

Aus der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und klinische Immunologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Arndt Borkhardt

**Identifikation neuer therapeutischer Ansätze
für hochmaligne Gliome im Kindes- und Erwachsenenalter**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Mara Maue

2024

Angabe der Gutachter

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Marc Remke

Zweitgutachetr: Prof. Dr. med. Guido Reifenberger

Für meinen Opa

I. Zusammenfassung (deutsch)

Das Glioblastom stellt den häufigsten primären malignen Hirntumor im Erwachsenenalter dar. Bei Kindern sind bösartige Gliome deutlich seltener als bei Erwachsenen, weisen aber auch in dieser Altersgruppe meist eine äußerst schlechte Prognose mit einem Fünfjahresüberleben von unter 5% auf. Das multimodale Behandlungskonzept maligner Gliome umfasst eine möglichst vollständige chirurgische Resektion des Tumors mit nachfolgender kombinierter Chemo- und Radiotherapie. Diese Therapiekombination stellt eine erhebliche Belastung dar, welche durch eine zielgerichtete Behandlung unter Einbeziehung typischer genetisch bedingter Vulnerabilitäten reduziert werden könnte. Zur Identifizierung neuer therapeutischer Ansätze wurden im Rahmen dieser Arbeit pädiatrische ($n = 7$) und adulte ($n = 18$) Zellkulturmodelle hochgradig maligner Gliome in der Hochdurchsatz-Medikamententestung (*high-throughput drug screening*, HTDS) hinsichtlich des therapeutischen Ansprechmusters verglichen. Dabei wurden 660 entweder experimentelle oder bereits klinisch eingesetzte Wirkstoffe getestet, um eine schnelle Translation in die Therapie zu ermöglichen. Im Rahmen der HTDS konnte für die Inhibitoren Napabucasin und Nedaplatin eine gute Wirkung auf kultivierte Gliomzellen nachgewiesen werden. Napabucasin, ein oral verfügbarer niedermolekularer STAT3- Inhibitor, kann die Zellproliferation von Gliomzellen hemmen und zu deren Apoptose führen. In klinischen Studien erwies Napabucasin sich als nebenwirkungsarm und gut verträglich. Eine synergistische Wirkung mit Temozolomid konnte im Rahmen dieser Arbeit für Gliomzellen nachgewiesen werden. Bei Nedaplatin handelt es sich um ein Cisplatin- Analogon, das in Gliomzellen mit erhöhter Kopienzahl des Cyclin D1-Gens (*CCND1*) ein Wirkansprechen zeigte. Wirkstoffe wie Napabucasin und Nedaplatin könnten in der Zukunft in Kombination mit der Standardtherapie, nicht nur bei Glioblastomen und pädiatrischen malignen Gliomen, eine bedeutende Rolle spielen. Gerade Malignome mit infauster Prognose und starker Resistenzentwicklung machen synergistisch wirksame Medikamente mit einem günstigen Nebenwirkungsprofil und entsprechender, bereits bestehender Studienlage, besonders interessant. Mit Hilfe des HTDS ist die Identifizierung solcher Wirkstoffe möglich, so dass die Entwicklung einer personalisierten Medizin für Patienten mit bösartigen Gliomen ermöglicht werden kann.

II. Zusammenfassung (englisch)

Glioblastoma is the most common primary malignant brain tumor in adults. Malignant gliomas are overall less frequent in children than in adults. However, they also have an extremely poor prognosis with a five-year survival rates of less than 5%. The multimodal treatment concept for glioblastoma and other malignant gliomas includes surgical resection of the tumor followed by combined chemotherapy and radiotherapy. This combination of therapies represents a massive burden, which could be reduced by the development of targeted treatments based on tumor-specific genetic vulnerabilities. To identify novel therapeutic approaches, this work compared drug response patterns in pediatric ($n = 7$) and adult ($n = 18$) malignant glioma cell culture models using a high-throughput drug screening (HTDS) approach. This included testing of 660 experimental compounds as well as compounds already in clinical use to enable rapid translation into clinical application. The high-throughput drug screening approach revealed that the pharmacological inhibitors napabucasin and nedaplatin showed the most promising antitumoral effects on cultured glioma cells. Napabucasin, an orally available small molecule *STAT3* inhibitor, inhibited cell proliferation and induced apoptosis of glioma cells. In clinical trials, napabucasin was shown to have few side effects and was well-tolerated. The own research experiments demonstrated synergistic effects with temozolomide on cultured gliomas cells. Nedaplatin is a cisplatin analog that showed a specific response in glioma cells with increased copy numbers of the cyclin D1 (*CCND1*) gene. Drugs including napabucasin and nedaplatin could play future roles as add-ons to standard therapy, not only in the treatment of malignant gliomas. Especially highly drug resistant malignancies with a devastating prognosis require alternative treatment approaches including synergistically effective drugs with a favorable side effect profile established in advanced clinical studies. High-throughput drug screening enables the identification of such drugs and can thereby pave the way towards personalized medicine for adult and pediatric patients with malignant gliomas.

III. Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluoruracil
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
ATRT	Atypischer teratoider/rhabdoider Tumor
AUC	Area under the curve
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
CDKN2A	Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor 2A
CO ₂	Kohlendioxid
CSC	Cancer stem cells (Krebsstammzellen)
DIPG	Diffuses intrinsisches Pongliom
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
FBS	Fetales Bovines Serum
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FGFR1	Fibroblasten-Wachstumsfaktorrezeptor 1
GBM	Glioblastom
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
H ₂ O	Wasser
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HDAC	Histondeacetylase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HER2	Humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2
HFF	Humane Fibroblasten
HTDS	High-throughput Drug Screening (Hochdurchsatz-Medikamententestung)
IC ₅₀	Half maximal inhibitory concentration
IDH	Isocitratdehydrogenase
IL	Interleukin
JAK	Janus-Kinase
LIF	Leukämiehemmender Faktor
MCP1	Makrophagen-Chemoattraktorprotein 1
MDM2	Mouse double minute 2 homolog
MEM	Modified Eagle Medium
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MLH1	MutL Homolog 1
mM	Millimolar

MUC1	Mucin1
MYB	MYB Proto-Oncogene
MYBL1/2	MYB Proto-Oncogene Like 1/2
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NEAA	Non Essential Amino Acid Solution
NF1	Neurofibromin 1
nM	Nanomolar
NQO1	NADPH Chinon Oxidoreduktase 1
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
NTRK2	Neurotrophin Rezeptor Tyrosin Kinase 2
OKT	Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor
P/S	Penicillin/Streptomycin
PARP	Poly (ADP-Ribose) -Polymerase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDGF	Platelet Derived Growth Factor (Blutplättchen-Wachstumsfaktor)
PDGFRA	Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha
PI	Propidiumiodid
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
PMS2	PMS1 Homolog 2
PTN	Pleiotrophin
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPM	Revolutions per minute
SH2	Src-Homologiedomäne
SOX2	Sex determining region Y-box 2
STAT	Signaltransduktor und Aktivator der Transkription
TCS2	Tuberin
TERT	Telomerase Reverse Transkriptase
TLRs	Toll-like-Rezeptoren
TNF- α	Tumornekrose-Faktor- α
TP53	Tumorsuppressorprotein p53
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Glioblastom	1
1.1.1 Histologische und molekulare Merkmale des Glioblastoms im Erwachsenenalter.....	2
1.1.2 Hochgradige diffuse astrozytäre Gliome im Kindesalter.....	3
1.2 Hochdurchsatz-Medikamententestung zur Identifikation neuer therapeutischer Ansätze .	4
1.3 Krebsstammzellen als therapeutische Zielstrukturen.....	6
1.4 Die Rolle von STAT3 in der Kanzerogenese	7
1.5 Die Rolle von <i>CCND1</i> als Proto-Onkogen.....	10
1.6 Napabucasin	12
1.7 Ziele der Arbeit	13
2. Material	14
2.1 Zelllinien und Medien	14
Die in den eigenen Experimenten verwendeten Zellkulturmodelle, deren Herkunft sowie die zur Kultivierung der jeweiligen Zellen benutzten Medien sind in Tabelle 1 zusammengefasst	14
2.2 Inhibitoren	16
Die verwendeten pharmakologischen Inhibitoren und deren wesentliche Wirkmechanismen sind in Tabelle 2 zusammengefasst	16
2.3 Geräte	29
2.4 Software.....	30
2.5 Verbrauchsmaterialien	30
2.5.1 Medien und Lösungen	30
2.5.2 Materialien.....	32
3. Methoden.....	33
3.1 Präparation der Inhibitoren.....	33
3.2 Erstellung des Plattendesigns zur Hochdurchsatz-Medikamententestung	33
3.3 Inhibitor dispensation auf 384-Well-Mikrotiterplatten	34
3.4 Qualitätskontrollen innerhalb des Screening-Prozesses	35
3.4.1 Qualitätskontrolle innerhalb des Screening-Experiments	35
3.4.2 Qualitätskontrolle innerhalb der Datenauswertung.....	37
3.5 Erstellung des Plattendesigns für die Validierung von Napabucasin und Synergismus-Experimente.....	38
3.5.1 Konzentrationen von Napabucasin für die Validierung.....	38
3.5.2 Konzentrationen der Inhibitoren im Synergismus-Experiment	38
3.5.3 Auswertung des Synergismus-Experiments	40

3.6	Zelllinien und Zellkultur.....	40
3.6.1	Passagieren und Splitten adhärenter Zelllinien.....	41
3.6.2	Passagieren und Splitten von Zelllinien in Suspension.....	41
3.6.3	Kryokonservierung von Zellen.....	41
3.6.4	Bestimmung der Zellzahl.....	42
3.6.5	Bestimmung der Zellzahl für die Hochdurchsatz-Medikamententestung	42
3.7	Zellviabilitätsassay mittels CellTiterGlo®	43
3.8	Propidiumiodid-Färbung für die Durchflusszytometrie zur Zellzyklusanalyse	45
4.	Ergebnisse	47
4.1.1	Untersuchung der Inhibitoren auf entitätsspezifische Wirksamkeit.....	47
4.1.2	Wirkspezifität von Napabucasin in adulten und pädiatrischen hochgradigen Gliomen.....	52
4.1.3	Synergistische Effekte von Napabucasin in Kombination mit anderen Inhibitoren.....	53
4.1.4	Zellzyklus- und Apoptoseanalyse mittels Durchflusszytometrie nach Napabucasinbehandlung	57
4.2.1	Heatmapanalyse der Wirksspezifität von ausgewählten Inhibitoren auf Glioblastomzelllinien.....	59
4.2.2	Wirkspezifität von Nedaplatin in Abhängigkeit vom <i>CCND1</i> -Kopienzahlstatus	61
5.	Diskussion	62
5.1	Die Identifikation neuartiger therapeutischer Ansätze durch die Hochdurchsatz-Medikamententestung	62
5.2	Nedaplatin zeigt ein von der Kopienzahl des <i>CCND1</i> -Gens abhängiges Wirkansprechen in Glioblastomzellen.....	68
5.5	Limitationen der Arbeit.....	70
5.6	Schlussfolgerung und Ausblick.....	71
6.	Literaturverzeichnis	73
7.	Anhang	89
8.	Danksagung	100

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Tumorphiliferation unter Standardtherapie und unter Krebsstammzell-spezifischer Therapie.....	7
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Einflusses von STAT3 auf die Tumorphiliferation.	9
Abbildung 3: Der physiologische Zellzyklus und die Regulation der Phasen durch Cyclin-abhängige Kinasen.	10
Abbildung 4: Der Einfluss der Cyclin D1-Überexpression auf die Zelle.	11
Abbildung 5: Exemplarische Darstellung eines Plattenmodells aus dem genutzten Setup.....	34
Abbildung 6: Exemplarische Darstellung einer erfolgten Randomisierung in einer Heatmap im Vergleich zu einer fehlerhaften Randomisierung.....	36
Abbildung 7: Heatmap-Darstellung des Randomisierungsmusters auf den befüllten Platten der Inhibitor-Bibliothek exemplarisch für eine Zelllinie.	36
Abbildung 8: Exemplarische Darstellung aller IC50-Werte von Staurosporin für die Zelllinie YKG-1.....	37
Abbildung 9: Das Synergy-Plattendesign ohne Randomisierung und Normalisierung.	39
Abbildung 10: Darstellung des Synergy-Plattendesigns mit Randomisierung und Normalisierung.	40
Abbildung 11: Die Luziferase Biolumineszenzreaktion mit D-Luziferin als Substrat	44
Abbildung 12: Der exemplarische Vergleich der Wirksamkeit in Glioblastomen und anderen Entitäten für Napabucasin und sechs weitere Inhibitoren.	49
Abbildung 13: Die Wirkung von Napabucasin in adulten und pädiatrischen Glioblastomen im Vergleich zu anderen Entitäten.....	50
Abbildung 14: Die Dosis-Wirkungskurven verschiedener Entitäten für Napabucasin.	51
Abbildung 15: Die Dosis-Wirkungskurven von humanen Fibroblasten für Napabucasin im Vergleich zu adulten und pädiatrischen Glioblastomen	52
Abbildung 16: Die Dosis-Wirkungskurven von adulten und pädiatrischen Glioblastomen.	53
Abbildung 17: Exemplarische Darstellung von synergistischen Effekten in GBM67MF für 5-Fluoruracil, Entinostat, Gemcitabin, Paclitaxel und Napabucasin.	55
Abbildung 18: Exemplarische Darstellung des fehlenden synergistischen Effektes für Irinotecan kombiniert mit Napabucasin.	56
Abbildung 19: Exemplarische Darstellung des Synergismus in GBM67MF für Temozolomid in Kombination mit Napabucasin.....	57
Abbildung 20: Zellzyklus- und Apoptoseanalyse mittels Durchflusszytometrie nach Napabucasin Behandlung in GBM0505611.....	58
Abbildung 22: Heatmap für Inhibitoren Wirksamkeit im Bezug auf <i>CCND1</i> Status der Zelllinien.....	60
Abbildung 23: Dosis-Wirkungskurve von Nedaplatin für Zelllinien mit erhöhter <i>CCND1</i> -Kopienzahl und Wildtyp-Zelllinien.	61
Abbildung 24: Die Strukturformeln von Cisplatin und Nedaplatin im Vergleich.	68

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Zellkulturmodelle und Kulturmedien sowie Ursprung der Zelllinien.....	14
Tabelle 2: Die getesteten Inhibitoren der Wirkstoffbibliothek mit ihrem Wirkmechanismus	16
Tabelle 3: Verwendete Geräte mit Herstellerangabe und Verwendungszweck	29
Tabelle 4: Verwendete Software mit Herstellerangabe und Verwendungszweck	30
Tabelle 5: Verwendete Medien und Lösungen.....	30
Tabelle 6: Verwendete Materialien mit Herstellerangabe.....	32
Tabelle 7: Die Inhibitorkonzentrationen im Synergismus-Experiment	39
Tabelle 8: Die jeweilige Zelllinie und die verwendete Zellzahl	43
Tabelle 9: Zelllinien, die die Qualitätskontrolle passierten und für die Analysen im Entitätenvergleich verwendet wurden.	47
Tabelle 10: Die 20-Top Inhibitoren mit hoher Signifikanz ($p < 0,001$).....	48
Tabelle 11: Verwendete Gliomzelllinien für die Darstellung der Dosis-Wirkungskurven.	52

1. Einleitung

1.1 Glioblastom

Hirntumore sind die häufigste Ursache für krebsbedingte Mortalität bei Kindern und Jugendlichen. Während Glioblastome im Erwachsenenalter die häufigsten bösartigen Hirntumore sind¹, machen diese Tumore im Kindesalter nur etwa 3-15% aller Hirntumore aus. Nichtsdestotrotz ist die Prognose des Glioblastoms im Kindesalter vergleichbar infaust wie im Erwachsenenalter mit einem Fünfjahresüberleben von unter fünf Prozent². Das Glioblastom gehört zu den diffusen Gliomen der astrozytären Linie³ und zu seinen histopathologischen Merkmalen gehören Nekrosen sowie pathologische mikrovaskuläre Prolifere, was zur Zuordnung in den ZNS WHO Grad 4, dem höchsten Grad in der Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO), für Tumoren des zentralen Nervensystems (ZNS) führt.⁴ Das Glioblastom ist häufig im supratentoriellen Bereich (Frontal-, Temporal-, Parietal- und Okzipitallappen) und selten im Kleinhirn lokalisiert. Symptomatisch äußert das Glioblastom sich unter anderem mit Anzeichen eines erhöhten Hirndrucks und bei ca. einem Drittel der Patienten treten epileptische Anfälle auf. Weitere neurologische Symptome sind Lähmungen, Gefühlsstörungen, Sehstörungen, Sprachstörungen, Schwindel, Gedächtnisstörungen oder Veränderungen der Persönlichkeit.⁵

Die meisten Glioblastome entstehen sporadisch, wobei bestimmte Einzelnukleotidpolymorphismen der DNA mit einem erhöhten Risiko assoziiert wurden. Selten entstehen Glioblastome im Rahmen eines erblichen Tumorprädispositionssyndroms, z.B. im Rahmen des sehr seltenen Li-Fraumeni-Syndroms oder einer erblichen Defizienz des DNA-Mismatch-Reparatursystems.³ Als einziger exogener Risikofaktor für die Entwicklung eines Glioblastoms gilt ionisierende Bestrahlung, z.B. in Form einer Bestrahlung des zentralen Nervensystems bei Kindern mit einer akuten Leukämie³. Die derzeitige Behandlung des Glioblastoms ist vielschichtig und besteht zunächst aus einer chirurgischen Resektion, gefolgt von einer Strahlentherapie und einer gleichzeitigen und anschließenden Chemotherapie mit Temozolomid³. Eine zusätzliche Gabe von Lomustin ist ebenfalls möglich und bietet Vorteile im Gesamtüberleben im Vergleich zu einer alleinigen Therapie mit Temozolomid für die Subgruppe der Patienten, in deren Tumor eine Methylierung des O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (*MGMT*)-Genpromotors nachgewiesen wurde⁶. Desweiteren konnte nachgewiesen werden, dass eine Behandlung

mittels TumortheraPIefelder (TTFields) das Gesamtüberleben in der Primärtherapie von adulten Glioblastom-Patienten verlängert⁷. Dieses Verfahren verwendet schwache elektromagnetische Wechselfelder im Langwellenbereich über äußere Elektroden und stört die Mitose der Krebszellen, wodurch das Tumorstachstum gehemmt werden kann. Erste Studien legen ebenfalls eine Wirksamkeit bei pädiatrischen Glioblastom-Patienten nahe⁸. Trotz dieses multimodalen Therapieansatzes konnte das Gesamtüberleben von Glioblastom-Patienten in den letzten drei Jahrzehnten nur unwesentlich verbessert werden und die Prognose bleibt trotz Fortschritten in der Behandlung infaust, wobei ein jüngerer Diagnosealter und ein guter Allgemeinzustand unabhängig voneinander günstige Prognosefaktoren darstellen. Ein Problem bei der Behandlung des Glioblastoms ist die Heterogenität des Tumors auf morphologischer, genetischer und biologischer Ebene, wodurch die Tumorzellen meist recht schnell eine Resistenz gegenüber den verfügbaren Behandlungsmodalitäten entwickeln und es zur lokalen Rezidivtumorbildung kommt.⁹

1.1.1 Histologische und molekulare Merkmale des Glioblastoms im Erwachsenenalter

Das Glioblastom, Isocitratdehydrogenase (IDH)-Wildtyp, ist ein histologisch hochgradiges diffuses Gliom, das überwiegend bei Erwachsenen mit einem Altersgipfel im sechsten Lebensjahrzehnt auftritt und histologisch aus schlecht differenzierten, häufig pleomorphen astrozytären Tumorzellen mit ausgeprägter Kernatypie und hoher mitotischer Aktivität besteht. Prominente mikrovaskuläre Proliferation sowie Nekrosen sind wesentliche diagnostische Merkmale. Für die histologische Diagnosestellung ist das Vorhandensein stark anaplastischer Gliomzellen, einer erhöhten mitotischen Aktivität und vaskulärer Proliferation und/oder Nekrosen erforderlich. Die Verteilung dieser Strukturen innerhalb des Tumors kann zwar variieren, aber große nekrotische Bereiche finden sich für gewöhnlich im Tumorzentrum, während lebensfähige Tumorzellen dazu neigen, sich in der Peripherie anzusammeln. Gefäßproliferationen lassen sich im gesamten Tumor auffinden, besonders prominent sind sie jedoch in der Nähe von nekrotischen Herden und in der peripheren Infiltrationszone. Die Migrationskapazität von Glioblastomzellen im ZNS ist ebenfalls ein wichtiges Identifikationsmerkmal: Tumorzellen sind dabei in der subpialen Zone des Kortex, in der subependymalen Region, um Neuronen herum („perineuronale Satellitose“) und um Gefäße herum auffindbar. Diese Muster werden als „Sekundärstrukturen“ bezeichnet. Insgesamt ist die Histopathologie des Glioblastoms äußerst variabel, wobei in

der WHO-Klassifikation der Tumoren des Nervensystems 2016⁵ das Gliosarkom, das Riesenzellglioblastom und das epitheloide Glioblastome noch als eigene Entitäten abgegrenzt wurden. Letztere treten vor allem bei jüngeren Erwachsenen auf, wo sie als zerebrale oder diencephale Raumforderungen in Erscheinung treten und häufig mit einer *BRAF* V600E-Mutation assoziiert sind.⁵ Die Abgrenzung gegenüber einem pleomorphen Xanthoastrozytom kann dabei schwierig sein⁴. Neben den klassischen histologischen Merkmalen gelten gemäß der neuen WHO-Klassifikation auch bestimmte genetische Veränderungen als diagnostische Biomarker für Glioblastome. Dies sind Amplifikation des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR)-Gens, Mutation des TERT-Promotors und/oder ein kombinierter Gewinn von Chromosom 7 und Verlust von Chromosom 10 (+7/-10)⁴. Wenn mindestens eine dieser genetischen Veränderungen in einem diffusen Gliom ohne IDH-Mutation und ohne Histon H3-Mutation vorliegt, kann der Tumor bei erwachsenen Patienten in die Gruppe der Glioblastome, IDH-Wildtyp eingeordnet werden⁴. Die traditionellen histologischen Varianten (Riesenzellglioblastom, Gliosarkom, epithelioides Glioblastom) werden dagegen in der WHO-Klassifikation 2021 nicht mehr als eigenständige Tumorentitäten betrachtet⁴.

1.1.2 Hochgradige diffuse astrozytäre Gliome im Kindesalter

Während Glioblastome im Erwachsenenalter zu den am häufigsten vorkommenden Hirntumoren mit der höchsten Mortalität zählen, machen bösartige Gliome im Kindesalter lediglich etwa drei bis 15 Prozent aller Hirntumoren aus. Dennoch handelt es sich unabhängig vom Alter der Patienten bei diffusen malignen Gliomen um aggressive Tumoren mit einer infausten Prognose und einer Fünfjahresüberlebensrate von unter fünf Prozent¹⁰. Die makro- und mikroskopischen Eigenschaften des bösartiger Gliome vom pädiatrischen Typ unterscheiden sich oftmals nicht wesentlich von denen der Glioblastome bei Erwachsenen, allerdings handelt es sich auf molekularer Ebene um unterschiedliche Entitäten mit unterschiedlichen genomischen und epigenomischen Veränderungen¹¹⁻¹⁴.

IDH1 - und *IDH2*-Mutationen treten bei hochgradigen diffusen Gliomen vom pädiatrischen Typ sehr selten auf¹⁵, dennoch können auch diese Tumoren in molekulargenetische distinkte Entitäten unterteilt werden. Dies sind (i) das diffuse Mittelliniengliom mit Histon H3-K27-Alteration, (ii) das diffuse hemisphärische Gliom mit Histon H3-G34-Mutation und (iii) das diffuse hochgradige Gliom vom pädiatrischen Typ, IDH-Wildtyp und H3-Wildtyp⁴.

Ausschließlich bei Neugeborenen im ersten Lebensjahr kann zudem ein hemisphärisches Gliom vom pädiatrischen Typ auftreten, das molekularpathologisch durch Genfusionen unter Beteiligung der Rezeptortyrosinkinasegene NTRK1, 2 oder 3, ALK, ROS1 oder MET charakterisiert sind⁴. Mutationen im *H3-3A*-Gen führen entweder zu einer Histon H3.K27M-Variante, bei der Lysin an der Aminosäurenstelle 27 durch Methionin ersetzt wird, oder zu einem Austausch von Glycin mit Arginin bzw. Valin an Position 34 (H3-G34R/V), welche zwei kritische Positionen innerhalb des Histonarms darstellen und direkte Auswirkungen auf entscheidende Regulationsprozesse im Zusammenhang mit der posttranslationalen Modifikation haben¹⁶. Die H3-27M-Variante wurde als spezifischer Befund in diffusen Mittelliniengliomen mit H3-K27-Alteration identifiziert und es handelt sich dabei um eine Treibermutation innerhalb der Tumorgenese¹⁷. Das H3-K27-alterierte diffuse Mittelliniengliom ist ein hochgradiges Gliom des ZNS WHO-Grades 4, das typischerweise im Thalamus, im Pons, im Hirnstamm oder im Rückenmark lokalisiert ist und macht mehr als 70 Prozent der diffusen intrinsischen Ponsgliome (DIPGs) bei Kindern aus¹⁸. Diese Tumoren zeigen ein auffällig geringes Therapieansprechen und sind mit einer sehr ungünstigen Prognose assoziiert. Wie genau die Histon H3-K27M oder die H3-G34R/V Mutationen zur Pathogenese von malignen Gliomen beitragen, ist noch nicht komplett verstanden und ein aktueller Fokus der Forschung in der pädiatrischen Neuroonkologie¹⁸.

1.2 Hochdurchsatz-Medikamententestung zur Identifikation neuer therapeutischer Ansätze

Die Hochdurchsatz-Medikamententestung (*High-throughput drug screening* (HTDS)) ist eine vor allem in der Pharmaforschung angewendete, (semi-)automatisierte Methode, bei der biochemische, genetische oder pharmakologische Tests an Hunderten bis zu Tausenden von Substanzen durchgeführt werden. Mittlerweile wird diese Methode ebenfalls für die Grundlagenforschung und translationale Forschung in der Medizin und Pharmakologie eingesetzt. Sie umfasst das Screening großer pharmakologischer Molekülbibliotheken unter Verwendung von (Semi-)Automatisierung, miniaturisierten Assays und Datenanalyse. Seit seiner Entstehung Anfang der neunziger Jahre hat sich auf dem Gebiet der HTDS nicht nur ein kontinuierlicher Wandel in Technologie und Prozessen vollzogen, sondern auch eine Anpassung an verschiedene Bedürfnisse bei der Wirkungserkennung. Die HTDS hat sich mittlerweile zu einem ausgereiften Verfahren entwickelt, welches insbesondere für die

Forschung nach neuen, biologisch aktiven Substanzen und zur Entwicklung neuer Arzneistoffe verwendet wird¹⁹.

Ein stetig wachsendes Medikamentenspektrum mit einer Vielzahl von molekularen Zielstrukturen machte eine Miniaturisierung der HTDS-Assays nötig. Während des Aufkommens von HTDS Anfang und Mitte der neunziger Jahre waren Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (*wells* (w)) pro Platte das Hauptformat für die Handhabung und die Medikamententestung in den meisten Pharma- und Biotech-Unternehmen. Innerhalb des letzten Jahrzehnts etablierte sich jedoch zunehmend ein Plattentyp mit der gleichen Grundfläche, aber einer höheren Dichte von Vertiefungen. Dabei handelt es sich beispielsweise um Mikrotiterplatten mit 384 Vertiefungen, womit viermal so viele Proben wie mit dem ursprünglichen Format getestet werden können. Die meisten biochemischen oder zellbasierten Assays können problemlos auf dieses Plattenformat angepasst werden¹⁹. Dieses Plattenformat hat sich mittlerweile bei dem Großteil der Pharma- und Biotech-Unternehmen als das Standardformat durchgesetzt¹⁹ und wird ebenfalls regelmäßig als robustes Screening-Verfahren in der Arbeitsgruppe von Prof. Remke genutzt^{20–22}.

Da die Zulassung von Medikamenten ein kompliziertes und häufig langwieriges Verfahren darstellt, erweisen sich Wirkstoffe, die bereits Studien durchlaufen haben oder klinisch etabliert sind, als besonders interessante Kandidaten für *drug repurposing* für neuartige Indikationen. Es gibt zahlreiche Beispiele, in denen HTDS eingesetzt wurde, um pharmakologisch bereits genutzte und erforschte Substanzen für die Behandlung von anderen Tumor- und Infektionserkrankungen zugänglich zu machen^{20–26}. So ist es möglich neue Anwendungen eines etablierten Wirkstoffes zu identifizieren, um eine schnellere Translation in die klinische Praxis zu ermöglichen. Insbesondere sind die Nebenwirkungsprofile dieser Wirkstoffe aus vorherigen Therapieoptimierungsstudien oder der klinischen Erfahrung bereits bekannt und das Risiko für Dosis-limitierender Toxizität kann abgeschätzt werden. Weiterhin tragen solche Erkenntnisse zu einem tiefergreifenden Verständnis der zugrundeliegenden Tumorbilogie bei, da der Wirkmechanismus in der Regel umfassender charakterisiert ist als bei vielen präklinischen Substanzen.

Initial hat die Arbeitsgruppe von Prof. Marc Remke im Rahmen von HTDS-Studien eine Medikamentenbibliothek aus 202 zugelassenen Therapeutika genutzt^{27,28}. Im Verlauf wurde diese Medikamentenbibliothek auf 660 Wirkstoffe erweitert und deckt somit weitere zugelassene Medikamente als auch Wirkstoffkandidaten ab, die in Therapieoptimierungsstudien untersucht werden oder die sich zum Teil noch in der präklinischen Testung befinden.

1.3 Krebsstammzellen als therapeutische Zielstrukturen

Das Verständnis der Heterogenität von Tumoren ist für eine effektive Therapie unerlässlich. So können sich Zellen innerhalb desselben Tumors in Bezug auf Morphologie, Genetik, Zelloberflächenmarker, Proliferationskinetik und dadurch auch in Bezug auf das Ansprechen auf Standardtherapien unterscheiden^{29,30}. Krebsstammzellen (*cancer stem cells* (CSC)) sind eine kleine Subpopulation von Zellen in einem heterogenen Tumor mit der Fähigkeit, die Tumorentstehung zu initiieren. Sie werden auch für die Resistenz maligner Tumore gegenüber Therapie und die Ausbildung von Rezidiven verantwortlich gemacht. Die Zellpopulation hat ähnlich wie embryonale und stromale Stammzellen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung^{29,31–35}. Krebsstammzellen unterscheiden sich jedoch in mehreren Punkten von normalen Stammzellen. Häufig weisen CSC eine Fehlregulation in einem oder mehreren Signalwegen wie den NANOG, Wnt/ β -Catenin, Hedgehog, Notch, Janus-Kinase (JAK), Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription (STAT) bzw. Phosphoinositid-3-Kinase- oder Serin/Threonin-Kinase-abhängigen Signalwegen auf^{36–39}. Die konstitutive Aktivierung oder Inhibition von Signalwegen führt zu einer unregulierten Zellteilung^{35,40}, was CSC ein besonders hohes Potenzial zur Tumorgenese verleiht^{36,41,42}. Aus diesem Grunde zeigen wegweisende Arbeiten, dass CSC die Fähigkeit zur Tumorinitiierung aufweisen und somit einen Tumor nach einer chirurgischen Resektion oder Chemotherapie erneut wachsen lassen können^{29,30}.

Der Übergang von Epithelzellen in Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften vermittelt die Zunahme der Migration sowie der Invasivität und verleiht CSC so ein höheres metastatisches Potenzial im Vergleich zu regulären Tumorzellen, die den größten Teil der Tumoren darstellen^{43–45}. Multiple Mechanismen führen innerhalb der CSC zur Resistenz gegen konventionelle Krebstherapien^{36,46}. So stellt die Überexpression von ATP-bindenden Kassettentransportern einen der Hauptmechanismen zur Vermittlung von Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika von CSC dar^{47,48}. Diese Zelloberflächenproteine transportieren Substanzen aus den Zellen aktiv heraus, was die intrazelluläre Konzentration von antitumoralen Wirkstoffen verringert und kausal zum Überleben der Zellen sowie zum Therapieversagen beiträgt⁴⁷. Weiterhin beeinflusst auch das spezifische Zellzyklusverhalten die Behandlungsempfindlichkeit von CSC⁴⁶. Chemotherapeutika zielen in der Regel auf schnell proliferierende Zellen ab, während CSC sich nur selten teilen, was ihnen gegenüber diesen Therapien eine erhöhte Resistenz verleiht⁴⁰. Weitere Resistenzmechanismen der CSC umfassen eine erhöhte Apoptoseresistenz, die Aktivierung von DNA-

Schadensreparatursystemen, die Bildung eines Umgebungsmilieus, das für Krebszellen besonders vorteilhaft ist, und die Aktivierung von Signalwegen, welche die Stammzellfunktionen vermitteln^{46,49}. Rezidive innerhalb der Tumorerkrankung können daher von einigen wenigen CSC ausgelöst werden, die eine ausgesprochene Therapieresistenz aufweisen können und das Wachstum des ursprünglichen Tumors nach Therapieende erneut auslösen³⁰. Darüber hinaus sind rezidivierende Tumoren aufgrund des höheren Anteils von CSCs häufig aggressiver als der Primärtumor⁵⁰. Die gezielte Bekämpfung von CSCs und die Hemmung der Signalwege, die Resistenzen vermitteln, ist somit eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung neuer Therapeutika, die damit ein Tumorrezidiv verhindern können⁴⁶.

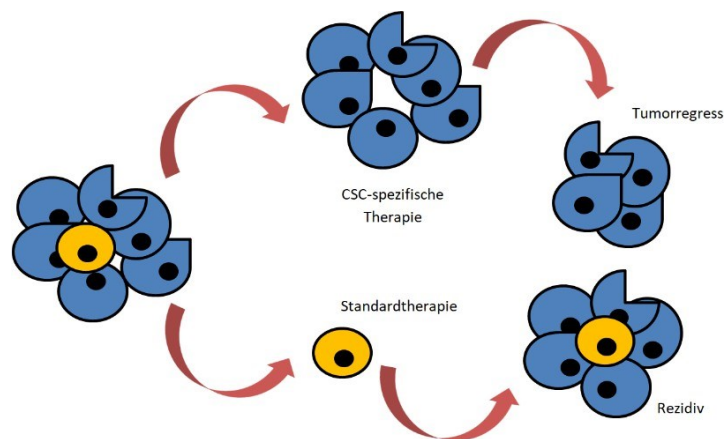


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Tumorproliferation unter Standardtherapie und unter Krebsstammzell-spezifischer Therapie.

In blau dargestellt sind Tumorzellen, in gelb dargestellt Krebsstammzellen (CSC). Von der herkömmlichen Standardtherapie werden die CSC nicht erfasst, weshalb es nach Beendigung der Therapie durch Teilung der Stammzellen zu einem Rezidiv kommt. Die CSC-spezifische Therapie führt insbesondere bei den Krebsstammzellen zum Zelltod und damit zum nachhaltigen Tumorregress.

1.4 Die Rolle von STAT3 in der Kanzerogenese

STAT3 ist ein onkogener Transkriptionsfaktor, der in einer Vielzahl von Tumorentitäten aktiv ist. Als Schlüsselregulator für viele onkogene Signalwege und wird STAT3 daher als vielversprechende Zielstruktur für die Krebsbekämpfung angesehen. Insbesondere der

JAK/STAT-Signalweg wird aufgrund seiner Rolle bei der Kanzerogenese als potenziell attraktives Ziel für therapeutische Interventionen angesehen^{51,52}.

Neben Interleukin-6 (IL-6) und seinen Familienmitgliedern wurden kürzlich mehrere Signalwege identifiziert, darunter G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), Toll-like-Rezeptoren (TLRs) und microRNAs, welche den JAK/STAT-Signalweg in der Tumorigenese regulieren. Bekannt für seine Rolle bei der Tumorzellproliferation, der Invasion von Tumorzellen und der Immunsuppression fördert der JAK/STAT3-Signalweg auch die Kanzerogenese. Zusätzlich zu seiner etablierten Rolle als Transkriptionsfaktor bei der Tumorentstehung reguliert STAT3 Mitochondrienfunktionen sowie die Genexpression durch epigenetische Mechanismen⁵².

STAT3 wurde erstmals als Transkriptionsfaktor mit einer DNA-Bindungsaktivität in IL-6-stimulierten Hepatozyten beschrieben, in denen es indirekt mit Akute-Phase-Genen interagiert⁵¹. Es zeigte sich, dass STAT3 als enger Verwandter von STAT1, von der gesamten Familie der IL-6-Zytokine aktiviert wird. Darüber hinaus wird STAT3 im Zellkultursystem auch durch Wachstumsfaktoren, Onkogene und Interferone aktiviert. STAT3 ähnelt strukturell anderen STAT-Proteinen mit einem Amino-Terminus, der an der Tetramerisierung beteiligt ist, einer DNA-Bindungsdomäne, einer Src-Homologiedomäne (SH2), die an der Rezeptorrekrutierung sowie an der STAT-Dimerisierung beteiligt ist, und einer carboxyterminalen Transaktivierungsdomäne⁵¹. Wie bei anderen STAT-Proteinen wird STAT3 sowohl durch Tyrosinphosphorylierung, als auch durch Serinphosphorylierung aktiviert. Durch Cytokinstimulation erfolgt die Janus-Kinase-vermittelte Tyrosinphosphorylierung und ist für die STAT3-Dimerisierung, die Kerntranslokation und die DNA-Bindung erforderlich⁵¹.

