

Aus der Klinik für Urologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf,
Urologisches Forschungslabor, Translationale Uroonkologie, Medizinische
Fakultät und Universitätsklinikum

Leiter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Daniel Nettersheim

Die *in vitro*-Testung von CDK4/6-Inhibitoren als therapeutische Option
für (Cisplatin-resistente) Keimzelltumoren

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Marieke Sofie Vermeulen

2021

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. rer. nat. Daniel Nettersheim

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. rer. nat. Hans Neubauer

Auflistung der Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Skowron, M.A., Vermeulen, M., Winkelhausen, A., Becker, T.K., Bremmer, F., Petzsch, P., Schönberger, S., Calaminus, G., Köhler, K., Albers, P., Nettersheim, D., (2020), *CDK4/6 inhibition presents as a therapeutic option for paediatric and adult germ cell tumours and induces cell cycle arrest and apoptosis via canonical and non-canonical mechanisms*, British Journal of Cancer (123), 378–391

Zusammenfassung

Die testikulären Keimzelltumoren stellen die häufigste (solide) maligne Erkrankung bei jungen Männern zwischen 25 und 45 Jahren dar. Da die bestehenden Behandlungsmöglichkeiten mit (Cisplatin-basierter) Chemo- und/oder Strahlentherapie starke Nebenwirkungen hervorrufen, sowie zu Zweitmalignomen führen können oder es zu Resistenzen gegen die Chemotherapeutika kommen kann, besteht der weitere Bedarf nach alternativen Therapiemöglichkeiten.

Die Inhibition von CDK4/6 hemmt die zelluläre Proliferation, führt zu einem pseudo-seneszenten Stadium der Zellen und wird bereits bei anderen Tumorentitäten erfolgreich zur Behandlung eingesetzt (z.B. Ovarialkarzinom).

Es konnte auf RNA- und Protein-Ebene gezeigt werden, dass auch in Keimzelltumorzelllinien CDK4 (nicht aber CDK6) und dessen Zielmolekül (p)Rb nachweisbar ist. Daher könnten sich diese Tumoren ebenfalls als sensitiv gegenüber einer CDK4/6-Inhibition präsentieren.

Mittels XTT-Vitalitätsassays wurden Dosis-Wirkungskurven der CDK4/6-Inhibitoren Palbo- und Ribociclib für zehn Keimzelltumorzelllinien (darunter drei Cisplatin-resistente Sublinien), sowie für neun Kontrollzelllinien aus gesunden Geweben erstellt. Des Weiteren wurden die unter der Behandlung auftretenden Veränderungen im Zellzyklus und in den Apoptose-Raten mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Palbo- und Ribociclib führten in den Keimzelltumorzelllinien zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Zellviabilität, sowie zu einer Zunahme der Apoptose-Raten. Darüber hinaus zeigte sich eine zelllinienspezifische Arretierung der Zellen in der G_{1/0}- oder G₂/M-Phase. Auch wenn die zelllinienspezifische Zellzyklus-Arretierung auch teilweise bei den Kontrollzelllinien gezeigt werden konnte, wirkten Palbo- und Ribociclib auf diese insgesamt weniger toxisch als auf die Keimzelltumorzelllinien, was ein therapeutisches Fenster aufzeigte.

Zusammenfassend konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass die CDK4/6-Inhibitoren Palbo- und Ribociclib eine mögliche neue Therapiemöglichkeit für (Cisplatin-resistente) Keimzelltumoren darstellen könnten. Beide Substanzen zeigten in den Keimzelltumorzelllinien vergleichbare Effekte auf die Viabilität, den Zellzyklus und die Apoptoseraten und es konnte CDK4 als primäres Ziel der Inhibitoren identifiziert werden.

Summary

Testicular germ cell tumours represent the most common (solid) malignant disease in young men between 25 and 45 years of age. Since the existing treatment options with (cisplatin-based) chemotherapy and/or radiotherapy can cause severe side effects, as well as lead to second malignancies, or resistance to the chemotherapeutic agents can occur, there is a further need for alternative treatment options.

The inhibition of CDK4/6 inhibits cellular proliferation, leads to a pseudo-senescent stage of the cells and is already successfully used for treatment in other tumour entities (e.g. ovarian carcinoma).

It could be shown on the RNA and protein level that CDK4 (but not CDK6) and its target molecule (p)Rb are also detectable in germ cell tumour cell lines. Therefore, these tumours could also present themselves as sensitive to CDK4/6 inhibition.

Using XTT viability assays, dose-response curves of the CDK4/6 inhibitors Palbo- and Ribociclib were generated for ten germ cell tumour cell lines (including three cisplatin-resistant sublines), as well as for nine control cell lines from healthy tissues. Furthermore, the changes in cell cycle and apoptosis rates occurring under treatment were investigated by flow cytometry.

Palbo- and Ribociclib led to a concentration-dependent reduction in cell viability and an increase in apoptosis rates in the germ cell tumour cell lines. In addition, cell line-specific arrest of cells in G_{1/0} or G₂/M phase was evident. Although cell cycle arrest was also partially demonstrated in the control cell lines, palbo- and ribociclib had a less toxic effect on them than on the germ cell tumour cell lines, indicating a therapeutic window.

In summary, this work showed that the CDK4/6 inhibitors palbo- and ribociclib could represent a potential new therapy option for (cisplatin-resistant) germ cell tumours. Both substances showed comparable effects on viability, cell cycle and apoptosis rates in the germ cell tumour cell lines and CDK4 could be identified as the primary target of the inhibitors.

Abkürzungsverzeichnis

β-HCG	Humanes Choriongonadotropin, beta-Untereinheit
(...) -R	(...) -Resistente
(D)PBS	engl. „(Dulbecco's) phosphate buffered saline“ = Dulbeccos Phosphat-gepufferte Lösung
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μM	Mikromolar
(p)RB	(phosphoryliertes) Retinoblastom-Protein
°C	Grad Celsius
A	Ampere
Abb.	Abbildung
AFP	Alpha-Fetoprotein
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	engl. „bicinchoninacid“
BEP	Bleomycin, Etoposid, Cisplatin
BSA	engl. „bovine serum albumin“ = bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c-Kit	Tyrosinkinase KIT
ca.	circa
CC	engl. „chorioncarcinoma“ = Chorionkarzinom
CDK	engl. „cyclin-dependent kinases“ = Zyklin-abhängige Kinasen
cm	Centimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d.h.	das heißt
DMEM	engl. „(Dulbecco's) modified eagle medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Sodium Deoxycholat
DTT	Dithiothreitol
EC	engl. „embryonal carcinoma“ = Embryonalkarzinom
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
e.g.	engl. „example given“ = zum Beispiel

ELISA	engl. „enzyme-linked immunosorbent assay“ = enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
EP	Etoposid, Cisplatin
FCS	engl. „fetal calf serum“ = fetales Kälberserum
FITC	engl. „Fluoresceinisothiocyanat“
FOXM1	engl. „Forkhead Box M“
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCNIS	engl. „germ cell neoplasia in situ“ = Keimzellneoplasie <i>in situ</i>
GnRH	engl. „Gonadotropin-releasing hormon“ = Gonadoliberin
griech.	griechisch
h	engl. „hours“ = Stunden
H ₂ O	Wasser
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HER	engl. „human epidermal growth factor receptor“ = humaner epidermaler Wachstumsrezeptor
HR	Hormonrezeptor
IGCCCG	engl. „International Germ Cell Consensus Classification“
KZT	Keimzelltumor
LD	Letale Dosis
LDH	Lactatdehydrogenase
LH	Luteinisierendes Hormon
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
NEAA	engl. „non essential amino acid“ = nicht-essentielle Aminosäure
n	Größe der Stichprobe
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NS	Nicht-Seminom
p.o.	per os
P/S	Penicillin/Streptomycin
PEI	Cisplatin, Etoposid, Ifosfamid
PGC	engl. „primordial germ cell“ = primodiale Keimzelle
pH	Potential des Wasserstoffes
PI	Propidiumiodid

PLK	engl. „polo-like kinase“
PMS	Polymethylsiloxan
RB	Retinoblastom-Gen
RKI	Robert Koch Institut
RNS	engl. „ribonukleinacid“ = Ribonukleinsäure
rpm	engl. „rounds per minute“ = Drehungen per Minute
s.o.	siehe oben
SDS	engl. „sodium dodecyl sulfate“ = Natriumlaurylsulfat
SE	Seminom
sog.	sogenannt
Tab.	Tabelle
TBS	tert-Butyldimethylsilyl
TBST	tert-Butyldimethylsilyl mit Tween
TE	Teratom
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNM	Primärtumor, Lymphknotenbefall, Metastasen
TP53	Tumor Protein 53
Tris	Trisaminomethan
U	engl. „Unit“ = Einheit
vs.	versus
XTT	2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]- innersalt-2H-tetrazolium
YST	engl. „yolk sac tumor“ = Dottersacktumor
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

Auflistung der Publikationen.....	
Zusammenfassung.....	I
Summary	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Inhaltsverzeichnis.....	VI
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	X
1. Einleitung	1
1.1. Reifung der männlichen Keimzelle	1
1.2. Entstehung testikulärer Keimzelltumoren und deren Risikofaktoren	3
1.3. Klassifizierung testikulärer Keimzelltumoren und ihre Prognose.....	5
1.4. Therapieoptionen testikulärer Keimzelltumoren und ihre Nebenwirkungen	7
1.5. Zellzyklus und spezifische Funktionen von CDK4 und CDK6	8
1.6. Pharmakologische Inhibition von CDK4/6	10
1.6.1. Wirkung von Palbociclib und Ribociclib	11
1.6.2. Aktuelle klinische Verwendung der Inhibitoren und laufende Studien	11
1.7. Zielsetzung dieser Arbeit	12
2. Material und Methoden	14
2.1. Material.....	14
2.1.1. Humane Keimzelltumor- und Kontrollzelllinien	14
2.1.2. Materialien der Zellkultur.....	15
2.1.3. Zellkulturmedien und Supplemente	17
2.1.4. Verwendete CDK4/6-Inhibitoren	18
2.1.5. Materialien für XTT-Assay	19
2.1.6. Materialien für Nicoletti-Assay zur Zellzyklusanalyse	20
2.1.7. Materialien für Annexin V/PI Apoptose-Assay	21
2.1.8 Materialien für RNA-Isolation und Proteinextraktion	22
2.1.9. Materialien für BCA-Protein-Assay	23
2.1.10. Materialien für SDS-Page und Western Blot.....	24
2.1.11. Verwendete Antikörper	27

2.2. Methoden.....	29
2.2.1. Kultivierung	29
2.2.2. Passagieren der Zellen	29
2.2.3. Zellzählung.....	30
2.2.4. Proteinextraktion	30
2.2.5. XTT-Assay	31
2.2.6. Bestimmung der LD ₅₀ -Werte	33
2.2.7. Nicoletti-Assay mittels Durchflusszytometrie	33
2.2.8. Annexin V/PI Apoptose-Assay mittels Durchflusszytometrie	35
2.2.9. BCA-Protein-Assay	36
2.2.10. Western Blot	36
3. Ergebnisse	40
3.1. Nachweis der Inhibitor-Zielstrukturen und (p)RB-Achse auf Proteinebene mittels Western Blot	40
3.2. Änderung der CDK4-Proteinexpression unter Behandlung	42
3.3. Messung der Zellviabilität unter Behandlung mit Palbociclib bzw. Ribociclib	42
3.4. Berechnung der LD ₅₀ -Werte	45
3.5. Analyse der Zellzyklusveränderungen mittels Durchflusszytometrie.....	48
3.6. Analyse der Apoptoseinduktion mittels Durchflusszytometrie	50
4. Diskussion	52
4.1. Detektierte Zielstrukturen für die CDK4/6-Inhibitoren Palbo- und Ribociclib	52
4.2. Abnahme der CDK4-Proteinproduktion unter Behandlung mit Palbociclib.....	53
4.3. Abnahme der Zellviabilität unter Behandlung mit Palbociclib bzw. Ribociclib, sowie Induktion von Zellzyklusveränderungen und Apoptose	54
4.4. Fazit und Ausblick	59
Literaturverzeichnis	60
Anhang 1: Fotos der Zellen mit/ohne Palbo- bzw. Ribociclib-Behandlung.	67
Anhang 2: Rohdaten Nicoletti-Assay zur Zellzyklusanalyse und Annexin V/PI-Apoptoseassay unter Ribociclib-Behandlung.....	68

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Spermatogenese in den Hodenkanälchen nach Mayerhofer et al. [2].	2
Abbildung 2: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2016 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs) nach Zentrum für Krebsregisterdaten des RKI [5].	3
Abbildung 3: Absolute Fallzahlen der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2016 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs) bei Männern zwischen 0-44 Jahren nach Zentrum für Krebsregisterdaten des RKI [5].	3
Abbildung 4: Entwicklung der verschiedenen Keimzelltumortypen und ihr Auftreten in den verschiedenen Entwicklungsabschnitten (PGC = Primordiale Keimzellen, TE = Teratom, YST = Dottersacktumor, GCNIS = Keimzellneoplasie <i>in situ</i> , SE = Seminom, EC = Embryonalkarzinom, CC = Chorionkarzinom, NS = Nichtseminome [11].	6
Abbildung 5: Regulation des G1/S-Übergangs durch CDK4/6/Zyklin D und E2F [26].	10
Abbildung 6: Reduktion von XXT zu Formazan [48].	31
Abbildung 7: farbliche Reduktion von XTT durch zelleigene Enzyme (Dehydrogenasen) [48].	32
Abbildung 8: Microarray-Expressionsanalyse von <i>CDK4</i> und <i>CDK6</i> auf RNA-Ebene in Keimzelltumorgewebe (GCNIS, Seminome, Embryonalkarzinome, Teratome) verglichen mit gesunden Hodengewebe (NTT), sowie in den verschiedenen Keimzelltumorzelllinien (TCam-2, 2102EP, NCCIT, JAR) verglichen Sertoli-Zellen (FS1) und Fibroblasten (MPAF) als Kontrollen.	40
Abbildung 9: Western Blot zum Nachweis von CDK4 und CDK6 in Keimzelltumorzelllinien (TCam-2, 2102EP, NCCIT, NT2/D1, JAR, JEG3) und Kontrollzelllinien (VHF2, ARZ, MPAF, FS1), sowie in den Positivkontrollen (HepG2, HeLa). GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.....	41
Abbildung 10: Western Blot Nachweis von RB und pRB1 in Keimzelltumorzelllinien (TCam-2, 2102EP, NCCIT, NT2/D1, JAR, JEG3) und Kontrollzelllinien (VHF2, ARZ, MPAF, FS1). GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.....	41
Abbildung 11: Western Blot zum Nachweis der CDK4-Synthese unter Behandlung mit 10 μ M Palbociclib für 16 Stunden verglichen mit unbehandelten Keimzelltumorzelllinien (TCam-2, 2102EP, NCCIT, NT2/D1, JAR, JEG3, BeWo).	42
Abbildung 12: Messung der Zellviabilität der Keimzelltumorzelllinie JAR unter verschiedenen Konzentrationen Palbociclib (links) und Ribociclib (rechts) über einen Zeitraum von 24-96 Stunden.....	43
Abbildung 13: Messung der Zellviabilität von (Cisplatin-resistenten) Keimzelltumorzelllinien (TCam-2, 2102EP, 2102EP-R, NCCIT, NCCIT-R, NT2/D1, NT2/D1-R, JAR, JEG-3, BeWo) und Kontrollzelllinien (VHF2, ARZ, MPAF, FS1, HBLAK, THP-1, HEK293, HaCaT, MCF7)	

unter verschiedenen Konzentrationen Palbociclib über einen Zeitraum von 24-96 Stunden.	43
Abbildung 14: Messung der Zellviabilität von (Cisplatin-resistenten) Keimzelltumorzelllinien (TCam-2, 2102EP, 2102EP-R, NCCIT, NCCIT-R, NT2/D1, NT2/D1-R, JAR, JEG-3, BeWo) und Kontrollzelllinien (VHF2, ARZ, MPAF, FS1, HBLAK, THP-1, HEK293, HaCaT, MCF7) unter verschiedenen Konzentrationen Ribociclib über einen Zeitraum von 24-96 Stunden.	44
Abbildung 15: Übersicht der Graphen zur Ermittlung der LD ₅₀ -Werte nach 48 Stunden Behandlung basierend auf den XTT-Daten. Relative Zellviabilität auf der Y-Achse aufgetragen gegen jeweiligen Inhibitor-Konzentrationen auf der X-Achse.	46
Abbildung 16: Veränderungen im Zellzyklus nach Behandlung mit Palbo- und Ribociclib verglichen mit Lösemittelkontrolle [%]. Die Behandlung erfolgte für 16 Stunden mit 10 µM Palbociclib und 25 µM Ribociclib. Dargestellt sind die Keimzelltumorzelllinien (TCam-2, 2102EP, 2102EP-R, NCCIT, NCCIT-R, NT2/D1, NT2/D1-R, JAR, JEG-3, BeWo) und Fibroblasten (VHF2, MPAF), sowie Sertoli Zellen (FS1) als Kontrollzelllinien.	49
Abbildung 17: Veränderungen der Apoptoserate nach Behandlung mit Palbo- und Ribociclib verglichen mit Lösemittelkontrolle [%]. Die Behandlung erfolgte für 16 Stunden mit 10 µM Palbociclib und 25 µM Ribociclib. Dargestellt sind die Keimzelltumorzelllinien (TCam-2, 2102EP, 2102EP-R, NCCIT, NCCIT-R, NT2/D1, NT2/D1-R, JAR, JEG-3, BeWo) und Fibroblasten (VHF2, MPAF), sowie Sertoli Zellen (FS1) als Kontrollzelllinien.	51
Abbildung 18: Fotos der Zellen mit/ohne Palbo- bzw. Ribociclib-Behandlung.	67
Abbildung 19: Rohdaten Nicoletti-Assay zur Zellzyklusanalyse und Annexin V/PI-Apoptoseassay unter Palbociclib-Behandlung.	68
Abbildung 20: Rohdaten Nicoletti-Assay zur Zellzyklusanalyse und Annexin V/PI-Apoptoseassay unter Ribociclib-Behandlung.	69

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten humanen Keimzelltumorzelllinien und Kontrollzelllinien.	15
Tabelle 2: Übersicht der Komponenten für die Standard-Kultivierung von Keimzelltumor- und Kontrollzelllinien in der Zellkultur.	17
Tabelle 3: Übersicht der zelllinienabhängigen Zellmedien mit den jeweiligen Supplementen.	18
Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Inhibitoren mit den jeweiligen Herstellern und Lösemitteln.	19
Tabelle 5: Übersicht der für das XTT-Assay benötigten Materialien.	19
Tabelle 6: Übersicht der für das Nicoletti-Assay zur Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie benötigten Materialien.	20
Tabelle 7: Übersicht der für das Annexin V/PI Apoptose-Assay mittels Durchflusszytometrie benötigten Materialien.	22
Tabelle 8: Übersicht der für die RNA-Isolation und die Proteinextraktion benötigten Materialien.	23
Tabelle 9: Übersicht der für das BCA-Protein-Assay benötigten Materialien.	24
Tabelle 10: Übersicht der benötigten Materialien für den SDS-Page und das Western Blot-Verfahren.	27
Tabelle 11: Übersicht der im Western Blot-Verfahren verwendeten Antikörper.	29
Tabelle 12: Zusammensetzung der Trenngele	37
Tabelle 13: Zusammensetzung der Sammelgele.	37
Tabelle 14: LD ₅₀ -Werte [µM] der Keimzelltumorzelllinien nach 48 Stunden Behandlung. Basierend auf den Graphen, die aus den XTT-Daten erstellt wurden. Die Durchschnittswerte stellen den Mittelwert der LD ₅₀ -Werte aller Keimzelltumorzelllinien (TCam-2, 2102EP, 2102EP-r, NCCIT, NCCIT-R, NT2/D1, NT2/D1-R, JAR, JEG-3, BeWo) dar.	47
Tabelle 15: LD ₅₀ -Werte [µM] der Kontrollzelllinien nach 48 Stunden Behandlung. Basierend auf den Graphen, die aus den XTT-Daten erstellt wurden. Die Durchschnittswerte stellen den Mittelwert der LD ₅₀ -Werte aller Kontrollzelllinien (VHF2, MPAF, FS1, THP-1, HEK293, HaCaT) außer MCF-7 dar.	47

1. Einleitung

1.1. Reifung der männlichen Keimzelle

Die Bildung von Keimzellen (griech. Gameten) wird Gametogenese genannt und lässt sich weiter aufteilen in die Oogenese bei der Frau und die Spermatogenese bei dem Mann, bei der jeweils aus diploiden Urkeimzellen durch Meiose haploide Gameten entstehen [1]. Die Urkeimzellen wandern im Laufe der Embryogenese in die weiblichen bzw. männlichen Gonadenanlagen ein [1]. Beim Mann findet die Spermatogenese daher im Keimepithel der Hodenkanälchen statt und lässt sich generell in drei Schritte unterteilen: die Vermehrung der Urkeimzelle durch Mitose zu Spermatogonien, die anschließende Reifung der Spermatogonien durch Meiose zu Spermatiden und abschließend die Differenzierung der Spermatiden zu reifen Spermien (siehe Abb. 1) [2].

Die Spermatogonien verbleiben bis zum Beginn der Pubertät in einem inaktiven Stadium, sodass es erst ab dem 9.-14. Lebensjahr durch Mitose zur Bildung sog. Spermatozyten I kommt [3]. Aus diesen Spermatozyten I entstehen daraufhin durch Meiose I die Spermatozyten II, welche einen haploiden Chromosomensatz mit zwei Chromatiden besitzen [3]. Anschließend entstehen durch die Meiose II Spermatiden, welche einen haploiden Chromosomensatz mit nur einer Chromatiden tragen [3]. Durch die abschließende Spermiogenese im Nebenhoden, d.h. eine Ausdifferenzierung, kommt es zur Bildung reifer Spermien, auch Spermatozoen genannt, bei welchen der Zellkern kondensiert im Spermienkopf vorliegt und welche sowohl über Akrosomen, als auch Spermischwänze verfügen [3]. Als Akrosom wird dabei die Kopfkappe des Spermiums verstanden, in welcher sich hydrolytische Enzyme befinden, die später die Penetration des Spermiums in die Eizelle ermöglichen [3]. Die Spermatogenese vollzieht sich ausgehend von der Basallamina hin zum Lumen der Hodenkanälchen, sodass die Spermatiden im Lumen zu liegen kommen und von hier zur abschließenden Ausdifferenzierung in den Nebenhoden transportiert werden [3].

Zum Schutz und zur Ernährung der Keimzellen, findet die Spermatogenese eingebettet in den sog. Sertoli-Zellen statt, welche außerdem noch das androgenbindende Protein, sowie das Hormon Inhibin produzieren [2]. Neben den Sertoli-Zellen sind im Bindegewebe auch noch die sog. Leydig-Zellen lokalisiert, welche das Hormon Testosteron produzieren [2].

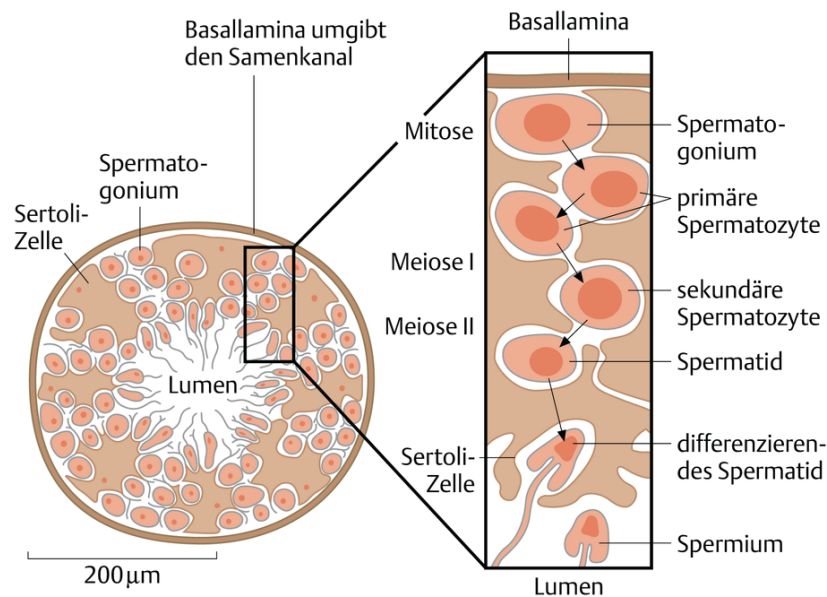


Abbildung 1: Spermatogenese in den Hodenkanälchen nach Mayerhofer et al. [2].

Neben den von den Sertoli- und Leydig-Zellen produzierten Hormonen, sind noch weitere Hormone zur Steuerung der Spermatogenese notwendig. Insgesamt sind es vor allem fünf Hormone, welche die Spermatogenese steuern: GnRH (Gonadotropin-Releasing-Hormon), LH (Luteinisierendes Hormon), FSH (Follikel-stimulierendes Hormon), sowie Inhibin und Testosteron [3]. Das in der Adenohypophyse ausgeschüttete LH stimuliert im Hoden die Leydig-Zellen zur Testosteron-Produktion, welches die Spermatogenese antreibt, dafür aber zunächst die Blut-Hoden-Schranke überwinden muss [3]. Dabei bezeichnet die Blut-Hoden-Schranke die Trennung zwischen den Blutgefäßen und den Lumina der Hodenkanälchen, welche durch die engen, interzellulären Verbindungen (sog. „tight junctions“) der Sertoli-Zellen untereinander entsteht [4]. Um die Blut-Hoden-Schranke zu passieren, werden die Sertoli-Zellen durch das hypophysäre Hormon FSH zur Produktion des androgenbindenden Proteins angeregt; hieran gebunden kann das Testosteron nun an den Ort der Spermatogenese gelangen [3]. Das Hormon Inhibin, welches ebenfalls von den Sertoli-Zellen produziert wird, stellt einen negativen Rückkopplungsmechanismus dar, da es die Produktion von FSH in der Hypophyse hemmt [3]. Eine übergeordnete Rolle der hormonellen Steuerung der Spermatogenese spielt GnRH. Dieses wird ab Beginn der Pubertät pulsatil im Hypothalamus freigesetzt, stimuliert die Freisetzung von LH und FSH und ist damit der Beginn der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse [3].

