² gemessen. Die Standardabweichung betrug 1,303, der Standardfehler 0,4608. Zwischen der Kontrollgruppe sowie der Therapiegruppe ergab sich ein signifikanter Unterschied in der ausgewerteten Tumorfläche ($p = 0,0068$, s. Tabelle 5).

Tumorfläche [mm²] PBS-Gruppe	Tumorfläche [mm²] CIQ-Gruppe
2,24	0,64
0,95	0,99
5,7	4,38
8,95	0,62
11,57	0,79
12,75	0,95
	0,28
	1,1

Tabelle 3: Gegenüberstellung der Tumorflächen von Kontroll- und Therapiegruppe

	PBS	CIQ
Versuchstiere	n=6	n=8
Minimum	0,950	0,280
25% Perzentile	1,918	0,625
Median	7,325	0,870
75% Perzentile	11,870	1,073
Maximum	12,750	4,380
Mittelwert	7,027	1,219
Standardabweichung	4,872	1,303
Standardfehler	1,989	0,461
Konfidenzintervall:		
Untere 95% d. Mittelwerts	1,914	0,129
Obere 95% d. Mittelwerts	12,140	2,308

Tabelle 4: Auswertung der Tumorflächen von Kontrollgruppe und Therapiegruppe

t-Test (PBS vs. CIQ):	
p-Wert	0,0068
Mittelw. ± Standardabw. (PBS)	7,0270 ± 1,989 N=6
Mittelw. ± Standardabw. (CIQ)	1,219 ± 0,4608 N=8
95%-Konfidenzintervall	1,926 bis 9,690
Bestimmtheitsmaß	R ² =0,4697
F-Test	p=0,0032

Tabelle 5: t-Test der Tumorflächen der Kontrollgruppe gegenüber der Therapiegruppe

Einfaktorielle Varianzanalyse			
p-Wert	0,0068		
Gruppen	n=2		
F-Wert	10,83		
R²	0,4897		
Bartlett-Test			
Bartlett-Statistik	8,376		
p-Wert	0,0038		
Varianzanalyse	Summe der Quadrate	Freiheitsgrade	Mittelwert der Quadrate
Behandlung	115,7	1	115,7
Residuum	130,6	12	10,88
Gesamt	246,2	13	

Tabelle 6: Einfaktorielle Varianzanalyse der Tumorflächen

Außerdem wurden Auswertungen der mitotischen und apoptotischen Indices durchgeführt: Dabei erfolgte die Identifizierung mitotischer Zellen auf der Grundlage ihrer markanten Zellkernmorphologie, die die Kondensierung der Chromosomen widerspiegelt (s. Anhang, Abbildung 4a, Abbildung 7 und 8). Zur Berechnung des apoptotischen Index wurden Zellen mit fragmentierter DNS mittels der TUNEL-Färbung ermittelt (s. Anhang, Abbildung 4d und Abbildung 8).

Für die Kontrollgruppe ergab sich ein durchschnittlicher mitotischer Index von 13,28 (s. Tabelle 8). In der Therapiegruppe lag der durchschnittliche mitotische Index signifikant

niedriger bei 5,667 ($p=0,0012$; s. Tabelle 9). Daraus lässt sich ein ausgeprägter inhibitorischer Effekt der Chloroquin-Behandlung auf die Proliferation von Gliomzellen am *in vivo*-Modell ableiten.

In der Kontrollgruppe zeigte sich ein mittlerer apoptotischer Index von 1,830 (s. Tabelle 8) im Gegensatz zu einem signifikant höheren Index von 9,835 in der Therapiegruppe ($p=0,0052$; s. Tabelle 9).

Mitose-Index		Apoptose-Index	
PBS	CIQ	PBS	CIQ
11,30	9,00	2,25	5,88
9,80	10	1,56	7
15,00	3	1,06	15,86
14,40	2	2,8	10,6
14,30	7,5	1,48	
14,90	2,5		

Tabelle 7: Vergleich der Mitose-Indices bzw. der Apoptose-Indices

	Mitose-Index		Apoptose-Index	
	PBS	CIQ	PBS	CIQ
	n=6	n=6	n=5	n=4
Minimum	9,80	2,00	1,06	5,88
25% Perzentile	10,93	2,38	1,27	6,16
Median	14,35	5,25	1,56	8,80
75% Perzentile	14,93	9,25	2,53	14,55
Maximum	15,00	10,00	2,80	15,86
Mittelwert	13,280	5,667	1,830	9,835
Standardabweichung	2,19	3,57	0,69	4,49
Standardfehler	0,89	1,46	0,31	2,25
Konfidenzintervall:				
Untere 95% des Mittelwerts	10,99	1,92	0,97	2,69
Obere 95% des Mittelwerts	15,58	9,42	2,69	16,98

Tabelle 8: Auswertung der Mitose-Indices bzw. Apoptose-Indices

t-Test (PBS vs. CIQ):	Mitose-Index	Apoptose-Index
p-Wert	0,0012	0,0052
Mittelw. ± Standardabw. (PBS)	13.28 ± 0.8927 n=6	1.830 ± 0.3087 n=5
Mittelw. ± Standardabw. (CIQ)	5.667 ± 1.459 n=6	9.835 ± 2.247 n=4
95%-Konfidenzintervall	3.806 bis 11.43	-12.74 bis -3.266
Bestimmtheitsmaß	0,66	0,7
F-Test	0,3	0

Tabelle 9: t-Test der Mitose-Indices bzw. Apoptose-Indices

Die tägliche Behandlung der orthotop implantierten Tumoren der U87MG-Glioblastomzelllinie mit jeweils 5 µl Chloroquin in einer Konzentration von 30 mM an 16 von 17 Versuchstagen bewirkte histopathologisch ein signifikant vermindertes Wachstum gegenüber der Kontrollgruppe (s. Tabelle 5). Ebenso konnte ein signifikant geringerer mitotischer bzw. signifikant erhöhter apoptotischer Index bei der mit Chloroquin behandelten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe verzeichnet werden (s. Abbildung 6).

5 Diskussion

Bisherige Studien unterstrichen wiederholt den unterstützenden Effekt einer Chloroquinbehandlung in Kombination mit der konventionellen Therapie an Glioblastompatienten (Briceño et al., 2003, Sotelo et al., 2006, Briceño et al., 2007) ohne jedoch die molekularen Grundlagen der Therapie weiter auszuloten. In dieser Arbeit konnte erstmalig die anhaltende Aktivierung der Chloroquin-induzierten apoptotischen Antwort in Glioblastomzellen mit wt-p53 belegt werden. Das Ergebnis der *in vivo*-Versuche greift die Schlussfolgerungen aus den *in vitro*-Versuchen auf: *In vitro* hatte sich eine dosisabhängige Wachstumshemmung durch Chloroquin an U87MG-Glioblastomzellen gezeigt.

5.1 p53-abhängige Chloroquinwirkung

In der Zellkultur ließ sich eine deutliche Steigerung der Chloroquinwirkung in Abhängigkeit von der p53-Funktionalität nachweisen. Die Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung der p53-vermittelten apoptotischen Signalkaskade. Im orthotopen *in vivo*-Modell an immundefizitären Nacktmäusen konnte unter Chloroquinbehandlung eine signifikante ($P < 0,01$) Wachstumshemmung der Tumoren durch apoptotischen Zelltod bestätigt werden. Außerdem fiel im *in vitro*-Modell eine p53-unabhängige Wirkung des Chloroquins auf, die in geringerem Maße auch bei p53-defizitären Zelllinien die Proliferation hemmte. Es ist davon auszugehen, dass die p53-Signalkaskade in der Induktion der Chloroquin-vermittelten Apoptose eine erhebliche Rolle spielt, da nach Inhibierung der p53-Expression auch die Zellantwort auf die Chloroquinbehandlung heruntergesetzt war. Die Tumorsuppressorfunktion von p53 unterliegt seiner Fähigkeit das Genom integer zu halten oder im gegenteiligen Fall den Zelltod herbeizuführen. Das Gleichgewicht dieser beiden gegenläufigen Funktionen ergibt sich aus dem zellulären Zusammenhang bzw. dem Ausmaß der DNS-Schädigung und der Art der Aktivierung der Signalkaskaden. In Glioblastom-Stammzellen konnte beispielsweise eine gesteigerte Strahlenresistenz durch die ausgeprägte Bereitschaft einerseits zur DNS-Reparatur und andererseits zur Aktivierung der durch die Schädigung vermittelten Signalkaskaden dokumentiert werden (Bao et al., 2006). Dem Punkt, an dem die apoptotische Funktion von p53 zu überwiegen beginnt, kommt somit große Bedeutung zu und könnte durch DNS-schädigende Wirkstoffe schwer zu erreichen sein. Es gibt Hinweise darauf, dass p53 in Glioblastomzellen sogar zur Erhaltung des Genoms beitragen kann (Xu et al., 2001; Xu et al., 2005a; Xu et al., 2005b; Batista et al., 2007). Die

Aktivierung von p53 durch Chloroquin wiederum konnte in verschiedenen Experimenten an unterschiedlichen Zelltypen mit einer Aktivierung durch ATM-Kinasen am ehesten im Rahmen einer DNS-Schädigung in Verbindung gebracht werden (Bakkenist und Kastan, 2003; Loehberg *et al.*, 2007). Andererseits wurde auch über eine ATM-unabhängige p53-Aktivierung durch Chloroquin berichtet (Macleane *et al.*, 2008). Die vorliegende Arbeit unterstützt die Aussage der letztgenannten Studie einer ATM-unabhängigen p53-Aktivierung. Außerdem ist Chloroquin als Wirkstoff bekannt, dessen intrazelluläre Wechselwirkung eine DNS-Interkalation ohne DNS-Schädigung einschließt (Mitscher, 2005). Die Bindung von p53 an DNS unterliegt sehr variablen Wechselwirkungen, v.a. auch Veränderungen der DNS-Topologie. Eine Aktivierung bzw. Verstärkung der p53-Transkription durch die interkalierenden Eigenschaften von Chloroquin erscheint somit durchaus vorstellbar (Cheng *et al.*, 2006, Kim und Deppert, 2006).

5.2 p53-unabhängige Chloroquinwirkung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Chloroquin anhand eines Glioblastom-Modells mit U87MG-Zellen mit intakter p53-Signalkaskade dargestellt. Möglicherweise unterdrückt Chloroquin aber auch unabhängig vom zellulären p53-Status das Wachstum der Glioblastomzellen. Dieser p53-unabhängige Effekt von Chloroquin wird auf dessen lysosomotrope Eigenschaften mit Hemmung der Autophagozytose und daraus resultierender mitochondrialer Dysfunktion zurückgeführt (Boya *et al.*, 2003, Boya *et al.*, 2005). Unterstützend kann eine frühzeitige Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials in Glioblastomzellen mit defekter p53-Funktion gezeigt werden (Kim *et al.*, 2010) und befürwortet damit eine Beteiligung des beschriebenen Mechanismus. Um eine Apoptose zu induzieren wird zusätzlich zum Chloroquin das Protein Bax benötigt, das ein Produkt der p53-Transkriptionszielgene ist (Boya *et al.*, 2003, Boya *et al.*, 2005). Eine synergistische Verknüpfung der p53-abhängigen und p53-unabhängigen Wirkprinzipien des Chloroquins erscheint durchaus vorstellbar (Boya *et al.*, 2003). Es würde sowohl die bereits beschriebene Induktion des Zelltodes durch Chloroquin untermauern (Boya *et al.*, 2003; Boya *et al.*, 2005; Amaravadi *et al.*, 2007; Maclean *et al.*, 2008) als auch eine Erklärung für das bessere Ansprechen von Glioblastomzelllinien mit wt-p53, im Gegensatz zu Zelllinien mit mutiertem p53, liefern.