Wie andere STAT-Proteine ist auch STAT3 an der Kanzerogenese beteiligt. Nach der Entdeckung, dass STAT3 in v-Src-transformierten Zellen konstitutiv phosphoryliert ist, wurde STAT3 eine entscheidende Rolle während maligner Transformationen zugesprochen⁵³. Aktiviertes STAT3 wurde in einer Vielzahl von experimentellen Modellen von Erkrankungen beobachtet und die Deaktivierung hat zur Umkehrung des malignen Phänotyps geführt. Die Expression von STAT3 kann zu einer malignen Transformation von Fibroblasten führen, was darauf hindeutet, dass es sich bei STAT3 um ein Onkogen handelt⁵³. Darüber hinaus wurde bei zahlreiche Malignomen im Mausmodell und bei humanen Tumoren aktiviertes STAT3, einschließlich vieler Kopf- und

Halskrebserkrankungen, Mammakarzinome, multipler Myelome und anderer hämatologischer Malignome nachgewiesen^{51,52,54}.

STAT3 reguliert auch die Expression vieler Gene, die an der CSC-Selbsterneuerung beteiligt sind, einschließlich c-Myc, NANOG und β -Catenin^{55,56}. Tatsächlich korreliert eine hohe β -Catenin-Expression mit der Zahl der CSCs bei bestimmten Krebsarten und CSCs verschiedener Tumorentitäten weisen aktiviertes STAT3 auf^{38,57}. STAT3 wurde als ein Schlüsselregulator der Krebsstammzellen identifiziert und ist an den Krebsstammzeleigenschaften beteiligt, die es CSCs ermöglichen zu überleben und zu proliferieren, zu metastasieren und Resistenzen sowie Rezidive zu erzeugen^{40,58}.

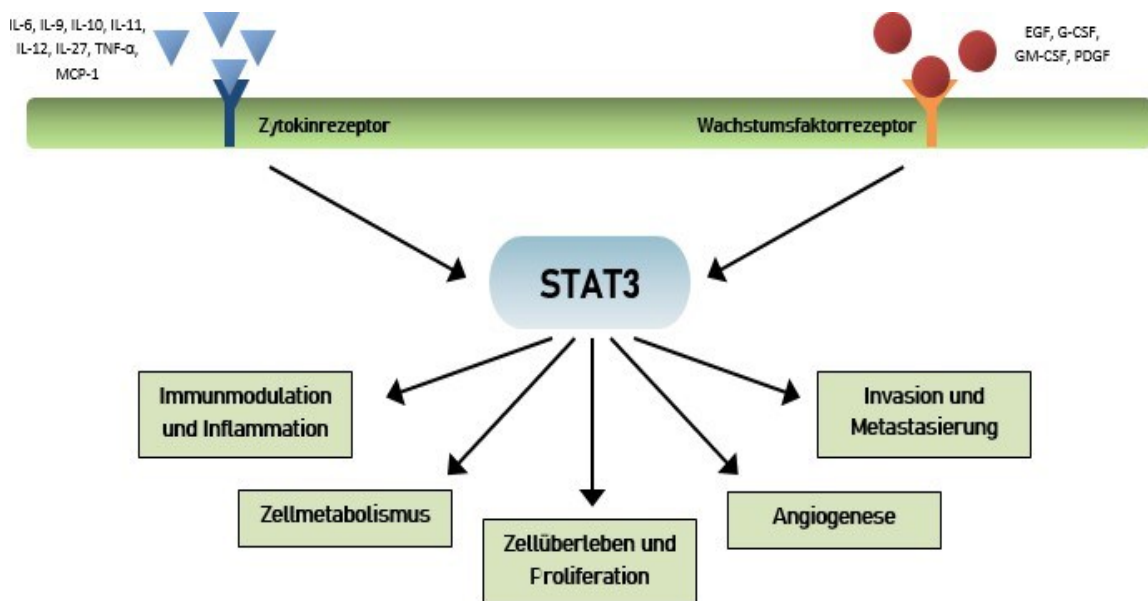


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Einflusses von STAT3 auf die Tumorphysik.

Die Interaktion von STAT3 mit Zytokinrezeptoren erfolgt unter anderem über die Interleukine (IL): IL-6, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-27, den Tumornekrose-Faktor- α (TNF- α) und das Makrophagen-Chemoattraktorprotein-1 (*monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1)), bei Wachstumsfaktorrezeptoren hingegen über den Epidermalen Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor* (EGF)), den Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (*granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF)), den Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF)) und den Blutplättchen-Wachstumsfaktor (*platelet derived growth factor* (PDGF)). Diese Interaktion hat direkten Einfluss auf die Tumorgenese über Immunmodulation und Inflammation, den Zellmetabolismus, die Zellüberlebensrate und Proliferation, die Angiogenese sowie Invasion und Metastasierung.

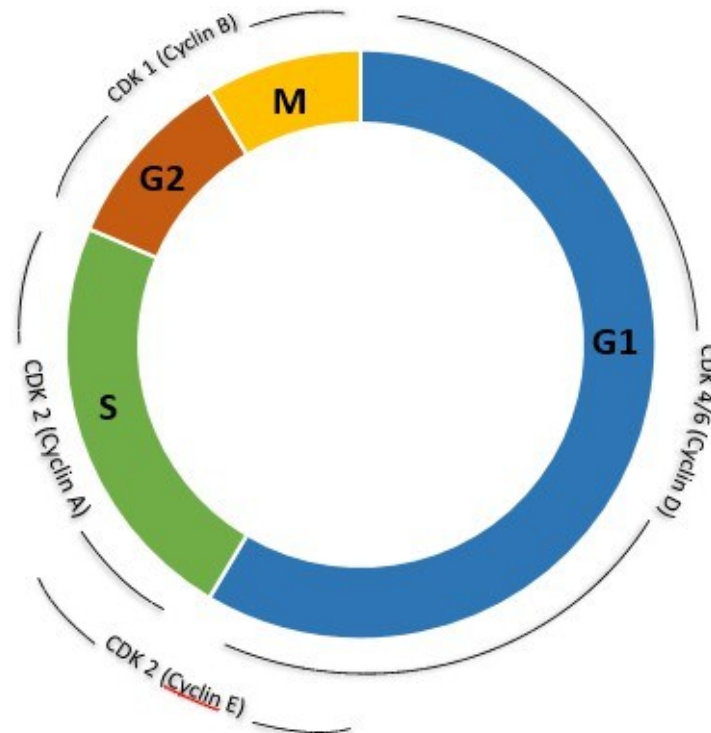


Abbildung 3: Der physiologische Zellzyklus und die Regulation der Phasen durch Cyclin-abhängige Kinasen.

In blau ist die G1-Phase dargestellt, in grün die S-Phase, in orange die G2-Phase und in gelb die M-Phase. Die Cycline und die entsprechenden Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) sind in schwarzen Halbkreisen abgebildet. Jedes Cyclin ist mit einer bestimmten Phase oder einem Phasen-Übergang verknüpft. Um den Progress des Zellzyklus zu gewährleisten, aktivieren die Cycline Cyclin-abhängige Kinasen. Cyclin D aktiviert CDK 4/6 und spielt eine Rolle bei dem Übergang von der G1-Phase in die S-Phase und wird durch die RB-Expression positiv reguliert. Der Übergang von der G1- zur S-Phase wird primär durch CDK 2 über Cyclin E eingeleitet. Cyclin A ist essentiell für die S-Phase und Cyclin B für die G2- und die M-Phase.

1.5 Die Rolle von *CCND1* als Proto-Onkogen

Das *CCND1*-Gen kodiert das Protein Cyclin D1. Cyclin D1 gehört zur Familie der Cycline, welche den Zellzyklus regulieren und daher gezielt regulatorisch exprimiert werden. Cycline regulieren von ihnen abhängige Kinasen. Mit diesen Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) bildet Cyclin Komplexe, wobei Cyclin D Komplexe mit CDK4 und CDK 6 bildet. Die Aktivität der CDK4/CDK6/Cyclin D-Komplexe ist entscheidend für den Übergang des Zellzyklus von der G1- in die S-Phase⁵⁹. Die Expression von Cyclin D ist in vielen Tumorentitäten fehlreguliert und eine Überexpression wurde mit einer schlechteren Prognose assoziiert⁵⁹. Im letzten Jahrzehnt standen die Cycline und die CDK im Mittelpunkt der onkogenetischen Forschung, dennoch gibt es bislang keine zielgerichteten Therapien⁵⁹.

In vivo-Experimente konnten bereits zeigen, dass eine Überexpression von Cylin D zur Reduktion der Chemosensitivität und vermehrten Angiogenese führt und damit Resistenzen begünstigt⁶⁰. Eine verminderte Expression hingegen führt zu vermehrter Apoptoseinduktion,

zur Hemmung der Proliferation, der Produktion der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGF) sowie zum Verlust der Tumorigenität⁶¹. Cyclin D1 spielt somit auf mehreren Ebenen eine wichtige Rolle als Onkoprotein. Eine Inhibition von Cyclin D könnte somit einen attraktiven Therapieansatz darstellen, der sowohl das Wachstum von Tumorzellen hemmen, als auch ihre Chemosensitivität verbessern könnte⁶¹.

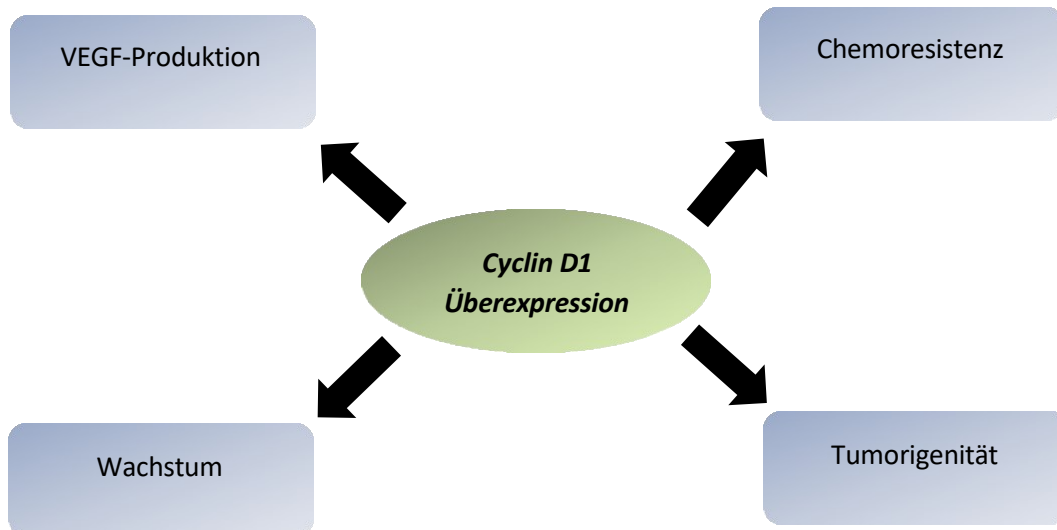


Abbildung 4: Der Einfluss der Cyclin D1-Überexpression auf die Zelle.

Eine Überexpression von Cyclin D1 verursacht Tumorigenität, fördert die Proliferation, erhöht die Chemoresistenz und die Produktion der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGF) in *in vivo*-Experimenten.

In Glioblastomen ist Cyclin D1 häufig überexprimiert, was zu erhöhten Proliferation und Invasion führen kann⁶². Auch *in vivo*-Experimente zeigen eine erhöhte Zellproliferation in Glioblastomen nach Überexpression von Cyclin D⁶². Eine Hemmung von STAT3 und Cyclin D1 führt dagegen zur verminderten Proliferation von Zelllinien *in vitro*, da keine Transition von der G1- in die S-Phase stattfindet⁶³.

Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass eine erhöhte Cyclin D1-Expression mit Malignität und Proliferation von Astrozytomen korreliert⁶⁴. Ebenso ist die Sensitivität gegenüber medikamentösen Therapien abhängig von Cyclin D1-Expression in Zelllinien maligner Gliome⁶⁴. Eine Herunterregulation von Cyclin D1 führte in Glioblastom-Modellen zu einer erhöhten Temozolomid-Sensitivität⁶⁴. Die Hemmung von Cyclin D1 inhibiert das Zellwachstum *in vitro* und *in vivo* nach Temozolomid-Behandlungen signifikant wirksamer, als die alleinige Temozolomid-Behandlung und reduzierte das Tumolvolumen in einem Mausmodell⁶⁴.

1.6 Napabucasin

Napabucasin ist ein oral verfügbarer niedermolekularer Wirkstoff, der die Stammzellaktivität in Tumorzellen blockiert, indem es STAT3 inhibiert⁴⁶. Die Wirkweise von Napabucasin basiert auf der Bioaktivierung durch die Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) Chinon Oxidoreduktase 1 (NADPH quinone oxidoreductase 1, NQO1) sowie durch die Cytochrom-P450-Oxidoreduktase, wodurch reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) freigesetzt werden^{65–67}. Eine Erhöhung des ROS-Levels verursacht DNA-Schäden und hemmt den STAT3-Signalweg⁶⁵. Die Hemmung des STAT3-Signalwegs verursacht neben der verminderten CSC-Proliferation ebenfalls die Induktion von Apoptose^{53,55,68,69}.

Weiterhin inhibiert Napabucasin Signalwege wie c-Myc, β -catenin, NANOG, Smoothed und *sex determining region Y-box 2* (SOX2)⁴⁰, was die CSC-Proliferation hemmt^{55,70} sowie den STAT3/MUC1-Signalweg⁷¹. Hohe MUC1-Expression verursachte eine Paclitaxel-Resistenz in Krebszellen mit hoher Expression von Stammzellfaktoren, während die Herunterregulierung von MUC1 durch Napabucasin diese Zellen für Paclitaxel sensitivierte und die Sphärogenese hemmte⁷¹.

Napabucasin hat sich in einem Mausmodell für Kolonkarzinome bereits gegen Milz- und Lebermetastasen als wirksam erwiesen⁴⁰. Die Napabucasinbehandlung von Krebszellen mit hoher Expression von Stammzellfaktoren senkte die Expression der Signalwege β -catenin, NANOG, Smoothed und SOX2, wo Standard-Chemotherapeutika keinerlei Effekt hatten⁴⁰. Napabucasin blockierte die Selbsterneuerung und verminderte das Überleben von Krebszellen mit hoher Expression von Stammzellfaktoren *in vitro* und *in vivo*, wohingegen Standardchemotherapeutika wie Gemcitabin oder Carboplatin eine Proliferation der Zellen bewirkten⁴⁰.

Zu beachten ist, dass Napabucasin, obwohl es sowohl auf CSC sowie andere Tumorzellen wirkt, das Wachstum und Überleben von normalen Zellen nicht zu beeinflussen scheint⁴⁰. Die gezielte Bekämpfung von CSC könnte sich somit als neuartiger Ansatz zur Entwicklung von Krebstherapeutika der nächsten Generation darstellen. Dieser Therapieansatz könnte vielversprechend gegen onkologische Erkrankungen wirken sowie als mögliche Kombination mit einer herkömmlichen Chemotherapie zur Verringerung der Arzneimittelresistenz beitragen⁴⁰.

In frühen Phase I- und II-Studien wurde die Wirksamkeit von Napabucasin sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit Standardchemotherapeutika nachgewiesen^{46,72–}

⁷⁵. Derzeit laufen mehrere Phase-III-Studien mit Napabucasin in Kombination mit Standardchemotherapeutika sowie eine Frühphasenstudie mit Napabucasin in Kombination mit immuntherapeutischen Ansätzen^{76–78}. Insgesamt haben sich die pharmakokinetischen und Sicherheitsprofile von Napabucasin als günstig und vielversprechend erwiesen⁴⁶.

1.7 Ziele der Arbeit

Die zentrale Zielsetzung der vorliegenden Disseration ist die Entwicklung neuartiger Therapiestrategien für Kinder und Jugendliche mit bösartigen Gliomen, da diese Tumore deutlich in der zugrundeliegenden Tumorbilogie von den häufigen IDH-Wildtyp-Glioblastomen bei Erwachsenen abweichen. Bisherige Therapieansätze sind vor allem aus Forschungsergebnissen und Behandlungsstudien bei adulten Patienten mit Glioblastomen abgeleitet, aber es besteht ein dringender klinischer Bedarf für hochgradige Gliome im Kindesalter, da die aggressiven Therapieprotokolle aktuell mit schwerwiegenden Therapie-assoziierten Nebenwirkungen verbunden sind und dennoch eine ausgesprochen schlechte Prognose für Kinder und Jugendliche mit dieser Tumorerkrankung besteht. In Ermangelung konkreter Hinweise auf eine wirksame adjuvante Chemotherapie bleibt die maximale chirurgische Exzision gefolgt von einer adjuvanten Strahlentherapie kombiniert mit Temozolomid die derzeit beste Behandlungsstrategie für Kinder mit diesen Tumoren. Zur Realisierung der Zielsetzung wird ein vergleichender Ansatz hinsichtlich des therapeutischen Ansprechmusters von pädiatrischen und adulten hochgradigen Gliom-Zellkulturmodellen in der HTDS-basierten Medikamententestung gewählt. Zudem sollen potenzielle prädiktive Biomarker zur erfolgreichen therapeutischen Stratifizierung identifiziert werden. Der Fokus auf etablierte Therapeutika verspricht eine zeitnahe Translation der Forschungsergebnisse in die klinische Praxis und zielt auf die Entwicklung neuartiger und wirksamer Therapiestrategien ab, um die Prognose von Kindern mit bösartigen Gliomen dauerhaft zu verbessern.

2. Material

2.1 Zelllinien und Medien

Die in den eigenen Experimenten verwendeten Zellkulturmodelle, deren Herkunft sowie die zur Kultivierung der jeweiligen Zellen benutzten Medien sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Verwendete Zellkulturmodelle und Kulturmedien sowie Ursprung der Zelllinien

Zelllinie	Medium	Quelle
AM-38 (JCRB No. IFO50492)	MEM, 20% FBS, 1% Glutamin, 1% P/S	JCRB Cell Bank (Osaka, Japan)
DBTRG-05MG (ATCC No. CRL-2020)	RPMI-1640 Medium, 10% FBS, 1% P/S	ATCC (Manassas, USA)
GBM-511-FH	NeuroCult NS-A Basal Medium (Human), 10 % NeuroCult NS-A Proliferation Supplements – Human, 1% P/S, 0,02% EGF, 0,02% FGF	Brain Tumor Research Laboratory (Fred Hutchinson Cancer Research) (Seattle, USA)
GBM0505611	DMEM/F12 + Neuronal Medium (1:1), 2,5% HEPES, 1% NEAA, 1% Sodium Bicarbonat, 1% Sodium Pyruvat, 1% Glutamin, 1% P/S, 2% B27, 0,2% Heparin, LIF 0,1%, 0,02% EGF, 0,02% FGF	Dr. Siddhartha Mitra, University of Colorado, Denver Anschutz Medical Campus (Aurora, USA)
GBM59 MF	DMEM/F12 + Neuronal Medium (1:1), 2,5% HEPES, 1% NEAA, 1% Sodium Bicarbonat, 1% Sodium Pyruvat, 1% Glutamin, 1% P/S, 2% B27, 0,2% Heparin, LIF 0,1%, 0,02% EGF, 0,02% FGF	Dr. Siddhartha Mitra, University of Colorado, Denver Anschutz Medical Campus (Aurora, USA)
GBM67 MF	DMEM/F12 + Neuronal Medium (1:1), 2,5% HEPES, 1% NEAA, 1% Sodium Bicarbonat, 1% Sodium Pyruvat, 1% Glutamin, 1% P/S, 2% B27, 0,2% Heparin, LIF 0,1%, 0,02% EGF, 0,02% FGF	Dr. Siddhartha Mitra, University of Colorado, Denver Anschutz Medical Campus (Aurora, USA)
GS-2	Neurobasal –A, 2% B27, 1% Glutamin, 1% P/S, 0,02% FGF, 0,02% EGF	Prof. Micheal Weller, Neuroscienc Center Zürich, University of Zurich (Zürich, Schweiz)
GS-5	Neurobasal –A, 2% B27, 1% Glutamin, 1% P/S, 0,02% FGF, 0,02% EGF	Prof. Micheal Weller, Neuroscienc Center Zürich, University of Zurich (Zürich, Schweiz)
KNS42 (JCRB No. IFO50356)	Neurobasal –A, 2% B27, 1% Glutamin, 1% P/S, 0,02% FGF, 0,02% EGF	JCRB Cell Bank (Osaka, Japan)
KS-1 (JCRB No. IFO50436)	MEM, 10% FBS, 1% Glutamin, 1% P/S	JCRB Cell Bank (Osaka, Japan)
LN18 (ATCC No. CRL- 2610)	DMEM, 10% FBS, 1% P/S	ATCC (Manassas, USA)
LN308	DMEM, 10% FBS, 1% P/S	Prof. Monika Hegi, Laboratory of Brain Tumor Biology and Genetics , Univerity of Lausanne (Lausanne, Schweiz)
LN229	DMEM, 10% FBS, 1% P/S	Prof. Monika Hegi, Laboratory of Brain Tumor

		Biology and Genetics , Univerity of Lausanne (Lausanne, Schweiz)
M059J (ATCC No.CRL- 2366)	DMEM/F12, 10% FBS, 1% P/S	ATCC (Manassas, USA)
M059K (ATCC No.CRL- 2365)	DMEM/F12, 10% FBS, 1% P/S	ATCC (Manassas, USA)
S24	Neurobasal –A, 2% B27, 1% Glutamin, 1% P/S, 0,02% FGF, 0,02% EGF	Prof. Micheal Weller, Neuroscienc Center Zürich, University of Zurich (Zürich, Schweiz)
SF126 (JCRB No. IFO50286)	MEM, 10% FBS, 1% Glutamin, 1% P/S	JCRB Cell Bank (Osaka, Japan)
SF188 (#SCC282)	Neurobasal –A, 2% B27, 1% Glutamin, 1% P/S, 0,02% FGF, 0,02% EGF	Merck Millipore, Sigma Aldrich (Darmstadt, Deutschland)
S4PCGBH 2	IMDM, 20% FBS, 1% Glutamin, 1% P/S	Children´s Oncology Group (COG), Cell line and Xenograft Repository (Lubbock, USA)
speasGBM	DMEM/F12 + Neuronal Medium (1:1), 2,5% HEPES, 1% NEAA, 1% Sodium Bicarbonat, 1% Sodium Pyruvat, 1% Glutamin, 1% P/S, 2% B27, 0,2% Heparin, LIF 0,1%, 0,02% EGF, 0,02% FGF	Dr. Siddhartha Mitra, University of Calorado, Denver Anschutz Medical Campus (Aurora, USA)
YH-13 (JCRB No. IFO50493)	MEM, 20% FBS, 1% Glutamin, 1% P/S	JCRB Cell Bank (Osaka, Japan)
YKG-1 (JCRB No. JCRB0746)	DMEM, 10% FBS, 1% Glutamin, 1% P/S	JCRB Cell Bank (Osaka, Japan)
ZH161	Neurobasal –A, 2% B27, 1% Glutamin, 1% P/S, 0,02% FGF, 0,02% EGF	Prof. Micheal Weller, Neuroscienc Center Zürich, University of Zurich (Zürich, Schweiz)
ZH426	Neurobasal –A, 2% B27, 1% Glutamin, 1% P/S, 0,02% FGF, 0,02% EGF	Prof. Micheal Weller, Neuroscienc Center Zürich, University of Zurich (Zürich, Schweiz)
ZH562	Neurobasal –A, 2% B27, 1% Glutamin, 1% P/S, 0,02% FGF, 0,02% EGF	Prof. Micheal Weller, Neuroscienc Center Zürich, University of Zurich (Zürich, Schweiz)

2.2 Inhibitoren

Die verwendeten pharmakologischen Inhibitoren und deren wesentliche Wirkmechanismen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Die getesteten Inhibitoren der Wirkstoffbibliothek mit ihrem Wirkmechanismus

Name	Target / Mechanismus	Produktnummer
(-)-Epigallocatechin Gallate	Autophagie, DNA Methyltransferase, Telomerase	HY-13653
(-)-p-Bromotetramisole (oxalate)	Phosphatase	HY-19695
(±)-Equol	Estrogen Rezeptor/ERR	HY-100583A
(R,S)-Ivosidenib	Isocitrat Dehydrogenase (IDH)	HY-18767A
(S)-10-Hydroxycamptothecin	Andere	HY-N0095
(S)-MCPG	mGluR	HY-100406
17-AAG	Autophagie, HSP	HY-10211
2-Deoxy-D-glucose	Hexokinase	HY-13966
2-Methoxyestradiol	Autophagie, HIF/HIF Prolyl-Hydroxylase	HY-12033
3,3'-Diindolylmethane	Androgen Rezeptor	HY-15758
4SC-202	HDAC	HY-16012
3-Deazaneplanocin (hydrochlorid)	EZH2, HMTase	HY-12186
5-Azacytidine	Nucleosid Antimetabolit/Analogon	HY-10586
5-Fluorouracil	Nucleosid Antimetabolit/Analogon	HY-90006
6-Mercaptopurine	Nucleosid Antimetabolit/Analogon	HY-13677
6-Thioguanine	Nucleosid Antimetabolit/Analogon	HY-13765
Abarelix	GNRH Rezeptor	HY-13534
ABC294640	SPHK	HY-16015
Abirateron	Cytochrom P450	HY-70013
ABT-199	Bcl-2 Familie	HY-15531
ABT-737	Autophagie, Bcl-2 Familie	HY-50907
ABT-751	Autophagie, Microtubuli/ Tubulin	HY-13270
Actinomycin D	Antibakteriell	HY-17559
ACY-1215	HDAC	HY-16026
Adarotene	Apoptose	HY-14808
AEE788	EGFR	HY-10045
Afatinib (dimalcate)	EGFR	HY-10261
Afuresertib	Akt, PKA	HY-15727
AGI-5198	Isocitrat Dehydrogenase (IDH)	HY-18082
AICAR	AMPK	HY-13417
Alendronate (sodium hydrate)	Andere	HY-11101
Alisertib	Aurora Kinase	HY-10971
Alprenolol (hydrochloride)	5-HT Rezeptor	HY-B1517A
Altretamine	DNA Alkylator/Crosslinker	HY-B0181
Alvespimycin (hydrochloride)	HSP	HY-12024
AMG 232	MDM-2/p53	HY-12296
AMG 900	Aurora Kinase	HY-13253
AMG 925	CDK, FLT3	HY-15889
AMG-208	c-Met/HGFR	HY-12035
AMG319	PI3K	HY-12948
AMG-337	c-Met/HGFR	HY-18696
Amifostin	Andere	HY-B0639

Amiselimod (hydrochlorid)	LPL Rezeptor	HY-16734A
Amisulprid	Dopamin Rezeptor	HY-14545
Amonafid	Topoisomerase	HY-10982
Amsacrin	Autophagie, Topoisomerase	HY-13551
Amuvatinib	c-Kit, FLT3, PDGFR	HY-10206
Amygdalin	Andere	HY-N0190
Altretamin	DNA Alkylator/Crosslinker	HY-B0181
Amonafid	Topoisomerase	HY-10982
Anacetrapib	CETP	HY-12090
Anamorelin	GHSR	HY-14734
Anastrozol	Aromatase	HY-14274
Ancitabin (hydrochlorid)	Autophagie	HY-N0093
Andrographolid	NF-κB	HY-N0191
Anethol	Andere	HY-B0900
API-2	Akt-Signalweg	HY-15457
Apocynin	Autophagie	HY-N0088
APTO-253	PAK	HY-16291
ARN-509	Androgen Rezeptor	HY-16060
Artigenin	Adiponectin-Rezeptor-Antagonist	HY-15549
ARQ-092	AKT	HY-19719
ARRY-520 (R enantiomer)	Kinesin	HY-15187A
AS703026	MEK	HY-12042
ASC-J9	Androgen Rezeptor	HY-15194
ASP3026	ALK	HY-13326
AT13148	AKT	HY-16071
AT13387	HSP	HY-14463
AT7519 (Hydrochlorid)	CDK	HY-50943
AT9283	Aurora Kinase, Autophagie, JAK	HY-50514
Atrasentan (hydrochlorid)	Endothelin Rezeptor	HY-15403A
Auristatin PE	Microtubuli/Tubulin	HY-14672
Aurora A Inhibitor I	Aurora Kinase	HY-70061
AV-412	EGFR	HY-10346A
AVL-292	BTK	HY-18012
AVN-944	Andere	HY-13560
Axitinib	VEGFR	HY-10065
AXL1717	IGF-1R	HY-15494
AZ505 (ditrifluoroacetat)	Histon Methyltransferase	HY-15226A
AZ-5104	EGFR	HY-B0793
AZ6102	PARP	HY-12975
AZD 6482	Autophagie, PI3K	HY-10344
AZD1152	Aurora Kinase	HY-10127
AZD1152-HQPA	Aurora Kinase	HY-10126
AZD1208	PIM	HY-15604
AZD-1480	JAK	HY-10193
AZD2014	Autophagy, mTOR	HY-15247
AZD-2461	PARP	HY-13536
AZD3514	Androgen Rezeptor	HY-16079
AZD3759	EGFR	HY-18750
AZD3839	Beta-Sekretase	HY-13438
AZD3965	Monocarboxylat Transporter	HY-12750

AZD4547	FGFR	HY-13330
AZD5363	AKT, Autophagie, PKA, Ribosomal S6 Kinase	HY-15431
AZD-5438	CDK	HY-10012
AZD6738	ATM/ATR	HY-19323
AZD-7762	Checkpoint Kinase (Chk)	HY-10992
AZD-8055	Autophagie, mTOR	HY-10422
AZD8186	PI3K	HY-12330
AZD8330	MEK	HY-12058
AZD-9291	EGFR	HY-15772
AZD-9291 (mesylat)	EGFR	HY-15772A
Bafetinib	Autophagie, Bcr-Abl	HY-50868
Bakuchiol	p38 MAPK	HY-N0235
Bardoxolone (methyl)	Keap1-Nrf2	HY-13324
Baricitinib (phosphat)	JAK	HY-15315A
BAY 80-6946	PI3K	HY-15346
Bazedoxifene (acetat)	Estrogen Rezeptor/ERR	HY-A0036
Belinostat	HDAC	HY-10225
Bendamustin (hydrochlorid)	Alkylanzien	HY-B0077
Berberine (chloridhydrat)	Autophagie, Wnt, β -Catenin	HY-17577
Bergapten	Autophagie, Cytochrom P450	HY-N0370
Bestatin	Aminopeptidase	HY-B0134
Betahistin (dihydrochlorid)	Histamin-Rezeptor	HY-12090
Betulinic acid	Apoptose, Autophagie, Topoisomerase	HY-10529
Bexaroten	RAR/RXR	HY-12861
BEZ235	mTOR, PI3K	HY-50673
BI 2536	Epigenetische Leserdomäne, Polo-like Kinase	HY-50698
BI-847325	Aurora Kinase, MEK	HY-18955
BIBF 1120	FGFR, PDGFR, VEGFR	HY-50759
BIBF 1120 (esylat)	FGFR, PDGFR, VEGFR	HY-11106
BIBR 1532	Telomerase	HY-17353
BIBX 1382	EGFR	HY-10322
Bicalutamid	Androgen Rezeptor, Autophagie	HY-14249
BIIB021	Autophagie, HSP	HY-10212
Birinapant	IAP	HY-16591
Bithionol	Parasit	HY-17592
BKT140	CXCR	HY-P0171
Bleomycin (sulfat)	Andere	HY-50911
BLU-554	FGFR	HY-100492
BML-284	Wnt-Signalweg	HY-19987
BMN-673 (8R,9S)	PARP	HY-16106A
BMS 777607	c-Met/HGFR, TAM Rezeptor	HY-12076
BMS-214662	Farnesyl Transferase	HY-16111
BMS-599626 (Hydrochloride)	EGFR	HY-12010
BMS-690514	EGFR, VEGFR	HY-10333
BMS-708163	Notch, γ -Secretase	HY-50845
BMS-754807	IGF-1R, Insulin Rezeptor	HY-10200
BMS-794833	c-Met/HGFR, VEGFR	HY-10497
BMS-833923	Smo	HY-13809
BMS-911543	JAK	HY-15270
Bortezomib	Proteasom	HY-17353

Bosutinib	BCR-ABL SRC	HY-10193
Briciclib	CDK	HY-16366
Brigatinib	ALK	HY-12857
Brivanib	VEGFR	HY-10221
BSI-201	PARP	HY-10990
Buserelin (Acetat)	GNRH Rezeptor	HY-13581A
Busulfan	DNA Alkylator/Crosslinker	HY-13316
BYL-719	PI3K	HY-15244
Cabazitaxel	Microtubuli/Tubulin	HY-10452
Cabozantinib (S-malate)	VEGFR	HY-10130
CAL-101	PI3K	HY-50671
Calcitonin (salmon)	Andere	HY-P0090
Calcitriol	VD/VDR	HY-10002
Canertinib	EGFR	HY-13809
Capecitabin	Nucleosid-Antimetabolit/Analogon	HY-15593
Capsaicin	Autophagie, TRP-Kanal	HY-10448
Carboplatin	DNA Alkylator/Crosslinker	HY-50934
Carfilzomib	Proteasom	HY-10450
Carmofur	Nucleosid-Antimetabolit/Analogon	HY-B0182
Carmustin	DNA Alkylator/Crosslinker	HY-13634A
Catechin	Andere	HY-N0898
CB-5083	p97	HY-12861
CB-839	Autophagie	HY-12248
CC-401 (hydrochloride)	JNK	HY-13022
Cecropin B	Cytochrom P450	HY-P0092
Cediranib	VEGFR	HY-15409
Cediranib (maleate)	Autophagie, VEGFR	HY-13049
CEP-32496	RAF	HY-15144
CEP-37440	ALK, FAK	HY-15841
Cerdulatinib	JAK, SYK	HY-15999
Cevipabulin	Microtubuli/Tubulin	HY-14949
CH5132799	PI3K	HY-15466
CH5183284	FGFR	HY-19957
CH5424802	ALK	HY-13011
Chidamid	HDAC	HY-13592
Chlorambucil	Alkylantien	HY-17510
Chlormethin (hydrochlorid)	Alkylantien	HY-18690
CI-1040	MEK	HY-50295
CI-994	HDAC	HY-N0140
Cilengitid	Autophagie, Integrin	HY-16141
Cinobufotalin	Andere	HY-N0880
Cisplatin	DNA Alkylator/Crosslinker	HY-13271
Citarinostat	HDAC	HY-15994
Cladribin	Adenosin Deaminase	HY-N0095
Clofarabin	Nucleosid-Antimetabolit/Analogon	HY-10215
Cobimetinib	MEK	HY-17514
Cortisone	Glucocorticoid Rezeptor	HY-17461
CPI-613	Pyruvat Dehydrogenase	HY-15453
Crenolanib	Autophagie, PDGFR	HY-13223
Crizotinib	ALK c-Met/HGFR	HY-14581

CTS-1027	MMP	HY-10398
CUDC-101	EGFR, HDAC	HY-10223
CUDC-427	IAP	HY-15835
CUDC-907	HDAC, PI3K	HY-13522
Curcumin	Autophagie, Keap1-Nrf2	HY-N0005
Curcumol	Andere	HY-N0104
CX-4945	Autophagie, Casein Kinase	HY-50855
CX-5461	DNA/RNA Synthese	HY-13323
CYC-116	Aurora Kinase	HY-10558
Cyclic Somatostatin	Andere	HY-P0084
Cyclophosphamid	DNA Alkylator/Crosslinker	HY-10619C
Cyclosporin A	Andere	HY-B0579
CYT387	JAK	HY-17384
Cytarabin	Nucleosid-Antimetabolit/Analogon	HY-12449
D-3263 (Hydrochlorid)	TRP-Kanal	HY-16162A
Dabrafenib (Mesylat)	RAF	HY-13541A
Dacarbazin	Nucleosid-Antimetabolit/Analogon	HY-100492
Dacomitinib	EGFR	HY-13272
Dalcetrapib	CETP	HY-14950
Danuserib	Aurora Kinase, Autophagie	HY-10179
Dapagliflozin	SGLT	HY-17371
Dasatinib	BCR-ABL SRC	HY-14249
Daunorubicin (Hydrochlorid)	Topoisomerase	HY-10586
DCC-2036	BCR-ABL, FLT3, SRC	HY-13024
DCC-2618	c-Kit, c-Met/HGFR	HY-15240
Debio 0932	HSP	HY-13469
Decitabin	DNMT	HY-17420
Defactinib	FAK	HY-12289
Deforolimus	mTOR	HY-B0900
Delamanid	Bakteriell	HY-10846
Delanzomib	Proteasom	HY-10454
Dihydroartemisinin	JNK, NF- κ B	HY-N0176
Dimethylenastron	Kinesin	HY-19944
Dinaciclib	CDK	HY-13780
DMXAA	Autophagie	HY-10964
Docetaxel	Microtubuli/Tubulin	HY-10422
Dofequidar (Fumarat)	P-Glycoprotein	HY-17013A
Dovitinib	c-Kit	HY-17364
Doxifluridin	Nucleosid Antimetabolit/Analogon	HY-B0021
Doxorubicin (Hydrochlorid)	Topoisomerase	HY-N0141
Dutasteride	5 α Reduktase	HY-13613
Duvelisib (R-Enantiomer)	PI3K	HY-17044A
E-3810	FGFR, VEGFR	HY-15391
E-7050	c-Met/HGFR, VEGFR	HY-13068
E7449	PARP	HY-12418
E7820	Integrin	HY-14571
Efaproxiral	Andere	HY-13619
Elesclomol	Apoptose-Induktor	HY-17469
Ellipticin (Hydrochlorid)	Topoisomerase	HY-15753A
Embelin	IAP	HY-17473