1.2. Entstehung testikulärer Keimzelltumoren und deren Risikofaktoren

Betrachtet man deutschlandweit alle Krebserkrankungen bei Männern gehört Hodenkrebs mit einem Anteil von 1,6 % zu einer der selteneren Krebsarten (siehe Abb. 2)[5]. Vergleicht man nun aber die Häufigkeiten aller Krebserkrankungen bei Männern zwischen 25 und 45 Jahren, fällt auf, dass Hodenkrebs hier die häufigste maligne Tumorart darstellt (siehe Abb. 3)[5].

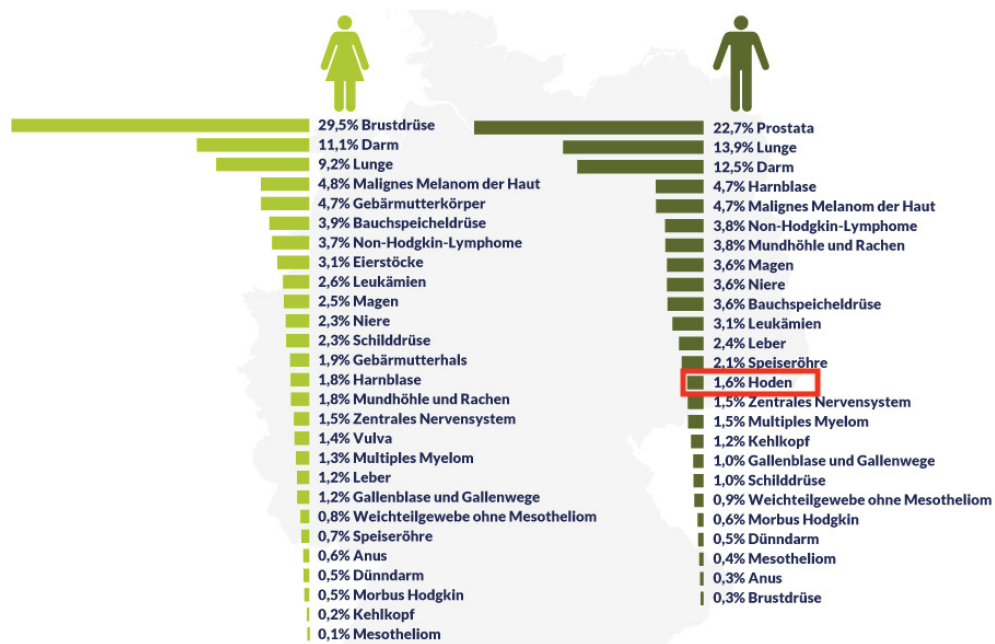


Abbildung 2: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2016 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs) nach Zentrum für Krebsregisterdaten des RKI [5].

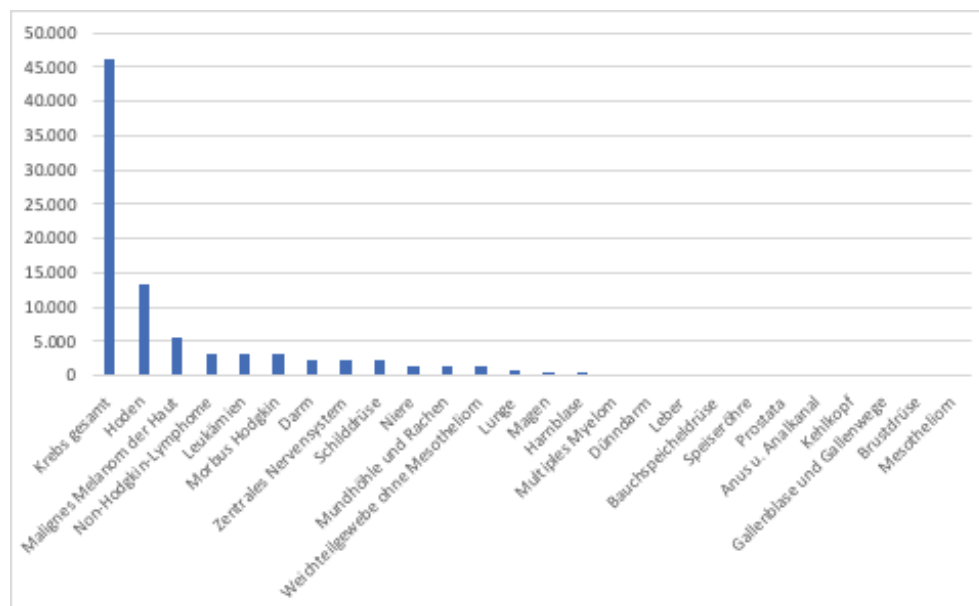


Abbildung 3: Absolute Fallzahlen der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2016 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs) bei Männern zwischen 0-44 Jahren nach Zentrum für Krebsregisterdaten des RKI [5].

Die Entstehung von Keimzelltumoren (Typ II) beginnt bereits während des Zeitraumes der Migration, sowie der Vermehrung der Urkeimzelle zu Spermatogonien, bei der die Urkeimzelle unter regulären Umständen ihre totipotenten Fähigkeiten verliert, während der Keimzelltumor-Entwicklung jedoch ihre totipotenten Eigenschaften behält und somit als eine transformierte Keimzelle vorliegt, welche dann als Keimzellneoplasie *in situ* (aus dem Englischen „germ cell neoplasia *in situ*“, „GCNIS“) bezeichnet wird [6]. Wie die Spermatogonien bei der physiologischen Spermatogenese, verbleiben auch die GCNIS bis zur Pubertät in einem ruhenden Stadium, sodass es erst ab diesem Zeitpunkt zur Ausbildung von seminomatösen und nicht-seminomatösen Keimzelltumoren kommt [7]. Die Progression des Tumorgeschehens wird dann durch epigenetische Einflüsse und verschiedene chromosomale Ereignisse, sowie somatische Mutationen vorangetrieben [6]. Eine chromosomale Veränderung stellt hierbei die überhöhte Anzahl an Kopien des kurzen Armes des Isochromosoms 12p dar, was unter anderem eine wichtige Rolle im Erhalt der Pluripotenz der GCNIS spielt [6] [7]. Als Isochromosom versteht man dabei eine strukturelle Chromosomenaberration, bei welcher es zum Verlust von Teilen der Erbinformation kommt [8]. Weitere molekulare Ursachen für die Tumorprogression sind die Amplifikation von *TP53*, Verlust der Expression von *c-Kit*, sowie Deregulationen des Zellzyklus am G₁/S-Phase-Checkpoint [9].

Die selteneren Keimzelltumoren der Präpubertät (Typ I) und des höheren Alters (Typ III) sind jedoch dadurch gekennzeichnet, dass sie ohne die Vorstufe GCNIS entstehen [6]. Hierbei handelt es sich in der Präpubertät um Teratome und Dottersacktumoren, bei denen davon ausgegangen wird, dass sie durch eine unvollständige Löschung der genomischen Prägung der embryonalen Keimzellen entstehen [6]. Die genomische Prägung stellt dabei eine reversible epigenetische Form der Genregulation dar, welche vornehmlich durch DNA-Methylierung bestimmt wird und dazu führt, dass entweder das maternale oder paternale Allel eines Genes ausgeprägt wird [10]. Bei Männern im höheren Lebensalter treten dagegen spermatozytische Tumoren auf, welche aus Spermatogonien entstehen und sich in den Hodentubuli weiterentwickeln [6].

Für die Entstehung von Keimzelltumoren spielen mehrere Risikofaktoren eine Rolle. Ein bekannter Risikofaktor ist Hodenhochstand, genauer der Kryptorchismus [11]. Das bedeutet, dass der Hoden nicht palpabel im Skrotum, sondern abdominell oder inguinal verborgen liegt [12]. Kryptorchismus führt zu einem fünffach erhöhtem Risiko, vor allem, wenn im Kindesalter nicht früh genug eine Orchidopexie, also die operative Verlagerung und Fixierung des Hodens im Skrotum, erfolgt [6] [13]. Auch die Hypospadie, sowie eine verringerte Anzahl an Spermien (sog. Oligospermie) werden als Risikofaktoren diskutiert [11]. Dabei stellt Hypospadie eine Fehlbildung der Harnröhre dar, bei welcher diese

fälschlicherweise an der Unterseite des Penis mündet [14]. Sowohl der Hodenhochstand als auch die Hypospadie und Oligospermie können durch pränatale Umwelteinflüsse mittels hormonellen Signalwegen beeinflusst werden [6]. Auch postnatale Umwelteinflüsse oder bestimmte Lebensstile werden als Risikofaktoren diskutiert, konnten allerdings noch nicht sicher als solche verifiziert werden [6]. Einen weiteren Risikofaktor stellt Hodenkrebs in der Vorgeschichte des Patienten dar, so haben Patienten beispielsweise eine zweiprozentige Wahrscheinlichkeit innerhalb der ersten 15 Jahre nach der Diagnose eines Keimzelltumors des einen Hodens, auch auf der kontralateralen Seite einen Tumor zu entwickeln [6]. Auch scheinen genetische Effekte bzw. eine genetische Prädisposition im Sinne einer positiven Familienanamnese eine Rolle zu spielen [13]. Auch wenn über 90 % der an Keimzelltumoren erkrankten Patienten keine positive Familienanamnese aufweisen, erhöht sich das Risiko für einen Mann in dessen Familie Keimzelltumoren aufgetreten sind signifikant [6]. So haben die Söhne von erkrankten Patienten ein vier- bis sechsfach, und Brüder eines erkrankten Patienten sogar ein acht- bis zehnfach erhöhtes Risiko [6]. Weiterhin scheinen auch Infertilität und das Klinefelter-Syndrom Risikofaktoren darzustellen [11] [15]. Das Klinefelter-Syndrom ist eine Chromosomenanomalie und geht meist mit dem Karyotypen 47, XXY einher [16]. Es ist mit einem primären hypogonadotropen Hypogonadismus vergesellschaftet und führt zu einer Hoden-, Nebenhoden-, Skrotumhypoplasie mit einem symptomatischem Testosteronmangel [16]. Der letzte gesicherte Risikofaktor ist die ethnische Zugehörigkeit, da sich gezeigt hat, dass kaukasische Männer vierfach häufiger an Keimzelltumoren erkranken als Männer afrikanischer Abstammung [13] [9].

1.3. Klassifizierung testikulärer Keimzelltumoren und ihre Prognose

Zunächst lassen sich Keimzelltumoren hinsichtlich ihres Auftretens in den verschiedenen Abschnitten der Spermatogenese, sowie in den verschiedenen Altersklassen der Patienten in drei Subtypen aufteilen [11]. Die Keimzelltumoren vom Typ I (vor allem Teratome und Dottersacktumore) stellen dabei die präpubertär auftretenden Tumoren dar, die vom Typ II, die Tumoren der Männer mittleren Alters und die vom Typ III (vor allem Spermatozytäre Tumoren) die Tumoren der älteren Männer [11] [6]. Wie bereits oben erläutert, entstehen die verschiedenen Keimzelltumoren bei fehlerhaften Prozessen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Spermatogenese. Demnach entstehen lediglich die Keimzelltumoren vom Typ II aus der GCNIS [6]. Weitergehend lassen sich die Keimzelltumoren vom Typ II in Seminome und Nichtseminome unterteilen [17]. Die Gruppe der Nichtseminomen besteht aus den stammzel-ähnlichen Embryonalkarzinomen, aus denen sich Teratome, Dottersacktumoren und Chorionkarzinome weiter differenzieren können (siehe Abb.4) [11].

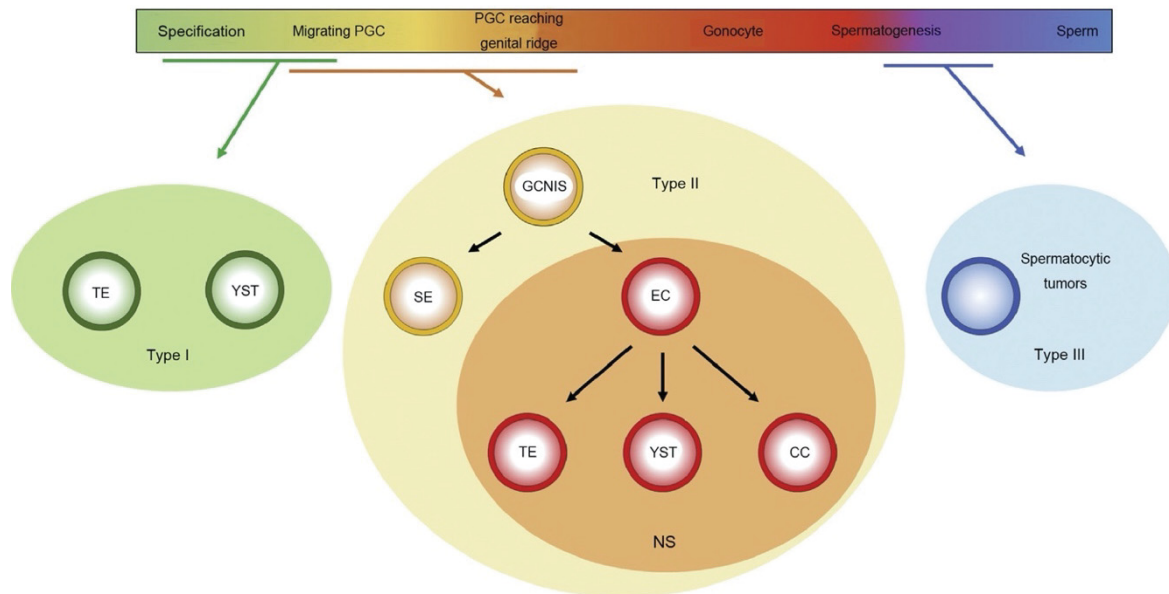


Abbildung 4: Entwicklung der verschiedenen Keimzelltumortypen und ihr Auftreten in den verschiedenen Entwicklungsabschnitten (PGC = Primordiale Keimzellen, TE = Teratom, YST = Dottersacktumor, GCNIS = Keimzellneoplasie *in situ*, SE = Seminom, EC = Embryonalkarzinom, CC = Chorionkarzinom, NS = Nichtseminome [11]).

Die klinische Klassifizierung der Keimzelltumoren, also des jeweiligen primären Hodentumors eines bestimmten Patienten, erfolgt anhand von drei verschiedenen Systemen: der TNM-Klassifizierung, der Klassifikation des klinischen Stadiums und der IGCCCG-Klassifikation (aus dem Englischen „*International Germ Cell Consensus Classification*“ [18]. Die TNM-Klassifizierung gibt dabei die Ausdehnung des Primärtumors (T), den Befall etwaiger regionärer Lymphknoten (N) und das Vorliegen von Metastasen (M) an. Diese Kodierung, die auch bei anderen Tumoren Anwendung findet, wird bei den Hodentumoren noch um das Vorliegen der Serummarker LDH (Lactatdehydrogenase), beta-HCG (Humanes Choriongonadotropin) und AFP (Alpha-Fetoprotein) erweitert [19]. Die Klassifikation des klinischen Stadiums (im Englischen sog. „*staging*“) dient vor allem der Festlegung von Therapiestrategien, sowie der Prognoseeinschätzung und ist unterteilt in drei Stadien [20]. Im Stadium I ist ausschließlich der Hoden befallen, im Stadium II liegt bereits eine lymphogene Metastasierung in das Retroperitoneum vor, vom Stadium III spricht man, wenn eine lymphogene Metastasierung oberhalb des Zwerchfells oder eine hämatogene Fernmetastasierung vorliegt [20]. Abschließend kommt bei allen metastasierten Hodentumoren noch die IGCCCG-Klassifikation zu tragen, welche als Prognosesystem dient [18]. Hierbei erfolgt eine Zuordnung zu den Gruppen „gute Prognose“ (5-Jahres-Überlebensrate > 90 %), „mittlere Prognose“ (5-Jahres-Überlebensrate 75 %) und „schlechte Prognose“ (5-Jahres-Überlebensrate 50 %), wobei es die letzte Gruppe der schlechten Prognose bei Seminomen nicht gibt [18]. Vereinfacht

lässt sich sagen, dass sich hierbei die Prognose mit zunehmender Höhe der Tumormarker im Serum, sowie mit dem Vorliegen extrapulmonaler Metastasen verschlechtert [18].

Generell betrachtet haben Hodentumoren jedoch prognostisch gute Aussichten, so liegt die 5-Jahres-Überlebensrate insgesamt bei über 97 %, was vor allem an den heutigen Therapiemöglichkeiten liegt [5].

1.4. Therapieoptionen testikulärer Keimzelltumoren und ihre Nebenwirkungen

Die Therapieoptionen der testikulären Keimzelltumoren bestehen aus der operativen Versorgung, der aktiven Überwachung, der Chemo-, sowie der Strahlentherapie, wobei sich die Wahl der jeweiligen Therapiestrategie nach der vorliegenden Tumorart und dem jeweiligen Stadium richtet [18].

Generell steht an erster Stelle die operative Entfernung des betroffenen Hodens (sog. „*Ablatio testis*“), welche möglichst rasch nach der Befunderhebung erfolgen sollte und nur in seltenen Fällen, wenn beispielsweise eine vitalbedrohliche Metastasierung einer dringlicheren Behandlung bedarf, zurückgestellt wird [13]. Die operative Behandlung kann in Fällen einer Metastasierung noch auf eine Entfernung dieser, sowie die Ausräumung verschiedener Lymphknoten im Bauchraum erweitert werden [20]. Diese sog. retroperitoneale Lymphknotenadenektomie bietet das Risiko einer Verletzung sympathischer Nervenfasern, was zum Verlust der antegraden Ejakulation führen kann [20]. Im Stadium I und ohne das Vorliegen weiterer Risikofaktoren, wie beispielsweise keine lymphogene Metastasierung, reicht eine aktive Überwachung (im Englischen sog. „*active surveillance*“) aus, bei der der Patient zwar engmaschig hinsichtlich möglicher Rezidive oder Tumorprogression kontrolliert wird, ansonsten aber keine Therapie erhält [6]. Im Falle einer bestehenden Metastasierung oder als adjuvante Therapie, um Rezidiven vorzubeugen, finden die Chemo- und Strahlentherapie Anwendung [20]. Hierbei überwiegt die Chemotherapie jedoch die Strahlentherapie, welche nur bei Seminomen angewendet und auch häufig nur als Alternative zur Chemotherapie angeboten wird [13]. Die Standardstrahlendosen betragen 20, 30 oder 36 Grey [18]. Dabei kann es zu akuten Nebenwirkungen, wie beispielsweise Hautrötungen, Übelkeit, Diarrhoen, oder chronischen Nebenwirkungen, wie zum Beispiel Gefäßverengungen oder Fibrosen kommen [21]. Bei der Chemotherapie werden je nach Stadium der Erkrankung verschiedene Substanzen und verschiedene Anzahlen an Zyklen verwendet [18]. Bei den dabei gebräuchlichen Chemotherapeutika handelt es sich um Carboplatin, Cisplatin (P), Bleomycin (B), Etoposid (E) und Ifosfamid (I), hierbei sind die Kombinationen BEP, EP und PEI als gängige Schemata gebräuchlich [18]. Carboplatin und Cisplatin sind Platinanaloga und erzielen ihre

chemotherapeutische Wirksamkeit über die Vernetzung von DNS-Strängen und daraus resultierenden DNS-Doppelstrangbrüchen [22]. Bleomycin ist ein zytostatisch wirkendes Antibiotikum, welches durch die Bildung von Radikalen zu Brüchen des DNS-Doppelhelix führt [22]. Bei Etoposid handelt es sich um einen Topoisomerasehemmer, wodurch es zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen der DNS kommt [22]. Ifosfamid gehört zur Substanzgruppe der Alkylantien, welche Alkylgruppen übertragen können, sodass es zu Quervernetzungen von DNS-Strängen kommt und diese folglich während der Zellteilung nicht mehr korrekt dupliziert werden können [22]. Das weite Spektrum der akuten Nebenwirkungen erstreckt sich von Übelkeit, Immunsuppression und Anaphylaxie bis hin zu spezifischeren Nebenwirkungen wie Lungen- oder Hauttoxizität [22]. Zu den später auftretenden Nebenwirkungen der Chemotherapeutika gehören beispielsweise Polyneuropathie oder Unfruchtbarkeit [22].

Ein weiterer großer Nachteil sowohl der Strahlen-, als auch der Chemotherapie stellt die Entwicklung von sog. Zweit-Malignomen dar [23]. So führen beide Therapiearten zu einem deutlich erhöhten Risiko eine Leukämie zu entwickeln [13]. Auch das Risiko für das Auftreten eines soliden Zweit-Tumors ist innerhalb der ersten fünf Jahre nach der Therapie erhöht [24]. Bei diesen soliden Tumoren handelt es sich um maligne Melanome, sowie Lungen-, Schilddrüsen-, Ösophagus-, Pleura-, Magen-, Darm-, Pankreas-, Nieren- und Blasentumore [24] [25]. Daher ist eine engmaschige Nachsorge nicht nur in Hinblick auf die Gefahr eines möglichen Rezidivs, sondern auch aufgrund der mannigfaltigen Spät-Toxizitäten sehr relevant.

1.5. Zellzyklus und spezifische Funktionen von CDK4 und CDK6

Der Zellzyklus dient der Zellteilung bzw. Zellvermehrung und wird unterteilt in G_1 -, S-, G_2 - (bilden zusammen die sog. Interphase) und M-Phase [26]. Die G_1 -Phase stellt die Wachstumsphase dar und bereitet die Zelle durch die Neusynthese von Proteinen auf die S-Phase vor [27]. Außerdem befindet sich hier ein Restriktionspunkt, der darüber entscheidet, ob der Zellzyklus erneut durchlaufen wird oder die Zelle zunächst in eine Ruhephase (G_0 -Phase) übergeht [26]. In der anschließenden S-Phase (Synthese-Phase) findet die eigentliche Replikation der DNS statt, sodass am Ende das genetische Material der Zelle doppelt vorliegt [27]. Daraufhin schließt sich die G_2 -Phase an. Hier werden zum einen Proteine synthetisiert, welche für die Mitose benötigt werden, und zum anderen kontrolliert, ob die DNS fehlerfrei dupliziert vorliegt [26]. Etwaige Fehler können durch Reparaturmechanismen korrigiert werden oder dazu führen, dass die Zelle die Apoptose, sprich den programmierten Zelltod, einleitet [26]. In der M-Phase (Mitose-Phase) werden die Schwesterchromatiden getrennt und jeweils auf zwei Tochterzellen verteilt,

sodass am Ende jede neu entstandene Zelle über eine Kopie der genetischen Information verfügt [26]. Dabei lässt sich die Mitose wiederum in verschiedene Phasen unterteilen: Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase, Telophase und Zytokinese [27]. Nach der M-Phase tritt die Zelle entweder wieder in die G₁-Phase ein oder verbleibt zunächst in der ruhenden G₀-Phase [27].

Da es sich beim Zellzyklus um einen sehr komplexen Prozess handelt, bei dem Fehler zu schwerwiegenden Folgen führen können, unterliegt er mehreren Kontrollmechanismen [27]. Diese Kontrollmechanismen können an drei verschiedenen Kontrollpunkten zu einem Abbruch des Zellzyklus führen, sollten im vorherigen Schritt Fehler unterlaufen sein [27]. Diese Kontrollpunkte liegen am Übergang der G₂-Phase zur Mitose (G₂-Kontrollpunkt), am Übergang der Mitose zur G₁-Phase (Metaphasekontrollpunkt), sowie am Übergang der G₁-Phase zur S-Phase (G₁-Kontrollpunkt) und werden vorrangig von zwei Proteingruppen beeinflusst: die Zykline und die zyklinabhängigen Proteinkinasen (aus dem Englischen „*cyclindependent protein kinases*“, CDK) [27]. CDKs sind in ihrer Aktivität abhängig von Phosphorylierung und der Bindung an Zykline, die eine regulatorische Untereinheit für die CDKs bilden [26]. CDKs liegen während des Zellzyklus immer in derselben Konzentration vor, sind enzymatisch aktiv und können andere Proteine phosphorylieren, während die Konzentration der Zykline sich periodisch im Verlauf des Zellzyklus ändert und diese nicht enzymatisch aktiv sind [26]. In menschlichen Zellen gibt es mehrere CDK-Gene, die an der Regulation zellulärer Prozesse beteiligt sind, jedoch spielen bei der Zellzykluskontrolle nur CDK1, CDK2, CDK4 und CDK6 eine Rolle [26]. CDK1 und CDK2 sind wichtig für den G₂- und den Metaphasekontrollpunkt, während CDK4 und CDK6 entscheidend für den G₁-Kontrollpunkt sind [26]. Da sich diese Arbeit mit der pharmakologischen Inhibition von CDK4 und CDK6 beschäftigt, werde ich im Folgenden lediglich die Funktion und Regulation dieser beiden ausführlicher darlegen und nicht näher auf CDK1 und CDK2 eingehen.

