

Aus dem Institut für Anatomie  
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. med. Jobst Sievers)  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Wirkung und Nutzen von Clomipramin und Quinacrin  
in der *in-vitro*-Behandlung des Glioblastoms**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Vorgelegt von  
**Maximilian Lempert**  
aus Saarbrücken

Kiel 2014

**1.Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Rolf Mentlein**

**2.Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Janka Held-Feindt**

**Tag der mündlichen Prüfung: 15.10.2015**

**Zum Druck genehmigt, Kiel, den 15.10.2015**

**gez.:**

**(Vorsitzender der Prüfungskommission)**

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	III
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis .....	VIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Glioblastome.....	1
1.2 Temozolomid (Temodal®).....	5
1.3 Clomipramin (Anafranil®).....	7
1.4 Quinacrin (Mepacrin).....	8
1.5 Lysosomotrope FIASMA-Arzneimittel.....	9
2 Fragestellung.....	13
3 Material und Methoden.....	14
3.1 Material.....	14
3.1.1 Geräte.....	14
3.1.2 Chemikalien.....	14
3.1.3 Puffer .....	15
3.1.4 Verbrauchsmaterialien.....	15
3.1.5 Stimulantien.....	15
3.1.6 Kits/Assays .....	15
3.1.7 Enzyme.....	16
3.1.8 TaqMan® Primer Probes.....	16
3.1.9 Zellkulturmedium .....	16
3.1.10 Zelllinien .....	16
3.2 Methoden.....	17
3.2.1 Zellkultur und Stimulation .....	17
3.2.1.1 Zellkultur .....	17
3.2.1.2 Subkultivierung der Zellen .....	17
3.2.1.3 Stimulation .....	18
3.2.2 Bestimmung lebender und toter Zellen mittels Trypanblau und Zellzählung.....	18
3.2.2.1 Durchführung .....	20
3.2.3 Caspase-3-Assay .....	20
3.2.3.1 Effektor-Caspase-3.....	20

3.2.3.2 Durchführung .....	22
3.2.4 Elektronenmikroskopie .....	23
3.2.5 Real Time PCR.....	25
3.2.5.1 RNA Isolierung.....	25
3.2.5.2 Herstellung von cDNA .....	26
3.2.5.3 Real Time-PCR.....	27
3.2.5.4 Quantifizierung.....	28
3.2.6 Statistische Methoden .....	29
4 Ergebnisse .....	30
4.1 Vorversuche .....	30
4.2 Einzeleffekte versch. Pharmaka auf das Überleben von Glioblastomzellen .....	32
4.3 Kombinationseffekte versch. Pharmaka auf das Überleben von Glioblastomzellen ....	36
4.4 Caspase-3-Assays .....	41
4.5 Real-Time-RT-PCR .....	49
4.6 Elektronenmikroskopie .....	51
5 Diskussion .....	67
5.1 Zytotoxische Effekte Clomipramins und Quinacrins auf Glioblastomzellen.....	68
5.2 Untersuchung der zytotoxischen Mechanismen mittels Caspase-3-Assays und Elektronenmikroskopie. ....	70
5.3 Wirkung Clomipramins auf die Expression von VEGF-A.....	73
5.4 Kritische Auseinandersetzung mit der aktuellen Literatur .....	74
5.4.1 Die Rolle trizyklischer Antidepressiva in der Behandlung des Glioblastoms .....	74
5.4.2 Die Rolle Quinacrins in der Behandlung des Glioblastoms .....	76
5.5 Fazit.....	79
6 Ausblick .....	81
7 Zusammenfassung .....	82
Summary .....	83
A Danksagung .....	94
B Versicherung an Eides Statt .....	95
C Lebenslauf .....	96

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Makroskopie und Mikroskopie eines Gehirns mit Glioblastom (Abbildungen: Sbrandner).....	2
Abb. 2: Strukturformel Temozolomid .....	5
Abb. 3: Strukturformel Clomipramin .....	7
Abb. 4: Strukturformel Quinacrin .....	8
Abb. 5: Foto und Schema einer NEUBAUER-Kammer (Abbildungen: Alcibiades) .....	19
Abb. 6: Schematische Darstellung der Apoptose .....	21
Abb. 7: Effekte von Temozolomid auf das Zellwachstum von Glioblastomzellen nach 7 Tagen .....	30
Abb. 8: Effekte von Clomipramin auf das Zellwachstum von Glioblastomzellen nach 7 Tagen .....	31
Abb. 9: Effekte von Temozolomid, Clomipramin und Quinacrin auf das Zellwachstum von U343 nach 48 Stunden .....	32
Abb. 10: Effekte von Temozolomid, Clomipramin und Quinacrin auf das Zellwachstum von A764 nach 48 Stunden .....	33
Abb. 11: Effekte von Temozolomid, Clomipramin und Quinacrin auf das Zellwachstum von C6 nach 48 Stunden .....	34
Abb. 12: Effekte von Temozolomid, Clomipramin und Quinacrin (z. T. in Kombination) auf das Zellwachstum von U343 nach 48 Stunden .....	37
Abb. 13: Effekte von Temozolomid, Clomipramin und Quinacrin (z. T. in Kombination) auf das Zellwachstum von A764 nach 48 Stunden .....	38
Abb. 14: Effekte von Temozolomid, Clomipramin und Quinacrin (z. T. in Kombination) auf das Zellwachstum von C6 nach 48 Stunden .....	40
Abb. 15: Effekte von Temozolomid und Clomipramin auf die Aktivität der Caspase-3 in A764 Zellen nach 5 Tagen .....	42
Abb. 16: Effekte von Temozolomid, Clomipramin und Quinacrin auf die Aktivität der Caspase-3 in A764 Zellen nach 48 Stunden .....	44
Abb. 17: Effekte von Temozolomid, Clomipramin und Quinacrin auf die Aktivität der Caspase-3 in C6 Zellen nach 48 Stunden .....	46
Abb. 18: Effekte von Temozolomid, Clomipramin und Quinacrin auf die Aktivität der Caspase-3 in U343 Zellen nach 48 Stunden .....	47
Abb. 19: Effekte von Temozolomid, Clomipramin und Quinacrin auf die Expression von VEGF-A in U343 Zellen nach 24 Stunden .....	50

Abb. 20: Legende Elektronenmikroskopie.....	51
Abb. 21: Unstimulierte Glioblastomzelle der Zelllinie C6 nach 48 Stunden .....	52
Abb. 22: Glioblastomzellen der Zelllinie C6 nach 48-stündiger Stimulation mit 20 $\mu$ M Clomipramin .....	53
Abb. 23: Glioblastomzelle der Zelllinie C6 nach 48-stündiger Stimulation mit 10 $\mu$ M Temozolomid .....	54
Abb. 24: Glioblastomzelle der Zelllinie C6 nach 48-stündiger Stimulation mit 200 $\mu$ M Temozolomid .....	55
Abb. 25: Glioblastomzelle der Zelllinie C6 nach 48-stündiger Stimulation mit 10 $\mu$ M Quinacrin .....	56
Abb. 26: Glioblastomzelle der Zelllinie C6 nach 48-stündiger Stimulation mit 50 $\mu$ M Temozolomid + 20 $\mu$ M Clomipramin.....	57
Abb. 27: Unstimulierte Zelle der Glioblastomzelllinie U343 nach 48 Stunden .....	58
Abb. 28: Glioblastomzelle der Zelllinie U343 nach 48-stündiger Stimulation mit 5 $\mu$ M Clomipramin .....	59
Abb. 29: Glioblastomzelle der Zelllinie U343 nach 48-stündiger Stimulation mit 20 $\mu$ M Clomipramin .....	60
Abb. 30: Glioblastomzelle der Zelllinie U343 nach 48-stündiger Stimulation mit 10 $\mu$ M Temozolomid .....	61
Abb. 31: Glioblastomzelle der Zelllinie U343 nach 48-stündiger Stimulation mit 200 $\mu$ M Temozolomid .....	62
Abb. 32: Glioblastomzelle der Zelllinie U343 nach 48-stündiger Stimulation mit 50 $\mu$ M Temozolomid + 20 $\mu$ M Clomipramin.....	63
Abb. 33: Glioblastomzellen der Zelllinie U343 nach 48-stündiger Stimulation mit 50 $\mu$ M Temozolomid + 1 $\mu$ M Quinacrin .....	64
Abb. 34: Mechanismen des Zelltodes .....	78

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: WHO-Klassifizierung der ZNS-Tumore .....	1
Tab. 2: Prognose des Glioblastoms (nach Shawl et al. 2003) .....	4
Tab. 3: Stupp Schema (nach Stupp et al. 2002) .....	5
Tab. 4: Übersicht Clomipramin .....	8
Tab. 5: Übersicht Quinacrin.....	9
Tab. 6: Liste lysosomotroper Substanzen .....	11
Tab. 7: Schritte der Real-Time-RT-PCR .....	27
Tab. 8: Übersicht Apoptose, Autophagozytose, Nekrose.....	80

## Abkürzungsverzeichnis

BAX:	BCL-2 associated X protein, Apoptoseregulatorprotein
BCL-2:	B-cell lymphoma 2, Apoptoseregulatorprotein
cDNA:	<i>Copy Deoxyribonucleic Acid</i>
Ct:	Cycle of threshold - Schwellenwertzyklus
CXCR:	CXC-Chemokinrezeptor
DMEM:	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNA:	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> – Desoxyribonukleinsäure
DNase:	Desoxyribonuklease
dNTP:	Desoxynucleosidtriphosphat
DDT:	Dithiothreitol
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR:	Epidermal Growth Factor Receptor
ELMI:	Elektronenmikroskopie
FAS:	FAS-Rezeptor
FKS:	Fetales Kälberserum
GAPDH:	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GBM:	Glioblastom
GFAP:	Glial fibrillary acidic protein
X-JÜR:	X-Jahres Überlebensrate
MÜR:	Mittlere Überlebensrate
p53:	Tumorsuppressor Protein 53
PBS:	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCD:	<i>Programmed Cell Death</i>
PCR:	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)



PTEN:	Phosphatase and Tensin homolog
RNA:	<i>Ribonucleic Acid</i> - Ribonukleinsäure
RNase:	Ribonuklease
VEGF:	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> – Signalmolekül in der Vaskulogenese
VEGFR:	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>
TMZ:	Temozolomid
TNF-alpha:	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i> – Tumornekrosefaktor

# 1 Einleitung

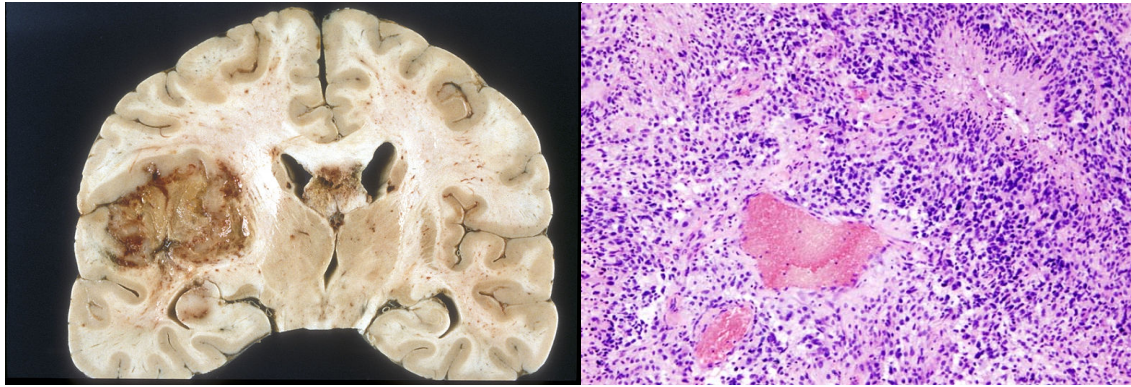
## 1.1 Glioblastome

Das Glioblastom (Glioblastoma multiforme) ist ein glialer Tumor, welcher sich von Astrozyten ableitet. Das Glioblastom (GBM) macht 15-20 % aller hirneigenen Tumore aus und ist somit der häufigste Hirntumor (Kleihues et al. 1993). Die Inzidenz in Nordamerika und Europa liegt bei 2,9-3,5 Neuerkrankungen pro Jahr pro 100.000 Einwohner. Männer und Frauen sind in einem Verhältnis von 1,7:1 betroffen (Ohgaki et al. 2004). In der Klassifizierung durch die Weltgesundheitsorganisation (WHO) – nach vornehmlich histologischen Gesichtspunkten (Kleihues et al. 2002, Louis et al. 2007) – entspricht das Glioblastom Grad IV, dem höchsten Malignitätsgrad.

WHO-Grad	Histologie/Prognose	Tumor (Beispiel)
I	Histologisch gutartig → meist heilbar	Pilozytisches Astrozytom
II	Histologisch gutartig, aber infiltrierend wachsend → Rezidive	Diffuses Astrozytom
III	Histologisch bösartig → lebensbegrenzend	Anaplastisches Astrozytom
IV	Histologisch äußerst bösartig → meist infauste Prognose	Medulloblastom, Glioblastom

**Tab. 1: WHO-Klassifizierung der ZNS-Tumore**

Der Tumor ist meist in der Balkenregion einer der beiden Großhirnhemisphären lokalisiert, wodurch ein Progress in die jeweils andere Hemisphäre möglich ist („Schmetterlingsgliom“). Das Glioblastom zeichnet sich aus durch ein diffus infiltrierendes Wachstum, Nekrosen und Einblutungen – histologisch ist das Glioblastom ein polymorpher und zellreicher Tumor mit starker Gefäßproliferation, hoher Mitoserate und großer Heterogenität.



**Abb. 1: Makroskopie und Mikroskopie eines Gehirns mit Glioblastom (Abbildungen: Sbrandner)**

Links ist ein Koronarschnitt durch ein mit Formalin fixiertes Gehirn mit Glioblastom abgebildet. Der Tumor stellt sich als partiell nekrotischer Bereich in der linken Hemisphäre dar. Rechts ist die Histologie eines Glioblastoms in Hämatoxylin-Eosin-Färbung dargestellt. Zu sehen sind Nekrosen und pleomorphe Glioblastomzellen. Die Abbildungen stammen aus Wikipedia.de (*Creative Commons*) und wurden von ihrem Urheber (Sbrandner) zur allgemeinen Nutzung freigegeben.

Überdies weisen Glioblastome oft genetische Veränderungen auf (TP53, PTEN, EGFR), die sie weniger anfällig für apoptotische Vorgänge machen. TP53 steht hier für Tumorsuppressor Protein 53, bekannt auch als p53. PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog*) ist eine Phosphatase, die ebenfalls an der Regulierung des Zellzyklus beteiligt ist. In aktiver Form kann PTEN den Zelltod einleiten. EGFR steht für *Epidermal Growth Factor Receptor* – es handelt sich dabei um einen Wachstumsfaktor (Iwadate et al. 1996, Haas-Kogan et al. 1998, Roth and Weller 1999, Mohri 2000). Sämtliche dieser Eigenschaften führen sehr häufig zu Resistenzen gegenüber den verschiedenen verfügbaren therapeutischen Ansätzen (Hosli et al. 1998, Galanis and Buckner 2000, Kleihues et al. 2002)

Mittels Immunhistochemie lässt sich die Abstammung von Astrozyten bestätigen. Häufig ist das astrozytäre Zytoskelettprotein *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) nachweisbar (Abaza et al. 1998). Astrozyten erfüllen im Zentralnervensystem unterschiedlichste essentielle Aufgaben. Unter anderem sind sie an der Aufrechterhaltung des extrazellulären Milieus, der Funktionalität von Synapsen und dem Aufbau der Blut-Hirn-Schranke beteiligt.

Glioblastome lassen sich in eine primäre und eine sekundäre Form unterteilen. Primäre Glioblastome entstehen *de novo* vor allem bei Personen über 45 Jahren (Zülch 1986). Sekundäre Glioblastome treten vermehrt bei Personen mittleren Alters (30 bis 50 Jahre) auf und entstehen oft aus anaplastischen oder niedrig gradigen Astrozytomen (Brat et al. 2002). Sie weisen besonders häufig Mutationen in einem für das Protein p53 kodierenden Gen auf. Einem Protein, das maßgeblich an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt ist (Aguzzi et al. 2008).

Die durch ein Glioblastom hervorgerufenen Symptome hängen signifikant von der Lokalisation des Glioblastoms im ZNS ab. Die häufigste Lokalisation ist frontotemporal. Die Patienten fallen partiell durch Persönlichkeitsveränderungen, neu auftretende Vergesslichkeit oder andere neurologische Defizite auf. Des Weiteren können Kopfschmerzen, Erbrechen, Krämpfe etc. auftreten. Allerdings kann das Glioblastom eine enorme Größe erreichen, bis es letztlich erst spät zu Symptomen kommt.

Die Prognose des Glioblastoms ist nach wie vor infaust. Die mittlere Überlebenszeit ab Diagnose liegt bei 9-12 Monaten (Stupp et al. 2005). Das 2-Jahres-Überleben liegt bei 8-14 % (Stupp et al. 2009) und die 5-Jahres-Überlebensrate bei 3 % (Louis et al. 2007). Diese sehr schlechte Prognose lässt sich hauptsächlich durch die bereits erwähnte Heterogenität des Tumors und die dadurch entstehenden Resistenzen erklären. Innerhalb des Tumors verbleiben trotz intensiver Behandlung meist Subpopulationen vitaler Zellen bestehen, die in der Lage sind, ein erneutes Tumorwachstum nach Resektion zu initiieren (Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. 2004). Dadurch kommt es bei einem Großteil der Patienten im Umkreis von 2 cm um den ursprünglichen Tumorfokus zu Rezidivtumoren (Hochberg et al. 1980).

RPA <sup>1</sup> Klasse	Definition	MÜR <sup>3</sup>	1-JÜR <sup>4</sup>	3-JÜR <sup>4</sup>	5-JÜR <sup>4</sup>
<b>III</b>	<50 Jahre KPS <sup>2</sup> ≥90	17,1 Monate	70 %	20 %	14 %
<b>IV</b>	<50Jahre KPS<90	11,2 Monate	46 %	7 %	4 %
	>50Jahre KPS≤70 Post OP -> gute Funktion				
<b>V+VI</b>	≥50Jahre KPS≤70 Post OP -> schlechte Funktion	7,5 Monate	28 %	1 %	0 %
	≥50Jahre KPS≥70 Keine OP				
	≥50Jahre KPS<70				

**Tab. 2: Prognose des Glioblastoms (nach Shawl et al. 2003)**

<sup>1</sup> RPA: *Recursive Partitioning Analysis*

<sup>2</sup> KPS: Karnofsky-Index

<sup>3</sup> MÜR: Mittlere Überlebensrate

<sup>4</sup> JÜR: x-Jahres Überlebensrate

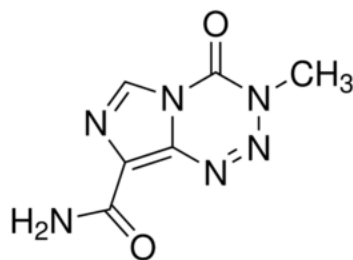
Die momentane Therapie besteht aus einer möglichst vollständigen chirurgischen Resektion, gefolgt von einer Radiotherapie oder einer kombinierten Radio-Chemotherapie (Stupp et al 2005). Eine vollständige chirurgische Resektion ist aufgrund des diffus infiltrativen Wachstums in aller Regel nicht möglich. Es verbleiben stets Reste des Tumors (Hentschel et al. 2003). Die kombinierte Radio-Chemotherapie wird nach dem Stupp-Schema (Stupp et al. 2002) durchgeführt.

Bestrahlung	Chemotherapie (Temozolomid)
60Gy ( $\gamma$ -Strahlung) ->2 Gy/d (30 Tage)	Begleitend: 75 mg/m <sup>2</sup> täglich für die Dauer der Radiatio Adjuvant: 150-200 mg/m <sup>2</sup> für 5 Tage alle 4 Wochen

**Tab. 3: Stupp Schema (nach Stupp et al. 2002)**

Das verwendete Chemotherapeutikum ist das orale Alkylanz Temozolomid. Mit keiner dieser Therapien ist jedoch eine Heilung zu erreichen. Ziel ist es, Symptome zu lindern und das Überleben zu verlängern.

### 1.2 Temozolomid (Temodal®)



**Abb. 2: Strukturformel Temozolomid**

Temozolomid ist das Standard-Chemotherapeutikum (1999 zugelassen) in der Behandlung des Glioblastoms und wird in Kombination mit einer Bestrahlungstherapie nach dem Stupp Schema (Stupp et al. 2005) appliziert. Die verwendete Dosis ist 75 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche. Diese Dosis wird täglich während der Strahlentherapie verabreicht. Die Bestrahlung erfolgt 5 Tage pro Woche mit 2 Gy über 6 Wochen (Stupp et al. 2005). Im Anschluss an die Bestrahlung erhält der Patient 150-200 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche für 5 Tage innerhalb eines 28-tägigen Zykluses. Temozolomid gehört zur Gruppe der monofunktionellen alkylierenden Zytostatika. Der aktive Metabolit des Temozolomids ist MITC (5-(3-Methyl)-1-Triazen-1-yl-imidazol-carboxamid). Dieser methyliert spezifisch das mittlere Guanin einer GGG-Sequenz.

Diese Methylierung führt schließlich über fehlerhafte DNA-Mismatch-Reparaturen zur Apoptose der betroffenen Tumorzelle (Mason et al. 2005, Roos et al. 2007) und somit zu einem Stopp bzw. einer Verlangsamung des Tumorwachstums (Stupp et al. 2002).

Der zelleigene Gegenspieler von Temozolomid und einer der Hauptgründe für Resistenzen ist das Reparaturenzym  $O^6$  – Methylguaninmethyltransferase (MGMT). Die MGMT ist in der Lage, die Methylierung durch MTC effektiv zu entfernen und so die zytostatische Wirkung von Temozolomid drastisch zu reduzieren (Hegi et al. 2008). Es kommt jedoch bei einem Teil der Tumoren zu epigenetischen Veränderungen in Form von Methylierungen einer MGMT-Promoterregion, welche dazu führen, dass die MGMT-Expression eingestellt wird und Temozolomid in vollem Umfang wirken kann. Das Fehlen von MGMT hat einen signifikant positiven Einfluss auf die Wirkung der Chemotherapie und die Überlebenszeit (Paz et al. 2004, Hegi et al. 2004). Bei Patienten, welche diese methylierte Promoterregion nicht vorwiesen, hatte Temozolomid einen deutlich geringeren Effekt (Hegi et al. 2004).

Wie bereits erwähnt, wird Temozolomid oral als Chemotherapie zusätzlich zu einer Bestrahlungstherapie und daran anschließend verabreicht. In einer aktuellen Studie konnte gezeigt werden, dass die zusätzliche Gabe von Temozolomid zur postoperativen Bestrahlungstherapie das mittlere Überleben von 12,1 auf 14,6 Monate verlängerte (Stupp et al. 2005; Koshy et al. 2012). Zum momentanen Zeitpunkt wird an mehreren Stellen versucht, die Wirkung von Temozolomid durch die Kombination mit anderen Substanzen zu verstärken. Unter anderem zeigten sich positive Effekte bei der Kombination mit Chloroquin, einer Substanz aus der Gruppe der FIASMA (Glibert MR 2006, Sotelo et al. 2006, Briceno et al. 2003). Hier stieg das mittlere Überleben durch die tägliche Gabe von 150 mg Chloroquin zusätzlich zur Standardtherapie um 13 Monate im Vergleich zur Kontrolle (Gilbert MR 2006). Diese und andere Studien zeigen, dass in der Therapie des Glioblastoms noch großes Potenzial für Verbesserungen herrscht, welches unter allen Umständen genutzt werden muss.

### 1.3 Clomipramin (Anafranil®)

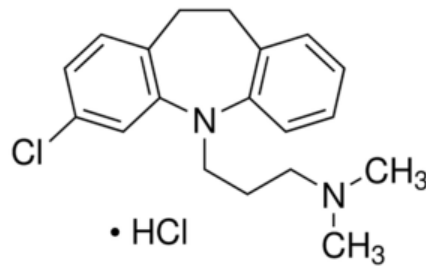


Abb. 3: Strukturformel Clomipramin

Clomipramin gehört zur Gruppe der trizyklischen Antidepressiva und ist ein Derivat von Imipramin, von dem es sich durch einen Chlor-Substituenten unterscheidet. Es wird seit 2002 zur Behandlung von Depressionen, Angststörungen, Narcolepsie, chronischer Schmerzen, Kataplexie etc. eingesetzt. Die therapeutische Dosis liegt bei 10 bis 250 mg pro Tag.

Es ist zuerst ein starker Serotonin- (*SRI*) und Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (*NARI*). Zudem hat Clomipramin anti-dopaminerge, anti-histaminische und anti-cholinerge Effekte. Ein weiterer therapeutischer Effekt ist die Downregulation von beta-Adrenorezeptoren.

Zusätzlich hat Clomipramin einen Einfluss auf den lysosomalen Lipidstoffwechsel. Hier hemmt es die Saure Sphingomyelinase und gehört somit zur pharmakologischen Gruppe der *FIASMA* (*Functional Inhibitors of Acid Sphingomyelinase*) (Kornhuber et al. 2011). Wie bereits erörtert, ist Clomipramin ein Derivat des Imipramins, das ebenfalls zur Gruppe der *FIASMA* gehört. An anderer Stelle konnte bereits dargelegt werden, dass Imipramin bei Glioblastomzellen zwar nicht zur Apoptose führt, jedoch in der Lage zu sein scheint, Autophagozytose-Prozesse anzustoßen, die letztlich zum Absterben von U-87MG Glioblastomzellen führten (Seung-Hyun Jeon et al. 2011). Aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit Clomipramins zu Imipramin ist eine ähnliche Wirkungsweise durchaus anzunehmen und in Anbetracht der nach wie vor inadäquaten Behandlung von Glioblastomen von großem Interesse.

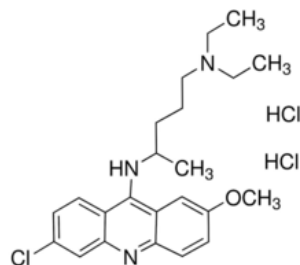


Handelsname	Anafantil
Klasse	TCA <sup>1</sup>
Summenformel	C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>2</sub> HCL
HWZ	32Std.
Molare Masse	314,9g/mol

**Tab. 4: Übersicht Clomipramin**

<sup>1</sup> TCA: Trizyklische Antidepressiva

### 1.4 Quinacrin (Mepacrin)



**Abb. 4: Strukturformel Quinacrin**

Quinacrin gehört zur Gruppe der Antiprotozoika und ist ein Derivat von 9-Aminoacridin, welches insbesondere zur Behandlung und Prophylaxe der Malaria eingesetzt wurde (Duncan 1945). Die antiprotozoische Wirkung von Quinacrin ist unklar, man geht jedoch davon aus, dass Quinacrin die Zellmembranen von Protozoon angreift. In der Behandlung der Malaria hat Quinacrin heute keine Bedeutung mehr, weil es von wirkungsvolleren Präparaten, wie z. B. Chloroquin, abgelöst wurde. Außerdem diente Quinacrin in der Vergangenheit als Kontrazeptivum, da es eine asymptotische Fibrosierung der Eileiter hervorruft (Zipper et al. 1970, Hieu et al. 1993). Heute wird Quinacrin *off label* zur Behandlung von Metronidazol resistenten Giardiosen (Gardner 2001), systemischen Lupus Erythematoses (Wallace 1989), Prionen Erkrankungen (Collinge et al. 2009), zur Pneumothorax-Prophylaxe bei zystischer Fibrose und z. T. zur Behandlung verschiedener Neoplasien eingesetzt (Reza Ehsanian et al. 2011, Mohapatra et al. 2012, Preet et al. 2012). Die übliche Dosierung für Erwachsene bei oraler Applikation ist bis zu 3 Mal täglich 100mg. In verschiedenen Arbeiten konnte bereits

gezeigt werden, dass Quinacrin zytotoxisch auf Krebszellen in Lunge, Pankreas, Brust und Niere wirkt (Mohapatra et al 2012). Des Weiteren konnten Iwai-Kanai et al. zeigen, dass der „Nachfolger“ von Quinacrin, das Chloroquin, bei verschiedenen Karzinomen Autophagozytose einzuleiten vermag. Wie Quinacrin gehört auch Chloroquin zur Gruppe der lysosomotropen Arzneimittel.

Klasse	Antiprotozoikum
Summenformel	$C_{23}H_{30}ClN_3O$
HWZ	5-14 Tage
Molare Masse	399,9g/mol

**Tab. 5: Übersicht Quinacrin**

In verschiedenen weiteren Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass Quinacrin stabilisierend bzw. aktivierend auf das Tumorsuppressorgen p53 wirkt (Gurova et al. 2005; Reza Ehsanian et al. 2011). Wie bereits von Aguzzi et al. gezeigt, ist dies ein Protein, welches bei Glioblastomen häufig von Mutationen betroffen ist. Zudem konnte festgestellt werden, dass Quinacrin inhibierend auf  $NF_{\kappa}B$  wirkt (Gurova et al. 2005).  $NF_{\kappa}B$  ist ein Transkriptionsfaktor, der stimulierend, aber z. T. auch inhibierend auf verschiedene Gene einwirken kann und u. a. an Entzündungsprozessen und Tumorwachstum beteiligt zu sein scheint (Orlowski et al. 2002).