EMD-1214063	Autophagie, c-Met/HGFR;	HY-14721
Empagliflozin	SGLT	HY-13775
Enasidenib	Isocitrate Dehydrogenase (IDH)	HY-18690
Endoxifen (E-Isomer)	Estrogen Rezeptor/ERR	HY-18719D
ENMD-2076	Aurora Kinase, FLT3, VEGFR	HY-10987A
Ensartinib	ALK	HY-16590
Entinostat	HDAC	HY-17449
Enzastaurin	PKC	HY-15685
Epirubicin (hydrochlorid)	Topoisomerase	HY-15777A
Epothilone B	Microtubuli/Tubulin	HY-17029
EPZ-5676	Histon Methyltransferase	HY-15593
EPZ-6438	EZH2 HMTase	HY-14792B
Eribulin (Mesylat)	Microtubuli/Tubulin	HY-13442A
Erlotinib	EGFR	HY-16518
Estramustin (phosphat sodium)	Microtubuli/Tubulin	HY-13438
Etoposid	Topoisomerase	HY-16478
Everolimus	mTOR	HY-N0232
Evodiamin	Andere	HY-N0114
EW-7197	TGF- β Rezeptor	HY-19928
Exatecan (Mesylat)	Topoisomerase	HY-13631A
Exemestan	Aromatase	HY-13632
Exherin (Trifluoroacetat)	Andere	HY-13541A
Ezatiostat	Gutathion S-Transferase	HY-13634A
Fasudil (Hydrochlorid)	Autophagie, PKC, ROCK	HY-10341
Fenretinide	Autophagie, RAR/RXR	HY-15373
FG-4592	HIF	HY-18597
Finasterid	5 alpha Reduktase	HY-13635
FK866	Autophagie, Nampt	HY-50876
Flavopiridol (Hydrochlorid)	Autophagie, CDK	HY-10006
Floxuridin	Nucleosid-Antimetabolit/Analogon	HY-16366
Fludarabin (phosphat)	Nucleosid-Antimetabolit/Analogon	HY-16276
Flumatinib	BCR-ABL, c-Kit, PDGFR	HY-13904
Flutamid	Androgen Rezeptor	HY-B0022
Foretinib	c-Met/HGFR, VEGFR	HY-10338
Formestan	Aromatase	HY-B0697
Forodesin (Hydrochlorid)	Nucleosid Antimetabolit/Analogon	HY-16209
Fosbretabulin (disodium)	Microtubuli/Tubulin	HY-17576
Ganetespib	HSP	HY-10230
GANT 61	GLI1	HY-10065
GDC-0032	PI3K	HY-13898
GDC-0068	Akt	HY-15186
GDC-0068 (Dihydrochlorid)	Akt	HY-15186A
GDC-0152	IAP	HY-13638
GDC-0349	Autophagie, mTOR	HY-15248
GDC-0623	MEK	HY-15610
GDC-0941	Autophagie, PI3K	HY-50094
GDC-0980	mTOR, PI3K	HY-13246
GDC-0994	ERK	HY-P0090
Gefitinib	EGFR	HY-10454
Gemcitabin	Nucleosid-Antimetabolit/Analogon	HY-15228

Genistein	Autophagie, EGFR	HY-14596
Genz-644282	Topoisomerase	HY-16228
Gilteritinib	FLT3, TAM Rezeptor	HY-12432
Gimeracil	Andere	HY-17469
GLPG0634	JAK	HY-18300
Gossypol (Acetatsäure)	Bcl-2 Familie	HY-17510
GS-9973	SYK	HY-15968
GSK 525762A	BET Bromodomäne	HY-15149
GSK1059615	mTOR PI3K	HY-12036
GSK-1070916	Aurora Kinase	HY-70044
GSK126	EZH2 HMTase	HY-17575
GSK2110183 (Hydrochlorid)	AKT	HY-15966A
GSK2126458	mTOR, PI3K	HY-10297
GSK2141795	AKT	HY-15965
GSK2636771	PI3K	HY-15245
GSK2879552	Histon Demethylase	HY-18632
GSK343	EZH2 HMTase	HY-10195B
GSK461364	Polo-like Kinase (PLK)	HY-50877
GSK-690693	Akt, Autophagie	HY-10249
GSK-923295	Kinesin	HY-10299
Hesperidin	Autophagie	HY-15337
Hexaminolevulinat (Hydrochlorid)	Andere	HY-16045
Homoharringtonin	Andere	HY-P0084
Honokiol	Apoptose-Induktor	HY-15966A
Hydroxyfasudil	ROCK	HY-13911
Hydroxyurea	DNA/RNA Synthesis	HY-12551
Icaritin	Autophagie	HY-N0678
Icotinib (Hydrochlorid)	EGFR	HY-15164
Idarubicin (Hydrochlorid)	Topoisomerase	HY-100583A
Ifosfamid	DNA Alkylator/Crosslinker	HY-17419
Imatinib (Mesylat)	c-Kit PDGFR	HY-15141
Imisopasem manganese	Andere	HY-13336
INCB 024360	Indoleamin 2,3-Dioxygenase (IDO);	HY-15689
INCB28060	c-Met/HGFR	HY-13404
Ingenol Mebutat	PKC	HY-B0719
INK 128 (MLN0128)	mTORC1/2	HY-19695
INNO-206	ADC Cytotoxin, Topoisomerase	HY-16261
INO-1001	PARP	HY-12022
Inolitazon (Dihydrochlorid)	PPAR	HY-14792B
IPI-145	PI3K	HY-17044
Irbinitinib	EGFR	HY-16069
Irinotecan	Topoisomerase	HY-16293
Isoliquiritigenin	Aldose Reduktase, Autophagie	HY-N0102
Isotretinoin	RAR/RXR	HY-15676
Ispinesib	Kinesin	HY-50759
Itraconazol	Antifungal	HY-18256
Ivosidenib	Isocitrat Dehydrogenase (IDH)	HY-18767
Ixabepilon	Microtubuli/Tubulin	HY-18346
JNJ-38877605	c-Met Inhibitor	HY-10255
K-115	ROCK	HY-15685

Kevetrin (Hydrochlorid)	MDM-2/p53	HY-16271
KU-57788	CRISPR/Cas9, DNA-PK,	HY-11006
KW-2449	FLT3	HY-10339
KX2-391 (Mesylat)	Microtubuli/Tubulin, SRC	HY-10340B
Lapatinib	EGFR	HY-P0171
LB-100	Phosphatase	HY-18597
LCL161	IAP	HY-15518
LDE225	SMO	HY-N0100
LDK378	ALK	HY-13733
LEE011 (Hydrochlorid)	CDK	HY-13593
Lenvatinib	VEGFR	HY-13757A
Letrozol	Aromatase, Autophagie	HY-14248
Lexibulin	Microtubuli/Tubulin	HY-10498
LGK974	PORCN	HY-B0022
LGX818	RAF	HY-14691
Licochalcon A	Autophagie	HY-N0372
Linifanib	PDGFR VEGFR	HY-12330
Linsitinib	IGF-1R Insulin Rezeptor	HY-12058
Lomustin	DNA Alkylator/Crosslinker	HY-12015
Lonafarnib	Farnesyl Transferase	HY-10617
Lonidamin	Hexokinase	HY-B0486
Losmapimod	p38 MAPK	HY-18719D
Lurbinectedin	Andere	HY-16293
Luteolin	Autophagie	HY-N0162
LY2090314	GSK-3	HY-16294
LY2157299	TGF- β Rezeptor	HY-13226
LY2228820	p38 MAPK	HY-13241
LY2510924	CXCR	HY-12488
LY-2584702	Ribosomale S6-Kinase (RSK)	HY-12493
LY2603618	Autophagie, Checkpoint Kinase (Chk);	HY-14720
LY2606368 (Dihydrochlorid)	Checkpoint Kinase (Chk)	HY-18174A
LY2784544	FGFR, FLT3, JAK	HY-13034
LY2801653 (Dihydrochlorid)	c-Met/HGFR	HY-15514A
LY2835219	CDK	HY-B0134
LY2874455	FGFR	HY-13304
LY2940680	SMO	HY-13242
LY3009120	RAF	HY-15180
LY3023414	DNA-PK, mTOR, PI3K	HY-12513
LY3039478	NOTCH	HY-12449
Malotilat	5-Lipoxygenase	HY-A0060
Marimastat	MMP	HY-B0097
Masitinib	c-Kit, PDGFR	HY-12019
Mc-Val-Cit-PABC-PNP	ADC Linker	HY-20336
MEK162	MEK	HY-50895
Melphalan	DNA Alkylator/Crosslinker	HY-10322
Methotrexat	Antifolat	HY-50751
MI-773	MDM-2/p53	HY-17493
Mibefradil (Dihydrochlorid)	Calcium-Kanal	HY-15553A
Miriplatin	DNA Alkylator/Crosslinker	HY-16325A
Mitomycin C	DNA Alkylator/Crosslinker	HY-13223

Mitotan	Andere	HY-13690
Mitoxantron (Dihydrochlorid)	Topoisomerase	HY-19957
MK 2206 (Dihydrochlorid)	AKT, Autophagie	HY-10358
MK-0752	γ -Sekretase	HY-10974
MK-1775	WEE1	HY-10993
MK-2461	c-Met/HGFR	HY-50703
MK-4827 (Racemat)	PARP	HY-10619C
MK-4827 (Tosylat)	PARP	HY-10619B
MK-5108	Aurora Kinase	HY-13252
MLN 2480	RAF	HY-15246
MLN1117	PI3K	HY-12285
MLN2238	Autophagie, Proteasom	HY-10453
MLN4924 (Hydrochlorid)	NEDD8-aktivierendes Enzym	HY-10484
MLN8054	Aurora Kinase	HY-10180
MLN9708	Proteasom	HY-14721
Mocetinostat	Autophagie, HDAC	HY-12164
Motesanib (Diphosphat)	c-Kit, VEGFR	HY-12067
Motolimod	Toll-like Rezeptor (TLR)	HY-13773
Mozavaptan	Vasopressin Rezeptor	HY-18346
MRK003	γ -Sekretase	HY-100370
MSX-122	CXCR	HY-13696
Mubritinib	EGFR	HY-13501
Napabucasin	STAT	HY-13919
Naringenin	Caspase, NF- κ B, PPAR	HY-N0100
Navitoclax	Bcl-2 Familie	HY-10087
Nedaplatin	DNA/RNA Synthese	HY-13700
Nelarabin	Nucleosid-Antimetabolit/Analogon	HY-10338
Nelotanserin	5-HT Rezeptor	HY-10559
Neratinib	EGFR	HY-50868
Nilotinib	BCR-ABL	HY-10202
NMS-1286937	Polo-like Kinase (PLK)	HY-15828
Nocodazol	Autophagie, Bcr-Abl, CRISPR/Cas9,	HY-13520
Noscapin	Alkaloid / Opioid	HY-13011
NVP-AUY922	Autophagie, HSP	HY-10215
NVP-BKM120	PI3K	HY-70063
NVP-BKM120 (Hydrochlorid)	PI3K	HY-15180
Obatoclax	Bcl-2 Family	HY-10339
ODM-201	Androgen Rezeptor	HY-16985
Olaparib	PARP	HY-11106
Oleanolsäure	Autophagie, STAT	HY-N0156
Oltipraz	HIF/HIF Prolyl-Hydroxylase	HY-12519
Ombrabulin (Hydrochlorid)	Microtubuli/Tubulin	HY-18256
ONO-4059	BTK	HY-15771
Oprozomib	Autophagie, Proteasom	HY-12113
Orteronel	Cytochrom P450	HY-10505
OSI-027	Autophagie, mTOR	HY-10423
OSI-930	c-FMS, c-KIT, VEGFR	HY-10204
Osilodrostat	Mineralocorticoid Rezeptor	HY-16276
Ospemifen	Estrogen Rezeptor/ERR	HY-B0723
Ostarin	Androgen Rezeptor	HY-13273

OTX-015	BET Bromodomäne	HY-13001
Oxaliplatin	DNA Alkylator/Crosslinker	HY-12948
PAC-1	Autophagie, Caspase	HY-13523
Paclitaxel	Microtubuli/Tubulin	HY-10343
Pacritinib	FLT3, JAK	HY-50877
Palbociclib	CDK	HY-10180
Palifosfamid	DNA Alkylator/Crosslinker	HY-14798
Palomid 529	mTOR;	HY-14581
Panobinostat	HDAC	HY-12042
Parthenolid	Autophagie, DNA Methyltransferase, HDAC,	HY-N0141
Pazopanib (Hydrochlorid)	PDGFR, VEGFR	HY-10006
PCI-24781	HDAC	HY-10990
PCI-32765	BTK	HY-B0313
PD0325901	Autophagie, MEK	HY-10254
Pelitinib	EGFR	HY-32718
Pemetrexed (Disodium	Antifolat	HY-15466
Pentostatin	Adenosin Deaminase	HY-12037
Perifosine	AKT	HY-15994
Pexidartinib	c-FMS, c-KIT	HY-13246
PF-03814735	Aurora Kinase	HY-14574
PF-04217903 (Methansulfonat)	c-MET/HGFR	HY-12017A
PF-04449913	SMO	HY-16391
PF-04691502	mTOR, PI3K	HY-17545
PF-06463922	ALK	HY-12215
PFK-158	Andere	HY-12203
PH-797804	p38 MAPK	HY-10403
PHA-793887	CDK	HY-11001
PHA-848125	Autophagie, CDK	HY-10424
Phenformin (Hydrochlorid)	AMPK	HY-16397A
Pipobroman	Alkylase	HY-15315A
Pixantron (Dimaleat)	Topoisomerase	HY-13727A
PKC412	PKC	HY-10230
Plinabulin	Microtubuli/Tubulin	HY-14444
PND-1186	FAK	HY-13917
Ponatinib	BCR-ABL, FGFR, FLT3, VEGFR	HY-13768A
Poziotinib	EGFR	HY-15730
PQR620	mTOR	HY-100026
Pracinostat	HDAC	HY-13322
Pralatrexat	Antifolat	HY-10398
Pranlukast (Hemihydrat)	Leukotrien Rezeptor	HY-B0290A
Prinaberel	Estrogen Rezeptor/ERR	HY-14933
Procarbazin (Hydrochlorid)	DNA Alkylator/Crosslinker	HY-15610
Psoralen	Andere	HY-N0053
Psoralidin	Notch	HY-N0232
PX-12	Andere	HY-13734
PX-478	Autophagie, HIF/HIF Prolyl-Hydroxylase	HY-10231
Quercetin	Autophagie, PI3K, Sirtuin	HY-18085
Quinacrin (Dihydrochlorid)	Autophagie, Phospholipase	HY-13735A
Quisinostat	HDAC	HY-15433
Quizartinib	FLT3	HY-10179

R406	SYK	HY-12067
R428	TAM Rezeptor	HY-15150
R788 (Disodium Hexahydrat)	SYK	HY-10959
Raltitrexed	Nucleosid Antimetabolit/Analogon,	HY-10821
Rapamycin	mTOR	HY-13605
Refametinib	MEK	HY-14691
Regorafenib	VEGFR	HY-13062
Resminostat (Hydrochlorid)	HDAC	HY-14718A
Resveratrol	Autophagie, IKK	HY-16561
Retinsäure	Andere	HY-10229
RG7112	MDM-2/p53	HY-10959
RG7388	MDM-2/p53	HY-15676
RGB-286638	CDK	HY-15504A
RGFP966	HDAC	HY-13909
Rigosertib (Sodium)	Polo-like Kinase (PLK)	HY-13026
Ro 5126766	MEK, RAF	HY-18652
RO4929097	Notch, γ -Sekretase	HY-11102
RO4987655	MEK	HY-14719
Romidepsin	HDAC	HY-B0486
Roscovitin	CDK	HY-30237
Rotenon	Andere	HY-B1756
Ruboxistaurin (Hydrochlorid)	PKC	HY-10195B
Rucaparib (Phosphat)	PARP	HY-13252
Ruxolitinib (Phosphat)	JAK	HY-12203
Ruxolitinib (S-Enantiomer)	JAK	HY-10424
RVX-208	Epigenetische Leserdomäne	HY-16652
RX-3117	Nucleosid Antimetabolit/Analogon	HY-15228
Salinomycin	Autophagie, Bacteriell, WNT, β -Catenin	HY-15597
Salirasib	Autophagie, RAS	HY-14754
SAR245409	mTOR, PI3K	HY-15900
Saracatinib	Autophagie, SRC	HY-10234
Satraplatin	DNA Alkylator/Crosslinker	HY-17576
Savolitinib	c-Met/HGFR	HY-15959
SB1317	CDK, FLT3, JAK	HY-15166
SB-743921	Kinesin	HY-12069
SCIO-469	p38 MAPK	HY-10406
Selumetinib	MEK	HY-10492
Semagacestat	γ -Sekretase	425386-60-3
Seocalcitol	VD/VDR	HY-32341
Serdemetan	MDM-2/p53	HY-12025
SGI-1776	Autophagie, PIM	HY-13287
SGX-523	c-Met/HGFR	HY-12019
Silibinin	Autophagie	HY-13748
SJG-136	DNA Alkylator/Crosslinker	HY-14573
SN-38	Autophagie, Topoisomerase	HY-13704
SNS-032	CDK	HY-10008
SNS-314	Aurora Kinase	HY-12003
Sorafenib (Tosylat)	RAF	HY-11001
Sotrastaurin	PKC	HY-10343
SSR128129E	FGFR	HY-15599

Staurosporin	PKC / Positivkontrolle	HY-50514
Stibogluconat (Natrium)	Phosphatase	HY-100595
Streptozocin	DNA Alkylator/Crosslinker	HY-10961
SU5416 (TSU-68)	VEGFR	HY-17559
Sulfatinib	FGFR, VEGFR	HY-12297
Sunitinib (Malat)	PDGFR, VEGFR	HY-19696A
TAK-285	EGFR	HY-15196
TAK-593	PDGFR, VEGFR	HY-15506
TAK-632	RAF	HY-10498
TAK-715	p38 MAPK	HY-13323
TAK-733	MEK	HY-13449
TAK-901	Aurora Kinase	HY-12201
TAK-960	Polo-like Kinase (PLK)	HY-15160
Talabostat (Mesylat)	Dipeptidyl Peptidase	HY-13233A
Tamibaroten	RAR/RXR	HY-14652
Tamoxifen	Autophagie, Estrogen Rezeptor/ERR	HY-13757A
Tandutinib	FLT3	HY-10202
Tariquidar	P-Glycoprotein	HY-12113
TAS-102	Nucleosid Antimetabolit/Analogon,	HY-16478
Tasquinimod	HDAC	HY-14808
Tauroursodeoxycholat (Natrium)	ERK	HY-19696A
Telatinib	c-Kit, PDGFR, VEGFR	HY-10527
Temozolomid	DNA Alkylator/Crosslinker	HY-16985
Temsirolimus	mTOR	HY-19928
Teniposid	Topoisomerase	HY-B0011
TG 100801	SRC, VEGFR	HY-10186
TG100-115	PI3K	HY-10111
TG-101348	Epigenetische Leserdomäne, JAK	HY-10409
TGR-1202	PI3K	HY-12279
TH-302	Andere	HY-10535
Thalidomide	Andere	HY-14658
Thioridazin (Hydrochlorid)	5-HT Rezeptor Dopamin Rezeptor	HY-13696
Thio-TEPA	DNA Alkylator/Crosslinker	HY-10212
TIC10 Isomer	AKT, ERK, TNF-alpha	HY-15615
Tipifarnib	Farnesyl-Transferase	HY-10111
Tipiracil (hydrochlorid)	Nucleosid-Antimetabolit/Analogon	HY-12750
Tirapazamin	Topoisomerase	HY-13767
Tivantinib	c-Met/HGFR	HY-10821
Tivozanib	VEGFR	HY-B0628A
Toceranib (Phosphat)	PDGFR, VEGFR	HY-10330A
Tofacitinib (Citrat)	JAK	HY-14949
TOK-001	Cytochrom P450	HY-70006
Topotecan (Hydrochlorid)	Topoisomerase	HY-15136
Toremifen (Citrat)	Estrogen Rezeptor/ERR	HY-B0005
Tozasertib	Aurora Kinase, Autophagie	HY-10161
Trametinib	MEK	HY-13716
Tramiprosat	Amyloid-β	HY-14602
Treosulfan	DNA Alkylator/Crosslinker	HY-16503
Triapin	DNA/RNA Synthese	HY-10082
Trichostatin A	HDAC	HY-15144

Triciribin	AKT, DNA/RNA Synthese, HIV, Nucleosid	HY-15457
Trifluorothymidin	Nucleosid Antimetabolit/Analogon	HY-16398
Triptorelin	GNRH Rezeptor	HY-12551
Troglitazon	Autophagie, PPAR	HY-50935
TSU-68	PDGFR	HY-13902
Tubastatin A (Hydrochlorid)	HDAC	HY-15531
Uramustin	DNA Alkylator/Crosslinker	HY-15187A
Ursolsäure	Autophagie	HY-N0140
VAL-083	DNA Alkylator/Crosslinker	HY-16513
Valproic acid (sodium salt)	HDAC	HY-14660A
Valrubicin	Others	HY-B0028
Valspodar	P-Glycoprotein	HY-17384
Vandetanib	VEGFR	HY-10218
Vatalanib	VEGFR	HY-15453
VcMMAE	Drug-Linker ADC, Microtubuli/Tubulin	HY-15575
VE-822	ATM/ATR	HY-13902
Veliparib (Dihydrochlorid)	Autophagie, PARP	HY-10130
Vemurafenib	RAF	HY-16397A
Verteporfin	YAP	HY-17013A
Vinblastin (sulfat)	Microtubuli/Tubulin	HY-50673
Vincristin (sulfat)	Microtubuli/Tubulin	HY-16228
Vinflunin (Tartrat)	Microtubuli/Tubulin	HY-N0088
Vismodegib	Hedgehog	HY-B0021
VLX1570	Deubiquitinase	HY-12471
Voreloxin (Hydrochlorid)	Topoisomerase	HY-16518
Volasertib	Polo-like Kinase (PLK)	HY-12137
Vorinostat	HDAC	HY-12519
VRT752271	ERK	HY-14933
VS-5584	PI3K	HY-16585
VT-464 (R-Enantiomer)	Cytochrom P450	HY-15996A
VX-661	CFTR	HY-15448
WAY-362450	FXR	HY-50911
WP1066	JAK, STAT	HY-13748
Xanthohumol	COX, DGAT	HY-N1067
XL019	JAK	HY-13775
XL-147	PI3K	HY-16526
XL228	Aurora Kinase, BCR-ABL, IGF-1R, SRC	HY-15749
YM-155	Autophagie, Survivin	HY-10194
Zibotentan	Endothelin Rezeptor	HY-17493
Zoledronsäure (Monohydrat)	PKC	HY-13966
Zosuquidar (Trihydrochlorid)	P-Glycoprotein	HY-19944
ZSTK474	Autophagie, PI3K	HY-50847

2.3 Geräte

Tabelle 3 zeigt eine Übersicht über die in den eigenen Untersuchungen verwendeten Geräte.

Tabelle 3: Verwendete Geräte mit Herstellerangabe und Verwendungszweck

Gerät	Firma	Verwendungszweck
Biosicherheitsbank Flow Safe 2020	Thermo Fisher Scientific	Zellkultivierung
CytoFLEX	Beckman Counter	Durchflusszytometrie
D300e Digital Dispenser	Tecan	Zellviabilitätsassay und Plattendesign
Inkubator C170	Binder	Inkubation von Zellen in 384-Well-Mikrotiterplatten
Inkubator HeraCell 150	Marshall Scientific	Inkubation von Zellen
Mikroskop Axio Scope A1	Zeiss	Zellkultivierung
Milli-Q-Plus-Reinstwasseranlage	Milipore	Zellviabilitätsassay
Multidrop Combi Reagenzien-Dispenser	Thermo Fisher Scientific	Zellviabilitätsassay
Plate Reader Spark 10M	Tecan	Zellviabilitätsassay
Vi-Cell-XR Zellzähler und Zellviabilitätsanalyzer	Beckman Counter	Zellviabilitätsanalyzer und Zellzahlmessung
Zentrifuge Allegra X-12 R	Thermo Fisher Scientific	DNA-Aufreinigung
Zentrifuge Haraeus Fresco 21	Beckman Counter	Zellbasierte-Assays
Zentrifuge Multifuge 4KR	Thermo Fisher Scientific	Zell-basierte Assays, RNA Extraktion, DNA Isolation

2.4 Software

Die in dieser Arbeit eingesetzte Software ist in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Verwendete Software mit Herstellerangabe und Verwendungszweck

Software	Hersteller	Verwendungszweck
Cytextpert	Beckman Counter	Durchflusszytometrie
D300e Control	HP	Applikation der Testsubstanzen
D300e Merge	HP	Design der Platten für den Zellviabilitätsassay
FILLit for Multidrop Combi 1.2.1	Thermo Fisher Scientific	Aussaat von Zellen
GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc.	Graphische Darstellung der Daten
Office	Microsoft	Analytik
SPARKCONTROL Dashboard	Tecan	Auslesen des Zellviabilitätsassay
Zellcounter VI-CELL XR 2.03	Beckman Counter	Bedienung des Zellzahlmessers

2.5 Verbrauchsmaterialien

2.5.1 Medien und Lösungen

Tabelle 5 fasst die in den eigenen Untersuchungen verwendeten Medien und Lösungen zusammen.

Tabelle 5: Verwendete Medien und Lösungen

Medien und Lösungen	Firma	Produktnummer
Accutase®	Corning	25-058-CI
B27 minus Vitamin A	Thermo Fisher Scientific	12587010
BSA	Sigma	A9306
Celltiter-Glo®	Promega	G7570
DMEM	Gibco	10566016
DMEM F12	Thermo Fisher Scientific	11330-057
DMSO	Sigma	D8418

DTT	Sigma	3483-12-3
Dye Reagent	Bio-Rad	5000006
EGF	Gibco	PHG0311
FBS	Sigma-Aldrich	F9665
FGF	Gibco	AA 10-155
GlutaMax	Invitrogen	35050061
Heparin	STEMCELL Technologies	07980
HEPES Buffer Solution (1M)	Gibco	15630080
IMDM	Gibco	31980030
Leukemia Inhibitory Factor, human	Millipore	LIF1010
Loadingpuffer	Sigma	S3401
LumiGlo®	Cell Signaling	95538P
MEM Non-Essential Amino Acids Solution	Thermo Fisher Scientific	11140050
Modified IMEM	Gibco	A1048901
Neurobasal-Medium	Thermo Fisher Scientific	21103049
NeuroCult™ Proliferation Supplement (Human)	STEMCELL Technologies	05753
NeuroCult™ NS-A Basal Medium (Human)	STEMCELL Technologies	05750
Novex Tris-Glycine SDS running buffer	Invitrogen	LC2675
Nuklease freies Wasser (DEPC-H ₂ O)	Ambion	AM9916
PBS	Sigma	P5493
PBS-T	Thermo Fisher	28352
PDGF -AA	Shenandoah Biotechnology	100-16
PDGF -BB	Shenandoah Biotechnology	100-18AF
Penicillin (10.000. U/ml) - Streptomycin (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich	P4333
PhosSTOP	Sigma	4906845001
Propidium iodid	Sigma	P4170
Proteaseinhibitor	Sigma	P8340
RIPA Lysepuffer	Sigma	R0278
Rnase Away	Molecular Bio Products	83931
RPMI Medium 1640	Gibco	21875091
Sodium Bicarbonat	Gibco	25080094
Sodium Pyruvat	Gibco	11360039
TBS-T-Puffer	Sigma	SRE0031
Triton X-100	Roth	3051.3

2.5.2 Materialien

Tabelle 6 fasst die in den eigenen Untersuchungen verwendeten Materialien zusammen.

Tabelle 6: Verwendete Materialien mit Herstellerangabe

Material	Firma
384-Well Assay Platten, Flat Bottom	Corning
Handschuhe	Roth
Kryoröhrchen	Thermo Fisher Scientific
Novex™ WedgeWell™ 4-12% Tris-Glycine Gel	Invitrogen
Parafilm	Sigma
Pipettenspitzen aerosolresistent	Nerbe
Reaktionsgefäße	Falcon, Eppendorf
T8+ Dispensehead Cassettes	HP
Zellkulturflaschen Bio-One	Greiner
Zellkulturflaschen Cellbind	Corning

3. Methoden

3.1 Präparation der Inhibitoren

Alle Inhibitoren wurden in sterilem DMSO unter einer Werkbank gelöst und auf eine Konzentration von 10 mM als Stocklösung verdünnt. Anschließend wurden alle Inhibitoren bei -80°C gelagert.

3.2 Erstellung des Plattendesigns zur Hochdurchsatz-Medikamententestung

Die Methode zur automatisierten und standardisierten Hochdurchsatz-Medikamententestung ist in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Marc Remke bereits vollständig etabliert und wird umfassend eingesetzt^{79,80}. Der Prozess der Hochdurchsatz-Medikamententestung basiert auf der Nutzung von drei hochspezialisierten Geräten, die semi- oder vollautomatisiert arbeiten: D300e Digital Dispenser (Tecan), MultiDrop Combi (Thermo Scientific) und dem Mikrotiterplattenlesegerät Spark (Tecan). Zunächst wurden die Inhibitoren in mehreren Verdünnungsschritten durch den D300e Digital Dispenser von Tecan auf 384-Well-Mikrotiterplatten pipettiert. Dabei wurden die weißen 384-Well-Mikrotiterplatten mit flachem Boden der Firma Corning verwendet. Der Digital Dispenser und die dazugehörige Software D300e Control ermöglichen einen standardisierten sowie randomisierten Auftrag der Inhibitoren in unterschiedlichen Verdünnungsstufen. Für das Auftragen der Inhibitoren wurde ein geeignetes Pipettierschema innerhalb des Programms D300e Control erstellt, wobei die Verteilung linear oder logarithmisch erfolgen kann und die individuelle Festlegung der Verdünnungsschritte möglich ist. Die Höchstkonzentration aller eingesetzten Inhibitoren betrug dabei 10 mM und die Verdünnung erfolgte in sieben oder fünf Verdünnungsschritten bis zu der Konzentration von 5 nM. Das Setup war dabei für alle getesteten Zelllinien gleich.

In die beiden äußeren Reihen und Spalten der jeweiligen Platten werden keine Inhibitoren pipettiert, um mögliche Randeffekte (wie durch Verdunstung) zu minimieren. In allen anderen Wells erfolgt neben der notwendigen Randomisierung ebenfalls eine

Normalisierung mittels DMSO. Diese dient der Einstellung aller Wells auf die höchste DMSO-Konzentration, um DMSO-Effekte aufgrund der bestehenden Lösung der Inhibitoren in DMSO zu vermeiden. Sechs Wells pro Platte werden ausschließlich mit DMSO befüllt und dienen als DMSO-Kontrolle, während weitere fünf Wells frei von DMSO und Inhibitoren bleiben und als Normalkontrolle dienen. Staurosporin dient in allen Platten als Positivkontrolle, da es in Säugetierzellen Apoptose induziert (siehe Abbildung 5)⁸¹.

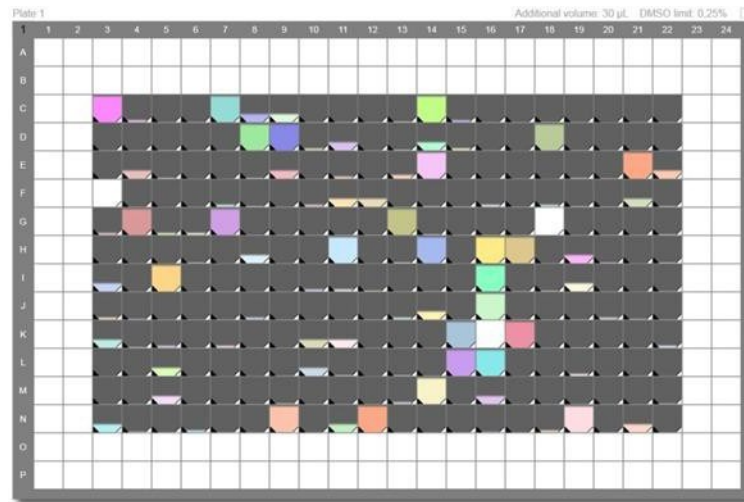


Abbildung 5: Exemplarische Darstellung eines Plattenmodells aus dem genutzten Setup.

Exemplarische Darstellung eines Plattenmodells aus dem genutzten Setup. Die verschiedenen Farben stellen unterschiedliche Inhibitoren dar und geben je nach Füllung des Quadrats die jeweilige Verdünnung an. Dunkelgrau dargestellt wird die DMSO-Normalisierung. Die weißen bzw. schwarzen Dreiecke in den unteren Ecken der Quadrate zeigen die eingesetzte Normalisierung sowie Randomisierung.

3.3 Inhibitordispensation auf 384-Well-Mikrotiterplatten

Mithilfe der D300e Control Software wurde über eine USB-Verbindung mit dem Digital Dispenser die Inhibitordispensation gesteuert (dafür wurde das gemäß 3.2 zuvor erstellte Setup verwendet). Die 384-Well-Mikrotiterplatten wurden unter der Sterilbank ausgepackt, entsprechende Etiketten wurden zur Nummerierung gedruckt, Parafilm wurde zur späteren Versiegelung in 3 cm breite und 20 cm lange Streifen geschnitten und die Inhibitoren wurden auf Eis aufgetaut.

Danach erfolgte das Einlegen einer T8-Kassette (HP) in den D300e Digital Dispenser und die Befüllung der acht Dosierköpfe mit den avisierten Inhibitoren in entsprechender

Konzentration. Diese wurden nacheinander aus T8-Kassetten durch den Digital Dispenser auf die Mikrotiterplatten pipettiert, bis alle Inhibitoren des jeweiligen Platten-Setups enthalten waren. Danach fand die DMSO-Normalisierung aufgrund der größeren Volumina in D4-Kassetten (HP) statt und die Platten wurden mit Parafilm versiegelt und bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert.

Nach dem abgeschlossenen Bedrucken der Platten mit Inhibitoren, speichert die Software eine Report-Datei, welche später derandomisiert und mithilfe des Lumineszenzergebnisses nach Verwendung von Zellen auf den inhibitorpräparierten Platten für die Auswertung verwendet wurde.

3.4 Qualitätskontrollen innerhalb des Screening-Prozesses

3.4.1 Qualitätskontrolle innerhalb des Screening-Experiments

Zur Qualitätssicherung der Ergebnisse im Screening-Prozess wurden mehrere Schritte zur Überprüfung entwickelt. Zunächst wurde die Richtigkeit der Randomisierung aller Platten für jede Zelllinie mittels einer Heatmap-Darstellung geprüft. So wurde einerseits sichergestellt, dass die Randomisierung im Setup erfolgte, während andererseits überprüft wurde, dass die Zellsuspension exakt durch den Multidrop Combi Reagenzien-Dispenser aufgetragen wurde. Sollte beispielsweise eine der Dispenser-Düsen, innerhalb des Aussaat-Prozesses verstopfen, kann man dies anhand des Randomisierungsmusters feststellen und das Experiment müsste wiederholt werden. Eine schlechte oder nicht erfolgte Randomisierung würde sich dadurch kenntlich zeigen, dass die Farben nicht auf der gesamten Platte verteilt wären, sondern eine Farbe in einer oder mehreren Reihen vorkommen würde (siehe Abbildung 6). Eine korrekt erfolgte Randomisierung ist exemplarisch in Abbildung 7 dargestellt.

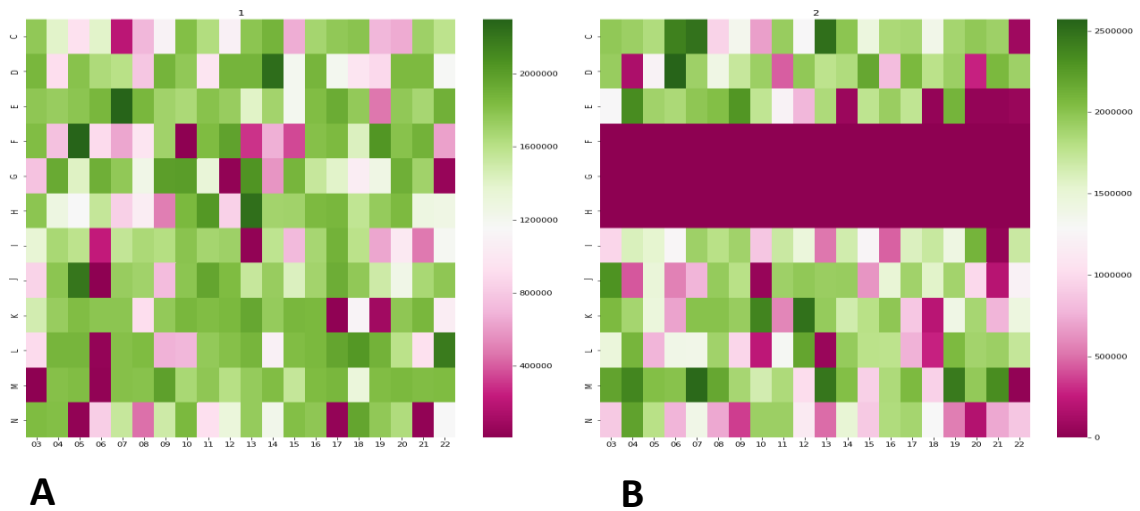


Abbildung 6: Exemplarische Darstellung einer erfolgten Randomisierung in einer Heatmap im Vergleich zu einer fehlerhaften Randomisierung.