CDK4 und CDK6 interagieren mit Zyklinen D1, D2 und/oder D3 und werden durch eine Komplexbildung mit diesen aktiviert (siehe Abb. 5) [26][28]. Die zelleigenen Inhibitoren der INK4-Gruppe mit den Proteinen p15, p16, p18 und p19 können spezifisch mit CDK4 und CDK6 interagieren und so deren Aktivierung durch Zyklin D1 verhindern [26]. Wenn die Zelle von der G₁- in die S-Phase übergehen soll, kommt es zu einer Akkumulation des CDK4/6-Zyklin-D-Komplexes, was zu der Phosphorylierung des Substrates pRB (Retinoblastom-Protein) führt (siehe Abb. 5)[28]. pRB ist ein Tumorsuppressor-Protein, das E2F-Proteine binden kann, die als Transkriptionsfaktoren für den Übergang der Zelle aus der G₁- in die S-Phase dienen [26]. Durch die Phosphorylierung von pRB durch CDK4/6 kommt es zu strukturellen Veränderungen und die Bindung der E2F-Proteine löst sich (siehe Abb. 5) [28]. E2F wiederum stimuliert unter anderem die Transkription von Zyklin E und S-Phase-

Genen, welche für die DNS-Replikation, -Reparatur und die weiteren Kontrollpunkte relevant sind (siehe Abb. 2) [26]. Zyklin E stellt im Komplex mit CDK2 einen positiven Feedbackmechanismus dar, da es zur verstärkten Phosphorylierung von pRB und somit zu dessen weiterer Inaktivierung führt (siehe Abb. 5) [26]. Somit stellen CDK4 und CDK6 äußerst relevante Akteure des Zellzyklus dar, deren Inhibition einen Abbruch der Zellteilung zur Folge hat.

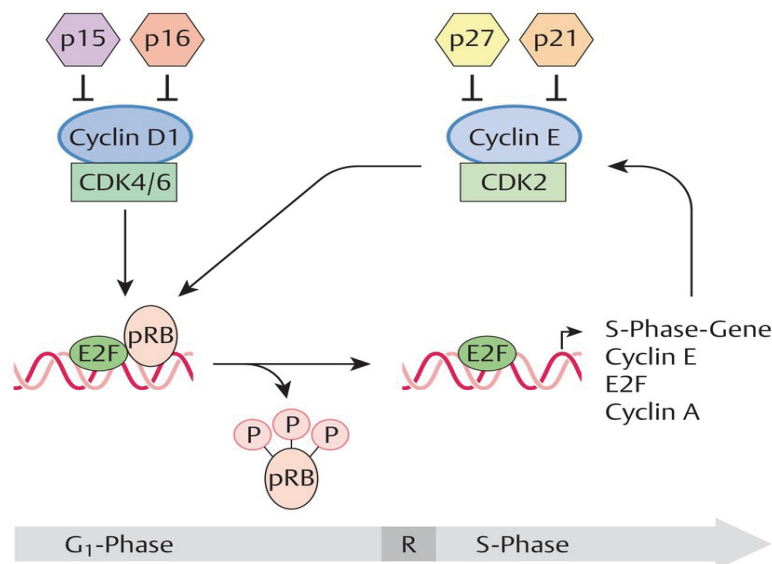


Abbildung 5: Regulation des G1/S-Übergangs durch CDK4/6/Zyclin D und E2F [26].

1.6. Pharmakologische Inhibition von CDK4/6

Neben den zelleigenen Inhibitoren von CDK4 und CDK6, den Proteinen der INK4-Gruppe (s.o.), gibt es auch die Möglichkeit mittels pharmakologischen Substanzen CDK4/6 zu inhibieren. Bisher sind drei verschiedene Inhibitoren bekannt: Palbociclib (PD0332991, Ibrance, Pfizer), Ribociclib (LEE011, Kisqali, Novartis) sowie Abemaciclib (LY2835219, Verzenio, Eli Lilly) [29]. Dabei sind sich die beiden Substanzen Palbociclib und Ribociclib hinsichtlich ihrer pharmakologischen Charakteristika und Nebenwirkungen sehr ähnlich [30]. So zeigen beide als mögliche Nebenwirkungen das Auftreten von Neutro- und Thrombozytopenien, während als vorrangige Nebenwirkung von Abemaciclib Fatigue zu nennen ist [30]. Darüber hinaus werden Palbo- und Ribociclib nur über einen bestimmten Zeitraum eingenommen, während die Einnahme von Abemaciclib kontinuierlich erfolgen muss [30].

1.6.1. Wirkung von Palbociclib und Ribociclib

Palbo- und Ribociclib sind reversibel-wirksame und oral bioverfügbare Pyridopyrimidine [29]. Sie binden an die ATP-Bindestellen von CDK4 und CDK6, was zur Inaktivierung des Zyklin-D-CDK4/6-Komplexes führt [31]. Dadurch kommt es zur Hypophosphorylierung des Rb-Proteins, sodass sich der Transkriptionsfaktor E2F nicht lösen kann, der Zellzyklus nicht weiter fortschreiten und die Zellen in einen Arrest der G₁/G₀-Phase eintreten [29]. Da maligne Zellen zum einen durch eine erhöhte Proliferationsrate gekennzeichnet sind, und zum anderen viele solide Tumoren eine Dysregulation der zelleigenen CDK4/6-Inhibition mittels INK4-Proteine zeigen, greifen Palbo- und Ribociclib gezielt die Tumorphosphorylierung solider Tumoren an [31]. Außerdem zeigen Studien an Mausmodellen, dass die Inhibition von CDK4/6 auch zu einer immunologischen Antwort gegen die Tumorzellen führt [32]. So kommt es einerseits zur Ausschüttung von verschiedenen Interferonen, die zu einer verstärkten Präsentation der Tumor-Antigene führt und zum anderen zu einer Runterregulation regulatorischer T-Zellen bei gleichzeitiger Hochregulation zytotoxischer T-Zellen [32]. Regulatorische T-Zellen unterdrücken normalerweise die körpereigene Immunantwort, um die Selbsttoleranz zu steigern [33]. Die zytotoxischen T-Zellen erkennen die Tumor-Antigen und greifen die Tumorzellen daraufhin an [34]. Die dosislimitierenden Nebenwirkungen der beiden Substanzen sind die Neutropenie bei Palbociclib und Neutropenie, Mukositis, Thrombozytopenie, pulmonare Embolien, erhöhte Kreatininwerte, Hyponatriämie und QT-Zeit-Verlängerungen bei Ribociclib, wobei zu ergänzen ist, dass diese Nebenwirkungen selten auftreten [31].

1.6.2. Aktuelle klinische Verwendung der Inhibitoren und laufende Studien

Palbociclib und Ribociclib werden leitliniengerecht in der Behandlung des metastasierten HR-positiven, HER-negativen Mammakarzinoms empfohlen und eingesetzt [35]. Hierbei meint HR-positiv, dass die Tumorzellen Hormonrezeptoren tragen und somit empfänglich für eine endokrine Therapie (z.B. Tamoxifen oder Aromataseinhibitoren) sind, während HER-negativ beschreibt, dass die Tumorzellen nicht den Humanen Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor exprimieren und damit nicht mit gegen diesen Rezeptor gerichteten Antikörpern behandelt werden können [36] [37]. Die Behandlung mit Palbo- oder Ribociclib wird daher stets mit einer endokrinen Therapie kombiniert [38]. Palbociclib wird dabei in einer Dosierung von 125 mg p.o. und Ribociclib in einer Dosierung von 600 mg p.o. täglich eingenommen, beide über einen Zeitraum von 21 Tagen und einer einmaligen Wiederholung am 29. Tag [39]. Es bestehen keine Hinweise auf die Überlegenheit eines bestimmten CDK4/6-Inhibitors [39]. Positiv hervorzuheben ist

außerdem die geringe (Palbociclib) bis moderate (Ribociclib) emetogene Potenz der CDK4/6-Inhibitoren gegenüber den herkömmlichen Chemotherapeutika [39].

Neben der aktuellen klinischen Verwendung von Palbo- und Ribociclib in der Brustkrebstherapie, werden aktuell mehrere Studien durchgeführt, die sich mit der Anwendung der beiden Substanzen bei anderen Tumorentitäten, wie beispielsweise dem Ovarialkarzinom beschäftigen [40]. In Mausmodellen konnte durch die Behandlung mit Palbociclib das Wachstum von Kolontumoren, Glioblastomen und Prostatakarzinomen erfolgreich arretiert werden [31]. Auch in AML-Zellen konnte durch die Gabe der CDK4/6-Inhibitoren Palbociclib und Abemaciclib *in vitro* eine Induktion von Apoptose nachgewiesen werden [41]. Für das Mantelzell-Lymphom konnte die Wirksamkeit von Palbociclib sogar in einer Pilotstudie (Phase II abgeschlossen) an ausgewählten Patienten, bei denen die herkömmliche Therapie versagt hatte, gezeigt werden [30]. Ribociclib führte *in vitro* bei Liposarkom-Zellen zu einer effektiven und bei Melanom-Zellen zu einer moderaten Wachstumshemmung [31]. Die anschließende Phase-I-Studie konnte die Wirksamkeit von Ribociclib gegenüber Liposarkomen am Patienten bestätigen [30]. Ebenso führte die Kombination aus Ribociclib und Cisplatin bei Ovarialkarzinom-Zelllinien zu synergistischen Effekten, welche auch *in vivo* am Mausmodell validiert werden konnten [40]. Es lässt sich folglich sagen, dass sich der Einsatz von Palbo- und Ribociclib nach der erfolgreichen Zulassung in der Therapie des metastasierten Mammakarzinoms und den vielzähligen, sowie vielversprechenden Studien zur Wirksamkeit der CDK4/6-Inhibition, zukünftig wahrscheinlich auf viele andere Tumorentitäten ausweiten wird. Da es noch keine Studien zur Anwendung von CDK4/6-Inhibitoren bei Keimzelltumoren gibt, wird an dieser Stelle deutlich, welche hohe Relevanz dieser Arbeit zukommt.

1.7. Zielsetzung dieser Arbeit

Es stehen durch die operativen, chemo- und strahlentherapeutischen Therapieregime gute Behandlungsmöglichkeiten für die Keimzelltumoren des Mannes zur Verfügung, durch deren Anwendung 5-Jahres-Überlebensraten von 95-99 % erreicht werden [6]. Allerdings geht diese Therapie mit einem erhöhten Risiko für Zweit-Malignomen und Spättoxizitäten einher, was gerade bei dem jungen Erkrankungsalter der meisten Hodentumorpatienten problematisch ist [25]. Das Risiko für die Entwicklung von Zweit-Malignomen ist für mindestens 35 Jahre nach der Therapie erhöht [42]. Wie bereits oben beschrieben, ist außerdem das weite Spektrum der Nebenwirkungen der Chemo- und Strahlentherapie groß. Neben den akuten Nebenwirkungen und dem Auftreten von Zweit-Malignomen, haben die Patienten auch ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, ein metabolisches Syndrom, sowie Neuro- und Ototoxizität [43] [24]. Ein ebenfalls nicht zu

vernachlässigendes Problem ist die durch die Therapie verursachten Fertilitätseinschränkungen und erektilen Dysfunktionen [43]. Bei alleiniger operativer Therapie (d.h. Ablatio testis der betroffenen Seite) ist die Fertilität nicht so sehr eingeschränkt, wie bei anschließender adjuvanter Therapie, gleiches gilt für die erektile Dysfunktion, was zum einen durch direkte zytotoxische Effekte der Chemotherapeutika auf die Keimzellen und zum anderen durch neurotoxische Effekte an den für die Erektion relevanten Nerven begründet werden kann [18][44]. Gerade bei Platin-basierten und alkylierenden Chemotherapeutika wird das Risiko der Infertilität als besonders erhöht beschrieben [45].

Neben den mannigfaltigen Toxizitäten der Chemotherapeutika, kann es auch zu einer Resistenz gegen diese und somit zu einem Progress der Erkrankung trotz Therapie kommen. Vorrangig ist hierbei die Cisplatin-Resistenz zu nennen, die sich im Laufe der Therapie bei 10-15% der Patienten im metastasierten Krankheitsstadium entwickelt [46]. Generell scheint diese Resistenz-Entwicklung multifaktorieller Genese zu sein [47]. Dabei spielen verschiedene Resistenzmechanismen eine Rolle und ergänzen sich gegenseitig: eine reduzierte Aufnahme von Cisplatin in die Tumorzellen, ein erhöhter Export von Cisplatin aus den Tumorzellen heraus, eine erhöhte Detoxifizierung, eine reduzierte Cisplatin-DNS-Addukt-Bildung, eine verbesserte DNS-Reparatur in den Tumorzellen, eine reduzierte Apoptoseinduktion und die Aktivierung von antagonistischen Signalwegen gegen den Cisplatinmechanismus [46].

Es lässt sich folglich ableiten, dass eine Einsparung chemo- oder strahlentherapeutischer Behandlungsstrategien vor allem in dem vulnerablen jungen Patientenalter der Hodenkrebspatienten sehr wichtig ist und somit trotz der bestehenden guten Behandlungserfolge eine Notwendigkeit für alternative Therapiemöglichkeiten besteht. Wie bereits oben beschrieben, hat sich die pharmakologische CDK4/6-Inhibition in vielen verschiedenen Tumorentitäten, sei es *in vitro* oder *in vivo*, als vielversprechend und wirksam gezeigt, sodass eine Übertragung auf Keimzelltumorzellen nahe lag. Die Zielsetzung dieser Arbeit war also, zu zeigen, dass eine CDK4/6-Inhibition mittels der Substanzen Palbo- und Ribociclib *in vitro*, d.h. in Keimzelltumorzelllinien, das Wachstum reduziert. Gleichzeitig wurde auch untersucht, um welche Art des Effektes es sich handelt. Das heißt, ob und welche Veränderungen des Zellzyklus auftreten oder ob es sogar zur Induktion von Apoptose kommt. Darüber hinaus wurden in die Testung auch Cisplatin-resistente Subtypen der Keimzelltumorzelllinien inkludiert, was auch eine Einschätzung der Wirksamkeit von Palbo- und Ribociclib gegenüber Cisplatin-resistenten Hodentumoren erlaubt.

Diese Arbeit schafft somit Grundlage für weitere Projekte, da bei erfolgreicher Testung zum einen der genaue Wirkmechanismus weiter untersucht werden muss und zum anderen eine Übertragung der Ergebnisse auf ein *in vivo*-Mausmodell erfolgen sollte. Grundsätzlich ermöglicht diese Arbeit, dass die Inhibition von CDK4/6 als generelle Therapiemöglichkeit bei Keimzelltumoren festgestellt wird.

2. Material und Methoden

Studennummer des Ethikvotums: 2018-254-FmB

2.1. Material

2.1.1. Humane Keimzelltumor- und Kontrollzelllinien

Übersicht der verwendeten humanen Keimzelltumorzelllinien und Kontrollzelllinien. Dabei wurden von den Zelllinien 2102EP, NCCIT und NT2/D1 jeweils auch Cisplatin-resistente Subtypen verwendet. Aufgeführt sind der Ursprung des Gewebes und das Geschlecht des Patienten, aus denen die jeweiligen Zelllinien gewonnen wurden. Da Chorionkarzinome bislang nicht erfolgreich aus männlichem Ursprungsgewebe kultiviert werden konnten, wurden für diese Arbeit Zelllinien mit weiblichem Ursprung verwendet.

Zelllinie	Ursprung	Geschlecht
TCam-2	Seminom	männlich
2102EP; 2102EP-Resistente	Embryonalkarzinom	männlich
NCCIT; NCCIT-Resistente	Embryonalkarzinom	männlich
NT2/D1; NT2/D1-Resistente	Embryonalkarzinom	männlich
JAR	Chorionkarzinom	weiblich
JEG-3	Chorionkarzinom	weiblich
BeWo	Chorionkarzinom	weiblich
VHF2	Vorhautfibroblasten	männlich

ARZ	Neonatale Fibroblasten	männlich
MPAF	Adulte Fibroblasten	männlich
FS1	Sertoli-Zellen	männlich
HLAK	Harnblasenepithelzellen	männlich
THP-1	Monozyten	männlich
HEK293	Embryonale Nierenzellen	weiblich
HaCaT	Keratinocyten	männlich
MCF7	Mammakarzinomzellen	weiblich

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten humanen Keimzelltumorzelllinien und Kontrollzelllinien.

2.1.2. Materialien der Zellkultur

Übersicht der Komponenten für die Standard-Kultivierung von Keimzelltumor- und Kontrollzelllinien in der Zellkultur. Aufgeführt sind die jeweiligen Materialien mit dem dazugehörigen Hersteller und Hauptsitz des Herstellers.

Material	Hersteller	Hauptsitz
(D)PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Accutase Lösung	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Automatischer Zellzähler TC20TM	BioRad	Feldkirchen, Deutschland
CnT-Prime-Medium	CELLnTEC	Bern, Schweiz
CO ₂ -Inkubator HeraCell 150i	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Collagen IV-Lyophilisat	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
DMEM Medium	Gibco	Schwerte, Deutschland

DMSO	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
F-12 (Nutrient Mixture (Ham))	Gibco	Schwerte, Deutschland
FCS	Biochrom/MERCK	Darmstadt, Deutschland
Glas-Pasteur-Pipetten	Brand	Wertheim, Deutschland
Kühlzentrifuge Allegra 2IR Centrifuge	Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland
L-Glutamin	Gibco	Schwerte, Deutschland
Mikroskope Ts2, TE2000-S	Nikon	Düsseldorf, Deutschland
Nicht-essenzielle Aminosäuren	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
NIS Elements Software (Mikroskop)	Nikon	Düsseldorf, Deutschland
P/S	Gibco	Schwerte, Deutschland
Pipetten 0,5 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,5 ml	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Röhrchen 15 ml/50 ml	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
RPMI	Gibco	Schwerte, Deutschland
Sterile Pipetten 5 ml/10 ml/25 ml	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
T-75 Zellkultur-Flaschen	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Trypanblau 0,4 %	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland

Trypsin-EDTA 0,05 % Phenolrot	Gibco	Schwerte, Deutschland
Vortex Mixer	Scientific Industries	Bohemia, NC, USA
Zählkammern	BioRad	Feldkirchen, Deutschland
Zentrifuge 5810	Eppendorf	Hamburg, Deutschland

Tabelle 2: Übersicht der Komponenten für die Standard-Kultivierung von Keimzelltumor- und Kontrollzelllinien in der Zellkultur.

2.1.3. Zellkulturmedien und Supplemente

Die verschiedenen Zelllinien wurden in unterschiedlichen Zellmedien kultiviert, die auch hinsichtlich der Supplemente variieren.

Jedem Medium wurde Fetales Kälberserum (FCS) supplementiert, welches viele Proteine und Wachstumsfaktoren enthält, die für die Kultivierung der Zellen notwendig sind. Um Kontaminationen der Medien zu vermeiden, werden außerdem 50 U/ml Penicillin/Streptomycin (P/S) beigemischt. Einige Zelllinien sind darüber hinaus nicht in der Lage, eigenständig L-Glutamin und/oder nicht-essentielle Aminosäuren zu synthetisieren, weshalb einigen Zellmedien 200 nM L-Glutamin und/oder nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA) hinzugefügt werden.

Übersicht der zelllinienabhängigen Zellmedien mit den jeweiligen Supplementen.

Zelllinie	Medium	Supplemente
TCam-2 NCCIT; NCCIT-Resistente THP-1	RPMI Medium 1640 (1X)	10% FCS 50 U/ml P/S 200 nM L-Glutamin
2102EP; 2102EP-Resistente NT2/D1; NT2/D1-Resistente JAR	DMEM (1X) + GlutaMAX™-I	10% FCS 50 U/ml P/S 200 nM L-Glutamin

JEG-3		
BeWo	F-12 (1X)	10% FCS 50 U/ml P/S 200 nM L-Glutamin
ARZ MPAF	DMEM (1X) + GlutaMAX™- I	10 % FCS 50 U/ml P/S 200 nM L-Glutamin NEAA
FS1	DMEM (1X) + GlutaMAX™- I	20 % FCS 50 U/ml P/S 200 nM L-Glutamin
VHF2 HEK293 HaCaT MCF7	DMEM (1X) + GlutaMAX™- I	10 % FCS 50 U/ml P/S
HBLAK	CnT-Prime-Medium	

Tabelle 3: Übersicht der zelllinienabhängigen Zellmedien mit den jeweiligen Supplementen.

2.1.4. Verwendete CDK4/6-Inhibitoren

Die in dieser Arbeit verwendeten CDK4/6-Inhibitoren Palbo- und Ribociclib wurden von Pfizer und Novartis unentgeltlich zur Verfügung (MTA-Nr. WI238366 und PLSMTA18FEB46 an Prof. Dr. Daniel Nettersheim) gestellt.

Übersicht der verwendeten Inhibitoren mit den jeweiligen Herstellern und Lösemitteln.

Inhibitor	Name	Hersteller	Lösemittel
-----------	------	------------	------------

CDK4/6-Inhibitor	Palbociclib (IBRANCE®)	Pfizer	Aq. dest., pH 3
CDK4/6-Inhibitor	Ribociclib (Kisqali®)	Novartis	DMSO

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Inhibitoren mit den jeweiligen Herstellern und Lösemitteln.

2.1.5. Materialien für XTT-Assay

Zur spektrophotometrischen Messung der XTT-behandelten Platten wurde die Software OPTIMA der Firma BMG Labtech in der Version 2.20R2 genutzt.

Zur tabellarischen und graphischen Auswertung der LD₅₀ -Werte wurde GraphPad Prism 6.01 der Firma GraphPad Software Inc. benutzt.

Übersicht der für das XTT-Assay benötigten Materialien.

Material	Hersteller	Hauptsitz
96-Well-Platte	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Costar® Reagenzreservoir, 50 ml	Corning	Krailling, Deutschland
ELISA Platten-Lesegerät „FLUOstarOptima“	BMG Labtech	Ortenberg, Deutschland
Multikanalpipette	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Multipipette® stream	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
PMS (1,25 mM in PBS gelöst)	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
XTT (1 mg/ml gelöst in RPMI-Medium)	Cayman Chemical	Ann Arbor, MI, USA

Tabelle 5: Übersicht der für das XTT-Assay benötigten Materialien.

2.1.6. Materialien für Nicoletti-Assay zur Zellzyklusanalyse

Für den Nicoletti-Puffer wurden 0,1 % Triton-X100 und 0,1 % Natriumzitat in PBS gelöst.

Übersicht der für das Nicoletti-Assay zur Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie benötigten Materialien.

Material	Hersteller	Hauptsitz
6-Well-Platten	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
MACSQuant® und MACSQuant Analyzer 10, Version 2.13.0 Durchflusszytometer	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
MACSQuantify Software Version 2.11 zur Datenauswertung	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
PBS	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
PI (2 mg/ml gelöst in PBS, gelagert bei 4°C)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Polystyrol-Röhrchen	VWR Chemicals	Darmstadt, Deutschland
Trypsin-EDTA 0,05 % Phenolrot	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Vortex Mixer	Scientific Industries	Bohemia, NC, USA
Chemikalien für Nicoletti-Puffer		
Natriumzitat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)	MERCK	Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland

Tabelle 6: Übersicht der für das Nicoletti-Assay zur Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie benötigten Materialien.

2.1.7. Materialien für Annexin V/PI Apoptose-Assay

Für den Annexin V-Bindepuffer wurden 10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM Natriumchlorid, 5 mM Kaliumchlorid, 5 mM Magnesiumchlorid, 1,6 mM Calciumchlorid in PBS gelöst.

Übersicht der für das Annexin V/PI Apoptose-Assay mittels Durchflusszytometrie benötigten Materialien.

Material	Hersteller	Hauptsitz
6-Well-Platten	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
MACSQuant® und MACSQuant Analyzer 10, Version 2.13.0 Durchflusszytometer	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
MACSQuantify Software Version 2.11 zur Datenauswertung	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
Rekombinantes Annexin V FITC-Konjugat	ImmunoTools	Friesoythe, Deutschland
PBS	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
PI (2 mg/ml gelöst in PBS, gelagert bei 4°C)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Polystyrol-Röhrchen	VWR Chemicals	Darmstadt, Deutschland
Trypsin-EDTA 0,05 % Phenolrot	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Vortex Mixer	Scientific Industries	Bohemia, NC, USA
Chemikalien für Annexin V-Bindepuffer		
Calciumchlorid (CaCl ₂)	MERCK	Darmstadt, Deutschland
HEPES (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	CARL ROTH GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	MERCK	Darmstadt, Deutschland

Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	MERCK	Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	VWR Chemicals	Darmstadt, Deutschland

Tabelle 7: Übersicht der für das Annexin V/PI Apoptose-Assay mittels Durchflusszytometrie benötigten Materialien.

2.1.8 Materialien für RNA-Isolation und Proteinextraktion

Der verwendete RIPA-Puffer setzte sich zusammen aus 110 nM NaCl, 1% Triton X-100, 0,5% DOC, 0,1% SDS, 50mM Tris und wird auf einen pH von 8 eingestellt.

Der Phosphatase- und Protease-Inhibitor wurden jeweils 1%ig in RIPA-Puffer gelöst.

Übersicht der für die RNA-Isolation und die Proteinextraktion benötigten Materialien.

Material	Hersteller	Hauptsitz
PBS	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Phosphatase-Inhibitor	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Protease-Inhibitor	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
QIAzol® Lysis Reagent	QIAGEN	Hilden, Deutschland
Röhrchen 15 ml	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Trypsin-EDTA 0,05 % Phenolrot	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Zellkultur Schale, PS, 100/20 mm	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Zentrifuge 5810	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Chemikalien für RIPA-Puffer		
DOC (Sodium Deoxycholat, C ₂₄ H ₃₉ NaO ₄)	Sigma Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	VWR Chemicals	Darmstadt, Deutschland

SDS ultra pure (Dodecylsulfat, $C_{12}H_{25}NaO_4S$)	CARL ROTH GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Tris (Trisaminomethan, $NH_2C(CH_2OH)_3$)	VWR Chemicals	Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland

Tabelle 8: Übersicht der für die RNA-Isolation und die Proteinextraktion benötigten Materialien.

2.1.9. Materialien für BCA-Protein-Assay

Um die Quantität an Proteinen in den jeweiligen Proben zu bestimmen, wurde das BCA (Bicinchoninsäure)-Protein-Assay genutzt.

Als Kontrollprogramm zur spektrophotometrischen Messung der Platten wurde OPTIMA der Firma BMG Labtech mit der Software-Version 2.20R2 genutzt.