Sämtliche dieser Informationen deuten einen möglichen positiven Beitrag Quinacrins bei der Behandlung neoplastischer Erkrankungen an. Und einiges weist darauf hin, dass Quinacrin gerade auch in der Behandlung von Glioblastomen von Nutzen sein könnte - ein Tumor, der aufgrund mangelhafter Behandlungsoptionen bis heute eine infauste Prognose aufweist.

### 1.5 Lysosomotrope FIASMA-Arzneimittel

Lysosomotrope Arzneimittel sind lipophile Substanzen, die in ungeladener Form membrangängig sind. Sie können sowohl Zellmembranen als auch Lysosomen-

membranen durchdringen. Im sauren Milieu der Lysosome werden diese Substanzen dann protoniert, wodurch ein Entweichen nicht mehr möglich ist („*acidic trap*“). Dementsprechend kommt es zu einer Akkumulation dieser Substanzen in Lysosomen.

Außerdem hemmen lysosomotrope Arzneimittel die saure Sphingomyelinase, daher der Name *Functional Inhibitors of Acid SphingoMyelinAse (FIASMA)*. Die saure Sphingomyelinase befindet sich in Lysosomen und spaltet Sphingomyelin in Sphingosin und Ceramid. Ceramid hat großen Einfluss auf die Regulation der Zellproliferation, daher führt die Hemmung der sauren Sphingomyelinase zu Beeinträchtigungen dieser Prozesse. Ein totales Fehlen der sauren Sphingomyelinase führt zur Niemann-Pick-Krankheit, deren Hemmung durch *FIASMA* tut dies allerdings nicht (Kornhuber et al. 2010). In C6 Ratten-Glioblastomzellen konnte gezeigt werden, dass einige trizyklische Antidepressiva (Paroxetin, Clomipramin und Fluoxetin), welche ebenfalls zur Gruppe der *FIASMA* gehören, Zelltod-assoziierte Prozesse aktivieren (Lekovitz et al. 2005). In einer anderen Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass Clomipramin die zytotoxische Wirkung des Tyrosin-Kinase-Inhibitors Imatinib über eine synergistische Steigerung der Autophagozytose-Prozesse potenzieren konnte (Bilir et al. 2008).

Alverine	Clomiphen	Fluphenazin	Pimethixene
Amiodaron	<b>Clomipramin</b>	Fluvoxamin	Pimozid
Amitriptylin	Cloperastin	Hydroxyzin	Profenamine
Amlodipin	Conessin	Imipramin	Promazin
Aprindine	Cyclobenzaprine	Lofepramin	Promethazin
Astemizol	Cyproheptadin	Loperamid	Protriptylin
AY9944	Desipramin	Loratadin	Sertindol
Benzatropin	Desloratadin	Maprotilin	Sertralin
Bepidil	Dicyclomin	Mebeverin	Solasodine
Biperiden	Dilazep	Mebhydrolin	Suloctidil
Camylofin	Dimebon	<b>Quinacrin</b>	Tamoxifen
Carvedilol	Doxepin	Mibefradil	Terfenadin
Cepharanthine	Drofenin	Norfluoxetine	Thioridazin
Chlorpromazin	Emetin	Nortriptylin	Tomatidine
Chlorprothixen	Fendilin	Paroxetin	Trifluoperazin
Cinnarizine	Flunarizin	Penfluridol	Triflupromazin
Clemastin	Fluoxetin	Perhexiline	Trimipramin
Clofazimin	Flupentixol	Perphenazin	Zolantidine

**Tab. 6: Liste lysosomotroper Substanzen**

Die Autophagozytose ist ein kataboler Prozess, bei dem intrazelluläre Bestandteile einer Zelle in Vesikeln abgeschnürt und letztlich in Lysosomen abgebaut werden. Dieser Prozess dient eigentlich über den Abbau alter Zellbestandteile der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen Auf- und Abbau verschiedener Zellbausteine (Levine et al. 2004). Allerdings kann die Autophagozytose auch zum Absterben einer Zelle führen. Diese Art des programmierten Zelltodes (*PCD*) wird von der reinen Apoptose (*PCD*-Typ 1) differenziert und als *PCD*-Typ 2 bezeichnet. Diese den Zelltod einleitenden, bzw. begünstigenden Prozesse können u. a. durch externe Reize, wie Hypoxie, Mangelversorgung mit Nährstoffen, aber auch durch Chemotherapeutika ausgelöst werden (Mortimore et al. 1977, Ferraro & Cecconi 2007, Seung-Hyun Jeon et al. 2011).

Die Autophagozytose muss aber keineswegs immer eine negative Wirkung auf Krebszellen haben. Sie kann sowohl „Tumor-hemmend“ als auch „Tumor-fördernd“ wirken (White 2012).

Nichtsdestotrotz hat die Autophagozytose in der letzten Zeit Aufsehen erregt und gilt als eine Möglichkeit, Resistenzen von entarteten Zellen in der Karzinom-Therapie zu umgehen.

## **2 Fragestellung**

Angesichts der nach wie vor nur beschränkten Wirksamkeit der Therapie des Glioblastoms und der damit verbundenen desaströsen Prognose dieses Tumors ist es von höchstem Interesse und größter Dringlichkeit, neue Therapieansätze zu finden und zu evaluieren.

Das Ziel der vorliegenden Thesis besteht darin, die Wirkung zweier vielversprechender Substanzen (Clomipramin, Quinacrin) aus der Gruppe der lysosomotropen Arzneimittel (FIASMA) auf verschiedene Glioblastom-Zelllinien (U343, A764, C6) *in vitro* zu untersuchen.

Zunächst gilt es, die Effekte Clomipramins und Quinacrins mit der des Standardchemotherapeutikums Temozolomid zu vergleichen.

Anschließend sollen die genannten Substanzen untereinander kombiniert werden und auf mögliche additive oder synergistische Effekte hin untersucht werden.

Abschließend sollen die zum Zelltod führenden Mechanismen der jeweiligen Wirkstoffe mittels zellbiologischer Methoden und elektronenmikroskopischer Aufnahmen genauer betrachtet werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Geräte

Autoklav 5050 ELV	Tuttnauer Systec, Breda, NL
Brutschränke	Heraeus, Hanau, D
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Heraeus, Hanau, D
Feinwaage	Satorius, Göttingen, D
Fluoreszenzspektrophotometer	F2000, Hitachi, Tokio, Japan
Inverses Mikroskop	Anxiovert 200M, Zeiss, Jena, D
Laborgebläse Typ 5018	Privileg, Stuttgart, D
Lichtmikroskop CK2	Olympus, Hamburg, D
Magnetrührer	MR2000, Heidolph, Schwabach, D
Neubauer-Zählkammer	Roth, Karlsruhe, D
Photometer	Ultrospec 3100 pro, Amersham Biosciences, UK
Pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte, Herrenberg, D
Real-Time PCR Gerät	ABI Prism-7700 SDS, Applied Biosystems, Foster City CA, USA
Sterilwerkbank HeraSafe	Heraeus, Hanau, D
Thermocycler	T-Gradient Biometra, Göttingen, D
Transmissionselektronenmikroskop	900M, Zeiss, Jena, D
Vortex-Mixer	VF2, Janke & Kunkel, Staufen, D
Wasserbad	Köttermann, Uetze/Hänigsen, D
Zentrifugen	Biofuge pico, Heraeus, Hanau, D DigifugeGL, Heraeus, Hanau, D Cenrifuge 5417R, Eppendorf, HH, D

##### 3.1.2 Chemikalien

Aceton	Roth, Karlsruhe, D
Amphotericin	PAN, Mailand, I
Araldit	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Araldite M Accelerator	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Bradford Reagenz	BioRad Laboratories, München, D
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, D
Chloroform	Merck, Darmstadt, D
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
dNTP-Mix (Desoxynucleosidtriphosphat)	Thermo Scientific, Bonn, D
DTT (Dithiotreitol)	BIOMOL, Hamburg, D
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Ethanol	Roth, Karlsruhe, D
FCS (Fetales Kälberserum)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AU
Glutamin	Roth, Karlsruhe, D
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, D
Methanol	Roth, Karlsruhe, D
Osmium (VIII) Oxid	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
PBS Puffer	Roth, Karlsruhe, D
Pferdeserum	PAN, Mailand, I
Penicillin / Streptomycin	Life Technologies, Carlsbad, USA
Propanol	Roth, Karlsruhe, D
Propylen	Roth, Karlsruhe, D
QIAzol Lysis Reagent	Qiagen, dt. Niederlassung, Hilden, D
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D

Trypsin EDTA  
Uranylacetat Dihydrat

Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D  
Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D

### 3.1.3 Puffer

Lysispuffer

50 mM TRIS, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA,  
1 % Triton X-100, 1:500/2 mM Vanadat,  
1:100 Glycerophosphat, pH 7,4

PBS

8,0 g NaCl (136 mM), 0,2 g KCl (2,7 mM),  
0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,8 mM), 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (8mM);  
auf 1 l H<sub>2</sub>O dest., pH 7,2 - 7,4

Trypsin-Lsg.

24 ml PBS, 1 ml 2,5 % Trypsin, 37 mg EDTA, steril filtriert

### 3.1.4 Verbrauchsmaterialien

6-Well-Kulturschalen  
96-Well-Platten für rtPCR  
Abdeckfolie  
Deckgläser  
Eppendorfgefäße  
Kosmetiktücher  
Latex-Handschuhe  
Nitril-Handschuhe  
Objektträger  
Pasteur Pipetten 230ml  
Pipettenspitzen  
Parafilm M Pechiney  
Sterile Plastikröhrchen  
Sterile Spritzen (10 ml)  
Vernichtungsbeutel  
Whatmann-Papier  
Zellkulturflaschen  
Zellkulturschalen  
Zellschaber

Greiner, Frickenhausen, D  
Sarstedt, Nürnberg, D  
Sarstedt, Nürnberg, D  
Menzel-Gläser, Braunschweig, D  
Eppendorf, Hamburg, D  
Ahrensfelde, D  
ROTH, Karlsruhe, D  
ROTH, Karlsruhe, D  
Carl Roth, Karlsruhe, D  
Roth, Karlsruhe, D  
Sarstedt, Nürnberg, D  
Plastic Packaging, Chicago, USA  
Sarstedt, Nürnberg, D  
Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA  
Sarstedt, Nümbrecht, D  
BioRad Laboratories, München, D  
Sarstedt, Nürnberg, D  
Sarstedt, Nürnberg, D  
Greiner Bio-One, Frickenhausen, D

### 3.1.5 Stimulantien

Clomipramin Hydrochlorid Pulver  
(≤98 % HPLC)

Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D

Quinacrin Dihydrochlorid (98 %)

Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D

Temozolomid (≤98 % HPLC)

Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D

### 3.1.6 Kits/Assays

Caspase 3-Assay Asp-Glu-Val-  
Asp-AMC  
TaqMan® Universal Master Mix  
mit AmpErase® UNG, 4304437

Bachem, Torrance, CA, USA

Applied Biosystems, Branchburg, NJ, USA



### 3.1.7 Enzyme

DNase (RNase-frei)	Fermentas, St.Leon-Rot, D
ReverseAid™ TH Minus M-MuLV	Fermentas, St.Leon-Rot, D
Reverse Transkriptase	
RNase(DNase-frei)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D

### 3.1.8 TaqMan® Primer Probes

Applied Biosystems, Branchburg, NJ, USA

<u>Primer</u>	<u>ID-Nummer</u>
CXCR-4	HS500607978 s1
CXCR-7	HS500664172 s1
GAPDH	HS99999905 m1
VEGF-A	HS00900055 m1
VEGF-C	HS500153458 m1
VEGF-D	HS00189521 m1
VEGFR-2/FLT1	HS00176573 m1
VEGFR-2/KDR	HS00176676 m1

### 3.1.9 Zellkulturmedium

Dulbecco´s Modified Eagle Medium mit 4 mM Glucose (DMEM) (PAN Cat.No P04-05540)	Gibco, Life Technologies, Darmstadt, D / PAN Biotech GmbH, Aidenbach, D
---	--

### 3.1.10 Zelllinien

#### A764

Bei der A764-Zelllinie handelt es sich um eine humane Glioblastomzelllinie, die durch wiederholtes Subkultivieren aus einer primären Glioblastomkultur gewonnen worden ist. Für die Primärkultur war ein solides humanes Glioblastom, das aus der Neurochirurgie in Kiel erhalten wurde, dissoziiert und in Kulturmedium aufgenommen worden. Die Zellen wachsen adhärent.

#### U343

Bei der Zelllinie U343 handelt es sich um eine humane Glioblastomzelllinie. Sie wächst adhärent und wurde über ATCC zugekauft.

## C6

C6 Zellen sind eine von der Ratte stammende Glioblastomzelllinie. Sie wachsen adhärent. Diese Zellen stammen vom Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ; Heidelberg, Germany).

### **3.2 Methoden**

#### **3.2.1 Zellkultur und Stimulation**

##### 3.2.1.1 Zellkultur

Die im Rahmen der Zellkultur notwendigen Arbeiten fanden alle unter sterilen Bedingungen an einer Sterilwerkbank (*Bench*) statt. Alle verwendeten Materialien wurden autoklaviert und die Werkbank regelmäßig mit 70 % Ethanol gereinigt. Außerdem wurden Arbeitsflächen und Hände vor jedem Arbeitsschritt gründlich desinfiziert. Die Kulturmedien wurden bei 4 °C gelagert und vor jeder Benutzung im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

Bei der vorliegenden Arbeit fanden die etablierten humanen Zelllinien A764, U343 und weiterhin die etablierte Ratten-Zelllinie C6 Verwendung. Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien erfolgte in Brutschränken bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit in TC 50 Kulturflaschen. Die Versorgung der Zellen erfolgte mittels Kulturmedien für Tumorzellen. Das verwendete Medium war DMEM mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS), 3 % L-Glutamin-Lösung und 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung.

##### 3.2.1.2 Subkultivierung der Zellen

Bei einer Konfluenz von über 80 % fand die Subkultivierung der Zellen statt. Im ersten Schritt wurde das Kulturmedium aus den TC 50 Flaschen abgesaugt. Daraufhin erfolgte eine Spülung der Zelloberfläche mit vorgewärmtem (37 °C) PBS. Das PBS wurde wieder abgezogen. Zum Ablösen des Zellrasens wurde eine Trypsin/EDTA Mischung verwendet. Diese wurde auf die Zellen gegeben und bei Raumtemperatur dort für 15 bis 30 Sekunden belassen. Dann wurde das Trypsin/EDTA wieder abgesogen und die Zellen bei 37 °C für etwa 3 Minuten inkubiert. Die Beurteilung der benötigten Dauer der Inkubation erfolgte durch

mehrmalige Begutachtung der Beschaffenheit des Zellrasens unter dem Lichtmikroskop. Anschließend erfolgte die Ablösung des Zellrasens durch eine Spülung mit DMEM Medium bzw. bei A764 z. T. auch durch Abkratzen der Zellen. Daraufhin wurde in der Neubauer Zählkammer die Zelldichte bestimmt und anschließend erfolgte die Aussaat der Zellen je nach geplantem Versuch in 6-*Wells* oder TC 25 Flaschen.

### 3.2.1.3 Stimulation

Die Stimulation der Zellen erfolgte, nachdem sie 48 Stunden unstimuliert anwachsen konnten. Hierfür wurde zunächst das Medium abgesaugt und frisches FCS-Medium (2 ml je *Well* und 5ml je TC25 Flasche) auf die Zellen gegeben. Danach kamen die Zellen vorerst zurück in den Brutschrank, um den Stress so gering wie möglich zu halten. Nun wurden die Verdünnungen der Stimulanzen aus den jeweiligen Stocklösungen angefertigt. Temozolomid und Chlomipramin waren jeweils in einer 100 mM Stocklösung in DMSO vorhanden, Quinacrin in einer 1  $\mu$ M Stocklösung in PBS vorhanden. Verdünnt wurde entweder mit dem DMEM Vollmedium oder mit DMSO. Bei gewissen Zielkonzentrationen wurden einzelne Stimulanzen ebenfalls unverdünnt direkt aus der Stocklösung auf die Zellen gegeben.

### **3.2.2 Bestimmung lebender und toter Zellen mittels Trypanblau und Zellzählung**

Um die Wirkungen der differenten verwendeten Substanzen auf das Wachstum der jeweiligen Zellen zu quantifizieren, wurden die Zellen nach Ende der Stimulationsphase mittels der Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop gezählt und die jeweiligen Zellzahlen untereinander in Relation gesetzt.

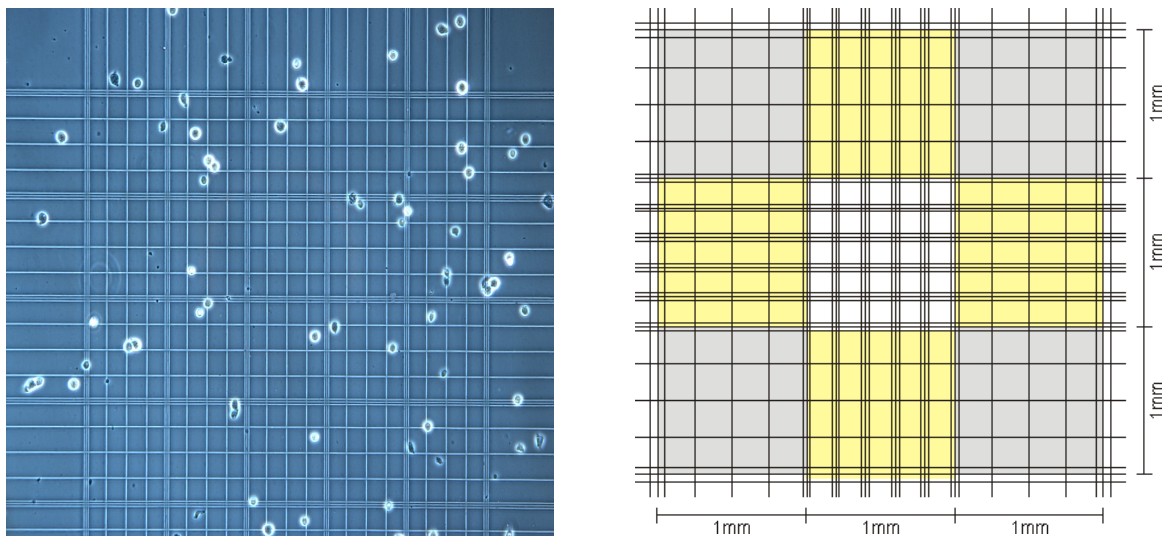
Die Bestimmung der lebenden Zellen beruht auf dem Anfärben der abgestorbenen Zellen mit Trypanblau. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, welcher nicht in der Lage ist, die Zellmembran lebender Zellen zu durchdringen.

Bei einer toten Zelle hingegen finden sich Defekte in der Zellmembran, durch die der Farbstoff ins Zytoplasma eindringen kann. Dort heftet er sich an Proteine und färbt die Zelle blau.

Im Mikroskop erscheinen lebende Zellen daher hell mit blau kontrastiertem Rand, wohingegen abgestorbene Zellen sich durch ihre dunkelblaue Färbung deutlich von intakten Zellen abheben.

Trypanblau weist eine zytotoxische Wirkung auf und darf daher nicht zu lange auf die Zellen einwirken, um eine Verfälschung der Ergebnisse zu verhindern.

Eine NEUBAUER-Zählkammer besteht aus einer circa 5 mm dicken Glasplatte von der Größe und Form eines üblichen Objektträgers. Die Oberfläche der Zählkammer ist mittels eingravierter Linien in ein feines Raster unterteilt. Die Kammer enthält 9 Großquadrate mit einer Seitenlänge von jeweils 0,2 mm. Jedes Großquadrat enthält 16 Kleinquadrate mit einer Seitenlänge von jeweils 0,05 mm. Durch Andrücken eines leicht angefeuchteten Deckglases bis zum Erscheinen Newtonscher Ringe erhält man einen exakten Abstand zwischen Deckglas und Zählkammer von 0,1 mm. Hieraus ergibt sich ein Volumen über jedem der Großquadrate von  $0,004 \text{ mm}^3$ . Zur Quantifizierung der noch lebenden Zellen wurde die Anzahl nicht gefärbter Zellen aus 5 Großquadraten summiert.



**Abb. 5: Foto und Schema einer NEUBAUER-Kammer (Abbildungen: Alcibiades)**

### 3.2.2.1 Durchführung

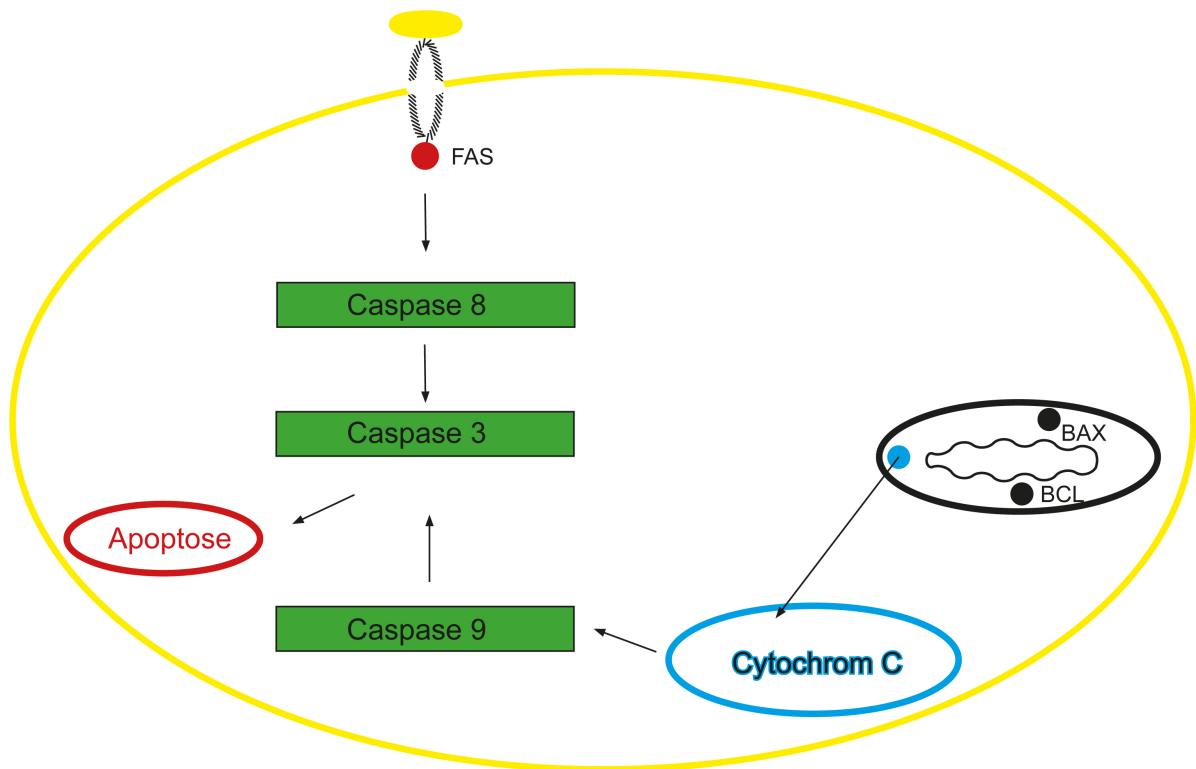
Ich mischte 30µl der Zellsuspension mit 30µl Trypanblau. Diese Suspension wurde dann durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren in einen homogenen Zustand gebracht. Darauf applizierte ich etwa 15µl der Suspension zwischen Deckglas und Objektträger, von wo diese durch Kapillarkräfte in die Zählkammer gezogen wurde.

Aus der Zellzahl und dem Verdünnungsverhältnis konnte nun die Zellzahl pro Milliliter der Suspension errechnet werden.

### **3.2.3 Caspase-3-Assay**

#### 3.2.3.1 Effektor-Caspase-3

Caspasen sind **Cystein-Proteasen**, die stets hinter **Aspartat** schneiden. Die Gruppe der Caspasen spielt eine essentielle Rolle bei apoptotischen, nekrotischen und inflammatorischen Prozessen. Man unterscheidet zwei Gruppen von Caspasen, Adaptercaspasen und Effektorcaspasen. Die Adaptercaspasen, wie z. B. Caspase-8 und Caspase-9, aktivieren die inaktiven Proformen der Effektorcaspasen durch Spaltung. Die verschiedenen Adaptercaspasen können auf unterschiedliche Weisen aktiviert werden, bspw. über Transmembranrezeptoren (Fas Rezeptor und *tumor necrosis factor receptor-1*) im Falle der Caspase-8 oder über Cytochrom C, wie bei der Caspase-9. Die aktivierten Adaptercaspasen-8 und -9 interagieren mit der Effektorcaspase-3 und aktivieren diese über proteolytische Spaltung. Die aktivierte Effektorcaspase-3 leitet schließlich die Apoptose einer Zelle ein, indem sie u. a. das Kernskelett der Zelle zerlegt.



**Abb. 6: Schematische Darstellung der Apoptose**

Dargestellt ist der schematische und vereinfachte Ablauf der Apoptose. Abgebildet ist zum einen der intrinsische Weg, bei dem Cytochrom C aus einem Mitochondrium austritt und die Adaptercaspase-9 aktiviert. Des Weiteren ist der extrinsische Weg gezeigt. Hier wird die Adaptercaspase-8 über einen Transmembranrezeptor (hier beispielhaft FAS) aktiviert. Beide Wege haben eine gemeinsame Endstrecke: Caspase-8 und Caspase-9 können die Effektorcaspase-3 aktivieren, die letztlich zur Apoptose führt.

Wie dargelegt, ist die Effektorcaspase-3 ein essentieller Bestandteil der Apoptose und somit ein sinnvoller Parameter, um die Apoptose-Aktivität in Zellen zu messen.

### 3.2.3.2 Durchführung

Ich säte Zellen der zu untersuchenden Zelllinie in TC 25ml Flaschen aus (ca. 300.000 Zellen/Flasche) und ließ sie 48 Stunden anwachsen. Nach 48 Stunden wurde das Zellmedium erneuert und Stimulanzien in bestimmten Konzentrationen auf die Zellen gegeben. Nach einer vorher festgelegten Stimulationsphase von 12 Stunden bis 5 Tagen erntete ich die Zellen, indem ich sie im Medium vom Flaschenboden abschabte. Danach wurde die Zellsuspension in ein Gefäß überführt und für 5 Minuten bei 1000 g zentrifugiert. Dann befanden sich die Zellen als Pellet am Boden des Gefäßes, und das Medium konnte abgesaugt werden. Daraufhin wusch ich die Zellen mit PBS und zentrifugierte sie nochmals für 5 Minuten bei 1000 g. Das PBS wurde abgesaugt und das Pellet wurde in etwa 150µl NP40-Lysispuffer (50 mM HEPES; pH 7,4; 100 mM NaCl; 0,1 % NP40; 10 mM DTT; 1 mM EDTA; 10 % Glycerol) gelöst. Um eine ausreichende Lysierung zu gewährleisten, behandelte ich diese Zellsuspension unter Eiskühlung mittels Ultraschall. Danach wurde sie abermals kurz zentrifugiert, um Luftblasen zu beseitigen, und schließlich in Eppendorfgefäße überführt. Abschließend wurden die Zellen für mindestens 30 Minuten bei -70 °C eingefroren.

Im nächsten Schritt erfolgte die Proteinbestimmung nach Bradford und das Einstellen von 50µg Protein auf 250µl Lysispuffer.

Im darauf folgenden Arbeitsschritt wurde das Substrat auf eine Konzentration von 40 µM in Lysispuffer verdünnt und von dieser Lösung zu jeder Probe 250µl hinzugefügt. Darauf folgte eine einstündige Inkubation der Proben bei 37 °C. Im Anschluss erfolgte die Fluoreszenzmessung.

Das Substrat ist AC-Asp-Glu-Val-Asp-AMC, welches eine Spaltungssequenz enthält, die für die Caspase-3 spezifisch ist. Außerdem beinhaltet das Substrat Fluorophor AMC (7-Amino-4-methylcumarin), das solange es, an das Substrat gebunden ist, unter UV-Licht (360 nm) blau fluoresziert. Sobald es jedoch vom Substrat abgespalten wird, emittiert es gelb-grünes Licht der Wellenlänge 460 nm. Daraus folgt, dass die Fluoreszenzintensität ( $\lambda_{\text{ex}}$  360 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  460 nm) als Maß für die Apoptoserate genutzt werden kann.

Um mögliche Hintergrundfluoreszenzen herausrechnen zu können, musste eine ausschließliche Messung der Caspase-3-Aktivität sichergestellt sein. Hierzu wurde eine Negativkontrolle mit 3µl eines kompetitiven Inhibitors des Substrates mit der Endkonzentration von 40 µM für jede Probe erstellt. Der Inhibitor (Asp-Glu-Val-Asp-CHO) wird selektiv von der Caspase-3 gebunden, jedoch nicht von ihr gespalten.

Die Messung erfolgte mit dem Fluoreszenzspektrophotometer F 2000.