Auf der x-Achse dargestellt befinden sich jeweils die befüllten Reihen der Platte von C bis N, auf der y-Achse die Spalten von drei bis 22. Auf der rechten Seite jeder Platte ist die Legende der Zellzahl viabler Zellen dargestellt, wobei rot eine geringe und grün eine hohe Zellzahl bedeutet. Jede Platte zeigt ein anderes Muster, was eine funktionierende Randomisierung und eine erfolgreiche Dispensation der Zellen nachweist.

A zeigt ein Beispiel für eine korrekt erfolgte Randomisierung, während B exemplarisch eine fehlerhafte Randomisierung darstellt. In Reihe E bis H ist ein dunkelroter Balken mit einer geringen Zellzahl sichtbar.

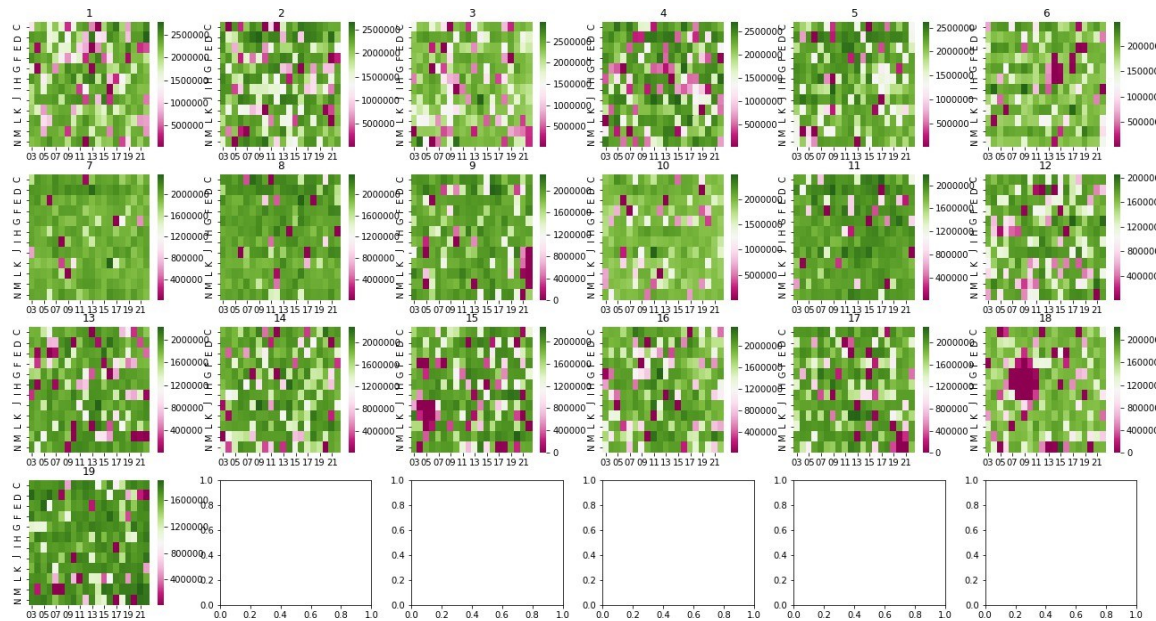


Abbildung 7: Heatmap-Darstellung des Randomisierungsmusters auf den befüllten Platten der Inhibitor-Bibliothek exemplarisch für eine Zelllinie.

Jede Platte ist oben mit einer Zahl von eins bis 19 nummeriert. Auf der x-Achse dargestellt befinden sich jeweils die befüllten Reihen der Platte von C bis N, auf der y-Achse die Spalten von drei bis 22. Auf der rechten Seite jeder Platte ist die Legende der Zellzahl viabler Zellen dargestellt, wobei rot eine geringe und grün eine hohe Zellzahl bedeutet. Jede Platte zeigt ein anderes Muster, was zum einen eine funktionierende Randomisierung nachweist und zum anderen belegt, dass keine Fehler bei der Aussaat auszumachen sind.

In einem zweiten Schritt wurden die IC₅₀-Werte von Staurosporin als Positivkontrolle der Qualität des Screenings genutzt. Staurosporin induziert in allen in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien zuverlässig den Zelltod⁸¹⁻⁸⁴ und wurde aus diesem Grunde in sechs Konzentrationen als Positivkontrolle auf jeder Platte verwendet. So sollten alle Dosis-Wirkungskurven von Staurosporin in einer vergleichenden Grafik zueinander eine möglichst geringe Abweichung von der Regressions-S-Kurve sowie möglichst ähnliche Mittelwerte aufweisen. Hierbei wurde die Streuung als R² für Werte zwischen null und eins bestimmt, wobei eins die geringste Abweichung darstellt. Die festgelegte Toleranzgrenze von R² = 0,75 durfte nicht unterschritten werden.

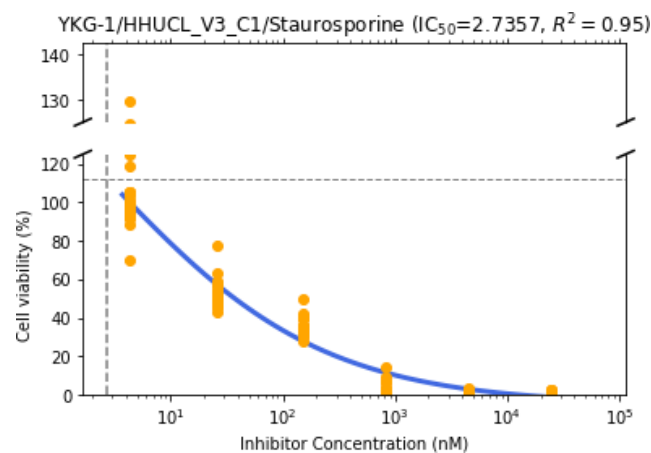


Abbildung 8: Exemplarische Darstellung aller IC₅₀-Werte von Staurosporin für die Zelllinie YKG-1.

Auf der x-Achse die Zellviabilität in Prozent, auf der y-Achse die Inhibitor-Konzentration in nM. Die einzelnen IC₅₀-Werte sind in gelb dargestellt, die Ausgleichskurve in blau. Die Grafik zeigt eine geringe Streuung R² von 0,95 um die Ausgleichskurve herum.

3.4.2 Qualitätskontrolle innerhalb der Datenauswertung

Anhand der Zellviabilität der Glioblastomzellen nach erfolgter Inhibitorbehandlung wurden der entsprechende IC₅₀-Wert sowie die Fläche unter der Kurve (*area under the curve* (AUC)) aus den Dosis-Wirkungskurven des Zellviabilitätsassays ermittelt. Der IC₅₀-Wert beschreibt jene Wirkstoffkonzentration, bei der 50% der Zellen metabolisch *in vitro* inhibiert werden. Der IC₅₀-Wert dient als Indikator für die Potenz des Wirkstoffes^{85,86}. Die AUC beschreibt die Fläche unter der Dosis-Wirkungskurve und wird ähnlich wie der IC₅₀-Wert verwendet^{87,88}.

Um Wirkstoffe mit hoher Effizienz zu bestimmen, wurden die 660 Inhibitoren zunächst nach ihrer Signifikanz ($p < 0,05$) ausgewählt. Im folgenden Schritt wurden die Inhibitoren nach einem Verhältnis (Ratio) für die Wirkspezifität für pädiatrische und adulte hochgradige Gliome im Vergleich zu anderen Entitäten sortiert. Dazu wurde die jeweilige Fläche AUC berechnet. Um das Verhältnis darzustellen, wurde die AUC des jeweiligen Wirkstoffs für pädiatrische und adulte hochgradige Gliome durch die AUC für andere Entitäten dividiert. Die Werte wurden aus den AUC der jeweiligen Entitäten gemittelt.

Die Toleranzgrenze der Ratio wurde als $>1,2$ und $<0,8$ festgelegt, um einen mindestens 20-prozentigen Wirkunterschied in pädiatrischen und adulten hochgradigen Gliomen im Verhältnis zu anderen Entitäten zu ermitteln. Je weiter der Wert der Ratio von den beiden Toleranzgrenzen entfernt ist, desto höher ist die Wirkspezifität des Inhibitors für eine Entitätsgruppe (siehe Kapitel 4.1.1, Tabelle 10)

3.5 Erstellung des Plattendesigns für die Validierung von Napabucasin und Synergismus-Experimente

3.5.1 Konzentrationen von Napabucasin für die Validierung

Für die Validierung von Napabucasin wurde der jeweilige IC₅₀-Wert der Zelllinien aus dem Primärscreen genutzt und so logarithmisch Werte getestet, die sowohl unter als auch über dem IC₅₀-Wert lagen ([nM]: 10, 100, 450, 1.150, 1.500, 5.000, 8.000, 10.000, 25.000).

3.5.2 Konzentrationen der Inhibitoren im Synergismus-Experiment

Für das Synergismus-Experiment wurden Paclitaxel, 5-Fluoruracil, Irinotecan, Gemcitabin, Entinostat und Temozolomid in Kombination mit Napabucasin getestet. In Tabelle 7 dargestellt sind die jeweiligen verwendeten Konzentrationen und Kombinationen. In Abbildung 9 und 10 exemplarisch dargestellt eine Synergismusplatte mit und ohne Normalisierung und Randomisierung.

Tabelle 7: Die Inhibitorkonzentrationen im Synergismus-Experiment

Napabucasin	Temozolomid	Paclitaxel	5-Fluoruracil	Irinotecan	Gemcitabin	Entinostat
Konzentrationsbereich [nM]						
0	0	0	0	0	0	0
100	10.000	10.000	10.000	10.000	500	1.000
450	13.750	13.750	13.750	13.750	1.625	7.000
800	17.500	17.500	17.500	17.500	2.750	13.000
1.150	21.500	21.500	21.500	21.500	3.875	19.000
1.500	25.000	25.000	25.000	25.000	5.000	25.000

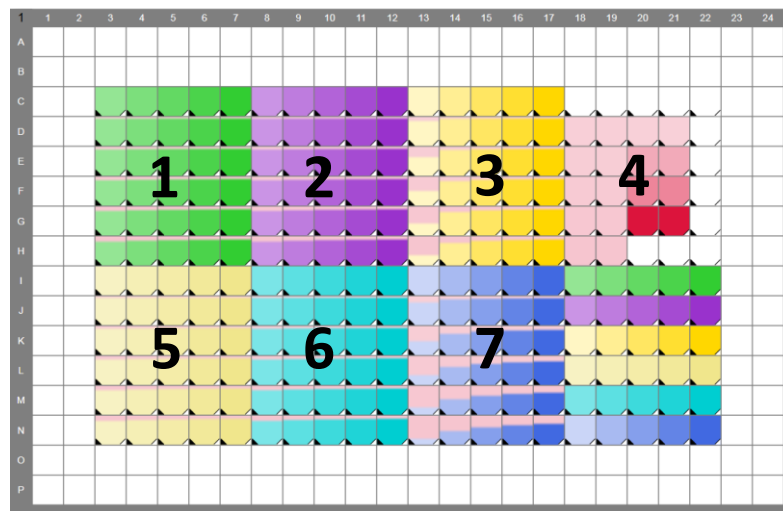


Abbildung 9: Das Synergy-Plattendesign ohne Randomisierung und Normalisierung.

In rot wird Napabucasin (4), in grün Temozolomid (1), in lila Paclitaxel (2), in orange Entinostat (3), in ocker 5-Fluoruracil (5), in türkis Irinotecan (6) und in blau Gemcitabin (7) dargestellt. Der Auftrag von Napabucasin erfolgt von hoher Konzentration (links) nach niedriger Konzentration (rechts). Bei dem jeweiligen dazu getesteten Wirkstoff, erfolgt die Verteilung von niedriger Konzentration (links) zu hoher Konzentration (rechts). Die Quadranten am rechten Rand zeigen die Validierung von Napabucasin (oben) und Kontrollen der getesteten Inhibitoren (unten).

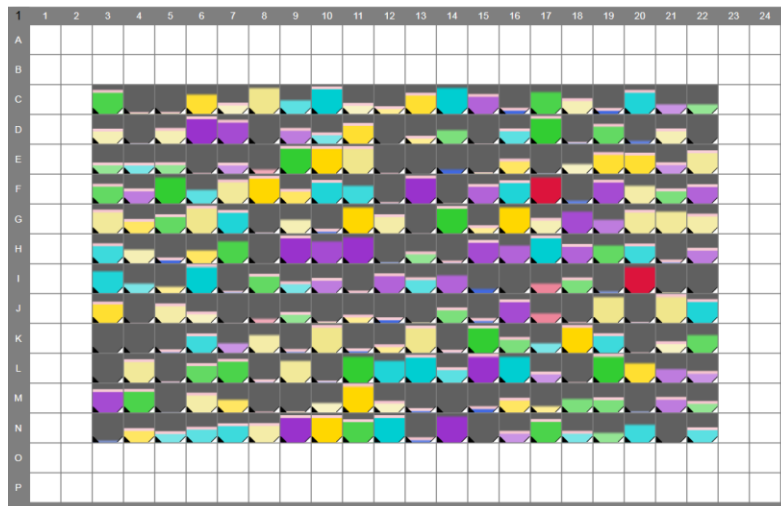


Abbildung 10: Darstellung des Synergy-Plattendesigns mit Randomisierung und Normalisierung.

Die Normalisierung (mittels DMSO) ist in Schwarz dargestellt. Die Konzentrationen der Wirkstoffe werden durch unterschiedliche Füllhöhe der einzelnen Felder dargestellt.

3.5.3 Auswertung des Synergismus-Experiments

Zur Aufbereitung der Rohdaten wurde die Software Combeneft verwendet, um Inhibitoren- und Reagenzienkombinationen durch Oberflächenanalysen in Synergismus-Modelle umzuwandeln. Möglich ist dabei die Erstellung von Modellen nach Loewe, Bliss und HSA⁸⁹. Dabei wird logarithmisch ermittelt, ob sich die Zellviabilität bei Behandlung mit einer Inhibitor Kombination im Vergleich zu der Behandlung mit nur einem Inhibitor unterscheidet.

3.6 Zelllinien und Zellkultur

Die Zellkulturarbeiten aller Zelllinien erfolgten unter sterilen Bedingungen in einer Biosicherheitsbank. Die Zelllinien GBM5050611, GBM59 MF, GBM67 MF, GS-2, GS-5, S24, SF188, S4GBH 2, speasGBM, ZH305, ZH426 und ZH582 wurden in Zellkulturflaschen der Firma Greiner Bio-One und die Zelllinien AM-38, CHLA-200, DBTRG-05MG, GBM-511-FH, KNS42, KS-1, LN18, LN308, LN229, M059K, M059J,

SF126, YH-13 und YKG-1 wurden in Cellbind ®- Zellkulturflaschen der Firma Corning bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

3.6.1 Passagieren und Splitten adhärenter Zelllinien

Der Zellrasen wurde bei 70–80-prozentiger Konfluenz nach Absaugen des Mediums zunächst einmalig mit PBS gewaschen. Anschließend wurden entweder 2 ml TrypLE Express oder 2 ml Trypsin (abhängig von der Zelllinie) hinzugegeben, um die Zellen enzymatisch abzulösen. Nach einer Inkubationszeit von ca. fünf Minuten wurde die vollständige Ablösung des Zellrasens unter dem Mikroskop überprüft. Die Zellen wurden anschließend mit frischem Medium in der Flasche resuspendiert. Ein Teil der Zellsuspension wurde verworfen und der Rest in einer neuen Zellkulturflasche weiterkultiviert (meist im Verhältnis 1:5 oder 1:10).

3.6.2 Passagieren und Splitten von Zelllinien in Suspension

Bei Sphäroidbildung der Zellen wurden diese zunächst fünf Minuten bei 1200 RPM zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in 1 ml Accutase® (Corning) resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von fünf bis zehn Minuten wurden die Zelllinien in 3 ml Medium resuspendiert und im Verhältnis 1:5 gesplittet, um weiter kultiviert zu werden.

3.6.3 Kryokonservierung von Zellen

Für die Kryokonservierung wurden die Zellen pelletiert und in 1 ml Kulturmedium mit 10% DMSO aufgenommen bzw. serumhaltig kultivierte Zelllinien in 1 ml Kulturmedium mit 20% FBS und 10% DMSO. Zunächst wurden die Zelllinien in einem Gefrierbehälter (Mr. Frosty, Nalgene) bei -80°C eingefroren und am nächsten Tag in den Flüssigstickstofftank zur Langzeitlagerung verbracht (-172°C). Zum Auftauen von kryokonservierten Zellen wurden diese drei Minuten bei 36°C im Wasserbad geschwenkt und in 10 ml PBS

resuspendiert. Nach der Zentrifugation von fünf Minuten bei 1200 RPM, wurde der Überstand abgenommen und verworfen, das Zellpellet mit frischem Medium resuspendiert und die Zellen in eine Zellkulturflasche gegeben.

3.6.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Zählung der Zellen erfolgte in dafür vorgesehenen 500 µl Röhrchen des Vi-Cell-XR Zellviabilitätsanalyser von der Firma Beckman Counter. Dieser verwendet die Standard-Trypanblau-Methode, wobei Trypanblau in die defekte Zellmembran toter Zellen eindringen kann, jedoch nicht in gesunde Zellen mit intakter Zellmembran und somit einen Viabilitätsnachweis möglich macht.⁹⁰ Daraus ergibt sich die Zahl der lebenden Zellen pro ml Suspension sowie die Prozentzahl der lebenden Zellen. Vor der Zählung wurden die adhärennten Zellen mit Tryple® oder Trypsin® abgelöst und Sphären in Suspension wurden mittels Accutase® dissoziiert (siehe Kapitel 3.5.3).

3.6.5 Bestimmung der Zellzahl für die Hochdurchsatz-Medikamententestung

Für die Durchführung der Hochdurchsatz-Medikamententestung wurde zunächst die optimale Zellzahl pro Well für eine 384-well Mikrotiterplatten ermittelt. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe für die jeweilige Zelllinie durchgeführt. Für alle Zelllinien wurden Zellzahlen zwischen 2.000 Zellen/Well und 15.000 Zellen/Well getestet. Für adhärennte Zelllinien sollte der Zellrasen nach 72-stündiger Inkubationszeit eine Dichte von ca. 80 Prozent unter dem Mikroskop aufweisen. Für Suspensionszellen wurde mittels CellTiter-Glo® die optimale Zelldichte ermittelt, da sich durch die Sphärenbildung der Zellen nur schwer die Zellzahl unter dem Mikroskop bestimmen lässt. Die jeweilige Zellzahl wurde so gewählt, dass sich das Wachstum im exponentiellen proliferierenden Bereich befand und eine möglichst geringste Standardabweichung aufwies. In der unten aufgeführten Tabelle 8 ist die verwendete Zellzahl der einzelnen Ziellinien dargestellt.

Tabelle 8: Die jeweilige Zelllinie und die verwendete Zellzahl

Zelllinie	Zellzahl (Zellen/Well)
AM-38	4000
DBTRG-05MG	1750
GBM-511-FH	10000
GBM0505611	5000
GBM59 MF	7500
GBM67 MF	8000
GS-2	5000
GS-5	5000
KNS42	4000
KS-1	1500
LN18	1250
LN308	1750
LN229	1000
M059J	2500
M059K	2500
S24	2500
SF126	9000
SF188	7000
S4PCGBH 2	1500
speasGBM	5000
YH-13	4000
YKG-1	2500
ZH161	4500
ZH426	4000
ZH562	5000

3.7 Zellviabilitätsassay mittels CellTiterGlo®

Nach Behandlung der verschiedenen Inhibitoren, wurde ein Zellviabilitätsassay durchgeführt. Das Verfahren wurde in folgenden Experimenten verwendet:

- a. *Verdünnungsreihen*: Auswertung der Zelldichte bei den Glioblastom-Zelllinien in Suspension.
- b. *Primärscreen*: Screening der Inhibitoren-Bibliothek der Zelllinien
- c. *Validierung* von Napabucasin aus dem Primärscreen
- d. *Synergismus* von Napabucasin mit Temozolomid, Paclitaxel, 5-Fluoruracil, Irinotecan, Gemcitabin und Entinostat

Die Zellviabilitätsassays wurden in 384-Well Assay-Mikrotiterplatten der Firma Corning durchgeführt. Zunächst erfolgte die Zellzahlbestimmung mittels Zellviabilitätsanalyzer

(siehe 3.6.4). Die Zellsuspension wurde anschließend entsprechend der benötigten Zellzahl hergestellt (siehe Tabelle 8).

Mit Hilfe des Multidrop-Combi-Reagenzien-Dispensers wurden jeweils 30 µl der jeweiligen Zellsuspension auf 384-Well Assay-Mikrotiterplatten ausgesät. Die hierfür verwendeten Platten waren zuvor mittels des D300e Digital Dispensers von Tecan mit den Testsubstanzen/Inhibitoren präpariert worden (siehe 3.3). Die Bedienung, Reinigung und Befüllung der Platten erfolgte über die Software FILLit for Multidrop Combi von Thermo Fisher. Die Platten wurden zuvor über den D300e Digital Dispenser von Tecan mit den Testsubstanzen präpariert.

Vor dem Aussäen der Zellen wurde der Multidrop-Combi-Reagenzien-Dispenser zunächst mit 20 ml Triton-X (1:70 in PBS verdünnt), 50 ml Ethanol, 20 ml H₂O und 20 ml PBS, nacheinander gespült. Die Zellsuspension wurde mit Hilfe des Dispensers so lange aufgezogen bis alle Schläuche vollständig befüllt waren, um dann 30 µl pro Well zu dispensieren. Nach jeder Zelllinie sowie nach Abschluss des Experimentes wurde der Dispenser erneut gespült. Nach Befüllen der Platten mit der Zellsuspension, wurden diese für 72 Std. bei 37°C und fünf Prozent CO₂ inkubiert.

Nach der Inkubationsphase von 72 Stunden erfolgte die Auswertung mittels des CellTiter-Glo® Lumineszenz Assays von Promega. Der Nachweis viabler Zellen basierte auf der Anwesenheit von Adenosintriphosphat (ATP), welches als Indikator metabolisch aktiver Zellen dient^{90,91}. Aufgrund der Reaktion von ATP und Luziferin, kann eine Biolumineszenz detektiert werden (Abbildung 11).

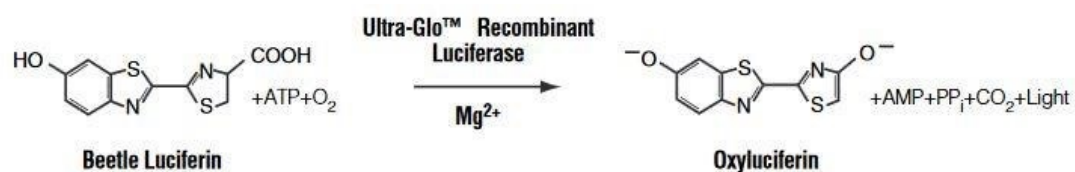


Abbildung 11: Die Luziferase Biolumineszenzreaktion mit D-Luziferin als Substrat.

Beetle Luziferin reagiert mit Magnesium und dem CellTiter-Glo® Lumineszenz Assay zu Oxyluziferin, Adenosinmonophosphat (AMP), Pyrophosphat, CO₂ und erzeugt dabei eine Lumineszenz.

Modifiziert nach: <https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-glo-luminescent-cell-viability-assay-protocol.pdf?la=en>

Bevor Celltiter-Glo® auf die Zellen in der Platte gegeben wurde, wurden die Platten gemäß den Angaben des Herstellers für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 30 µl CellTiter-Glo® pro Well dispensiert.

Daraufhin erfolgte eine 10-minütige Inkubationszeit in Dunkelheit bei Raumtemperatur. Die Auslesung erfolgte mittels des Tecan Spark 10M und der Software SPARKCONTROL. Die Software SPARKCONTROL erstellt dabei automatisch eine Excel-Datei für die spätere Auswertung. Die Zellviabilität wurde anhand der Rohdaten mithilfe der Inhibitorkonzentrationen ermittelt, wobei der Mittelwert der DMSO-Kontrolle als Normalisierung diente und die Excel-Datei zuvor derandomisiert wurde. Die Dosis-Wirkungs-Kurven sowie die IC50 Werte wurden berechnet und graphisch erstellt.

3.8 Propidiumiodid-Färbung für die Durchflusszytometrie zur Zellzyklusanalyse

Propidiumiodid (PI) dient als Farbstoff, der in die DNA interkaliert und diese färbt. Die Fluoreszenzintensität der gefärbten Zellen korreliert mit der darin enthaltenen Menge an DNA, wodurch im Rahmen einer Durchflusszytometrie eine Zellzyklusanalyse durchgeführt werden kann⁹². Zuvor muss die in den Zellen vorhandene RNA denaturiert werden, um eine Interkalation des PI in die RNA zu verhindern, da dies das Ergebnis der Durchflusszytometrie verfälschen würde⁹³. Der Zellzyklus der Zellen wurde nach Inhibitorbehandlung für 72 Stunden untersucht, wobei DMSO als Kontrolle genutzt wurde, da alle verwendeten Inhibitoren in DMSO gelöst wurden. Der DMSO-Gehalt lag dabei aufgrund von Toxizität unter einem Prozent⁹⁴.

Zunächst wurde die Zellzahl anhand des Zellviabilitätstests im Rahmen der Verdünnungsreihe angepasst und auf 6-Well-Platten berechnet. Jede Vertiefung wurde mit zwei Milliliter Zellsuspension im Medium befüllt und nach 72 Stunden mit der jeweiligen Inhibitorkonzentration (oder DMSO-Kontrolle) behandelt. Nach der Inkubationszeit von 72 Stunden wurde der Überstand der Zellen abgenommen und in einem 1,5 ml Eppendorf Mikroreaktionsgefäß aufbewahrt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit TrypLE Express abgelöst. Die abgelöste Zellsuspension wurde dem aufbewahrten Überstand hinzugefügt und bei 500 RPM für fünf Minuten zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in PBS resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in auf -20°C gekühltem 70 % Ethanol resuspendiert. Das Ethanol-Zell-Gemisch wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen bei 500 RPM für fünf

Minuten zentrifugiert, wobei das Zellpellet im Anschluss zweimalig mit PBS gewaschen wurde. Dem Zellpellet wurden 40 µl Ribonuklease (100 µg/ml) hinzugefügt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 100 µl PI (50 µg/ml) hinzugefügt und die Zellen lichtgeschützt über Nacht bei 4°C gelagert. Am nächsten Tag erfolgte die Analyse mittels Durchflusszytometrie, wobei die Daten mit der Software Kaluza nach einem non-parametric paired t-Test ausgewertet wurden. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt (n=3).

4. Ergebnisse

4.1.1 Untersuchung der Inhibitoren auf entitätsspezifische Wirksamkeit

Aufgrund der durchgeführten Qualitätskontrollen (siehe Kapitel 3.3) wurden bei den adulten Glioblastomen 12 Modelle und bei den pädiatrischen Glioblastomen sieben Modelle ausgewählt. Diese Modelle wurden dann für die HTDS verwendet und mit anderen Hirntumorentitäten verglichen, welche innerhalb der AG Remke bereits auf der gleichen Inhibitorplattform getestet wurden. Für den Entitätsvergleich wurden Medulloblastome (n=10) und atypische teratoide/rhabdoide Tumoren (ATRT; n=7) mit den Glioblastomen verglichen. Die verwendeten Zelllinien für alle entitätsspezifischen Analysen sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Zelllinien, die die Qualitätskontrolle passierten und für die Analysen im Entitätenvergleich verwendet wurden.

Glioblastome	Pädiatrische maligne Gliome	Medulloblastome	AT/RT
AM-38	GBM-511-FH	CHLA-01	BT-12
GBM0505611	GBM67MF	CHLA-01R	CHLA-02
GS-2	KNS42	D283	CHLA-04
KS-1	S4PCGBH2	D425	CHLA-05
LN18	SF188	DAOY	CHLA-06
LN229	speasGBM2	HD-MB03	JC-ATRT
LN308		MED8A	VU397
M059J		ONS76	
S24		UW228-2	
SF126		UW228-3	
YKG-1			
ZH562			

Aus über 650 Inhibitoren wurden die 20 Top-Inhibitoren mit sehr hoher Signifikanz ($p < 0,001$) bestimmt. Napabucasin wies in Glioblastomen eine AUC von 0,64 und in anderen Entitäten eine AUC von 0,96 (je kleiner der AUC Wert desto spezifischer das Ansprechen des Inhibitors). Daraus ergab sich eine Ratio von 0,67 im Vergleich zu anderen Entitäten und die höchste Spezifität von Napabucasin in Glioblastomen. Oprozomib und Genz644282 zeigten mit 0,41 und 0,58 eine geringere AUC für Glioblastome als Napabucasin, wirkten in anderen Entitäten allerdings noch spezifischer als in Glioblastomen (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Die 20-Top Inhibitoren mit hoher Signifikanz ($p < 0,001$)

Inhibitor	AUC Glioblastome	AUC andere Entitäten	Signifikanz (p-Wert < 0,001)	Ratio
Napabucasin	0,64	0,96	9,92529E-05	0,67
Treosulfan	0,98	0,80	0,000169113	1,21
AZD6738	0,84	0,69	0,000622343	1,22
TH302	0,97	0,80	2,56936E-05	1,22
Tucidinostat	0,86	0,70	0,000110572	1,22
Belinostat	0,72	0,58	0,000976195	1,24
AVN944	0,77	0,62	0,000110572	1,25
Adarotene	0,73	0,57	0,000622343	1,27
RX3117	0,92	0,72	0,000255737	1,29
TAK901	0,71	0,55	0,000826587	1,29
Mozavaptan	0,95	0,74	1,80355E-05	1,30
Oprozomib	0,41	0,31	0,0007525	1,32
Ancitabine	0,82	0,60	6,39808E-05	1,37
CUDC101	0,72	0,52	0,000255737	1,38
AMG232	0,98	0,68	0,000465621	1,43
Epirubicin	0,71	0,48	0,000995274	1,47
Mitomycin C	0,83	0,55	7,14802E-05	1,50
JIB4	0,73	0,48	3,83894E-05	1,53
Nedaplatin	0,97	0,61	0,000123095	1,59
Genz644282	0,58	0,34	0,000313158	1,69

In Abbildung 12 sind graphisch die AUC-Werte von Napabucasin, Temozolomid, CX5461, Dasatinib, JIB 4, Mozavaptan und Mitomycin C in Glioblastomen und anderen Hirntumorentitäten dargestellt. Wie oben bereits beschrieben, zeigte dabei Napabucasin die beste Wirksamkeit in Glioblastomen im Vergleich zu den anderen Entitäten. Im Kontrast dazu zeigte Temozolomid (Standardtherapie für Glioblastome) in allen Entitäten einen

vergleichbar hohen AUC-Wert und war somit nicht signifikant effektiver in Glioblastomen. CX5461 und Dasatinib wiesen in Glioblastomen und anderen Entitäten keine signifikanten Unterschiede in der AUC auf. JIB 4, Mozavaptan und Mitomycin C hatten in anderen Entitäten eine niedrigere mittlere AUC als in Glioblastomen (siehe Abbildung 12) und waren daher nicht Glioblastom-spezifisch. In Abbildung 13 ist die Wirksamkeit (AUC-Werte) von Napabucasin für adulte Glioblastome (n=12) und pädiatrische maligne Gliome (n=7) im Vergleich zu Medulloblastomen (n=10), ATRTs (n=7) und humanen Fibroblasten (HFF, n=3) im Detail dargestellt. In adulten Glioblastomen wies Napabucasin die geringste mittlere AUC von 0,6 auf. In pädiatrischen malignen Gliomen betrug die mittlere AUC 0,8 und in Medulloblastomen 0,9. In ATRT und humanen Fibroblasten zeigte Napabucasin mit einer mittleren AUC von 1,0 keine Wirkung.

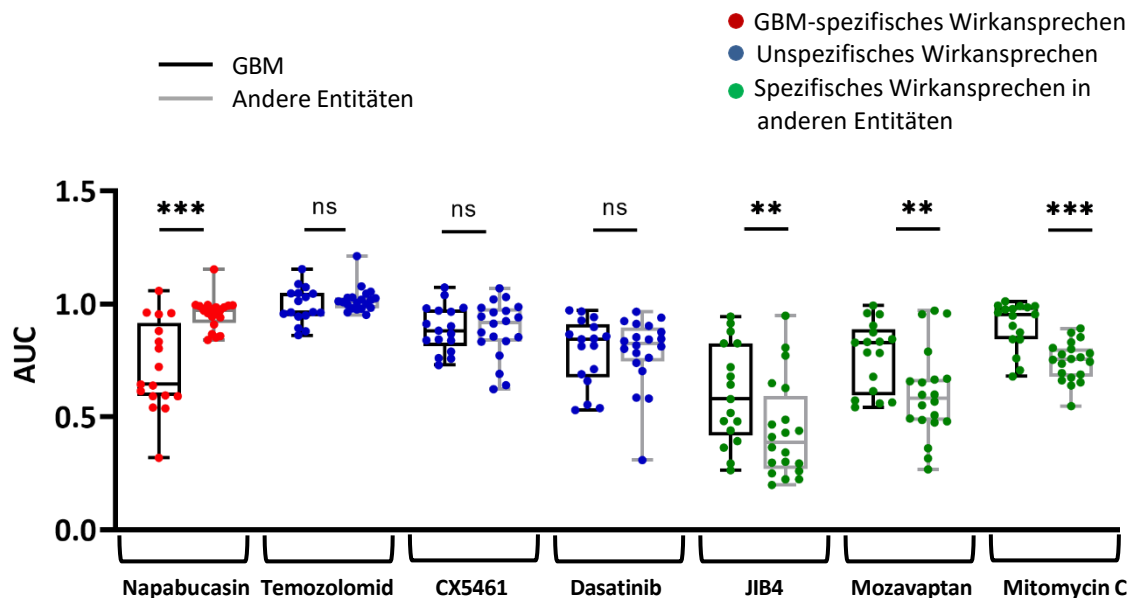


Abbildung 12: Der exemplarische Vergleich der Wirksamkeit in Glioblastomen und anderen Entitäten für Napabucasin und sechs weitere Inhibitoren.

Auf der y-Achse dargestellt die jeweilige *area under the curve* (AUC), auf der x-Achse die Wirkstoffe Napabucasin, Temozolomid, CX5461, Dasatinib, JIB4, Mozavaptan und Mitomycin C. Die AUC von Glioblastomen (GBM) wird in schwarz gerahmten Box-Plots dargestellt, die AUC für andere Entitäten in grau gerahmten Box-Plots. Die einzelnen Werte sind in Punkten innerhalb der Box-Plots gezeigt. Jeder Punkt entspricht einer getesteten Zelllinie der jeweiligen Entität. Rote Punkte zeigen GBM-spezifisches Wirkansprechen, blaue Punkte unspezifisches Wirkansprechen und grüne Punkte ein spezifisches Wirkansprechen in anderen Entitäten im Vergleich zu Glioblastomen.

t-Test; ns = nicht signifikant; * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001

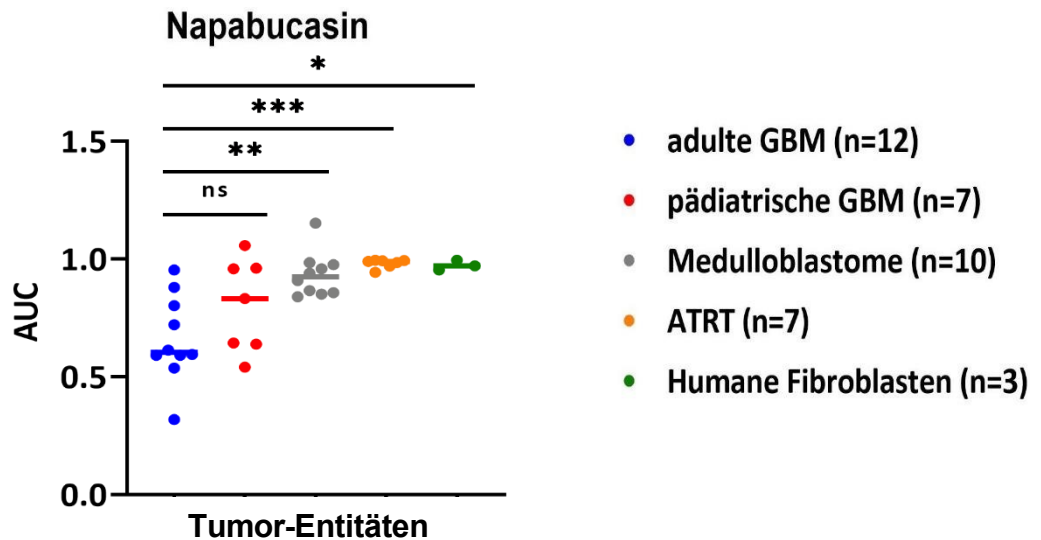
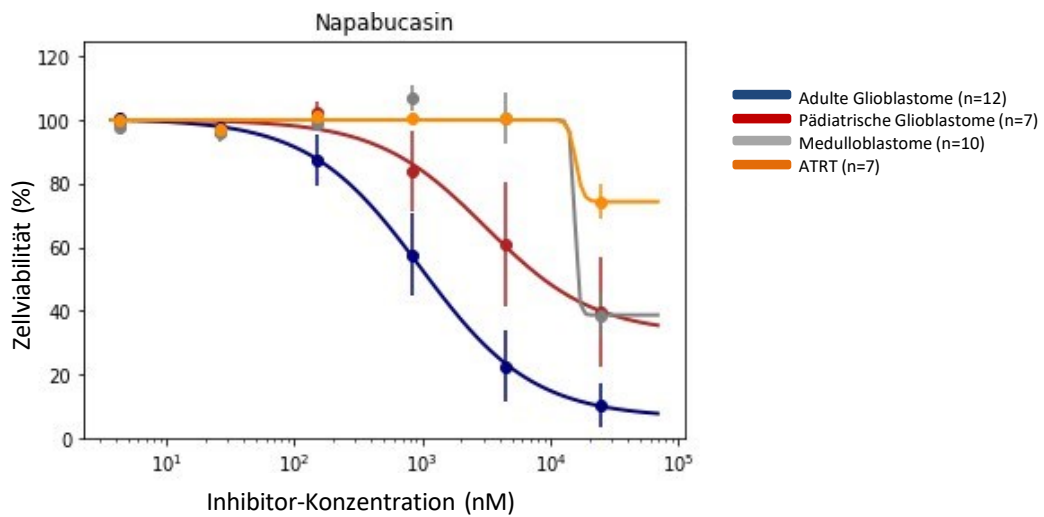


Abbildung 13: Die Wirkung von Napabucasin in adulten und pädiatrischen Glioblastomen im Vergleich zu anderen Entitäten.