Der verwendete RIPA-Puffer setzte sich zusammen aus 110 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,5% DOC, 0,1% SDS, 50mM Tris und wird auf einen pH von 8 eingestellt.

Übersicht der für das BCA-Protein-Assay benötigten Materialien.

Material	Hersteller	Hauptsitz
96-Well-Platte	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Albumin Standard (Verdünnungsreihe in RIPA 2 mg, 1 mg, 0,5 mg, 0,25 mg, 0,125 mg, 0,063 mg, 0,032 mg)	Thermo Scientific	Schwerte, Deutschland
ELISA Platten-Lesegerät „FLUOstarOptima“	BMG Labtech	Ortenberg, Deutschland
Pierce™ BCA Protein Assay Reagent A/B	Thermo Scientific	Schwerte, Deutschland
Thermomixer Comfort	Eppendorf	Hamburg, Deutschland

Tischzentrifuge Mini Spin	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Chemikalien für RIPA-Puffer		
DOC (Sodium Deoxycholat, $C_{24}H_{39}NaO_4$)	Sigma Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	VWR Chemicals	Darmstadt, Deutschland
SDS ultra pure (Dodecylsulfat, $C_{12}H_{25}NaO_4S$)	CARL ROTH GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Tris (Trisaminomethan, $NH_2C(CH_2OH)_3$)	VWR Chemicals	Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland

Tabelle 9: Übersicht der für das BCA-Protein-Assay benötigten Materialien.

2.1.10. Materialien für SDS-Page und Western Blot

Der Laemmli-Puffer wurde als 6x Puffer bestehend aus 350 mM Tris mit pH 6,8, 350 mM SDS, 30 % Glycerol, 216 mM DTT und 0,1 % Bromphenolblau in Millipore-Wasser angesetzt.

In dieser Arbeit wurden 10%ige und 12%ige Polyacrylamid-Trenngele, sowie ein Polyacrylamid-Sammelgel genutzt. Die Trenngele wurden aus Millipore-Wasser, Acrylamid 30 %, 1,5 M Tris mit pH 8,8, 10 % SDS mit pH 7,2, 10% APS und TEMED (siehe Methoden) zusammengesetzt. Das Sammelgel aus Millipore-Wasser, Acrylamid 30 %, 1,5 M Tris mit pH 6,8, 10 % SDS mit pH 7,2, 10% APS und TEMED (siehe Methoden).

Für den verwendeten Elektrophorese-Puffer wurde der 10x Tris/Glycine/SDS Puffer im Verhältnis 1:10 mit Millipore-Wasser verdünnt.

Der Blotting-Puffer wurde zunächst als 5x Puffer mit 125 mM Tris und 960 mM Glycin in Millipore-Wasser angesetzt, anschließend wurde der pH auf 8,8 eingestellt und dann auf einen 1x Puffer mit 20% Methanol und Millipore-Wasser verdünnt.

Für die TBST-Waschlösung wurde zunächst ein 10x TBS-Puffer mit 198 mM Tris und 150 mM NaCl in Millipore-Wasser mit einem pH von 7,6 angesetzt. Dieser wiederum wurde dann mit Millipore-Wasser und 0,1% Tween zur TBST-Waschlösung verdünnt.

Der Stripping-Puffer wurde mit 1,5 % Glycin, 0,1 % SDS und 1 % Tween in Millipore-Wasser mit einem pH von 2,2 hergestellt.

Übersicht der benötigten Materialien für den SDS-Page und das Western Blot-Verfahren.

Material	Hersteller	Hauptsitz
BSA (Bovine Serum Albumin)	PAN-Biotech GmbH	Aidenbach, Deutschland
ChemiDoc™ Imaging System Version 2.3.0.07	BioRad	Feldkirchen, Deutschland
Clarity Max™ Western ECL Substrate	BioRad	Feldkirchen, Deutschland
Clarity™ Western ECL Substrate	BioRad	Feldkirchen, Deutschland
Immobilon®-P Transfer Membranes	MERCK	Darmstadt, Deutschland
Methanol	VWR Chemicals	Darmstadt, Deutschland
Milchpulver	CARL ROTH GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Mini-PROTEAN Tetra Cell (mit Kammer, Deckel, Elektrodenzubehör und Kompanion Laufmodul)	BioRad	Feldkirchen, Deutschland
Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (gelagert bei -20°C)	Thermo Scientific	Schwerte, Deutschland
Ponceau S Solution	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
PowerPac™ Basic Netzteil	BioRad	Feldkirchen, Deutschland
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	BioRad	Feldkirchen, Deutschland

Whatman™ Gel Blot Paper	GE Healthcare	Solingen, Deutschland
Laemmli Sample Puffer		
Bromphenolblau	United States Biochemical Corporation	Cleveland, OH, USA
DTT (Dithiothreitol, $C_4H_{10}O_2S_2$)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Glycerol ($C_3H_8O_3$)	MERCK	Darmstadt, Deutschland
SDS ultra pure (Dodecylsulfat, $C_{12}H_{25}NaO_4S$)	CARL ROTH GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Tris (Trisaminomethan, $NH_2C(CH_2OH)_3$)	VWR Chemicals	Darmstadt, Deutschland
Chemikalien für Polyacrylamid-Gele (Trenn- und Sammelgel)		
Acrylamid (C_3H_5NO)	CARL ROTH GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
APS (Ammoniumperoxodisulfat, $(NH_4)_2S_2O_8$)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
SDS ultra pure (Dodecylsulfat, $C_{12}H_{25}NaO_4S$)	CARL ROTH GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
TEMED (Tetramethylethyldiamin, $C_6H_{16}N_2$)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Tris (Trisaminomethan, $NH_2C(CH_2OH)_3$)	VWR Chemicals	Darmstadt, Deutschland
Chemikalien für Elektrophorese-Puffer		
10x Tris/Glycine/SDS Puffer	BioRad	Feldkirchen, Deutschland

Chemikalien für Blotting-Puffer (5x Puffer)		
Glycin	VWR Chemicals	Darmstadt, Deutschland
Tris (Trisaminomethan, $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$)	VWR Chemicals	Darmstadt, Deutschland
Chemikalien für TBST-Waschlösung		
Natriumchlorid (NaCl)	VWR Chemicals	Darmstadt, Deutschland
Tris (Trisaminomethan, $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$)	VWR Chemicals	Darmstadt, Deutschland
Tween	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Chemikalien für Stripping-Puffer		
Glycin	VWR Chemicals	Darmstadt, Deutschland
SDS ultra pure (Dodecylsulfat, $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$)	CARL ROTH GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Tween	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland

Tabelle 10: Übersicht der benötigten Materialien für den SDS-Page und das Western Blot-Verfahren.

2.1.11. Verwendete Antikörper

Übersicht der im Western Blot-Verfahren verwendeten Antikörper.

Antikörper	Hersteller/Ort	Blocking-Puffer	Konzentration
Primäre Antikörper			
Anti-GAPDH antibody [6C5]: ab8245	Abcam; Cambridge, UK	5%ige Milch	1: 10000 - 1:40000
Cdk4 (O.N.199): sc-70832	Santa Cruz Biotechnology; Heidelberg, Deutschland	5%ige Milch	1:1000

Cdk4 (DCS-31): sc-56277	Santa Cruz Biotechnology; Heidelberg, Deutschland	5%ige Milch	1:1000
Cdk6 (B-10): sc- 7961	Santa Cruz Biotechnology; Dallas, TX, USA	5%ige Milch	1:1000
E2F-1 (KH95): sc-251	Santa Cruz Biotechnology; Heidelberg, Deutschland	5%ige Milch	1:1000
E2F-3 (C-18): sc- 878	Santa Cruz Biotechnology; Heidelberg, Deutschland	5%ige Milch	1:1000
FoxM1 (D12D5) XP® Rabbit mAb	Cell Signaling Technology; Frankfurt a. M., Deutschland	5%iges BSA 5%ige Milch	1:500, 1:1000
Monoclonal Anti- b-Actin Clone AC- 15	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland	5%ige Milch	1:20000
p-Rb (78.T821/826): sc-135776	Santa Cruz Biotechnology; Heidelberg, Deutschland	5%iges BSA	1:1000
p-Rb (B-4): sc- 514031	Santa Cruz Biotechnology; Heidelberg, Deutschland	5%ige Milch	1:1000
p-Rb (B-7): sc- 377527	Santa Cruz Biotechnology; Heidelberg, Deutschland	5%iges BSA	1:1000
Rb (C-15): sc-50	Santa Cruz Biotechnology; Heidelberg, Deutschland	5%iges BSA 5%ige Milch	1:1000, 1:1500

Rb (D20) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology; Frankfurt a. M., Deutschland	5%iges BSA 5%ige Milch	1:500, 1:1000
Rb (M-153): sc- 7905	Santa Cruz Biotechnology; Heidelberg, Deutschland	5%ige Milch	1:1000
Sekundäre Antikörper			
Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate (1706516)	BioRad; Feldkirchen, Deutschland	1%iges BSA 1%ige Milch	1:20000
Goat Anti-Rabbit IgG H&L (ab6721)	Abcam; Cambridge, UK	1%iges BSA 1%ige Milch	1:5000

Tabelle 11: Übersicht der im Western Blot-Verfahren verwendeten Antikörper.

2.2. Methoden

2.2.1. Kultivierung

Die humanen Keimzelltumorzelllinien und die Kontrollzelllinien wurden in DMEM-, RPMI- oder CnT-Prime-Medium mit den jeweils zelllinienabhängigen Supplementen (siehe 1.1.3.) in T-75-Flaschen im Inkubator bei 37°C und einem 5%igem CO₂-Gehalt kultiviert.

Die Harnblasenepithelzelllinie HBLAK wurde in zuvor mit Collagen beschichteten T-75-Flaschen kultiviert.

2.2.2. Passagieren der Zellen

Die Zelllinien wurden abhängig von der jeweiligen Wachstumsgeschwindigkeit bei einer Konfluenz von 70-90% passagiert.

In einem ersten Schritt wurde das Zellmedium der T-75-Flasche abgesaugt und die Zellen durch Zugabe von 4 ml PBS gewaschen. Um die adhärenen Zellen anschließend vom Flaschenboden zu lösen, wurde das PBS wieder abgesaugt und 1 ml Trypsin (0,05 %) für

1-5 Minuten bei 37°C hinzugegeben. Da die enzymatische Reaktion des Trypsins nach einiger Zeit zu einer Schädigung der Zellen führen würde, wurde die Reaktion durch die Zugabe von 4 ml FCS-haltigem Medium gestoppt.

Bei der Harnblasenepithelzelllinie HBLAK wurde zum Ablösen der Zellen vom Flaschenboden 5 ml Accutase bei 37° C im Inkubator verwendet. Anschließend wurde die Zell-Accutase-Suspension zusammen mit 5 ml CnT-Prime-Medium für 5 Minuten bei 1000 rpm/min abzentrifugiert. Danach wurde der Überstand vom Zellpellet abgesaugt und in eine collagenisierte T-75-Flasche mit 12 ml CnT-Prime-Medium resuspendiert. Dabei musste auf ein Passagierverhältnis von 1:3 bis 1:5 geachtet werden, da diese Zelllinie dicht gehalten werden muss, um optimal zu wachsen.

Da die Zelllinie THP-1 nicht adhärent ist, sondern als Suspensionskultur wächst, konnte hier einfach direkt ein Teil der Zellsuspension in eine neue T-75-Flasche überführt werden.

2.2.3. Zellzählung

Die Zellzählung wurde mittels Trypanblau-Färbung mit einem automatischen Zellzähler (TC20TM, BioRad) durchgeführt. Dafür wurden 10 µl Trypanblau (0,4%) mit 10 µl der jeweiligen Zellsuspension vermengt und davon wiederum 10 µl in eine Zellkammer überführt. Der Zellzähler ermittelte dann sowohl die Zellzahl pro ml, sowie die Anzahl vitaler Zellen in Prozent.

2.2.4. Proteinextraktion

Das Aussäen und Behandeln der Zelllinien mit den Inhibitoren für die Proteinextraktion erfolgten in einer Schale mit einem 10 cm Durchmesser. Dabei wurden pro Schale 2×10^6 Zellen in 8 ml Medium ausgesät und nach ungefähr 24 Stunden mit den Inhibitoren behandelt. Für Palbociclib wurde in einer Konzentration von 10 µM und Ribociclib in einer Konzentration von 25 µM verwendet. Die entsprechenden Lösemittelkontrollen waren wieder H₂O pH3 für Palbociclib und DMSO für Ribociclib. Dafür wurde zunächst das alte Medium aus den Schalen abgesaugt und die Zellen dann mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Inhibitoren bzw. die Lösemittelkontrollen gelöst in 8 ml frischen Medium gelöst auf die jeweiligen Schalen appliziert. Die Behandlung mit den Inhibitoren erfolgte für 16 Stunden bei 37°C im Inkubator.

Für die Proteinextraktion wurden das Medium der 10 cm Schalen zunächst abgesaugt und die Zellen mit 3 ml PBS gewaschen. Durch die Zugabe von 1 ml Trypsin (0,05 %) für 3-5

Minuten bei 37°C im Inkubator wurde die Adhärenz der Zellen an den Schalenboden gelöst. Mit 9 ml Medium wurde die Reaktion gemischt und die Zellsuspension zu selben Anteilen (jeweils 5 ml) auf zwei Greiner-Röhrchen verteilt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, nochmals mit 2 ml PBS gewaschen und wiederrum abzentrifugiert. In einem nächsten Schritt wurde die überschüssige Suspension bis zum Zellpellet abgesaugt.

Für die Proteinextraktion wurden die Zellen dann in 150 µl RIPA-Puffer mit 1%igem Phosphatase- und 1%igem Protease-Inhibitor aufgenommen und für 30 Minuten auf Eis inkubiert bevor sie in einer Kühlzentrifuge bei 4°C und 12000 g für 10 Minuten zentrifugiert wurden. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, sodass die Proben für den BCA-Protein-Assay (siehe 1.2.9) vorlagen.

2.2.5. XTT-Assay

Um die Zellviabilität und Zelltoxizität der Inhibitoren auf die Zellen zu untersuchen wurde das Verfahren des XTT-Assays gewählt.

XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-innersalt-2H-tetrazolium, monosodium salt) ist ein Farbstoff, welcher sich durch die Reduktion seines Tetrazolringes hell orange verfärbt [48]. Die für die Reduktion erforderlichen Dehydrogenasen sind bei vitalen Zellen im Mitochondrium lokalisiert, sodass das farbige Reaktionsprodukt Formazan nur in lebenden, metabolisch aktiven Zellen gebildet werden kann [48]. PMS dient dabei als Elektronenüberträger [48].

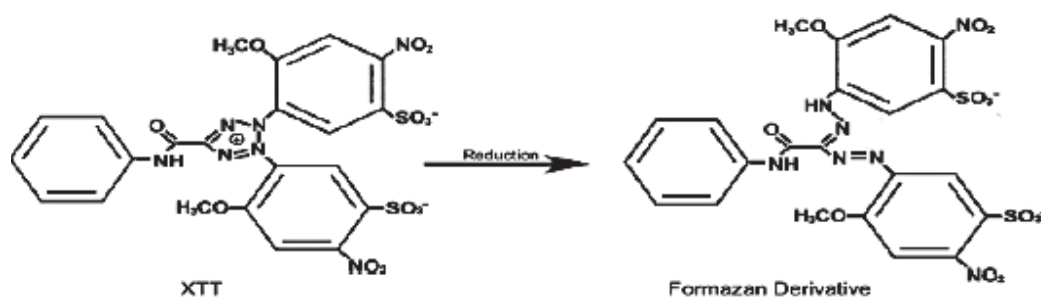


Abbildung 6: Reduktion von XTT zu Formazan [48].

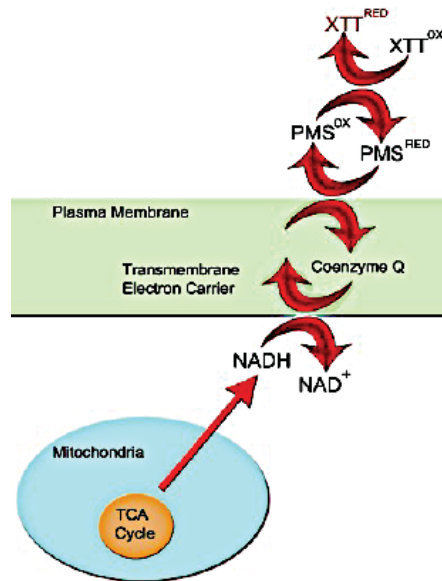


Abbildung 7: farbliche Reduktion von XTT durch zelleigene Enzyme (Dehydrogenasen) [48].

Anschließend kann das entstandene Formazan durch das ELISA Platten-Lesegerät „FLUOstarOptima“ spektrophotometrisch detektiert werden, dabei ist die Intensität proportional zur Anzahl vitaler Zellen.

Für den XTT-Assay wurden auf einer 96-Well-Platte 5×10^3 Zellen pro Well in jeweils 50 μ l Zellkulturmedium ausgesät. In die letzte Spalte der Platte wurde ein Leerwert aufgetragen, der keine Zellen enthielt, sondern lediglich das jeweilige Zellkulturmedium (sog. „Blank“). Dieser Leerwert und auch die ausgesäten Zellen waren auf den Platten für jede Konzentration als Quadruplikate, für die Lösemittelkontrolle sogar als Oktuplikate, angelegt.

Die Zelllinien wurden mit dem Inhibitor Palbociclib in den Konzentrationen 2,5 µM, 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM, 25 µM, 30 µM, 40 µM und 50 µM behandelt. Der Inhibitor Ribociclib wurde in den Konzentrationen 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM, 25 µM, 30 µM, 40 µM, 50 µM und 100 µM eingesetzt. Die Behandlung der Zellen erfolgte 24 Stunden nach der Aussaat.

Für die Versuche mit Palbociclib wurde eine H₂O-pH3-Lösemittelkontrolle entsprechend der höchsten Konzentration des Inhibitors, für die Ribociclib-Versuche eine DMSO-Lösemittelkontrolle entsprechend der höchsten Konzentration des Inhibitors, eingesetzt.

Der erste Messzeitpunkt erfolgte 24 Stunden nach Behandlung, außerdem nach 48 Stunden, 72 Stunden und 96 Stunden, sodass insgesamt ein Zeitraum von 4 Tagen beobachtet wurde. Dafür wurde zu jedem Well 50 μ L XXT mit 0,5 μ L PMS (1.25 mM)-Aktivierungsreagenz hinzugegeben, sodass ein Totalvolumen von ungefähr 150 μ L pro Well vorlag. Anschließend wurden die 96-Well-Platten bei 37°C für 4 Stunden inkubiert. Die dann folgende Absorptionsmessung im ELISA Platten-Lesegerät erfolgte bei einer

Wellenlänge von 450 nm (Wellenbereich des orangenen Formazans) und von 630 nm (Hintergrundabsorption der Proben/Leerwert).

Um die Zellviabilität zu ermitteln, wurde zunächst der Mittelwert der Quadruplikate des Leerwerts, sowie der Mittelwert der Oktuplikate der Lösemittelkontrollen berechnet. Der gemittelte Leerwert und der gemittelte Lösemittelkontrollwert wurden anschließend von jedem Probenwert subtrahiert. Die so normalisierten Probenwerte wurden dann ebenfalls nochmal gemittelt und graphisch so ausgewertet, dass jedem Zeitpunkt und jeder Konzentration ein Datenpunkt zugeordnet werden konnte.

2.2.6. Bestimmung der LD₅₀-Werte

Die letale Dosis LD₅₀ beschreibt die Konzentration des Inhibitors, bei der die Zellen im Vergleich zur Kontrolle zu 50% letal vorliegen.

Die LD₅₀-Werte wurden hier aus den 48-Stunden-Werten aus den XTT-Assay-Messungen mit Hilfe des Computerprogrammes GraphPad Prism 6.01 berechnet und graphisch dargestellt. Dabei wurde die relative Zellviabilität auf der Y-Achse gegen die jeweiligen Inhibitor-Konzentrationen auf der X-Achse aufgetragen. Zur Datenauswertung wurde eine lineare Regression mit Kurvenanpassung gewählt, mit den Programmeinstellungen „Dosiswirkungskurve – Inhibition“ mit „[Inhibitor] vs. normalisierte Antwort - variable Steigung“.

2.2.7. Nicoletti-Assay mittels Durchflusszytometrie

Der Nicoletti-Assay dient dazu, den DNS-Gehalt der Zellen während der verschiedenen Zellzyklusphasen zu detektieren und so eine Zuordnung der Zellen zu den verschiedenen Phasen zu ermöglichen. Indirekt kann auch die Anzahl der apoptotischen Zellen anhand der Sub-G₁-Phase abgelesen werden. Als Nukleinsäure-Interkalator wird der fluoreszierende Farbstoff PI verwendet, der nur die permeabilisierte Membran von letalen Zellen passieren kann.

Mit Hilfe des Nicoletti-Puffers werden die Zellen fixiert, permeabilisiert und dann mit PI angefärbt. Die von dieser Färbung ausgehende Fluoreszenzstärke ist direkt proportional zur DNS-Menge der Zelle.

Das Aussäen und Behandeln der Zelllinien mit den Inhibitoren für den Nicoletti-Zellzyklus erfolgten in einer 6-Well-Platte. Dabei wurden 4×10^5 Zellen pro Well in 2 ml Medium

ausgesät und nach ungefähr 24 Stunden mit den Inhibitoren behandelt. Für Palbociclib wurde die Konzentration 10 μM und für Ribociclib die Konzentration 25 μM festgelegt. Die entsprechenden Lösemittelkontrollen waren wieder H_2O pH3 für Palbociclib und DMSO für Ribociclib. Dafür wurde das alte Medium zunächst abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Inhibitoren bzw. die Lösemittelkontrollen gelöst in 2 ml neues Medium auf die jeweiligen Wells aufgetragen. Die Behandlung mit den Inhibitoren erfolgte für 16 Stunden und erfolgte bei 37°C im Inkubator.

Nach 16 Stunden Behandlung wurden die Zellen für den Nicoletti-Assay geerntet. Dafür wurde der Überstand aus den jeweiligen Wells abgenommen und in Polystyrol-Röhrchen überführt. Dann wurden die Wells mit jeweils 1 ml PBS gewaschen und dieses ebenfalls in die Röhrchen überführt. Die adhären Zellen wurden mit 0,5 ml Trypsin (0,05%) bei 37°C im Inkubator für 3-5 Minuten vom Boden gelöst. Die Reaktion wurde mit 1 ml Medium gestoppt und der Überstand erneut in die jeweiligen Röhrchen überführt, sodass pro Röhrchen jeweils ein Volumen von ungefähr 4 ml vorlag. Jede Zellsuspension wurde dann auf zwei Röhrchen aufgeteilt, sodass das jeweilige Duplikat für den Annexin V/PI Apoptose-Assay genutzt werden konnte, der sich ab diesem Schritt von dem Nicoletti-Assay unterscheidet (siehe 1.2.11.). Anschließend erfolgte für 5 Minuten eine Zentrifugierung der Röhrchen bei 1000 rpm. Es folgte nach dem Absaugen des Überstandes ein weiterer Waschschrift mit 1 ml PBS und eine erneute Zentrifugierung für 5 Minuten bei 1000 rpm. Danach wurde der Überstand bis zum Zellpellet am Boden des Röhrchens abgesaugt.

Pro Röhrchen wurden 500 μL des Nicoletti-Puffers (siehe 1.1.6.) mit 50 $\mu\text{g/ml}$ PI angesetzt und die Zellpellets in jeweils 500 μL davon resuspendiert und im Vortex-Mixer kurz vermengt. Danach wurden die Proben bei Raumtemperatur für 10 Minuten in Dunkelheit inkubiert, dann bis zur Messung auf Eis gelagert und vor jeder Messung nochmals mit dem Vortex-Mixer kurz vermengt.

Die Messung der Proben erfolgte mit dem MACSQuant® Analyzer 10, Version 2.13.0 Durchflusszytometer und die anschließende Auswertung mit dem Computerprogramm MACSQuantify Software Version 2.11.

2.2.8. Annexin V/PI Apoptose-Assay mittels Durchflusszytometrie

Um die Menge an lebendigen, früh- bzw. spätapoptotischen und nekrotischen Zellen zu detektieren wurde der Annexin V/PI Apoptose-Assay eingesetzt.

In apoptotischen Zellen wird das Membranphospholipid Phosphatidylserin (PS) von der inneren auf die äußere Seite der Plasmamembran transloziert, sodass PS an die extrazelluläre Umgebung präsentiert wird. Annexin V ist ein Protein, das eine starke Affinität zu PS aufweist und somit an Zellen bindet, die dieses nach außen präsentieren. Durch Konjugation von Fluorochrom an Annexin V können apoptotische Zellen farblich markiert werden. Mit PI wird hingegen im Zellkern befindliche DNS angefärbt, sodass lebende von apoptotischen Zellen unterschieden werden können.

Folglich sind lebende Zellen sowohl für Annexin V, als auch für PI negativ. Apoptotische Zellen sind nur für Annexin V positiv und für PI negativ und nekrotische Zellen sind (aufgrund des Verlustes der Membranintegrität, der bei apoptotischen Zellen nicht auftritt) für Annexin V negativ, aber für PI positiv.

Das Aussäen und Behandeln der Zelllinien mit den Inhibitoren für den Annexin V/PI Apoptose-Assay erfolgte in einer 6-Well-Platte. Dabei wurden 4×10^5 Zellen pro Well in 2 ml Medium ausgesät und nach ungefähr 24 Stunden mit den Inhibitoren behandelt. Für Palbociclib wurde die Konzentration 10 μM und für Ribociclib die Konzentration 25 μM festgelegt. Die entsprechenden Lösemittelkontrollen waren wieder H_2O pH3 für Palbociclib und DMSO für Ribociclib. Dafür wurde das alte Medium zunächst abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Inhibitoren bzw. die Lösemittelkontrollen gelöst in 2 ml neues Medium auf die jeweiligen Wells aufgetragen. Die Behandlung mit den Inhibitoren erfolgte für 16 Stunden und erfolgte bei 37°C im Inkubator.