### **3.2.4 Elektronenmikroskopie**

Die Zellen wurden zunächst über 48 Stunden mit Temozolomid, Clomipramin, Quinacrin und den entsprechenden Kombinationen in DMEM-Medium (FCS) stimuliert. Nach der 48-stündigen Stimulation begann die Vorbereitung der Zellen für die Elektronenmikroskopie.

Zur Akklimatisierung standen die Zellen zunächst für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Dann wurde das Zellmedium abgesaugt. Nun wurden die Zellen 3 Mal für 5 Minuten mit PBS (PH 7,4) gespült. Im nächsten Schritt erfolgte die Fixierung der Zellen mittels einer 3 %igen Glutaraldehyd-Lösung (in PBS gelöst). Die Zellen kamen jetzt über Nacht bei 4° C in einen Kühlschrank. Am nächsten Tag spülte ich die Zellen 3 Mal für jeweils 10 Minuten mit PBS.

Darauf folgend wurde eine 2 %ige Osmium (VIII)-Oxidlösung (in dest. Wasser gelöst) auf die Zellen gegeben, um eine kontrastreichere Darstellung zu erreichen. Dann kamen die Zellen für 60 Minuten unter den Abzug. Die Osmium-Lösung wurde abgesaugt und es folgte die Entwässerung.

Dazu gab ich zunächst 2 Mal für je 5 Minuten jeweils 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 % und abschließend noch 2 Mal für 10 Minuten 100 % Ethanol auf die Zellen. Im letzten Schritt der Entwässerung wurde 1,2 Propylen für 15 Minuten auf die Zellen gegeben.

Nun folgte die Einbettung. Im ersten Schritt kam ein Araldit-Gemisch (Araldite M+, DDSA) mit 3 % Araldite M Accelerator auf die Zellen und wurde 1:1 mit Propylenoxid vermischt. Da Propylenoxid Kunststoff angreift, muss bei diesem Schritt si-



chergestellt sein, dass alles in einem Glasbehälter abläuft. Dieser Behälter wurde nun über Nacht offen unter einen Abzug gestellt und die Verdunstung des Propylenoxids diente der weiteren Entwässerung.

Am nächsten Morgen überführte ich das Deckglas mit den Zellen auf einen Kunststoffteller, der ein Araldit-Gemisch (Araldite M+, DDSA) mit 2 % Araldite M Accelerator enthielt. Der Teller wurde für 5 Stunden stehen gelassen, damit sich Luftblasen absetzen konnten. Danach lagerten die Zellen für 4 Tage bei 37 °C und für 1 Tag bei 65 °C, um auszupolymerisieren.

Das Ergebnis war ein Aralditteller, in dem sich das Deckglas mit den zu mikroskopierenden Zellen befand. Nun wurde das bei der Mikroskopie störende Deckglas mittels flüssigen Stickstoffs aus dem Aralditteller herausgesprengt, wobei die Zellen am Araldit haften blieben. Es wurden dann kleine Aralditblöcke ausgesägt und mittels Technovitkleber auf kleine Araldit-Stäbe geklebt.

Es folgte das Zuschneiden der zu mikroskopierenden Schnitte. Im ersten Schritt erfolgte ein Dickschnitt von etwa 1µm mittels eines Glasmessers. Darauf hin wurden mit einem Diamantmesser Dünnschnitte von einer Dicke von 50 bis 70 nm angefertigt. Diese Dünnschnitte wurden mittels eines Kupfernetzes aufgefangen und anschließend trocknen gelassen.

Der nächste Schritt bestand in der Kontrastierung der Schnitte mittels einer gesättigten Lösung von Uranylacetat Dihydrat in 70 %igen Methanol und durch Bleicitrat. Die Lösung wurde für 5 Minuten bei 5000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und anschließend auf die Schnitte gegeben und dort für 5 Minuten belassen.

Dann wurden die Schnitte in 4 Schritten gespült. Zuerst mit 70 % Methanol, dann mit 50 % Methanol, dann mit 30 % Methanol und im letzten Schritt mit Aqua Dest. Danach mussten die Schnitte über Nacht trocknen und konnten am nächsten Tag mikroskopiert werden.

Mikroskopiert wurde mit einem Zeiss EM 900 und zwar mit 3000- bis 20000-facher Vergrößerung je nach Fragestellung.

### 3.2.5 Real Time PCR

Die *Realtime-RT-PCR* (Realtime-Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion) wird zur indirekten Quantifizierung der mRNA-Menge eines zu untersuchenden Gens eingesetzt. Dadurch können Aussagen zur Expressionsrate eines Gens in Geweben oder Zellen gemacht werden.

#### 3.2.5.1 RNA Isolierung

Um eine Realtime-RT-PCR durchführen zu können, muss zunächst die mRNA aus den zu untersuchenden Zellen isoliert werden. Die Zellen wurden in 1ml Trizol „geerntet“, dann wurden 200µl Chloroform hinzugefügt. Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur von 2-3 Minuten, anschließend wurden die Zellen bei 4 °C und 12.000 g für 15 Minuten zentrifugiert. Durch das Zentrifugieren bilden sich drei Phasen: eine untere rötliche Phenol- und Chloroform haltige Phase, eine weiße Phase in der Mitte und eine wässrige Phase, die sich ganz oben befindet. Die wässrige Phase, die die RNA enthält, wurde abgezogen. Die beiden anderen Phasen wurden verworfen.

Die wässrige Phase wurde mit 500µl Isopropanol bei Raumtemperatur für 2-3 Minuten inkubiert und für 10 Minuten mit 12000g bei 4 °C zentrifugiert. Die RNA befand sich daraufhin in Form eines Pellets am Boden des Eppendorf Gefäßes, und der Überstand wurde entfernt. Das RNA haltige Pellet wurde nun mit 1ml Ethanol versehen, gevortext und anschließend für 5 Minuten mit 7600g bei 4° C zentrifugiert. Den Überstand habe ich verworfen und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Danach löste ich das Pellet in etwa 50µl RNase freien Wassers. Diese Lösung wurde nun für 10 Minuten auf 58° Celsius erhitzt und schließlich wieder abkühlen gelassen.

Nach dem Abkühlen habe ich zur Bestimmung des RNA-Gehaltes ein Absorptionsspektrum von 240-300 nm gegen H<sub>2</sub>O bidest im Photometer gemessen (Verdünnung 1:100). RNA hat ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm, wobei eine Absorption von A<sub>260</sub> nm = 1 einer RNA-Konzentration von 41,2µl/ml entspricht (Sambrook et al. 1989). Die Reinheit der Probe errechnete sich aus dem Quotienten OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>; er sollte idealer Weise über 1,8 liegen.

### 3.2.5.2 Herstellung von cDNA

Die isolierte RNA konnte in dieser Form nicht bei der PCR eingesetzt werden, sie musste erst in DNA umgewandelt werden. Das geschah mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase.

Zunächst füllte ich die Proben (RNA-Gehalt von jeweils 1µg) mit je 7µl RNase freiem Wasser auf. Um eventuelle DNA-Verunreinigungen zu entfernen, wurden zuerst 1µl DNase-Puffer sowie 1µl DNase hinzugefügt, dieser Ansatz wurde bei 37 °C für 15 Minuten inkubiert. Danach wurde 1µl einer EDTA-Lösung (20mM) hinzugegeben. Nun erhitzte ich die Proben für 10 Minuten auf 65 °C, um so die Sekundärstruktur der RNA aufzulösen und um die DNase zu inaktivieren.

Darauf folgend wurden die Proben in Eis abgekühlt und nach Zugabe von 0,2µg Randomhexamerprimer für 5 Minuten bei 70 °C inkubiert.

Dann versetzte ich die Proben unter Eiskühlung mit dem sogenannten „*Master-mix*“, welcher je Probe 4µl 5x Reaktionspuffer, 2µl dNTP-Mix und 1µL H<sub>2</sub>O enthielt. Dieser Ansatz wurde dann für 5 Minuten bei 25 °C inkubiert.

Letztlich gab ich je Probe 1µl Reverse Transkriptase hinzu. Abschließend wurden die Proben im Thermocycler wie folgt inkubiert:

10 Minuten bei 25 °C, 60 Minuten bei 42 °C und 10 Minuten bei 70 °C.

Das daraus entstehende Endprodukt war die cDNA, die nun für RT-PCR verwendet werden konnte.

### 3.2.5.3 Real Time-PCR

Schritt	Dauer	Temperatur
Inkubation	2 min	50 °C
Aktivierung	10 min	95 °C
Denaturierung	15 sec (40 Zyklen)	95 °C
Anlagerung/Elongation	1min (40 Zyklen)	60 °C

**Tab. 7: Schritte der Real-Time-RT-PCR**

Die *Real Time* PCR wurde in einer 96-Loch-Mikroplatte durchgeführt. Je Loch legte ich 2µl einer 1:10 mit bidestilliertem Wasser verdünnten cDNA vor. Dies entsprach 10ng der ursprünglichen RNA-Menge. In jedes der Löcher wurden zudem 18µl einer vorbereiteten Mastermixlösung hinzugegeben. Diese Lösung bestand aus 1µl 20x *TaqMan primer* und Sonden (FAM markierte *TaqMan*-Sonden + unmarkierte *TaqMan* Primer), 7µl bidestilliertem Wasser und 10µl 2x *TaqMan PCR Universal Mastermix*, der die DNA Polymerase enthält. Die 96-Loch-Mikroplatte wurde verschlossen und mittels *ABI Prism®-7000 SDS Real-Time-PCR-Gerät* analysiert. Das ablaufende Programm inkludierte folgende Schritte: 2 Minuten 50 °C (UNG-Aktivierung), 10 Minuten 95 °C (Polymerase-Aktivierung), 40 Zyklen á 15 Sekunden mit 95 °C (Denaturierung) und 1 Minute 60 °C (Annealing und Elongation) mit anschließender Detektion der Fluoreszenzsignale. Die Fluoreszenz kommt durch Folgendes zu Stande: Die *TaqMan* Sonden sind Oligonukleotide, die komplementär zu einer bestimmten Sequenz der cDNA-Probe sind, die sich zwischen den beiden *Primern* befindet. Diese Oligonukleotide sind an einem Ende mit einem *Quencher* (Fluoreszenzlöscher) und am anderen Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Befinden sich *Quencher* und Farbstoff nahe beieinander, gibt der Farbstoff seine Energie an den *Quencher* ab, anstatt sie in Form von Fluoreszenz abzugeben (Förster Resonanz Energie Transfer, FRET). Findet sich im Reaktionsansatz nun eine entsprechende cDNA-Vorlage, so binden die *Primer* und die Oligonukleotide an ihre komplementären Sequenzen und die *Taq-Polymerase* beginnt daraufhin die Vervollständigung zu einem DNA-Doppelstrang. Sobald die *Taq-Polymerase* an die markierte Oligonukleotidsonde gelangt, spaltet sie diese mittels ihrer 5'-Nuklease-Aktivität ab. Dadurch kommt es

zu einer räumlichen Trennung zwischen dem *Quencher* und dem Fluoreszenzfarbstoff. Nun gibt der Reporterfarbstoff nach Anregung seine Energie in Form von fluoreszierendem Licht ab. Das *real time* PCR-Gerät ist jetzt in der Lage, mit einer entsprechenden Software den Intensitätsanstieg der Fluoreszenz zu messen und das Überschreiten eines bestimmten Schwellenwertes (*cycle of threshold*, Ct-Wert), der im Bereich der exponentiellen Steigung liegt, zu registrieren.

#### 3.2.5.4 Quantifizierung

Als Referenz für die relative Quantifizierung der Expression eines untersuchten Gens wird für jede Probe die Expression eines sogenannten Haushaltgens (*housekeeping gene*) untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde hierfür die Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH) genutzt.

Die relative Genexpression wurde nach der  $\Delta^{Ct}$ -Methode unter Verwendung der vom PCR-Gerät vorgegebenen Ct-Werte berechnet.

$$\Delta^{Ct} = Ct(\text{Gen}) - Ct(\text{GAPDH})$$

Der Ct-Wert sagt aus, wie viele Zyklen nach dem Referenzgen(GAPDH) das analysierte Gen den Fluoreszenzschwellenwert überschritten hat. Da die Amplifikationsreaktion nicht linear, sondern exponentiell verläuft, kann der  $\Delta^{Ct}$ -Wert mittels folgender Formel linearisiert werden:

$$\text{Linearisierte relative Expressionsänderung} = 2^{-(\Delta^{Ct})}$$

Daraus folgt, dass ein  $\Delta^{Ct}$ -Wert von 3,33 einer zehnfach geringeren Expression des untersuchten Gens gegenüber der des Haushaltgens entspricht.

### 3.2.6 Statistische Methoden

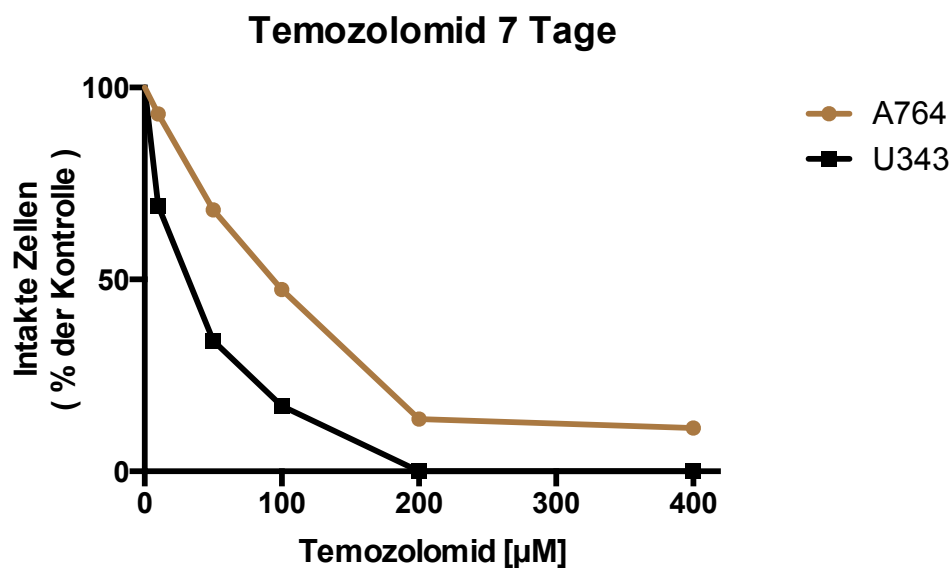
Zur Beurteilung der ermittelten Messwerte wurden Mittelwerte und die dazugehörigen Standardabweichungen errechnet und angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mittels eines zweiseitigen „*Students-t-Tests*“ ermittelt und wie folgt deklariert:

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; p\*\*\* $< 0,001$ .

## 4 Ergebnisse

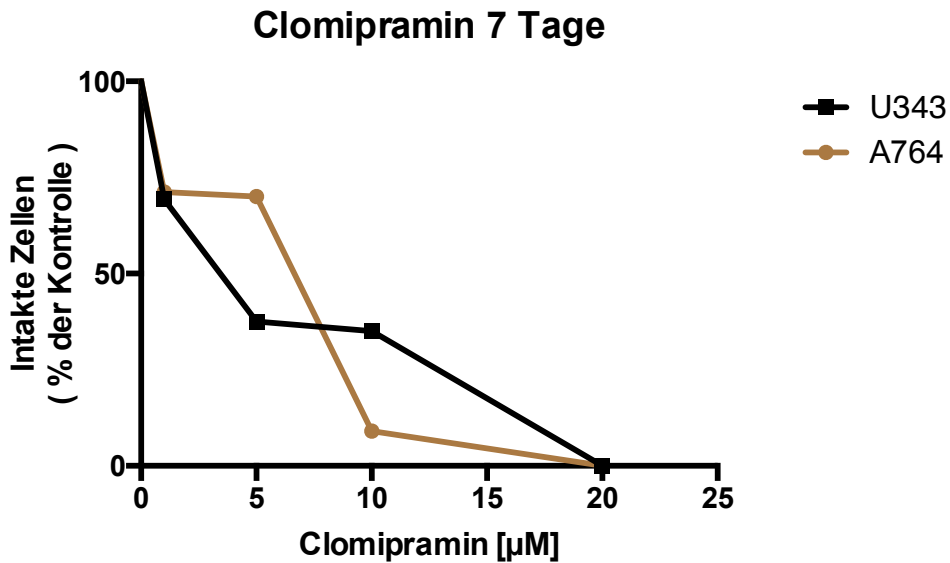
### 4.1 Vorversuche

Die in Abb. 7-8 gezeigten Versuche sind Vorversuche, die einen ersten orientierenden Überblick geben sollten. Zunächst sollten möglichst sinnvolle Konzentrationen und Stimulationsintervalle für darauffolgende Versuche ermittelt werden. Dafür wurden sowohl für Temozolomid als auch für Clomipramin Konzentrationsreihen über je 1 Woche durchgeführt (Abb. 7, 8).



**Abb. 7: Effekte von Temozolomid auf das Zellwachstum von Glioblastomzellen nach 7 Tagen**

Dargestellt ist die Anzahl intakter Zellen in Bezug auf eine DMSO-Kontrolle (0,2 %). Stimuliert wurden Zellen der humanen Glioblastom-Zelllinien A764 und U343 mit verschiedenen Konzentrationen des Zytostatikums Temozolomid über 7 Tage. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus dreifach-Bestimmungen eines Versuches.



**Abb. 8: Effekte von Clomipramin auf das Zellwachstum von Glioblastomzellen nach 7 Tagen**

Dargestellt ist die Anzahl intakter Zellen in Bezug auf eine unstimulierte Kontrolle (100 %). Stimuliert wurden Zellen der humanen Glioblastom-Zelllinien A764 und U343 mit divergenten Konzentrationen des Antidepressivums Clomipramin über 7 Tage. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus dreifach-Bestimmungen eines Versuches

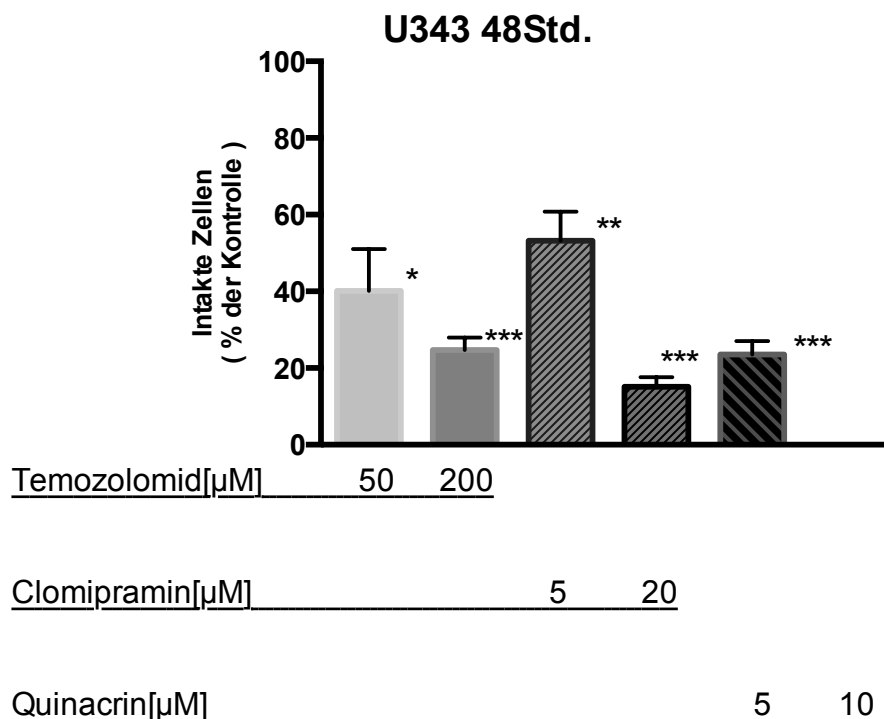
Um später additive oder synergistische Effekte mehrerer Pharmaka messen zu können, wurden für folgende Versuche Konzentrationen ausgewählt, bei denen nur ein Teil der Zellen abstarb:

- Für Temozolomid 50 µM und 200 µM.
- Für Clomipramin 5 µM und 20 µM.



## 4.2 Einzeleffekte versch. Pharmaka auf das Überleben von Glioblastomzellen

Anschließend sollte die Wirkung Temozolomids, Clomipramins und Quinacrins auf Glioblastomzellen differenzierter untersucht werden. Verwendet wurden zwei humane Glioblastom-Zelllinien (U343, A764) und eine von der Ratte stammende Glioblastom-Linie (C6). Die Zellen wurden 48 Stunden nach Aussaat über weitere 48 Stunden mit den jeweiligen Präparaten stimuliert und letztlich wurden tote und lebende Zellen mittels Trypanblau-Färbung in der NEUBAUER-Zählkammer bestimmt.

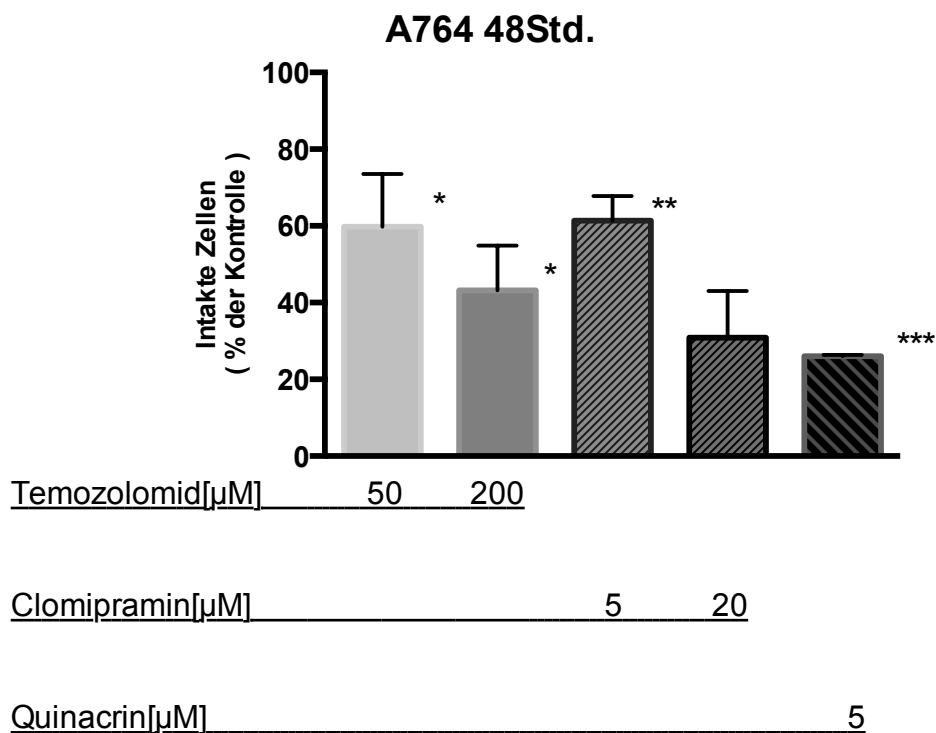


**Abb. 9: Effekte von Temozolomid, Clomipramin und Quinacrin auf das Zellwachstum von U343 nach 48 Stunden**

Dargestellt sind die intakten Zellen der humanen Glioblastom-Zelllinie U343 mit Standardabweichung in Bezug auf eine Kontrolle (100 %) nach 48-stündiger Stimulation. Die Werte für Temozolomid beziehen sich auf eine DMSO-Kontrolle (0,2 %), die Werte für Clomipramin und Quinacrin beziehen sich auf eine unstimulierte Kontrolle. Die Werte setzen sich aus den Mittelwerten von dreifach-Bestimmungen aus jeweils 3 unabhängigen Versuchen zusammen.

Abb.9 zeigt die Wirkung von Temozolomid, Clomipramin und Quinacrin auf das Zellwachstum der humanen Glioblastomzellen U343.

- Bei den mit Temozolomid behandelten Kulturen zeigte sich signifikant, dass innerhalb von 48 Stunden bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  60 %, bzw. bei einer Konzentration von 200  $\mu\text{M}$ , 75 % der Glioblastomzellen in Bezug zur DMSO-Kontrolle abgetötet wurden.
- Für Clomipramin ergab sich folgendes signifikantes Bild. Bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  wurden 47 % und bei einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  85 % der Tumorzellen abgetötet.
- Quinacrin vermochte bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  76 % und bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  100 % der humanen Glioblastomzellen (A764) binnen 48 Stunden abzutöten.

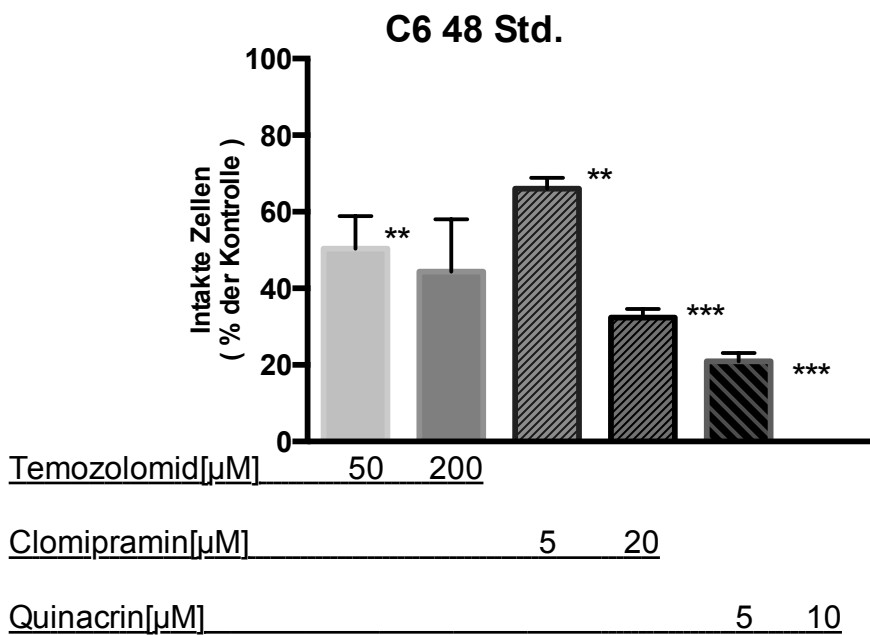


**Abb. 10: Effekte von Temozolomid, Clomipramin und Quinacrin auf das Zellwachstum von A764 nach 48 Stunden**

Dargestellt sind die intakten Zellen der humanen Glioblastom-Zelllinie A764 mit Standardabweichung in Bezug auf eine Kontrolle (100 %) nach 48-stündiger Stimulation. Die Werte für Temozolomid beziehen sich auf eine DMSO-Kontrolle (0,2 %), die Werte für Clomipramin und Quinacrin auf eine unstimulierte Kontrolle. Die Werte setzen sich aus den Mittelwerten von dreifach-Bestimmungen aus jeweils 3 unabhängigen Versuchen zusammen.

Die Effekte von Temozolomid, Clomipramin und Quinacrin auf humane Glioblastomzellen der Zelllinie A764 über 48 Stunden werden in Abbildung 10 dargestellt.

- Temozolomid tötete über einen Zeitraum von 48 Stunden und bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  40 % der A764 Zellen ab. Bei einer Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  wurden 57 % der humanen Glioblastomzellen abgetötet.
- Clomipramin tötete 39 % der Zellen, die mit 5  $\mu\text{M}$  stimuliert wurden, ab. Von den Zellen, die mit 20  $\mu\text{M}$  behandelt wurden, starben 69 % binnen 48 Stunden ab.
- Quinacrin führte signifikant in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  bei 74 % der behandelten Zellen zum Zelltod.



**Abb. 11: Effekte von Temozolomid, Clomipramin und Quinacrin auf das Zellwachstum von C6 nach 48 Stunden**

Dargestellt sind die intakten Zellen der von der Ratte stammenden Glioblastom-Zelllinie C6 mit Standardabweichung in Bezug auf eine Kontrolle (100 %) nach 48-stündiger Stimulation. Die Werte für Temozolomid beziehen sich auf eine DMSO-Kontrolle (0,2 %), die Werte für Clomipramin und Quinacrin beziehen sich auf eine unstimulierte Kontrolle. Die Werte setzen sich aus den Mittelwerten von dreifach-Bestimmungen aus jeweils 3 unabhängigen Versuchen zusammen.

Abbildung 11 zeigt die Effekte Temozolomids, Clomipramins und Quinacrins über 48 Stunden auf die von der Ratte stammende Glioblastom-Linie C6.

- Temozolomid in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  wirkte bei 50 % und in einer Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  bei 56 % der Zellen letal.
- Bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  tötete Clomipramin 34 % und bei einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  68 % der Glioblastomzellen.
- Quinacrin in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  führte bei 79 % der untersuchten Zellen zum Tod. Bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  starben 100 % der ausgesäten Glioblastomzellen binnen 48 Stunden ab.

Aggregierend lässt sich feststellen, dass die humanen Glioblastomzellen der Zelllinie U343 (Abb.9) am sensitivsten auf Temozolomid und auch auf Clomipramin reagiert haben. Bei Clomipramin zeigte sich bei diesen Zellen auch die stärkste Dosisabhängigkeit. Die Dosisabhängigkeit für Temozolomid und Quinacrin lag bei allen drei Zelllinien in etwa im gleichen Bereich.