Auf der y-Achse dargestellt die *area under the curve* (AUC), auf der x-Achse die Tumor-Entitäten: adulte (n=12; blau) und pädiatrische (n=7; rot) Glioblastome, Medulloblastome (n=10; grau), atypische teratoide/rhabdoide Tumoren (ATRT) (n=7; orange), humane Fibroblasten (n=3; grün).

t-Test, ns = nicht signifikant; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Der Vergleich der Dosis-Wirkungskurven für Napabucasin ist in Abbildung 14 für adulte (n=12) sowie pädiatrische Glioblastome (n=7), Medulloblastome (n=10) und ATRT (n=7) dargestellt. Alle Dosis-Wirkungskurven der jeweiligen Entitäten wurden zusammengefasst und miteinander verglichen. Die Inhibitortestung erfolgte in sechs Verdünnungsschritten. Die Fehlerbalken der Dosis-Wirkungskurven repräsentieren das unterschiedliche Wirkansprechen in den verschiedenen Zelllinien. Adulte Glioblastome waren gegenüber Napabucasin deutlich sensibler mit einem IC50-Wert von 0,98 μM gegenüber pädiatrischen Glioblastomen mit einem IC50-Wert von 3,1 μM . Medulloblastome und ATRT waren im Vergleich resistenter gegenüber über Napabucasin mit einem IC50-Wert von 15,5 μM bzw. 15,8 μM .



Entität	Adulte Glioblastome	Pädiatrische Glioblastome	Medulloblastome	ATRT
IC50 in nM	975,80	3106,59	15491,89	15764,87

Abbildung 14: Die Dosis-Wirkungskurven verschiedener Entitäten für Napabucasin.

Verglichen werden adulte Glioblastome (n=12) in blau, pädiatrische Glioblastome (n=7) in rot, Medulloblastome (n=10) in grau und atypische teratoide/rhabdoide Tumoren (ATRT) (n=7) in orange. Auf der y-Achse wird die Zellviabilität in Prozent und auf der x-Achse die Inhibitorkonzentration in nM dargestellt. In der Tabelle darunter befinden sich die entitätsspezifischen IC50-Werte.

In HFF (n=3) zeigte Napabucasin mit einem IC50-Wert von 20,82 μ M kein Wirkungsansprechen (Abbildung 15).

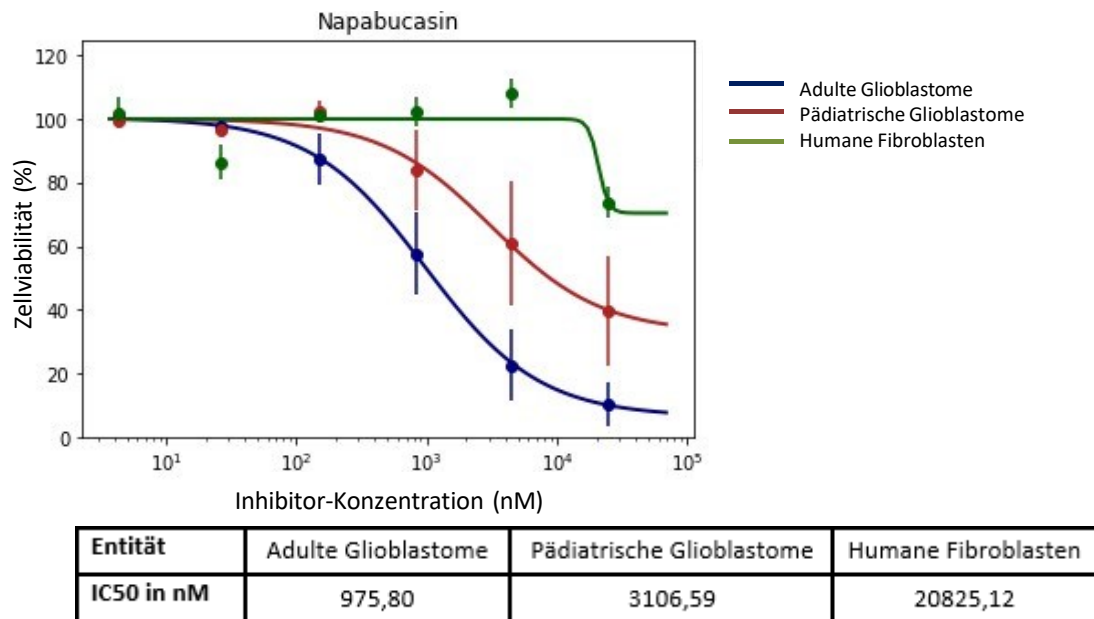


Abbildung 15: Die Dosis-Wirkungskurven von humanen Fibroblasten für Napabucasin im Vergleich zu adulten und pädiatrischen Glioblastomen.

Verglichen werden adulte Glioblastome (n=12; A-GBM) in blau, pädiatrische Glioblastome (n=7; P-GBM) in rot und humane Fibroblasten (HFF) (n=3) in grün. Auf der y-Achse wird die Zellviabilität in Prozent und auf der x-Achse die InhibitorKonzentration in nM dargestellt. In der Tabelle darunter befinden sich die entitätsspezifischen IC50-Werte.

4.1.2 Wirksamkeit von Napabucasin in adulten und pädiatrischen hochgradigen Gliomen

Anhand der Dosis-Wirkungskurven im Entitätenvergleich in 4.1.1 wurde ein unterschiedliches Inhibitoransprechen von Napabucasin in adulten und pädiatrischen hochgradigen Gliomen ersichtlich. Abbildung 16 zeigt exemplarisch drei pädiatrische und drei adulte Gliom-Modelle im Dosis-Wirkungskurven-Vergleich. Die, für diese Darstellung verwendeten Zelllinien finden sich in Tabelle 11.

Tabelle 11: Verwendete Gliomzelllinien für die Darstellung der Dosis-Wirkungskurven.

Adulte Glioblastome	Pädiatrische Gliome
GBM0505611	S4PCGBH2
GS-2	SF188
LN229	speasGBM2

Die Dosis-Wirkungskurven der adulten Glioblastome GBM0505611, GS-2 und LN229 wiesen niedrigere IC50-Werte auf als die Dosis-Wirkungskurven für die pädiatrischen Gliome S4PCGBH2, SF188 und speasGBM2. Innerhalb der adulten Zellmodelle zeigte LN229 den niedrigsten IC50-Wert von 0,78 μM . Bei GS-2 lag der IC50-Wert bei 0,94 μM und bei GBM0505611 bei 1,1 μM . Unter den pädiatrischen Gliomen zeigte SF188 den niedrigsten IC50-Wert von 6 μM . Bei S4PCGBH2 lag dieser Wert bei 23,6 μM und bei speasGBM2 konnte kein IC50-Wert ermittelt werden, da Napabucasin keine Wirkung in diesem Modell zeigte (siehe Abbildung 16).

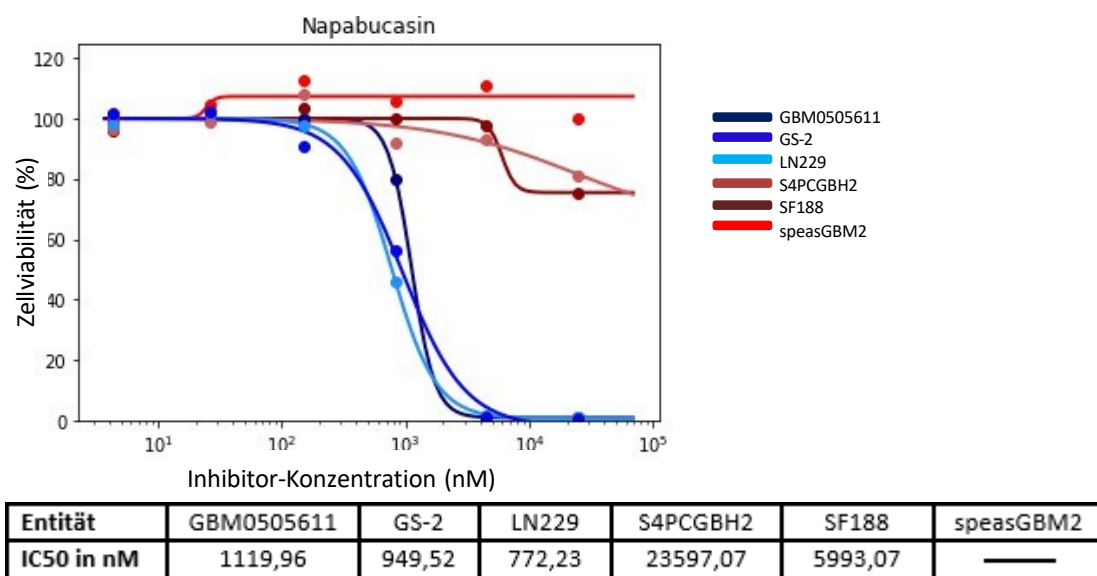


Abbildung 16: Die Dosis-Wirkungskurven von adulten und pädiatrischen Glioblastomen.

Verglichen werden die Dosis-Wirkungskurven von drei adulten Glioblastommodellen (GBM0505611, GS-2, LN229) in Blautönen mit drei pädiatrischen Glioblastommodellen (S4PCGBH2, SF188, speasGBM2) in Rottönen. Auf der y-Achse wird die Zellviabilität in Prozent und auf der x-Achse die Inhibitor-Konzentration in nM dargestellt. In der Tabelle darunter befinden sich die entitätsspezifischen IC50-Werte.

4.1.3 Synergistische Effekte von Napabucasin in Kombination mit anderen Inhibitoren

In den Abbildungen 17 bis 19 sind exemplarisch sogenannte Bliss Scores der Synergismusexperimente von Napabucasin in Kombination mit anderen Inhibitoren

dargestellt. Dabei zeigte Napabucasin zusammen mit 5-Fluoruracil (5-FU), Entinostat, Gemcitabin und Paclitaxel in GBM67MF sehr hohe synergetische Effekte (Abbildung 17). Im Detail: bei einer Konzentration von 13,75 bis 21,25 μM von 5-FU in Kombination mit 0,1 bis 1,5 μM Napabucasin konnten synergetische Effekte detektiert werden. Am stärksten war der Synergismus zwischen den beiden Wirkstoffen bei einer 5-FU-Konzentration von 17,5 μM und bei Napabucasin-Konzentrationen von 0,1 bis 0,45 μM (Abbildung 17 A). Die Kombination von Entinostat und Napabucasin zeigte bei Konzentrationen von 7 bis 13 μM Entinostat kombiniert mit 0,1 bis 1,5 μM Napabucasin synergistische Effekte. Am stärksten zeigte sich dabei der Synergismus bei einer niedrigen Napabucasin-Konzentration von 0,1 μM sowie einer Entinostat-Konzentration von 7 μM (Abbildung 17 B). Für Gemcitabin zeigte sich ein synergistischer Effekt bei den Konzentrationen von 1,82 bis 2,75 μM Gemcitabin in Kombination mit 0,1 bis 0,4 μM sowie 1,15 bis 1,5 μM Napabucasin. Die stärksten synergistische Effekte konnten bei einer Gemcitabin-Konzentration von 1,82 μM und Napabucasin-Konzentrationen von 0,1 bis 0,4 μM sowie 1,15 bis 1,5 μM detektiert werden (Abbildung 17 C). Die Kombination von Paclitaxel mit Napabucasin wies eine sich gegenseitig verstärkenden Wirkung bei Konzentrationen von 17,5 bis 21,25 μM Paclitaxel mit 0,1 bis 1,5 μM Napabucasin auf. Bei einer Paclitaxel-Konzentration von 17,5 μM und einer Napabucasin-Konzentration von 0,1 μM zeigte sich der stärkste synergistische Effekt. Insgesamt zeigten sich bei der Kombination von Paclitaxel mit Napabucasin weniger synergistische Effekte als in den Kombinationen mit 5-FU, Entinostat und Gemcitabin (Abbildung 17 D). Mit Entinostat sowie mit Gemcitabin und in Kombination mit Paclitaxel zeigte Napabucasin auch eine synergistische Wirkung in dem Zellmodell LN308 (siehe Anhang). Abbildungen zu den einzelnen Dosis-Wirkungskurven für Temozolomid, Paclitaxel, 5-Fluoruracil, Irinotecan, Gemcitabin und Entinostat aus dem Primärscreen befinden sich im Anhang (Abbildungen S1-5).

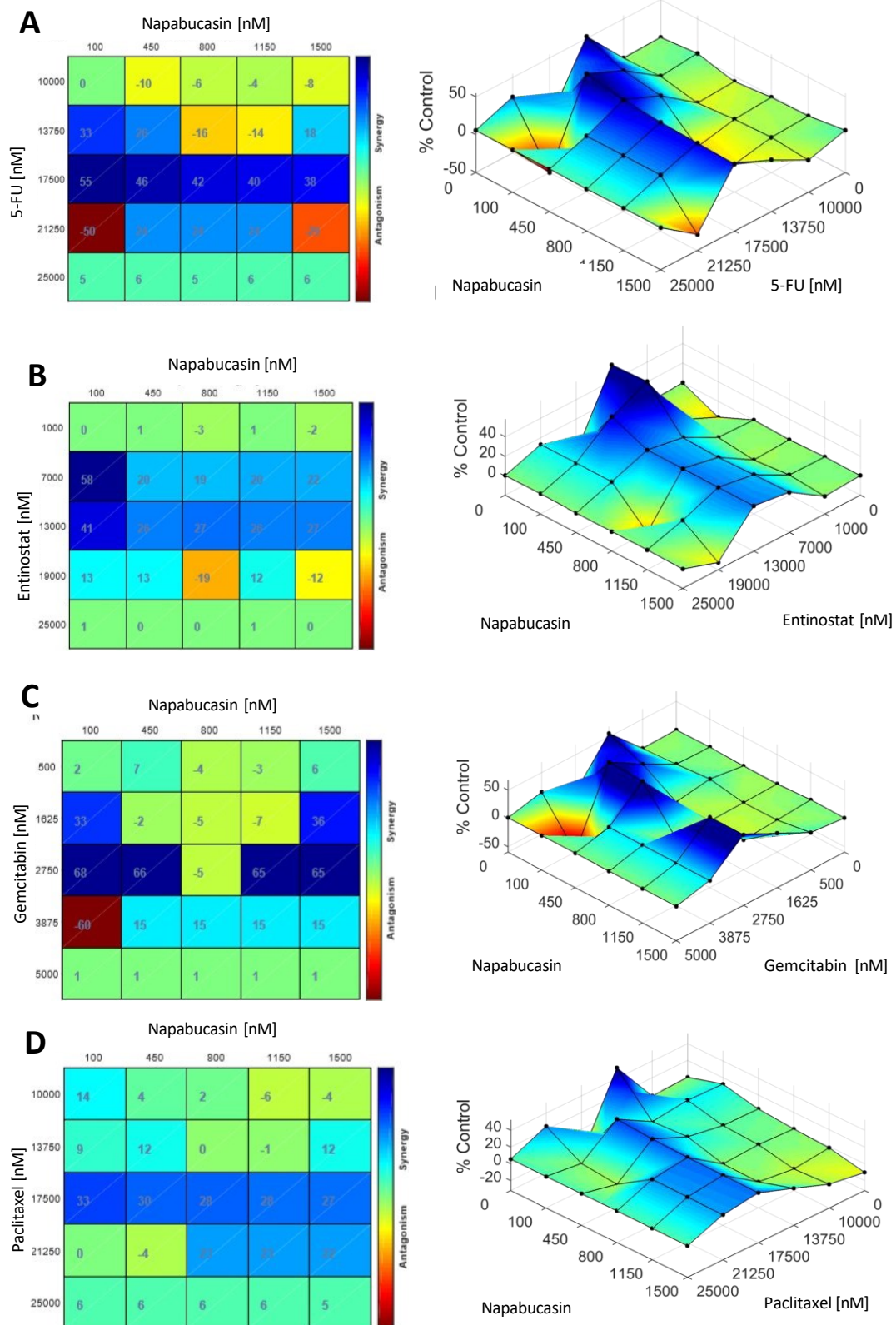


Abbildung 17: Exemplarische Darstellung von synergistischen Effekten in GBM67MF für 5-Fluoracil, Entinostat, Gemcitabin, Paclitaxel und Napabucasin.

Eine blaue Färbung deutet auf synergistische Effekte hin, während eine rote Färbung Antagonismus darstellt. Eine grüne Färbung bedeutet keine gegenseitige Wechselwirkung. Links wird in den Abbildungen eine zweidimensionale Matrix und rechts eine dreidimensionale Darstellung (Bliss Score) abgebildet. Auf den Achsen sind die jeweiligen Wirkstoffkonzentrationen aufgetragen, wobei die Napabucasin-Konzentration immer 0,1 bis 1,5 μM beträgt.

A Napabucasin in Kombination mit 5-Fluoruracil (5-FU) (10-25 μM). **B** Napabucasin in Kombination mit Entinostat (10-25 μM). **C** Napabucasin in Kombination mit Gemcitabin (0,5-5 μM). **D** Napabucasin in Kombination mit Paclitaxel (10-25 μM).

Die Kombinationen von Napabucasin mit Irinotecan zeigten keine gegenseitige Wechselwirkung in GBM0505611, LN18 und LN308, jedoch einen leichten Antagonismus in LN229 bzw. minimalen Synergismus und Antagonismus in GBM67MF (Anhang Abbildungen S6-12). Hier exemplarisch die fehlende Wechselwirkung in GBM0505611 dargestellt (Abbildung 18).

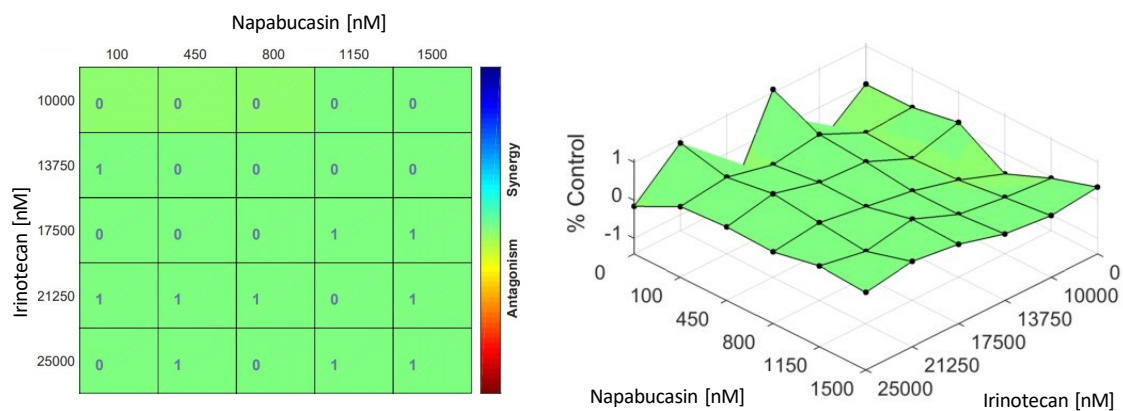


Abbildung 18: Exemplarische Darstellung des fehlenden synergistischen Effektes für Irinotecan kombiniert mit Napabucasin.

Eine grüne Färbung bedeutet keine gegenseitige Wechselwirkung. Links wird in den Abbildungen eine zweidimensionale Matrix und rechts eine dreidimensionale Darstellung (Bliss Score) abgebildet. Auf den Achsen ist die jeweilige Wirkstoffkonzentration aufgetragen, wobei die Napabucasin-Konzentration 0,1 bis 1,5 μM und die Irinotecan-Konzentration 10 bis 25 μM beträgt.

Für Temozolomid in Kombination mit Napabucasin ließen sich generell in mittelhohen Temozolomid-Konzentrationen (13,75 bis 21,25 μM) synergistische Effekte nachweisen. Jedoch zeigten Napabucasin-Konzentrationen von 0,45 und 1,15 μM in Kombination mit Temozolomid keinen Effekt. Bei einer Konzentration von 17,5 μM Temozolomid zeigten sich leichte antagonistische Effekte mit Napabucasin-Konzentrationen von 0,8 und 1,15 μM . Besonders deutlich wurden die antagonistischen Effekte bei einer Kombination von 0,1 μM Napabucasin zusammen mit 21,25 μM Temozolomid und einer Kombination von 1,15 μM Napabucasin zusammen mit 21,25 μM Temozolomid (Abbildung 19).

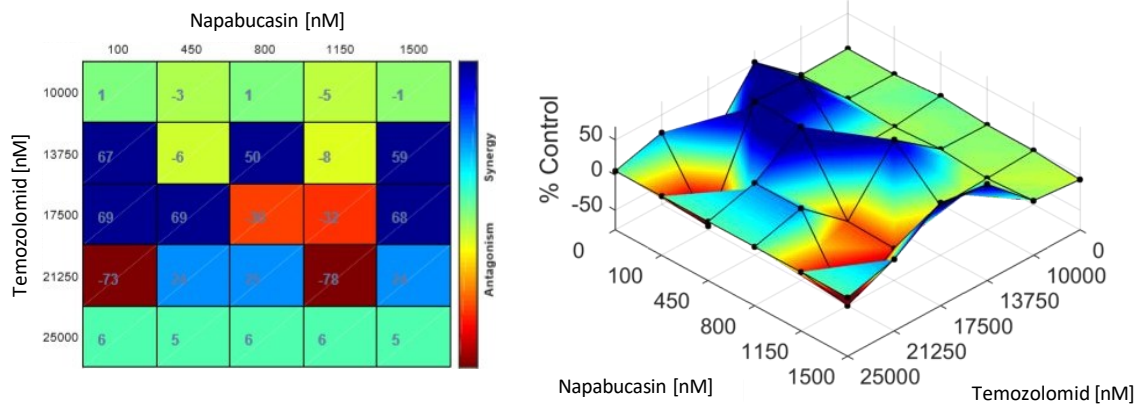


Abbildung 19: Exemplarische Darstellung des Synergismus in GBM67MF für Temozolomid in Kombination mit Napabucasin.

Eine blaue Färbung zeigt Synergismus, während eine rote Färbung Antagonismus darstellt. Eine grüne Färbung bedeutet keine gegenseitige Wechselwirkung. Links wird in den Abbildungen eine zweidimensionale Matrix und rechts eine dreidimensionale Darstellung (Bliss Score) abgebildet. Auf den Achsen ist die jeweilige Wirkstoffkonzentration aufgetragen, wobei die Napabucasin-Konzentration 0,1 bis 1,5 μM und die Temozolomid-Konzentration 10 bis 25 μM beträgt.

4.1.4 Zellzyklus- und Apoptoseanalyse mittels Durchflusszytometrie nach Napabucasinbehandlung

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie nach 72-stündiger Napabucasinbehandlung sind exemplarisch für GBM0505611 (A-GBM) und SF188 (P-GBM) in Abbildung 20 und 21 dargestellt. Eine Behandlung mit Napabucasin über 72h führte dazu, dass 43% der GBM0505611 Zellpopulation apoptotisch wurden. Bei der DMSO-Behandlung waren es nur 2% der Zellpopulation. Ausserdem konnte gezeigt werden, dass 84% der mit DMSO-behandelten GBM0505611 Zellen, in die G1-Phase übergegangen waren. Bei den mit Napabucasin-behandelten Zellen waren es nur noch 48%. In die S-Phase waren 10%, der mit DMSO-behandelten Zellen nach 72 Stunden übergegangen, bei den mit Napabucasin-behandelten Zellen waren es 7%. In die G2-Phase waren 4%, der mit DMSO-behandelten Zellen nach 72 Stunden übergegangen, bei den mit Napabucasin-behandelten Zellen waren es 2%.

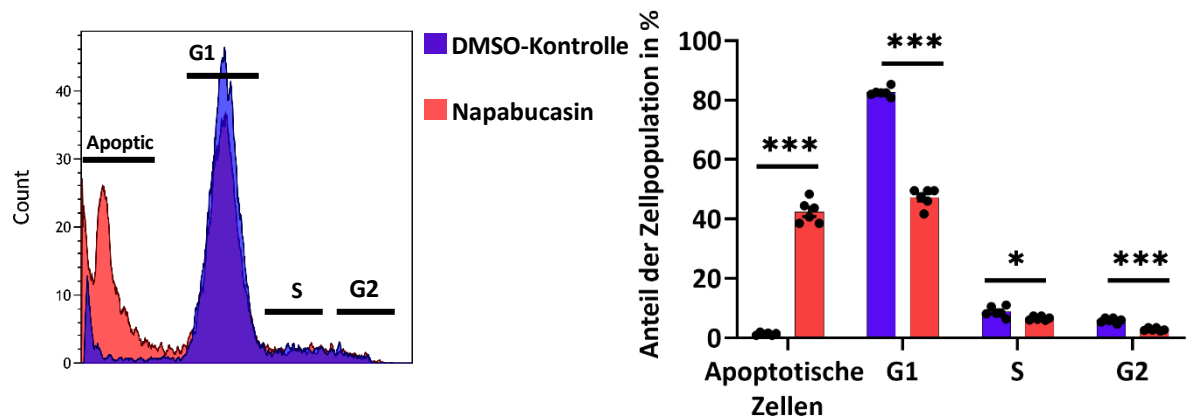


Abbildung 20: Zellzyklus- und Apoptoseanalyse mittels Durchflusszytometrie nach Napabucasin Behandlung in GBM0505611

GBM0505611 Zellen wurden entweder mit DMSO oder Napabucasin für 72 Stunden behandelt.

A Histogramm der jeweiligen Zellzyklusphasen nach DMSO (lila) oder Napabucasin-Behandlung (lachsfarben).

B. Anteil der Zellpopulation in Prozent.

Non-parametric t-Test, n=3

ns = nicht signifikant; * p< 0.05; ** p< 0.01; *** p< 0.001

Die 72-stündige Behandlung von SF188 mit Napabucasin zeigte keinen Unterschied in Zellzyklus und Apoptose im Vergleich zu der Kontrollbehandlung mit DMSO (Abbildung 21).

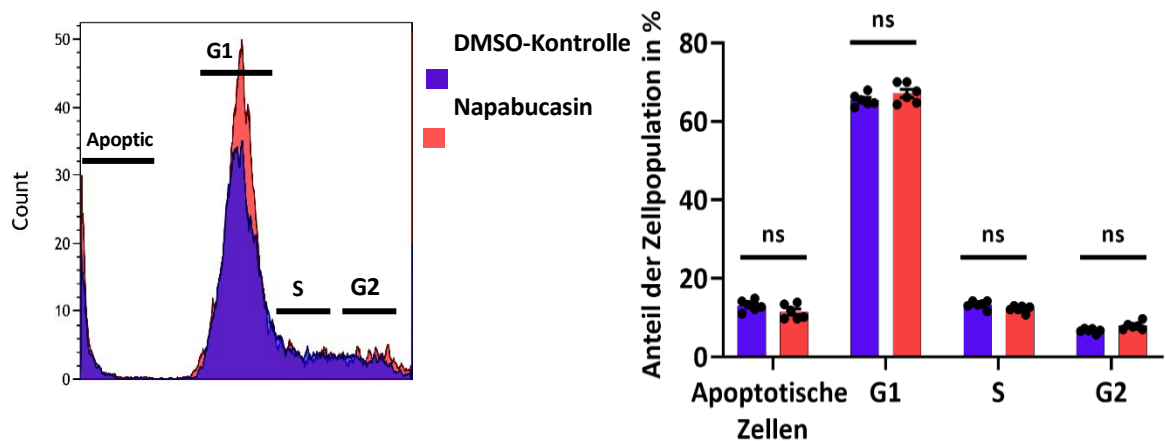


Abbildung 21: Zellzyklus- und Apoptoseanalyse mittels Durchflusszytometrie nach Napabucasin Behandlung in SF188.

SF188 Zellen wurden entweder mit DMSO oder Napabucasin für 72 Stunden behandelt.

A Histogramm der jeweiligen Zellzyklusphasen nach DMSO (lila) oder Napabucasin-Behandlung (lachsfarben).

B. Anteil der Zellpopulation in Prozent.

Non-parametric t-Test, n=3

ns = nicht signifikant.

4.2.1 Heatmapanalyse der Wirksspezifität von ausgewählten Inhibitoren auf Glioblastomzelllinien

Für die im Rahmen der Arbeit verwendeten Glioblastomzelllinien wurde eine Genpanel-Sequenzierung durch das Institut für Neuropathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf für 47 Gene durchgeführt (Tabelle S1). Auf die genauen Ergebnisse dieser Sequenzierungen wird hier nicht weiter im Detail eingegangen. Wichtig für die eigene Arbeit war aber, dass sich für eine Unterteilung der Zelllinien nach der DNA-Kopienzahl des *CCND1*-Gens ein interessantes Ergebnis zeigte. Es wurde eine Heatmap erstellt, um das Inhibitoransprechen je nach *CCND1*-Kopienzahl-Status darzustellen (Abbildung 22). Für die Heatmap wurden die Inhibitoren nach spezifischen Qualitätskriterien ausgewählt ($p \leq 0,05$ und eine Ratio der AUC von 1,2). Vertikal sind zwei Cluster zu erkennen, die sich durch Zelllinien (LN229, LN308, SF188) mit erhöhter *CCND1*-Kopienzahl und Zelllinien ohne diese Veränderung (GBM0505611, GBM67MF, speasGBM2, S4P CGBH2, AM-38, GS-2, YKG-1, S24, DBTRG-05-MG, KS-1, M059J) gliedern. Horizontal gliedert sich die Heatmap in zwei übergeordnete Cluster, wovon das obere Cluster Wirkstoffe umfasst, die in allen Zelllinien gleich stark wirksam sind. Das zweite Cluster gliedert sich in drei untergeordnete Cluster. In diesen drei Clustern befinden sich Wirkstoffe, die in Zelllinien mit *CCND1*-Kopienzahlgewinnen stärker wirken als in Zelllinien ohne diese Gewinne. Nedaplatin weist dabei die höchste Signifikanz, der in der Heatmap ausgewählten Wirkstoffe gegenüber Zelllinien mit *CCND1*-Kopienzahlgewinnen auf (Abbildung 22).

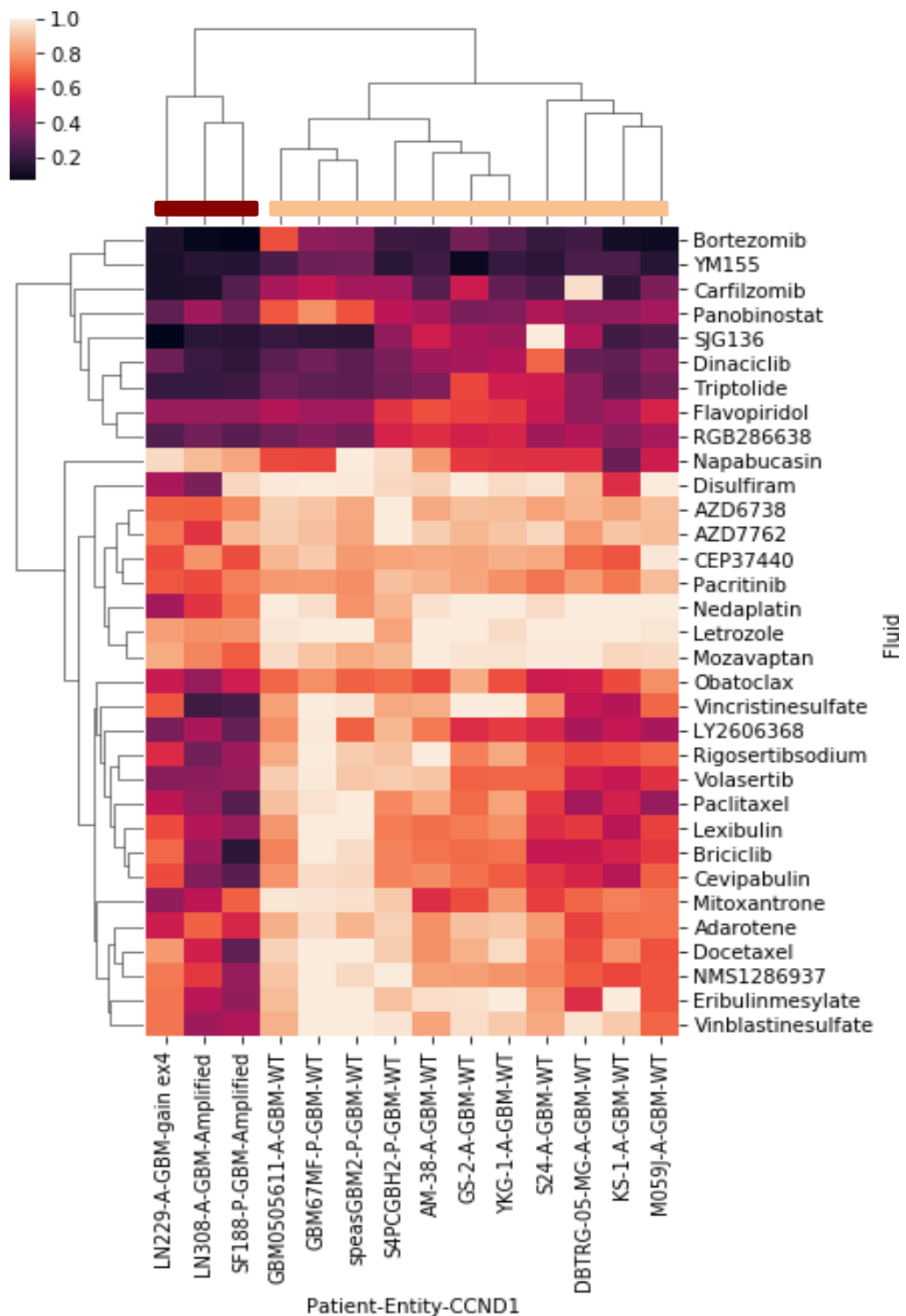
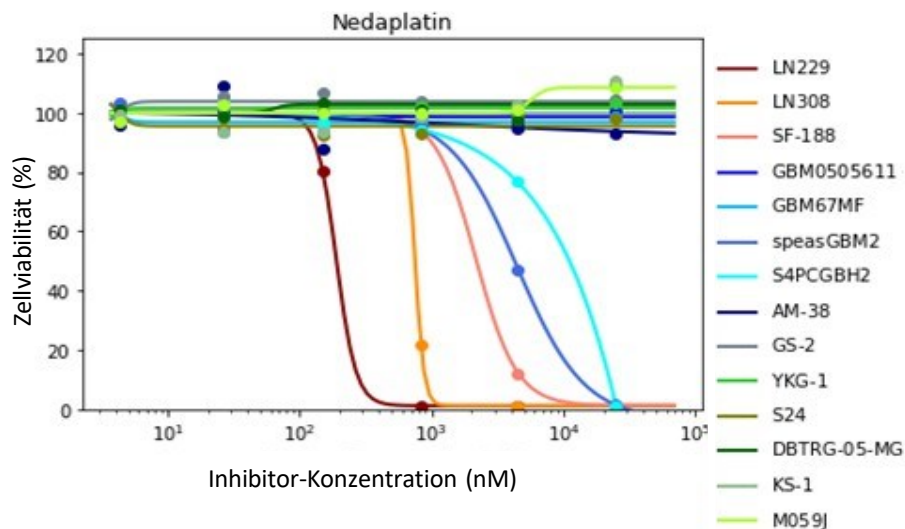


Abbildung 21: Heatmap für Inhibitoren Wirksamkeit im Bezug auf *CCND1* Status der Zelllinien.

Dargestellt sind unten Zelllinien mit erhöhter *CCND1*-Kopienzahl sowie Zelllinien vom Wildtyp (WT). Rechts die einzelnen Wirkstoffe. Links und Oben die Sortierung nach horizontalem bzw. vertikalem Cluster. Dunkelrote Färbung zeigt eine starke Reduktion der Zellviabilität, je heller die Färbung, desto geringer die Wirkung des jeweiligen Wirkstoffes.