Wie auch für den Nicoletti-Assay wurden die Zellen nach 16 Stunden Behandlung geerntet und zunächst wie in 1.2.10 bis zur Aufteilung der Zellsuspensionen auf je zwei Röhrchen behandelt. Nach der Zentrifugierung für 5 Minuten bei 1000 rpm, wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen mit 1 ml Annexin V-Bindepuffer gewaschen und noch einmal in gleicher Weise zentrifugiert und der Überstand erneut abgenommen. Pro Röhrchen wurde ein Mastermix bestehend aus 70 μl Annexin V-Bindepuffer, 5 μl Annexin FITC-Konjugat und 7,5 μl PI angesetzt (insgesamt 82,5 μL) und das jeweilige Zellpellet darin resuspendiert. Anschließend folgte eine Inkubation von 15 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit. Danach wurden nochmals 500 μL Annexin V-Bindepuffer pro Probe hinzugefügt, mittels Vortex-Mixer gut vermengt und die Proben dann bis zu Messung auf Eis gelagert.

2.2.9. BCA-Protein-Assay

Das BCA (Bicinchoninsäure)-Protein-Assay ist eine Methode, um die Menge von Proteinen in Proben zu bestimmen.

Das Verfahren beruht auf der Reduktion zweiwertiger Kupferionen zu einwertigen Kupferionen, an welche BCA bindet. Dadurch bildet sich ein blau-violetter Farbstoffkomplex, der per Photometrie bei einer Wellenlänge von 570 nm quantifiziert werden kann.

Zunächst werden 22,5 µL Ripa-Puffer mit je 2,5 µL der Proben vorgelegt. Auf einer 96-Well-Platte werden 10 µL jeder Probe als Duplikate aufpipettiert. Außerdem werden je 10 µL der Albumin-Standardverdünnungsreihe mit den Konzentrationen 2000 µL, 1000 µL, 500 µL, 250 µL, 125 µL, 63 µL und 32 µL, ebenfalls als Duplikate, eingefüllt. Als Blank werden in drei Wells je 10 µL Ripa aufpipettiert. Das Pierce™ BCA Protein Assay Reagent A wird im Verhältnis 50:1 mit Reagent B angesetzt. Davon werden auf jede Probe, die Standardkonzentrationen und den Blank je 200 µL aufpipettiert. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 37°C wurde mit Hilfe des ELISA Platten-Lesegerät „FLUOstarOptima“ die Absorption bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen.

Aus den Standardwerten wird eine Eichgerade berechnet. Mit Hilfe der Geradengleichung wurden die Konzentrationen der Proben bestimmt. Dafür wurden die Mittelwerte der gemessenen Absorptionen eingesetzt.

Aus den Konzentrationen (µg Protein/µL) wurde dann die Menge der Probe berechnet, die notwendig war, um ein Lysat mit 20 µg Protein zu erhalten. Anschließend wurde so viel Wasser hinzugegeben, dass die Lysate in einer Menge von 12,5 µL vorlagen. Durch Zugabe von jeweils 2,5 µL Laemmli-6x-Puffer wurden die Proteinlysate mit einem Gesamtvolumen von 15 µL bis zur weiteren Nutzung auf -70°C weggefroren.

2.2.10. Western Blot

2.2.10.1 Herstellung Polyacrylamid-Gele

In dieser Arbeit wurden 10%ige und 12%ige Polyacrylamid-Trenngele, sowie ein Polyacrylamid-Sammelgel genutzt. Zunächst wurden die Trenngele in der folgenden Zusammensetzung gegossen.

Komponenten	10%ige Trenngele (2 Gele)	12%ige Trenngele (2 Gele)
H ₂ O	4 ml	3,3 ml

Acrylamide 30 %	3,3 ml	4 ml
1.5 M Tris pH 8.8	2,5 ml	2,5 ml
10 % SDS pH 7.2	0,1 ml	0,1 ml
10% APS	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	0,005 ml	0,005 ml

Tabelle 12: Zusammensetzung der Trenngele

Sobald das Trenngel auspolymerisiert war, wurde das Sammelgel mit der folgenden Zusammensetzung gegossen.

Komponenten	2 Sammelgele
H ₂ O	3,4 ml
Acrylamide 30 %	0,83 ml
1.5 M Tris pH 6.8	0,63 ml
10 % SDS pH 7.2	0,05 ml
10% APS	0,05 ml
TEMED	0,005 ml

Tabelle 13: Zusammensetzung der Sammelgele

2.2.10.2 SDS-Page und Western Blot

Der SDS-Page und Western Blot ist ein Verfahren, um Proteine entsprechend ihrer Ladung und Größe zunächst aufzutrennen und dann auf eine Trägermembran zu übertragen, um damit einzelne Proteine qualitativ nachzuweisen.

Zunächst mussten die Proben vorbereitet werden. Dafür wurden die Proteinlysate (siehe Ende 1.2.12.) langsam auf Eis aufgetaut, bei 95°C für 5 Minuten denaturiert, dann abzentrifugiert und auf Eis gelagert. Gleichzeitig wurde auch die Proteinleiter aufgetaut (Page Ruler™ Prestained Protein Ladder).

Die zuvor gegossenen Gele wurden eingespannt, die SDS-Laufmodule in die Kammern eingesetzt und mit Elektrophorese-Puffer aufgefüllt. Mit einer Spritze wurden die Geltaschen dann vor der Probenauftragung noch ausgewaschen. Anschließend wurden die

Geltaschen mit den Proben mit einem Gesamtvolumen von 15 µL beladen, in die erste Geltasche wurde die Proteinleiter pipettiert. Nachfolgend wurden die Gele zunächst für 15 Minuten bei 70 Volt und dann bis zur Auftrennung bei 99 Volt (ca. 1,5 Stunden) laufen gelassen.

Für das Blotting wurde zunächst das Whatman™-Papier in Blotting-Puffer eingeweicht und die Transfer-Membran 15 Sekunden in 100% Methanol, 2 min in Wasser und mindestens 5 Minuten in Blotting-Puffer inkubiert, um diese zu aktivieren. Zum Blotten wurden dann die Kammern des Transfersystems mit Whatman™-Papier/ Gel/ Membran/ Whatman™-Papier beladen. Anschließend erfolgte das Blotten bei 25 Volt und 2,5 A für 20 Minuten.

Um zu überprüfen, ob die Übertragung von Proteinen auf die Membran erfolgreich war, wurde die Ponceau-Färbung durchgeführt. Dafür wurden die Membranen für 5 Minuten in Ponceau-Lösung unter stetiger Schwenkung inkubiert. Mit Millipore-Wasser wurden die Membranen dann soweit entfärbt, dass der Hintergrund weiß war, die Banden aber noch rosa angefärbt waren. Diese Banden waren dann der Beweis, dass die Übertragung erfolgreich war. Die Membranen wurden dann mit T-BST gewaschen.

Je nach Antikörper wurden die Membranen daraufhin in 5 ml 5%iger Milch oder 5%igem BSA für 1 Stunde unter Rotation bei Raumtemperatur geblockt.

Anschließend wurde der erste Antikörper entweder für 3 Stunden bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht unter Rotation aufgetragen. Auch hier war es von dem jeweiligen Antikörper abhängig, ob 5%ige Milch oder 5%iges BSA eingesetzt wurde. Hiernach wurden die Membranen dreimal für 5 Minuten in einem großen Volumen T-BST gewaschen (siehe Tab. 11).

Der zweite Antikörper wurde in 5 ml 1%iger Milch oder 1%igem BSA für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Rotation aufgetragen. Anschließend wurden die Membranen wieder dreimal für 5 Minuten in T-BST gewaschen.

Vor der Detektion wurden je 700 µl der Lösung A und B (Clarity™ Western ECL Substrate) gemischt und die Membran 5 Minuten in Dunkelheit damit inkubiert. Zur Detektion wurde das ChemiDoc™ Imaging System (Version 2.3.0.07) genutzt.

2.2.10.3 Western Blot Membran-Stripping

Um die Membranen von den aufgetragenen Antikörpern zu reinigen und nochmals zur Detektion anderer Proteine zu nutzen, wurde ein milder Stripping-Puffer genutzt.

Die Membranen wurden mit 20 ml des Stripping-Puffers zunächst zweimal für 5-10 Minuten bei Raumtemperatur unter Rotation inkubiert, dann zweimal für 5 Minuten in T-BST gewaschen. Hiernach wurden die Membranen abhängig von dem danach eingesetzten Antikörper entweder in 5 ml 5%iger Milch oder 5%igem BSA geblockt. Anschließend konnte erneut wie in 1.2.14. beschrieben weiter verfahren werden.

3. Ergebnisse

3.1. Nachweis der Inhibitor-Zielstrukturen und (p)RB-Achse auf Proteinebene mittels Western Blot

Zunächst wurde die Expression der Zielstrukturen von Palbociclib und Ribociclib in den verschiedenen Keimzelltumor-Geweben und -Zelllinien auf RNA- und Protein-Ebene untersucht. Auf Grund von vorliegenden Microarray-Expressionsanalysen [49] konnte gezeigt werden, dass *CDK4* in Keimzelltumor-Geweben und -Zelllinien auf RNA-Ebene im Vergleich zu Normalgeweben bzw. Kontrollzelllinien (MPAF Fibroblasten, FS1 Sertoli-Zellen) stark exprimiert wurde, während *CDK6* nicht nachweisbar war (Abb. 8).

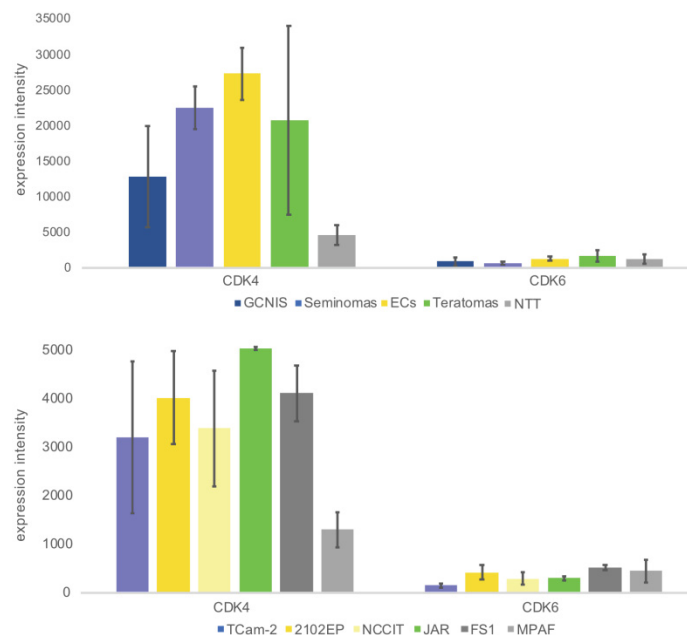


Abbildung 8: Microarray-Expressionsanalyse von *CDK4* und *CDK6* auf RNA-Ebene in Keimzelltumorgewebe (GCNIS, Seminome, Embryonalkarzinome, Teratome) verglichen mit gesunden Hodengewebe (NTT), sowie in den verschiedenen Keimzelltumorzelllinien (TCam-2, 2102EP, NCCIT, JAR) verglichen Sertoli-Zellen (FS1) und Fibroblasten (MPAF) als Kontrollen.

Ebenso wurde die Expression von *CDK4* und *CDK6* in den verwendeten Zelllinien mittels Western Blot-Analysen auch auf Proteinebene nachgewiesen (Abb. 9). Darüber hinaus wurde auch die Proteinmenge und Aktivität (Phosphorylierung) des *CDK4/6*-Zielmolekül Rb1 untersucht, in dem auch ein Western Blot hinsichtlich der Protein-Expression von *RB* und phosphoryliertem *RB1* (*pRB1*) durchgeführt wurde (Abb. 10). Als Antikörper-Positivkontrollen wurden Proteinlysate der Zelllinie HepG2 (Leberkarzinom) und HeLa (Zervixkarzinom) verwendet, da bekannt ist, dass HeLa-Zellen *CDK4* und *CDK6* stark exprimieren, während HepG2-Zellen beide Faktoren nur schwach exprimieren [50] [51] [52].

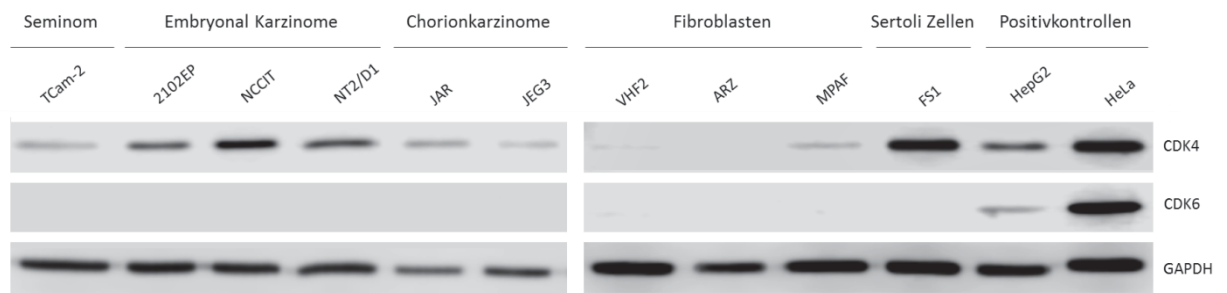


Abbildung 9: Western Blot zum Nachweis von CDK4 und CDK6 in Keimzelltumorzelllinien (TCam-2, 2102EP, NCCIT, NT2/D1, JAR, JEG3) und Kontrollzelllinien (VHF2, ARZ, MPAF, FS1), sowie in den Positivkontrollen (HepG2, HeLa). GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

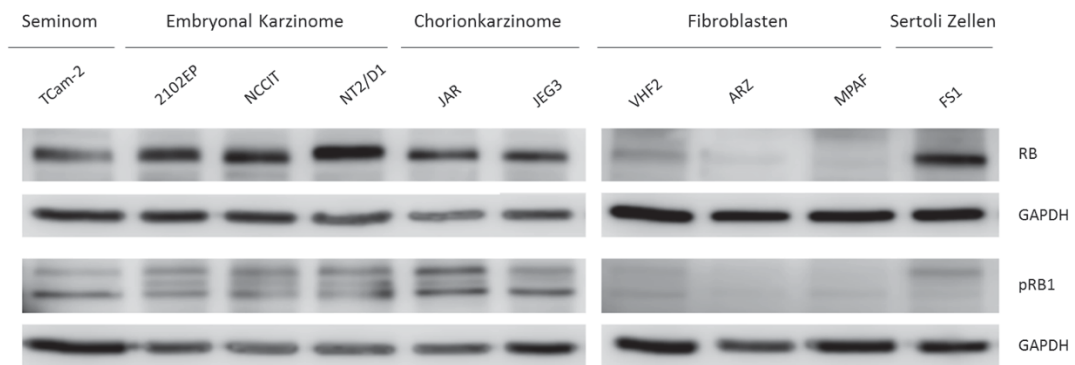


Abbildung 10: Western Blot Nachweis von RB und pRB1 in Keimzelltumorzelllinien (TCam-2, 2102EP, NCCIT, NT2/D1, JAR, JEG3) und Kontrollzelllinien (VHF2, ARZ, MPAF, FS1). GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

Hierbei fiel auf, dass das Vorliegen von CDK4 in den KZT-Zelllinien höher war als in den Kontrollzelllinien (außer FS1) (Abb. 9). Besonders ausgeprägt war dies in den Embryonalkarzinom-Zelllinien (2102EP, NCCIT, NT2/D1) (Abb. 9). Hingegen konnte CDK6 in den Keimzelltumor-Zelllinien mittels Western Blot nicht nachgewiesen werden, auch in den Kontrollzelllinien war die Protein-Expression zu niedrig, um detektiert werden zu können (Abb. 9). Somit konnten diese Ergebnisse die Microarray-Daten auf Proteinebene validieren.

Es konnte folglich CDK4 als Primärziel der beiden Inhibitoren detektiert und CDK6 als Zielstruktur ausgeschlossen werden.

Auch die Protein-Synthese von Rb1 und pRb1 fiel in den Keimzelltumorzelllinien deutlich stärker aus, als in den Kontrollzelllinien, sodass die gesamte CDK4-(p)RB-Achse in den

Keimzelltumorzelllinien aktiv zu sein scheint und somit durch Palbociclib und Ribociclib inhibiert werden kann (Abb. 10).

3.2. Änderung der CDK4-Proteinexpression unter Behandlung

Um zu untersuchen, ob Palbociclib zu einer veränderten Proteinexpression von *CDK4* führt, wurden die Keimzelltumor- und Kontrollzelllinien mit Palbociclib (10 µM) behandelt und die *CDK4*-Expression mittels Western Blot analysiert (Abb. 11). Es fiel auf, dass es in einigen der Keimzelltumorzelllinien unter der Behandlung mit Palbociclib zu einer reduzierten *CDK4*-Expression kam (2102EP, NT2/D1, JAR, BeWo), bei den übrigen war eine Veränderung der Proteinproduktion mittels Western Blot nicht detektierbar (TCam-2, NCCIT, JEG3) (Abb. 11).

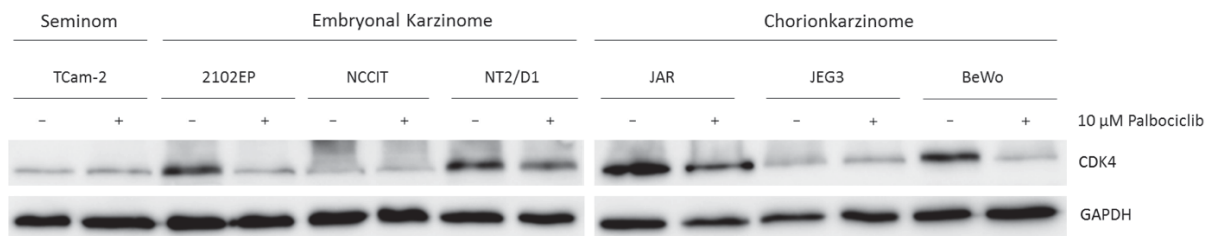


Abbildung 11: Western Blot zum Nachweis der *CDK4*-Synthese unter Behandlung mit 10 µM Palbociclib für 16 Stunden verglichen mit unbehandelten Keimzelltumorzelllinien (TCam-2, 2102EP, NCCIT, NT2/D1, JAR, JEG3, BeWo).

3.3. Messung der Zellviabilität unter Behandlung mit Palbociclib bzw. Ribociclib

Nun sollten die zytotoxischen Effekte der Inhibitoren auf die Zellviabilität der Keimzelltumor- und Kontrollzelllinien mittels XTT-Assay untersucht werden. Um eine dosis- und zeitabhängige Wirkung von Palbo- und Ribociclib zu ermitteln, fanden die Messung jeweils täglich über 96 Stunden nach Applikation der Inhibitoren statt. Die ausgewählten Konzentrationen für die beiden Inhibitoren wurden durch Vortestungen ermittelt, bei denen sich Palbociclib im Vergleich zu Ribociclib bereits in geringeren Dosen als toxisch erwies. Hier einmal beispielhaft an der Zelllinie JAR gezeigt (Abb. 12). Sodass Palbociclib in den Konzentrationen 2,5 µM, 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM, 25 µM, 30 µM, 40 µM, 50 µM (Abb. 11) getestet wurde, Ribociclib in den Konzentrationen 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM, 25 µM, 30 µM, 40 µM, 50 µM, 100 µM (Abb. 14).

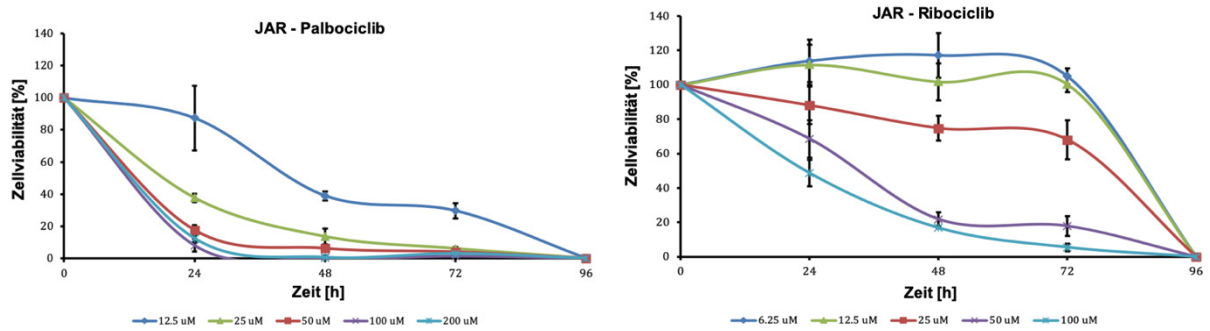


Abbildung 12: Messung der Zellviabilität der Keimzelltumorzelllinie JAR unter verschiedenen Konzentrationen Palbociclib (links) und Ribociclib (rechts) über einen Zeitraum von 24-96 Stunden.

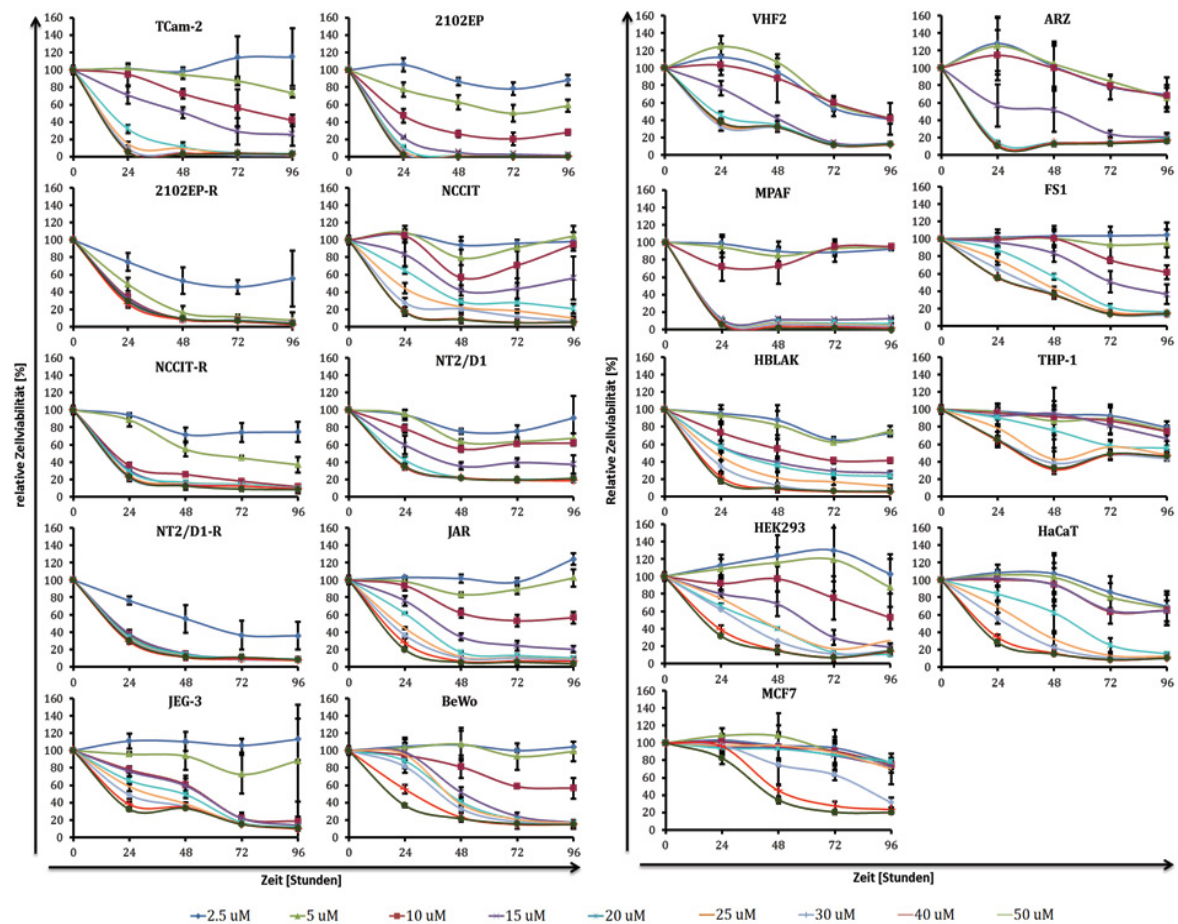


Abbildung 13: Messung der Zellviabilität von (Cisplatin-resistenten) Keimzelltumorzelllinien (TCam-2, 2102EP, 2102EP-R, NCCIT, NCCIT-R, NT2/D1, NT2/D1-R, JAR, JEG-3, BeWo) und Kontrollzelllinien (VHF2, ARZ, MPAF, FS1, HBLAK, THP-1, HEK293, HaCaT, MCF7) unter verschiedenen Konzentrationen Palbociclib über einen Zeitraum von 24-96 Stunden.