Obwohl die Ergebnisse dieser Studie darauf hindeuten, dass maligne Gliomzellen mit mutiertem p53 nur bedingt auf eine alleinige Behandlung mit Chloroquin ansprechen, könnte

Chloroquin sehr wohl einen Stellenwert in der adjuvanten Therapie erlangen. In diesem Zusammenhang erscheint die Fähigkeit des Chloroquins, unterschiedliche Arten der DNS-Reparatur zu inhibieren, bedeutsam (Cohen und Yielding, 1965; Michael und Williams, 1974; Yielding *et al.*, 1970). Die Aktivierung von DNS-Reparaturmechanismen durch zytotoxische Therapieregime ist einer der Hauptgründe für das Auftreten von Tumorrezidiven (Bao *et al.*, 2006). Somit ergibt sich hieraus ein Ansatzpunkt zum Einsatz von Chloroquin in Kombination mit etablierten DNS-schädigenden Therapien wie z.B. ionisierender Strahlung oder TMZ bzw. BCNU.

5.3 Neue Einblicke in die Wirkungsweise von Chloroquin am orthotopen Tiermodell

Die Bedeutung des Tiermodells liegt zum einen darin, dass sich die *in vitro* erbrachten Ergebnisse auf den lebenden Organismus im dreidimensionalen Modell übertragen ließen. Das Chloroquin erwies sich in den angewandten Konzentrationen als gut verträglich, so dass vor dem Hintergrund der langjährigen klinischen Erfahrung mit diesem Medikament zügig weitere Studien, insbesondere Therapiestudien, geplant werden können. Sollten sich sowohl die gute Wirksamkeit von Chloroquin in Kombination mit der konventionellen Therapie des Glioblastoms bestätigen (Briceño *et al.*, 2003, Sotelo *et al.*, 2006, Briceño *et al.*, 2007) als auch zusammen mit anderen neuen Wirkprinzipien die Therapiemöglichkeiten weiter entwickeln, stünde mit Chloroquin ein erprobtes und kostengünstiges Medikament zur Verfügung.

Nachdem diese Arbeit die Erkenntnisse bezüglich des bekannten klinischen Effektes von Chloroquin an Glioblastomen mit den intrazellulären Mechanismen des aktuell vermehrt im Fokus stehenden Tumorsuppressorgens TP53 (s. 1.4.3.2 Das Tumorsuppressorgen TP53 als molekulare Zielstruktur experimenteller Therapiestrategien für das Glioblastoma multiforme) in Beziehung setzen konnte, ergeben sich daraus auch für andere neoplastische Zelllinien neue Anwendungsmöglichkeiten am Tiermodell. Dies kann vor dem Hintergrund der medikamentösen Wirkung von Chloroquin oder der weiterführenden Erforschung der Stoffwechselwege des p53 geschehen.

Des Weiteren bietet die orthotope Versuchsanordnung innerhalb der *in vivo*-Modelle die bestmögliche Voraussage bezüglich der klinischen Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den menschlichen Organismus (s. 1.5.2.3 Experimentelle Gliome im orthotopen Mausmodell). Das hier benutzte Modell (Brockmann *et al.*, 2003) erlaubt eine sichere und lokal de-

finierte Applikation der gewünschten Therapieform in der höchstmöglichen tolerierten Dosis, da allgemeine (z.B. first-pass-effect, systemische Toxizität) und spezielle (z.B. Blut-Hirn-Schranke) Probleme der systemischen Anwendung nicht zum Tragen kommen. Einschränkung muss aber angemerkt werden, dass im Vergleich zur keimarmen Umgebung des Tierstalls die Anwendung am Menschen eine erhöhte Infektionsgefahr befürchten lässt. Eine vielversprechende Möglichkeit bieten hier osmotische Pumpensysteme im Sinne einer Convection enhanced delivery (s. 1.3.3 Chemotherapie; Schauff *et al.*, 2008), die in absehbarer Zeit auch am Menschen mit vertretbarem Risiko zu Anwendung kommen könnten.

6 Zusammenfassung

Das Glioblastoma multiforme (WHO-Grad IV) ist mit einer Inzidenz von 15-20% aller intrakraniellen und 69% aller astrozytären und oligodendroglialen Tumoren das am häufigsten auftretende Malignom von Gehirn und Meningen. Es hat eine infauste Prognose mit einer 5-Jahresüberlebensrate von weniger als 3%. Anhand charakteristischer genetischer Läsionen und dem zeitlichen Auftreten des Tumors wird zwischen primären und sekundären Glioblastomen unterschieden. Primäre Glioblastome treten vorzugsweise im höheren Lebensalter auf, bilden mit über 90% die größere Gruppe und weisen in etwa drei Viertel der Fälle eine intakte Funktion des Tumorsuppressorgens TP53 auf. Das Tumorsuppressorgen TP53 ist im intrazellulären Stoffwechsel an dem Gleichgewicht zwischen zellerhaltenden und apoptotischen Funktionen maßgeblich beteiligt. Diese apoptotische Potenz steht in der aktuellen Forschung als antineoplastisches Wirkungsprinzip zunehmend im Vordergrund. Chloroquin ist ein Wirkstoff mit langjähriger Erfahrung im klinischen Gebrauch, der zunehmend mit antineoplastischen Wirkungsmechanismen in Verbindung gebracht wird. Empirische klinische Daten über die Wirksamkeit des Chloroquins als ergänzendes Medikament bei konventioneller Glioblastomtherapie liegen bisher ohne molekulargenetischen Hintergrund vor.

An *in vitro*-Zellkulturen wurden die Auswirkungen unterschiedlicher Chloroquindosen bei intakter und beeinträchtigter p53-Funktion gemessen. Zusätzlich wurde die Art der Interaktion von Chloroquin und p53 näher betrachtet. Eine Validierung der *in vitro*-Ergebnisse sollte am orthotopen Tiermodell erfolgen.

Es zeigten sich zwei Formen einer signifikanten, von der Chloroquindosis abhängigen, Hemmung des Zellwachstums: Eine Form ist von der Unversehrtheit des p53 unabhängig und funktioniert am ehesten über einen lysosomotropen Mechanismus. Die andere Form deutet auf einen zusätzlichen synergistischen Effekt von Chloroquin und intaktem p53 über eine Aktivierung der apoptotischen Signalkaskade ohne Schädigung der DNS als auslösendem Mechanismus hin. Die Gesamtheit beider Wirkungsformen ließ sich mittels täglicher intratumoraler Verabreichungen über ein stereotaktisches Hohlschraubensystem erfolgreich auf den lebenden Organismus übertragen.

Mit Chloroquin steht ein erprobter, kostengünstiger und gut verträglicher Wirkstoff gegen Glioblastome und hier insbesondere gegen die Mehrzahl dieser Tumore mit intaktem p53 zeitnah für klinische Studien zur Verfügung.

7 Quellenverzeichnis

Aghi M, Chiocca EA (2003). "Genetically engineered herpes simplex viral vectors in the treatment of brain tumors: a review." *Cancer Invest* 21(2): 278-92.

Amaravadi RK, Yu D, Lum JJ, Bui T, Christophorou MA, Evan GI, Thomas-Tikhonenko A, Thompson CB (2007). „Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma“. *J Clin Invest*. 2007 Feb;117(2):326-36. Epub 2007 Jan 18

Andrews DW, Resnicoff M, Flanders AE, Kenyon L, Curtis M, Merli G, Baserga R, Iliakis G, Aiken RD (2001). "Results of a pilot study involving the use of an antisense oligodeoxynucleotide directed against the insulin-like growth factor type I receptor in malignant astrocytomas." *J Clin Oncol* 19(8): 2189-200.

Bakkenist CJ, Kastan MB (2003). „DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation“. *Nature*. 2003 Jan 30;421(6922):499-506

Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN. (2006). „Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response“. *Nature*. 2006 Dec 7;444(7120):756-60. Epub 2006 Oct 18

Barnard RO, Geddes JF (1987). "The incidence of multifocal cerebral gliomas. A histologic study of large hemisphere sections." *Cancer* 60(7): 1519-31.

Batchelor T, Shih HA, Carter BS (2007a), UpToDate: Management of malignant gliomas

Batchelor T, Supko JG (2007), UpToDate: Experimental treatment approaches for malignant gliomas

Batchelor TT, Sorensen AG, di Tomaso E, Zhang WT, Duda DG, Cohen KS, Kozak KR, Cahill DP, Chen PJ, Zhu M, Ancukiewicz M, Mrugala MM, Plotkin S, Drappatz J, Louis DN, Ivy P, Scadden DT, Benner T, Loeffler JS, Wen PY, Jain RK (2007b). „AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients“. *Cancer Cell* (2007); 11:83

Batista LF, Roos WP, Christmann M, Menck CF, Kaina B (2007). „Differential sensitivity of malignant glioma cells to methylating and chloroethylating anticancer drugs: p53 determines the switch by regulating xpc, ddb2, and DNA double-strand breaks“. *Cancer Res*. 2007 Dec 15;67(24):11886-95