4.2.2 Wirksamkeit von Nedaplatin in Abhängigkeit vom *CCND1*-Kopienzahlstatus

In Abbildung 23 wurden Glioblastomzelllinien mit erhöhter bzw. normaler *CCND1*-Kopienzahl innerhalb einer Dosis-Wirkungskurve gegenübergestellt. Dabei konnte das Ergebnis aus 4.2.1 bestätigt werden. Die Zelllinien LN229, LN308 und SF188 mit erhöhter *CCND1*-Kopienzahl (Anhang Tabelle S1) zeigten ein starkes Wirkansprechen auf Nedaplatin. Dabei war das Zellmodell LN229 am sensitivsten gegenüber einer Nedaplatinbehandlung (IC_{50} -Wert = 0,19 μ M). Für LN308 lag der IC_{50} -Wert bei 0,75 μ M und für SF188 bei 2,17 μ M. Die Zelllinien speasGBM2 und S4PCGBH2 zeigten dagegen IC_{50} -Werte von 4,44 und 43,7 μ M. Für alle anderen Zelllinien konnte kein IC_{50} -Wert ermittelt werden, d.h. diese erwiesen sich als resistent.



Zelllinie	IC_{50} in nM	<i>CCND1</i> -Status
LN229	189,69	erhöhte Kopienzahl
LN308	748,67	erhöhte Kopienzahl
SF188	2173,06	erhöhte Kopienzahl
speasGBM2	4442,85	Wildtyp
S4PCGBH2	43677,05	Wildtyp

Abbildung 22: Dosis-Wirkungskurve von Nedaplatin für Zelllinien mit erhöhter *CCND1*-Kopienzahl und Wildtyp-Zelllinien.

Dargestellt sind die Dosis-Wirkungskurven von drei Zelllinien mit erhöhter *CCND1*-Kopienzahl (LN229, LN308, SF188) in Rottönen mit elf Glioblastommodellen vom Wildtyp (GBM0505611, GBM67MF, speasGBM2, S4PCGBH2, AM-38, GS-2, YKG-1, S24, DBTRG-05-MG, KS-1, M059J) in Blautönen. Auf der y-Achse wird die Zellviabilität in Prozent und auf der x-Achse die Inhibitor-Konzentration in nM dargestellt. In der Tabelle darunter befinden sich die entsprechenden IC_{50} -Werte.

5. Diskussion

5.1 Die Identifikation neuartiger therapeutischer Ansätze durch die Hochdurchsatz-Medikamententestung

In den letzten zehn Jahren gab es wichtige Fortschritte bezüglich des Verständnisses der genetischen Veränderungen im Zusammenhang mit der Gliomgenese, doch bisher konnte dieses Wissen nicht in eine signifikante Verbesserung der Überlebenschance der Patienten umgesetzt werden und daher bleibt die Prognose für Patienten mit Glioblastomen auch heute noch infaust. Die fatale Prognose und die Nebenwirkungen der aktuellen Standardtherapie erhöhen den dringenden Bedarf nach neuen Therapiestrategien. In zahlreichen Fällen von Krebspatienten konnte HTDS bereits erfolgreich eingesetzt werden, um pharmakologisch genutzte und erforschte Substanzen innerhalb ihres Wirkspektrums für die Behandlung von Tumorerkrankungen zugänglich zu machen^{20–26}.

So ist es möglich neue Anwendungen eines etablierten Wirkstoffes innerhalb seines Wirkspektrums offen zu legen und einen direkten translationalen Übergang in die klinische Applikation zu schaffen. Da auch Wirkstoffe der Phasen I bis III innerhalb der verwendeten HTDS-Plattform getestet wurden, ergeben sich vielfältige Optionen für zukünftige experimentelle Therapiestrategien, bevor sie die klinische Etablierung erreichen.

Mit Hilfe des HTDS konnte im Rahmen dieser Arbeit eine besondere Sensitivität in Glioblastom-Zellkulturmodellen gegenüber Napabucasin im Vergleich zu Medulloblastom-Zellkulturmodellen und ATRT-Zellkulturmodellen detektiert werden (Tabelle 10).

Bei Napabucasin handelt es sich um einen oral verfügbaren niedermolekularen Inhibitor, der den STAT3-Signalweg inhibiert und sich dadurch negativ auf die CSC-Proliferation auszuwirken vermag⁴⁰. Neben der günstigen oralen Verfügbarkeit, zeigte sich Napabucasin in zahlreichen Studien nebenwirkungsarm und gut verträglich^{65,95–98}. In *in vivo* Modellen zeigte sich auch, dass Napabucasin die Blut-Hirn-Schranke passieren kann^{68,99}.

In mehreren aktuellen Phase I- bis Phase III-Studien wird Napabucasin als alleiniger Wirkstoff zur Behandlung von unterschiedlichen Tumorentitäten eingesetzt und zeigt bisher eine gute antikanzerogene Wirkung^{72,96,100}.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die antitumorale Wirkung von Napabucasin spezifisch in Glioblastom-Modellen gegenüber anderen Entitäten (Medulloblastom-Modellen und ATRT-Modellen) mit einer AUC von 0,64 bestätigt werden ($p < 0,001$; Tabelle 10). Aus der AUC für Glioblastomzellen und der AUC für andere Tumorzellen wurde eine Ratio gebildet, welche sich lediglich für Napabucasin < 1 darstellt, was

Napabucasin zum einzigen spezifischen Inhibitor für das *in vitro* Wachstum von Glioblastomzellen in der eigenen Studie macht ($p < 0,001$, Tabelle 10). Für Temozolomid (TMZ) beispielsweise konnte hingegen keine spezifische Wirkung auf Glioblastomzellen mit dem verwendeten *in vitro* Ansatz nachgewiesen werden (Abbildung 12), da TMZ in allen Zellmodellen gleichermaßen antitumoral wirkte.

Bei der Betrachtung der einzelnen Dosis-Wirkungskurven von Napabucasin für adulte und pädiatrische Glioblastomzelllinien zeigt sich mit einem IC₅₀ von 0,98 μM ein besseres Wirkansprechen in den adulten als in pädiatrischen Modellen mit einem IC₅₀ von 3,11 μM (Abbildung 14). Teilweise zeigt Napabucasin in pädiatrischen Gliomzellen sogar keine Wirkung (Abbildung 16). Dies könnte durch die kleinere Kohorte und durch die spezielle Tumorbilogie pädiatrischer hochgradiger Gliome zu erklären sein^{101–104}. Bei Betrachtung der Ergebnisse der Genpanel-Sequenzierung der verwendeten Gliomzelllinien (Tabelle S1) zeigte sich ein Unterschied in Bezug auf das Vorhandensein von Mutationen im *Telomerase Reverse Transkriptase (TERT)*-Promotor, die pädiatrischen Gliomzellen, in denen Napabucasin keine Wirkung zeigte, wiesen keine *TERT*-Promotormutationen auf, während die adulten Glioblastomzelllinien mit gutem Wirkansprechen alle *TERT*-Promotormutationen haben. Eine Studie an Patientenproben zeigte, dass Glioblastompatienten mit *TERT*-Promotor-mutierten Tumoren eher von einer alkylierenden Chemotherapie profitieren als Patienten, bei denen ein Glioblastom ohne *TERT*-Promotormutation vorliegt¹⁰⁵. Eine andere Studie konnte diesen Befund aber nicht reproduzieren¹⁰⁶. Normalgewebe hingegen wird von Napabucasin kaum beeinträchtigt⁴⁰, was im Rahmen der Arbeit anhand der fehlende Wirkung auf humane fetale Fibroblasten (HFF) bestätigt werden konnte. Humane Fibroblasten dienten als Vergleichskohorte des Inhibitoreffekts von Tumorzellen zu Normalgewebe^{107,108} (Abbildung 13).

Napabucasin wird in Phase I- bis III-Studien ebenfalls in Kombination mit den Chemo- bzw. Immuntherapeutika Paclitaxel, 5-FU, Irinotecan, Gemcitabin, Entinostat, Cisplatin, Bevacizumab, Permetrexed und Sorafenib bei der Behandlung zahlreicher Karzinome getestet und zeigt eine breite synergistische Wirkung^{73,77,109–114}. Aufgrund der aktuellen Studienlage wurden Synergismus-Experimente mit Napabucasin und in Kombination mit 5-FU, Entinostat, Gemcitabin, Paclitaxel, Irinotecan und Temozolomid durchgeführt. Temozolomid wurde ausgewählt, da es sich um die Standardtherapie von Glioblastomen handelt und Napabucasin in klinischen Studien eine verstärkte antitumorale Wirkung in Kombination mit Zytostatika aufwies^{46,114}.

Napabucasin zeigte in Kombination mit 5-FU, Entinostat, Gemcitabin, Paclitaxel, Irinotecan und Temozolomid unterschiedliche Wirkungen auf die untersuchten Gliomzelllinien

(Abbildung 17, 18 und 19), was sich durch verschiedene Wirkmechanismen der verwendeten Substanzen erklären lässt.

Zwischen Napabucasin und 5-FU zeigt sich der stärkste Synergismus bei hohen 5-FU-Konzentrationen von 17,5 μM und eher niedrigen Napabucasin-Konzentrationen von 0,1 bis 0,45 μM (Abbildung 17A). Napabucasin sensitiviert Tumorzellen für Chemotherapeutika^{110,113,115} und ermöglicht die Überwindung von Resistenzen durch Inhibition von Stammzellfaktoren^{116,117}. Ein möglicher Mechanismus dabei ist die Depletion der *Aldehyd-Dehydrogenasen* (*ALDH*)-Expression¹¹⁸. Zellen mit erhöhter *ALDH*-Expression zeigen sich resistenter gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika, so verspricht die Inhibition der *ALDH*-Expression einen therapeutischen Fortschritt durch Erhöhung der Effektivität von Krebstherapien^{115,119,120}.

Die synergistische Wirkung mit Entinostat¹²¹, einem Histon-Deacetylasen (HDAC)-Inhibitor, zeigt sich vor allem bei einer niedrigen Napabucasin-Konzentration von 0,1 μM sowie einer Entinostat-Konzentration von 7 μM (Abbildung 17B). Dieser Synergismus könnte auf der mit *STAT3*-Inhibitoren gemeinsamen inhibitorischen Wirkung auf myeloide Suppressorzellen begründet sein^{122–124}. Myeloide Suppressorzellen sind eine heterogene Population von unreifen myeloischen Zellen, die die angeborene und adaptive Immunität unterdrücken und ein günstiges Umfeld für wandernde Tumorzellen zur Metastasierung bilden können¹²⁵. Napabucasin wirkt durch die Bioaktivierung von Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) Chinon Oxidoreduktase 1 (NADPH quinone oxidoreductase 1, NQO1) sowie durch die Cytochrom-P450-Oxidoreduktase, wodurch reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) freigesetzt werden^{65–67}. Entinostat wirkt ebenfalls über eine ROS-Erhöhung¹¹⁸. Eine Erhöhung der ROS verursacht DNA-Schäden und hemmt den *STAT3*-Signalweg und die CSC-Proliferation⁶⁵.

Gemcitabin und Napabucasin zeigten starke synergistische Effekte bei einer Gemcitabin-Konzentration von 1,82 μM und Napabucasin-Konzentrationen von 0,1 bis 0,4 μM sowie 1,1 bis 1,5 μM (Abbildung 17C). Bei Gemcitabin handelt es sich um einen Pyrimidin-Antimetaboliten, der als Prodrug intrazellulär zu dem pharmakologisch aktiven Gemcitabintriphosphat metabolisiert wird. Gemcitabintriphosphat wird statt Cytidin in die DNA eingebaut, woraus eine Hemmung der DNA-Synthese resultiert, was die Apoptose induziert.¹²⁶ In Studien wurde die synergistische Wirkung von Gemcitabin und Napabucasin bisher nur in Kombination mit Albumin-gebundenem Paclitaxel getestet, wobei sich ein Synergismus zeigte^{77,95,109,127}. Die synergistische Wirkung von Napabucasin und Gemcitabin könnte aus reduzierten Leveln der Cytidin-Desaminase durch ROS-Erhöhung resultieren, was zu einer erhöhten Gemcitabin-Stabilität führt^{128,129}.

Der Synergismus mit Paclitaxel zeigte sich bei einer Paclitaxel-Konzentration von 17,5 μM und einer Napabucasin-Konzentration von 0,1 μM am stärksten (Abbildung 17D). Diese Wechselwirkung entsteht am ehesten durch die Herunterregulierung von MUC1, da Napabucasin den STAT3-MUC1-Signalweg inhibiert. In einer präklinischen Studie sensitivierte die Depletion von MUC1 die Zellen für Paclitaxel und hemmte die Sphärogenese, während eine hohe MUC1-Expression eine Paclitaxel-Resistenz verursachte⁷¹.

Die Kombination von Irinotecan und Napabucasin zeigte weder antagonistische noch synergistische Effekte (Abbildung 18). Irinotecan hemmt die Topoisomerase I, welche physiologisch den Scherungsstress des DNA-Doppelstrangs reduziert, lagert sich dem Komplex aus Topoisomerase I und DNA an und wirkt S-Phasen-spezifisch zytotoxisch¹³⁰. Die fehlende Wirkung der Kombination von Irinotecan und Napabucasin in der eigenen Arbeit lässt sich möglicherweise durch den Versuchsaufbau erklären. In zahlreichen Studien zeigte sich eine synergistische Wirkung von Napabucasin mit Irinotecan, allerdings meistens in der zusätzlichen Kombination mit 5-FU und Folinsäure, dem sogenannten FOLFIRI-Schema^{113,121,131,132}. Dabei wird Irinotecan in der Regel vor 5-FU verabreicht, da es dann eine deutlich bessere Wirkung zeigt und die Zellen für 5-FU sensitiviert^{133,134}. In einem *in vivo* Experiment konnte nachgewiesen werden, dass Irinotecan die Zellen in der S-Phase akkumuliert und dass eine höhere S-Phasen-Fraktion mit verbessertem Wirkansprechen auf Chemotherapie einhergeht^{134,135}. Eine Akkumulation der Zellen in der S-Phase ist nur möglich, wenn Irinotecan beispielsweise vor 5-FU verabreicht wird und nur dann zeigte sich auch ein verbessertes Wirkansprechen von 5-FU im Sinne eines Synergismus¹³⁴. Dies müsste in einem Versuch mit Glioblastom-Zelllinien nachvollzogen und analysiert werden, um mögliche synergistische Effekte von Napabucasin und Irinotecan aufzeigen zu können.

Für Temozolomid ließen sich in Kombination mit Napabucasin in niedrigen bis mittelhohen Temozolomid-Konzentrationen synergistische Effekte nachweisen. Dieser Synergismus zeigte sich bereits auch in *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten sowie einer klinischen Studie zu rezidierten Glioblastomen bei Erwachsenen^{75,99,136}. Der Wirkmechanismus von Temozolomid beruht auf Methylgruppen, die sich während der DNA-Replikation an Guanin an den Positionen O6 und N7 und an Adenin an der Position N3 anlagern. Dadurch wird zytotoxisches O6-Methylguanin, N7-Methylguanin und N3-Methyladenin gebildet, was zu fehlerhaften Basenpaaren führt. Durch die fehlerhaften Basenpaare kommt es zu Einzel- und Doppelstrang-DNA-Brüchen, die einen Zellzyklus-Arrest bei G2/M induzieren und schließlich zur Induktion der Apoptose führen.^{137,138}

Die primäre oder erworbene Temozolomid-Resistenz ist einer der Hauptgründe für das Behandlungsversagen in der Glioblastomtherapie¹³⁹. Diese Resistenz ist unter anderem durch die O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) begründet. MGMT repariert wichtige zytotoxische Läsionen wie das durch Temozolomid erzeugte O6-Methylguanin. Die Aktivität von MGMT wird durch CSC beeinflusst, was die Wirkstoffkombination mit einem Stammzellinhibitor wie Napabucasin interessant macht, um Resistenzen zu verringern oder gar zu überwinden.¹³⁸ Allerdings beeinflussen CSC nicht nur die MGMT-Aktivität, sondern tragen auch noch auf anderen Wegen zur Resistenzentwicklung bei, so gibt es auch Fälle von Glioblastomen, die keine MGMT-Aktivität aufweisen und sich dennoch resistent gegen Temozolomid zeigen. Diese Resistenzentwicklung liegt in den besonderen Eigenschaften der CSC begründet, da diese eine Schlüsselrolle in der Selbsterneuerung und Differenzierung in malignen Zellen spielen.^{140–142} Auch *in vivo* konnte bereits nachgewiesen werden, dass die Blockierung des STAT3-Signalweges durch Napabucasin die Wirkung von Temozolomid verstärkt¹³⁶. Eine Phase Ib/II-Studie an Patienten mit rezidivierenden Glioblastomen zeigte, dass Napabucasin in Kombination mit Temozolomid ein deutlich besseres Wirkansprechen als Temozolomid alleine aufwies und das Überleben verlängern konnte¹⁴³.

In der Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie konnte in unterschiedlichen Glioblastom-Zelllinien ein differentes Wirkansprechen von Napabucasin auf den Zellzyklus festgestellt werden. So induzierte die 72-stündige Napabucasinbehandlung in GBM0505611 in 43% der Zellen die Apoptose, bei der DMSO-Kontrollgruppe waren es hingegen nur 2%. Dementsprechend sind 84% der Zellen der DMSO-Kontrollgruppe in die G1-Phase übergegangen, während es unter Napabucasinbehandlung nur 48% waren (Abbildung 20). In *in vitro*-Experimenten konnte in Napabucasin-behandelten Glioblastomzelllinien auch nach 48 Stunden bereits eine Apoptoseinduktion nachgewiesen werden⁶⁸. Ebenso induziert Napabucasin dosisabhängig in Non-Hodgkin-Lymphomzellen, hepatozellulären Karzinomzellen (HCC) und kolorektalen Krebszellen *in vitro* Apoptose^{114,144}.

In kolorektalen Zellen wurden Apoptose-induzierende Faktoren wie p21, p53, Bid, Bax, Caspase 8, und Caspase 3 durch die Napabucasinbehandlung hoch- sowie anti-apoptotische Gene wie Bcl2 und Bcl-xL herunterreguliert¹⁴⁴. Die Steigerung von Caspase 3, 8 und 9 sowie die Erhöhung der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP)-Level durch Napabucasinbehandlung zeigte sich auch in Non-Hodgkin-Lymphomzellen sowie hepatozellulären Karzinomen (HCC)¹¹⁴. In Glioblastomzelllinien und HCC-Zellen konnte *in vitro* die Reduktion von STAT3-Leveln sowie von β -catenin, c-Myc, SOX2, Oktamer-

bindender Transkriptionsfaktor (OCT) 4, Nestin, CDK4 und Cyclin D1 und die Erhöhung von Caspase 3 und PARP nachgewiesen werden^{68,145}, was die Beobachtung des Zellzyklusarrests und auch die Induktion der Apoptose nach Napabucasin in dieser Arbeit bestätigt.

In der Zelllinie SF188 hingegen zeigte die 72-stündige Napabucasinbehandlung keinerlei Wirkung im Vergleich zur DMSO-Kontrollgruppe (Abbildung 21). Napabucasin zeigte jedoch auch im Zellviabilitätsassay in SF188 lediglich eine sehr geringe Wirkung (Abbildung 16). Mögliche Ursachen für das differente Wirkansprechen von Napabucasin in den Zelllinien könnten zum einen die biologischen Unterschiede sein, da es sich bei SF188 um eine pädiatrische Glioblastomzelllinie handelt und diese häufig gänzlich andere Mutationen aufweisen als adulte Glioblastome^{101–104,146}. Zum Anderen handelt es sich bei SF188 um eine gut etablierte Zelllinie, die bereits seit vielen Jahren verwendet wird^{147–149} und damit weniger Stammzellmarker aufweist, allerdings gleichzeitig eine Vielzahl von Mutationen zeigt¹⁴⁶. Die im Rahmen der Arbeit durchgeführte Panel-Sequenzierung (siehe Anhang) bestätigte die Vielzahl von Mutationen von SF188 im Vergleich zu GBM0505611. GBM0505611 weist lediglich Alterationen der Gene *EGFR*, *TERT*, *Cyclin-abhängiger Kinase Inhibitor 2A* (*Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A*, *CDNK2A*) und *TP53* auf. SF188 hingegen weist zwar ebenfalls Alterationen von *EGFR* und *TP53* auf, jedoch keine Veränderungen im *TERT*-Promoter und keine Verluste von *CDNK2A*. Zusätzlich sind genetische Alterationen in den Genen *NF1*, *CCND1*, *Neurotrophin Rezeptor Tyrosin Kinase 2* (*NTRK2*), *MDM4* und *CDK4* vorhanden.

Bei GBM0505611 handelt es sich um ein CSC-Modell, weshalb davon auszugehen ist, dass diese Zellen eine höhere Expression von Stammzellmarkern aufweisen, welche unter anderem als Angriffspunkt von Napabucasin dienen. Weiterhin sollte ein möglicher Einfluss eines serumhaltigen Mediums (SF188) auf das Experiment im Vergleich zu einem serumfreien Medium (GBM0505611) ebenfalls in Betracht gezogen werden^{150–152}. Eine Wiederholung der Durchflusszytometrie für SF188 unter serumfreien Kulturbedingungen könnte somit sinnvoll sein, um eine bessere Vergleichbarkeit zu ermöglichen.

5.2 Nedaplatin zeigt ein von der Kopienzahl des *CCND1*-Gens abhängiges Wirkansprechen in Glioblastomzellen

Bei Nedaplatin (cis-Diammin-Glycolatoplatin) handelt es sich um ein Cisplatin-Analogon. Es besitzt die gleichen Amin-Trägerliganden wie Cisplatin, aber eine Abgangsgruppe, welche aus einer fünfgliedrigen Ringstruktur besteht, in der Glykolat als zweizähniger Ligand an das Platinion gebunden ist¹⁵³ (Abbildung 24). Nedaplatin wurde 1983 entwickelt, um eine ähnliche Wirksamkeit wie Cisplatin zu gewährleisten, aber mit geringerer renaler und gastrointestinaler Toxizität¹⁵⁴. Nedaplatin bildet ähnlich wie Cisplatin reaktive Platinkomplexe, die an nukleophile Gruppen in der DNA binden, was zu Intra- und Interstrang-DNA-Quervernetzungen, Apoptose und Zelltod führt.^{155–157} Platinabkömmlinge weisen eine gute Blut-Hirn-Schranken-Permeabilität auf¹⁵⁸.

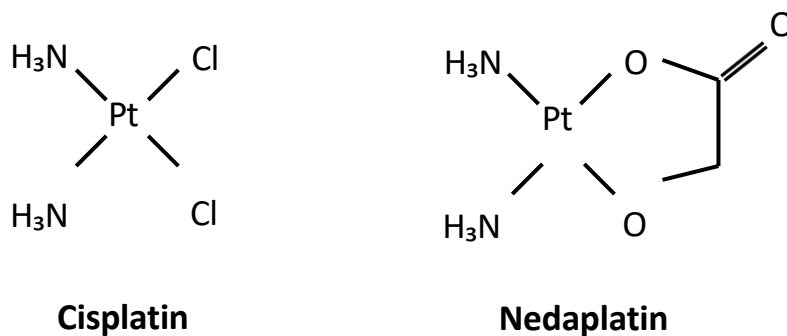


Abbildung 23: Die Strukturformeln von Cisplatin und Nedaplatin im Vergleich.

In zahlreichen Studien zeigte Nedaplatin alleinig oder als Kombinationstherapie mit anderen Chemotherapeutika eine vielversprechende antineoplastische Aktivität bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren, nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC), Ösophaguskarzinomen, Hodentumoren, Urothelkarzinomen, Peritonealkarzinomen, Tubenkarzinomen und Cervixkarzinomen^{155,157,159–167}. Zusätzlich erhöht die Nedaplatin-Gabe die Radiosensitivität von Tumorgewebe^{153,168}.

Auf Basis der Ergebnisse einer Genpanel-Sequenzierung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Glioblastomzelllinien (Tabelle S1) wurde für *CCND1* in drei Zelllinien (LN229, LN308 und SF188) eine erhöhte Genkopienzahl detektiert. Es wurde daraufhin eine Heatmap erstellt, um das Inhibitoransprechen je nach *CCND1*-Kopienzahlstatus

darzustellen. Dabei ergab sich ein Unterschied zwischen den Zelllinien mit erhöhter und den

Zelllinien mit nicht erhöhter *CCND1* Gendosis. Speziell zeigte Nedaplatin ein gutes Wirkansprechen in den Zelllinien mit erhöhter *CCND1* Kopienzahl und lediglich eine geringe Wirkung in den Zelllinien ohne diese Veränderung. Neben Nedaplatin zeigten Letrozol und Mozavaptan ein ähnliches aber deutlich schwächeres Wirkansprechen (Abbildung 22). Dieses unterschiedliche Wirkansprechen konnte bei Nedaplatin auch in der Dosis-Wirkungskurve detektiert werden (Abbildung 23). Die Zelllinien LN229, LN308 und SF188 mit erhöhter *CCND1* Kopienzahl zeigten ein Wirkansprechen für Nedaplatin, wohingegen die anderen Zelllinien kein Wirkansprechen zeigten. Lediglich die Zelllinie SpeasGBM2 wies einen IC50-Wert von 4,4 µM und zeigte damit ein deutlich geringeres Wirkansprechen für Nedaplatin. Die Ursache für das Wirkansprechen von Nedaplatin in SpeasGBM2 ließ sich im Rahmen dieser Arbeit nicht erklären. Unter anderem könnten die zahlreichen genetischen Alterationen in SpeasGBM2, u.a. in den Genen *EGFR*, *PMS2*, *TERT*, *TP53*, *PDGFRA* und *KRAS* daran beteiligt sein. Eine Wiederholung des Experiments wäre zur weiteren Validierung des Ergebnisses nötig.

Bei *CCND1* handelt es sich um ein Proto-Onkogen, welches das Protein Cyclin D1 kodiert. Cyclin D zeigt sich in vielen Tumorentitäten fehlreguliert und ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert. So führt eine Überexpression von Cyclin D zur Reduktion der Chemosensitivität, vermehrter Angiogenese und Resistenzentwicklung⁶⁰. In Glioblastomen führt die Cyclin D-Überexpression zu erhöhter Proliferation⁶². Eine Herunterregulation führt zu einer erhöhten Sensitivität für Temozolomid⁶⁴. Aufgrund der Rolle, die *CCND1* in der Tumorigenese spielt, stellt sich Nedaplatin als vielversprechendes additives Chemotherapeutikum dar, welches beispielsweise mit Temozolomid kombiniert werden könnte und zusätzlich die Radiosensitivität erhöht^{153,168}. In der Kombination mit Temozolomid wirken Platine über die Reduktion der intrazellulären MGMT-Konzentration synergistisch^{169,170}, da eine erhöhte MGMT-Expression Resistenzen gegen Temozolomid bedingt^{171,172}. Zur weiteren Validierung sollte die Wirkung von Nedaplatin in Abhängigkeit von der *CCND1* Gendosis und Expression in einer unabhängigen Kohorte untersucht werden.

5.5 Limitationen der Arbeit

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) dient sowohl als entscheidende Schnittstelle für den Austausch von Nährstoffen, Gasen und Metaboliten zwischen Blut und Gehirn, als auch als Barriere für neurotoxische Bestandteile des Plasmas und Xenobiotika¹⁷³. Damit stellt sie das Haupthindernis für die Medikamentenpassage in das Hirnparenchym dar. In den letzten vier Jahrzehnten wurden Zellkulturmodelle entwickelt, um eine Simulation der BHS *in vitro* zu ermöglichen.^{174,175} In einem typischen *in vitro*-Modell, wie es im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, ist eine Simulation der BHS jedoch nicht möglich. Dies erschwert den translationalen Einsatz des HTDS, da ein Medikament mit gutem Wirkansprechen *in vitro*, in einem *in vivo*-Modell bzw. in Patienten eventuell gar nicht erst die BHS zu passieren vermag, auch wenn die Tumoren die Funktionalität der BHS in der Regel beeinträchtigen¹⁷⁶. Weiterhin stellt die Translation einer Entdeckung *in vitro* zu einer vergleichbaren Wirksamkeit *in vivo* eine allseits bekannte Limitation dar. Vorteil der HTDS-Plattform ist die Verwendung von Wirkstoffen, die teilweise bereits klinisch etabliert oder in fortgeschrittenen Patientenstudien in Verwendung sind. So besteht die Möglichkeit *in vivo*-Versuche am Tier zu präferieren und einen beschleunigten Zugang in die Anwendung am Patienten zu finden.

Eine weitere Limitation ist die Verwendung von *in vitro* Zellkulturmodellen. Durch Langzeitkultivierung von Zelllinien ist es möglich, dass einige Eigenschaften des ursprünglichen Gewebes, aus dem sie isoliert wurden, verloren gehen. Gerade bei der Untersuchung von Glioblastomen spielen Stammzellfaktoren eine tragende Rolle^{34,41,139,177–179}, welche bei längerer Kultivierung abnehmen können^{180,181}. Außerdem kann serielles Passagieren zu genotypischen und phänotypischen Variationen in Zelllinien führen¹⁸².

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, mit einer größeren Kohorte von *in vitro*-Modellen (n=25) Zelllinien-spezifische Einzeleffekte zu minimieren. Dennoch müsste man die Kohortegrößen erhöhen, um die zahlreichen unterschiedlichen Mutationen von Glioblastomen im Ganzen mit einbeziehen zu können. So waren Mutationen, wie zum Beispiel die in pädiatrischen malignen Gliomen wie den diffusen Mittelliniengliomen mit H3-K27-Alteration und den diffusen hemisphärischen Gliomen mit H3-G34-Mutation Histon-3-Mutationen nicht ausreichend in dem untersuchten Panel von Zelllinien repräsentiert. Dies macht eine Auswertung der Wirkstoffe hinsichtlich eines mutationsspezifischen Wirkansprechens schwieriger, obwohl es sich dabei um einen sehr vielversprechenden Ansatz handelt.

5.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Definition der personalisierten Medizin umfasst die Anpassung der medizinischen Behandlung an die individuellen Charakteristika jedes Patienten, um so die Individuen in Subpopulationen zu klassifizieren, die sich in ihrem Ansprechen auf eine bestimmte Behandlung unterscheiden¹⁸³. Neue Erkenntnisse über die den Tumoren zu Grunde liegenden molekularen Veränderungen eröffnen neue Behandlungsmöglichkeiten durch einen zielgerichteten Angriff mit neuen Substanzklassen. Diese Ansätze haben zur selektiveren Therapie maligner Zellen und einer Minimierung der Nebenwirkungen geführt¹⁸⁴. Aktuelle Beispiele für personalisierte oder zielgerichtete Therapien sind die Behandlung von BRAF-mutierten malignen Melanomen mit *BRAF*-Inhibitoren, wofür Vemurafenib oder Dabrafenib angewendet werden¹⁸⁵, sowie die Therapie von Mammakarzinomen, wobei der Hormonrezeptorstatus entscheidend für die entsprechende Behandlung ist. So weist ein Mammakarzinom mit Positivität für den humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor 2 (HER2)/Neu ein gutes Wirkansprechen auf Trastuzumab auf¹⁸⁶. HTDS stellt dabei eine vielversprechende Möglichkeit auf dem Pfad zur personalisierten Medizin dar. Es ermöglicht den Einsatz von bereits klinisch etablierten Medikamenten in anderen Malignomen sowie den vereinfachten Zugang zur Testung von experimentellen Wirkstoffen in speziellen Entitäten. Darüber hinaus lassen sich über ausreichend große Kohorten sowohl entitätsspezifische sowie auch mutationsspezifische Wirkstoffe identifizieren und gewähren über die Entdeckung neuer Korrelationen einen besseren Einblick in die Tumorbilogie. Besonders zu erwähnen ist die Möglichkeit des translationalen Ansatzes im Zuge des HTDS. So ist es nicht nur möglich Zellmodelle insgesamt auf die Wirksamkeit eines breiten Spektrums von Inhibitoren zu untersuchen, sondern auch die Testung primärer Patientenproben ist mit dem Verfahren möglich. Daraus kann dann unter Umständen eine entsprechende Änderung im Therapieregime resultieren und besonders Patienten mit einer Ultima Ratio Situation noch die Chance auf eine Lebensverlängerung ermöglichen.

Dennoch sind auch die Möglichkeiten des HTDS besonders in Bezug auf die Untersuchung von Hirntumoren begrenzt. Es ist weder die Bluthirnschranke simulierbar, noch sind die *in vitro*-Ergebnisse auf die *in vivo* Wirkung direkt übertragbar. So bleiben Experimente *in vivo* auch auf dem Weg in Richtung personalisierter Medizin weiterhin unabdingbar.

Wirkstoffe wie Napabucasin und Nedaplatin könnten in der Zukunft als „Add-ons“ zur Standardtherapie nicht nur bei Glioblastomen eine Rolle spielen. Gerade Entitäten mit einer solch infausten Prognose und starker Resistenzentwicklung machen synergistisch wirksame

Medikamente mit einem günstigen Nebenwirkungsprofil und entsprechender, bereits bestehender Studienlage besonders interessant. Die Zukunft der Glioblastomtherapie wird sicherlich neben den CSC als Zielstruktur auf einem mutationsspezifischen Ansatz basieren.

Die Krebstherapie wird zunehmend individueller und zielgerichteter. Der Trend scheint in Richtung umfassender Datenanalysen, am besten eines ganzen Patientengenoms, -transkriptoms und -proteoms zu gehen, um dann für jeden Patienten eine individuelle Therapie zu entwickeln, welche ideal auf Mutationsmuster sowie die Tumorbiologie abgestimmt ist und damit hoffentlich eine bessere Wirkung und eventuell sogar Heilung ermöglicht.

6. Literaturverzeichnis

1. Davis, M. E. Glioblastoma: Overview of disease and treatment. *Clin. J. Oncol. Nurs.* **20**, 1–8 (2016).
2. Alifieris, C. & Trafalis, D. T. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacol. Ther.* **152**, 63–82 (2015).
3. TAMIMI, A. F. & JUWEID, M. Epidemiology and Outcome of Glioblastoma. in *Glioblastoma* 143–153 (Codon Publications, 2017). doi:10.15586/codon.glioblastoma.2017.ch8.
4. Louis, D. N. *et al.* The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro. Oncol.* **23**, 1231–1251 (2021).
5. Louis, D. N. *et al.* The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* **131**, 803–820 (2016).
6. Herrlinger, U. *et al.* Lomustine-temozolomide combination therapy versus standard temozolomide therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CeTeG/NOA-09): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* **393**, 678–688 (2019).
7. Zhao, B. *et al.* Comparative efficacy and safety of therapeutics for elderly glioblastoma patients: A Bayesian network analysis. *Pharmacol. Res.* **182**, 106316 (2022).
8. Green, A. L. *et al.* Tumor treating fields in pediatric high-grade glioma. *Child's Nerv. Syst.* **33**, 1043–1045 (2017).
9. Liu, D. *Tumors and Cancers. Tumors and Cancers: Central and Peripheral Nervous Systems* (CRC Press, 2017). doi:10.1201/9781315120522.
10. Wu, L. M. N. *et al.* Programming of Schwann Cells by Lats1/2-TAZ/YAP Signaling Drives Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumorigenesis. *Cancer Cell* **33**, 292–308.e7 (2018).
11. Friedrich, C. *et al.* Tropomyosin receptor kinase C (TrkC) expression in medulloblastoma: relation to the molecular subgroups and impact on treatment response. *Child's Nerv. Syst.* **33**, 1463–1471 (2017).
12. Niklison-Chirou, M. V. *et al.* TAp73 is a marker of glutamine addiction in

- medulloblastoma. *Genes Dev.* **31**, 1738–1753 (2017).
13. Conduit, S. E. *et al.* A compartmentalized phosphoinositide signaling axis at cilia is regulated by INPP5E to maintain cilia and promote Sonic Hedgehog medulloblastoma. *Oncogene* **36**, 5969–5984 (2017).
 14. Delaidelli, A. *et al.* MYCN amplified neuroblastoma requires the mRNA translation regulator eEF2 kinase to adapt to nutrient deprivation. *Cell Death Differ.* **24**, 1564–1576 (2017).
 15. Gholamin, S. *et al.* Disrupting the CD47-SIRP α anti-phagocytic axis by a humanized anti-CD47 antibody is an efficacious treatment for malignant pediatric brain tumors. *Sci. Transl. Med.* **9**, (2017).
 16. van den Bruck, R. *et al.* Abstracts of the 52nd Workshop for Pediatric Research. *Mol. Cell. Pediatr.* **4**, 5 (2017).
 17. Thompson, E. M. *et al.* The role of angiogenesis in Group 3 medulloblastoma pathogenesis and survival. *Neuro. Oncol.* **19**, 1217–1227 (2017).
 18. Reifenberger, G., Wirsching, H.-G., Knobbe-Thomsen, C. B. & Weller, M. Advances in the molecular genetics of gliomas — implications for classification and therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **14**, 434–452 (2017).
 19. Mayr, L. M. & Bojanic, D. Novel trends in high-throughput screening. *Curr. Opin. Pharmacol.* **9**, 580–588 (2009).
 20. Marquardt, V. *et al.* MEDU-20. HDAC AND NF κ B ANTAGONISTS SYNERGISTICALLY INHIBIT GROWTH OF MYC-DRIVEN MEDULLOBLASTOMA. *Neuro. Oncol.* **21**, ii107–ii107 (2019).
 21. Marquardt, V. *et al.* TRTH-28. HIGH THROUGHPUT SCREENING OF NOVEL HISTONE DEACETYLASE INHIBITORS FOR EPIGENETIC THERAPY OF PRIMARY BRAIN TUMORS. *Neuro. Oncol.* **19**, iv57–iv58 (2017).
 22. Nobre, L. *et al.* Effective and safe tumor inhibition using vinblastine in medulloblastoma. *Pediatr. Blood Cancer* **66**, e27694 (2019).
 23. Halvorson, K. G. *et al.* A High-Throughput In Vitro Drug Screen in a Genetically Engineered Mouse Model of Diffuse Intrinsic Pontine Glioma Identifies BMS-754807 as a Promising Therapeutic Agent. *PLoS One* **10**, e0118926 (2015).
 24. Chauvin, C. *et al.* High-Throughput Drug Screening Identifies Pazopanib and

- Clofilium Tosylate as Promising Treatments for Malignant Rhabdoid Tumors. *Cell Rep.* **21**, 1737–1745 (2017).
25. Brandish, P. E. *et al.* A Cell-Based Ultra-High-Throughput Screening Assay for Identifying Inhibitors of D-Amino Acid Oxidase. *SLAS Discov.* **11**, 481–487 (2006).
 26. Pauck, D. *et al.* EPEN-08. PHARMACOGENOMICS REVEALS ERBB2 AS A THERAPEUTIC TARGET IN PRIMARY EPENDYMOMA CULTURES. *Neuro. Oncol.* **21**, ii78–ii79 (2019).
 27. Maciacyk, D. *et al.* CBF1 is clinically prognostic and serves as a target to block cellular invasion and chemoresistance of EMT-like glioblastoma cells. *Br. J. Cancer* **117**, 102–112 (2017).
 28. Selt, F. *et al.* Establishment and application of a novel patient-derived KIAA1549:BRAF-driven pediatric pilocytic astrocytoma model for preclinical drug testing. *Oncotarget* **8**, 11460–11479 (2017).
 29. Dick, J. E. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* **112**, 4793–4807 (2008).
 30. Clarke, M. F. *et al.* Cancer Stem Cells—Perspectives on Current Status and Future Directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells. *Cancer Res.* **66**, 9339–9344 (2006).
 31. Oliveira, L., Castilho-Fernandes, A. & Ribeiro-Silva, A. Stem Cells and Cancer Stem Cells. in *Cancer Stem Cells - The Cutting Edge* vol. 11 03–28 (InTech Open Access Publisher, 2011).
 32. Buczacki, S. Cancer Stem Cells. in *Encyclopedia of Cell Biology* 807–812 (Elsevier, 2016). doi:10.1016/B978-0-12-394447-4.30119-5.
 33. Gao, J.-X. Stem Cells Review Series: Cancer stem cells: the lessons from pre-cancerous stem cells. *J. Cell. Mol. Med.* **12**, 67–96 (2007).
 34. Lobo, N. A., Shimono, Y., Qian, D. & Clarke, M. F. The Biology of Cancer Stem Cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **23**, 675–699 (2007).
 35. Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. & Weissman, I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**, 105–111 (2001).
 36. Zhang, S. *et al.* Identification and Characterization of Ovarian Cancer-Initiating Cells from Primary Human Tumors. *Cancer Res.* **68**, 4311–4320 (2008).