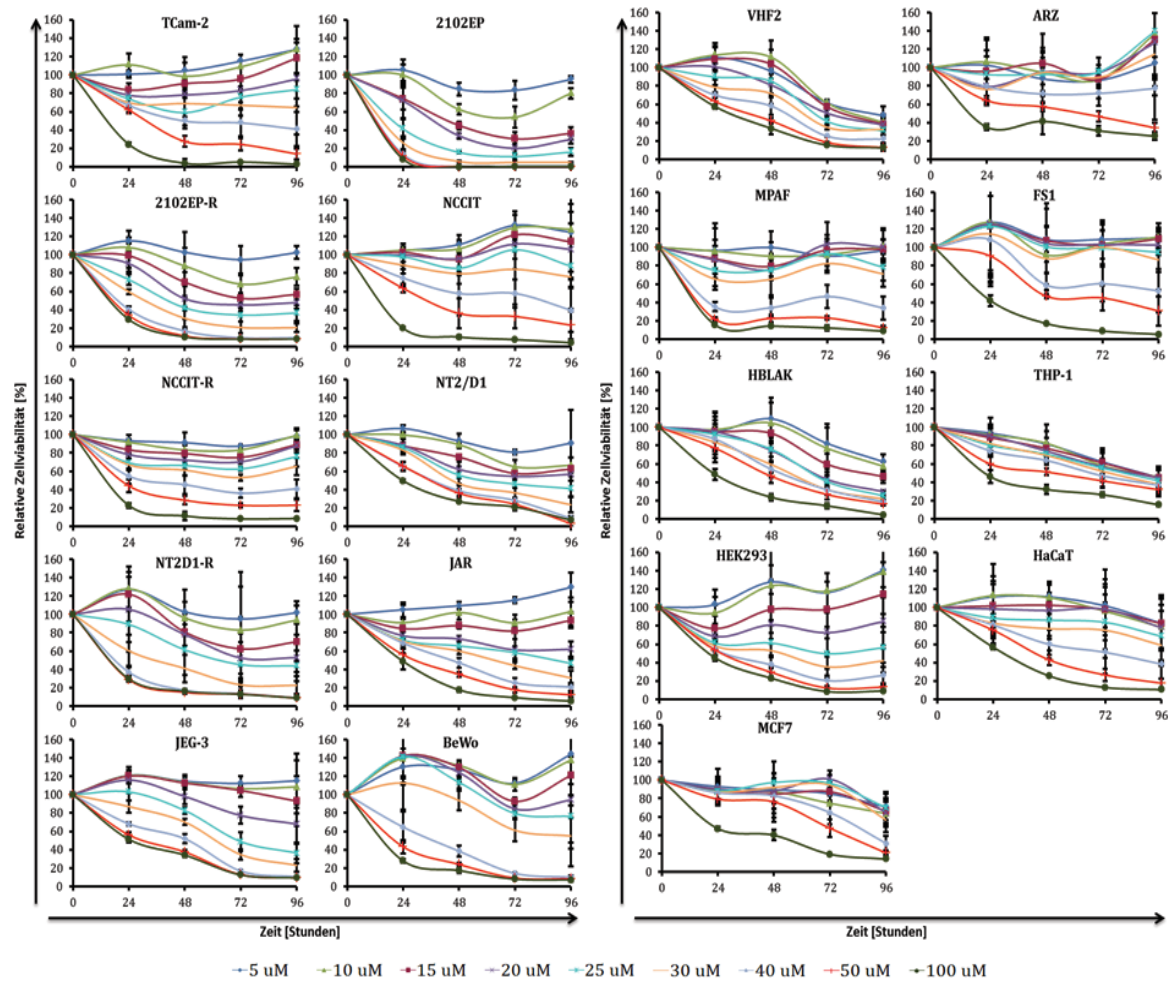


Abbildung 14: Messung der Zellviabilität von (Cisplatin-resistenten) Keimzelltumorzelllinien (TCam-2, 2102EP, 2102EP-R, NCCIT, NCCIT-R, NT2/D1, NT2/D1-R, JAR, JEG-3, BeWo) und Kontrollzelllinien (VHF2, ARZ, MPAF, FS1, HBLAK, THP-1, HEK293, HaCaT, MCF7) unter verschiedenen Konzentrationen Ribociclib über einen Zeitraum von 24-96 Stunden.

Insgesamt reagierten sowohl die (Cisplatin-resistenten) Keimzelltumor-, als auch die Kontrollzelllinien mit einer dosisabhängigen reduzierten relativen Zellviabilität unter der Behandlung mit den beiden Inhibitoren (Abb. 13 und Abb. 14). Wie die Vortestungen schon gezeigt hatten, konnte Palbociclib schon in geringeren Dosen eine ähnliche Wirkung wie Ribociclib erzielen, welches in höheren Konzentrationen appliziert werden musste. Sehr wichtig war, dass im Vergleich zu den Keimzelltumorzelllinien die Kontrollzelllinien weniger sensitiv auf die Inhibitoren reagierten (Abb. 13 und Abb. 14).

Es zeigt sich hier also, dass sich die Inhibitoren Palbo- und Ribociclib grundsätzlich für den Einsatz bei Keimzelltumoren eignen und dass die Behandlung effektiv auf die Keimzelltumorzellen wirkt, während das umliegende Gewebe geschont wird.

3.4. Berechnung der LD₅₀-Werte

Um die zytotoxischen Effekte von Palbo- und Ribociclib auf Keimzelltumor- und Kontrollzelllinien besser vergleichen zu können, wurden mit Hilfe des Computerprogrammes GraphPad Prism 6.01 die LD₅₀-Werte nach 48 Stunden berechnet (Abb. 15).

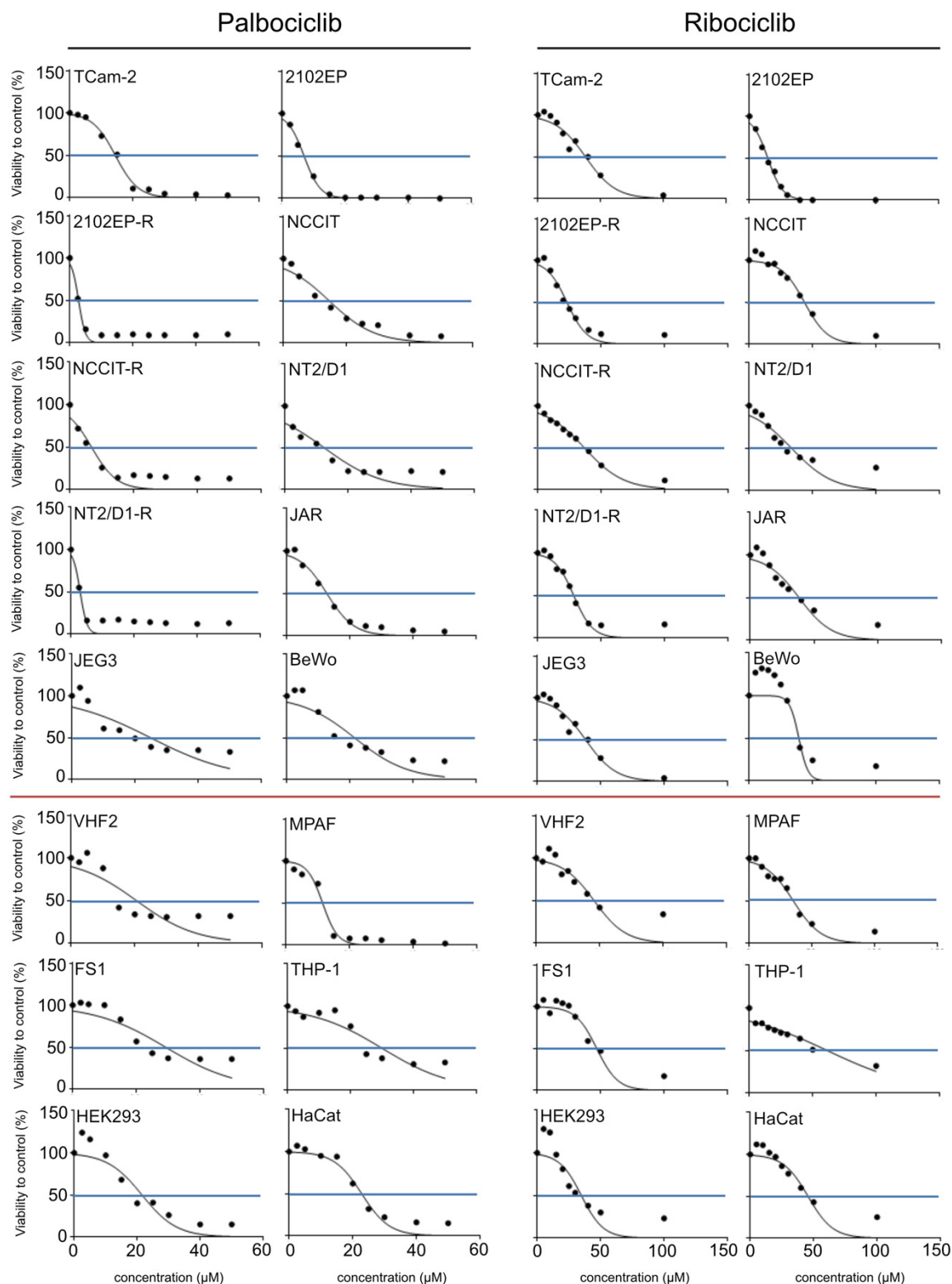


Abbildung 15: Übersicht der Graphen zur Ermittlung der LD₅₀-Werte nach 48 Stunden Behandlung basierend auf den XTT-Daten. Relative Zellviabilität auf der Y-Achse aufgetragen gegen jeweiligen Inhibitor-Konzentrationen auf der X-Achse.

Es fiel auf, dass die meisten Keimzelltumorzelllinien bereits ab niedrigeren Inhibitor-Konzentrationen (im Durchschnitt ca. 10 μM niedriger) 50 % letale Zellen aufwiesen, als die Kontrollzelllinien (Abb. 15, Tab. 14). Der durchschnittliche LD₅₀-Wert für Palbociclib lag bei

den Keimzelltumoren bei 12,39 μM (Tab. 14), während er bei den Kontrollzelllinien 22,62 μM (Tab. 15) betrug. Auch bei Ribociclib zeigte sich ein Unterschied zwischen den Keimzelltumor- und Kontrollzelllinien. Hier betrug der durchschnittliche LD_{50} -Wert der Keimzelltumorzelllinien 34,05 μM (Tab. 14) und bei den Kontrollzelllinien 44,96 μM (Tab. 15). Die Kontrollzelllinien zeigten sich also insgesamt weniger sensitiv gegenüber den beiden Inhibitoren. Verglich man die Wirkung der Inhibitoren untereinander, wurde deutlich, dass Palbociclib bei niedrigeren Konzentrationen als Ribociclib zytotoxisch wirkte (Durchschnitt Palbociclib LD_{50} 12,39 μM gegenüber Durchschnitt Ribociclib LD_{50} 34,05 μM).

Keimzelltumorzelllinien	Palbociclib LD_{50}	Ribociclib LD_{50}
TCam-2	14,43	38,06
2102EP	6,962	14,58
2102EP-R	2,762	23,07
NCCIT	14,55	43,65
NCCIT-R	6,77	36,65
NT2/D1	12,45	33,5
NT2/D1-R	2,875	28,37
JAR	12,69	38,31
JEG-3	28,85	42,5
BeWo	21,49	39,25
	Durchschnitt Palbociclib LD_{50}	Durchschnitt Ribociclib LD_{50}
Keimzelltumorzelllinien	12,39	34,05

Tabelle 14: LD_{50} -Werte [μM] der Keimzelltumorzelllinien nach 48 Stunden Behandlung. Basierend auf den Graphen, die aus den XTT-Daten erstellt wurden. Die Durchschnittswerte stellen den Mittelwert der LD_{50} -Werte aller Keimzelltumorzelllinien (TCam-2, 2102EP, 2102EP-r, NCCIT, NCCIT-R, NT2/D1, NT2/D1-R, JAR, JEG-3, BeWo) dar.

Kontrollzelllinien	Palbociclib LD_{50}	Ribociclib LD_{50}
VHF2	20,59	45,62
MPAF	11,51	47,01
FS1	29,27	35,12
THP-1	29,99	61,58
HEK293	21,52	34,79
HaCaT	22,84	45,61
MCF-7	41,22	88,07
	Durchschnitt Palbociclib LD_{50}	Durchschnitt Ribociclib LD_{50}
Kontrollzelllinien (ohne MCF-7)	22,62	44,96

Tabelle 15: LD_{50} -Werte [μM] der Kontrollzelllinien nach 48 Stunden Behandlung. Basierend auf den Graphen, die aus den XTT-Daten erstellt wurden. Die Durchschnittswerte stellen den Mittelwert der LD_{50} -Werte aller Kontrollzelllinien (VHF2, MPAF, FS1, THP-1, HEK293, HaCaT) außer MCF-7 dar.

Außerdem fiel auf, dass die Cisplatin-resistenten Subklone (2102EP-R, NCCIT-R, NT2/D1-R) v.a. auf die Behandlung mit Palbociclib sensitiver, d.h. mit niedrigeren LD₅₀-Werten (Durchschnitt der LD₅₀-Werte der Cisplatin-resistenten Subklone für Palbociclib bei 4,14 µM) reagierten als die parentalen Zelllinien (Durchschnitt der LD₅₀-Werte der parentalen Zelllinien für Palbociclib bei 11,32 µM) (2102EP, NCCIT, NT2/D1) (Tab. 14). Dies galt auch für die Behandlung mit Ribociclib, allerdings hier nicht für die Zelllinien 2102EP und 2102EP-R (Tab. 14, 14,58 µM bei 2102EP vs. 23,07 µM bei 2102EP). Insgesamt zeigte sich, dass die Embryonalkarzinom-Zelllinien (2102EP, NCCIT, NT2/D1) und ihre Cisplatin-resistenten Subtypen sensitiver auf die Behandlung reagierten als die Seminom- (TCam-2) und Chorionkarzinom-Zelllinien (JAR, JEG-3, BeWo) (Tab. 14). Interessanterweise lagen die LD₅₀-Werte der MCF7-Zelllinie (Tab. 15), die ein Brustkrebs-Modell darstellt, sowohl für die Behandlung mit Palbociclib als auch mit Ribociclib oberhalb der Werte der Keimzelltumorzelllinien (Tab. 14).

3.5. Analyse der Zellzyklusveränderungen mittels Durchflusszytometrie

Um anschließend zu untersuchen, ob es durch die Behandlung mit den beiden Inhibitoren Palbo- und Ribociclib zu Veränderungen im Zellzyklus kommt, wurde ein Nicoletti-Assay mit anschließender Durchflusszytometrie durchgeführt.

Die Behandlung mit den beiden Inhibitoren Palbo- und Ribociclib (10µM bzw. 25µM, 16 Stunden) führte in den meisten Keimzelltumorzelllinien zu einem Auflaufen der Zellen in der G₁/G₀-Phase des Zellzyklus (Abb. 16, blauer Balken). Zusätzlich trat zelllinienabhängig auch ein nicht-erwartetes Arretieren der Zellen in der G₂/M-Phase auf, allerdings nur in den Embryonalkarzinomzelllinien 2102EP/-R und NT2/D1/-R (Abb. 16, roter Balken). Bei den Kontrollzelllinien (VHF2, MPAF, FS1) konnte man hingegen kaum einen Effekt der Inhibitoren auf den Zellzyklus beobachten (Abb. 16).

Auch hier wird wieder deutlich, dass die Behandlung mit den Inhibitoren einen stärkeren Effekt auf die Keimzelltumorzellen als die Kontrollzellen hat, und dass dieser Effekt durch relevante Veränderungen im Zellzyklus bzw. der Zellzyklusphasen gekennzeichnet ist.

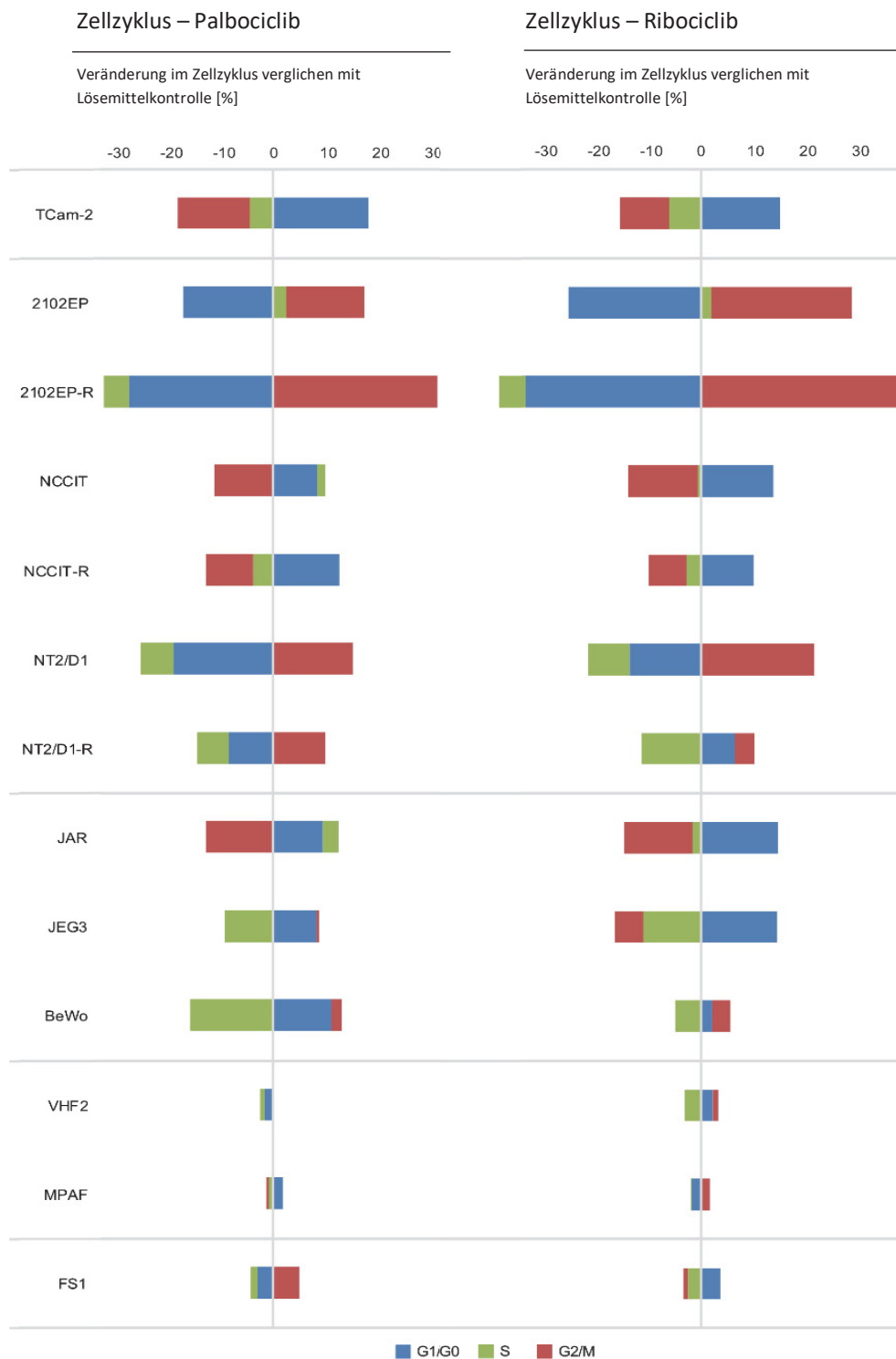


Abbildung 16: Veränderungen im Zellzyklus nach Behandlung mit Palbo- und Ribociclib verglichen mit Lösemittelkontrolle [%]. Die Behandlung erfolgte für 16 Stunden mit 10 μ M Palbociclib und 25 μ M Ribociclib. Dargestellt sind die Keimzelltumorzelllinien (TCam-2, 2102EP, 2102EP-R, NCCIT, NCCIT-R, NT2/D1, NT2/D1-R, JAR, JEG-3, BeWo) und Fibroblasten (VHF2, MPAF), sowie Sertoli Zellen (FS1) als Kontrollzelllinien.

3.6. Analyse der Apoptoseinduktion mittels Durchflusszytometrie

Weitergehend sollte mittels Annexin V/PI-Apoptose-Assay mit anschließender Durchflusszytometrie untersucht werden, in wie weit die Behandlung mit den beiden Inhibitoren Palbo- und Ribociclib zu einer Apoptose-Induktion in den Keimzelltumor- und Kontrollzelllinien führen.

Neben den Zellzyklusveränderungen (siehe 2.5. und Abb. 16) kam es in den Keimzelltumorzelllinien unter der Behandlung mit den Inhibitoren auch zu einer Zunahme der Apoptose-Rate (Abb. 17). Diese Zunahme der Apoptose stellte eine atypische Beobachtung dar, da aufgrund des Wirkmechanismus der Inhibitoren Palbo- und Ribociclib nur eine Pseudoseneszenz der Zellen in der G₁/G₀-Phase des Zellzyklus erwartet wurde. Auch hier waren die Effekte der beiden Inhibitoren untereinander vergleichbar (Abb. 17). Die Apoptose-Induktion fiel dabei zelllinienabhängig stärker (z.B. NT2/D1) oder schwächer (z.B. BeWo) aus, war jedoch in den Keimzelltumorzelllinien (außer NCCIT-R) deutlich (je nach Zelllinie zwischen ca. 5% bis ca. 60% mehr Apoptose verglichen mit der Lösemittelkontrolle) messbar, während in den Kontrollzelllinien (VHF2, MPAF, FS1) kaum eine Apoptose-Induktion messbar war (Abb. 17).

Obwohl zunächst nicht mit einer Apoptose-Induktion unter der Behandlung mit Palbo- und Ribociclib zu rechnen war, erscheint dies als vielversprechende Beobachtung, dass somit von einem langfristigen Effekt der Inhibition ausgegangen werden kann und ein weiteres Wachstum nach Beendigung der Behandlung ausgeschlossen wird. Ebenso ist an dieser Stelle zum wiederholten Male hervorzuheben, dass der wesentlich geringere Effekt in den Kontrollzelllinien die Schlussfolgerung zulässt, dass das gesunde Gewebe durch die Behandlung nicht in Mitleidenschaft gezogen würde.

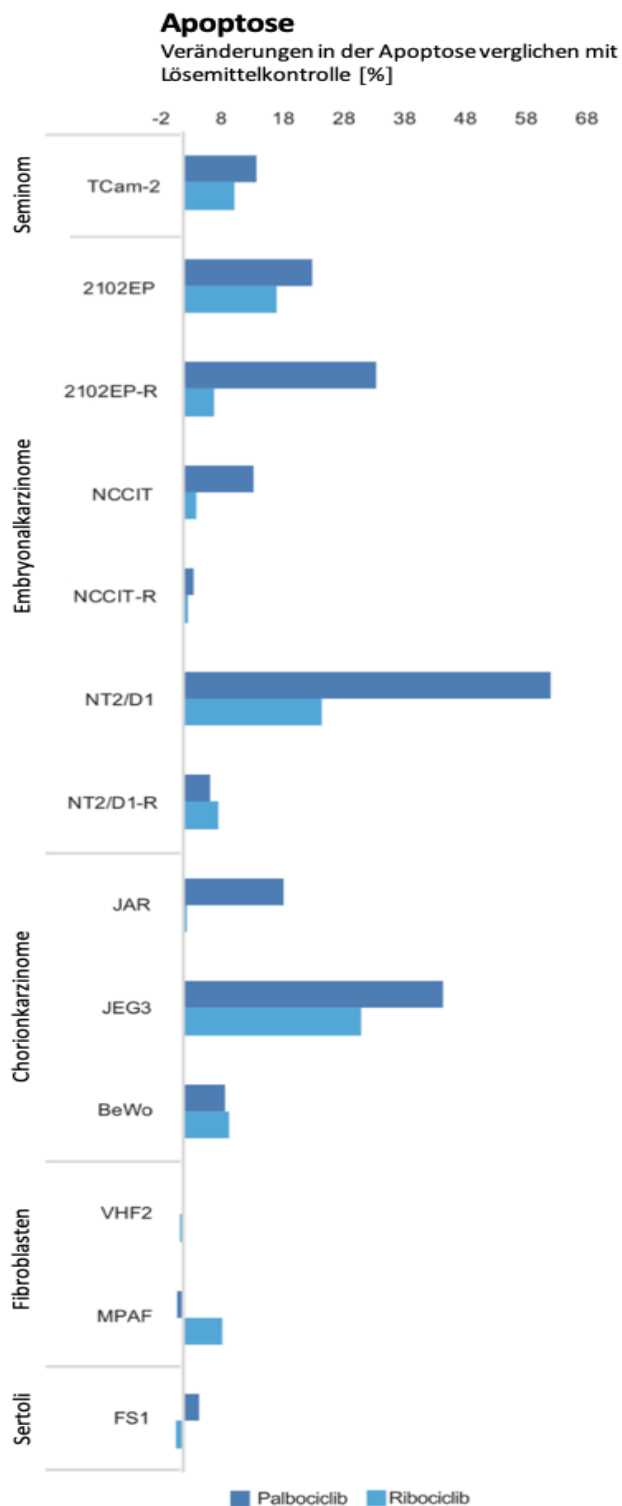


Abbildung 17: Veränderungen der Apoptoserate nach Behandlung mit Palbo- und Ribociclib verglichen mit Lösemittelkontrolle [%]. Die Behandlung erfolgte für 16 Stunden mit 10 μ M Palbociclib und 25 μ M Ribociclib. Dargestellt sind die Keimzelltumorzelllinien (TCam-2, 2102EP, 2102EP-R, NCCIT, NCCIT-R, NT2/D1, NT2/D1-R, JAR, JEG-3, BeWo) und Fibroblasten (VHF2, MPAF), sowie Sertoli Zellen (FS1) als Kontrollzelllinien.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die CDK4/6-Inhibition durch Palbo- und Ribociclib als therapeutische Möglichkeit bei Keimzelltumoren aufzuzeigen. Dabei sollte durch die *in vitro*-Testung an Keimzelltumorzelllinien und gesunden Zelllinien zunächst eine grundlegende Effektivität nachgewiesen werden, um somit einen Ausgangspunkt für weitere Versuche und *in vivo*-Modelle zu schaffen.