Allgemein am widerstandsfähigsten zeigte sich die humane Glioblastomzelllinie A764 (Abb.10). Hier überlebten, mit Ausnahme bei Clomipramin 20  $\mu\text{M}$ , die meisten Zellen die 48-stündige Stimulation.

Als generell am wirkungsvollsten bei allen drei Zelllinien stellte sich das Pharmakon Quinacrin heraus. Hier zeigten sich alle untersuchten Zelllinien als in etwa gleich sensitiv. Jedoch gilt es hier zu beachten, dass für A764 Zellen (Abb.10) keine Daten für Quinacrin in der Dosierung 10  $\mu\text{M}$  erhoben wurden.

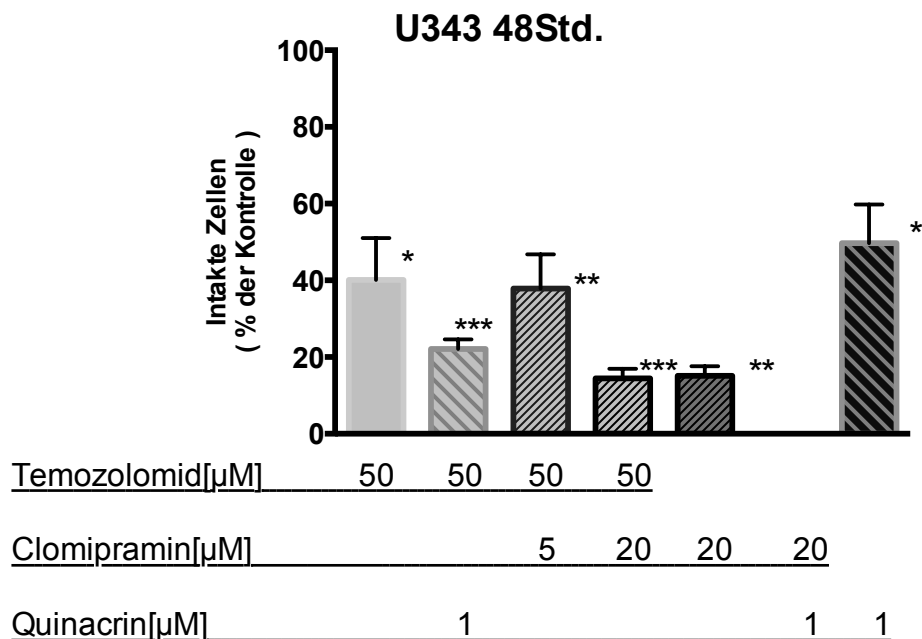
### **4.3 Kombinationseffekte versch. Pharmaka auf das Überleben von Glioblastomzellen**

Nachdem die Wirkung der Einzelsubstanzen auf verschiedene Glioblastomzellen (A764, U343, C6) untersucht wurde, war nun die Wirkung von Temozolomid, Clomipramin und Quinacrin in Kombination untereinander auf Glioblastomzellen von Interesse. Hierfür wurden Glioblastomzellen der humanen Zelllinien A764 und U343 und die der von der Ratte stammenden Linie C6 mit verschiedenen Kombinationen der genannten Substanzen stimuliert.

Ziel der in Abb.12-14 dargestellten Versuche war es, die kombinierten Substanzen auf mögliche additive oder synergistische Effekte hin zu untersuchen.

Hierfür wurden Glioblastomzellen dreier Zelllinien (U343, A764, C6) über 48 Stunden mit den entsprechenden Substanzen stimuliert und schließlich mittels Trypanblau-Färbung die Zahl der überlebenden Zellen in der NEUBAUER-Zählkammer ermittelt.

Abschließend wurde die Anzahl überlebender Zellen der mit Kombinationen behandelten Kulturen mit denen derer verglichen, die mit den entsprechenden Einzelsubstanzen behandelt wurden.



**Abb. 12: Effekte von Temozolomid, Clomipramin und Quinacrin (z. T. in Kombination) auf das Zellwachstum von U343 nach 48 Stunden**

Dargestellt sind die intakten Zellen der humanen Glioblastom-Zelllinie U343 mit Standardabweichung in Bezug auf eine unstimulierte Kontrolle (100 %) nach 48-stündiger Stimulation. Die Werte setzen sich aus den Mittelwerten von dreifach-Bestimmungen aus jeweils 3 unabhängigen Versuchen zusammen.

Der in Abbildung 12 gezeigte Versuch sollte die Frage klären, ob sich bei Stimulation der humanen Glioblastomzelllinie U343 mit Kombinationen aus Temozolomid, Clomipramin und Quinacrin synergistische oder additive Effekte im Vergleich zur Stimulation mit den Einzelsubstanzen einstellen.

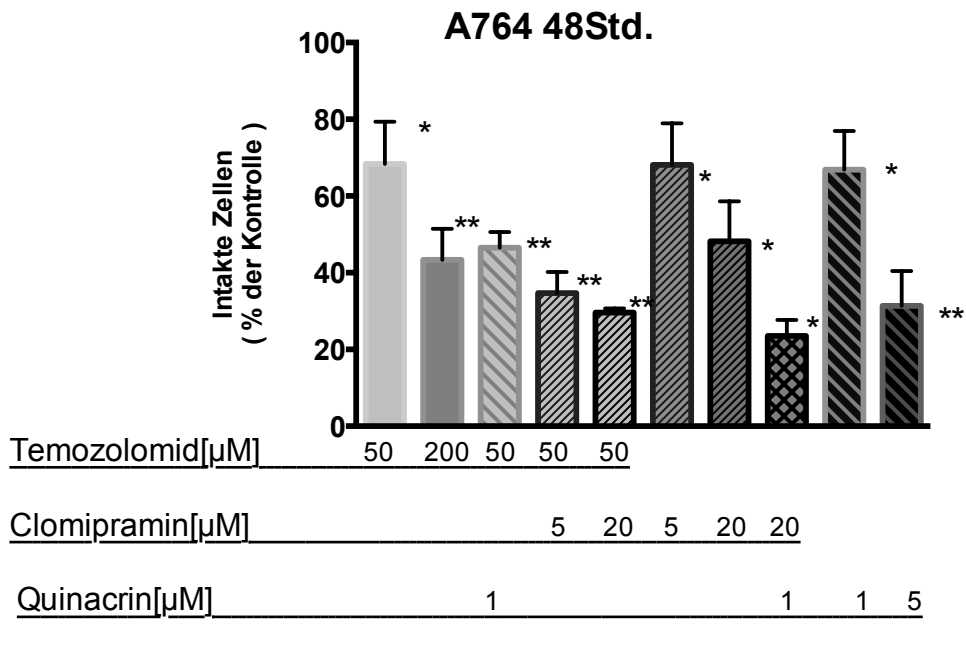
Temozolomid, bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$ , tötete 60 % der Zellen und Clomipramin in einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  tötete 85 % der Zellen, was weitestgehend den Ergebnissen der Vorversuche entsprach.

Quinacrin wurde hier in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  verwendet, da diese Konzentration auch bei den Kombinationen verwendet wurde. In dieser Konzentration wirkte Quinacrin bei 50 % der Glioblastomzellen letal.

Bei der Kombination von Temozolomid (50  $\mu\text{M}$ ) mit Quinacrin (1  $\mu\text{M}$ ) zeigte sich ein gesteigerter Effekt. Diese Kombination führte bei 78 % der Zellen zum Absterben.

Damit liegt die Wirkung der Kombination deutlich über jener der beiden Einzelsubstanzen. Die Kombinationen Temozolomids (50  $\mu\text{M}$ ) mit Clomipramin 5  $\mu\text{M}$  und 20  $\mu\text{M}$  zeigten keine starke Wirkungssteigerung gegenüber der Gabe der einzelnen Substanzen.

Die Kombination von Clomipramin 20  $\mu\text{M}$  mit Quinacrin 1  $\mu\text{M}$  hingegen zeigte einen additiven Effekt. Diese Kombination tötete über 48 Stunden 100 % der humanen Glioblastomzellen (U343) ab.



**Abb. 13: Effekte von Temozolomid, Clomipramin und Quinacrin (z. T. in Kombination) auf das Zellwachstum von A764 nach 48 Stunden**

Dargestellt sind die intakten Zellen der humanen Glioblastom-Zelllinie A764 mit Standardabweichung in Bezug auf eine unstimulierte Kontrolle (100 %) nach 48-stündiger Stimulation. Die Werte setzen sich aus den Mittelwerten von dreifach-Bestimmungen aus jeweils 3 unabhängigen Versuchen zusammen.

Abbildung 13 zeigt die Effekte von Temozolomid, Clomipramin und Quinacrin über 48 Stunden in den jeweiligen Reinformen und in Kombination untereinander auf die humanen Glioblastomzellen der Zelllinie A764.

Temozolomid wurde hier in zwei Konzentrationen verwendet. Bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  tötete es über 48 Stunden 32 % der Zellen und bei einer Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  57 %.

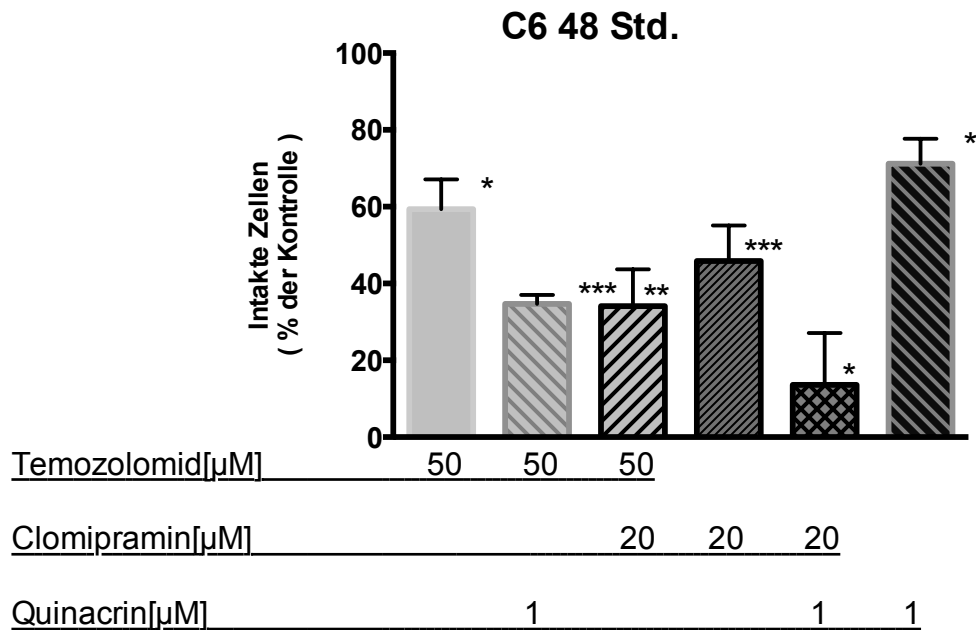
Clomipramin wurde in den Konzentrationen 5  $\mu\text{M}$  und 20  $\mu\text{M}$  appliziert. Bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  wirkte es bei 32 % der Zellen letal, bei einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  wurden 52 % der Tumorzellen abgetötet.

Quinacrin wurde in den Konzentrationen 1  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$  verwandt. Bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  starben 33 % der Zellen ab und bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  68 %.

Außerdem fand eine Kombination aller Präparate untereinander statt. Temozolomid 50  $\mu\text{M}$  in Kombination mit 1  $\mu\text{M}$  Quinacrin tötete 53 % der Zellen ab, was eine deutliche Steigerung zu den Wirkungen der Einzelsubstanzen darstellt. Temozolomid kombiniert mit 5  $\mu\text{M}$  Clomipramin tötete 65 % der Zellen und in Kombination mit Clomipramin 20  $\mu\text{M}$  70 %, was ebenfalls die Wirkungen aller Substanzen für sich alleine jeweils deutlich übersteigt.

Des Weiteren wurde Clomipramin bei einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  mit Quinacrin 1  $\mu\text{M}$  kombiniert. Diese Kombination tötete über 48 Stunden 76,5 % der A764 Zellen ab, auch hier zeigte sich also eine gesteigerte Wirkung.





**Abb. 14: Effekte von Temozolomid, Clomipramin und Quinacrin (z. T. in Kombination) auf das Zellwachstum von C6 nach 48 Stunden**

Dargestellt sind die intakten Zellen der von der Ratte stammenden Glioblastom-Zelllinie C6 mit Standardabweichung in Bezug auf eine unstimulierte Kontrolle (100 %) nach 48-stündiger Stimulation. Die Werte setzen sich aus den Mittelwerten von dreifach-Bestimmungen aus jeweils 3 unabhängigen Versuchen zusammen.

Abbildung 14 stellt die Wirkung von Temozolomid, Clomipramin und Quinacrin über 48 Stunden auf die von der Ratte stammende Glioblastom-Zelllinie C6 dar. Alle Stimulanzien wurden sowohl einzeln als auch in Kombinationen miteinander verwendet.

Temozolomid in einer Konzentration von 50 µM tötete über 48 Stunden 41 % der Glioblastomzellen.

Clomipramin in einer Konzentration von 20 µM führte bei 54 % und Quinacrin in einer Konzentration von 1 µM bei 29 % der Zellen zum Zelltod.

In Kombination mit Quinacrin (1 µM) wirkte Temozolomid (50 µM) bei 65 % und in Kombination mit Clomipramin (20 µM) bei 66 % der Zellen letal. Somit lag die Wirkung der Kombinationen deutlich über derer der Einzelsubstanzen.

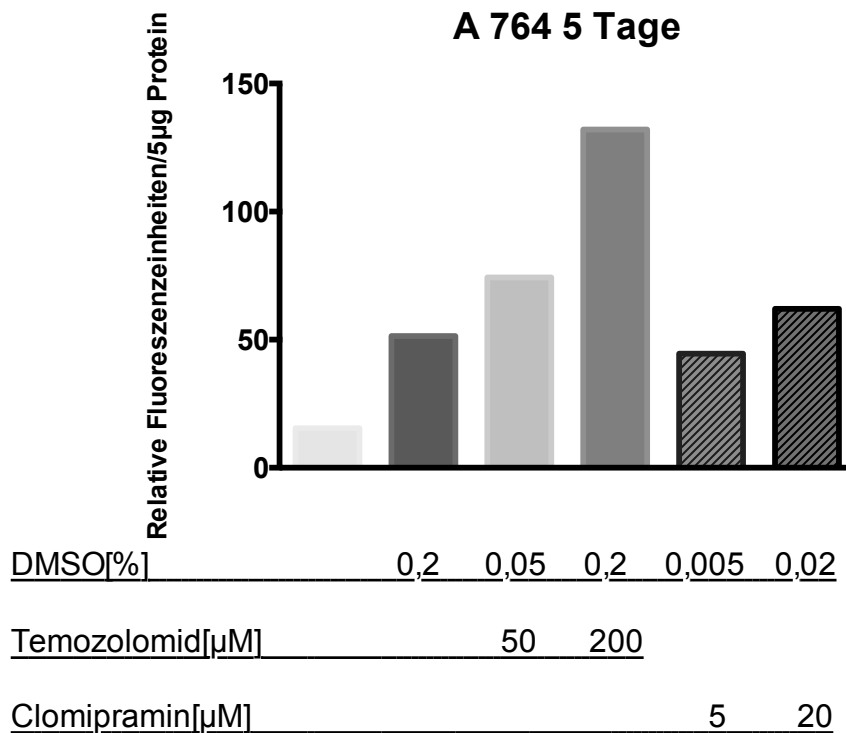
Clomipramin (20 µM) in einer Kombination mit Quinacrin (1 µM) tötete 86 % der Zellen innerhalb von 48 Stunden ab.

Abschließend lässt sich feststellen, dass sich bei allen drei untersuchten Glioblastom-Zelllinien (U343, A764, C6) die zytotoxischen Effekte der Pharmaka durch Kombinationen untereinander steigern ließen. Allerdings zeigten sich diese Steigerungen in unterschiedlichen Ausmaßen. Wie schon bei den Einzeleffekten zeigten sich auch bei den Kombinationen die Zellen der Zelllinie U343 (Abb.12) als die generell am sensitivsten. Deutliche Wirkungssteigerungen durch Kombinationen ließen sich hier vor allem durch die Kombinationen Quinacrins mit Temozolomid bzw. Clomipramin erzielen.

Die Sensitivitäten der beiden anderen untersuchten Zelllinien A764 (Abb.13) und C6 (Abb.14) stellten sich als recht ähnlich heraus, wobei sich die C6 Zellen als etwas sensitiver zeigten. Hier zeigte sich ein deutlich additiver Effekt für die Kombination Clomipramin 20  $\mu$ M + Quinacrin 1  $\mu$ M, der in dieser Intensität bei A764 Zellen nicht zu sehen war.

#### **4.4 Caspase-3-Assays**

Die in den bisherigen Versuchen gezeigte Abnahme der Zellzahlen nach Behandlung mit Temozolomid, Clomipramin und Quinacrin deutet darauf hin, dass diese Substanzen zur Einleitung des Zelltodes beitragen können. Eine Form des Zelltodes ist die Apoptose (*PCD* Typ1). Darunter versteht man einen programmierten Zelltod, der z. B. durch toxische Einflüsse von außen hervorgerufen werden kann. Ein wichtiger Teil der Apoptose sind die sogenannten Caspasen. Sie sind Teil einer Kaskade, welche letztlich zum Zelltod führt. Die Effektorcaspase-3 spielt eine entscheidende Rolle innerhalb dieser Kaskade. Daher kann man über die Bestimmung ihrer Aktivität Rückschlüsse auf die Apoptoserate ziehen. Das Ziel der folgenden Versuche bestand darin, die Aktivität der Effektorcaspase-3 in Glioblastomzellen nach Stimulation mit Temozolomid, Clomipramin und Quinacrin zu ermitteln. Dafür wurden die Glioblastomzellen (A764, U343, C6) nach Stimulation mit Temozolomid, Clomipramin und Quinacrin geerntet. Anschließend wurde die Aktivität der Effektorcaspase-3 mittels fluorometrischer Bestimmung des Substratumsatzes ermittelt.



**Abb. 15: Effekte von Temozolomid und Clomipramin auf die Aktivität der Caspase-3 in A764 Zellen nach 5 Tagen**

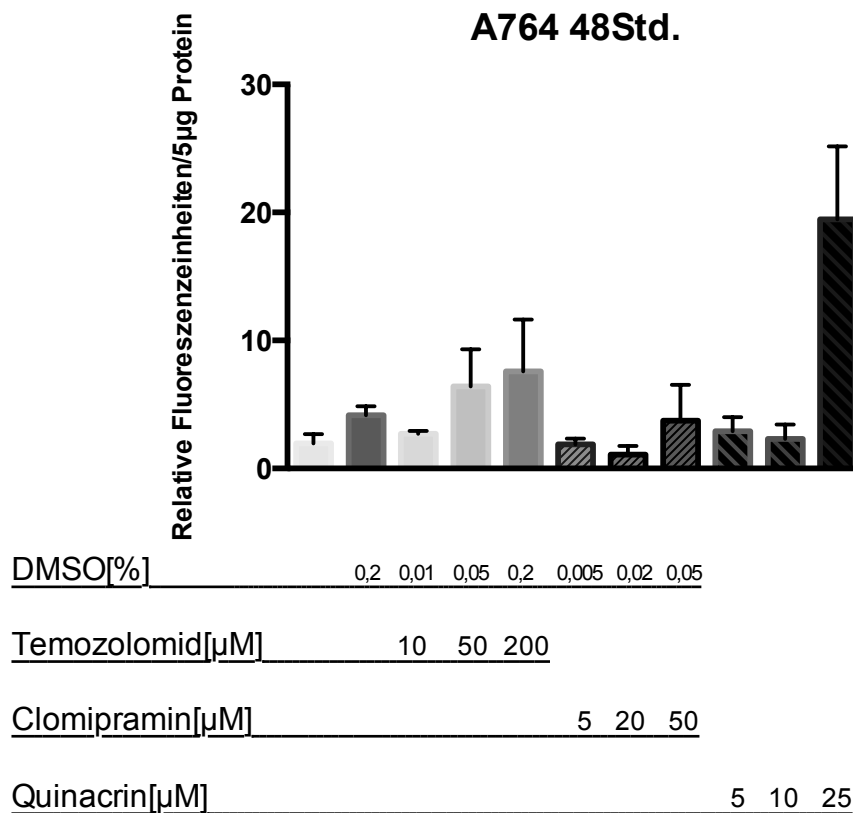
Dargestellt ist die Caspase-3-Aktivität in relativen Fluoreszenzeinheiten/5 µg Protein von humanen Glioblastomzellen der Zelllinie A764 nach 5-tägiger Stimulation mit Temozolomid und Clomipramin. Als Kontrolle dienten für Clomipramin und Quinacrin unstimulierte Zellen und für Temozolomid mit 0,2 % DMSO stimulierte Zellen. Die Werte wurden aus Doppelwerten eines Versuches gemittelt.

Abbildung 15 zeigt einen Vorversuch zur Bestimmung der Caspase-3-Aktivität bzw. der Apoptoserate bei A764 Zellen, in relativen Fluoreszenzeinheiten/5 µg Protein gemessen. Die Zellen wurden über 5 Tage stimuliert und die Stimulanzien wurden am 3. Tag erneuert.

Die unstimulierte Kontrolle wies mit 15,4 relativen Fluoreszenzeinheiten die geringste Caspase-3-Aktivität auf. Die DMSO Kontrolle (0,2 %) für Temozolomid 200 µM führte zu einem Anstieg der Apoptoserate gegenüber der unstimulierten Kontrolle um 36 Einheiten auf 51,4.

- Clomipramin mit einer Konzentration von 5 µM führte über die 5 Tage zu einem Anstieg der relativen Fluoreszenz gegenüber der unstimulierten Kontrolle um 29,1 Einheiten auf 44,5 relative Fluoreszenzeinheiten.

- Clomipramin bei einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  führte zu einem Anstieg der relativen Fluoreszenzeinheiten auf 62 bzw. auf das 4-fache der Kontrolle, was auf eine gesteigerte Caspase-3-Aktivität gegenüber der unstimulierten Kontrolle hinweist.
- Temozolomid bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  führte zu einem Anstieg der relativen Fluoreszenzeinheiten auf 74. Bei einer Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  kam es zu einem Anstieg auf 132 relative Fluoreszenzeinheiten. Damit führte Temozolomid bei einer Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  zu einem Anstieg der relativen Fluoreszenzeinheiten von 80,6 Einheiten gegenüber der entsprechenden DMSO-Kontrolle.



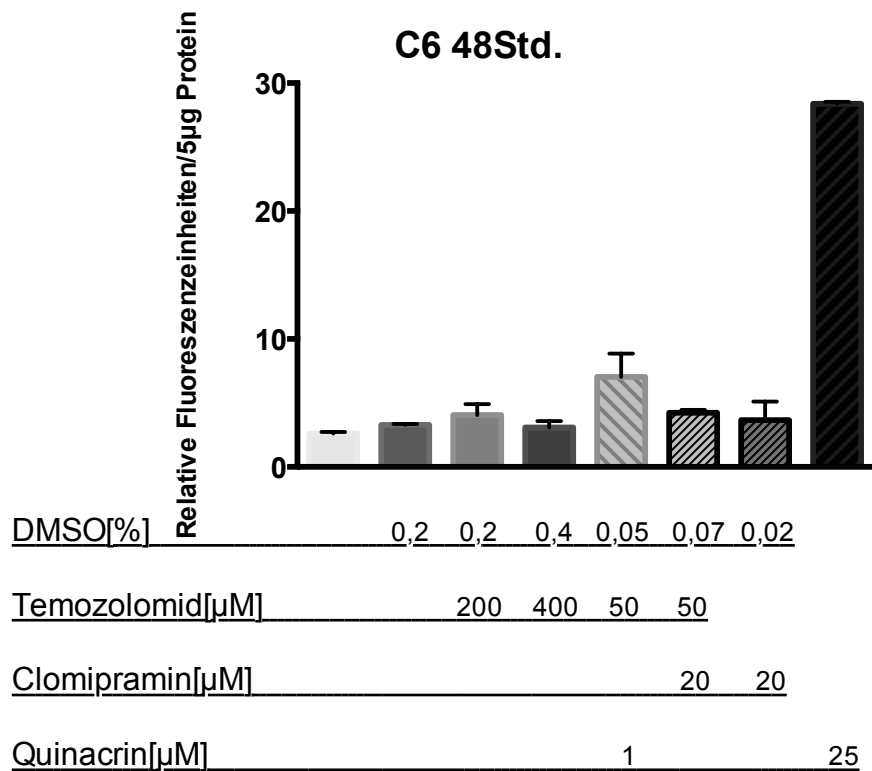
**Abb. 16: Effekte von Temozolomid, Clomipramin und Quinacrin auf die Aktivität der Caspase-3 in A764 Zellen nach 48 Stunden**

Dargestellt ist die Caspase-3-Aktivität in relativen Fluoreszenzeinheiten/5 µg Protein von humanen Glioblastomzellen der Zelllinie A764 mit Standardabweichung nach 48-stündiger Stimulation mit Temozolomid, Clomipramin und Quinacrin. Als Kontrolle dienten für Clomipramin und Quinacrin unstimulierte Zellen und für Temozolomid mit 0,2 % DMSO stimulierte Zellen. Die Werte setzen sich aus den Mittelwerten von zweifach-Bestimmungen aus jeweils 2 unabhängigen Versuchen zusammen.

In Abbildung 16 werden die Ergebnisse eines Caspase-3-Assays an humanen Glioblastomzellen der Zelllinie A764 über 48 Stunden dargestellt. Die Zellen der unstimulierten Kontrolle wiesen nach 48 Stunden eine relative Fluoreszenzaktivität von 1,95 Einheiten/5 µg Protein bei der Fluoreszenzmessung auf. Die der DMSO-Kontrolle wiesen 4,2 relative Fluoreszenzeinheiten/5 µg Protein auf. Verwendet wurde Temozolomid in den Konzentrationen 10, 50 und 200 µM. Von Clomipramin wurden 5, 20 und 50 µM appliziert. Quinacrin fand in den Konzentrationen 5, 10 und 25 µM Verwendung.

- 50  $\mu\text{M}$  Temozolomid führten zu einem Anstieg der relativen Fluoreszenzeinheiten/5 $\mu\text{g}$  Protein auf 6,4. 200  $\mu\text{M}$  Temozolomid bewirkten einen Anstieg auf 7,6 relative Fluoreszenzeinheiten/5 $\mu\text{g}$  Protein.
- Im Fall von Clomipramin hob sich nur die Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  deutlich von der unstimulierten Kontrolle ab. Hier stiegen die relativen Fluoreszenzeinheiten/5 $\mu\text{g}$  Protein auf 3,7 Einheiten, was 1,8 Einheiten über der unstimulierten Kontrolle lag.
- Quinacrin löste bei einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  einen deutlichen Anstieg der Caspase-3-Aktivität gegenüber der unstimulierten Kontrolle aus. Die relativen Fluoreszenzeinheiten/5 $\mu\text{g}$  Protein stiegen hier auf 19,5 Einheiten, also auf das 10-fache.

Hier zeigten sich somit im Vergleich zu dem Versuch über 5 Tage (Abb. 15) deutlich geringere Caspase-3-Aktivitäten. Daraus lässt sich schließen, dass die Apoptose-fördernde Wirkung der verwendeten Substanzen eine Zeitabhängigkeit aufweist.



**Abb. 17: Effekte von Temozolomid, Clomipramin und Quinacrin auf die Aktivität der Caspase-3 in C6 Zellen nach 48 Stunden**

Dargestellt ist die Caspase-3-Aktivität in relativen Fluoreszenzeinheiten/5µg Protein von Ratten-Glioblastomzellen der Zelllinie C6 mit Standardabweichung nach 48-stündiger Stimulation mit Temozolomid, Clomipramin und Quinacrin. Als Kontrolle dienten für Clomipramin und Quinacrin unstimulierte Zellen und für Temozolomid mit 0,2 % DMSO stimulierte Zellen. Die Werte setzen sich aus den Mittelwerten von einfach-Bestimmungen aus jeweils 2 unabhängigen Versuchen zusammen.