- Boral AL, Dessain S, Chabner BA (1998). "Clinical evaluation of biologically targeted drugs: obstacles and opportunities." *Cancer Chemother Pharmacol* 42 Suppl: S3-21
- Bossi G, Sacchi A (2007). Restoration of wild-type p53 function in human cancer: relevance for tumor therapy. *Head Neck*. 2007 Mar;29(3):272-84
- Boya P, Gonzalez-Polo RA, Poncet D, Andreau K, Vieira HL, Roumier T, Perfettini JL, Kroemer G (2003). „Mitochondrial membrane permeabilization is a critical step of lysosome-initiated apoptosis induced by hydroxychloroquine“. *Oncogene*. 2003 Jun 19;22(25):3927-36
- Boya P, González-Polo RA, Casares N, Perfettini JL, Dessen P, Larochette N, Métivier D, Meley D, Souquere S, Yoshimori T, Pierron G, Codogno P, Kroemer G (2005). „Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis“. *Mol Cell Biol*. 2005 Feb;25(3):1025-40
- Bredel M, Pollack IF (1999). "The p21-Ras signal transduction pathway and growth regulation in human high-grade gliomas." *Brain Res Brain Res Rev* 29(2-3): 232-49.
- Briceño E, Reyes S, Sotelo J (2003). "Therapy of glioblastoma multiforme improved by the antimutagenic chloroquine." *Neurosurg Focus* 14(2): e3.
- Briceño E., Calderon A, Sotelo J (2007). "Institutional experience with chloroquine as an adjuvant to the therapy for glioblastoma multiforme." *Surg Neurol* 67(4): 388-91.
- Brockmann MA, Westphal M, Lamszus K (2003). "Improved method for the intracerebral engraftment of tumour cells and intratumoural treatment using a guide screw system in mice." *Acta Neurochir (Wien)* 145(9): 777-81; discussion 781.
- Buckner JC, Schomberg PJ, McGinnis WL, Cascino TL, Scheithauer BW, O'Fallon JR, Morton RF, Kuross SA, Mailliard JA, Hatfield AK, Cole JT, Steen PD, Bernath AM (2001). "A phase III study of radiation therapy plus carmustine with or without recombinant interferon-alpha in the treatment of patients with newly diagnosed high-grade glioma." *Cancer* 92(2): 420-33.
- Burger PC, Dubois PJ, Schold SC Jr, Smith KR Jr, Odom GL, Crafts DC, Giangaspero F (1983). "Computerized tomographic and pathologic studies of the untreated, quiescent, and recurrent glioblastoma multiforme." *J Neurosurg* 58(2): 159-69.
- Cerrato JA, Khan T, Koul D, Lang FF, Conrad CA, Yung WK, Liu TJ (2004). Differential activation of the Fas/CD95 pathway by Ad-p53 in human gliomas. *Int J Oncol*. 2004 Feb;24(2):409-17
- Chang CH, Horton J, Schoenfeld D, Salazer O, Perez-Tamayo R, Kramer S, Weinstein A, Nelson JS, Tsukada Y (1983). "Comparison of postoperative radiotherapy and combined

postoperative radiotherapy and chemotherapy in the multidisciplinary management of malignant gliomas. A joint Radiation Therapy Oncology Group and Eastern Cooperative Oncology Group study." *Cancer* 52(6): 997-1007.

Chang SM, Parney IF, Huang W, Anderson FA Jr, Asher AL, Bernstein M, Lillehei KO, Brem H, Berger MS, Laws ER, Glioma Outcomes Project Investigators (2005). "Patterns of care for adults with newly diagnosed malignant glioma." *Jama* 293(5): 557-64.

Cheng J, Zeidan R, Mishra S, Liu A, Pun SH, Kulkarni RP, Jensen GS, Bellocq NC, Davis ME (2006). „Structure-function correlation of chloroquine and analogues as transgene expression enhancers in nonviral gene delivery“. *J Med Chem.* 2006 Nov 2;49(22):6522-31

Chiocca EA., Aghi M, Fulci G (2003). "Viral therapy for glioblastoma." *Cancer J* 9(3): 167-79.

Cohen SN, Yielding KL (1965). „Inhibition of DNA and RNA polymerase reactions by chloroquine“. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1965 Aug;54(2):521-7

D'Avenia P, Porrello A, Berardo M, Angelo MD, Soddu S, Arcangeli G, Sacchi A, D'Orazi G (2006). „Tp53-gene transfer induces hypersensitivity to low doses of X-rays in glioblastoma cells: a strategy to convert a radio-resistant phenotype into a radiosensitive one“. *Cancer Lett.* 2006 Jan 8;231(1):102-12

Eccles SA (2002), Models for evaluation of targeted therapies of metastatic disease, in Teicher BA, Tumor Models in Cancer Research, Humana Press, Totowa, 293-319

Fadul C, Wood J, Thaler H, Galicich J, Patterson RH Jr, Posner JB (1988). "Morbidity and mortality of craniotomy for excision of supratentorial gliomas." *Neurology* 38(9): 1374-9.

Fan C, Wang W, Zhao B, Zhang S, Miao J (2006). „Chloroquine inhibits cell growth and induces cell death in A549 lung cancer cells“. *Bioorg Med Chem.* 2006 May 1;14(9):3218-22. Epub 2006 Jan 18

Fine HA, Kim L, Royce C (2005): Results from phase II trial of Enzastaurin (LY317615) in patients with recurrent high grade gliomas. *J Clin Oncol*; 23:115S.

Fomchenko EI, Holland EC (2006). „Mouse models of brain tumors and their applications in preclinical trials“. *Clin Cancer Res.* 2006 Sep 15;12(18):5288-97

Friedlander P, Haupt Y, Prives C, Oren M (1996). "A mutant p53 that discriminates between p53-responsive genes cannot induce apoptosis." *Mol Cell Biol* 16(9): 4961-71.

Fujiwara T, Kataoka M, Tanaka N (2000). „Adenovirus-mediated p53 gene therapy for human cancer“. *Mol Urol.* 2000 Summer;4(2):51-4

- Gaspar LE, Fisher BJ, Macdonald DR, LeBer DV, Halperin EC, Schold SC Jr, Cairncross JG (1992). "Supratentorial malignant glioma: patterns of recurrence and implications for external beam local treatment." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 24(1): 55-7.
- Geser A, Brubaker G, Draper CC (1989). "Effect of a malaria suppression program on the incidence of African Burkitt's lymphoma." *Am J Epidemiol* 129(4): 740-52.
- Giese A, Laube B, Zapf S, Mangold U, Westphal M (1998). "Glioma cell adhesion and migration on human brain sections." *Anticancer Res* 18(4A): 2435-47.
- Giese A (2003). "Glioma invasion--pattern of dissemination by mechanisms of invasion and surgical intervention, pattern of gene expression and its regulatory control by tumor-suppressor p53 and proto-oncogene ETS-1." *Acta Neurochir Suppl* 88: 153-62.
- Giese A, Bjerkvig R, Berens ME, Westphal M (2003). "Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment." *J Clin Oncol* 21(8): 1624-36.
- Gilbert MR (2006). "New treatments for malignant gliomas: careful evaluation and cautious optimism required." *Ann Intern Med* 144(5): 371-3.
- Gross MW, Kraus A, Nashwan K, Mennel HD, Engenhart-Cabillic R, Schlegel J (2005). „Expression of p53 and p21 in primary glioblastomas“. *Strahlenther Onkol.* 2005 Mar;181(3):164-71
- Gudkov AV, Komarova EA (2007). „Dangerous habits of a security guard: the two faces of p53 as a drug target“. *Hum Mol Genet.* 2007 Apr 15;16 Spec No 1:R67-72
- Gurova KV, Hill JE, Guo C, Prokvolit A, Burdelya LG, Samoylova E, Khodyakova AV, Ganapathi R, Ganapathi M, Tararova ND, Bosykh D, Lvovskiy D, Webb TR, Stark GR, Gudkov AV (2005). „Small molecules that reactivate p53 in renal cell carcinoma reveal a NF-kappaB-dependent mechanism of p53 suppression in tumor“. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Nov 29;102(48):17448-53. Epub 2005 Nov 15
- Haas-Kogan DA, Prados MD, Tihan T, Eberhard DA, Jelluma N, Arvold ND, Baumber R, Lamborn KR, Kapadia A, Malec M, Berger MS, Stokoe D (2005). "Epidermal growth factor receptor, protein kinase B/Akt, and glioma response to erlotinib." *J Natl Cancer Inst* 97(12): 880-7.
- Holland EC (2001), Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models, *Nature Reviews Genetics*, 2:1-10
- Horn HF, Vousden KH (2007). Coping with stress: multiple ways to activate p53. *Oncogene.* 2007 Feb 26;26(9):1306-16

<http://de.wikipedia.org> nach Karnofsky und Burchenal, 1949 (Tag des Zugriffs 14.10.2008)

Huang Q, Pu P, Xia Z, You Y (2007). „Exogenous wt-p53 enhances the antitumor effect of HSV-TK/GCV on C6 glioma cells“. J Neurooncol. 2007 May;82(3):239-48. Epub 2006 Nov 11

Jänicke RU, Sohn D, Schulze-Osthoff K (2008). The dark side of a tumor suppressor: anti-apoptotic p53. Cell Death Differ. 2008 Jun;15(6):959-76. Epub 2008 Mar 21

Karnofsky DA, Burchenal JH. The Clinical Evaluation of Chemotherapeutic Agents in Cancer. In: MacLeod CM (Ed), Evaluation of Chemotherapeutic Agents. Columbia Univ Press, 1949:196

Kelland LR, Jones M, Abel G, Valenti M, Gwynne J, Harrap KR (1992), Human ovarian carcinoma cell lines and companion xenografts: a disease oriented approach to new platinum anticancer drug development, Cancer Chemotherapy Pharmacology, 30, 43-50

Kelland LR (2004), „Of mice and men“: values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development, European Journal of Cancer 40 (2004) 827-836

Kim EL, Yoshizato K, Kluwe L, Meissner H, Warnecke G, Zapf S, Westphal M, Deppert W, Giese A (2005). „Comparative assessment of the functional p53 status in glioma cells“. Anticancer Res. 2005 Jan-Feb;25(1A):213-24

Kim EL, Deppert W (2006). „The versatile interactions of p53 with DNA: when flexibility serves specificity“. Cell Death Differ. 2006 Jun;13(6):885-9

Kim EL, Wuestenberg R, Christoph Schmitz-Salue, Anne Rübsam, Gabriele Warnecke, Eva-Maria Bückner, Nadine Pettkus, Daniel Speidel, Veit Rohde, Walter Schulz-Schaeffer, Wolfgang Deppert, Alf Giese (2010). „Chloroquine activates the p53 pathway and induces apoptosis in human glioma cells“. Neuro-Oncology. Epub 2010 Jan 27 (Drucklegung folgt)

Kleihues P, Burger PC, Collins VP, Newcomb EW, Ohgaki H, Cavenee WK (2000). „Glioblastoma. In: Pathology and genetics of tumors of the nervous system“. Kleihues P, Cavenee WK, (Eds), pp 29-39, IARC Press, Lyon, 2000

Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK (2002). „The WHO classification of tumors of the nervous system“. J Neuropathol Exp Neurol. 2002 Mar;61(3):215-25; discussion 226-9

Koshland DE (1993). „Molecule of the year“. Science 1993;262 (5142):1953

Lacroix M, Abi-Said D, Fournay DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, Lang FF, McCutcheon IE, Hassenbusch SJ, Holland E, Hess K, Michael C, Miller D, Sawaya R (2001). "A

multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival." J Neurosurg 95(2): 190-8.

Lal S, Lacroix M, Tofilon P, Fuller GN, Sawaya R, Lang FF (2000). "An implantable guide-screw system for brain tumor studies in small animals." J Neurosurg 92(2): 326-33.

Lamborn KR, Chang SM, Prados MD (2004). "Prognostic factors for survival of patients with glioblastoma: recursive partitioning analysis." Neuro Oncol 6(3): 227-35.

Lane DP (1992). „Cancer. p53, guardian of the genome“ Nature. 1992 Jul 2;358(6381):15-6.