37. Vermeulen, L. *et al.* Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat. Cell Biol.* **12**, 468–476 (2010).
38. Hernández-Vargas, H. *et al.* Methylome analysis reveals Jak-STAT pathway deregulation in putative breast cancer stem cells. *Epigenetics* **6**, 428–439 (2011).
39. Xia, P. & Xu, X.-Y. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in cancer stem cells: from basic research to clinical application. *Am. J. Cancer Res.* (2015).
40. Li, Y. *et al.* Suppression of cancer relapse and metastasis by inhibiting cancer stemness. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 1839–1844 (2015).
41. Singh, S. K. *et al.* Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* **432**, 396–401 (2004).
42. Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J. & Clarke, M. F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 3983–3988 (2003).
43. Mani, S. A. *et al.* The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell* **133**, 704–715 (2008).
44. Yao, D., Dai, C. & Peng, S. Mechanism of the Mesenchymal–Epithelial Transition and Its Relationship with Metastatic Tumor Formation. *Mol. Cancer Res.* **9**, 1608–1620 (2011).
45. Fabregat, I., Malfettone, A. & Soukupova, J. New Insights into the Crossroads between EMT and Stemness in the Context of Cancer. *J. Clin. Med.* **5**, 37 (2016).
46. Hubbard, J. M. & Grothey, A. Napabucasin: An Update on the First-in-Class Cancer Stemness Inhibitor. *Drugs* **77**, 1091–1103 (2017).
47. Dean, M. ABC Transporters, Drug Resistance, and Cancer Stem Cells. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **14**, 3–9 (2009).
48. Chen, K., Huang, Y. & Chen, J. Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges. *Acta Pharmacol. Sin.* **34**, 732–740 (2013).
49. Teng, Y. D., Wang, L., Kabatas, S., Ulrich, H. & Zafonte, R. D. Cancer Stem Cells or Tumor Survival Cells? *Stem Cells Dev.* **27**, 1466–1478 (2018).
50. Beachy, P. A., Karhadkar, S. S. & Berman, D. M. Tissue repair and stem cell

- renewal in carcinogenesis. *Nature* **432**, 324–331 (2004).
51. Levy, D. E. & Lee, C. What does Stat3 do? *J. Clin. Invest.* **109**, 1143–1148 (2002).
 52. Yu, H., Lee, H., Herrmann, A., Buettner, R. & Jove, R. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 736–746 (2014).
 53. Bromberg, J. F. *et al.* Stat3 as an Oncogene. *Cell* **98**, 295–303 (1999).
 54. Hirano, T., Ishihara, K. & Hibi, M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene* **19**, 2548–2556 (2000).
 55. Bromberg, J. & Darnell, J. E. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* **19**, 2468–2473 (2000).
 56. Zhang, F., Li, C., Halfter, H. & Liu, J. Delineating an oncostatin M-activated STAT3 signaling pathway that coordinates the expression of genes involved in cell cycle regulation and extracellular matrix deposition of MCF-7 cells. *Oncogene* **22**, 894–905 (2003).
 57. Hubbard, J. M. & Grothey, A. Napabucasin: An Update on the First-in-Class Cancer Stemness Inhibitor. *Drugs* **77**, 1091–1103 (2017).
 58. Kamran, M. Z., Patil, P. & Gude, R. P. Role of STAT3 in Cancer Metastasis and Translational Advances. *Biomed Res. Int.* **2013**, 1–15 (2013).
 59. CCND1 Gene - GeneCards | CCND1 Protein | CCND1 Antibody.
<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CCND1>.
 60. Kornmann, M., Arber, N. & Korc, M. Inhibition of basal and mitogen-stimulated pancreatic cancer cell growth by cyclin D1 antisense is associated with loss of tumorigenicity and potentiation of cytotoxicity to cisplatin. *J. Clin. Invest.* **101**, 344–352 (1998).
 61. Tashiro, E., Tsuchiya, A. & Imoto, M. Functions of cyclin D1 as an oncogene and regulation of cyclin D1 expression. *Cancer Sci.* **98**, 629–635 (2007).
 62. Cemeli, T. *et al.* Cytoplasmic cyclin D1 regulates glioblastoma dissemination. *J. Pathol.* **248**, 501–513 (2019).

63. Chen, L., Lin, L., Xian, N. & Zheng, Z. Annexin A2 regulates glioma cell proliferation through the STAT3-cyclin D1 pathway. *Oncol. Rep.* **42**, 399–413 (2019).
64. Zhang, D. *et al.* Inhibition of Cyclin D1 Expression in Human Glioblastoma Cells is Associated with Increased Temozolomide Chemosensitivity. *Cell. Physiol. Biochem.* **51**, 2496–2508 (2018).
65. Froeling, F. E. M. *et al.* Bioactivation of Napabucasin Triggers Reactive Oxygen Species–Mediated Cancer Cell Death. *Clin. Cancer Res.* **25**, 7162–7174 (2019).
66. Nagaraju, G. P. *et al.* Napabucasin (BBI 608), a potent chemoradiosensitizer in rectal cancer. *Cancer* **126**, 3360–3371 (2020).
67. Guo, G. *et al.* NQO1 is a determinant for cellular sensitivity to anti-tumor agent Napabucasin. *Am. J. Cancer Res.* (2020).
68. Han, D. *et al.* Napabucasin, a novel STAT3 inhibitor suppresses proliferation, invasion and stemness of glioblastoma cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **38**, 289 (2019).
69. Zhang, Y. *et al.* Suppression of prostate cancer progression by cancer cell stemness inhibitor napabucasin. *Cancer Med.* **5**, 1251–1258 (2016).
70. Lee, T. K. W. *et al.* CD24⁺ Liver Tumor-Initiating Cells Drive Self-Renewal and Tumor Initiation through STAT3-Mediated NANOG Regulation. *Cell Stem Cell* **9**, 50–63 (2011).
71. Rogoff, H. A., Li, J. & Li, C. Abstract 4777: Cancer stemness and resistance: Napabucasin (BBI-608) sensitizes stemness-high cancer cells to Paclitaxel by inhibiting the STAT3-MUC1 pathway. *Cancer Res.* **77**, 4777–4777 (2017).
72. Kawazoe, A. *et al.* Phase 1 study of napabucasin, a cancer stemness inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **85**, 855–862 (2020).
73. Garcia, A. A. *et al.* A phase Ib/II study of cancer stemness inhibitor napabucasin (BB608) combined with weekly paclitaxel in platinum-resistant ovarian cancer. *J. Clin. Oncol.* **34**, 5578–5578 (2016).
74. Becerra, C. *et al.* Phase Ib/II study of cancer stem cell (CSC) inhibitor BBI608 combined with paclitaxel in advanced gastric and gastroesophageal junction (GEJ) adenocarcinoma. *J. Clin. Oncol.* **33**, 4069–4069 (2015).

75. Chi, A., DeRobles, P., Foos, E., Hitron, M. & Mason, W. CTNI-45. A PHASE 1B/2 CLINICAL STUDY OF NAPABUCASIN IN COMBINATION WITH TEMOZOLOMIDE FOR ADULT PATIENTS WITH RECURRENT OR PROGRESSED GLIOBLASTOMA MULTIFORME (GBM). *Neuro. Oncol.* **22**, ii52–ii52 (2020).
76. Shah, M. A. *et al.* The BRIGHTER trial: A phase III randomized double-blind study of BBI-608 + weekly paclitaxel versus placebo (PBO) + weekly paclitaxel in patients (pts) with pretreated advanced gastric and gastro-esophageal junction (GEJ) adenocarcinoma. *J. Clin. Oncol.* **34**, TPS4144–TPS4144 (2016).
77. Sonbol, M. B. *et al.* CanStem111P trial: a Phase III study of napabucasin plus nab-paclitaxel with gemcitabine. *Futur. Oncol.* **15**, 1295–1302 (2019).
78. Jonker, D. J. *et al.* Napabucasin versus placebo in refractory advanced colorectal cancer: a randomised phase 3 trial. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **3**, 263–270 (2018).
79. Pauck, D. *et al.* EPEN-34. HIGH-THROUGHPUT DRUG SCREENING OF PRIMARY CULTURES REVEALS IRREVERSIBLE ERBB2 INHIBITION AS NOVEL THERAPEUTIC VULNERABILITY OF EPENDYMOMAS. *Neuro. Oncol.* **20**, i80–i80 (2018).
80. Selt, F. *et al.* Establishment and application of a novel patient-derived KIAA1549:BRAF-driven pediatric pilocytic astrocytoma model for preclinical drug testing. *Oncotarget* **8**, 11460–11479 (2017).
81. Yin, J., Howe, J. & Tan, K. S. W. Staurosporine-induced programmed cell death in Blastocystis occurs independently of caspases and cathepsins and is augmented by calpain inhibition. *Microbiology* **156**, 1284–1293 (2010).
82. Bertrand, R., Solary, E., O'Connor, P., Kohn, K. W. & Pommier, Y. Induction of a Common Pathway of Apoptosis by Staurosporine. *Exp. Cell Res.* **211**, 314–321 (1994).
83. Belmokhtar, C. A., Hillion, J. & Ségal-Bendirdjian, E. Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Oncogene* **20**, 3354–3362 (2001).
84. Hutchinson, D. Staurosporine. in *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference* 1 (Elsevier, 2007). doi:10.1016/B978-008055232-3.63141-1.
85. Sebaugh, J. L. Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharm. Stat.* **10**, 128–134 (2011).

86. Li, M. *et al.* ICECAP: An Integrated, General-Purpose, Automation-Assisted IC50/EC50 Assay Platform. *SLAS Technol.* **20**, 32–45 (2015).
87. Ma, H., Bandos, A. I. & Gur, D. On the use of partial area under the ROC curve for comparison of two diagnostic tests. *Biometrical J.* **57**, 304–320 (2015).
88. Kumar, R. & Indrayan, A. Receiver operating characteristic (ROC) curve for medical researchers. *Indian Pediatr.* **48**, 277–287 (2011).
89. Di Veroli, G. Y. *et al.* Combenefit: an interactive platform for the analysis and visualization of drug combinations. *Bioinformatics* **32**, 2866–2868 (2016).
90. Strober, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr. Protoc. Immunol.* **111**, (2015).
91. Weyermann, J., Lochmann, D. & Zimmer, A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int. J. Pharm.* **288**, 369–376 (2005).
92. Pozarowski, P. & Darzynkiewicz, Z. Analysis of Cell Cycle by Flow Cytometry. in *Checkpoint Controls and Cancer* 301–312 (Humana Press, 2004). doi:10.1385/1-59259-811-0:301.
93. Wallen, C. A., Higashikubo, R. & Dethlefsen, L. A. Comparison of two flow cytometric assays for cellular RNA—acridine orange and propidium iodide. *Cytometry* **3**, 155–160 (1982).
94. Westh, P. Preferential interaction of dimethyl sulfoxide and phosphatidyl choline membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1664**, 217–223 (2004).
95. El-Rayes, B. F. *et al.* A phase Ib extension study of cancer stemness inhibitor BB608 (napabucasin) in combination with gemcitabine and nab-paclitaxel (nab-PTX) in patients (pts) with metastatic pancreatic cancer. *J. Clin. Oncol.* **34**, 4128–4128 (2016).
96. Jonker, D. J. *et al.* Napabucasin versus placebo in refractory advanced colorectal cancer: a randomised phase 3 trial. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **3**, 263–270 (2018).
97. El-Rayes, B. F. *et al.* BBI608-503-103HCC: A phase Ib/II clinical study of napabucasin (BBI608) in combination with sorafenib or amcasertib (BBI503) in combination with sorafenib (Sor) in adult patients with hepatocellular carcinoma (HCC). *J. Clin. Oncol.* **35**, 4077–4077 (2017).

98. O’Neil, B. H. *et al.* Phase 1b extension study of cancer stemness inhibitor BB608 (napabucasin) administered in combination with FOLFIRI +/- bevacizumab (Bev) in patients (pts) with advanced colorectal cancer (CRC). *J. Clin. Oncol.* **34**, 3564–3564 (2016).
99. Mason, W. P. *et al.* BBI608-201GBM: A phase Ib/II clinical study of napabucasin (BBI608) in combination with temozolomide (TMZ) for adult patients with recurrent glioblastoma (GBM). *J. Clin. Oncol.* **35**, e13525–e13525 (2017).
100. Jonker, D. J. *et al.* A randomized phase III study of napabucasin [BBI608] (NAPA) vs placebo (PBO) in patients (pts) with pretreated advanced colorectal cancer (ACRC): the CCTG/AGITG CO.23 trial. *Ann. Oncol.* **27**, vi150 (2016).
101. Paugh, B. S. *et al.* Integrated Molecular Genetic Profiling of Pediatric High-Grade Gliomas Reveals Key Differences With the Adult Disease. *J. Clin. Oncol.* **28**, 3061–3068 (2010).
102. Rizzo, D. *et al.* Molecular Biology in Pediatric High-Grade Glioma: Impact on Prognosis and Treatment. *Biomed Res. Int.* **2015**, 1–10 (2015).
103. Jones, C. *et al.* Pediatric high-grade glioma: biologically and clinically in need of new thinking. *Neuro. Oncol.* **19**, 153–161 (2017).
104. Sturm, D., Pfister, S. M. & Jones, D. T. W. Pediatric Gliomas: Current Concepts on Diagnosis, Biology, and Clinical Management. *J. Clin. Oncol.* **35**, 2370–2377 (2017).
105. Zhang, Z.-Y. *et al.* TERT promoter mutations contribute to IDH mutations in predicting differential responses to adjuvant therapies in WHO grade II and III diffuse gliomas. *Oncotarget* **6**, 24871–24883 (2015).
106. Gramatzki, D. *et al.* Telomerase reverse transcriptase promoter mutation– and O6-methylguanine DNA methyltransferase promoter methylation–mediated sensitivity to temozolomide in isocitrate dehydrogenase–wild-type glioblastoma: is there a link? *Eur. J. Cancer* **147**, 84–94 (2021).
107. Oliveira, T. *et al.* Human foreskin fibroblasts: from waste bag to important biomedical applications. *J. Clin. Urol.* **11**, 385–394 (2018).
108. J. Richard Morphy and C. John Harris. Foreword. in *Designing Multi-Target Drugs* (eds. Richard Morphy, J. & John Harris, C.) P005–P009 (2012).
109. Bekaii-Saab, T. S. *et al.* A phase Ib/II study of BBI608 combined with weekly paclitaxel in advanced pancreatic cancer. *J. Clin. Oncol.* **34**, 196–196 (2016).

110. Grothey, A. *et al.* CanStem303C trial: A phase III study of napabucasin (BBI-608) in combination with 5-fluorouracil (5-FU), leucovorin, irinotecan (FOLFIRI) in adult patients with previously treated metastatic colorectal cancer (mCRC). *J. Clin. Oncol.* **35**, TPS3619–TPS3619 (2017).
111. Edenfield, W. J. *et al.* A phase 2 study of napabucasin with weekly paclitaxel in previously treated metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **35**, 1084–1084 (2017).
112. Bekaii-Saab, T. S. *et al.* CanStem111P trial: A phase III study of napabucasin (BBI-608) plus nab-paclitaxel (nab-PTX) with gemcitabine (gem) in adult patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma (mPDAC). *J. Clin. Oncol.* **35**, TPS4148–TPS4148 (2017).
113. Bendell, J. C. *et al.* Cancer stemness inhibition and chemosensitization: Phase 1b/II study of cancer stemness inhibitor napabucasin (BBI-608) with FOLFIRI +/- bevacizumab (Bev) administered to colorectal cancer (CRC) patients (pts). *J. Clin. Oncol.* **35**, 593–593 (2017).
114. Li, X., Wei, Y. & Wei, X. Napabucasin, a novel inhibitor of STAT3, inhibits growth and synergises with doxorubicin in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Lett.* **491**, 146–161 (2020).
115. Schmidtova, S. *et al.* Napabucasin overcomes cisplatin resistance in ovarian germ cell tumor-derived cell line by inhibiting cancer stemness. *Cancer Cell Int.* **20**, 364 (2020).
116. MacDonagh, L. *et al.* BBI608 inhibits cancer stemness and reverses cisplatin resistance in NSCLC. *Cancer Lett.* **428**, 117–126 (2018).
117. Beyreis, M. *et al.* The Cancer Stem Cell Inhibitor Napabucasin (BBI608) Shows General Cytotoxicity in Biliary Tract Cancer Cells and Reduces Cancer Stem Cell Characteristics. *Cancers (Basel)*. **11**, 276 (2019).
118. Marques, A. E. M. *et al.* Entinostat is a novel therapeutic agent to treat oral squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.* **49**, 771–779 (2020).
119. Kozovska, Z. *et al.* ALDH1A inhibition sensitizes colon cancer cells to chemotherapy. *BMC Cancer* **18**, 656 (2018).
120. Durinikova, E. *et al.* ALDH1A3 upregulation and spontaneous metastasis formation is associated with acquired chemoresistance in colorectal cancer cells. *BMC Cancer* **18**, 848 (2018).
121. Shah, F. L. *et al.* Abstract 4802: Combination therapy in PDAC involving blockade

of the APE1/Ref-1 signaling pathway: An investigation into drug synthetic lethality and anti-neuropathy therapeutic approach. *Cancer Res.* **78**, 4802–4802 (2018).

122. Orillion, A. *et al.* Entinostat Neutralizes Myeloid-Derived Suppressor Cells and Enhances the Antitumor Effect of PD-1 Inhibition in Murine Models of Lung and Renal Cell Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **23**, 5187–5201 (2017).
123. Yu, H., Pardoll, D. & Jove, R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 798–809 (2009).
124. Pili, R. *et al.* Immunomodulation by HDAC inhibition: Results from a phase I study with entinostat in combination with atezolizumab and bevacizumab in metastatic renal cell carcinoma patients. *J. Clin. Oncol.* **38**, 5064–5064 (2020).
125. Romeo, E., Caserta, C. A., Rumio, C. & Marcucci, F. The Vicious Cross-Talk between Tumor Cells with an EMT Phenotype and Cells of the Immune System. *Cells* **8**, 460 (2019).
126. Mini, E., Nobili, S., Caciagli, B., Landini, I. & Mazzei, T. Cellular pharmacology of gemcitabine. *Ann. Oncol.* **17**, v7–v12 (2006).
127. Bekaii-Saab, T. S. *et al.* A phase Ib/II study of cancer stemness inhibitor napabucasin (BBI-608) in combination with gemcitabine (gem) and nab-paclitaxel (nabPTX) in metastatic pancreatic adenocarcinoma (mPDAC) patients (pts). *J. Clin. Oncol.* **35**, 4106–4106 (2017).
128. Frese, K. K. *et al.* nab -Paclitaxel Potentiates Gemcitabine Activity by Reducing Cytidine Deaminase Levels in a Mouse Model of Pancreatic Cancer. *Cancer Discov.* **2**, 260–269 (2012).
129. Liu, J. *et al.* Signal transducer and activator of transcription 3 mediates apoptosis inhibition through reducing mitochondrial ROS and activating Bcl-2 in gemcitabine-resistant lung cancer A549 cells. *J. Cell. Physiol.* **236**, 3896–3905 (2021).
130. LIU, L. F. *et al.* Mechanism of Action of Camptothecin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **922**, 1–10 (2006).
131. Hubbard, J. M. *et al.* Phase Ib study of cancer stem cell (CSC) pathway inhibitor BBI-608 administered in combination with FOLFIRI with and without bevacizumab (Bev) in patients (pts) with advanced colorectal cancer (CRC). *J. Clin. Oncol.* **34**, 569–569 (2016).
132. Hubbard, J. M. *et al.* A phase Ib study of BBI608 in combination with FOLFIRI with and without bevacizumab in patients (pts) with advanced colorectal cancer

- (CRC). *J. Clin. Oncol.* **33**, 3616–3616 (2015).
133. Wilke, H. W. Kombination mit Irinotecan – die Referenztherapie in der First-line-Therapie des fortgeschrittenen Kolorektalkarzinoms. *Oncol. Res. Treat.* **23**, 32–34 (2000).
 134. Azrak, R. G. *et al.* Therapeutic Synergy Between Irinotecan and 5-Fluorouracil against Human Tumor Xenografts. *Clin. Cancer Res.* **10**, 1121–1129 (2004).
 135. Kolfschoten, G. M., Hulscher, T. M., Pinedo, H. M. & Boven, E. Drug resistance features and S-phase fraction as possible determinants for drug response in a panel of human ovarian cancer xenografts. *Br. J. Cancer* **83**, 921–927 (2000).
 136. Zhong, C. *et al.* B7-H3 Regulates Glioma Growth and Cell Invasion Through a JAK2/STAT3/Slug-Dependent Signaling Pathway. *Onco. Targets. Ther.* **Volume 13**, 2215–2224 (2020).
 137. Karachi, A., Dastmalchi, F., Mitchell, D. A. & Rahman, M. Temozolomide for immunomodulation in the treatment of glioblastoma. *Neuro. Oncol.* **20**, 1566–1572 (2018).
 138. JIAPAER, S., FURUTA, T., TANAKA, S., KITABAYASHI, T. & NAKADA, M. Potential Strategies Overcoming the Temozolomide Resistance for Glioblastoma. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)*. **58**, 405–421 (2018).
 139. Perazzoli, G. *et al.* Temozolomide Resistance in Glioblastoma Cell Lines: Implication of MGMT, MMR, P-Glycoprotein and CD133 Expression. *PLoS One* **10**, e0140131 (2015).
 140. Cruceru, M. L., Neagu, M., Demoulin, J. & Constantinescu, S. N. Therapy targets in glioblastoma and cancer stem cells: lessons from haematopoietic neoplasms. *J. Cell. Mol. Med.* **17**, 1218–1235 (2013).
 141. Mimeault, M., Hauke, R., Mehta, P. P. & Batra, S. K. Recent advances in cancer stem/progenitor cell research: therapeutic implications for overcoming resistance to the most aggressive cancers. *J. Cell. Mol. Med.* **11**, 981–1011 (2007).
 142. Hambardzumyan, D., Squatrito, M., Carbajal, E. & Holland, E. C. Glioma Formation, Cancer Stem Cells, and Akt Signaling. *Stem Cell Rev.* **4**, 203–210 (2008).
 143. Mason, W. P. *et al.* BBI608-201GBM: A phase Ib/II clinical study of napabucasin (BBI608) in combination with temozolomide (TMZ) for adult patients with recurrent glioblastoma (GBM). *J. Clin. Oncol.* **35**, e13525–e13525 (2017).

144. Babaei, A., Soleimanzahi, H., Soleimani, M. & Arefian, E. The synergistic anticancer effects of ReoT3D, CPT-11, and BBI608 on murine colorectal cancer cells. *DARU J. Pharm. Sci.* **28**, 555–565 (2020).
145. Li, Y., Han, Q., Zhao, H., Guo, Q. & Zhang, J. Napabucasin Reduces Cancer Stem Cell Characteristics in Hepatocellular Carcinoma. *Front. Pharmacol.* **11**, (2020).
146. Bax, D. A. *et al.* Molecular and Phenotypic Characterisation of Paediatric Glioma Cell Lines as Models for Preclinical Drug Development. *PLoS One* **4**, e5209 (2009).
147. Bodell, W. J., Aida, T., Berger, M. S. & Rosenblum, M. L. Increased repair of O 6 -alkylguanine DNA adducts in glioma-derived human cells resistant to the cytotoxic and cytogenetic effects of 1, 3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Carcinogenesis* **7**, 879–883 (1986).
148. Nistér, M. & Westermarck, B. Human Glioma Cell Lines. in *Atlas of Human Tumor Cell Lines* 17–42 (Elsevier, 1994).
149. Rutka, J. T. *et al.* Establishment and characterization of five cell lines derived from human malignant gliomas. *Acta Neuropathol.* **75**, 92–103 (1987).
150. Tan, K. Y. *et al.* Serum-free media formulations are cell line-specific and require optimization for microcarrier culture. *Cytotherapy* **17**, 1152–1165 (2015).
151. Ryu, J. H., Kim, S. S., Cho, S. W., Choi, C. Y. & Kim, B. S. HEK 293 cell suspension culture using fibronectin-adsorbed polymer nanospheres in serum-free medium. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **71**, 128–133 (2004).
152. Ghasemi, N., Bandehpour, M. & Ranjbari, J. Optimization of key factors in serum free medium for production of human recombinant GM-CSF using response surface methodology. *Iran. J. Pharm. Res.* **18**, 146–156 (2019).
153. Shimada, M., Itamochi, H. & Kigawa, J. Nedaplatin: A cisplatin derivative in cancer chemotherapy. *Cancer Management and Research* vol. 5 67–76 (2013).
154. Niioka, T. *et al.* Pharmacokinetics of low-dose nedaplatin and validation of AUC prediction in patients with non-small-cell lung carcinoma. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **59**, 575–580 (2007).
155. Li, W.-J., Jiang, J. & Wang, X.-L. Nedaplatin Salvage Chemotherapy for Cervical Cancer. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* **16**, 3159–3162 (2015).
156. Ota, K. Nedaplatin. *Japanese J. Cancer Chemother.* **23**, 379–387 (1996).

157. Qiu, X. *et al.* Concurrent chemoradiotherapy with raltitrexed and nedaplatin regimen for esophageal squamous cell carcinoma. *Medicine (Baltimore)*. **99**, e18732 (2020).
158. *Fachinformation Cisplatin Accord 1 mg/ml Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung*. (2015).
159. Ogawara, D. *et al.* Phase I/II study of amrubicin and nedaplatin in patients with untreated, advanced, non-small cell lung cancer. *Chemotherapy* **60**, 180–184 (2014).
160. Kitamura, H. *et al.* Paclitaxel, ifosfamide, and nedaplatin as second-line treatment for patients with metastatic urothelial carcinoma: A phase II study of the SUOC group. *Cancer Sci.* **102**, 1171–1175 (2011).
161. Matsumoto, K. *et al.* Gemcitabine plus nedaplatin as salvage therapy is a favorable option for patients with progressive metastatic urothelial carcinoma after two lines of chemotherapy. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* **16**, 2483–2487 (2015).
162. Goto, T. *et al.* Single nedaplatin treatment as salvage chemotherapy for platinum/taxane-resistant/refractory epithelial ovarian, tubal and peritoneal cancers. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* **36**, 764–768 (2010).
163. Su, X. Y. *et al.* Intervention effects of nedaplatin and cisplatin on proliferation and apoptosis of human tumour cells in vitro. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* **13**, 4531–4536 (2012).
164. Mabuchi, S. *et al.* Postoperative concurrent nedaplatin-based chemoradiotherapy improves survival in early-stage cervical cancer patients with adverse risk factors. *Gynecol. Oncol.* **115**, 482–487 (2009).
165. Kataoka, Y. *et al.* A case of postoperative thymic carcinoma recurrence that was effectively treated with combination chemotherapy of nedaplatin and docetaxel. *Japanese J. Cancer Chemother.* **40**, 2561–2563 (2013).
166. Pang, H. *et al.* Efficacy and Safety of Nedaplatin in Advanced Breast Cancer Therapy. *Cancer Invest.* **34**, 167–172 (2016).
167. Soeda, S. *et al.* Successful management of platinum-resistant ovarian cancer by weekly Nedaplatin followed by Olaparib: Three case reports. *Anticancer Res.* **40**, 5263–5270 (2020).
168. Yin, L. *et al.* Radiosensitization Effect of Nedaplatin on Nasopharyngeal Carcinoma Cells in Different Status of Epstein-Barr Virus Infection. *Biomed Res. Int.* **2014**, 1–7 (2014).

169. Lombardi, G. *et al.* Cisplatin and temozolomide combination in the treatment of leptomeningeal carcinomatosis from ethmoid sinus intestinal-type adenocarcinoma. *J. Neurooncol.* **104**, 381–386 (2011).
170. Wang, Y. *et al.* Phase II trial of temozolomide plus concurrent whole-brain radiation followed by TNV regimen as adjuvant therapy for patients with newly diagnosed primary CNS lymphoma. *Neurol. India* **61**, 260–264 (2013).
171. Dresemann, G. Temozolomide in malignant glioma. *Onco. Targets. Ther.* **3**, 139 (2010).
172. D’Incalci, M., Citti, L., Taverna, P. & Catapano, C. V. Importance of the DNA repair enzyme O6-alkyl guanine alkyltransferase (AT) in cancer chemotherapy. *Cancer Treat. Rev.* **15**, 279–292 (1988).
173. Daneman, R. & Prat, A. The Blood–Brain Barrier. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, a020412 (2015).
174. Czupalla, C. J., Liebner, S. & Devraj, K. In Vitro Models of the Blood–Brain Barrier. in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* vol. 1135 415–437 (Methods Mol Biol, 2014).
175. Helms, H. C. *et al.* In vitro models of the blood–brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **36**, 862–890 (2016).
176. Arvanitis, C. D., Ferraro, G. B. & Jain, R. K. The blood–brain barrier and blood–tumour barrier in brain tumours and metastases. *Nature Reviews Cancer* vol. 20 26–41 (2020).
177. Hu, J. *et al.* Cancer Stem Cells in Glioblastoma. in *Stem Cells and Cancer Stem Cells, Volume 1* 113–120 (Springer Netherlands, 2012).
178. Sattiraju, A., Sai, K. K. S. & Mintz, A. Glioblastoma stem cells and their microenvironment. in *Advances in Experimental Medicine and Biology* vol. 1041 119–140 (Springer New York LLC, 2017).
179. Huang, Z., Cheng, L., Guryanova, O. A., Wu, Q. & Bao, S. Cancer stem cells in glioblastoma-molecular signaling and therapeutic targeting. *Protein and Cell* vol. 1 638–655 (2010).
180. Bilzer, T., Stavrou, D., Wechsler, W., Wohler, B. & Keiditsch, E. Antigen variation in a human glioblastoma: From the primary tumor to the second recurrence, permanent cell line and xenotransplantation tumors. *Anticancer Res.* **11**, 547–553

(1991).

181. Jaggupilli, A. & Elkord, E. Significance of CD44 and CD24 as Cancer Stem Cell Markers: An Enduring Ambiguity. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, 1–11 (2012).
182. *FIRST THINGS FIRST: PRIMARY CELLS IN RESEARCH.*
www.lonza.com/primarycells.
183. Ginsburg, G. S. & Phillips, K. A. Precision Medicine: From Science To Value. *Health Aff.* **37**, 694–701 (2018).
184. Mitra, A. K. *et al.* Novel delivery approaches for cancer therapeutics. *J. Control. Release* **219**, 248–268 (2015).
185. Menzies, A. M., Long, G. V & Murali, R. Dabrafenib and its potential for the treatment of metastatic melanoma. *Drug Des. Devel. Ther.* **6**, 391–405 (2012).
186. Daniels, B. *et al.* Survival outcomes for Australian women receiving trastuzumab for HER2-positive metastatic breast cancer following (neo)adjuvant trastuzumab: a national population-based observational study (2006–2014). *Br. J. Cancer* **118**, 441–447 (2018).

7. Anhang

Tabelle S1. Genetische Veränderungen in den untersuchten Glioblastomzelllinien.

Die Resultate wurden mit Hilfe einer Genpanelsequenzierung von ausgewählten Gliom-assoziierten Genen am Institut für Neuropathologie erhoben und für die korrelativen Analysen in der vorliegenden Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Panel-Sequenzierung zur Mutationsanalyse der Glioblastomzelllinien

GBM	EGFR	PMS2	ATRX	CDKN2C	CDKN2A	TSC1	TSC2	CCND2
AM-38					teilw. Verlust			
DBTRG-05MG					teilw. Verlust	Mutation	Mutation	
GBM-511-FH	Gewinn							
GBM5050611	Gewinn				Gewinn			
GBM59 MF	Gewinn	fok. Gewinn			teilw. Verlust			
GBM67 MF	Gewinn	Mutation						
GS-2	fok. Gewinn	Mutation			fok. Gewinn			
GS-5	fok. Gewinn	Mutation			fok. Gewinn			
KNS42								
KS-1					fok. Verlust			
LN18					teilw. Verlust			
LN308								
LNT229				fok. Verlust	teilw. Verlust		Mutation	
M059J								
M059K							fok. Gewinn	
S24					teilw. Verlust			
SF126	fok. Gewinn	fok. Gewinn			teilw. Verlust			
SF188	Gewinn							
S4GBH 2	Gewinn	Gewinn					Mutation	
speasGBM	Gewinn	modifiziert						
YH-13	fok. Gewinn				teilw. Verlust	Mutation		
YKG-1		Gewinn	Mutation	Verlust	teilw. Verlust			
ZH161	fok. Gewinn				Gewinn			
ZH426	fok. Gewinn							fok. Verlust
ZH562					Gewinn			

GBM	CCND3	TERT	TP53	PTEN	MTAP	RB1	NF1	KRAS
AM-38		Mutation			teilw. Verlust	fok. Verlust		
DBTRG-05MG		Mutation		fok. Verlust				
GBM-511-FH								
GBM5050611		Mutation	Mutation					
GBM59 MF		Mutation		Verlust				
GBM67 MF		Mutation	Mutation	fok. Verlust				
GS-2		Mutation	Mutation	Mutation/fok. Verlust		fok. Verlust		
GS-5		Mutation	Mutation	Mutation		fok. Verlust		
KNS42								
KS-1		Mutation			fok. Verlust			
LN18			Mutation		teilw. Verlust		Mutation	
LN308		Mutation	fok. Verlust	Mutation				
LNT229		Mutation	Mutation		Mutation		fok. Gewinn	
M059J	fok. Gewinn	Mutation	Mutation	Mutation				
M059K	fok. Gewinn	Mutation	Mutation	Mutation				
S24		Mutation		Mutation			Mutation	
SF126		Mutation	fok. Verlust	Mutation	fok. Verlust	fok. Verlust		
SF188			Mutation				Mutation	
S4GBH 2			Mutation			Mutation/fok. Verlust	Mutation	
speasGBM		Mutation	Mutation					Mutation
YH-13		Mutation	Mutation	fok. Verlust	teilw. Verlust			
YKG-1		Mutation	Mutation	Mutation/fok. Verlust	fok. Verlust	fok. Verlust	Mutation	
ZH161		Mutation	Mutation	Mutation/fok. Verlust			Mutation	
ZH426		Mutation	Mutation/fok. Verlust	Mutation	Mutation	Mutation		fok. Verlust
ZH562		Mutation		Mutation	Mutation	Mutation		

GBM	PIK3CA	PDGFRA	CIC	CCND1	PTPN11	MSH6	BRAF	HIST1H3B
AM-38							modifiziert	
DBTRG-05MG					Mutation		Mutation	
GBM-511-FH						modifiziert		
GBM5050611								
GBM59 MF								
GBM67 MF								
GS-2	fok. Gewinn							
GS-5								
KNS42								
KS-1			Mutation					
LN18		Mutation	Mutation					
LN308				fok. Amplifikation				
LNT229				fok. Gewinn	Mutation			
MO59J								
MO59K	fok. Gewinn							
S24								
SF126								
SF188				fok. Amplifikation				
S4GBH 2	fok. Verlust	Verlust						
speasGBM		modifiziert						
YH-13	Mutation	fok. Verlust	fok. Gewinn					
YKG-1	Mutation	fok. Verlust	fok. Gewinn					
ZH161								
ZH426	Mutation	Mutation	fok. Gewinn			Mutation		
ZH562	Mutation				Mutation			

GBM	MLH1	NTRK2	MDM2	IRS	DAXX	MYBL1	PIK3R1	HIST1H3B
AM-38								
DBTRG-05MG				Gewinn				
GBM-511-FH								
GBM5050611								
GBM59 MF								
GBM67 MF								
GS-2						fok. Gewinn		
GS-5								
KNS42								
KS-1			fok. Gewinn					
LN18								
LN308								
LNT229						Verlust		
MO59J					modifiziert			
MO59K				fok. Gewinn	fok. Gewinn		fok. Gewinn	
S24	Mutation						Mutation	
SF126								
SF188		fok. Gewinn						
S4GBH 2	fok. Verlust							
speasGBM								
YH-13								
YKG-1								
ZH161								
ZH426								
ZH562								

GBM	MSH2	FGFR1	IRS2	NRAS	FUBP1	MDM4	NF2	CDK4
AM-38								
DBTRG-05MG								Gewinn
GBM-511-FH	Mutation							
GBM5050611								
GBM59 MF								
GBM67 MF								
GS-2								
GS-5								
KNS42								
KS-1								
LN18								
LN308								fok. Amplifikation
LNT229								
M059J								
M059K				fok. Gewinn	fok. Gewinn			
S24	Mutation							
SF126								
SF188						Gewinn		fok. Amplifikation
S4GBH 2								
speasGBM								
YH-13								
YKG-1								
ZH161								
ZH426								
ZH562								

Abbildung S1. Dosis-Wirkungskurven des Primärscreens für GBM67MF.