4.1. Detektierte Zielstrukturen für die CDK4/6-Inhibitoren Palbo- und Ribociclib

CDK4, nicht jedoch CDK6, konnte als Inhibitor-Zielstruktur in testikulären Keimzelltumorzelllinien nachgewiesen werden. (Abb. 9). Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Arbeiten, welche sich ebenfalls mit dem Vorliegen von CDK4 und 6 in Keimzelltumoren beschäftigt haben [53]. Allerdings wurden zwar die Keimzelltumoren vom Typ II und die pädiatrischen Keimzelltumoren vom Typ I untersucht, nicht aber die spermatozytischen Tumore des älteren Mannes (Typ III). Weitere Untersuchungen könnten zeigen, ob bei diesem Typ auch CDK6 als Zielstruktur für Palbo- und Ribociclib in Frage käme. An dieser Stelle ist jedoch bereits hervorzuheben, dass die beiden Inhibitoren auch eine mögliche therapeutische Option bei kindlichen Keimzelltumoren darstellten, was in Hinblick auf die mögliche Reduzierung der Nebenwirkungen von Chemotherapeutika oder Strahlentherapie sehr interessant wäre. Außerdem zeigte sich, dass auch die Phosphorylierung von Rb1 und pRb1 als Teil der CDK4-(p)Rb-Achse in den Keimzelltumorzelllinien stärker ausfiel als in den Kontrollzelllinien (Fibroblasten und Sertoli-Zellen, Abb. 10). Dies lässt den Rückschluss zu, dass das gesunde Gewebe bzw. die umliegenden Zellen beim Einsatz der Inhibitoren nicht in dem Maße angegriffen würden, wie die Tumorzellen. Dass sich hier eine verstärkte Aktivierung von Rb1 und pRb1 in den Keimzelltumorzelllinien zeigte, steht jedoch im Widerspruch zu einer anderen Arbeit, bei der gezeigt wurde, dass es bei den Keimzelltumorzellen (Seminome, Embryonal Karzinome, Teratome und gemischte Histologietypen) generell eher zur einer Deregulierung und verminderten Phosphorylierung von (p)Rb kommt, was jedoch nicht unbedingt als eigenständiges Malignitätskriterium zu werten ist, da dies auch in fetalen Gonozyten-Zellen zu beobachten ist [54]. Ob (p)Rb folglich als Marker für die Wirksamkeit von Palbo- und Ribociclib herangezogen werden sollte, ist somit strittig, zumal bei anderen Tumorentitäten wie Blasenkrebs die Wirksamkeit der CDK4/6-Inhibition unabhängig vom (p)Rb-Status der Zellen nachgewiesen werden konnte [55]. Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass CDK4 als Zielstruktur für die Inhibitoren Palbo- und Ribociclib in Keimzelltumorzellen vorliegt.

4.2. Abnahme der CDK4-Proteinproduktion unter Behandlung mit Palbociclib

Unter der Behandlung mit Palbociclib kam es in einigen Keimzelltumorzelllinien zu einer leicht reduzierten CDK4-Produktion (2102EP, NT2/D1, JAR, BeWo), während bei TCam-2, NCCIT und JEG3 keine Veränderungen der Expression nachweisbar waren (Abb. 11). Studien mit adrenokortikalen Karzinomzelllinien, sowie Osteosarkomzelllinien konnten unter der Gabe von Palbociclib ebenfalls keine Änderungen der CDK4-Synthese zeigen [56][57]. Dies deutet darauf hin, dass Palbociclib lediglich die Aktivität von CDK4/6 hemmt, nicht jedoch deren Produktion. Es wäre demnach erst eine Änderung in der nachfolgenden Signalkaskade zu erwarten, sprich in der Reduktion von pRb. Dies wurde auch bereits in einer Studie zur Anwendung von Palbociclib bei Blasenkrebszellen gezeigt [58]. Über einen längeren Behandlungszeitraum mit den CDK4/6-Inhibitoren scheint es sogar zu einer Hochregulierung der CDK4/6-Synthese zu kommen [29]. Dies könnte einen möglichen Mechanismus zur Resistenzentwicklung der Tumorzellen darstellen, da andere Studien schon gezeigt haben, dass eine hohe Expression von CDK4 zwar die Sensitivität gegenüber CDK4/6-Inhibitoren erhöht, die Amplifikation von CDK4 allerdings zu einer Resistenz gegenüber der Inhibition führt [59]. Ob es in den Zellen zu einer Resistenzentwicklung gegenüber Palbo- und Ribociclib kommt, scheint eher von den nachgeschalteten Prozessen in der CDK4/6-(p)Rb- Achse abzuhängen. So konnten andere Arbeiten zeigen, dass der Verlust von RB, beispielsweise in (p)Rb-*knockdown*-Brustkrebszellen (*knockdown* mittels Vektor-basierter RNA-Interferenz), mit einer verminderten Sensitivität gegenüber CDK4/6-Inhibition einhergeht, da durch das Fehlen die wichtige nachgeschaltete Zielstruktur des Wirkmechanismus der Inhibition fehlt [60]. Diese Resistenz zeigt sich vor allem bei der Langzeitbehandlung mit CDK4/6-Inhibitoren [60]. Da jedoch auch bestimmte (p)Rb-negative Tumorzelllinien auf CDK4/6-Inhibitoren reagieren, kann der Verlust oder die Expression von (p)Rb nicht alleine über die Wirksamkeit der CDK4/6-Inhibitoren entscheiden [55]. Dies liegt vermutlich daran, dass CDK4/6 auch abseits der Rb-Kaskade Prozesse katalysiert, die z.B. zu einer Phosphorylierung von FOXM1, was in Rb-negativen Blasenkrebszellen zu einer Rb-unabhängigen Abnahme der Anzahl mitotischer Zellen und zur Induktion von Apoptose unter CDK4/6-Inhibition führt [55]. Auch die Überexpression von E2F2 und die Deregulation von CDK2 können zu einem verminderten Ansprechen auf eine CDK4/6-Inhibition führen [59]. So konnte beispielweise gezeigt werden, dass es in einigen Brustkrebszelllinien unter der Behandlung mit CDK4/6-Inhibitoren zur einer Hochregulation von Cyclin D und darüber zu einem durch CDK2-abhängigen Voranschreiten im Zellzyklus kommt [61]. Da es auch in den Keimzelltumorzelllinien unter der Behandlung mit Palbo- und Ribociclib nicht nur zu einer veränderten Expression von *CDK4/6* und *RB* kommt, sondern auch andere Proteine abseits dieser Achse (*CCND1/2/3*, *CDK6/7*, *E2F5*, *CCNA2*, *CCNB1/2*,

CDK1, *CDKN2D/3*, *CDC2/3/4/7/20/25A/25B/25C*, *E2F1/2*) eine veränderte Expression zeigen [29] und diese eventuell mit einer Resistenzentwicklung gegenüber der Therapie einhergehen, sollten die Veränderungen und Zusammenhänge Gegenstand weiterer Arbeiten und Versuche sein.

4.3. Abnahme der Zellviabilität unter Behandlung mit Palbociclib bzw. Ribociclib, sowie Induktion von Zellzyklusveränderungen und Apoptose

Es konnte eine dosisabhängige Abnahme der Zellviabilität unter der Behandlung mit Palbo- und Ribociclib gezeigt werden, wobei diese bei den Keimzelltumorzelllinien stärker ausfiel als bei den Kontrollzelllinien und bei Palbociclib mit niedrigeren Dosierungen erreicht wurde als bei Ribociclib (Abb. 13 und Abb. 14). Dabei konnte für alle Keimzelltumorzelllinien die gleiche Tendenz, sprich die Abnahme der Zellviabilität gezeigt werden, sodass dies als Konsequenz aus der Behandlung mit Palbo- und Ribociclib geschlussfolgert werden kann. Eine Abnahme der Zellviabilität kann zum einen durch einen Proliferationsstopp und zum anderen durch vermehrten Zelltod erklärt werden. Die Behandlung mit Palbo- und Ribociclib sollte in der vereinfachten Theorie über die Inhibition der CDK4/6-(p)Rb-Achse lediglich zu einem G_{1/0}-Arrest der Zellen führen. Es wäre also ein seneszendes Stadium der Zellen zu erwarten, in welchem die Zellen zwar im Zellzyklus arretieren und somit keine Zellteilung mehr stattfindet, sie jedoch noch metabolisch aktiv sind. Da jedoch durch die Durchflusszytometrie nicht nur Änderungen des Zellzyklus, sondern auch eine Apoptoseinduktion gezeigt werden konnten, ist davon auszugehen, dass die Abnahme der Zellviabilität auch durch Palbo- und Ribociclib induzierten Zelltod zustande kommt. Es ist bekannt, dass seneszente gesunde Körperzellen verschiedene bioaktive Moleküle, wie beispielsweise proinflammatorische Zytokine oder Chemokine, Interleukine oder Reaktive Sauerstoffspezies, über Zell-Zell-Kontakte (*gap junctions*) an ihre lokale Zellumgebung abgeben und so bei anderen Zellen Zellschäden induzieren können [62]. Die Zellschäden der umgebenden gesunden Zellen haben dann zumeist prokanzerogene Effekte, sei es durch DNS-Schäden selbst oder die damit verbundenen DNS-Reparaturmechanismen, die zu Mutationen und daraus resultierenden Aktivierungen von Onkogenen oder Inaktivierungen von Tumorsuppressorgenen führen können [63]. Somit ist die Abnahme der Zellviabilität der Keimzelltumorzelllinien vermutlich auch teilweise damit zu erklären, dass die Inhibition des Zellzyklus mit der Ausschüttung verschiedener proapoptotischer und pronekrotischer bioaktiver Moleküle einhergeht. Des Weiteren ist bekannt, dass der Übergang in ein seneszendes Stadium mit morphologischen Veränderungen der Zellen einhergeht [64]. Diese morphologischen und strukturellen Veränderungen umfassen Zellvergrößerung, -abflachung, Mehrkernigkeit oder eine Vergrößerung des Zellkernes,

vergrößerte Vakuolen, sowie eine veränderte Zusammensetzung und Struktur der Plasmamembran [65]. Zwar sind diese Veränderungen nicht zwangsweise mit dem Zelltod verbunden, werden jedoch auch besonders bei Zellen beobachtet die apoptotische oder nekrotische Vorgänge durchlaufen [66]. Auch bei der mikroskopischen Betrachtung der mit Palbo- bzw. Ribociclib behandelten Keimzelltumorzelllinien zeigten sich neben der Abnahme der Zellzahl insgesamt, morphologische Veränderungen (siehe Anhang). So waren die Keimzelltumorzelllinien häufig vergrößert und wirkten hinsichtlich ihrer Form und Membrankontinuität inhomogen (siehe Anhang). Diese Veränderungen waren bei den Kontrollzelllinien weniger zu beobachten, was mit den Ergebnissen korreliert, dass es bei den Kontrollzelllinien zu einer weniger stark ausgeprägten Abnahme der Zellviabilität unter Behandlung gekommen ist. Zur besseren Vergleichbarkeit der zytotoxischen Effekte der Inhibitoren auf die verschiedenen Zelllinien wurden die LD₅₀-Werte berechnet. Auch hier zeigte sich, dass die Keimzelltumorzelllinien sowohl bei der Behandlung mit Palbo-, als auch mit Ribociclib bereits ab niedrigeren Konzentrationen der Inhibitoren 50% letale Zellen aufwiesen als die Kontrollzelllinien (Tab. 14 und Tab. 15). Insgesamt wirkt Palbociclib im Vergleich zu Ribociclib dabei bereits in geringeren Dosen letal (Tab. 14 und Tab. 15). Dass die Kontrollzelllinien weniger auf die CDK4/6-Inhibition mit Palbo- und Ribociclib reagieren kann damit erklärt werden, dass ein Eingriff in den Zellzyklus bei schnell proliferierenden Zellen einen stärkeren Effekt hervorruft, als bei weniger schnell proliferierenden Zellen [67]. Allgemein sind Tumorzellen für ihre hohe Mitose- und somit Proliferationsrate bekannt, womit erklärt werden kann, dass die Keimzelltumorzelllinien stärker auf die Behandlung mit Palbo- und Ribociclib reagieren als die Kontrollzelllinien [68]. Es lässt sich an dieser Stelle festhalten, dass der Abnahme der Zellviabilität eine multifaktorielle Genese zu Grunde liegt, jedoch zeigt, dass die CDK4/6-Inhibition nicht nur zu einem Zellzyklus-Arrest führt, sondern auch auf mehreren Wegen zum Zelltod führt, wobei genauere Zusammenhänge und Mechanismen weiter untersucht werden sollten. Außerdem konnte beobachtet werden, dass die Cisplatin-resistenten Subklone durchschnittlich sensibler reagierten als die parentalen Zelllinien (Tab. 14). Es wirft sich folglich die Frage auf, ob die Cisplatin-Resistenz bzw. die Resistenzmechanismen mit einer Hochregulation der Empfindlichkeit gegenüber Zellzyklus-Inhibitoren einhergehen. Wie bereits in 1.7. erläutert sind die Resistenzmechanismen gegen Cisplatin mannigfaltig und ergänzen sich gegenseitig. Es ist bekannt, dass eine Cisplatin-Resistenz auch mit Veränderungen und Dysregulationen von Zellzyklus-abhängigen Proteinen einhergeht [69]. Wie dies mit der Beobachtung korreliert, dass die Cisplatin-resistenten Zelllinien stärker auf die Zellzyklus-Inhibition reagieren, muss jedoch noch weiter untersucht werden. Ebenfalls wäre es von Interesse, ob bei der gleichzeitigen Anwendung von Cisplatin und CDK4/6-Inhibitoren synergistische Effekte zu beobachten sind oder ob die vorherige Anwendung der Inhibitoren eine Cisplatin-Resistenz

aufheben kann. Bisher erfolgte lediglich eine klinische Studie, die sich mit der Behandlung von therapierefraktären Keimzelltumorzelllinien mit Palbociclib beschäftigt hat [70]. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Palbociclib zu einem begünstigten progressionsfreiem 24-Wochen-Überleben führte [70]. Eine *follow-up* Studie konnte diese Wirksamkeit v.a. bei Teratomen zeigen, weniger bei anderen Keimzelltumorentitäten [71]. Es ist jedoch anzumerken, dass zum einen in diesen Studien nur RB1-exprimierende Keimzelltumore eingeschlossen wurden, und zum anderen die untersuchte Kohorte sehr klein war ($n=30$) [70][71]. Darüber hinaus wurde als Inhibitorsubstanz lediglich Palbociclib getestet [70][71]. Da in dieser Arbeit keine Teratom-Zelllinie inkludiert werden konnte, ist ein direkter Vergleich der Beobachtungen leider nicht möglich. Die Betrachtung der berechneten LD_{50} -Werte legt jedoch nahe, dass nicht nur bei Teratomen mit einer Wirksamkeit der CDK4/6-Inhibitoren zu rechnen ist, sodass eine breite angelegte Untersuchung mit einer größeren Kohorte anzustreben ist. Außerdem ist zu diskutieren, ob es sinnvoll ist, lediglich RB-exprimierende Keimzelltumore zu inkludieren, da die in dieser Arbeit beobachteten Effekte auch mit nicht-kanonischen Mechanismen abseits der (p)RB-Achse einhergehen. Eine größere Bedeutung könnte die Untersuchung hinsichtlich der Expression von *CDKN2A* (*p16*), ein physiologischer CDK4-Inhibitor, darstellen, da andere Arbeiten gezeigt haben, dass Zellen mit hohen Leveln an *CDKN2A* wesentlich schlechter auf die Behandlung mit Palbociclib ansprechen [72]. Gleichwohl wird hier jedoch die hohe Relevanz weiterer Therapiemöglichkeiten, konkret der CDK4/6-Inhibition, gerade bei therapierefraktären Keimzelltumoren, deutlich. Weiterhin fiel bei der Berechnung der LD_{50} -Werte interessanterweise auf, dass die LD_{50} -Werte der Brustkrebszelllinie MCF7 deutlich oberhalb der Werte der Keimzelltumorzelllinien lagen (Tab. 15). Es hat sich gezeigt, dass Brustkrebszelllinien, darunter auch MCF7, an die CDK4/6-Inhibition adaptieren können, in dem sie, neben dem Verlust von RB1, Cyclin D1-CDK2-vermittelt in die S-Phase des Zellzyklus eintreten und das *CCNE1*-Gen amplifiziert vorliegt [61]. Dass die Sensitivität der Keimzelltumorzelllinien im Vergleich zur Brustkrebszelllinie MCF7 höher ist, legt die Vermutung nahe, dass die Keimzelltumorzelllinien über weniger solcher nicht-kanonischen Adaptationsmöglichkeiten verfügen. Tatsächlich kommt es in den Keimzelltumorzelllinien zu einer Runterregulation von *CDK2* und *Cyclin E*, sodass dieser Mechanismus nicht zur Umgehung des Zellzyklusarrestes genutzt werden kann [53]. Da allerdings nur MCF7 zum Vergleich herangezogen wurde, ist die Aussagekraft begrenzt und sollte um weitere Untersuchungen mit anderen Brustkrebszelllinien erweitert werden. Insgesamt ist diese Beobachtung jedoch sehr vielversprechend, da Palbo- und Ribociclib in der Behandlung von Brustkrebs bereits eingesetzt werden und somit eine Anwendung der Substanzen bei Keimzelltumoren, dann sogar in einer noch geringeren Dosis, vorstellbar ist.

Mittels Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass es in den meisten Keimzelltumorzelllinien zu einem Arretieren der Zellen in der G_1/G_0 -Phase des Zellzyklus kam (Abb. 16). Bei den Embryonalkarzinomzelllinien 2102EP/-R und NT2/D1/-R kam es zu einem nicht-erwartetem Auflaufen der Zellen in der G_2/M -Phase (Abb. 16, roter Balken), während bei den Kontrollzelllinien kaum Zellzyklusänderungen auffielen (Abb. 16). Das Arretieren der Zellen in der G_1/G_0 -Phase war ein zu erwartender Effekt und deckt sich mit den eingangs beschriebenen Wirkmechanismen der CDK4/6-Inhibitoren Palbo- und Ribociclib (siehe 1.5. und 1.6.1.). Auch, dass die Kontrolllinien keine starken Zellzyklusänderungen zeigten, deckt sich mit den anderen Beobachtungen, dass die Kontrollzelllinien insgesamt schwächer auf die Inhibition reagieren. Unerwartet war hingegen das Arretieren der Embryonalkarzinomzelllinien in der G_2/M -Phase, da dies bedeutet, dass diese Zellen den durch Palbo- und Ribociclib induzierten G_1 -Block überwinden und anscheinend unabhängig von der CDK4/6-(p)RB-Achse die G_1 -Phase durchlaufen können. Es ist bekannt, dass CDK3 unabhängig von RB den Eintritt in die G_1/S -Phase ermöglichen kann [73]. Betrachtet man nun die Expressionsmuster von *CDK3* in der Embryonalkarzinomzelllinie 2102EP, fällt auf, dass die Expression des *CDK3*-codierende Gens generell deutlich hochreguliert ist [29]. Weitere zellzyklusregulierende Gene wie *PLK3*, *CDC25C*, *CHECK1* oder *HAUS1/2/6* werden durch die Gabe von Palbo- oder Ribociclib jedoch so dereguliert, dass es nach dem RB-unabhängigen Eintritt in die G_1 -Phase nicht zu einem Fortschreiten des Zellzyklus der 2102EP-Zellen kommt [29]. Es bleibt zu untersuchen, ob diese Hochregulation auch in den anderen Embryonalkarzinomzelllinien zu finden ist oder ein Alleinstellungsmerkmal der Zelllinie 2102EP darstellt. Unterschiede hinsichtlich der Cisplatin-resistenten Subklone konnten bei den Zellzyklusveränderungen nicht gefunden werden, so zeigten die Subklone stets ähnliche Veränderungen wie die zugehörigen parental Linien (siehe Abb. 16). Die Cisplatin-Resistenz scheint folglich keinen Einfluss auf den kanonischen Effekt der CDK4/6-Inhibition in Form von G_1/G_0 -Arrest zu haben. Andere Arbeiten haben gezeigt, dass Cisplatin-resistente Karzinomzellen hingegen den durch Cisplatin-induzierten G_2/M -Arrest umgehen können [74]. Es wird an dieser Stelle nunmehr erneut deutlich, dass die CDK4/6-Inhibition einen wirksamen alternativen Therapieansatz bei (Cisplatin-resistenten) Keimzelltumoren darstellen könnte.

Neben den erwarteten Zellzyklusveränderungen, konnte auch gezeigt werden, dass es in den Keimzelltumorzelllinien durch die Behandlung mit Palbo- und Ribociclib zu einer atypischen Apoptoseinduktion kam (siehe 2.6. und Abb. 17.). Diese war bei den Keimzelltumorzellen deutlich messbar, während die Kontrollzelllinien kaum eine Zunahme der Apoptoserate zeigten (siehe 2.6. und Abb. 17). Nach der zuvor beobachteten Abnahme der Zellviabilität unter Behandlung mit den Inhibitoren, war zwar mit einer gesteigerten Zelltodrate zu rechnen, jedoch passt dies, wie vorab bereits diskutiert, nicht zum initial

erwarteten Wirkmechanismus der CDK4/6-Inhibition. Während die Messung der Zellviabilität lediglich beschreibt, wie hoch der Anteil an lebenden Zellen an einer Zellpopulation ist, kann das Annexin V/PI-Apoptose-Assay zwischen nekrotischen und apoptotischen Zellen unterscheiden (siehe 2.2.8). Es ist hier folglich hervorzuheben, dass die Keimzelltumorzellen auf die Behandlung mit den CDK4/6-Inhibitoren vorrangig mit dem programmierten Zelltod, d.h. Apoptose, reagierten. Es konnte gezeigt werden, dass diese Apoptos-Induktion nicht nur unter den verschiedenen Keimzelltumorzelllinien unterschiedlich stark ausfällt, sondern insgesamt zelllinienabhängig zu sein scheint. So kommt es beispielsweise auch bei Blasenkarzinomen oder ALL (Akute Lymphatische Leukämie) unter der Behandlung mit CDK4/6-Inhibitoren zur Apoptose der Zellen, bei Pankreasadenomen hingegen nicht [75][58][76]. Würde man die Mechanismen, die zur Apoptose durch CDK4/6-Inhibition führen noch besser verstehen, würde dies Rückschlüsse auf die zu erwartende Wirksamkeit bei verschiedenen Tumorentitäten zulassen. Dass auch die Embryonalkarzinomzelllinie 2102EP, welche zunächst die G₁-Phase durchläuft, eine hohe Apoptose-Rate aufweist, legt erneut nahe, dass Palbo- und Ribociclib nicht nur in den Zellzyklus eingreifen, sondern auch abseits davon zu Zellschäden führen. Zwar ist eine mögliche Erklärung die Ausschüttung verschiedener proapoptotischer und pronekrotischer bioaktiver Moleküle in seneszenten Zellen (s.o.), eine andere mögliche Erklärung wäre jedoch auch die Unfähigkeit der Zellen sich an prolongierte Veränderungen im Zellzyklus zu adaptieren und so Seneszenz über einen längeren Zeitraum aufrecht zu halten. Gestützt wird diese Vermutung dadurch, dass beobachtet wurde, dass es durch die Hemmung von CDK4/6 und des damit verbunden G₁-Arrests auch zur verminderten Expression von Genen kommt, die für andere Zellzyklusphasen relevant sind, was die Zellen anfälliger für den Zelltod macht [77]. Darüber hinaus konnte bereits an kolorektalen Karzinomzelllinien gezeigt werden, dass Zellen mit Störungen der Zellzyklus-Checkpunkte unter Bestrahlung apoptotisch reagieren, während Zellen ohne diese Störungen lediglich in der G₁-Phase arretieren [78]. Eine Übertragung dieser *in vitro*-Versuche auf p21-*knockout* Mäuse, d.h. auf Tiere, denen p21 als wichtiger Zellzyklus-Kontrolleur fehlt, führte ebenfalls zu einem besseren Therapieansprechen als bei den p21-positiven Mäusen [78]. Es ist somit davon auszugehen, dass die Inhibition verschiedener Zellzyklus-Kontrollmechanismen Zellen unter Stress schneller in die Apoptose treibt. Es wäre demzufolge zum einen interessant zu untersuchen, ob auch bei Keimzelltumoren synergistische Effekte bei gleichzeitiger CDK4/6-Inhibition und Cisplatin-Behandlung beobachtet werden können. Zum anderen legt diese Arbeit nahe, dass bei einer Übertragung auf *in vivo*-Versuche mit positiven Effekten zu rechnen ist. Weitergehend ist es von großer Relevanz, dass insgesamt v.a. die Tumorzelllinien apoptotisch auf die CDK4/6-Inhibition reagieren. So zeigte auch eine andere Arbeit, die sich mit den Effekten der Inhibition auf menschliche tumorfreie Zelllinien

(25 Zelllinien darunter THP1 und Hek293) beschäftigt hat, dass diese den G₁-Arrest gut tolerieren und nach Beendigung der Inhibitorgabe (Palbociclib, Ribociclib und Abemaciclib; nach 24 Stunden) den Zellzyklus weiter durchlaufen können [79]. Es ist dementsprechend davon auszugehen, dass eine Behandlung mit Palbo- und Ribociclib die körpereigenen Zellen schonen und gezielt die Tumorzellen angreifen würde.

4.4. Fazit und Ausblick

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Arbeit grundsätzlich zeigt, dass die Behandlung von (Cisplatin-resistenten) Keimzelltumoren mit Palbo- und Ribociclib zu einem zelllinienabhängigen Zellzyklusarrest und/oder einer zelllinienabhängigen Apoptose-Induktion führt und somit einen vielversprechenden Therapieansatz für Keimzelltumoren darstellt. Natürlich müssen diese Beobachtungen durch eine Übertragung auf *in vivo*-Versuche verifiziert werden. Weitergehend wäre es interessant, ob es durch einen längeren Behandlungszeitraum zur Resistenzentwicklung der Keimzelltumorzellen kommt. Auch bleibt die Frage offen, warum gerade die Cisplatin-resistenten Subklone sensibler auf die CDK4/6-Inhibition reagierten als ihre parenteralen Zelllinien und ob eine Kombination aus Cisplatin und Palbo- bzw. Ribociclib zu synergistischen Effekten führen könnte. Aus der nicht-erwarteten Apoptoseinduktion ergibt sich außerdem die Frage, welche weiteren Signalwege durch die CDK4/6-Inhibition in welcher Form beeinflusst werden. Würde man dies besser verstehen, würde klar, warum die Inhibition zum einen generell Tumorentitäten-abhängig ist und zum anderen welche Konsequenzen die verlängerten Zellzyklusphasen bzw. Seneszenzstadien für Tumorzellen haben.