Lang FF, Bruner JM, Fuller GN, Aldape K, Prados MD, Chang S, Berger MS, McDermott MW, Kunwar SM, Junck LR, Chandler W, Zwiebel JA, Kaplan RS, Yung WK (2003). Phase I trial of adenovirus-mediated p53 gene therapy for recurrent glioma: biological and clinical results. J Clin Oncol. 2003 Jul 1;21(13):2508-18

Lefranc F, Kiss R (2006). „Autophagy, the Trojan horse to combat glioblastomas“. Neurosurg Focus. 2006 Apr 15;20(4):E7

Levin VA, Phuphanich S, Yung WK, Forsyth PA, Maestro RD, Perry JR, Fuller GN, Baillet M (2006). "Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of marimastat in glioblastoma multiforme patients following surgery and irradiation." J Neurooncol 78(3): 295-302.

Lidar Z, Mardor Y, Jones T, Pfeffer R, Faibel M, Nass D, Hadani M, Ram Z (2004). "Convection-enhanced delivery of paclitaxel for the treatment of recurrent malignant glioma: a phase I/II clinical study." J Neurosurg 100(3): 472-9.

Loehberg CR, Thompson T, Kastan MB, Maclean KH, Edwards DG, Kittrell FS, Medina D, Conneely OM, O'Malley BW (2007). "Ataxia telangiectasia-mutated and p53 are potential mediators of chloroquine-induced resistance to mammary carcinogenesis." Cancer Res 67(24): 12026-33.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P (2007). „The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system“. Acta Neuropathol. 2007 Aug;114(2):97-109. Epub 2007 Jul 6

Maclean KH., Dorsey FC, Cleveland JL, Kastan MB (2008a). "Targeting lysosomal degradation induces p53-dependent cell death and prevents cancer in mouse models of lymphomagenesis." J Clin Invest 118(1): 79-88.

Maclean KH, Dorsey FC, Cleveland JL, Kastan MB (2008b). "Erratum." J Clin Invest 118(4): 1584. [This corrects the article on p. 79 in vol. 118, PMID: 18097482.]

- Mangieri D, Nico B, Coluccia AM, Vacca A, Ponzoni M, Ribatti D (2009). „An alternative *in vivo* system for testing angiogenic potential of human neuroblastoma cells“ *Cancer Lett.* 2009 May 18;277(2):199-204. Epub 2009 Jan 17
- McCarty MF (1997). "Thalidomide may impede cell migration in primates by down-regulating integrin beta-chains: potential therapeutic utility in solid malignancies, proliferative retinopathy, inflammatory disorders, neointimal hyperplasia, and osteoporosis." *Med Hypotheses* 49(2): 123-31
- Mellinghoff IK, Wang MY, Vivanco I, Haas-Kogan DA, Zhu S, Dia EQ, Lu KV, Yoshimoto K, Huang JH, Chute DJ, Riggs BL, Horvath S, Liao LM, Caveness WK, Rao PN, Beroukhi R, Peck TC, Lee JC, Sellers WR, Stokoe D, Prados M, Cloughesy TF, Sawyers CL, Mischel PS (2005). "Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGF-R kinase inhibitors". *N Engl J Med* 353(19): 2012-24
- Michael RO, Williams GM (1974). "Chloroquine inhibition of repair of DNA damage induced in mammalian cells by methyl methanesulfonate". *Mutat Res.* 1974 Dec;25(3):391-6
- Mitscher LA (2005). „Bacterial topoisomerase inhibitors: quinolone and pyridone antibacterial agents“. *Chem Rev.* 2005 Feb;105(2):559-92
- Moll UM, Zaika A (2001). "Nuclear and mitochondrial apoptotic pathways of p53." *FEBS Lett* 493(2-3): 65-9
- Nakamizo A, Amano T, Zhang W, Zhang XQ, Ramdas L, Liu TJ, Bekele BN, Shono T, Sasaki T, Benedict WF, Sawaya R, Lang FF (2008). Phosphorylation of Thr18 and Ser20 of p53 in Ad-p53-induced apoptosis. *Neuro Oncol.* 2008 Jun;10(3):275-91. Epub 2008 Apr 28
- Naumann U, Kügler S, Wolburg H, Wick W, Rascher G, Schulz JB, Conseiller E, Bähr M, Weller M. (2001). Chimeric tumor suppressor 1, a p53-derived chimeric tumor suppressor gene, kills p53 mutant and p53 wild-type glioma cells in synergy with irradiation and CD95 ligand. *Cancer Res.* 2001 Aug 1;61(15):5833-42
- Nelson DF., Diener-West M, Horton J, Chang CH, Schoenfeld D, Nelson JS (1988). "Combined modality approach to treatment of malignant gliomas--re-evaluation of RTOG 7401/ECOG 1374 with long-term follow-up: a joint study of the Radiation Therapy Oncology Group and the Eastern Cooperative Oncology Group." *NCI Monogr*(6): 279-84

- Ohgaki H, Reifenberger G, Nomura K, Kleihues P (2001) Prognostic factors in gliomas. In: Gospodarowicz MK, Henson DE, Hutter RVP, O'Sullivan B, Sobin LH, Wittekind C (eds) UICC: Prognostic factors in cancer, 2nd edn. Wiley, New York, pp 725-743
- Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, Burkhard C, Maiorka P, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, Yasargil MG, Lufolf U, Kleihues P (2004) Pathways to glioblastoma: a population based study on incidence, survival rates, and genetic alterations. *Cancer Res* 64:6892-6899
- Ohgaki, H, Kleihues P (2005). "Epidemiology and etiology of gliomas." *Acta Neuropathol* 109(1): 93-108
- Ohgaki H, Kleihues P (2007). Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol.* 2007 May;170(5):1445-53
- Paul M, Gafter-Gvili A, Fraser A, Leibovici L (2007). The anti-cancer effects of quinolone antibiotics? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2007 Nov;26(11):825-31
- Plautz GE, Miller DW, Barnett GH, Stevens GH, Maffett S, Kim J, Cohen PA, Shu S (2000). "T cell adoptive immunotherapy of newly diagnosed gliomas." *Clin Cancer Res* 6(6): 2209-18
- Pope WB, Lai A, Nghiemphu P, Mischel P, Cloughesy TF (2006): MRI in patients with high-grade gliomas treated with bevacizumab and chemotherapy. *Neurology*; 66:1258
- Pritzkeleit R, Holzmann M, Raspe H, Katalinic A (2009). „Krebs in Schleswig-Holstein, Band 7 – Inzidenz und Mortalität im Jahr 2006“, <http://www.krebsregister-sh.de/berichte/kish2006.pdf> (13.07.2009)
- Rádl S (1996). From chloroquine to antineoplastic drugs? the story of antibacterial quinolones. *Arch Pharm (Weinheim).* 1996 Mar;329(3):115-9
- Ram Z, Culver KW, Walbridge S, Blaese RM, Oldfield EH (1993). "In situ retroviral-mediated gene transfer for the treatment of brain tumors in rats." *Cancer Res* 53(1): 83-8
- Reardon DA, Egorin MJ, Quinn JA, Rich JN, Gururangan S, Vredenburgh JJ, Desjardins A, Sathornsumetee S, Provenzale JM, Herndon JE 2nd, Dowell JM, Badruddoja MA, McLendon RE, Lagattuta TF, Kiczielinski KP, Dresemann G, Sampson JH, Friedman AH, Salvado AJ, Friedman HS (2005). "Phase II study of imatinib mesylate plus hydroxyurea in adults with recurrent glioblastoma multiforme." *J Clin Oncol* 23(36): 9359-68
- Reardon DA, Rich JN, Friedman HS, Bigner DD (2006). „Recent advances in the treatment of malignant astrocytoma“ *J Clin Oncol.* 2006 Mar 10;24(8):1253-65

Rowan S, Ludwig RL, Haupt Y, Bates S, Lu X, Oren M, Vousden KH. (1996). EMBO J., 15, 827-838

Savarino A, Lucia MB, Giordano F, Cauda R (2006). „Risks and benefits of chloroquine use in anticancer strategies“ Lancet Oncol. 2006 Oct;7(10):792-3

Schlegel U, Westphal M, Hrsg. (1998) Neuroonkologie: Diagnostischer und therapeutischer Leitfaden für Neurologen, Neurochirurgen, Onkologen und Radioonkologen, 1. Ausg. Thieme, New York: Kap: Diagnostik, Klinik und allgemeine Therapie (M. Westphal): Seiten 2-18, Kap. Molekularbiologie (A. von Deimling): Seiten 47-56, Kap. Primäre Tumoren des Gehirns und seiner Häute: Seiten 182-191

Schauff AK, Kim EL, Leppert J, Nadrowitz R, Wuestenberg R, Brockmann MA, Giese A (2008). "Inhibition of invasion-associated thromboxane synthase sensitizes experimental gliomas to gamma-radiation". J Neurooncol. 2008 Sep 30. [Epub ahead of print]. Gelesen: 23.10.2008

Shacka JJ, Klocke BJ, Shibata M, Uchiyama Y, Datta G, Schmidt RE, Roth KA (2006). Bafilomycin A1 inhibits chloroquine-induced death of cerebellar granule neurons. Mol Pharmacol. 2006 Apr;69(4):1125-36. Epub 2006 Jan 3

Shapiro WR (1986). "Therapy of adult malignant brain tumors: what have the clinical trials taught us?" Semin Oncol 13(1): 38-45

Shapiro WR, Green SB, Burger PC, Selker RG, VanGilder JC, Robertson JT, Mealey J Jr, Ransohff J, Mahaley MS Jr. (1992). "A randomized comparison of intra-arterial versus intravenous BCNU, with or without intravenous 5-fluorouracil, for newly diagnosed patients with malignant glioma." J Neurosurg 76(5): 772-81

Silbergeld DL, Rostomily RC, Alvord EC Jr (1991). "The cause of death in patients with glioblastoma is multifactorial: clinical factors and autopsy findings in 117 cases of supratentorial glioblastoma in adults." J Neurooncol 10(2): 179-85

Slee EA, O'Connor DJ, Lu X (2004). "To die or not to die: how does p53 decide?" Oncogene 23(16): 2809-18

Snyder RD, Arnone MR (2002). "Putative identification of functional interactions between DNA intercalating agents and topoisomerase II using the V79 *in vitro* micronucleus assay." Mutat Res 503(1-2): 21-35

Sotelo J, Briceno E, López-González MA (2006). "Adding chloroquine to conventional treatment for glioblastoma multiforme: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial." Ann Intern Med 144(5): 337-43

Steinbach JP, Weller M (2004). Apoptosis in gliomas: molecular mechanisms and therapeutic implications. *J Neurooncol.* 2004 Nov;70(2):245-54

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (2005). "Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma." *N Engl J Med* 352(10): 987-96

Taphoorn MJ, Stupp R, Coens C, Osoba D, Kortmann R, van den Bent MJ, Mason W, Mirimanoff RO, Baumert BG, Eisenhauer E, Forsyth P, Bottomley A; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumour Group; EORTC Radiotherapy Group; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (2005). "Health-related quality of life in patients with glioblastoma: a randomised controlled trial." *Lancet Oncol* 6(12): 937-44

UpToDate, 2008, Copyright 1978-2007 Lexi-Comp, Inc.