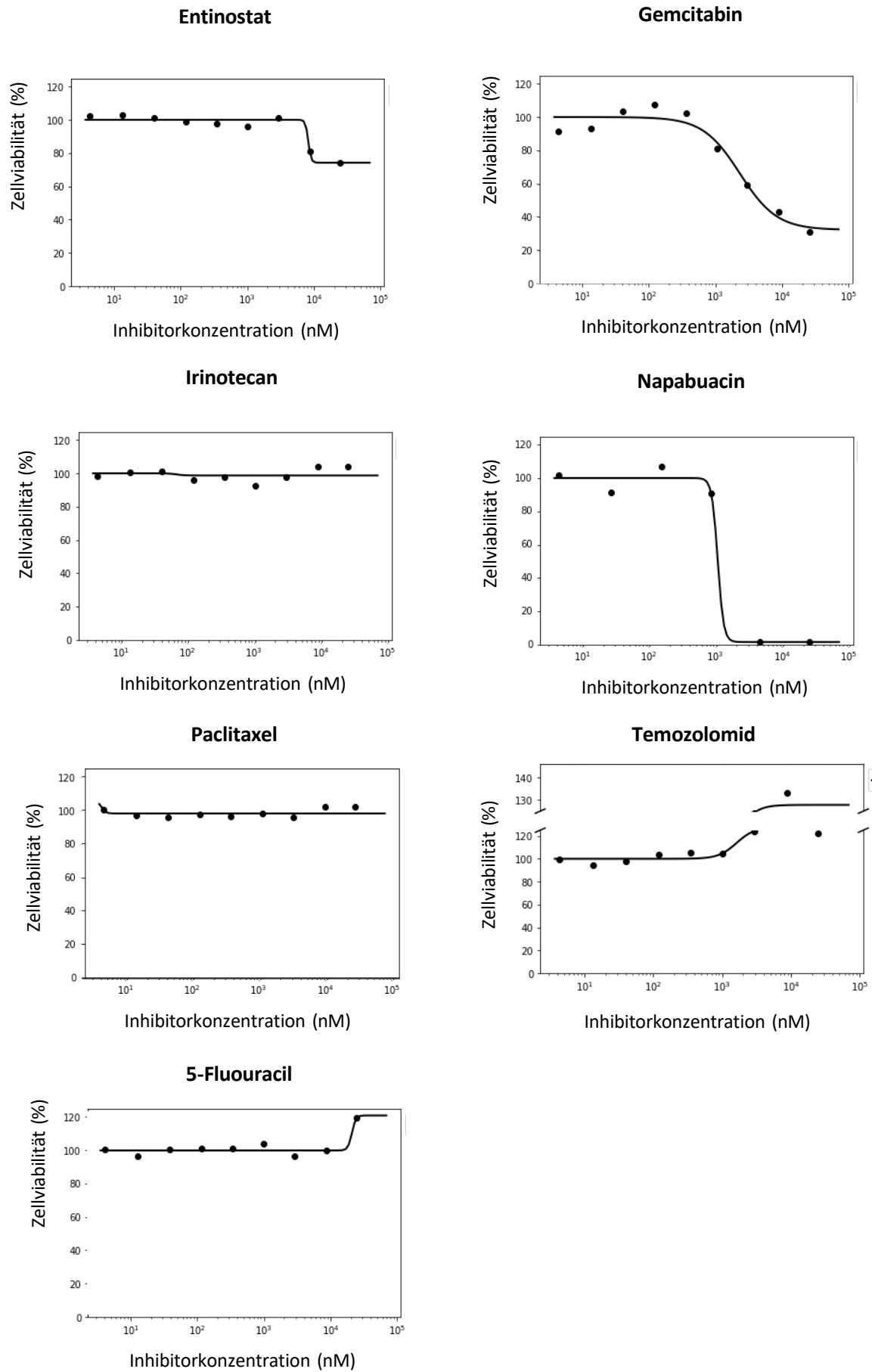


Abbildung S2. Dosis-Wirkungskurven des Primärscreens für GBM0505611.

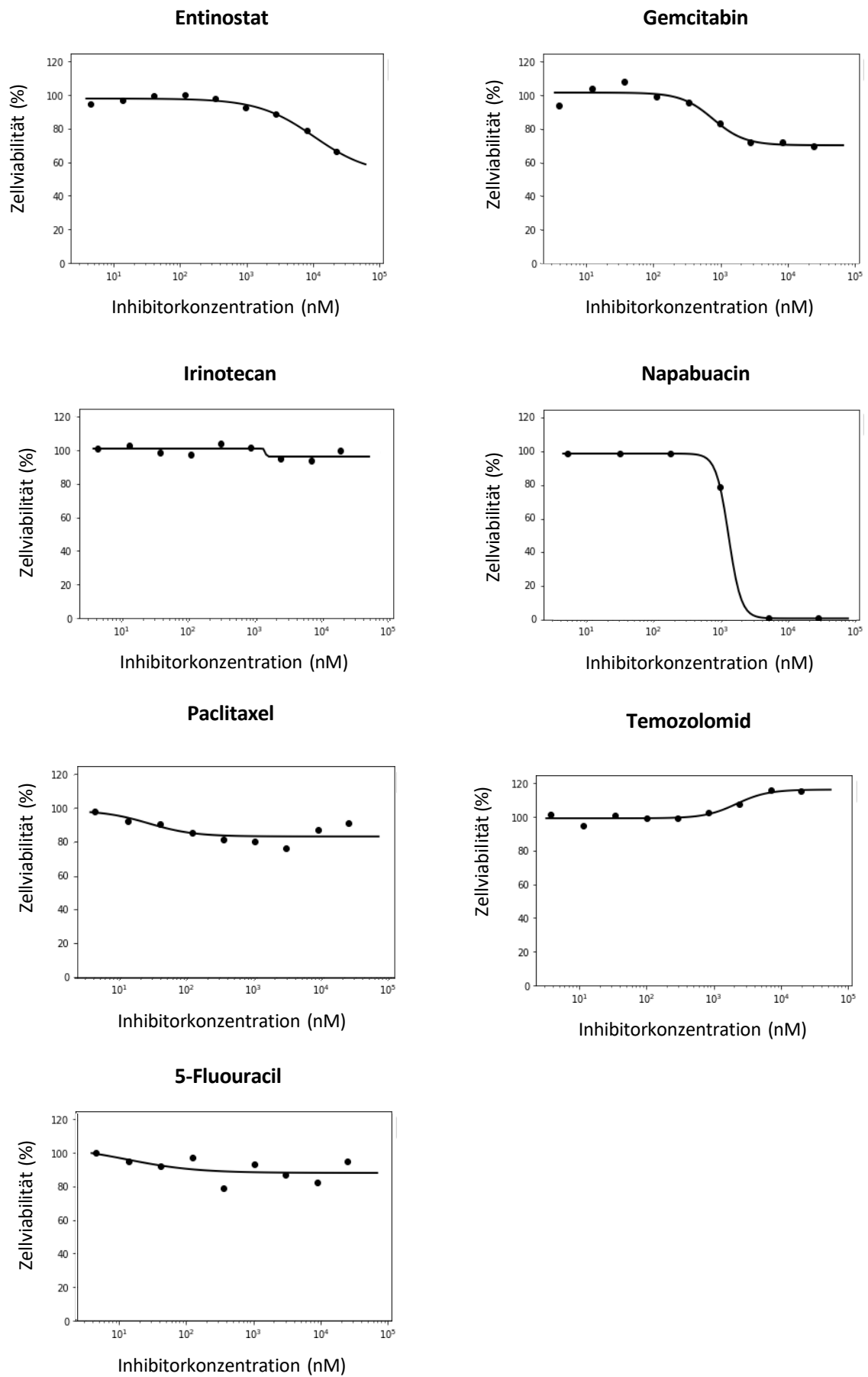


Abbildung S3. Dosis-Wirkungskurven des Primärscreens für LN18.

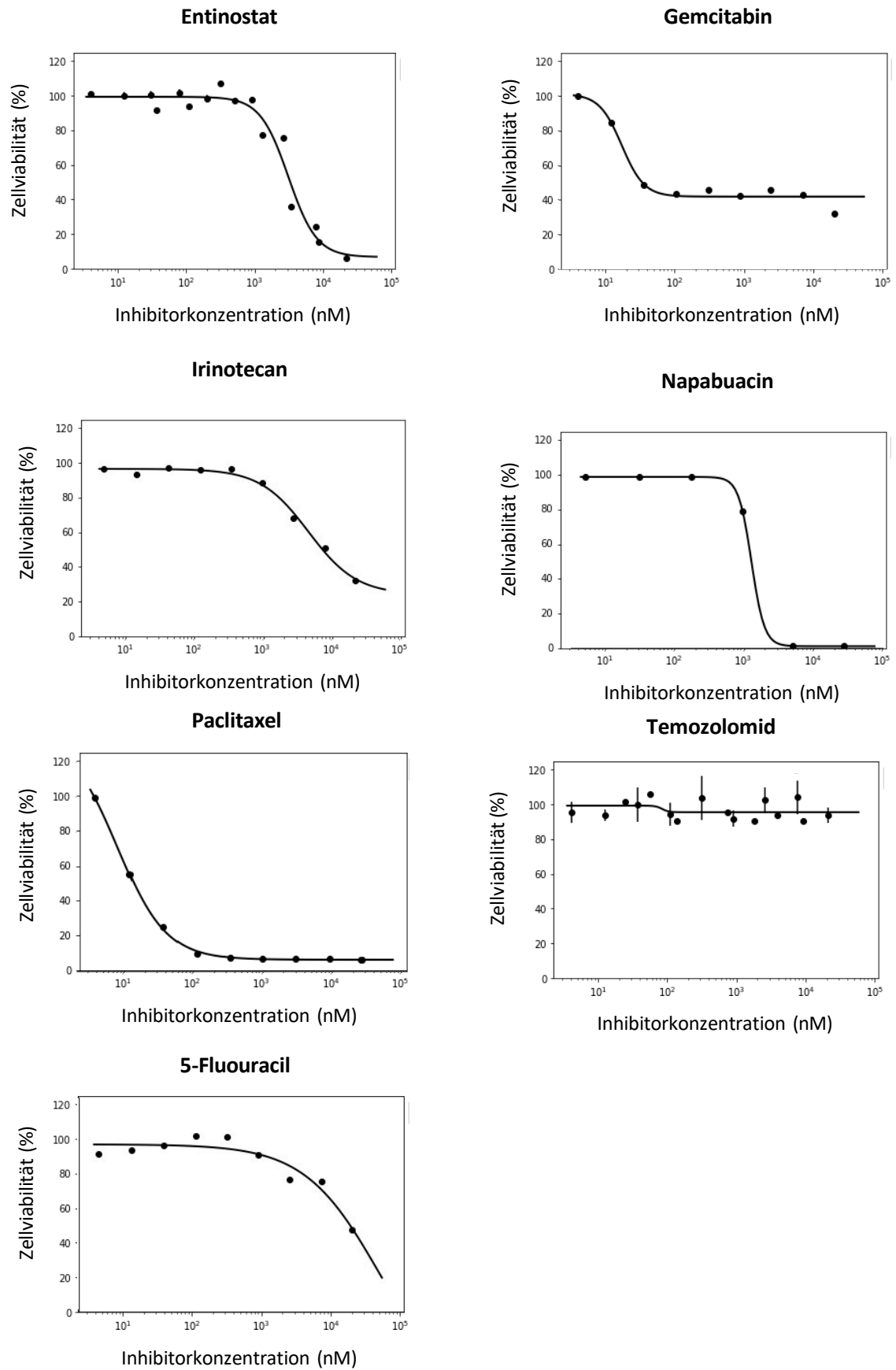


Abbildung S4. Dosis-Wirkungskurven des Primärscreens für LN229.

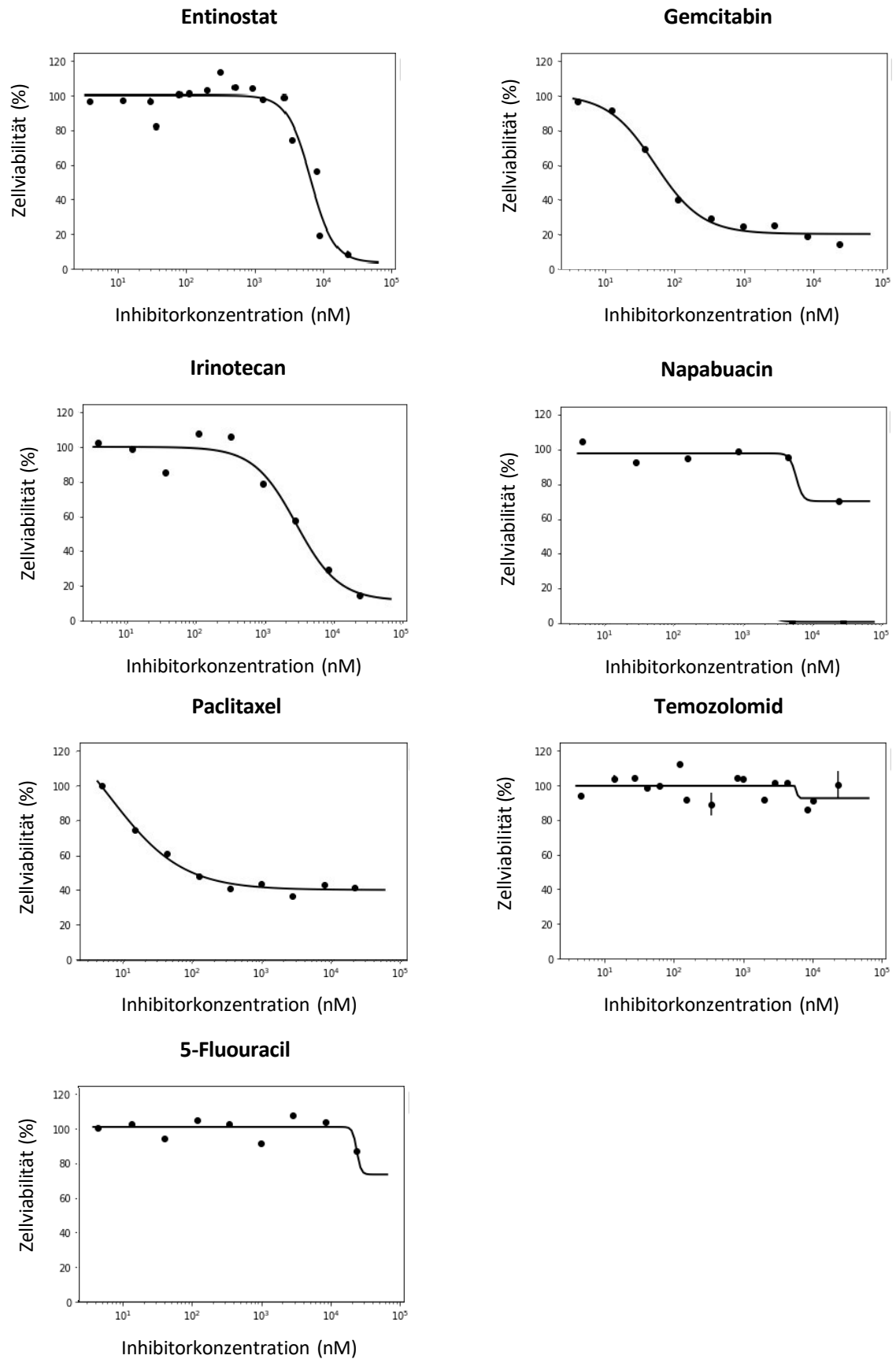


Abbildung S5. Dosis-Wirkungskurven des Primärscreens für LN308.

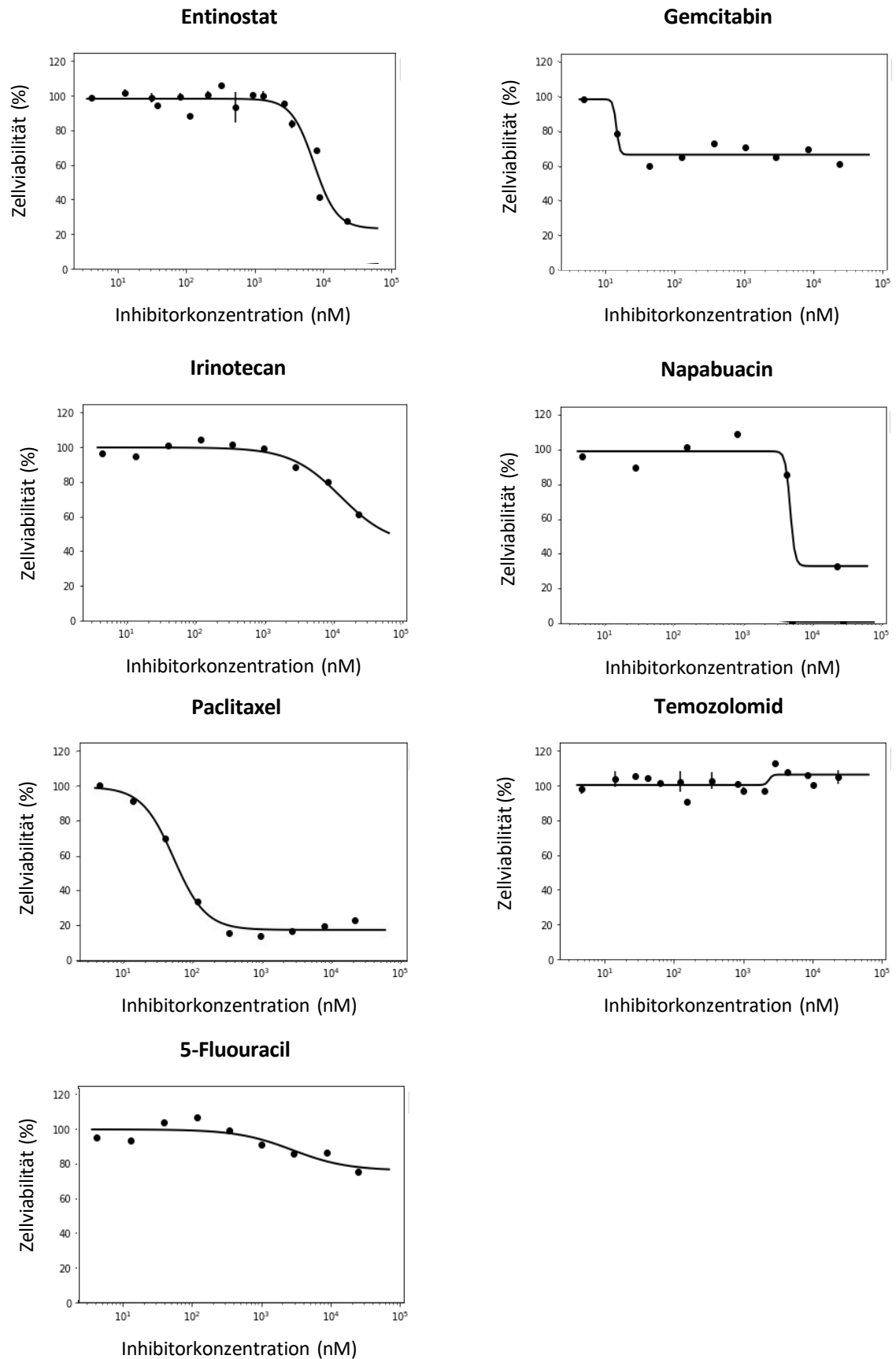


Abbildung S6. Ergebnisse des Synergismusexperiments von Napabucasin und Entinostat in LN308.

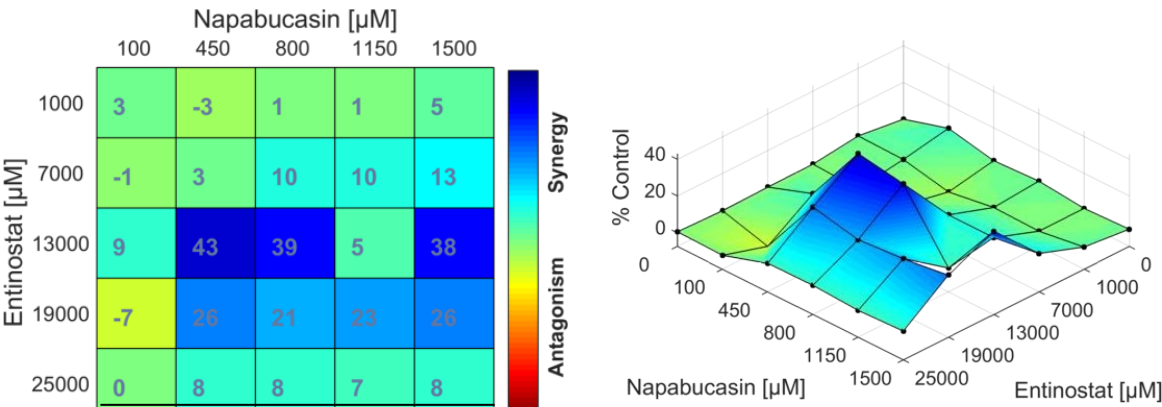


Abbildung S7. Ergebnisse des Synergismusexperiments von Napabucasin und Gemcitabin in LN308.

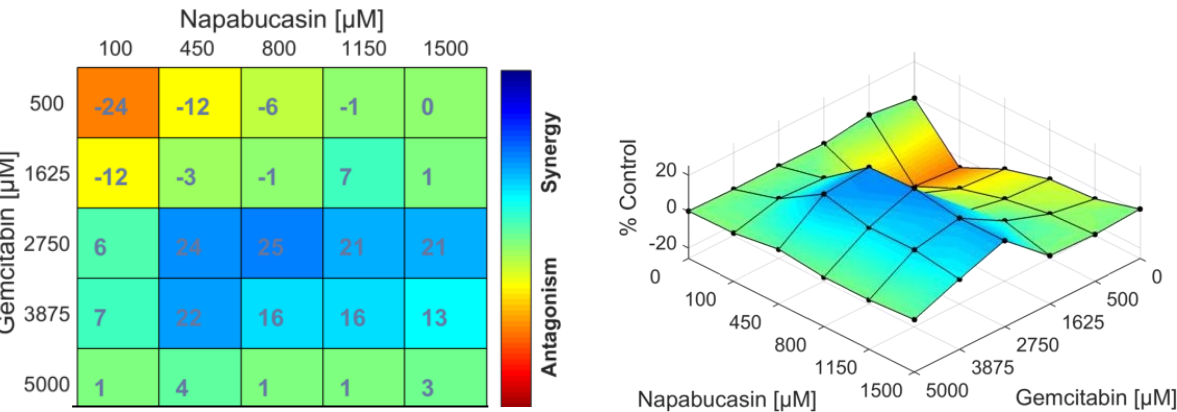


Abbildung S8. Ergebnisse des Synergismusexperiments von Napabucasin und Paclitaxel in LN308.

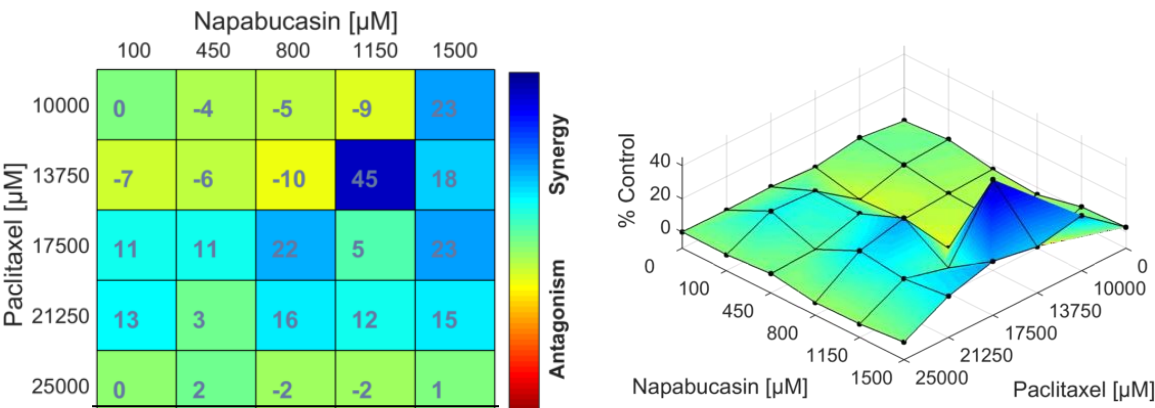


Abbildung S9. Ergebnisse des Synergismusexperiments von Napabucasin und Irinotecan in LN18.

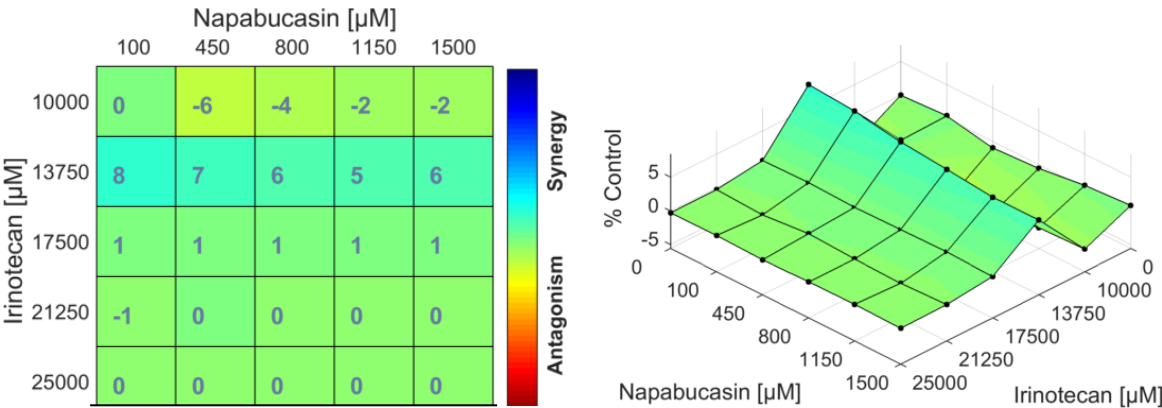


Abbildung S10. Ergebnisse des Synergismusexperiments von Napabucasin und Irinotecan in LN308.

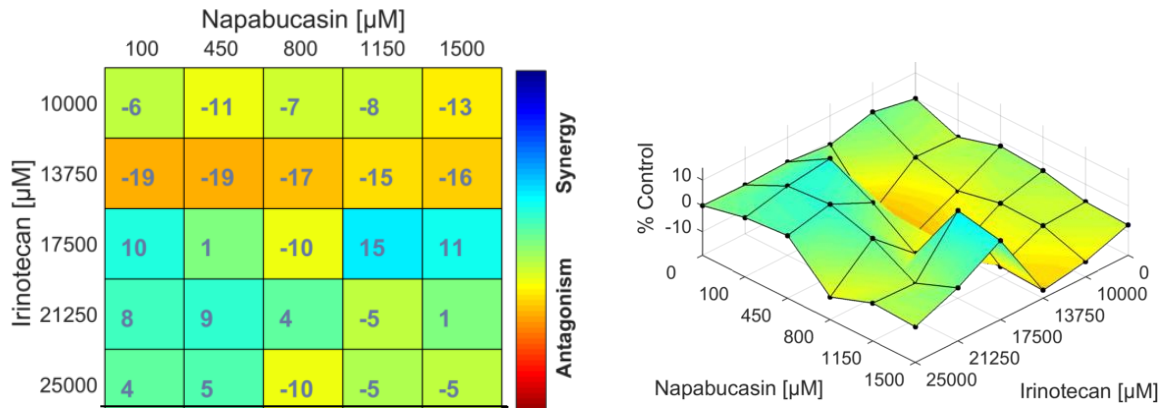


Abbildung S11. Ergebnisse des Synergismusexperiments von Napabucasin und Irinotecan in LN229.

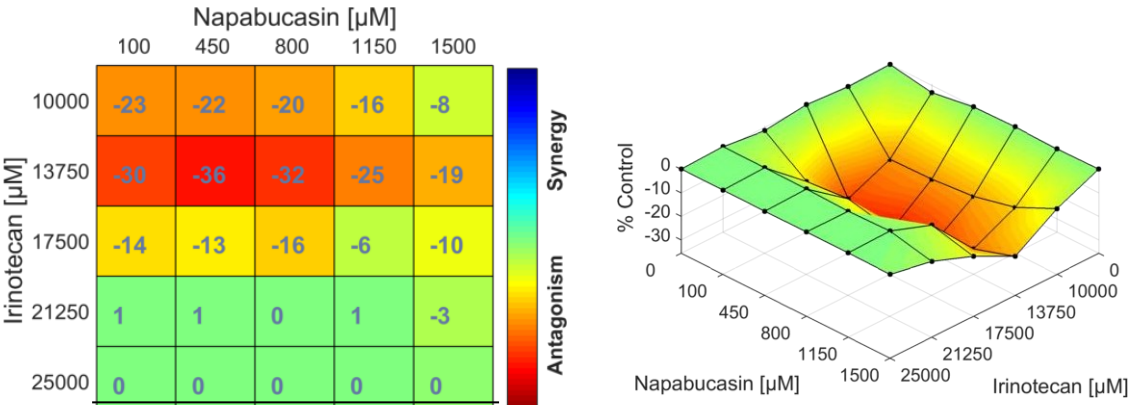
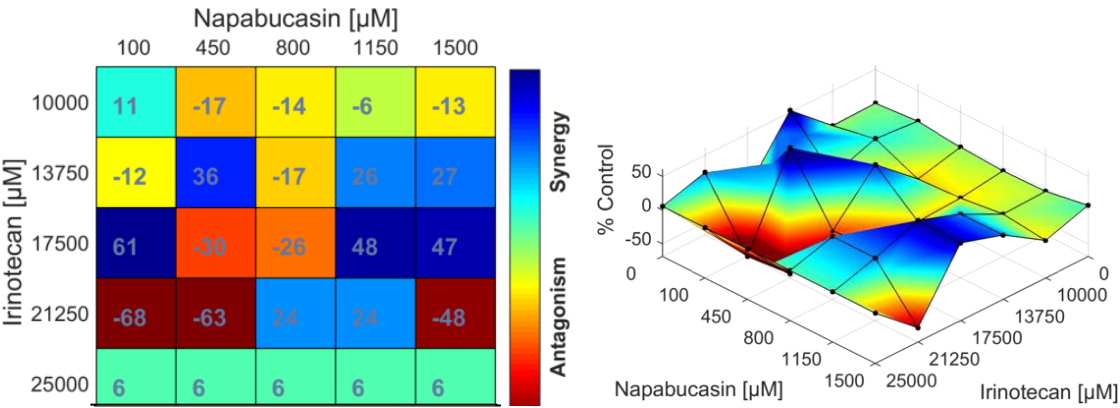


Abbildung S12. Ergebnisse des Synergismusexperiments von Napabucasin und Irinotecan in GBM67MF.



8. Danksagung

Die Doktorarbeit wurde unter der Klinikleitung von Prof. Arndt Borkhardt in der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie, in der Arbeitsgruppe „Pädiatrische Neuroonkogenomik“ von Prof. Dr. Marc Remke erstellt.

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei all jenen bedanken, die mich in vielfältiger Weise bei der Fertigstellung der Arbeit unterstützt haben.

Prof. Marc Remke danke ich für die Betreuung, die Bereitstellung des Themas und die wissenschaftliche Unterstützung und Beratung. Weiterhin danke ich ihm für die gute Atmosphäre im und auch außerhalb des Labors. Ich bedauere zutiefst, dass ich bei keiner Weihnachtsfeier mehr dabei sein kann und mit Euch Tequila trinken kann.

Prof. Guido Reifenberger möchte ich herzlichst für die unkomplizierte Übernahme der Kobetreuung sowie für die Unterstützung bei der Durchführung und die ausführliche Korrektur der Arbeit und von Kooperationen danken. In diesem Zuge möchte ich auch dem ganzen Institut für Neuropathologie danken, ohne dass die Sequenzierung der Zelllinien nicht möglich gewesen wäre.

Ich danke der Düsseldorf School of Oncology für die finanzielle Unterstützung in Form eines Stipendiums.

Mein großer Dank geht an die AG Remke und all ihre aktuellen sowie früheren Mitglieder.

Die Zeit mit Euch war großartig und ich werde Euch und die Grillabende, Pizzamittage und Weihnachtsfeiern schmerzlich vermissen. Viele von Euch sind längst mehr als nur Kollegen.

Ich danke Dr. Jasmin Bartl für die aufopferungsvolle Korrektur meiner Arbeit, die unzähligen Ratschläge und die viele Zeit, die Du Dir immer für mich genommen hast. Wann immer ich Hilfe, Rat oder ein freundliches Gespräch brauchte, warst Du da.

Dr. Nan Qin danke ich für die große Unterstützung bei der Planung und Ausführung der Experimente, bei der Erstellung der Daten und die zahlreichen Ratschläge. Ohne Dich gäbe es diese Doktorarbeit nicht.

David Pauck möchte ich von Herzen für sein Engagement danken, das nicht nur die AG Remke betraf, sondern auch meine Doktorarbeit. Wann immer ich nicht weiter wusste, hattest Du ein offenes Ohr für mich, hast Dich für mich eingesetzt, an mich geglaubt und

mir Mut gemacht. Und ganz egal um was es ging, ich konnte mich auch freundschaftlich immer auf Dich verlassen und auf Deine Hilfe zählen. Die zahlreichen Okinii-Abende sind unvergesslich!

Ich danke Dr. Christian Dimitriadis für die großartige Zeit im Labor, ohne Dich war es nie wieder das Gleiche. Ich danke Dir, dass du Dich für die AG Remke entschieden hast, da sich so unsere Wege gekreuzt haben und hoffentlich auch zukünftig nicht mehr trennen.

Kübra Taban möchte ich für ihre Stärke und ihr Durchhaltevermögen danken, das auch unter Tränen nicht weniger beeindruckend ist. Ich bin wahnsinnig dankbar, dass wir uns im Labor kennen gelernt haben und ich Dich zu meinen Freunden zählen darf.

Ich danke Dr. Lena Blümel und Dr. Viktoria Marquardt, die für viele lustige Stunden und großartige Gespräche gesorgt haben. Ich danke Euch, dass Ihr meiner Fragen niemals überdrüssig geworden seid und mich immer unterstützt habt, ganz egal wie banal mein Anliegen war.

Außerdem danke ich Frauke Meyer, Sarah Göbbels, Daniel Picard, Ulvi Ahmadov, Mascha Korsch, Felix Sander, Dorothea Hillebrand und Jonas Krenz für die Hilfsbereitschaft, die Gespräche und die schöne gemeinsame Zeit. Ich werde Euch vermissen!

Weiterhin möchte ich meinen Freunden Franz, Sandra, Robin, und Jan für den unerschütterlichen Glauben und das Interesse an meiner Arbeit danken. Insbesondere Janina danke ich für die Hilfe, die Unterstützung und dafür, dass mit Dir alles immer nur halb so schlimm war.

Meinen Eltern, Großeltern und Jürgen danke ich von ganzem Herzen für die mentale und finanzielle Unterstützung, die Geduld, die Ermutigungen und den unerschütterlichen Glauben in mich. Ohne Euch wäre nichts von alledem möglich gewesen und ich hätte wohl den Rest meines Lebens im Papagayo gearbeitet.