Generell kann diese Arbeit jedoch als Ausgangspunkt für viele weitere Versuche und Arbeiten genutzt werden, die alle dabei helfen, die CDK4/6-Inhibition als Therapie bei Keimzelltumoren zu etablieren.

Literaturverzeichnis

- [1] O.A., "Gametogenese," *Psychrembel*. De Gruyter, 2014.
- [2] P. D. med. A. Mayerhofer, "Spermatogenese," *Thieme via medici*, 2020.
<https://viamedici.thieme.de/lernmodul/547003/subject/histologie/geschlechtsorgane/männliche+geschlechtsorgane/spermatogenese>.
- [3] Benninghoff und Drenckhahn, *Anatomie. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*. Urban & Fischer, 2002.
- [4] o.A., "Blut-Hoden-Schranke," *Psychrembel*. De Gruyter, 2014.
- [5] o.A., "Zentrum für Krebsregisterdaten, Robert Koch-Institut," 2019.
https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Hodenkrebs/hodenkrebs_node.html.
- [6] L. Cheng *et al.*, "Testicular cancer," *Nat. Rev. Dis. Prim.*, vol. 4, no. 1, 2018, doi: 10.1038/s41572-018-0029-0.
- [7] A. Batool, N. Karimi, X. N. Wu, S. R. Chen, and Y. X. Liu, "Testicular germ cell tumor: a comprehensive review," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 76, no. 9, pp. 1713–1727, 2019, doi: 10.1007/s00018-019-03022-7.
- [8] o.A., "Isochromosom," *Psychrembel*. De Gruyter, 2014.
- [9] D. Manski, *Keimzelltumoren*. Urologielehrbuch.de, 2020.
- [10] o.A., "Genomisches Imprinting," *Psychrembel*. De Gruyter, 2014.
- [11] M. R. Müller, M. A. Skowron, P. Albers, and D. Nettersheim, "Molecular and epigenetic pathogenesis of germ cell tumors," *Asian J. Urol.*, no. xxxx, 2020, doi: 10.1016/j.ajur.2020.05.009.
- [12] o.A., "Hodenhochstand," *Psychrembel*. De Gruyter, 2014.
- [13] D. C. Baird *et al.*, "Testicular Cancer: Diagnosis and Treatment," *Am. Fam. Physician*, vol. 97, no. 4, 2018.
- [14] o.A., "Hypospadie," *Psychrembel*. De Gruyter, 2014.
- [15] C. Niemeyer and A. Eggert, *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag GmbH Deutschland, 2018.
- [16] o.A., "Klinefelter-Syndrom." De Gruyter, 2014.

- [17] J. W. Oosterhuis and L. H. J. Looijenga, "Testicular germ-cell tumours in a broader perspective," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 5, no. 3, pp. 210–222, 2005, doi: 10.1038/nrc1568.
- [18] H. U. Schmelz, C. Sparwasser, and W. Weidner, *Facharztwissen Urologie*. Springer-Verlag GmbH Deutschland, 2010.
- [19] F. E. Von Eyben, "Laboratory markers and germ cell tumors," *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, vol. 40, no. 4, pp. 377–427, 2003, doi: 10.1080/10408360390247814.
- [20] R. Hautmann and J. E. Gschwend, *Urologie*. Springer-Verlag GmbH Deutschland, 2014.
- [21] F. W. Michael Wannenmacher, Jürgen Debus, *Strahlentherapie*. Springer-Verlag GmbH Deutschland, 2007.
- [22] G. L. Thomas Herdegen, Ruwen Böhm, Juraj Culman, Peter Gohlke, *Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie*. Georg Thieme Verlag, 2013.
- [23] P. Chung and P. Warde, "Testicular cancer: germ cell tumours," *BMJ Clin. Evid.*, vol. 2016, no. October 2014, pp. 1–21, 2016.
- [24] C. Fung, S. D. Fossa, A. Williams, and L. B. Travis, "Long-term Morbidity of Testicular Cancer Treatment," *Urol. Clin. North Am.*, vol. 42, no. 3, pp. 393–408, 2015, doi: 10.1016/j.ucl.2015.05.002.
- [25] R. Schaffar, S. Pant, C. Bouchardy, H. Schubert, and E. Rapiti, "Testicular cancer in Geneva, Switzerland, 1970-2012: Incidence trends, survival and risk of second cancer," *BMC Urol.*, vol. 19, no. 1, pp. 1–8, 2019, doi: 10.1186/s12894-019-0494-0.
- [26] A. Nordheim and R. Knippers, *Molekulare Genetik*. Thieme, 2018.
- [27] Werner Buselmaier, *Biologie für Mediziner*. Springer-Verlag GmbH Deutschland, 2012.
- [28] E. S. Knudsen and A. K. Witkiewicz, "The Strange Case of CDK4/6 Inhibitors: Mechanisms, Resistance, and Combination Strategies," *Trends in Cancer*, vol. 3, no. 1, pp. 39–55, 2017, doi: 10.1016/j.trecan.2016.11.006.
- [29] M. A. Skowron *et al.*, "CDK4/6 inhibition presents as a therapeutic option for paediatric and adult germ cell tumours and induces cell cycle arrest and apoptosis via canonical and non-canonical mechanisms," *Br. J. Cancer*, vol. 123, no. 3, 2020, doi: 10.1038/s41416-020-0891-x.

- [30] C. J. Sherr, D. Beach, and G. I. Shapiro, "Targeting CDK4 and CDK6: From discovery to therapy," *Cancer Discov.*, vol. 6, no. 4, pp. 353–367, 2016, doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-0894.
- [31] F. Schettini *et al.*, "CDK 4/6 inhibitors as single agent in advanced solid tumors," *Front. Oncol.*, vol. 8, no. December, pp. 1–12, 2018, doi: 10.3389/fonc.2018.00608.
- [32] B. B. Li *et al.*, "CDK4/6 inhibition triggers anti-tumor immunity," *Nature*, vol. 548, no. 7668, pp. 471–475, 2017, doi: 10.1038/nature23465.CDK4/6.
- [33] o.A., "regulatorische T-Lymphozyten," *Psychrembel*. De Gruyter, 2014.
- [34] o.A., "zytotoxische T-Lymphozyten," *Psychrembel*. De Gruyter, 2014.
- [35] J. Lu, "Palbociclib: a first-in-class CDK4/CDK6 inhibitor for the treatment of hormone-receptor positive advanced breast cancer," *J. Hematol. Oncol.*, vol. 8, no. 1, pp. 10–12, 2015, doi: 10.1186/s13045-015-0194-5.
- [36] o.A., "Hormonrezeptor-Status," *Psychrembel*. De Gruyter, 2014.
- [37] o.A., "HER2-Status," *Psychrembel*. De Gruyter, 2014.
- [38] N. Portman *et al.*, "MDM2 inhibition in combination with endocrine therapy and CDK4/6 inhibition for the treatment of ER-positive breast cancer," *Breast Cancer Res.*, vol. 22, no. 1, pp. 1–17, 2020, doi: 10.1186/s13058-020-01318-2.
- [39] W. D. Friedemann Honecker, Johannes Claßen, Joachim Preiß, *Taschenbuch Onkologie: Interdisziplinäre Empfehlungen zur Therapie 2020/2021*. Zuckschwerdt-Verlag, 2020.
- [40] M. Iyengar *et al.*, "CDK4/6 inhibition as maintenance and combination therapy for high grade serous ovarian cancer," *Oncotarget*, vol. 9, no. 21, pp. 15658–15672, 2018, doi: 10.18632/oncotarget.24585.
- [41] K. Nakatani *et al.*, "Inhibition of CDK4/6 and autophagy synergistically induces apoptosis in t(8;21) acute myeloid leukemia cells," *Int. J. Hematol.*, vol. 113, no. 2, pp. 243–253, 2020, doi: 10.1007/s12185-020-03015-4.
- [42] J. P. Richie, "Second cancers among 40,576 testicular cancer patients: focus on long-term survivors," *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.*, vol. 24, pp. 171–172, 2006.
- [43] P. Maroto, G. Anguera, and C. Martin, "Long-term toxicity of the treatment for germ cell-cancer. A review.," *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 121, pp. 62–67, 2018.

- [44] J. Lorenz, "Sexualfunktion nach Hodenkrebs," *Aktuelle Urol.*, vol. 50, no. 2, pp. 138–139, 2019, doi: 10.1055/a-0795-5577.
- [45] K. Possinger, A. C. Regierer, and J. Eucke, *Facharztwissen Hämatologie und Onkologie*. Elsevier, 2017.
- [46] C. Bokemeyer, M. A. Skowron, M. C. Peters, D. Nettersheim, and C. Oing, "Cisplatin-refractory germ cell tumours - molecular background and clinical concepts," *Der Onkol.*, vol. 27, no. 1, pp. 46–53, 2021, doi: 10.1007/s00761-020-00881-9.
- [47] J. Lobo, C. Jerónimo, and R. Henrique, "Cisplatin resistance in testicular germ cell tumors: Current challenges from various perspectives," *Cancers (Basel)*., vol. 12, no. 6, pp. 1–26, 2020, doi: 10.3390/cancers12061601.
- [48] American Type Culture Collection, "Cell Proliferation Assay Kit Instruction Manual," 1988.
- [49] D. Eckert, D. Nettersheim, L. C. Heukamp, S. Kitazawa, K. Biermann, and H. Schorle, "TCam-2 but not JKT-1 cells resemble seminoma in cell culture," *Cell Tissue Res.*, vol. 331, no. 2, pp. 529–538, 2008, doi: 10.1007/s00441-007-0527-y.
- [50] H. Chen *et al.*, "CDK4 protein is degraded by anaphase-promoting complex/cyclosome in mitosis and reaccumulates in early G1 phase to initiate a new cell cycle in HeLa cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 292, no. 24, pp. 10131–10141, 2017, doi: 10.1074/jbc.M116.773226.
- [51] Y. Gong, S. Deng, M. Zhang, G. Wang, G. Y. Minuk, and F. Burczynski, "A cyclin-dependent kinase inhibitor (p21WAF1/CIP1) affects thymidine incorporation in human liver cancer cells," *Br. J. Cancer*, vol. 86, no. 4, pp. 625–629, 2002, doi: 10.1038/sj.bjc.6600099.
- [52] E. Sirach *et al.*, "KLF6 transcription factor protects hepatocellular carcinoma-derived cells from apoptosis," *Cell Death Differ.*, vol. 14, no. 6, pp. 1202–1210, 2007, doi: 10.1038/sj.cdd.4402114.
- [53] B. A. Schmidt, A. Rose, C. Steinhoff, T. Strohmeyer, M. Hartmann, and R. Ackermann, "Up-regulation of cyclin-dependent kinase 4/cyclin D2 expression but down-regulation of cyclin-dependent kinase 2/cyclin E in testicular germ cell tumors," *Cancer Res.*, vol. 61, no. 10, pp. 4214–4221, 2001.
- [54] J. Bartkova *et al.*, "Deregulation of the RB pathway in human testicular germ cell

- tumours," *J. Pathol.*, vol. 200, no. 2, pp. 149–156, 2003, doi: 10.1002/path.1353.
- [55] C. Rubio *et al.*, "CDK4/6 inhibitor as a novel therapeutic approach for advanced bladder cancer independently of RB1 status," *Clin. Cancer Res.*, vol. 25, no. 1, pp. 390–402, 2019, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-0685.
- [56] R. Liang *et al.*, "Targeted Gene Expression Profile Reveals CDK4 as Therapeutic Target for Selected Patients With Adrenocortical Carcinoma," *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, vol. 11, no. April, pp. 1–13, 2020, doi: 10.3389/fendo.2020.00219.
- [57] Y. Zhou, J. K. Shen, Z. Yu, F. J. Hornicek, Q. Kan, and Z. Duan, "Expression and therapeutic implications of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) in osteosarcoma," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, vol. 1864, no. 5, pp. 1573–1582, 2018, doi: 10.1016/j.bbadis.2018.02.004.
- [58] G. Zhang *et al.*, "Palbociclib triggers apoptosis in bladder cancer cells by Cdk2-induced Rad9-mediated reorganization of the Bak.Bcl-xl complex," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 163, no. February, pp. 133–141, 2019, doi: 10.1016/j.bcp.2019.02.017.
- [59] M. Álvarez-Fernández and M. Malumbres, "Mechanisms of Sensitivity and Resistance to CDK4/6 Inhibition," *Cancer Cell*, vol. 37, no. 4, pp. 514–529, 2020, doi: 10.1016/j.ccell.2020.03.010.
- [60] J. L. Dean, C. Thangavel, A. K. McClendon, C. A. Reed, and E. S. Knudsen, "Therapeutic CDK4/6 inhibition in breast cancer: Key mechanisms of response and failure," *Oncogene*, vol. 29, no. 28, pp. 4018–4032, 2010, doi: 10.1038/onc.2010.154.
- [61] I. Garcia-murillas *et al.*, "Early Adaptation and Acquired Resistance to CDK4/6 Inhibition in Estrogen Receptor–Positive Breast Cancer," *Cancer Res.*, vol. 76, no. 8, pp. 2301–2313, 2016, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0728.Early.
- [62] G. Nelson *et al.*, "A senescent cell bystander effect: Senescence-induced senescence," *Aging Cell*, vol. 11, no. 2, pp. 345–349, 2012, doi: 10.1111/j.1474-9726.2012.00795.x.
- [63] E. Sikora, G. Mosieniak, and M. Alicja Sliwinska, "Morphological and Functional Characteristic of Senescent Cancer Cells," *Curr. Drug Targets*, vol. 17, no. 4, pp. 377–387, 2016, doi: 10.2174/1389450116666151019094724.
- [64] T. Kuilman, C. Michaloglou, W. J. Mooi, and D. S. Peeper, "The essence of

- senescence,” *Genes Dev.*, pp. 1–17, 2010, doi: 10.1101/gad.1971610.by.
- [65] R. Kumari and P. Jat, “Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype,” *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 9, no. March, pp. 1–24, 2021, doi: 10.3389/fcell.2021.645593.
- [66] S. Van Cruchten and W. Van den Broeck, “Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis,” *Anat. Histol. Embryol.*, vol. 31, no. 4, pp. 214–223, 2002, doi: 10.1046/j.1439-0264.2002.00398.x.
- [67] I. Z. Theodor Dingermann, Rudolf Hänsel, *Pharmazeutische Biologie*, vol. 130, no. 22. Springer-Verlag GmbH Deutschland, 1990.
- [68] K. R. Aigner *et al.*, *Onkologie Basiswissen*. Springer-Verlag GmbH Deutschland, 2016.
- [69] S. Horibe *et al.*, “Cisplatin resistance in human lung cancer cells is linked with dysregulation of cell cycle associated proteins,” *Life Sci.*, vol. 124, pp. 31–40, 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.01.011>.
- [70] D. J. Vaughn, W. T. Hwang, P. Lal, M. A. Rosen, M. Gallagher, and P. J. O'Dwyer, “Phase 2 trial of the cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in patients with retinoblastoma protein-expressing germ cell tumors,” *Cancer*, vol. 121, no. 9, pp. 1463–1468, 2015, doi: 10.1002/cncr.29213.
- [71] V. Narayan *et al.*, “Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibition for the Treatment of Unresectable Mature Teratoma: Long-Term Follow-Up of a Phase II Study.,” *Clin. Genitourin. Cancer*, vol. 14, no. 6, pp. 504–510, Dec. 2016, doi: 10.1016/j.clgc.2016.03.010.
- [72] J. L. Green *et al.*, “Direct CDKN2 modulation of CDK4 alters target engagement of CDK4 inhibitor drugs,” *Mol. Cancer Ther.*, vol. 18, no. 4, pp. 771–779, 2019, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-18-0755.
- [73] F. Hofmann and D. M. Livingston, “Differential effects of cdk2 and cdk3 on the control of pRb and E2F function during G1 exit,” *Genes Dev.*, vol. 10, no. 7, pp. 851–861, 1996, doi: 10.1101/gad.10.7.851.
- [74] N. Sarin *et al.*, “Cisplatin resistance in non-small cell lung cancer cells is associated with an abrogation of cisplatin-induced G2/M cell cycle arrest,” *PLoS One*, vol. 12, no. 7, pp. 1–26, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0181081.
- [75] Y. J. Choi *et al.*, “The requirement for cyclin D function in tumor maintenance.,”

Cancer Cell, vol. 22, no. 4, pp. 438–451, Oct. 2012, doi: 10.1016/j.ccr.2012.09.015.

- [76] B. Medsker, E. Forno, H. Simhan, C. Juan, and R. Sciences, “Metabolic re-programming of pancreatic cancer mediated by CDK4/6 inhibition elicits unique vulnerabilities,” *Cell Rep.*, vol. 70, no. 12, pp. 773–779, 2016, doi: 10.1016/j.celrep.2015.12.094.Metabolic.
- [77] X. Huang *et al.*, “Prolonged early G 1 arrest by selective CDK4/CDK6 inhibition sensitizes myeloma cells to cytotoxic killing through cell cycle-coupled loss of IRF4,” *Blood*, vol. 120, no. 5, pp. 1095–1106, 2012, doi: 10.1182/blood-2012-03-415984.
- [78] T. Waldman *et al.*, “Cell-cycle arrest versus cell death in cancer therapy,” *Nat. Med.*, vol. 3, no. 9, pp. 1034–1036, 1997, doi: 10.1038/nm0997-1034.
- [79] E. W. Trotter and I. M. Hagan, “Release from cell cycle arrest with Cdk4/6 inhibitors generates highly synchronized cell cycle progression in human cell culture: Cdk4/6 Induction Synchronisation,” *Open Biol.*, vol. 10, no. 10, 2020, doi: 10.1098/rsob.200200rsob200200.

Anhang 1

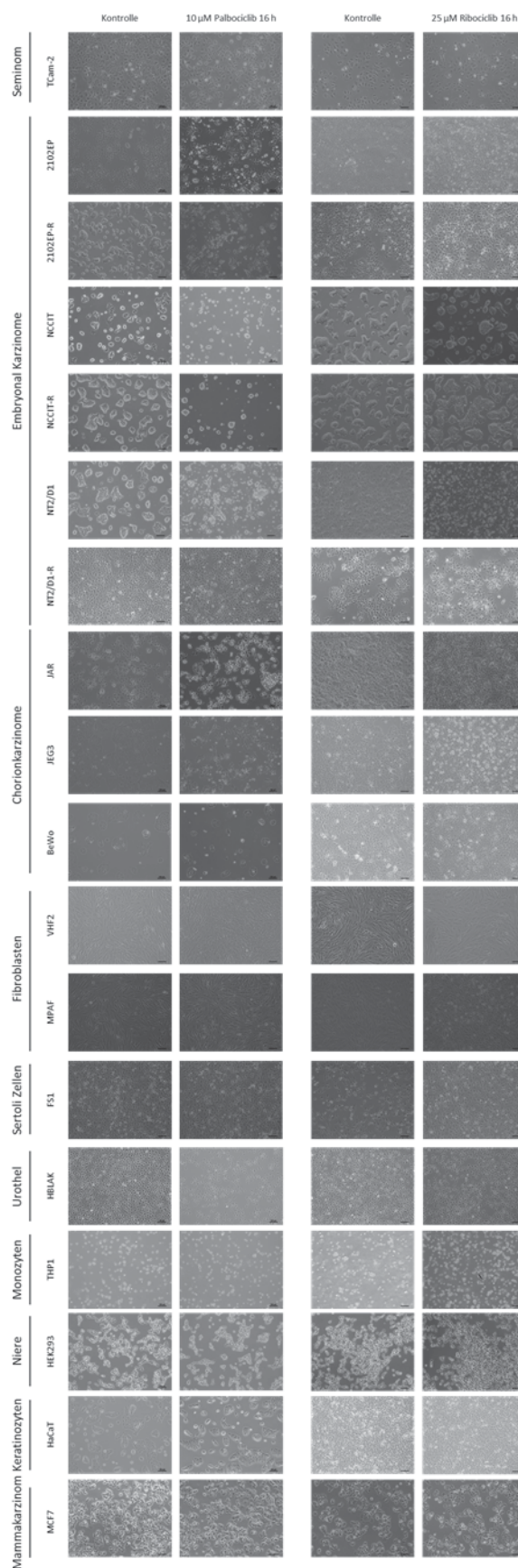


Abbildung 18: Fotos der Zellen mit/ohne Palbo- bzw. Ribociclib-Behandlung.

Anhang 2

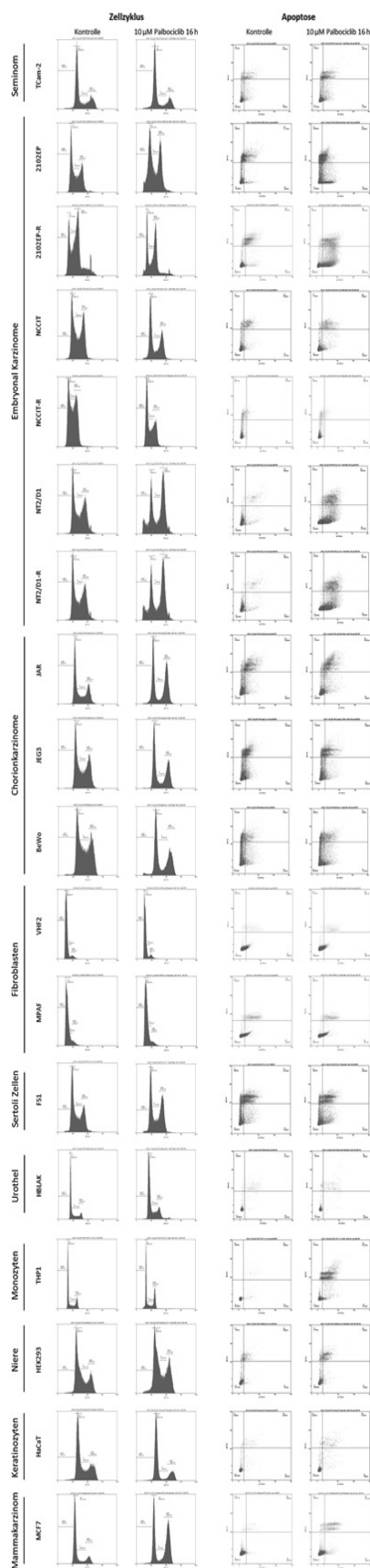


Abbildung 19: Rohdaten Nicoletti-Assay zur Zellzyklusanalyse und Annexin V/PI-Apoptoseassay unter Palbociclib-Behandlung.

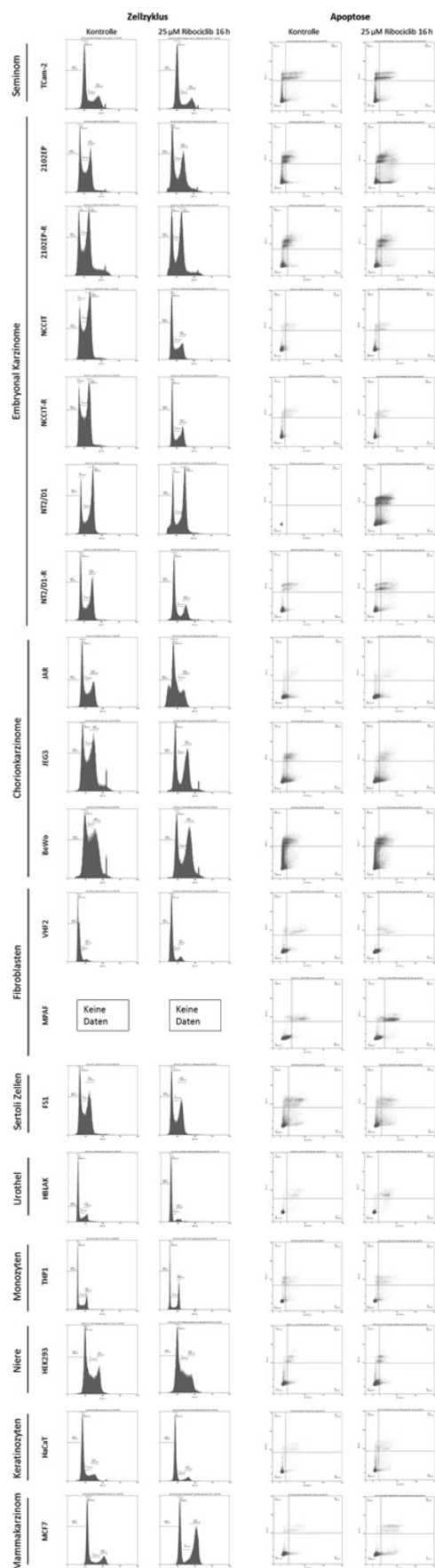


Abbildung 20: Rohdaten Nicoletti-Assay zur Zellzyklusanalyse und Annexin V/PI-Apoptoseassay unter Ribociclib-Behandlung.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt und mich immer wieder motiviert haben.

Zuerst gebührt mein Dank Herrn Prof. Dr. Nettersheim und Frau PhD Skowron, die mich während meiner Laborzeit betreut haben, stets ein offenes Ohr für Fragen hatten, mir immer geholfen und konstruktive Kritik bei der Erstellung dieser Arbeit gegeben haben. Ich hätte mir keine bessere Betreuung wünschen können. Dafür möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Des Weiteren danke ich den Firmen Pfizer Inc. und Novartis AG für die Bereitstellung der Inhibitorsubstanzen Palbo- und Ribociclib, ohne die diese Arbeit nie zu Stande gekommen wäre.

Abschließend gilt ein ganz besonderer Dank dem gesamten Laborteam. Durch den Zusammenhalt und durch die familiäre Atmosphäre wurde die Zeit im Labor für mich unvergesslich und ein besonders schöner Abschnitt meines Studiums.