Valk PE, Dillon WP (1991). "Radiation injury of the brain." *AJNR Am J Neuroradiol* 12(1): 45-62.

Vecil GG, Lang FF (2003). Clinical trials of adenoviruses in brain tumors: a review of Ad-p53 and oncolytic adenoviruses. *J Neurooncol.* 2003 Dec;65(3):237-46

Vezmar M, Georges E (2000). „Reversal of MRP-mediated doxorubicin resistance with quinoline-based drugs“. *Biochem Pharmacol.* 2000 May 15;59(10):1245-52.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ (2000). "Surfing the p53 network." *Nature* 408(6810): 307-10.

Vousden KH, Lu X (2002). "Live or let die: the cell's response to p53." *Nat Rev Cancer* 2(8): 594-604

Vousden KH, Prives C (2005). P53 and prognosis: new insights and further complexity. *Cell.* 2005 Jan 14;120(1):7-10

Vousden KH (2006). „Outcomes of p53 activation--spoilt for choice“. *J Cell Sci.* 2006 Dec 15;119(Pt 24):5015-20

Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE 2nd, Marcello J, Reardon DA, Quinn JA, Rich JN, Sathornsumetee S, Gururangan S, Sampson J, Wagner M, Bailey L, Bigner DD, Friedman AH, Friedman HS (2007). Phase II Trial of Bevacizumab and Irinotecan in Recurrent Malignant Glioma. *Clin Cancer Res*; 13:1253

Westphal M, Hilt DC, Bortey E, Delavault P, Olivares R, Warnke PC, Whittle IR, Jääskeläinen J, Ram Z (2003). "A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma." *Neuro Oncol* 5(2): 79-88.

Xu GW, Nutt CL, Zlatescu MC, Keeney M, Chin-Yee I, Cairncross JG (2001). „Inactivation of p53 sensitizes U87MG glioma cells to 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea“. *Cancer Res.* 2001 May 15;61(10):4155-9

Xu GW, Mymryk JS, Cairncross JG (2005a). „Pharmaceutical-mediated inactivation of p53 sensitizes U87MG glioma cells to BCNU and temozolomide. *Int J Cancer.* 2005 Aug 20;116(2):187-92

Xu GW, Mymryk JS, Cairncross JG (2005b). „Inactivation of p53 sensitizes astrocytic glioma cells to BCNU and temozolomide, but not cisplatin“. *J Neurooncol.* 2005 Sep;74(2):141-9

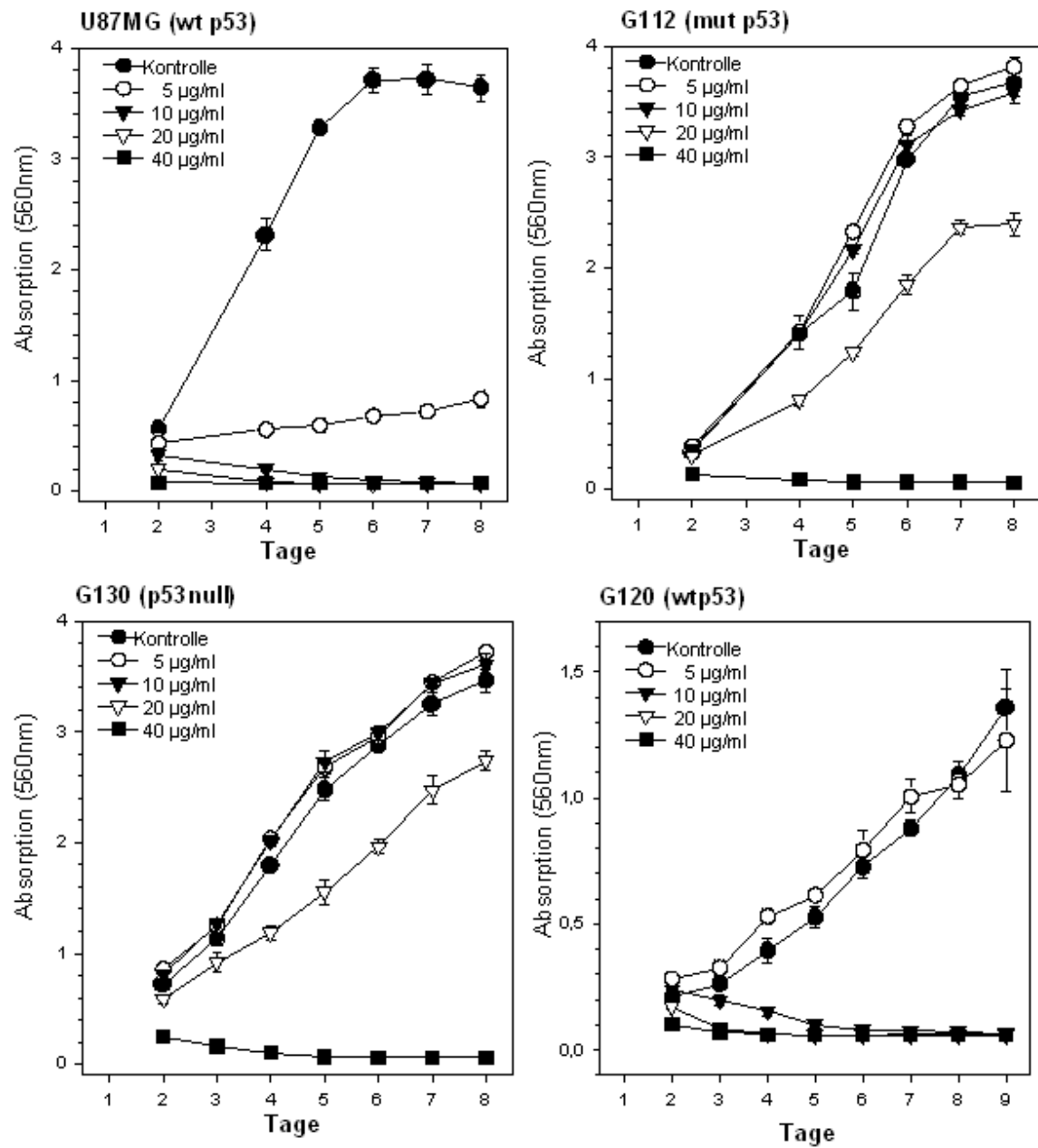
Yielding KL, Yielding L, Gaudin D (1970). „Inhibition by chloroquine of UV repair in *E. coli* B“. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1970 Mar;133(3):999-1001

Zaidi AU, McDonough JS, Klocke BJ, Latham CB, Korsmeyer SJ, Flavell RA, Schmidt RE, Roth KA (2001) „Chloroquine-induced neuronal cell death is p53 and Bcl-2 family-dependent but caspase-independent“. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2001 Oct;60(10):937-45

Zhao H, Cai Y, Santi S, Lafrenie R, Lee H (2005). „Chloroquine-mediated radiosensitization is due to the destabilization of the lysosomal membrane and subsequent induction of cell death by necrosis“ *Radiat Res.* 2005 Sep;164(3):250-7

Zhou Q, McCracken MA, Strobl JS (2002). "Control of mammary tumor cell growth *in vitro* by novel cell differentiation and apoptosis agents." *Breast Cancer Res Treat* 75(2): 107-17

8 Anhänge



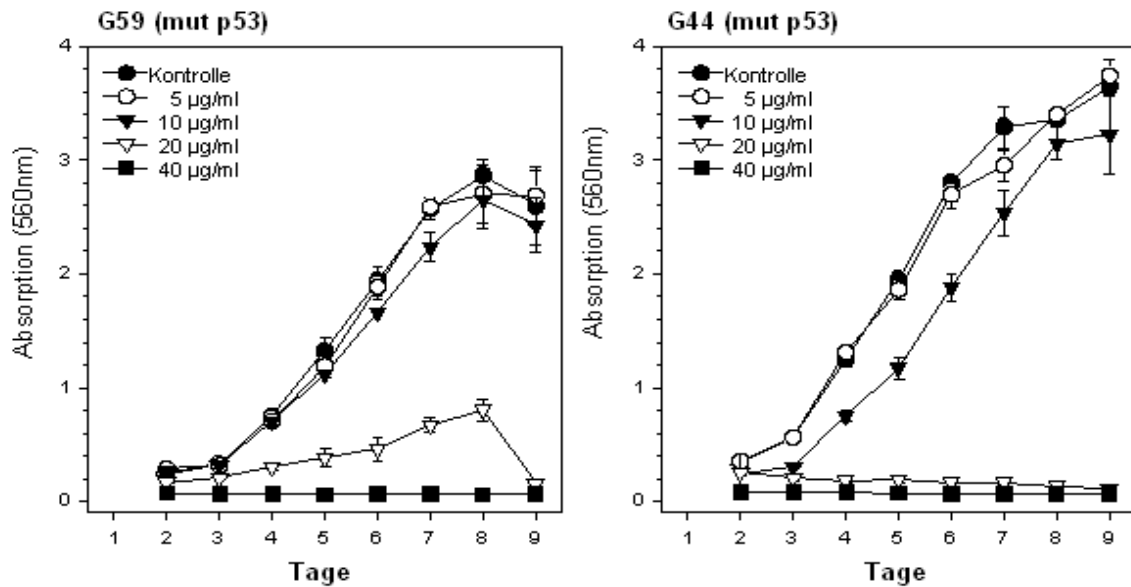


Abbildung 3a: Effekt von Chloroquin anhand von Wachstumsraten von Gliomzelllinien mit bekanntem p53-Status

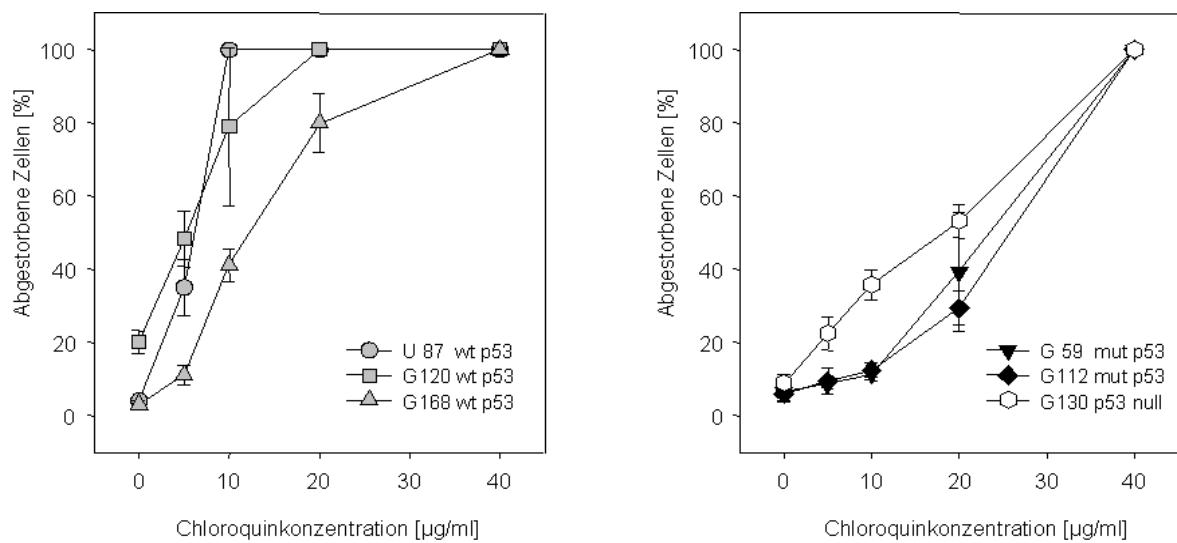


Abbildung 3b: Effekt von Chloroquin anhand der Zellvitalität von Gliomzelllinien mit wt-p53, mutiertem bzw. ohne p53