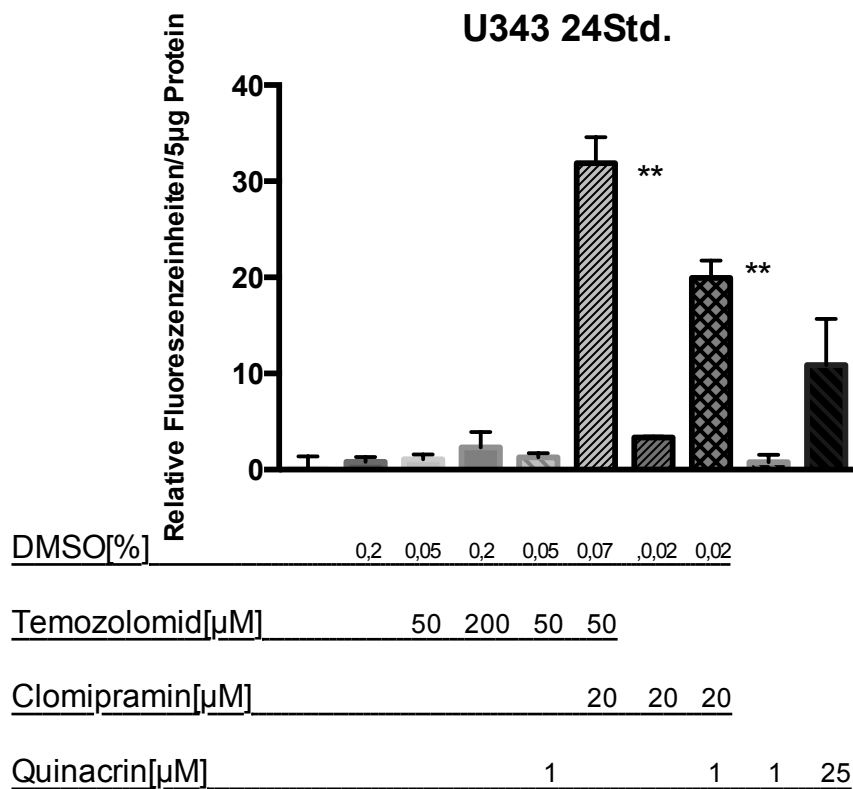
Der in Abbildung 17 dargestellte Versuch stellt einen Caspase-3-Test an von Ratten stammenden Glioblastomzellen der Zelllinie C6 über 48 Stunden dar. Die unstimulierte Kontrolle wies nach 48 Stunden 2,5 relative Fluoreszenzeinheiten/5µg Protein auf, die DMSO-Kontrolle 3,2.

Weder Temozolomid in den Konzentrationen 200µm und 400µm noch Clomipramin in der Konzentration 20 µm zeigten nach der 48-stündigen Simulation eine deutliche Steigerung der Apoptoserate, gemessen über die relativen Fluoreszenzeinheiten.

Die Kombination von Temozolomid 50 µm und Clomipramin 20 µm wies einen leicht verstärkten Effekt auf, hier wurden 4,2 relative Fluoreszenzeinheiten/5 µg

Protein gemessen. Temozolomid 50  $\mu\text{M}$  in Kombination mit Quinacrin 1  $\mu\text{M}$  wies einen Anstieg der relativen Fluoreszenzeinheiten auf, und zwar um das 2,2-fache auf 7 Einheiten.

Quinacrin in einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  führte zu einem deutlichen Anstieg der relativen Fluoreszenzeinheiten/5 $\mu\text{g}$  Protein im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Hier wurden 28,4 Einheiten gemessen. Das entspricht einer Steigerung um das 11,4-fache.



**Abb. 18: Effekte von Temozolomid, Clomipramin und Quinacrin auf die Aktivität der Caspase-3 in U343 Zellen nach 48 Stunden**

Dargestellt ist die Caspase-3-Aktivität in relativen Fluoreszenzeinheiten/5  $\mu\text{g}$  Protein von humanen Glioblastomzellen der Zelllinie U343 mit Standardabweichung nach 24-stündiger Stimulation mit Temozolomid, Clomipramin und Quinacrin. Als Kontrolle dienten für Clomipramin und Quinacrin unstimulierte Zellen und für Temozolomid mit 0,2 % DMSO stimulierte Zellen. Die Werte setzen sich aus den Mittelwerten von zweifach-Bestimmungen aus jeweils 3 oder mehr unabhängigen Versuchen zusammen.

Bei dem in Abbildung 18 gezeigten Versuch wurden humane Glioblastomzellen der Zelllinie U343 über 48 Stunden stimuliert. Die unstimulierte Kontrolle wies 0,1 relative Fluoreszenzeinheiten/5 $\mu\text{g}$  Protein auf, die DMSO-Kontrolle 0,8.



Temozolomid in der Konzentration 50  $\mu\text{M}$  führte zu einem Anstieg der Fluoreszenz auf 1,1 Einheiten. In einer Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  kam es zu einem Anstieg auf 2,3 relative Fluoreszenzeinheiten/5 $\mu\text{g}$  Protein.

Clomipramin wurde in einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  appliziert und führte zu einem Anstieg um das 34-fache auf 3,4 relative Fluoreszenzeinheiten.

Quinacrin in der Konzentration 1  $\mu\text{M}$  führte zu einem Anstieg der relativen Fluoreszenz auf 0,7 Einheiten, was einer Steigerung um das 7-fache entspricht. Bei einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  führte Quinacrin zu einem deutlichen Anstieg um das 109-fache der unstimulierten Kontrolle auf 10,9 relative Fluoreszenzeinheiten.

Die Kombination von Temozolomid 50  $\mu\text{M}$  mit Quinacrin 1  $\mu\text{M}$  führte zu einem Anstieg auf 1,25 relative Fluoreszenzeinheiten/5  $\mu\text{g}$  Protein.

Temozolomid 50  $\mu\text{M}$  in Kombination mit Clomipramin 20  $\mu\text{M}$  führte zu einem signifikanten Anstieg gegenüber der Kontrolle um das 39-fache auf 31,9 relative Fluoreszenzeinheiten/5  $\mu\text{g}$  Protein.

Außerdem führte die Kombination von Clomipramin 20  $\mu\text{M}$  und Quinacrin 1  $\mu\text{M}$  zu einem signifikanten Anstieg der relativen Fluoreszenzeinheiten/5 $\mu\text{g}$  Protein auf 20, also um etwa das 200-fache gegenüber der unstimulierten Kontrolle.

Zusammenfassend lässt sich anhand der durchgeführten Versuche konstatieren, dass Quinacrin in einer Dosierung von 25  $\mu\text{M}$  bei allen drei Zelllinien (A764, U343, C6) zu deutlichen Anstiegen der Caspase-3-Aktivität geführt hat.

Temozolomid und Clomipramin führten über die kürzeren Stimulationsphasen von 24 bzw. 48 Stunden zu vergleichsweise niedrigeren Anstiegen bei allen drei Zelllinien. Allerdings zeigten sich nach einer 5-tägigen Stimulation von A764 Zellen (Abb.15) auch hier deutlich gesteigerte Aktivitäten der Caspase-3.

Die Kombinationspräparate zeigten sich vor allem bei U343 über 24 Stunden als sehr effektiv und z. T. signifikant. Bei C6 war ihre Wirkung ebenfalls stärker als die der Einzelpräparate, allerdings in geringerer Deutlichkeit.

Diese Versuche haben gezeigt, dass alle verwendeten Präparate in gewissem Maße in der Lage sind Apoptose in Glioblastomzellen zu fördern.

Die aber doch recht heterogenen Ergebnisse zeigen die Schwierigkeiten, die sich hier auftaten. Die Wirkung der verschiedenen Pharmaka hing partiell stark von der Stimulationsdauer, Dosierung und Zelllinie ab.

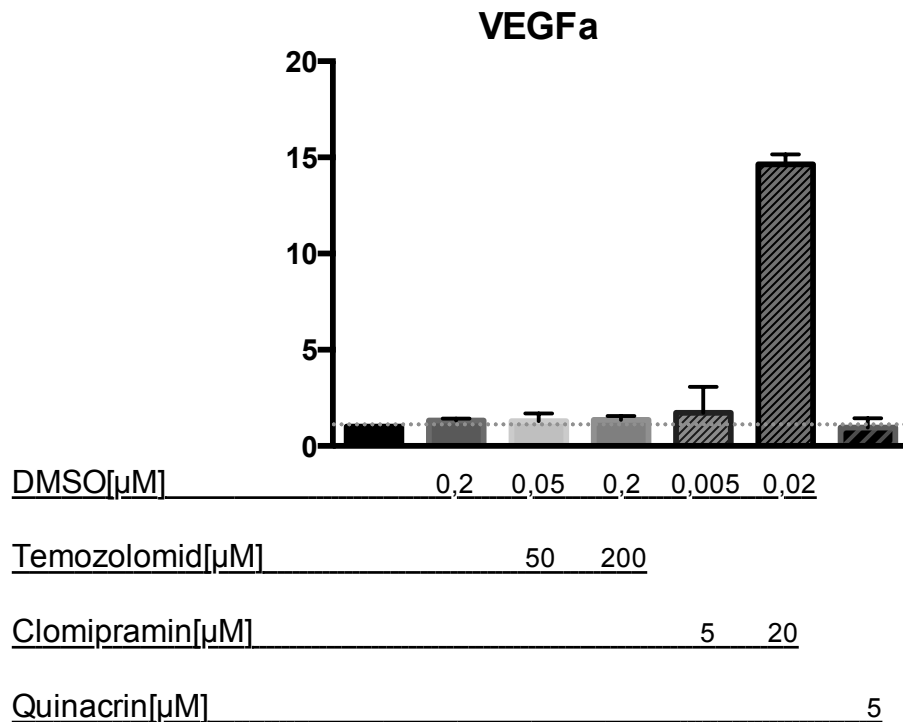
Abschließend lässt sich feststellen, dass A764 und C6 generell eine höhere Caspase-3-Aktivität aufwiesen als U343. Allerdings war die Steigerung der Aktivität durch die Pharmaka in Bezug auf die Kontrollen in U343 am deutlichsten.

#### **4.5 Real-Time-RT-PCR**

Mittels *Real-Time-RT-PCR* sollte untersucht werden, ob die verwendeten Pharmaka (Temozolomid, Clomipramin, Quinacrin) u. U. auch tumorfördernde Wirkungen, wie bspw. die Induktion der Expression von Wachstumsfaktoren haben können.

Zu diesem Zweck wurde, wie im Methoden-Teil erläutert, zunächst RNA aus den zu untersuchenden Zellen isoliert und dann in cDNA umgewandelt. Letztlich wurde die Expression verschiedener Faktoren und Rezeptoren - mit möglichem Einfluss auf das Tumorwachstum - mittels *Real-Time-RT-PCR* quantifiziert.

Im Folgenden werden die Effekte Temozolomids, Clomipramins und Quinacrins auf die Expression des *Vascular Endothelial Growth Factors* (VEGF-A) in U343 Zellen dargestellt. Untersucht wurden diese mithilfe *Real-Time-RT-PCR*.



**Abb. 19: Effekte von Temozolomid, Clomipramin und Quinacrin auf die Expression von VEGF-A in U343 Zellen nach 24 Stunden**

Dargestellt ist die relative Expressionsänderung von *VEGF-A* bei humanen Glioblastomzellen der Zelllinie U343 unter der Wirkung von Temozolomid, Quinacrin und Clomipramin. Werte für Clomipramin und Quinacrin auf unstimulierte Kontrolle bezogen. Werte für Temozolomid auf 0,2 %ige DMSO-Kontrolle bezogen. Werte setzen sich aus zweifach-Werten aus 3 Versuchen zusammen.

In Abbildung 19 werden die Effekte von Temozolomid, Quinacrin und Clomipramin auf die relative Expression des Wachstumsfaktors *VEGF-A* dargestellt. Hierfür wurden humane Glioblastomzellen der Zelllinie U343 über 24 Stunden mit den jeweiligen Substanzen stimuliert.

Mittels der *RT-PCR* sollten weitere mögliche Effekte der Substanzen Temozolomid, Clomipramin und Quinacrin auf humane Glioblastomzellen der Zellreihe U343 untersucht werden. Untersucht wurden regulatorische Effekte auf die Expression von *VEGF-A*, *VEGF-C*, *VEGF-D*, *VEGFR-2/KDR*, *VEGFR3*, *CXCR4*, *CXCR7* und *VEGFR-2/FLT1*. Nur für *VEGF-A*, einen Angiogenesefaktor, wurden deutliche Effekte im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle festgestellt. Hier wurde die Expression durch Clomipramin in einer Konzentration von 20 µM auf das 14,7-fache der Kontrolle gesteigert.

Die hier abgebildeten Ergebnisse für Clomipramin (20  $\mu\text{M}$ ) zeigten eine starke Varianz. Daher war die Steigerung zwar deutlich, aber nicht signifikant.

#### 4.6 Elektronenmikroskopie

Nachdem sich mittels Caspase-3-Assay nicht bei allen zytotoxisch wirksamen Substanzen eine gesteigerte Apoptoserate nachweisen ließ, galt es, nach anderen möglichen Mechanismen für das Zellsterben zu suchen. Wir entschlossen uns daher, stimulierte Glioblastomzellen mittels Elektronenmikroskopie nach morphologischen Korrelaten für verschiedene Arten des Zelltodes zu untersuchen.

Unser Augenmerk richtete sich auf Zeichen für Apoptose (*PCD* TypI), wie z. B. DNA-Kondensation und Kern-Fragmentierung (*nuclear blebbing*).

Außerdem suchten wir nach Zeichen für Autophagozytose (*PCD* TypII), wie bspw. Autophagosomen (Vesikel mit Doppelmembran).

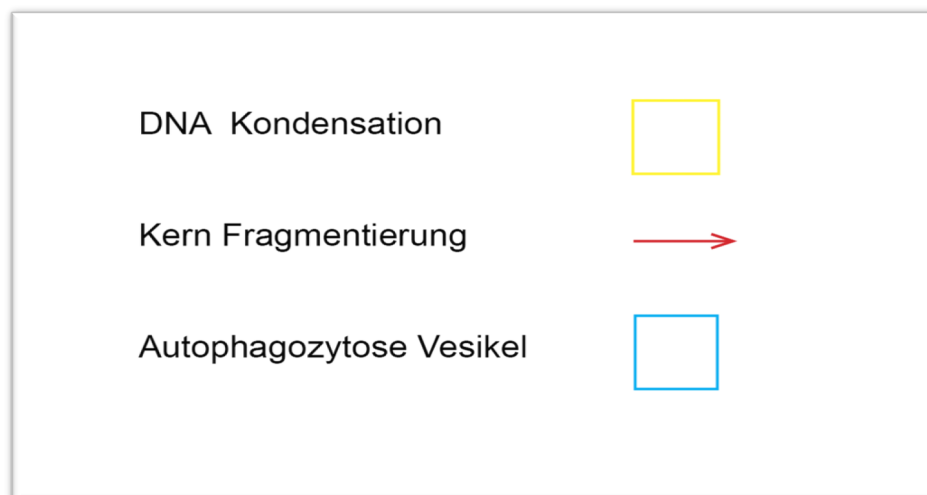
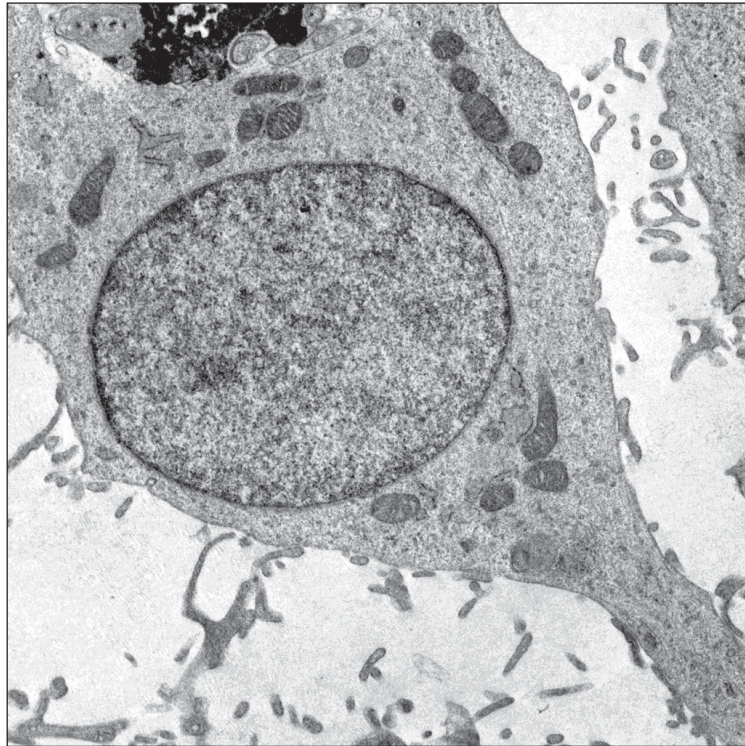


Abb. 20: Legende Elektronenmikroskopie

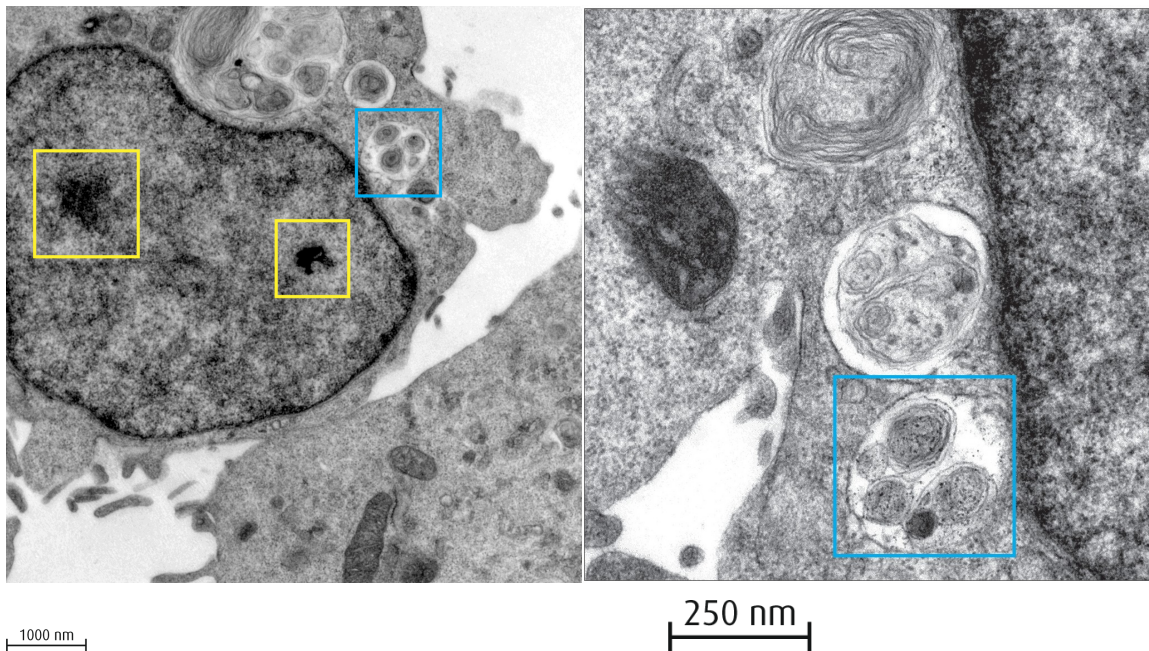


1000 nm

**Abb. 21: Unstimulierte Glioblastomzelle der Zelllinie C6 nach 48 Stunden**

Die Abbildung zeigt eine unstimulierte Zelle der Zelllinie C6 in 4.400-facher Vergrößerung 48 Stunden nach Aussaat.

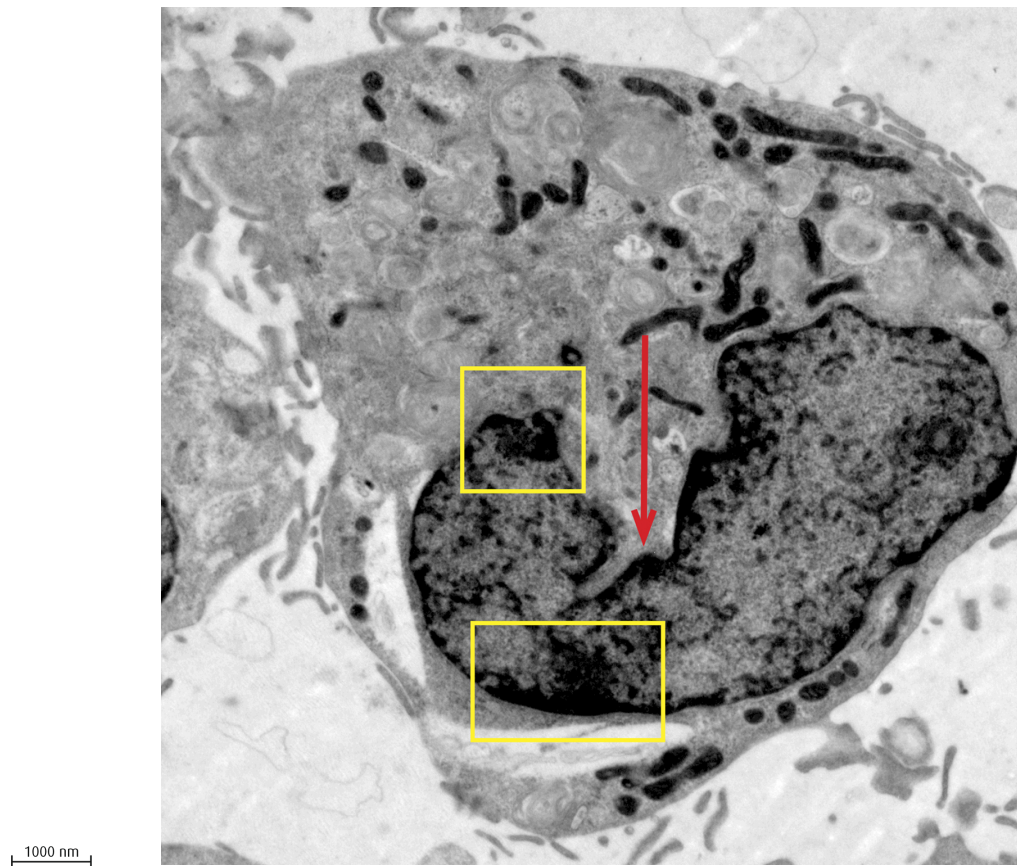
Diese unstimulierte C6 Zelle zeigte 48 Stunden nach Aussaat keinerlei Anzeichen für apoptotische Prozesse oder Autophagozytose. Die Zelle war gänzlich intakt.



**Abb. 22: Glioblastomzellen der Zelllinie C6 nach 48-stündiger Stimulation mit 20  $\mu$ M Clomipramin**

Die Abbildung zeigt eine C6 Zelle (links) in 7.000-facher Vergrößerung und rechts einen Ausschnitt einer C6 Zelle in 20.000-facher Vergrößerung. Aufgenommen nach 48-stündiger Stimulation mit 20  $\mu$ M Clomipramin. Die gelben Vierecke heben DNA-Kondensationen hervor, die blauen Vierecke zeigen Autophagosomen.

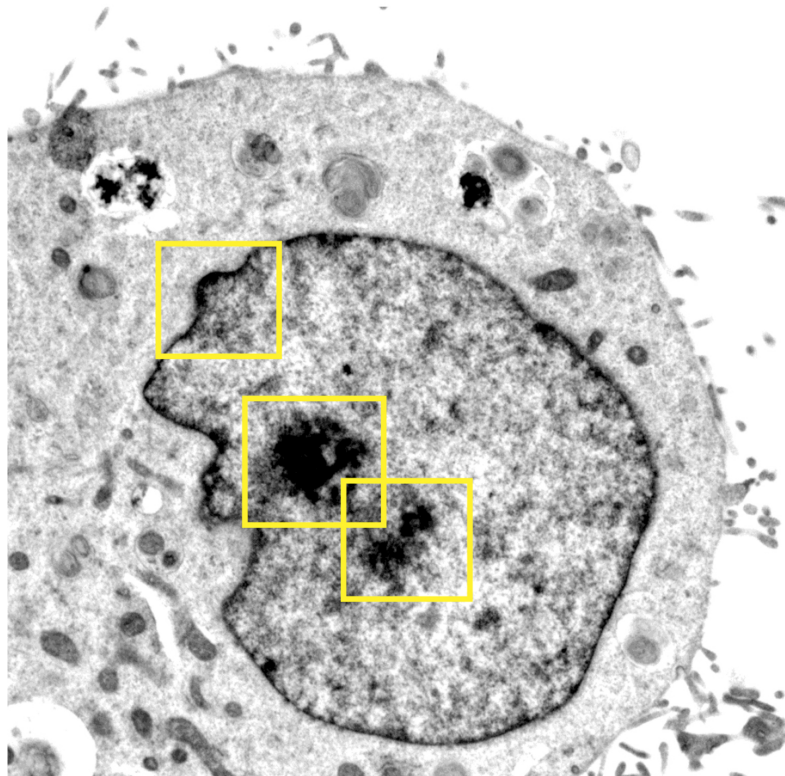
Beide Zellen zeigten nach 48-stündiger Stimulation mit 20  $\mu$ M Clomipramin Autophagosome (blau), die als Zeichen für Autophagozytose gedeutet werden können. Außerdem zeigte die linke Zelle zusätzlich eine leichte bzw. beginnende DNA-Kondensation (gelb).



**Abb. 23: Glioblastomzelle der Zelllinie C6 nach 48-stündiger Stimulation mit 10 µM Temozolomid**

Abgebildet ist eine Glioblastomzelle der Zelllinie C6 in 4.400-facher Vergrößerung nach 48 Stunden Stimulation mit 10µm Temozolomid. Der Pfeil weist auf fragmentierten Kern, die gelben Vierecke heben DNA-Kondensationen hervor.

Diese von der Ratte stammende Glioblastomzelle zeigte nach 48 Stunden Stimulation mit 10 µM Temozolomid einen fragmentierten Kern (roter Pfeil) und DNA-Kondensationen, was beides auf eine ablaufende Apoptose hindeutet.



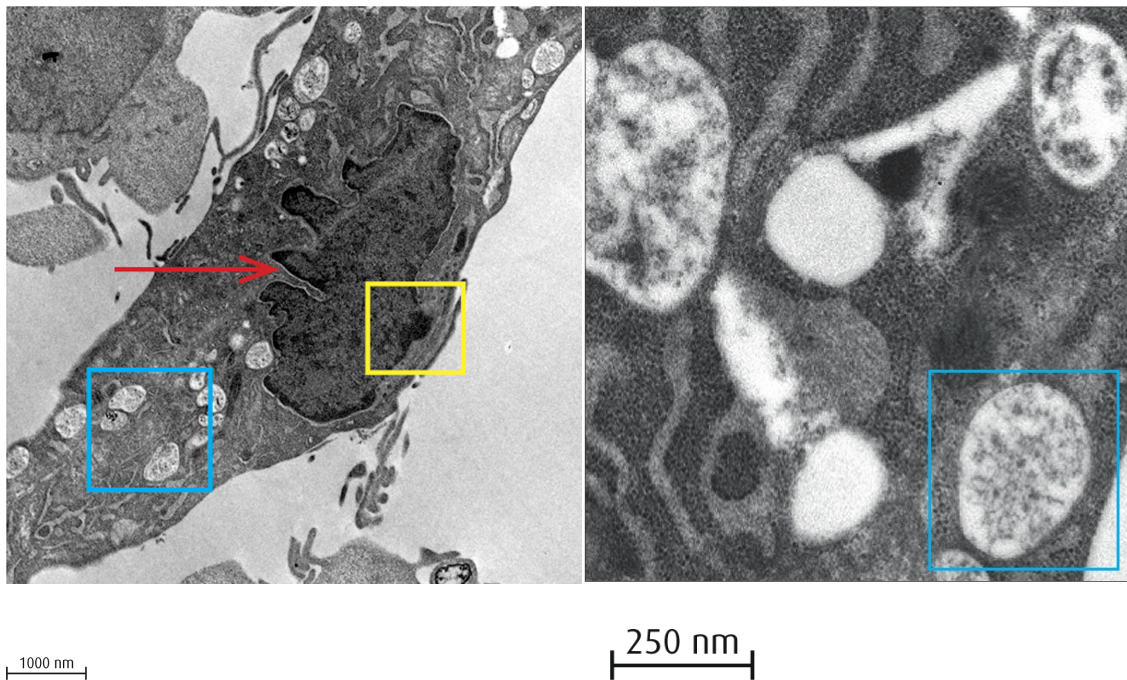
1000 nm

**Abb. 24: Glioblastomzelle der Zelllinie C6 nach 48-stündiger Stimulation mit 200 µM Temozolomid**

Abbildung 24 zeigt eine von der Ratte stammende Glioblastomzelle (C6) 4.400-fach vergrößert nach 48-stündiger Stimulation mit 200 µM Temozolomid. Die gelben Vierecke heben DNA-Kondensationen hervor.

Die in Abb. 24 dargestellte Zelle zeigt nach einer 48-stündigen Stimulation mit 200 µM Temozolomid deutliche DNA-Kondensationen (gelb), als Zeichen für eine bevorstehende Apoptose.

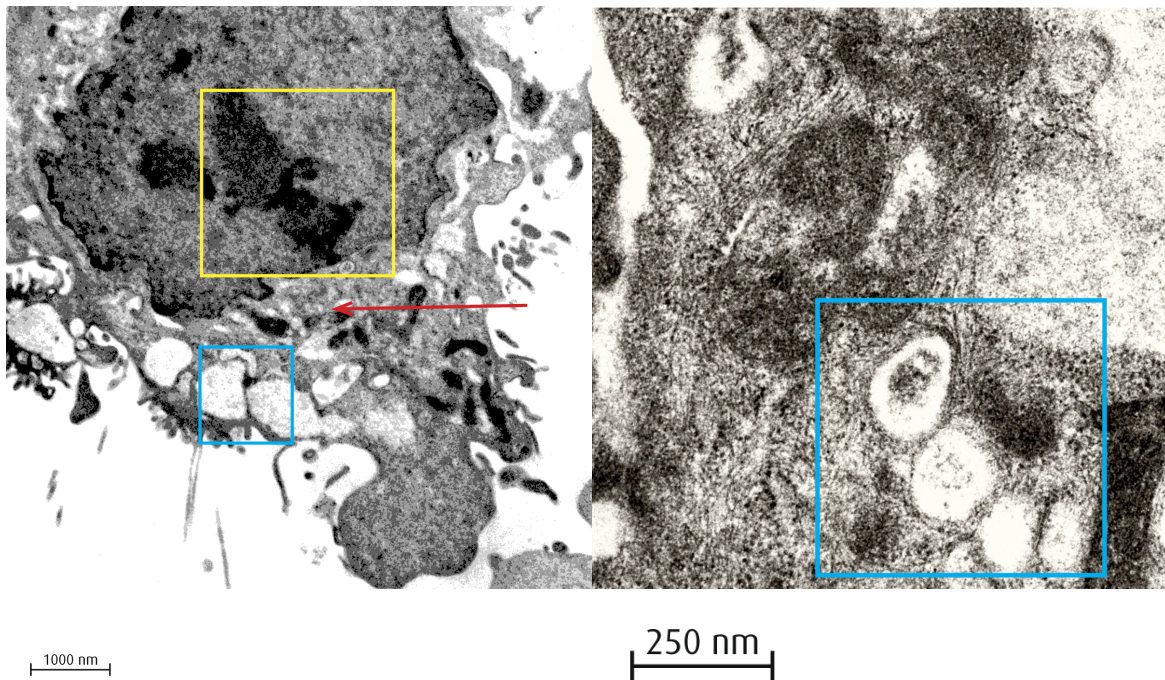




**Abb. 25: Glioblastomzelle der Zelllinie C6 nach 48-stündiger Stimulation mit 10  $\mu\text{M}$  Quinacrin**

Zu sehen ist links eine 4.400-fach vergrößerte Glioblastomzelle (C6) nach 48-stündiger Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  Quinacrin. Rechts ein Ausschnitt dieser Zelle (20.000-fach vergrößert). Gelbes Viereck zeigt DNA-Kondensation (links), blaue Vierecke heben Vesikel hervor (links und rechts), roter Pfeil zeigt auf Kern-Fragmentierung (links)

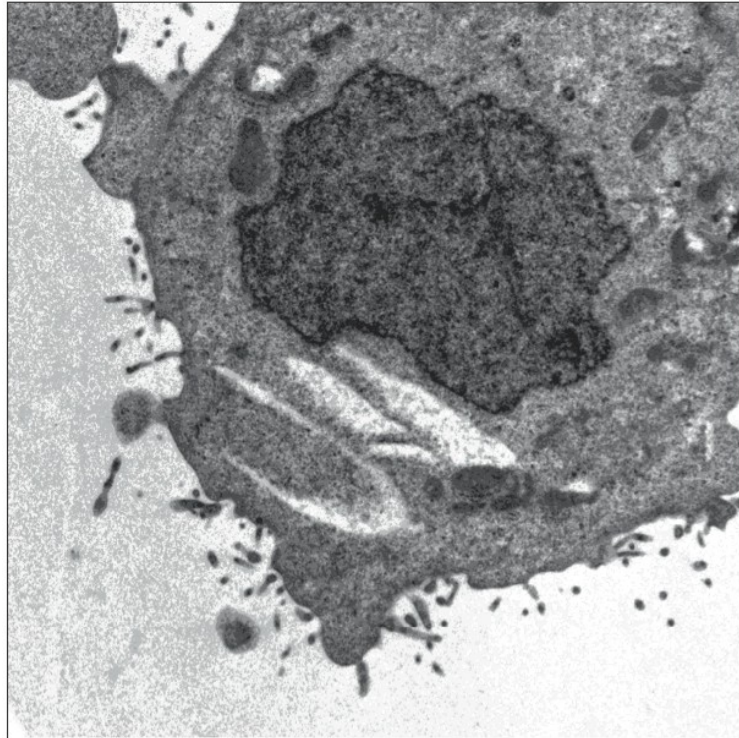
Abbildung 25 zeigt eine von der Ratte stammende Glioblastomzelle der Zelllinie C6 nach 48 Stunden Stimulation mit 10  $\mu\text{M}$  Quinacrin. In der links abgebildeten Übersichtsaufnahme sind als Zeichen für Apoptose DNA-Kondensation (gelb) und *nuclear blebbing* (rot) zu sehen. Außerdem zeigen beide Aufnahmen vermehrte Vesikel (blau) als mögliche Zeichen für Autophagozytose.



**Abb. 26: Glioblastomzelle der Zelllinie C6 nach 48-stündiger Stimulation mit 50  $\mu\text{M}$  Temozolomid + 20  $\mu\text{M}$  Clomipramin**

Abgebildet ist eine von der Ratte stammende Glioblastomzelle (links) in 4.400-facher Vergrößerung nach 48 Stunden Stimulation mit 50  $\mu\text{M}$  Temozolomid + 20  $\mu\text{M}$  Clomipramin. Rechts ein Ausschnitt aus dieser Zelle (20.000-fach vergrößert). Mit gelb hervorgehoben DNA-Kondensation (links). Roter Pfeil weist auf Kern-Fragmentierung (links). Blaue Vierecke zeigen Vesikel (links und rechts).

Abbildung 26 zeigt eine Glioblastomzelle (C6), nachdem sie 48 Stunden mit 50  $\mu\text{M}$  Temozolomid + 20  $\mu\text{M}$  Clomipramin behandelt worden war. In der Übersicht links zeigen sich eine Kern-Fragmentierung (rot) und DNA-Kondensation als Zeichen apoptotischer Vorgänge (gelb). Sowohl in der linken Übersicht als auch rechts in der Vergrößerung sind Vesikel (blau) als mögliche Zeichen für Autophagozytose zu sehen.

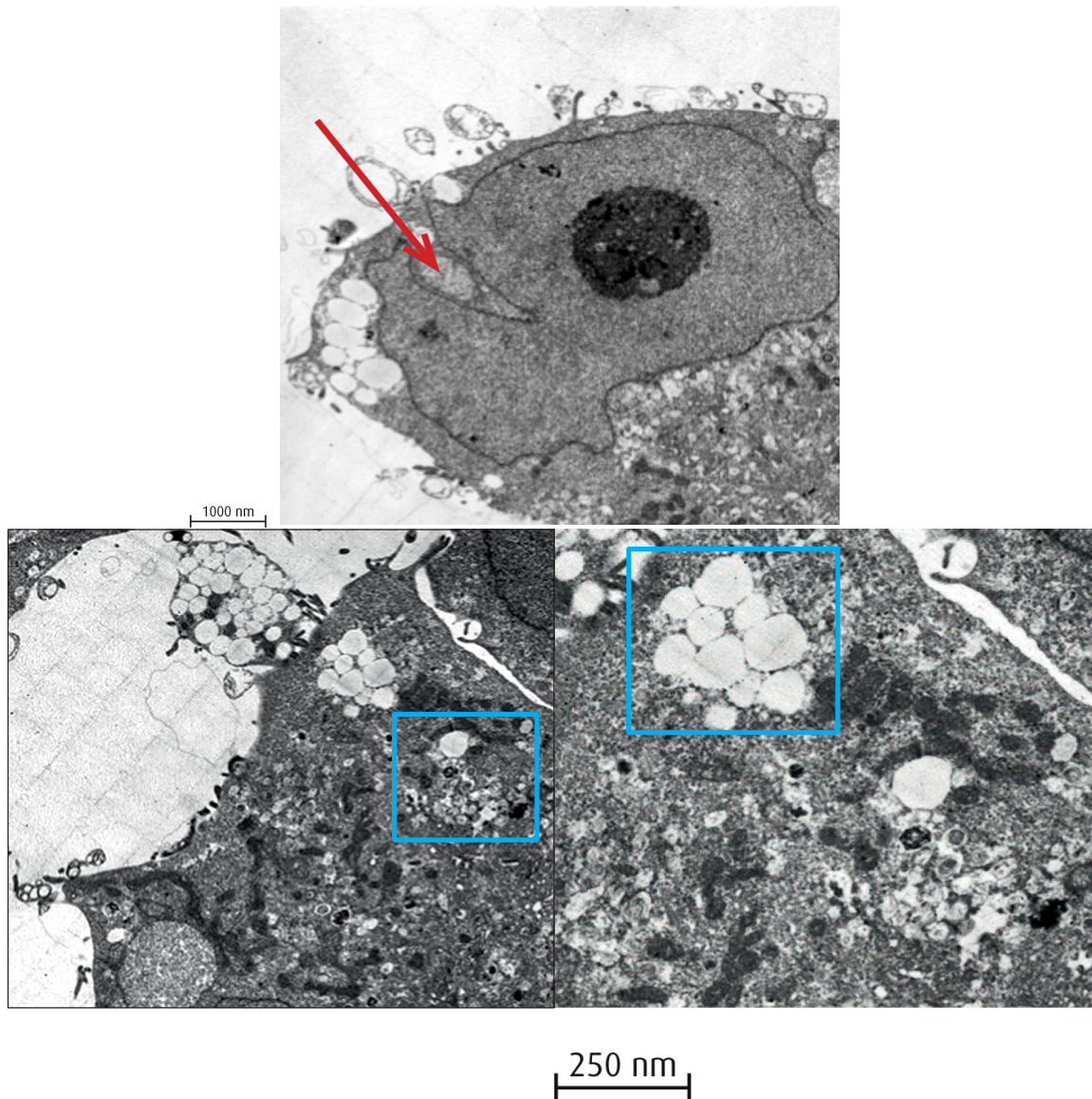


1000 nm

**Abb. 27: Unstimulierte Zelle der Glioblastomzelllinie U343 nach 48 Stunden**

Abgebildet ist eine Glioblastomzelle der Zelllinie U343 48 Stunden nach Aussaat (4.400-fach vergrößert).

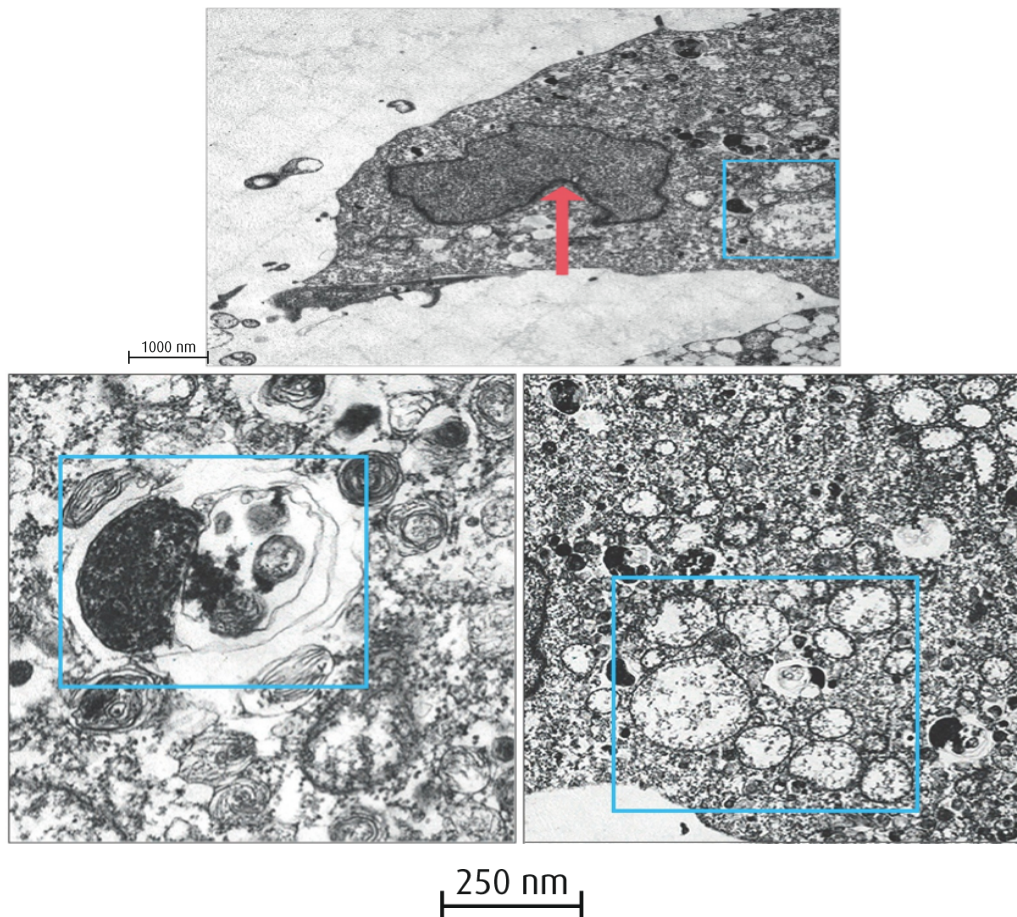
Abbildung 27 zeigt eine humane Glioblastomzelle der Zelllinie U343 48 Stunden nach der Aussaat. Die Zelle zeigt keine eindeutigen Zeichen für ein bevorstehendes Absterben.



**Abb. 28: Glioblastomzelle der Zelllinie U343 nach 48-stündiger Stimulation mit 5  $\mu$ M Clomipramin**

Abgebildet sind drei Ausschnitte einer humanen Glioblastomzelle der Zelllinie U343 nach 48-stündiger Stimulation mit 5  $\mu$ M Clomipramin. Oberes Bild und unteres Bild links 3.000-fache Vergrößerung. Unterem Bild rechts nachträglich digital vergrößert. Mit rot hervorgehobene Kernfragmentierung (obere Reihe). Blaue Vierecke zeigen Vesikel (untere Reihe). 1.000 nm Maßstab für die Bilder oben und unten links, für unten rechts gilt der 250 nm Maßstab.

Die in Abb. 28 gezeigte Zelle ist eine humane Glioblastomzelle (U343) nach 48-stündiger Stimulation mit 5  $\mu$ M Clomipramin. Die Zelle zeigt sowohl Kernfragmentierung (rot) als auch vermehrte Vesikel (blau). Die Kernfragmentierung ist ein Zeichen dafür, dass die Zelle möglicherweise kurz vor dem Absterben durch Apoptose steht. Die vermehrte Vesikel-Bildung lässt zudem Autophagozytose vermuten.



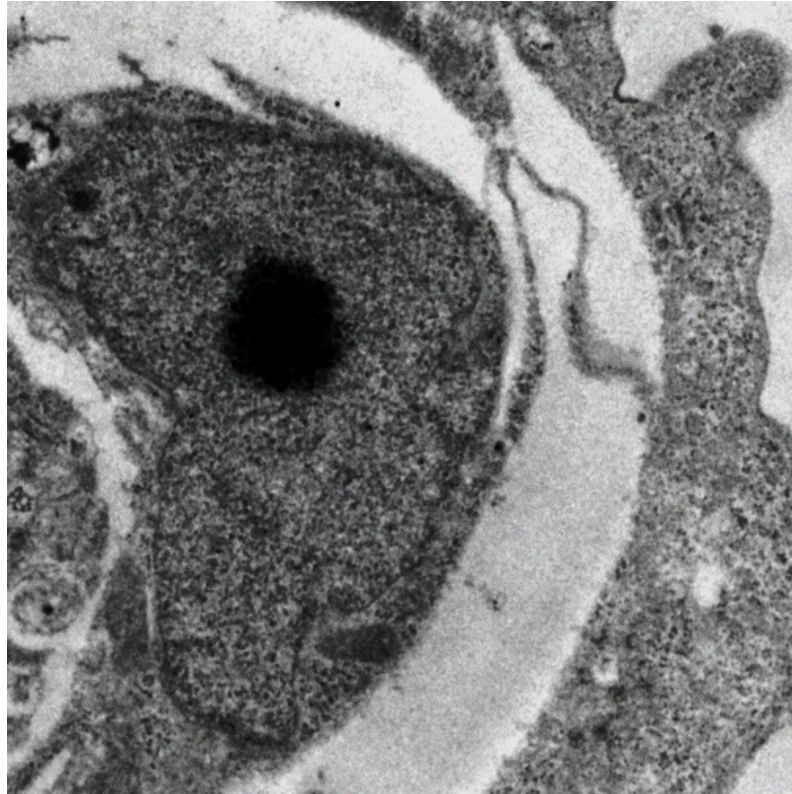
**Abb. 29: Glioblastomzelle der Zelllinie U343 nach 48-stündiger Stimulation mit 20  $\mu\text{M}$  Clomipramin**

Abgebildet ist eine humane Glioblastomzelle der Zelllinie U343 nach 48-stündiger Stimulation mit 20  $\mu\text{M}$  Clomipramin. Oberer Ausschnitt in 3.000-facher Vergrößerung, links unten 20.000-fach vergrößert. Rechts unten nachträglich digital vergrößert. Roter Pfeil weist auf fragmentierten Kern (oben). Blaue Vierecke weisen auf Autophagosomen (alle Bilder). 1.000 nm Maßstab für oberes Bild, 250 nm Maßstab für die beiden unteren.

Abbildung 29 zeigt 3 Ausschnitte aus einer humanen Glioblastomzelle der Zelllinie U343 nach einer 48-stündigen Stimulation mit 20  $\mu\text{M}$  Clomipramin.

In der Übersicht (oben) zu erkennen ist eine beginnende Kern-Fragmentierung (rot) und deutlich gesteigerte Vesikel-Bildung (blau).

In den Ausschnitten (unten) sind Vesikel mit Doppelmembranen zu erkennen, so genannte Autophagosomen (blau), die stark für das Ablaufen von Autophagozytose sprechen.

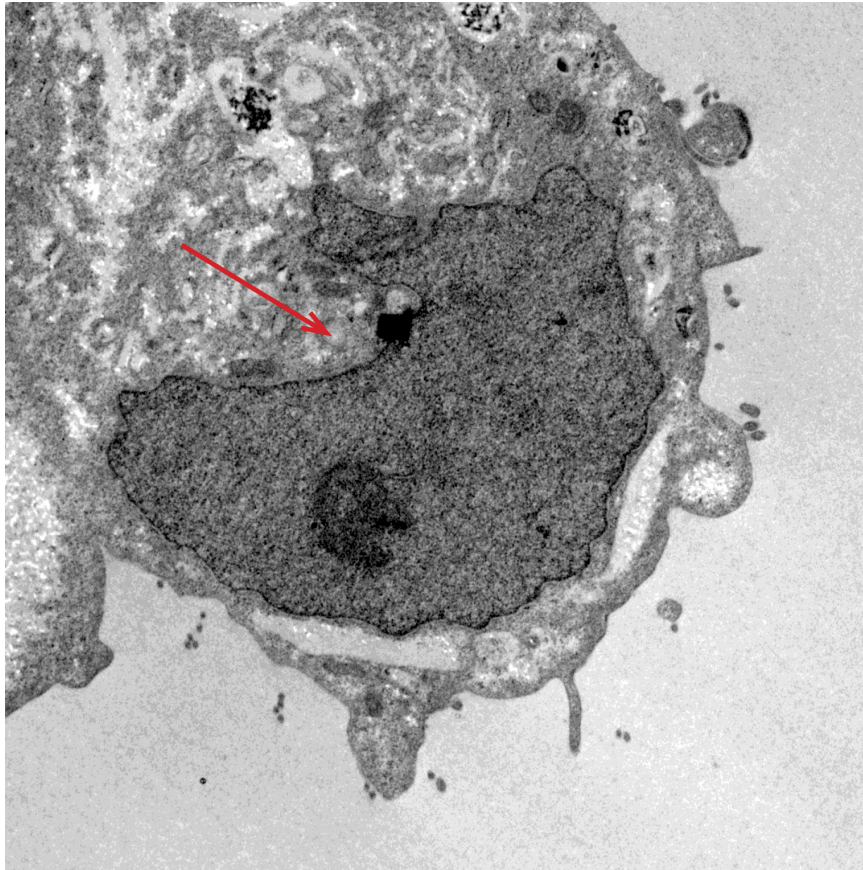


1000 nm

**Abb. 30: Glioblastomzelle der Zelllinie U343 nach 48-stündiger Stimulation mit 10 µM Temozolomid**

Abgebildet ist der Zellkern einer humanen Glioblastomzelle der Zelllinie U343 nach 48-stündiger Stimulation mit 10 µM Temozolomid (7000-fach vergrößert).

In Abbildung 30 ist eine Glioblastomzelle der Zelllinie U343 nach 48 Stunden Stimulation mit 10 µM Temozolomid zu erkennen. Unter anderem oben links ist eine beginnende Kondensation der DNA als ein mögliches Zeichen für apoptotische Vorgänge zu erkennen.

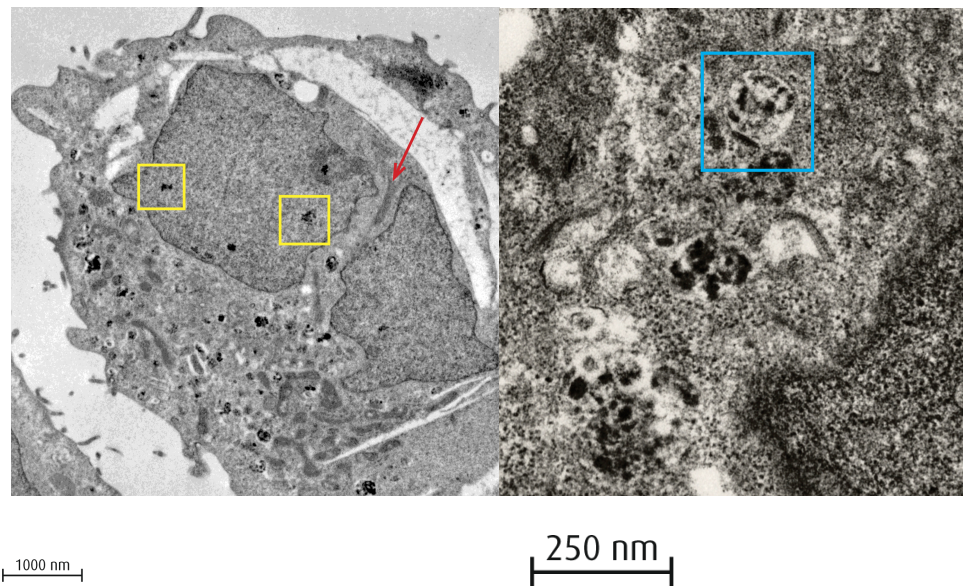


1000 nm

**Abb. 31: Glioblastomzelle der Zelllinie U343 nach 48-stündiger Stimulation mit 200  $\mu$ M Temozolomid**

Abgebildet ist der Zellkern einer über 48 Stunden mit 200  $\mu$ M Temozolomid behandelten Glioblastomzelle der Zelllinie U343 (4400-fach vergrößert). Roter Pfeil weist auf Kern-Fragmentierung.

Dargestellt ist eine Glioblastomzelle der Zelllinie U343, nach 48-stündiger Stimulation mit 200  $\mu$ M Temozolomid. Der rote Pfeil zeigt auf beginnendes *nuclear blebbing*, als Zeichen für Apoptose.

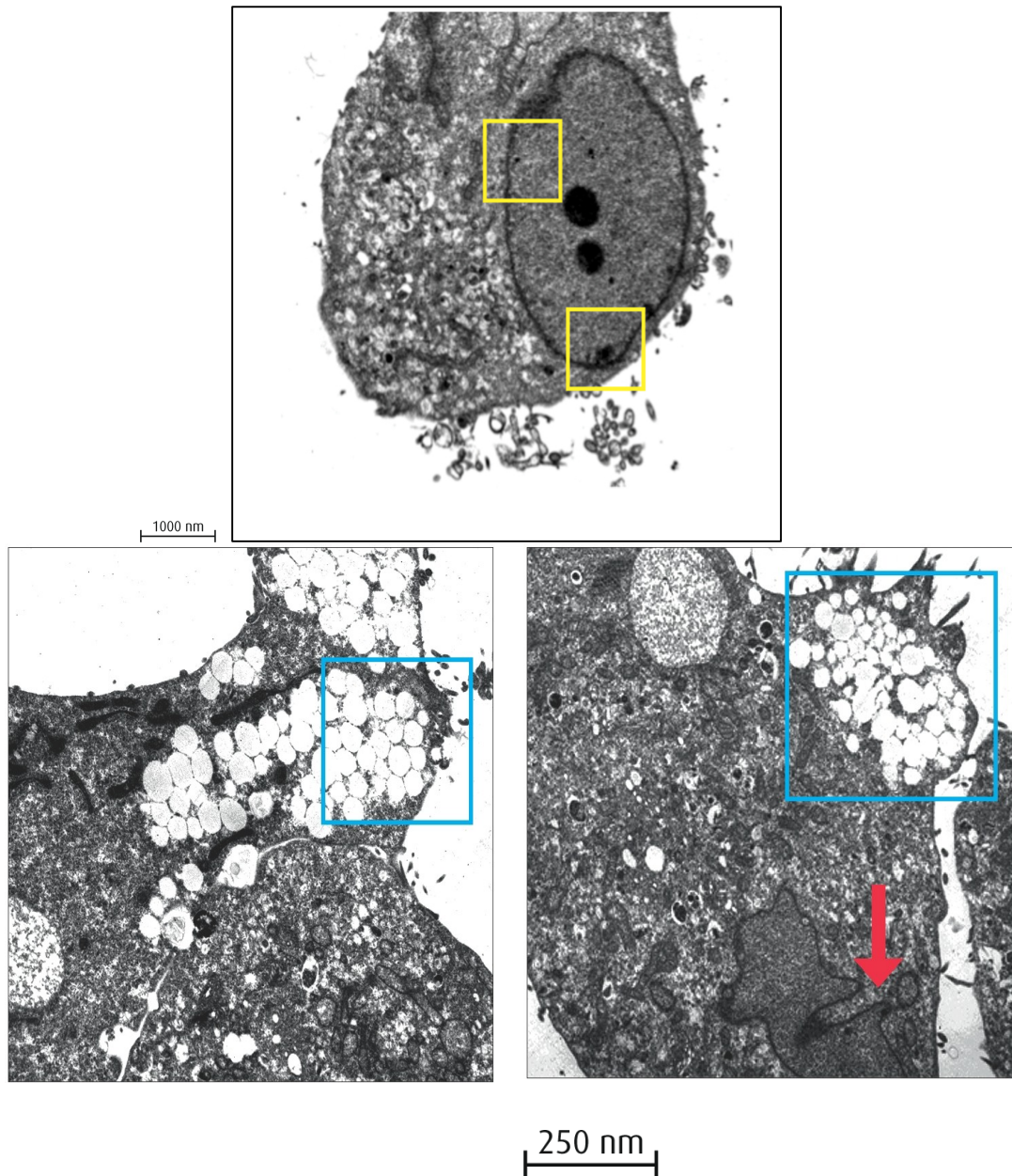


**Abb. 32: Glioblastomzelle der Zelllinie U343 nach 48-stündiger Stimulation mit 50  $\mu\text{M}$  Temozolomid + 20  $\mu\text{M}$  Clomipramin**

Abgebildet ist eine humane Glioblastomzelle nach 48-stündiger Behandlung mit 50  $\mu\text{M}$  Temozolomid + 20  $\mu\text{M}$  Clomipramin. Links Übersicht (4400-fach vergrößert), rechts Ausschnitt (20000-fach vergrößert). Gelbe Vierecke zeigen auf DNA-Kondensation (links), Pfeil weist auf fragmentierten Kern (links), mit blau hervorgehoben ist ein Vesikel (rechts).

Abbildung 32 zeigt eine humane Glioblastomzelle, die über 48 Stunden mit 50  $\mu\text{M}$  Temozolomid + 20  $\mu\text{M}$  Clomipramin behandelt wurde. Die Zelle zeigt als Zeichen für Apoptose DNA-Kondensation (gelb) und Kernfragmentierung (rot). Außerdem sind Vesikel (blau) als mögliche Korrelate der Autophagozytose zu erkennen.





**Abb. 33: Glioblastomzellen der Zelllinie U343 nach 48-stündiger Stimulation mit 50 µM Temozolomid + 1 µM Quinacrin**

Abgebildet sind 2 humane Glioblastomzellen der Zelllinie U343 nach 48-stündiger Stimulation mit 50 µM Temozolomid + 1 µM Quinacrin. Oben und unten links Übersichten (3.000-fach vergrößert). Unten rechts nachträglich digital vergrößert. Gelbe Vierecke heben DNA-Kondensationen hervor (oben). Roter Pfeil weist auf Kernfragmentierung (links unten). Blaue Vierecke deuten auf vermehrte Vesikel-Bildung (unten links und rechts). 1000 nm Maßstab für oberes Bild und Bild unten links, unten rechts 250 nm.

Abbildung 33 zeigt 2 Glioblastomzellen der Zelllinie U343, nachdem sie 48 Stunden mit 50 µM Temozolomid + 1 µM Quinacrin behandelt wurden. Im oberen Bild deutlich zu erkennen ist die Kondensation der DNA (gelb) als Zeichen für Apopto-

se. In den beiden Ausschnitten (unten) ist eine stark vermehrte Vesikel-Bildung (blau) zu sehen. Außerdem findet sich im Bild unten links ein fragmentierter Zellkern (rot).

Die durchgeführten elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten, dass Temozolomid, Clomipramin und Quinacrin auf partiell unterschiedliche Weisen zum Absterben der Zellen führen.

Die nur mit Temozolomid behandelten Zellen (U343 und C6) zeigten ausschließlich Zeichen für Apoptose (DNA-Kondensation, *nuclear blebbing*).