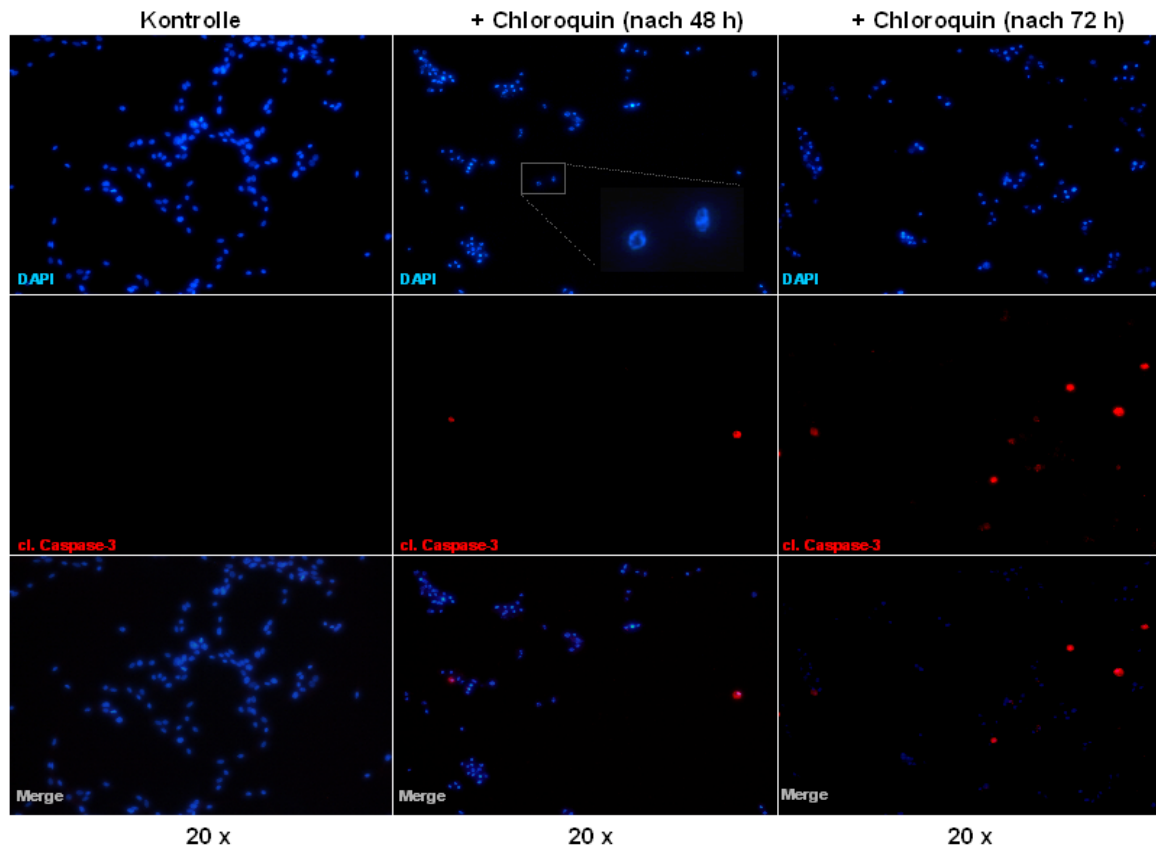


Abbildung 4a: Chloroquin induziert eine zeitabhängige Caspase-3-Aktivierung in U87MG-Zellen mit Expression von wt-p53. Färbung gespaltener Caspase-3 und Gegenfärbung mit DAPI. In Vergrößerung die charakteristische Kernmorphologie der mit Chloroquin behandelten Zellen

+ Chloroquin (nach 96 h)

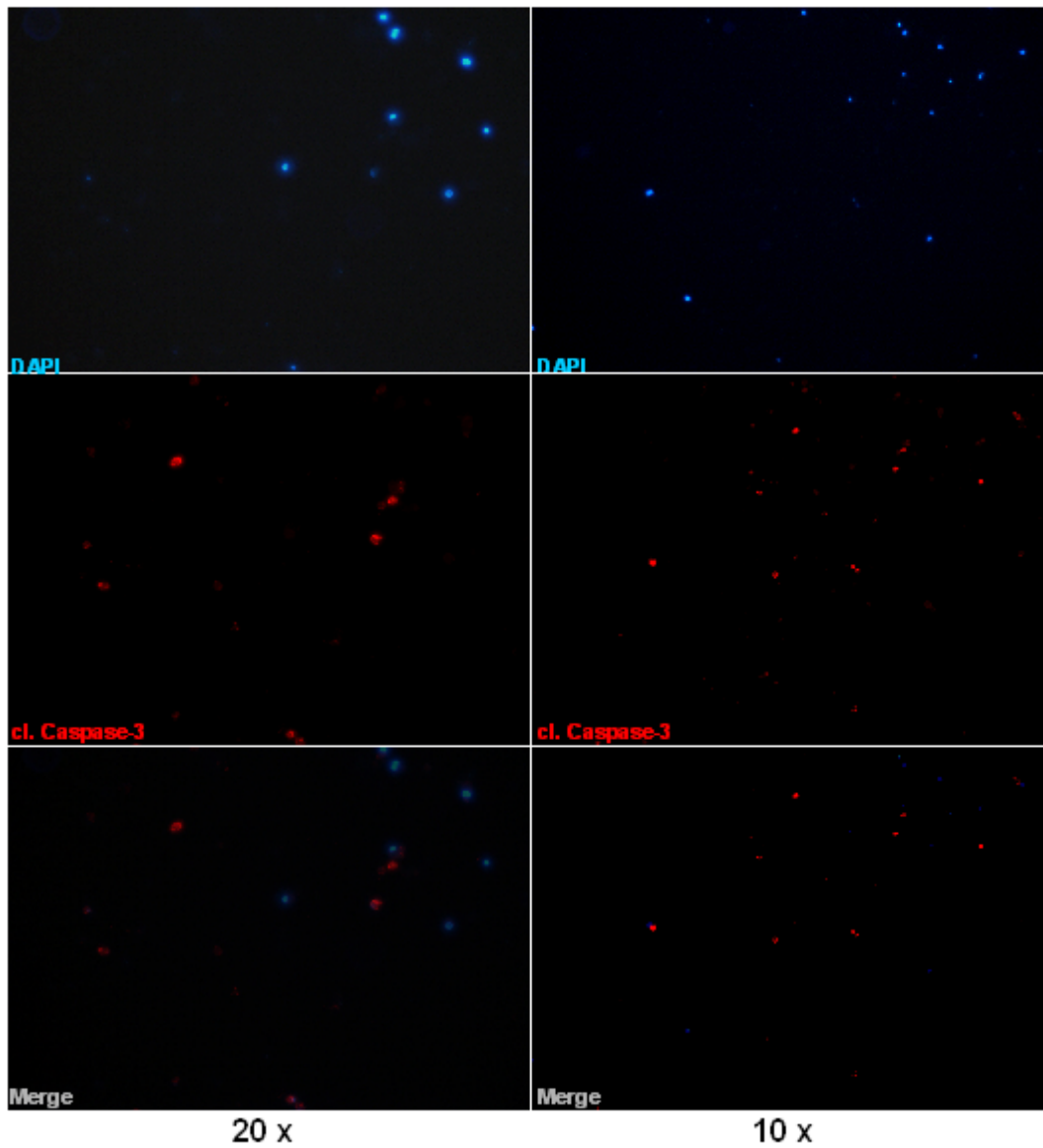


Abbildung 4b: Chloroquin induziert eine zeitabhängige Caspase-3-Aktivierung in U87MG-Zellen mit Expression von wt-p53. Anfärbung gespaltener Caspase-3 und Gegenfärbung mit DAPI.

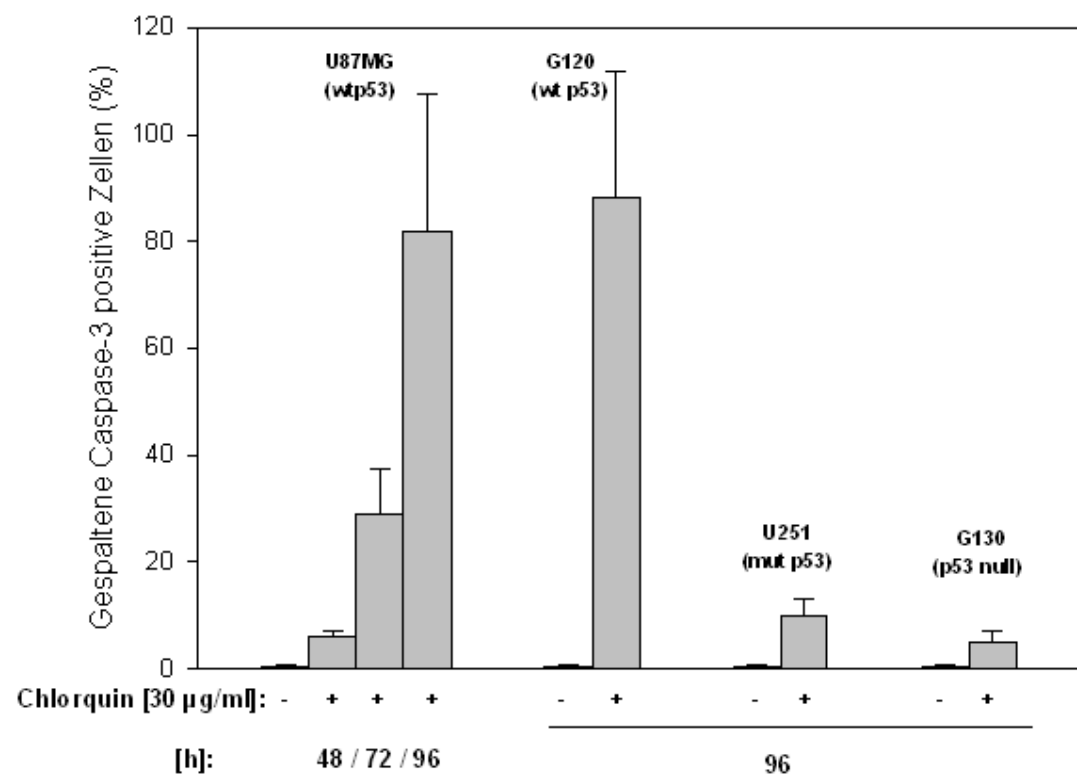


Abbildung 4c: Zusammenfassung der Caspase-3-Aktivierung von Gliomzellen mit unterschiedlichem p53-Status.