Die Zellen, die nur mit Clomipramin behandelt wurden, zeigten verstärkt Zeichen für Autophagozytose (Vesikel). Allerdings fanden sich hier auch immer wieder Zeichen für Apoptose (DNA-Kondensation, *nuclear blebbing*), wenn auch in geringerer Ausprägung als bei Temozolomid.

Bei der nur mit Quinacrin behandelten Zelle zeigten sich sowohl die bereits genannten Zeichen für Apoptose als auch die für Autophagozytose deutlich.

Ähnliches konnten wir bei den Zellen feststellen, die mit Kombinationen der Präparate behandelt wurden. Hier zeigten sich bei allen Zellen sowohl Zeichen für Autophagozytose als auch Merkmale der Apoptose.

Folglich konnte hier gezeigt werden, dass Temozolomid, Clomipramin und Quinacrin zwar auf unterschiedliche Weisen zum Absterben von Glioblastomzellen führen, diese aber durch Kombination der Pharmaka gemeinsam in einer Zelle ablaufen können.

Abschließend lassen sich die Ergebnisse der Versuche wie folgt zusammenfassen:

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Clomipramin als auch Quinacrin *in vitro* zytotoxisch auf Glioblastomzellen wirken. Außerdem stellten sich Clomipramin und Quinacrin im direkten Vergleich mit dem Standardchemotherapeutikum Temozolomid als effektiver in ihrer Wirkung auf die untersuchten Glioblastomzellen (A764, U343, C6) heraus. Zusätzlich zeigten wir, dass Temozolomid,

Clomipramin und Quinacrin teilweise über verschiedene Mechanismen zum Zelltod führen. Diese unterschiedlichen Mechanismen ließen sich durch Kombination der Pharmaka miteinander koppeln, wodurch sich *in vitro* eine gesteigerte Zytotoxizität und somit eine effektivere Abtötung der Glioblastomzellen erreichen ließ.

Die zytotoxischen Mechanismen der Kombinationen stellten sich außerdem zum Teil als recht überraschend dar. Die Kombination aus Temozolomid 50  $\mu\text{M}$  + Clomipramin 20  $\mu\text{M}$  zeigte im Caspase-3-Assay die höchste Caspase-3-Aktivität (Abb. 18). Hier präsentierte sich eine synergistische Wirkung, allerdings zeigte Clomipramin als Einzelsubstanz sowohl in den Caspase-3-Assays als auch in der Elektronenmikroskopie nur eine sehr leichte Apoptose-fördernde Wirkung. Dennoch kam es durch die Kombination dieser Substanz mit Temozolomid zu einem sehr deutlichen und signifikanten Anstieg, der so nicht zu erwarten war.

Hingegen führten die Kombination von Temozolomid mit Quinacrin, welche sich jeweils beide in den anderen Versuchen als deutlich Apoptose-fördernd zeigten, zu keinem deutlichen Anstieg der Caspase-3-Aktivität im Vergleich zu den Einzelsubstanzen.

## 5 Diskussion

Eine der wichtigsten Arbeiten über die Behandlung des Glioblastoms um Roger Stupp et al 2005, welche die adjuvante Gabe Temozolomids zur Strahlentherapie etablierte („Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma“), endet mit folgenden Worten:

*„Nevertheless the challenge remains to improve clinical outcomes further. For this reason the regimen, of radiotherapy plus temozolomide should serve as the new platform from which to explore innovative regimens for treating malignant gliomas.“*

Seit der Veröffentlichung dieser Arbeit im Jahre 2005 hat sich die Standardtherapie des Glioblastoms nicht grundlegend weiterentwickelt. Bis heute besteht sie aus einer möglichst vollständigen Resektion des Tumors, gefolgt von einer Radio-Chemotherapie nach dem Stupp-Schema (Stupp et al 2002). Trotz dieser intensiven Behandlung und einiger Neuerungen ist die Prognose des Glioblastoms nach wie vor infaust und das mittlere Überleben der Patienten liegt immer noch bei nur etwas mehr als einem Jahr.

Das verdeutlicht die Dringlichkeit der Suche nach neuen Behandlungsoptionen für das Glioblastom. Im Februar 2013 waren 257 Studien bei Clinicaltrials.gov (Register der US Nationalbibliothek für Medizin) registriert.

Auch wir sind diesem Aufruf gefolgt und haben in dieser Arbeit das mögliche Potenzial zweier vielversprechender Pharmaka (Clomipramin und Quinacrin) für die Therapie des Glioblastoms evaluiert.

Sowohl Clomipramin als auch Quinacrin sind zugelassene Substanzen; beide mit bekannten Wirkungs- und Nebenwirkungsprofilen.

Sie gehören der Gruppe der lysosomotropen Arzneimittel an (FIASMA), deren Nutzen in der Behandlung verschiedener Neoplasien bereits in zahlreichen Arbeiten gezeigt werden konnte.

Außerdem ist für beide Pharmaka bekannt, dass sie in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu durchdringen, was für die Therapie des Glioblastoms essentiell ist.

Im Folgenden sollen nun die erlangten Ergebnisse dieser Arbeit resümiert, diskutiert und schließlich kritisch im Kontext der aktuellen Literatur auf ihre Relevanz hin betrachtet werden.

### **5.1 Zytotoxische Effekte Clomipramins und Quinacrins auf Glioblastomzellen**

In den ersten beiden Versuchen wurden die humanen Glioblastomzellen U343 und A764 über 7 Tage mit Temozolomid, dem Standard-Chemotherapeutikum (Stupp et al. 2002), sowie dem trizyklischen Antidepressivum Clomipramin stimuliert. Hier zeigte sich Clomipramin verglichen mit Temozolomid als äußerst potent und tötete bei einer Konzentration von 20  $\mu$ M 100 % der Zellen beider Zelllinien ab.

Auch in einer darauffolgenden Zeitreihe mit Temozolomid und Clomipramin an A764 Zellen zeigte sich Clomipramin erneut als deutlich potenter in seiner zytotoxischen Wirkung gegenüber humanen Glioblastomzellen als Temozolomid.

Nach Abschluss dieser Vorversuche legten wir, wie im Ergebnisteil dargestellt, die Konzentrationen und Zeitintervalle für die folgenden Versuche fest und begannen Temozolomid systematisch mit Clomipramin und Quinacrin zu vergleichen und später auch in Kombination miteinander zu applizieren.

Um die Wirkung Quinacrins und Clomipramins objektiv mit der von Temozolomid vergleichen zu können, haben wir verschiedene Stimulationsexperimente mit genannten Substanzen an zwei unterschiedlichen humanen Glioblastomzelllinien (A764, U343) und an der von der Ratte stammenden Zelllinie C6 durchgeführt.

Auch in den folgenden Versuchen über 48 Stunden zeigten sich Clomipramin und Quinacrin als wirksamer verglichen mit Temozolomid.

Des Weiteren fiel auf, dass der Dosisbereich im Plasma eines Patienten, der nach dem Stupp-Schema mit Temozolomid behandelt wird, deutlich unter dem von uns ermittelten LD50 Wert liegt. Bei unseren Versuchen war in etwa eine Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  nötig, um 50 % der Glioblastomzellen zu töten. Nach dem Stupp-Schema (Stupp et al. 2002) erhält ein Patient 75  $\text{mg}/\text{m}^2$  Körperoberfläche für 7 Tage pro Woche während der Strahlentherapie. Nach Beendigung der Strahlentherapie werden 150-200  $\text{mg}/\text{m}^2$  Körperoberfläche an 5 Tagen innerhalb eines 28-tägigen Zykluses verabreicht. Diese Dosierung annehmend, liegt der Dosisbereich im Plasma des Patienten etwa bei 10-30  $\mu\text{M}$ , was zumindest bei unseren Versuchen nicht ausreichend war, um das Tumorwachstum deutlich zu hemmen.

Dies muss man allerdings mit der Einschränkung betrachten, dass ein Glioblastom-Patient Temozolomid zusätzlich zu einer Strahlentherapie (60 Gy) erhält, der häufig auch noch eine Resektion des Tumors vorangegangen ist. Zudem liefen unsere Versuche über stark begrenzte Zeiträume ab, wohingegen Glioblastom-Patienten über Wochen oder Monate mit Temozolomid behandelt werden.

Im nächsten Schritt der Arbeit wurden nun die Kombinationen der einzelnen Substanzen auf mögliche Wirkungssteigerungen gegenüber den Einzelsubstanzen untersucht.

Hier ließen sich die zytotoxischen Wirkungen aller drei Substanzen durch Kombination untereinander deutlich steigern. Kombiniert wurde Temozolomid mit Clomipramin und Quinacrin. Außerdem wurden Clomipramin und Quinacrin kombiniert. Lediglich bei den humanen Glioblastomzellen der Linie U343 zeigte die Kombination Temozolomid (50  $\mu\text{M}$ ) + Clomipramin(20  $\mu\text{M}$ ) keine gesteigerte Wirkung im Vergleich zu den Einzelsubstanzen.

Die Tatsache, dass sich die zytotoxischen Effekte der Einzelsubstanzen durch Kombination untereinander steigern ließen, warf Fragen nach den jeweiligen Tötungsmechanismen auf.

Um diese Fragen zu klären, wurden Caspase-3-Assays und schließlich aufwendige elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt.

## **5.2 Untersuchung der zytotoxischen Mechanismen mittels Caspase-3-Assays und Elektronenmikroskopie**

Im Fall von A764 Zellen war Temozolomid offensichtlich in der Lage, Apoptose auszulösen. Sowohl bei den Versuchen über 5 Tage als auch bei denen über 2 Tage, ließ sich eine im Vergleich zur Kontrolle deutlich gesteigerte Caspase-3-Aktivität feststellen.

Im Fall von C6 Zellen führte lediglich die Kombination von Temozolomid (50  $\mu\text{M}$ ) + Quinacrin (1  $\mu\text{M}$ ) zu einem deutlichen Anstieg der Caspase-3-Aktivität.

Bei den U343 Zellen konnte die gleiche Kombination ebenfalls eine leicht erhöhte Aktivität im Vergleich zu den Einzelsubstanzen auslösen. Die Kombination von Temozolomid (50  $\mu\text{M}$ ) + Clomipramin (20  $\mu\text{M}$ ) führte zu einem deutlicheren Anstieg der relativen Fluoreszenzeinheiten um das 38-fache, was hier eine synergistische Wirkung vermuten lässt.

Clomipramin für sich alleine führte bei keiner der drei Zelllinien (A764, U343, C6) binnen 24 bzw. 48 Stunden zu einem allzu deutlichen Anstieg der Caspase-3-Aktivität. Bei dem Versuch über 5 Tage zeigte jedoch auch Clomipramin einen Effekt auf die Caspase-3-Aktivität. Bedenkt man allerdings die in den Zellzahl-Versuchen zum Ausdruck gekommene z. T. sehr starke zytotoxische Wirkung Clomipramins auf Glioblastomzellen binnen 48 Stunden, so liegt die Vermutung nahe, dass Clomipramin hauptsächlich über einen anderen Weg zum Zelltod führt. Und als Folge dieser Form des Zellsterbens, nach längerer Zeit (5 Tage), auch die Apoptose-Rate ansteigt.

Die starke Wirkung Clomipramins in Kombination mit Temozolomid kam im vorherigen Abschnitt bereits zur Sprache. Die Kombination Clomipramin (20  $\mu\text{M}$ ) + Quinacrin (1  $\mu\text{M}$ ) wies bei U343 Zellen ebenfalls eine synergistische Wirkung auf und führte zu einem Anstieg der Caspase-Aktivität um das 210-fache in Bezug auf die Kontrolle.

Quinacrin führte bei allen drei verwendeten Zelllinien (A764, U343, C6) zu deutlichen, teils signifikanten Anstiegen der Caspase-Aktivität. Das deutet darauf hin, dass Quinacrin in der Lage ist, in Glioblastomzellen Apoptose auszulösen oder zumindest zu fördern. Des Weiteren zeigten sich bei U343 (human) und bei C6 (Ratte) Zellen additive Effekte für die Kombinationen Quinacrin (1  $\mu\text{M}$ ) + Temozolomid (50  $\mu\text{M}$ ) und Quinacrin (1  $\mu\text{M}$ ) + Clomipramin (20  $\mu\text{M}$ ).

Diese Ergebnisse deuten an, dass Temozolomid, Clomipramin und Quinacrin auf z. T. unterschiedliche Weisen zum Zelltod führen. Alle drei Substanzen haben sich in den Zellzahl-Versuchen als potent gegenüber Glioblastomzellen erwiesen, allerdings führten sie zu unterschiedlich starken Caspase-3-Aktivitäten. Außerdem lässt sich aus den Kombinationsversuchen ableiten, dass es unter den Substanzen gerade in Bezug auf die Auslösung von apoptotischen Vorgängen starke Synergismen zu geben scheint.

Um mehr über die Wirkungsweisen der einzelnen Substanzen zu erfahren, haben wir aufwendige elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Ziel war es hier, anhand der Morphologien Rückschlüsse auf mögliche Tötungsmechanismen der Pharmaka zu ziehen.

Wir sahen DNA-Kondensation und Kern-Fragmentierung (*nuclear blebbing*) als Zeichen für Apoptose an. Vermehrte Vesikel-Bildung – vornehmlich mit Doppelmembranen – werteten wir als Zeichen für Autophagozytose

Bei den mit Temozolomid behandelten Zellen fiel regelhaft das sogenannte „*nuclear blebbing*“ bzw. eine Kernsegmentierung auf. Zudem zeigten sie vermehrt Zeichen von DNA-Kondensation. Autophagozytose-Vesikel traten hingegen nicht regelhaft auf. Diese Beobachtungen deuten an, dass hier vornehmlich Apoptose zum Zelltod geführt haben muss.

Bei den Zellen, die mit Kombinationen aus Temozolomid plus Quinacrin behandelt wurden, kam es hingegen sehr wohl zu einer vermehrten Bildung von Vesikeln. Diese Vesikel zeigten zwar nicht immer eindeutig die Zeichen von Autophagozytose-Vesikeln (Doppelmembranen). Dennoch können sie als ein Indiz dafür gesehen werden, dass bei diesen Zellen neben apoptotischen Vorgängen auch



noch andere Prozesse, wie zum Beispiel Autophagozytose abliefen. Diese Beobachtung deckt sich mit den Erkenntnissen aus den Zellzahl-Versuchen, in denen sich die Kombinationen als deutlich potenter in ihrer Wirkung gegen Glioblastomzellen zeigten als die Einzelsubstanzen. Ebenso passen diese Befunde zu den Ergebnissen der Caspase-3-Assays für die Kombination aus Temozolomid + Quinacrin. Hier führte diese Kombination trotz ihrer hohen zytotoxischen Wirkung zu keinem starken Anstieg der Caspase-3-Aktivität. Daraus lässt sich schließen, dass diese Kombination nicht vornehmlich über Apoptose, sondern über Autophagozytose zum Zelltod geführt hat.

Die Zellen, welche mit der Kombination Temozolomid (50  $\mu$ M) + Clomipramin (20  $\mu$ M) behandelt wurden, zeigten im Vergleich zu der vorab besprochenen Kombination (T50+Q1) deutlich weniger Vesikel, dafür wiederum vermehrtes „*nuclear blebbing*“ und DNA-Kondensation. Auch diese Ergebnisse decken sich mit denen der vorherigen Versuche. Diese Kombination wies einen stark negativen Effekt auf das Wachstum von U343 auf und zeigte im Caspase-3-Assay eine sehr starke Aktivität. Das lässt darauf schließen, dass der Zelltod hier vor allem über Apoptose erfolgte. Und die gesteigerte Potenz im Vergleich zu den Einzelsubstanzen deutet darauf hin, dass es bei dieser Kombination zu einer wie auch immer gearteten gegenseitigen Verstärkung gekommen ist.

Die mit Clomipramin als Einzelsubstanz behandelten Zellen der Zelllinien U343 (human) und C6 (Ratte) zeigten deutliche Anzeichen für autophagozytotische Prozesse. Beide Zelllinien zeigten im Elektronenmikroskop Autophagozytose-Vesikel. Im Fall von U343 fand sich zwar auch DNA-Kondensation als Zeichen für Apoptose, dennoch überwogen die morphologischen Korrelate der Autophagozytose. Dies spiegelte auch die Ergebnisse vorheriger Versuche wider. Hier erwies sich Clomipramin als äußerst potent gegenüber U343 Zellen, führte aber im Caspase-3-Assay nicht zu einem deutlichen Anstieg der relativen Fluoreszenzeinheiten. Im Fall der von der Ratte stammenden Zelllinie C6 waren die Ergebnisse ähnlich, aber weniger deutlich. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Clomipramin hauptsächlich über Autophagozytose zum Zelltod führt. Die partiell leicht erhöhten Caspase-3-Aktivitäten und morphologischen Korrelate für Apoptose könnten möglicherweise Folge der Autophagozytose sein (Zaidi et al. 2001).

Clomipramin als Einzelsubstanz zeigte sich also, wie bereits besprochen, als wenig bis gar nicht Apoptose-fördernd. Aber in Kombination mit dem mittelmäßig Apoptose-fördernden Temozolomid kam es zum stärksten von uns ermittelten Anstieg der Caspase-3-Aktivität. Dieser Umstand ist äußerst interessant und es sollte in folgenden Arbeiten genauer auf die zu Grunde liegenden Mechanismen eingegangen werden. Denn eines der Hauptprobleme in der Glioblastombehandlung sind die Resistenzmechanismen des Tumors. Möglicherweise ist Clomipramin in der Lage, ebendiese Mechanismen zu umgehen und so Temozolomid zu ermöglichen, seine volle zytotoxische Wirkung zu entfalten.

Quinacrin als Einzelsubstanz kam lediglich bei den von der Ratte stammenden C6 Zellen zum Einsatz. Quinacrin in einer Konzentration von 10 µM führte hier sowohl zur Ausbildung von Zeichen für Apoptose (DNA-Kondensation, Kernfragmentierung) als auch für Autophagozytose (Vesikel mit Doppelmembran). Daraus lässt sich schließen, dass Quinacrin sowohl Apoptose als auch Autophagozytose auslösen kann.

Quinacrin erwies sich in vorherigen Versuchen als stark zytotoxisch wirksam gegen Glioblastomzellen und führte im Caspase-3-Assay zu z. T. sehr starken Anstiegen der relativen Fluoreszenzeinheiten. Allerdings zeigte sich dieser Anstieg meist erst bei höheren Konzentrationen (25 µM), wobei Quinacrin aber schon bei niedrigeren Konzentrationen (10 µM) ausgesprochen wirksam gegen Glioblastomzellen war. Dies ist neben den Morphologien in der Elektronenmikroskopie ein weiteres Indiz dafür, dass Quinacrin in der Lage ist, sowohl Apoptose als auch Autophagozytose auszulösen. Wobei es scheint, dass Quinacrin in geringeren Dosen hauptsächlich über Autophagozytose wirkt und erst in höheren Dosierungen auch Apoptose auslöst.

### **5.3 Wirkung Clomipramins auf die Expression von VEGF-A**

Wir untersuchten mittels *Real-Time-RT-PCR*, ob sich durch die Gabe Temozolomids, Clomipramins und Quinacrins in humanen Glioblastomzellen der Zelllinie U343 Expressionsänderungen für *VEGF-A*, *VEGF-C*, *VEGF-D*, *VEGFR-2/KDR*, *VEGFR3*, *CXCR4*, *CXCR7* und *VEGFR-1/FLT1* induzieren lassen. Lediglich im Fall von Clomipramin ließ sich eine gesteigerte Expression von *VEGF-A* (*Vascular*

*Endothelial Growth Factor*) feststellen. *VEGF-A* ist ein Angiogensefaktor, den Gewebe vermehrt ausschütten, wenn sie unter Hypoxie leiden.

Verschiedene Arbeiten zeigen, dass eine vermehrte Expression von VEGF einen negativen Einfluss auf die Prognose des Glioblastoms haben kann (Hamerlik et al. 2012, Xu et al. 2013). Daher ist der Fakt, dass Clomipramin die Expression von *VEGF-A* zu induzieren scheint, möglicherweise ein Nachteil dieser Substanz. Die sich hieraus u. U. ergebenden unerwünschten Wirkungen Clomipramins bei der Behandlung des Glioblastoms gilt es allerdings noch zu evaluieren, da sich Clomipramin dessen ungeachtet in unseren Versuchen *in vitro* als hoch potent gegenüber Glioblastomzellen zeigte.

#### **5.4 Kritische Auseinandersetzung mit der aktuellen Literatur**

Im Folgenden sollen die Ergebnisse dieser Arbeit im Kontext der aktuellen Literatur kritisch diskutiert und auf ihre Relevanz hin beurteilt werden.

##### **5.4.1 Die Rolle trizyklischer Antidepressiva in der Behandlung des Glioblastoms**

Clomipramin gehört, wie bereits in vorherigen Abschnitten dieser Arbeit erwähnt, zur Gruppe der lysosomotopen Arzneimittel (*FIASMA*) und ist ein trizyklisches Antidepressivum. In zahlreichen weiteren Arbeiten wurden bereits verschiedene Substanzen dieser beiden Gruppen auf einen möglichen Nutzen in der Therapie unterschiedlicher Karzinome hin untersucht.

Eine von Seung-Hyun Jeon et al. im Jahre 2011 veröffentlichte Arbeit beschäftigt sich mit der Wirkung Imipramins auf humane Glioblastomzellen der Zelllinie U-87MG. Das trizyklische Antidepressivum Imipramin unterscheidet sich von Clomipramin lediglich durch einen Chlor-Substituenten und gehört ebenso zur Gruppe der *FIASMA*. In dieser Arbeit erwies sich Imipramin als äußerst wirksam gegen Glioblastomzellen der Zelllinie U-87MG und als moderat wirksam gegenüber der Zelllinie C6 (Ratte). Des Weiteren zeigte sich, dass Imipramin in Glioblastomzellen den Zelltod effektiver einleitet als in gesunden Astrozyten.

Seung-Hyun Jeon et al. untersuchten, ob der durch Imipramin eingeleitete Zelltod Apoptose-abhängig ist. Sie kamen zu dem Schluss, dass Imipramin keinen oder kaum Einfluss auf die Apoptose hat. In einem nächsten Schritt untersuchten sie die Glioblastomzellen auf Zeichen für Autophagozytose.

Seung-Hyun Jeon et al. folgerten letztlich, dass Imipramin nicht über Apoptose sondern über Autophagozytose den Zelltod in Glioblastomzellen einleitet. Dieses Ergebnis deckt sich weitestgehend mit unseren Ergebnissen bezüglich der Wirkung Clomipramins auf Glioblastomzellen.

Eine weitere Arbeit, welche das möglicherweise große Potenzial der Gruppe der TCA andeutet, ist die Arbeit um Jian Ma et al. aus dem Jahre 2013. Hier konnte gezeigt werden, dass Desipramin bei Glioblastomzellen der Zelllinie C6 zum Zelltod führt. Auch hier wurden elektronenmikroskopisch Autophagosomen gefunden und die Autophagozytose als Hauptmechanismus für den Zelltod angenommen.

In weiteren Arbeiten spiegelt sich die vielversprechende Rolle trizyklischer Antidepressiva in der Behandlung verschiedener neoplastischer Erkrankungen wider. So konnten Merry et al. bereits 1991 zeigen, dass Clomipramin im Stande war, Resistenzen in osteogenen Sarkomen zu umgehen. Serafeim et al. veröffentlichten 2003 eine Arbeit, welche die Wirkung Imipramins, Amitryptilins und Desipramins auf Lymphomzellen beschreibt. Amitryptilin und Desipramin waren hier in der Lage, Autophagozytose auszulösen. Im Jahre 2008 konnten Arimochi et al. zeigen, dass Desipramin höchst potent gegenüber Kolon-Karzinom Zellen der Linie HT29 ist.

All diese Arbeiten zeigen den möglicherweise großen Nutzen der Gruppe der TCA in der Behandlung des Glioblastoms auf. Clomipramin gehört allerdings, wie schon erwähnt, nicht nur zur Gruppe der TCA, sondern auch zur Gruppe der lysosomtropen Substanzen (*FIASMA*). Auch diese Gruppe wird als vielversprechend in der aktuellen Literatur diskutiert. Wir haben uns in dieser Arbeit neben Clomipramin intensiv mit einem zweiten Vertreter aus der Gruppe der funktionellen Inhibitoren der sauren Sphingomyelinase (*FISMA*) beschäftigt, dem Quinacrin.

#### **5.4.2 Die Rolle Quinacrin in der Behandlung des Glioblastoms**

Quinacrin und andere Malaria-Therapeutika wie Chloroquin und Mefloquin, die alle samt Derivate des Chinins sind, erregen aktuell Aufsehen mit ihrem möglichen Nutzen als adjuvante Therapien für verschiedene neoplastische Erkrankungen.

Briceno et al. veröffentlichten 2003 eine Arbeit über die langfristige adjuvante Gabe Chloroquins zur Standard-Glioblastomtherapie. Hier zeigte sich, dass Chloroquin die Wirkung der antineoplastischen Therapie deutlich verstärkte. Ursächlich hierfür sahen Briceno et al. vor allem „antimutagene Effekte“ des Chloroquins und weniger seine Zytotoxizität. 2006 wurde eine doppel-blinde Placebo-kontrollierte Studie von Sotelo et al. durchgeführt, welche den Nutzen Chloroquins in der GBM-Therapie darlegen sollte. Hier zeigte sich ein Überlebensvorteil von 11 Monaten für die Gruppe, die adjuvant mit Chloroquin behandelt wurde, im Vergleich zur Placebo Gruppe (24 vs. 13 Monate). Diese Ergebnisse wurden 2007 durch Briceno et al. nochmals bestätigt.

Ying Geng et al. untersuchten 2010 die durch Chloroquin zum Zelltod führenden Vorgänge genauer. Hier zeigte sich zum einen, dass Autophagozytose-Prozesse definitiv am Zelltod beteiligt sind, zum anderen wiesen Ying Geng et al. darauf hin, dass Quinacrin deutlich effektiver gegen GBM Zellen zu sein scheint als Chloroquin.

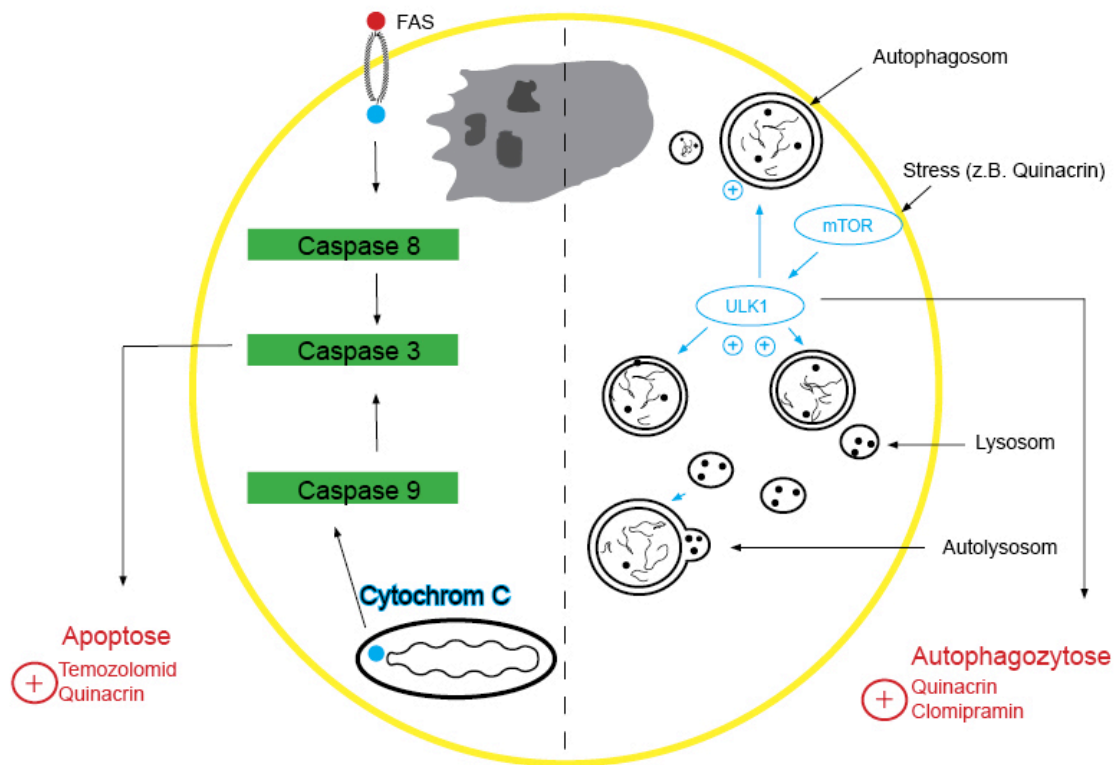
Zwei weitere aktuelle Arbeiten um Kun-Huang-Yan et al. zeigten 2013, dass Mefloquin, ein weiteres Derivat des Chinins, äußerst potent in der Behandlung des Prostata-Karzinoms zu sein scheint. Hier ließ sich im Tiermodell ein deutlicher Überlebensvorteil durch die Behandlung mit Mefloquin nachweisen.