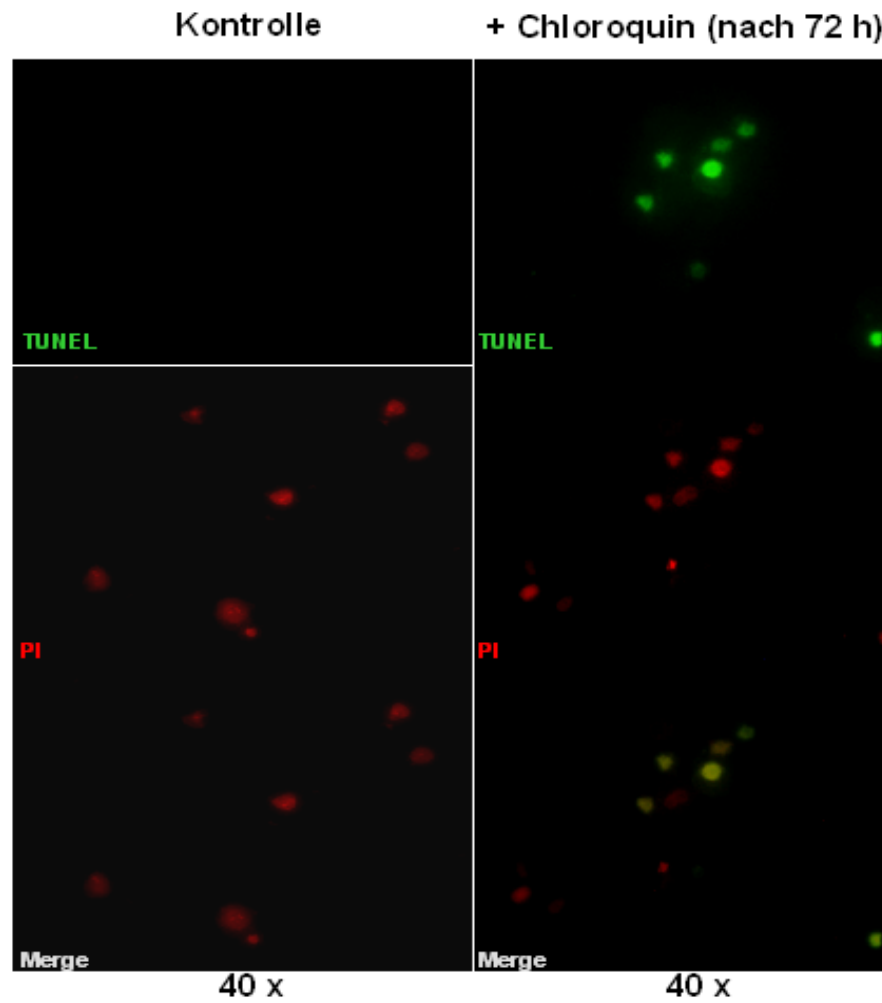


Abbildung 4d: Apoptose in U87MG-Zellen in der TUNEL-Färbung und Gegenfärbung mit Propidiumiodid

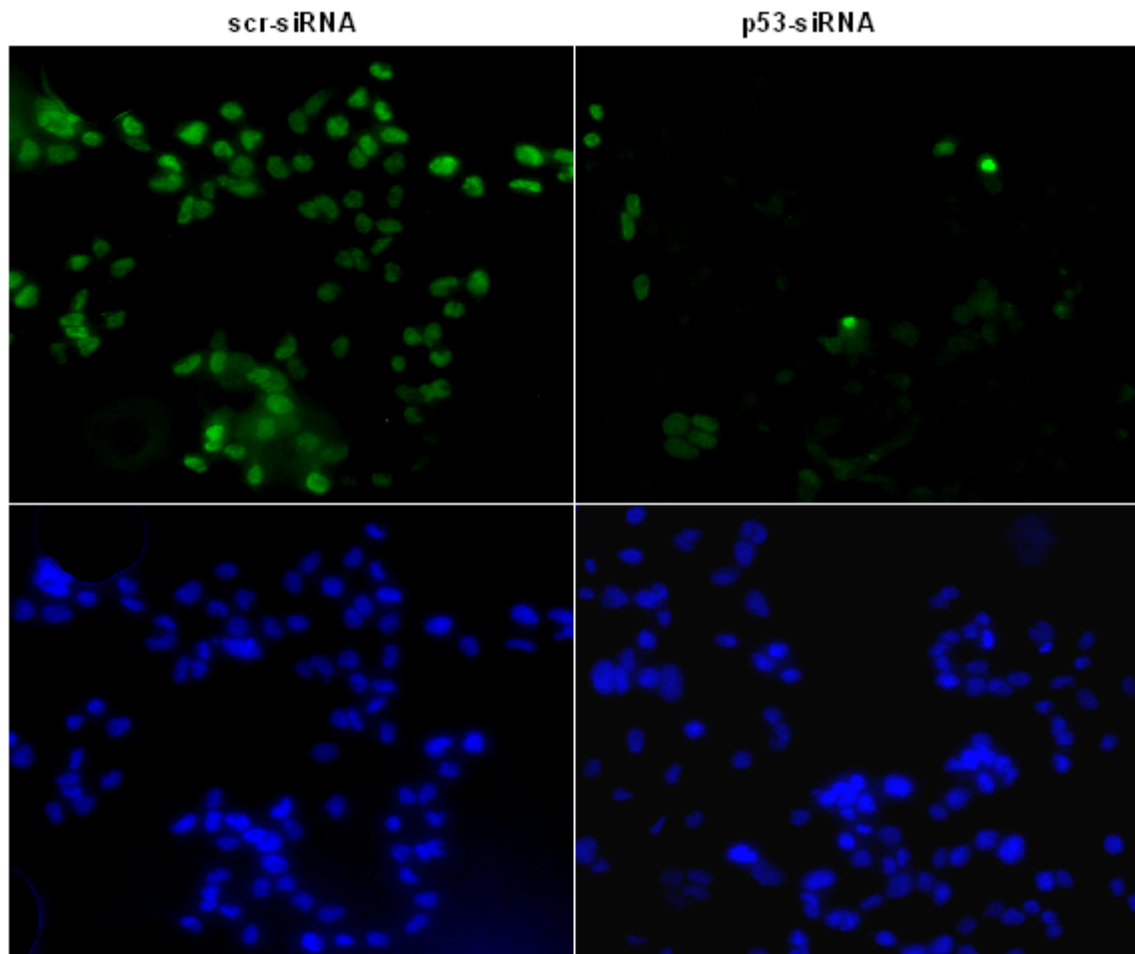


Abbildung 5a: Hemmung von endogenem p53 nach Transfektion mit unspezifischer scr-siRNA bzw. p53-siRNA.

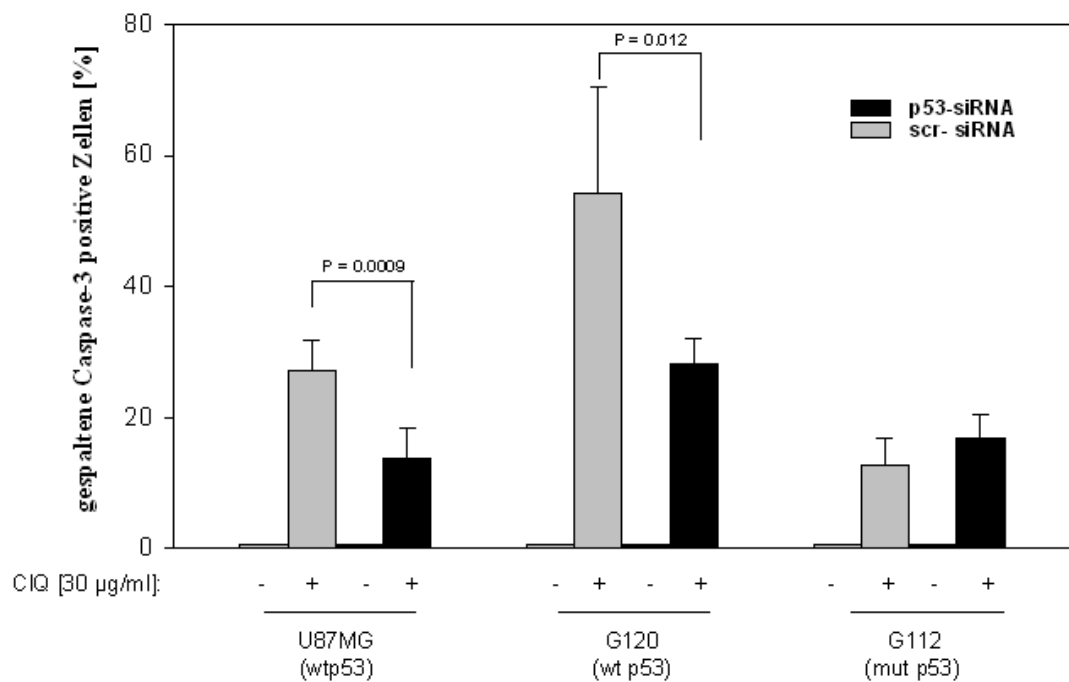


Abbildung 5b: Hemmung von p53 durch p53-siRNA vermindert die Caspase-3-Aktivierung in Gliomzellen mit wt-p53, aber nicht in Zellen mit mutiertem p53