Sotelo et al. untersuchten 2006 die Wirkung von Quinacrin, wenn dieses direkt in ein Glioblastom injiziert wird. Hierfür wurden Ratten C6 Zellen subkutan implantiert. Eine einmalige Injektion von 150 mg Quinacrin führte bei 72 % der Ratten über eine Entzündungsreaktion und begrenzte Nekrose zum völligen Verschwinden des Tumors.

Wang et al. konnten 2011 zeigen, dass Quinacrin bei hepatocellulärem Karzinom (HCC) sensitivierend gegenüber Chemotherapeutika wirkt. Gallant et al. fanden 2011 eine deutliche synergistische Wirkung zwischen Quinacrin und 5-Fluorouracil bei der Behandlung des Kolon-Karzinoms. Somit zeigte sich ein klarer Nutzen in der adjuvanten Gabe von Quinacrin.

Mohapatra et al. zeigten, dass Quinacrin sowohl bei Brustkrebs- als auch bei Darmkrebs-Zellen P53 abhängig Apoptose auslöst. Der Apoptose vorweg gehen Autophagozytose-Prozesse, die möglicherweise zu Membranlecks in Lysosomen führen und so letztlich Apoptose auslösen (Zaidi et al. 2001). Dies deckt sich mit unseren Ergebnissen an Glioblastomzellen. In der Elektronenmikroskopie fanden wir deutliche Zeichen für Autophagozytose. Überdies zeigten die mit Quinacrin behandelten Zellen stark gesteigerte Apoptoseraten im Caspase-3-Assay, allerdings erst bei höheren Dosierungen (25  $\mu$ M).

Des Weiteren stellten Mohapatra et al. fest, dass Quinacrin Mamma-Ca-Zellen (MCF-7) deutlich stärker angreift als gesundes Epithelgewebe (MCF-10A). Dies gilt es bei Glioblastomzellen noch zu untersuchen.



**Abb. 34: Mechanismen des Zelltodes**

Links läuft Apoptose ab. Zu sehen ist ein fragmentierter Kern (*nuclear blebbing*) und DNA-Kondensation. Auf der rechten Seite läuft Autophagozytose ab.

## 5.5 Fazit

Die vorliegende Thesis präsentiert im Einklang mit anderen Arbeiten, dass sowohl Clomipramin als auch Quinacrin in der Behandlung des Glioblastoms von Nutzen sein können.

Clomipramin zeigte sich alleine und vor allem in Kombination mit Temozolomid und Quinacrin als äußerst wirkungsvoll gegen humane (U343, A764) und von der Ratte stammende (C6) Glioblastomzellen. Zudem zeichnet sich Clomipramin dadurch aus, dass es eine bereits zugelassene Substanz mit bekanntem Wirkungs- und Sicherheitsprofil ist. Ein zusätzlicher großer Vorteil dieser Arznei ist ihre Fähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke zu durchdringen.

Die von uns mittels *Real-Time-RT-PCR* festgestellte Induktion der Expression von *VEGF-A* könnte allerdings ein Argument gegen den Nutzen von Clomipramin in der Glioblastombehandlung darstellen. Um dies zu bestätigen oder auszuschließen, bedarf es aber sicherlich weiterführender Untersuchungen in diese Richtung.

Nichtsdestotrotz hat sich Clomipramin in dieser Arbeit als äußerst wirksam in der *in vitro* Behandlung des Glioblastoms erwiesen.

Ebenfalls als stark wirksam gegen Glioblastomzellen zeigte sich Quinacrin. Quinacrin war alleine und in Kombination mit Temozolomid und Clomipramin bereits in recht geringen Dosierungen hoch potent. Dieses Ergebnis wird von Arbeiten anderer Arbeitsgruppen auch bei anderen Tumoren gestützt. Wie Clomipramin ist Quinacrin eine bekannte und zugelassene Substanz. Wirkungs- und Nebenwirkungsprofil sind bestens bekannt. Quinacrin ist seit den 30er Jahren des letzten Jahrhunderts in Gebrauch und wurde tausenden von Soldaten während des 2. Weltkrieges zur Behandlung und Prophylaxe der Malaria verabreicht.

Quinacrin ist ebenfalls in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu durchdringen und diente daher u. a. auch zur Behandlung der zerebralen Malaria (British Medical Journal 1944).

Sowohl Clomipramin als auch Quinacrin führen zumindest partiell über Autophagozytose zum Zelltod. Autophagozytose gilt eigentlich als Schutzfunktion der Zel-



le, kann aber auch zum Zelltod führen. Gleiches gilt für Krebszellen, hier kann sie fördernd oder hemmend auf die Proliferation wirken (White 2012).

Die Fähigkeit, Autophagozytose auszulösen, könnte eine der größten Stärken der beiden Substanzen in der Behandlung des Glioblastoms sein. Denn die Autophagozytose wird gegenwärtig als eine Art „Trojanisches Pferd“ bei der Umgehung von Resistenzen diskutiert (Lefranc et al. 2006, Seun Hyun et al. 2011).

	<b><u>Apoptose</u></b>	<b><u>Autophagozytose</u></b>	<b><u>Nekrose</u></b>
<b><u>Definition:</u></b>	Physiologischer, programmierter Zelltod (Typ I). Keine Entzündung, keine Schädigung der Nachbarzellen.	Kataboler Prozess, dient dem Erhalt eines Gleichgewichts in Zelle. Kann aber auch zu programmiertem Zelltod (Typ II) führen.	Pathologischer Zelltod
<b><u>Auslöser:</u></b>	Hitze, Strahlung, Viren, Hypoxie (Extrazellulär)  Toxine, Hormone, Zytokine, NO (Intrazellulär)	Nahrungsmangel, Infektion, Reparatur, „Recycling“	Infektion, Trauma, etc.
<b><u>Zeichen:</u></b>	DNA-Kondensation Kern-Fragmentation Zellschrumpfung <i>Apoptotic Bodies</i>	Vesikel mit Doppelmembran (Autophagosomen)	Entzündung Narben

**Tab. 8: Übersicht Apoptose, Autophagozytose, Nekrose**

Die Resistenzmechanismen der Glioblastomzellen sind wohl eine der Herausforderungen überhaupt bei der Entwicklung neuer wirksamerer Therapien und momentan noch hauptverantwortlich für die schlechte Prognose der Erkrankung. Dennoch geben Ergebnisse wie die unserer Arbeit Anlass zur Hoffnung und sollten als Ansporn gesehen werden, die Forschung weiter voran zu treiben.

## 6 Ausblick

In der vorliegenden Thesis konnte aufgezeigt werden, dass Clomipramin und Quinacrin *in vitro* wirksam gegen Glioblastomzellen sind. Damit wurde ein Grundstein für weitere Untersuchungen gelegt.

Ein wichtiger Schritt wäre es, die Versuche im Tiermodell fortzusetzen, um mehr über die Wirkung dieser Substanzen *in vivo* zu erfahren. Im Tiermodell sollten längere Untersuchungszeiträume und eine Kombination mit einer Bestrahlungstherapie angestrebt werden, um realitätsnähere Ergebnisse zu erlangen.

Weitere Experimente sollten der genauen Ergründung der Tötungsmechanismen der Substanzen gewidmet werden. Hier wären vor allem immunhistochemische Untersuchungen sinnvoll.

Außerdem haben die *RT-PCR*-Untersuchungen Fragen aufgeworfen, die es zu klären gilt. Die Auswirkungen der durch Clomipramin induzierten Expression von *VEGF-A* müssen genau evaluiert werden, bevor Clomipramin Anwendung in der Therapie des Glioblastoms finden kann.

Des Weiteren scheint es sinnvoll, auch im Falle von Quinacrin mittels *RT-PCR* zu ermitteln, ob es hier zu verstärkten Expressionen von tumorfördernden oder aber ebenso tumorhemmenden Faktoren kommt.

Aggregierend gilt es zu ergründen, ob die hier untersuchten Substanzen *in vivo* einen Nutzen in der Therapie von Glioblastomen haben und am Menschen zur Anwendung kommen können.

## 7 Zusammenfassung

Das Glioblastom ist der häufigste hirneigene maligne Tumor des Erwachsenen und zeichnet sich durch eine äußerst schlechte Prognose aus. Das mittlere Überleben liegt lediglich bei 9-12 Monaten, trotz chirurgischer Resektion, Bestrahlung und Chemotherapie mit dem Alkylanz Temozolomid. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, zwei neuartige Ansätze zur möglichen Verbesserung der Glioblastomtherapie durch in vitro-Versuche zu evaluieren und mit dem Standardchemotherapeutikum zu vergleichen.

Die untersuchten Pharmaka sind zum einen das trizyklische Antidepressivum Clomipramin und zum anderen das Antiprotoziokum Quinacrin. Beide Substanzen sind funktionelle Inhibitoren der sauren Sphingomyelinase (FIASMA).

Clomipramin und Quinacrin zeigten sich in verschiedenen Konzentrationsreihen als äußerst wirkungsvoll gegenüber Glioblastomzellen. Außerdem ließ sich die Wirkung der Pharmaka z.T. durch Kombinationen untereinander noch wesentlich steigern.

In Caspase-3-Assays zeigten sich für Temozolomid und Quinacrin erhöhte Apoptose-Raten. Clomipramin als Einzelsubstanz hingegen hatte nur geringen Einfluss auf die Apoptose-Rate. Die Kombinationen der Substanzen zeigten in weiteren Versuchen z. T. nochmals deutliche Steigerungen der Caspase-3-Aktivität in Vergleich zu den Effekten der Einzelsubstanzen. Partiiell zeigten sich hier sogar additive und auch synergistische Effekte.

In der Elektronenmikroskopie zeigten sich bei den mit Temozolomid behandelten Zellen vor allem Zeichen für Apoptose (DNA-Kondensation, nuclear blebbing). Auch Quinacrin führte bei den Zellen zur Ausbildung deutlicher Zeichen für Apoptose. Außerdem fanden wir hier aber auch verstärkte Vesikel-Bildung und Autophagosomen als Zeichen für Autophagozytose. Die mit Clomipramin behandelten Zellen zeigten kaum Zeichen für Apoptose, jedoch sehr wohl Zeichen für Autophagozytose.

Abschließend lässt sich konstatieren, dass wir mit Clomipramin und Quinacrin zwei *in vitro* gegen Glioblastomzellen überaus wirksame Substanzen gefunden haben. In Zukunft sollten unsere Ergebnisse *in vivo* verifiziert und auf ihre Anwendbarkeit beim Menschen hin überprüft werden.

## Summary

The Glioblastoma is the most common malignant brain tumour in adults which is characterized by a very poor prognosis. The median survival adds up to only 9-12 months despite surgical resection, radiation therapy and chemotherapy with the orally active, alkylating agent Temozolomide. The aim of this thesis therefore was to evaluate two new possible approaches to improve the therapy of Glioblastoma. Two alternative drugs were evaluated *in-vitro* and compared to the standard chemotherapeutic agent Temozolomide.

These two drugs are on the one hand the tricyclic antidepressant Clomipramine and on the other hand the antiprotozoal agent Quinacrine. Both substances are Functional Inhibitors of Acid Sphingomyelinase (FIASMA).

Clomipramine and Quinacrine proved to be very efficient in killing glioma cells in several concentration series (*in vitro*). Furthermore, we could considerably increase the cytotoxicity by combining the individual agents with each other.

In caspases-3-assays Temozolomide and Quinacrine appeared to have a clear effect on apoptosis in glioma cells. Both agents clearly increased the caspases-3-activity while Clomipramine on its own had hardly any effects on apoptosis. By combining the 3 individual drugs with each other the effects on apoptosis could significantly be increased even more. Here we observed additive and partially even synergistic effects.

Using electron microscopy we found signs for 2 different kinds of programmed cell death. Cells treated with Temozolomide showed signs of apoptosis such as nu-

clear blebbing and DNA condensation. Cells treated with Quinacrine also showed signs of apoptosis. However, besides autophagy Quinacrine also induced autophagy as seen by formation of vesicles and autophagosomes. Cells treated with Clomipramine did not really show clear signs of apoptosis but did show distinct signs of autophagy.

In conclusion we can state that both Clomipramine and Quinacrine have been proven to be very effective in the *in-vitro* therapy of glioma cells. Prospectively our results have to be verified *in-vivo* and to be further analysed for their applicability in humans.

## 8 Literaturverzeichnis

Abaza MS, Shaban F, Narayan RK, Atassi MZ (1998). „**Human glioma associated intermediate filament proteins: over-expression, co-localization and cross-reactivity**“. Anticancer Res. 18: 1333-1340.

Aguzzi A, Brandner S, Sure U, Rüedi D, Isenmann S (2008). „**Transgenic and Knock-out Mice: Models of Neurological Disease**“. Brain Pathol. 4: 3-20.

Arimochi H, Morita K (2008). „**Desipramine induces apoptotic cell death through nonmitochondrial and mitochondrial pathways in different types of human colon carcinoma cells**“. Pharmacology. 81: 164-172.

Benjamin R, Capparella J and Brown A (2003). „**Classification of glioblastoma multiforme in adults by molecular genetics**“. Cancer J. 9: 82-90.

Bilir A, Erguven M, Oktem G, Ozdemir A, Uslu A, Aktas E, Bonavida B (2008). „**Potenziation of cytotoxicity by combination of imatinib and chlorimipramine in glioma**“. Int J Oncol. 32: 829-839.

Brat DJ, Castellano-Sanchez A, Kaur B, Van Meir EG (2002). „**Genetic and biologic progression in astrocytomas and their relation to angiogenic dysregulation**“. Adv Anat Pathol. 9: 24-36

Briceño E, Reyes S, Sotelo J (2003). „**Therapy of glioblastoma multiforme improved by the antimutagenic chloroquine**“. Neurosurg Focus. 14: 3.

Briceño E, Calderon A, Sotelo J (2007). „**Institutional experience with chloroquine as an adjuvant to the therapy for glioblastoma multiforme**“. Surg Neurol. 67: 388-391.

Br Med J. (1944). „**Merpacrin and Malaria**“. Br Med J. 18: 666–667.

Collinge J, Gorham M, Hudson F, Kennedy A, Keogh G, Pal S, Rossor M, Rudge P, Siddique D, Spyer M, Thomas D, Walker S, Webb T, Wroe S, Darbyshire J (2009). „**Safety and efficacy of quinacrine in human prion disease (PRION-1 study): a patient-preference trial.**“ *Lancet Neurol.* 8: 334-344.

Duncan GG (1945). „**Quinacrine hydrochloride (atabrine) as a malaria suppressive agent.**“ *Air Surg Bull.* 2: 413.

Ehsanian R, Van Waes C, Feller SM (2011). „**Beyond DNA binding - a review of the potential mechanisms mediating quinacrine's therapeutic activities in parasitic infections, inflammation, and cancers.**“ *Cell Commun Signal.* 9: 13.

Ferraro E, Cecconi F (2007). „**Autophagic and apoptotic response to stress signals in mammalian cells.**“ *Arch Biochem Biophys.* 462: 210-219.

Galanis E, Buckner JC (2000). „Chemotherapy of brain tumors.“ *Curr Opin Neurol.* 13: 619-625.

Gallant JN, Allen JE, Smith CD, Dicker DT, Wang W, Dolloff NG, Navaraj A, El-Deiry WS (2011). „**Quinacrine synergizes with 5-fluorouracil and other therapies in colorectal cancer.**“ *Cancer Biol Ther.* 12: 239-251.

Geng Y, Kohli L, Klocke BJ, Roth KA (2010). „**Chloroquine-induced autophagic vacuole accumulation and cell death in glioma cells is p53 independent.**“ *Neuro Oncol.* 12: 473-481.

Haas-Kogan, D, Shalev N, Wong M, Mills G, Yount G, Stokoe D (1998). „**Protein kinase B (PKB/Akt) activity is elevated in glioblastoma cells due to mutation of the tumor suppressor PTEN/MMAC.**“ *Curr Biol.* 8: 1195-1198.

Hamerlik P, Lathia JD, Rasmussen R, Wu Q, Bartkova J, Lee M, Moudry P, Bartek J Jr, Fischer W, Lukas J, Rich JN, Bartek J (2012). „**Autocrine VEGF-VEGFR2-Neuropilin-1 signaling promotes glioma stem-like cell viability and tumor growth.**“ *J Exp Med.* 209: 507-520.

Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, Wick W, Weller M, Mehta MP, Gilbert MR (2008). „**Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity.**“ J Clin Oncol. 26: 4189-4199.

Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R (2005). „**MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma.**“ N Engl J Med. 352: 997-1003.

Hegi ME, Diserens AC, Godard S, Dietrich PY, Regli L, Ostermann S, Otten P, Van Melle G, de Tribolet N, Stupp R (2004). „**Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide.**“ Clin Cancer Res. 10: 1871-1874.

Hentschel SJ, Lang FF (2003). „**Current surgical management of Glioblastoma.**“ Cancer J. 9: 113-125.

Hieu DT, Tan TT, Tan DN, Nguyet PT, Than P, Vinh DQ (1993). „**31,781 cases of non-surgical female sterilisation with quinacrine pellets in Vietnam.**“ Lancet. 342: 213-217.

Hochberg FH, Pruitt A (1980). „**Assumptions in the radiotherapy of glioblastoma.**“ Neurology. 30: 907-911.

Hosli P, Sappino AP, de Tribolet N, Dietrich PY (1998). „**Malignant glioma: should chemotherapy be overthrown by experimental treatments?**“ Ann Oncol. 9: 589-600.

Iwadate Y, Fujimoto S, Tagawa M, Namba H, Sueyoshi K, Hirose M, Sakiyama S (1996). „**Association of p53 gene mutation with decreased chemosensitivity in human malignant gliomas.**“ Int J Cancer. 69: 236-240.



Jeon SH, Kim SH, Kim Y, Kim YS, Lim Y, Lee YH, Shin SY (2011). „**The tricyclic antidepressant imipramine induces autophagic cell death in U-87MG glioma cells.**“ Biochem Biophys Res Commun. 413: 311-370.

Kaufmann SH, Vaux DL(2003). „**Alterations in the apoptotic machinery and their potential role in anticancer drug resistance.**“ Oncogene. 22: 7414-7430.

Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK (2002). „**The WHO classification of tumors of the nervous system**“. J Neuropathol Exp Neurol. 61: 215-225.

Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW (1993). „**The new WHO classification of brain tumours**“. Brain Pathol. 3, 255-268.

Kornhuber J, Muehlbacher M, Trapp S, Pechmann S, Friedl A, Reichel M, Mühle C, Terfloth L, Groemer TW, Spitzer GM, Liedl KR, Gulbins E, Tripal P (2011). „**Identification of novel functional inhibitors of acid sphingomyelinase.**“ PLoS One. 6: 23852.

Kornhuber J, Tripal P, Reichel M, Mühle C, Rhein C, Muehlbacher M, Groemer TW, Gulbins E (2010). „**Functional Inhibitors of Acid Sphingomyelinase (FI-ASMAs): a novel pharmacological group of drugs with broad clinical applications.**“ Cell Physiol Biochem. 26: 9-20.

Koshy M, Villano JL, Dolecek TA, Howard A, Mahmood U, Chmura SJ, Weichselbaum RR, McCarthy BJ (2012). „**Improved survival time trends for glioblastoma using the SEER 17 population-based registries.**“ J Neurooncol. 107: 207-212.

Lai GM, Lee LM (2013). „**Mefloquine exerts anticancer activity in prostate cancer cells via ROS-mediated modulation of Akt, ERK, JNK and AMPK signaling.**“ Oncol Lett. 5: 1541-1545.

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

Levine B, Klionsky DJ (2004). „**Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy.**“ Dev Cell. 6: 463-477.

Levkovitz Y, Gil-Ad I, Zeldich E, Dayag M, Weizman A (2005). „**Differential induction of apoptosis by antidepressants in glioma and neuroblastoma cell lines: evidence for p-c-Jun, cytochrome c, and caspase-3 involvement.**“ J Mol Neuroscience. 27: 29-42.

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

Ma J, Hou LN, Rong ZX, Liang P, Fang C, Li HF, Qi H, Chen HZ (2013). „**Antidepressant desipramine leads to C6 glioma cell autophagy: implication for the adjuvant therapy of cancer.**“ Anticancer Agents Med Chem. 13: 254-260.

Mason WP, Cairncross JG (2005). „**Drug Insight: temozolomide as a treatment for malignant glioma - impact of a recent trial.**“ Nat Clin Pract Neurol. 1: 88-95.

Merry S, Hamilton TG, Flanigan P, Freshney RI, Kaye SB (1991). „**Circumvention of pleiotropic drug resistance in subcutaneous tumours in vivo with verapamil and clomipramine.**“ Eur J Cancer. 27: 31-34.

Mohapatra P, Preet R, Das D, Satapathy SR, Choudhuri T, Wyatt MD, Kundu CN (2012). „**Quinacrine-mediated autophagy and apoptosis in colon cancer cells is through a p53- and p21-dependent mechanism.**“ Oncol Res. 20: 81-91.

Mohri M, Nitta H, Yamashita J (2000). „**Expression of multidrug resistance-associated protein (MRP) in human gliomas.**“ J Neurooncol. 49: 105-115.

Mortimore GE, Schworer CM (1977). „**Induction of autophagy by amino-acid deprivation in perfused rat liver.**“ Nature. 270: 174-176.

Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, Burkhard C, Schüler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, Yasargil MG, Lütolf UM, Kleihues P (2004). „**Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study.**“ Cancer Res. 64: 6892-6899.

Orlowski RZ, Baldwin AS Jr (2002). „**NF-kappaB as a therapeutic target in cancer.**“ Trends Mol Med. 8: 385-389.

Paz MF, Yaya-Tur R, Rojas-Marcos I, Reynes G, Pollan M, Aguirre-Cruz L, García-Lopez JL, Piquer J, Safont MJ, Balaña C, Sanchez-Cespedes M, García-Villanueva M, Arribas L, Esteller M (2004). „**CpG island hypermethylation of the DNA repair enzyme methyltransferase predicts response to temozolomide in primary gliomas.**“ Clin Cancer Res. 10: 4933-4938.

Preet R, Mohapatra P, Mohanty S, Sahu SK, Choudhuri T, Wyatt MD, Kundu CN (2012). „**Quinacrine has anticancer activity in breast cancer cells through inhibition of topoisomerase activity.**“ Int J Cancer. 130: 1660-1670.

Roos WP, Batista LF, Naumann SC, Wick W, Weller M, Menck CF, Kaina B (2007). „**Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine.**“ Oncogene. 26: 186-197.

Roth W, Weller M (1999). „**Chemotherapy and immunotherapy of malignant glioma: molecular mechanisms and clinical perspectives.**“ Cell Mol Life Sci. 56: 481-506.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). „**Molecular cloning: a laboratory manual.**“ Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Shaw EG, Seiferheld W, Scott C, Coughlin C, Leibel S, Curran W, Mehta M (2003). „**Reexamining the radiation therapy oncology group (RTOG) recursive partitioning analysis (RPA) for glioblastoma multiforme (GBM) patients.**“ International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics. 57: 135-136.

Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB (2004). „**Identification of human brain tumour initiating cells.**“ Nature. 432: 396-401.

Serafeim A, Holder MJ, Grafton G, Chamba A, Drayson MT, Luong QT, Bunce CM, Gregory CD, Barnes NM, Gordon J (2003). „**Selective serotonin reuptake inhibitors directly signal for apoptosis in biopsy-like Burkitt lymphoma cells.**“ Blood. 101: 3212-3219.

Sotelo J, Briceño E, López-González MA (2006). „**Adding chloroquine to conventional treatment for glioblastoma multiforme: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial.**“ Ann Intern Med. 144: 337-343.

Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht CJ, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross JG, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumour and Radiation Oncology Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (2009). „**Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial.**“ Lancet Oncol. 10: 459-466.

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

Wallace DJ (1989). „**The use of quinacrine (Atabrine) in rheumatic diseases: a reexamination.**“ Semin Arthritis Rheum. 18: 282-296.

Wang W, Gallant JN, Katz SI, Dolloff NG, Smith CD, Abdulghani J, Allen JE, Dickler DT, Hong B, Navaraj A, El-Deiry WS (2011). „**Quinacrine sensitizes hepatocellular carcinoma cells to TRAIL and chemotherapeutic agents.**“ Cancer Biol Ther. 12: 229-238.

White E (2012). „Q&A: **Eileen White on understanding autophagy.**“ Cancer Discov. 2: 863.

Xu C, Wu X, Zhu J (2013). „**VEGF promotes proliferation of human glioblastoma multiforme stem-like cells through VEGF receptor 2.**“ ScientificWorldJournal. 2013: 417413

Yan KH, Lin YW, Hsiao CH, Wen YC, Lin KH, Liu CC, Hsieh MC, Yao CJ, Yan MD, Lai GM, Chuang SE, Lee LM (2013). „**Mefloquine induces cell death in prostate cancer cells and provides a potential novel treatment strategy in vivo.**“ Oncol Lett. 5: 1567-1571.

Zaidi AU, McDonough JS, Klocke BJ, Latham CB, Korsmeyer SJ, Flavell RA, Schmidt RE, Roth KA (2001). „**Chloroquine-induced neuronal cell death is p53 and Bcl-2 family-dependent but caspase-independent.**“ J Neuropathol Exp Neurol. 60: 937-945.

Zipper JA, Stachetti E, Medel M (1970). „**Human fertility control by transvaginal application of quinacrine on the fallopian tube.**“ Fertil Steril. 21: 581-589.

Zülch KJ (1986). „**Brain Tumors: Their Biology and Pathology.**“ Springer London.

## **A Danksagung**

Meinen besonderen Dank möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Rolf Mentlein und meiner Betreuerin Frau Dr. Kirsten Hattermann aussprechen. Beide haben mich während der Erstellung dieser Arbeit enorm unterstützt, beraten und betreut. Ihre Türen standen stets offen für mich. Vielen Dank!

Des Weiteren gilt mein Dank der gesamten Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. Mentlein. Im Besonderen haben mich hier Martina Burmester, Miriam Lemmer, Sonja Dahle und Henrike Gebhardt unterstützt und mir das Arbeiten erleichtert. Des Weiteren möchte ich mich herzlichst bei Marion Kölln und Katrin Masuhr für ihre großartige Hilfe bei der Elektronenmikroskopie bedanken.

Für die finanzielle Unterstützung dieses Projektes möchte ich außerdem ausdrücklich der Werner und Klara Kreitz-Stiftung danken.

## **B Versicherung an Eides Statt**

Maximilian Lempert

Geb. am 07.01.1989 in Saarbrücken

Deutsch

Feldmannstrasse 100, 66119 Saarbrücken

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Rolf Mentlein

Thema der Dissertation: **Wirkung und Nutzen von Clomipramin und Quinacrin in der in-vitro-Behandlung des Glioblastoms**

Ich versichere hiermit an Eides Statt, dass

1. meine Dissertation, abgesehen von Ratschlägen meines Doktorvaters und meiner sonstigen akademischen Lehrer, nach Form und Inhalt meine eigene Arbeit ist, dass ich außer den in der Arbeit aufgeführten keine weiteren Hilfsmittel benutzt habe, und dass meine Arbeit bisher, weder ganz noch in Teilen, keiner anderen akademischen Stelle als Dissertation vorgelegen hat.
2. Veröffentlichungen nach den Richtlinien über Benotung von Dissertationen in folgender Form erfolgt sind. Nachweise bitte beifügen.
3. die zuständigen Behörden (Ethikkommission/Amt für Tierschutz) zugestimmt haben, dass Forschungsvorhaben an Menschen oder Tieren vorgenommen wurden
4. ich bis zum heutigen Tag 2 Semester in Kiel studiert habe (MatrNr. 736219)
5. der Leiter der Einrichtung: Anatomisches Institut der CAU (Prof. Dr. med. Jobst Sievers) einverstanden ist, dass die Dissertation an seiner Einrichtung geschrieben wurde (Einwilligung des entsprechenden Abteilungsleiters der Institution zur Einreichung als Dissertation an der Med. Fak der CAU zu Kiel liegt als separates Schreiben bei)
6. für die Nutzung von Arbeitsmöglichkeiten der wissenschaftlichen oder klinischen Einrichtung der Fakultät durch mich die Einverständnis der Leitung der Einrichtung vorliegt.

München, den

(Unterschrift)



## **C Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name: Maximilian Lempert

Geburtsdaten: 07.01.1989 in Saarbrücken

Anschrift: Feldmannstrasse 100  
66119 Saarbrücken

Kontakt: 0173/7358841

Nationalität: Deutsch

Familienstand: Ledig

### **Ausbildung**

Mai 2014 PJ an der TU München (Drittes Staatsexamen 2015 geplant)

2008-2014 Medizinstudium an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (Zweites Staatsexamen April 2014)

2008 Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

2006-2008 Wirtschaftswissenschaftliches Gymnasium Saarbrücken

2000-2006 Willi-Graf-Gymnasium Saarbrücken

1996-2000 Grundschule Hohe Wacht Saarbrücken

### **Veröffentlichung**

Poster Lempert M, Hattermann K, Mehdorn HM, Held-Feindt J, Mentlein R (2012) „Induction of apoptosis in glioma cells by tricyclic antidepressants.“ 3rd International Congress on Reconstructive Neurosurgery, Kiel, 8.-12. 06. 2012

Publikation In Vorbereitung