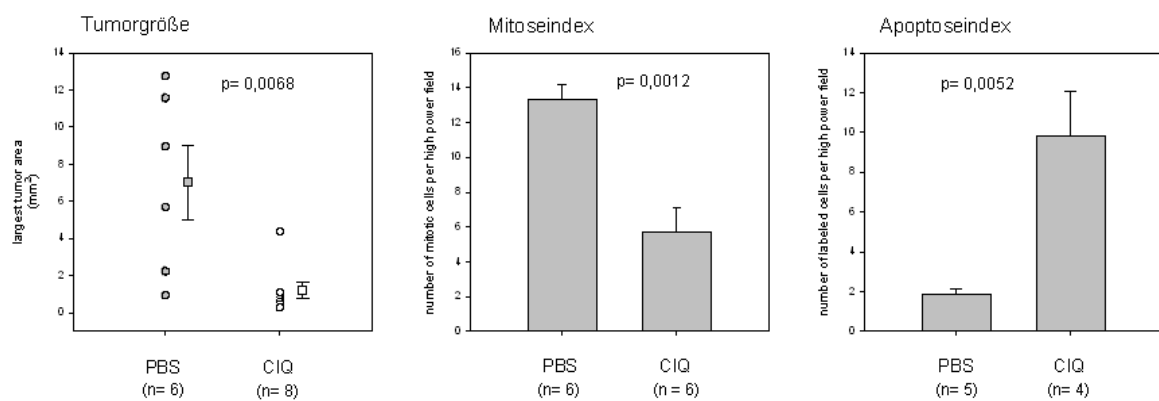
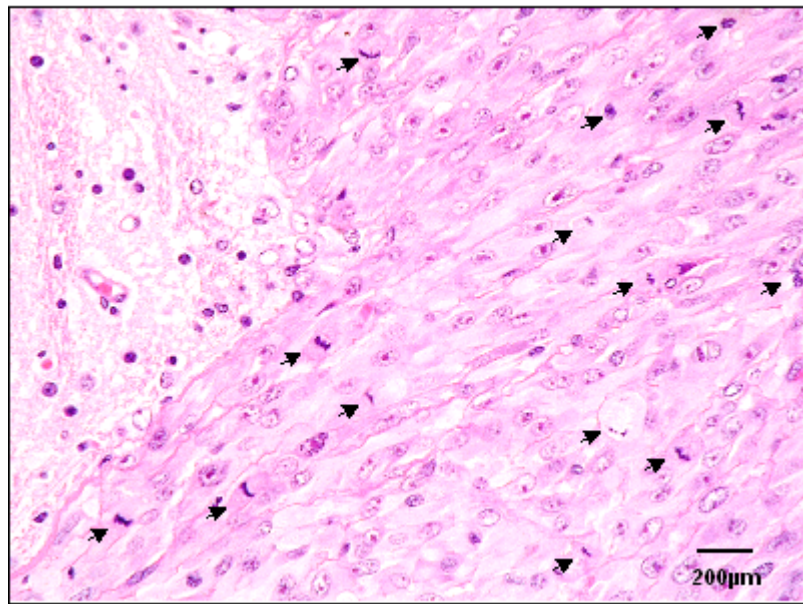


Abbildung 6: Tumorgröße, Mitoseindex sowie Apoptoseindex von U87MG-Tumoren nach Behandlung mit Chloroquin am Mausmodell

PBS



CIQ

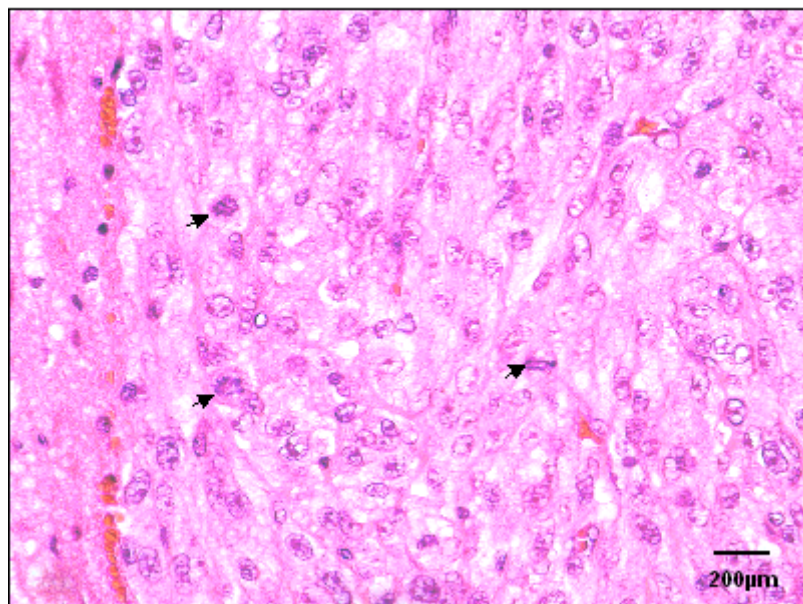
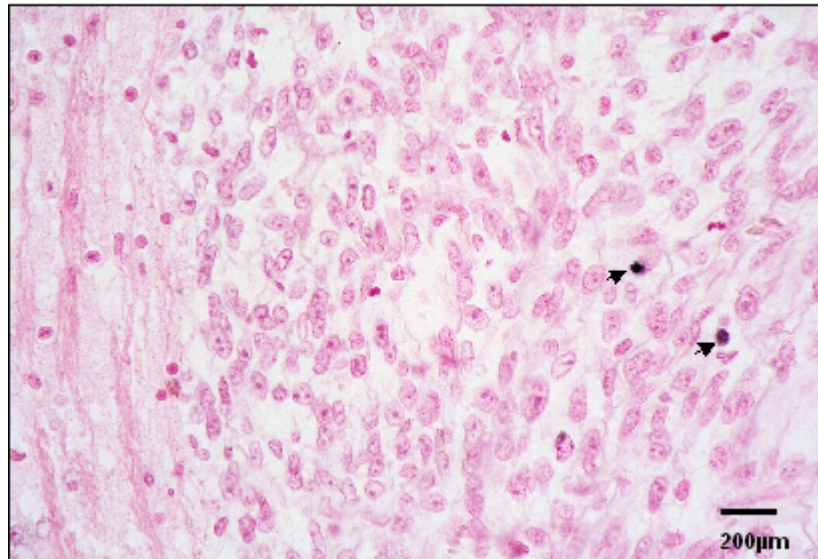


Abbildung 7: HE-Färbung repräsentativer Areale von U87MG-Tumoren mit mitotischen Zellen (Pfeile)

PBS



CIQ

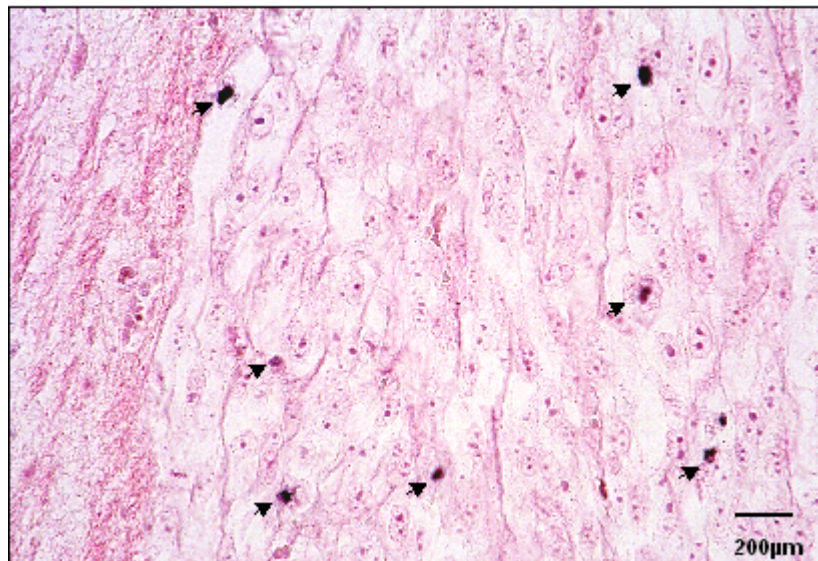


Abbildung 8: TUNEL-Färbung repräsentativer Areale von U87MG-Tumoren mit TUNEL-positiven Zellen (Pfeile)

9 Danksagungen

Für die Überlassung des Themas dieser Arbeit danke ich meinen Doktoreltern Prof. Dr. med. Alf Giese und Privatdozentin Dr. rer. nat. Ella Kim, für die sehr persönliche Betreuung, nachdenkliche Gespräche und mentale Wiederaufbauarbeit im Laufe der Versuche. Ella möchte ich auch für den regen Gedankenaustausch und das Bereitstellen der *in vitro*-Daten danken.

Ein großer Dank gilt den Mitstreitern rund um die Tierexperimente: Edith Pawlak für Rat und Tat in praktischen Laborfragen und die sehr kompetente Betreuung der Zelllinien; Nadine Pettkus für die Unterstützung bei der Anfertigung der Histologie und die beharrliche Organisation des Chaos, Dr. med. Jan Leppert für viel praktische Hilfe und Unterstützung an Zelllinien und Mäusen sowie Anne Katrin Schauff für Unterstützung und Austausch von Doktorand zu Doktorand.

Der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck in Gestalt von Klinikdirektor Prof. Dr. med. V. Tronnier und seinem Vorgänger Prof. Dr. med. H. Arnold danke ich für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit.

Mein Dank geht auch an Prof. Dr. med. E. Reusche für die neuropathologische Beratung und Hilfe sowie Frau Gabriele Feldhoff für die Vermittlung der notwendigen Fertigkeiten zur Erstellung der Histologie.

Den Mitarbeitern der gemeinsamen Tierhaltung unter Leitung von Dr. med. vet. R. Noel möchte ich für die Bereitstellung der Versuchstiere und die vertrauensvolle Zusammenarbeit danken.

Ein besonderer Dank geht an PD Dr. med. Marc Brockmann für das Vermitteln der tierexperimentellen Operationstechniken sowie Dr. med. Stefan Gottschalk und Dr. med. Stephan Ulmer für viele Stunden mit den Mäusen im MRT. Leider haben die MRT-Untersuchungen keinen Eingang in die vorliegende Arbeit gefunden.

...und nicht zuletzt Danke für den Zuspruch und die Ermutigung durch Familie und Freunde, v.a. meine Frau Anna-Maria.

10 Lebenslauf

Name : Robin Wüstenberg

Geburtsdatum : 28.05.1980

Geburtsort : Talcahuano/ Chile

Schulbildung :

- 1986-1990: Wilhelm-Busch-Grundschule, Soltau
- 1990-1991: Orientierungsstufe, Soltau
- 1991-1996: Deutsche Schule Valparaíso/ Chile
- 1996-1999: Gymnasium Soltau
- 1999: Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst : Heeresmusikkorps 3, Lüneburg

Studium :

- 2000-2002: Vorklinisches Studium, Universität zu Lübeck
- 2002-2006: Klinisches Studium, Universität zu Lübeck
- 2006-2007: Praktisches Jahr am UK-SH, Campus Lübeck

Abschluss : 3. Staatsexamen, 17. April 2007

Promotion : 2004-2007: Experimenteller Teil der Promotionsarbeit

Beschäftigung : Mai 2007 bis Juni 2009 als Assistenzarzt am Zentrum für Innere Medizin, Klinikum Oldenburg

11 Publikationen

Brockmann MA, Ulmer S, Leppert J, Nadrowitz R, Wuestenberg R, Nolte I, Petersen D, Groden C, Giese A, Gottschalk S (2006). „Analysis of mouse brain using a clinical 1.5 T scanner and a standard small loop surface coil“. Brain Res. 2006 Jan 12;1068(1):138-42. Epub 2005 Dec 27

Schauff AK, Kim EL, Leppert J, Nadrowitz R, Wuestenberg R, Brockmann MA, Giese A (2008). „Inhibition of invasion-associated thromboxane synthase sensitizes experimental gliomas to gamma-radiation“. J Neurooncol. 2009 Feb;91(3):241-9. Epub 2008 Sep 30

Kim EL, Wuestenberg R, Christoph Schmitz-Salue, Anne Rübsam, Gabriele Warnecke, Eva-Maria Bücken, Nadine Pettkus, Daniel Speidel, Veit Rohde, Walter Schulz-Schaeffer, Wolfgang Deppert, Alf Giese (2010). „Chloroquine activates the p53 pathway and induces apoptosis in human glioma cells“. Neuro-Oncology. Epub 2010 Jan 27 (Drucklegung folgt)