

Aus dem Institut für Physiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Charakterisierung der Wirkmechanismen des neuartigen, dual
wirksamen HDAC-Inhibitors „Animacroxam“ am Beispiel
testikulärer Keimzelltumore

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Gustav Steinemann

aus Aachen

Datum der Promotion: 04.06.2021

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
Zusammenfassung	2
Abstract	3
1. Einleitung	4
1.1 Testikuläre Keimzelltumore	4
1.2 Histondeacetylasen und ihre Bedeutung in Tumoren	4
1.3 Die Inhibition von Histondeacetylasen in der Tumorthherapie	4
1.4 Das Zytoskelett als therapeutische Zielstruktur	5
1.5 Dualinhibitoren zur Therapie von Tumoren	5
1.6 Der Glukosemetabolismus als Angriffspunkt	5
1.7 Der dual wirksame Inhibitor Animacroxam	5
1.8 Ziele der Arbeit	6
2. Material und Methoden	7
2.1 Zellmodelle	7
2.2 In-vitro-Experimente	7
2.3 In-vivo-Experimente	10
3. Ergebnisse	12
3.1 Wachstumsinhibition und Apoptoseinduktion in TKZT <i>in vitro</i>	12
3.2 Nachweis der dualen Wirksamkeit von Animacroxam bei TKZT-Zellen <i>in vitro</i>	12
3.3 Überprüfung der Glukoseaufnahme und des Glukosemetabolismus in TKZT-Zellen	13
3.4 Antiangiogene Effekte von Animacroxam <i>in vitro</i>	15
3.5 In-vivo-Bestimmung des Tumorumens am CAM-Modell mittels MRT	15
3.6 Überprüfung der Glukoseaufnahme <i>in vivo</i> nach Behandlung mit Animacroxam	16
3.7 Überprüfung der antiangiogenen Wirkung von Animacroxam <i>in vivo</i>	16
4. Diskussion	18
4.1 Proliferationsinhibition und Induktion der Apoptose durch Animacroxam <i>in vitro</i>	18
4.2 Der duale Wirkmechanismus von Animacroxam <i>in vitro</i>	19
4.3 Untersuchungen der Glukoseaufnahme und des Glukosestoffwechsels in TKZT <i>in vitro</i>	19
4.4 Untersuchung der antiangiogenen Potenz <i>in vitro</i>	20
4.5 Untersuchungen der In-vivo-Wachstumsinhibition und Reduktion des Tumorumens von inokulierten TKZT am erweiterten CAM-Modell	20
4.6 Verringerte <i>in vivo</i> Glukoseaufnahme in inokulierten TKZT auf der CAM	21
4.7 Die antiangiogene Wirkung von Animacroxam <i>in vivo</i>	21

5. Literaturverzeichnis.....	23
Eidesstattliche Versicherung	27
Detaillierte Aufstellung der selbst erbrachten Leistungen	28
Druckexemplar der Originalpublikation 1.....	30
Druckexemplar der Originalpublikation 2.....	40
Druckexemplar der Originalpublikation 3.....	52
Lebenslauf	70
Publikationsliste	72
Danksagung	74

Abkürzungsverzeichnis

APL	Akute promyeloische Leukämie
ATP	Adenosintriphosphat
BPGM	Bisphosphoglyceratmutase
CAM	Chorioallantoismembran
cDNA	Komplementäre-Desoxyribonukleinsäure
CTCL	Kutanes T-Zell-Lymphom
Cx43	Connexin43
DMEM	<i>dulbecco's modified eagles medium</i>
F ¹⁸ -FDG	2-Fluor-2-desoxy-D-Glukose
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
FKS	Fötale Kälberserum
GBM	Glioblastoma multiforme
GJIC	Gapjunktionale Kommunikation
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HDACi	Histondeacetylaseinhibitor
HK	Hexokinase
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
IC ₅₀	Halbmaximale inhibitorische Konzentration
iv	Intravenös
LDH	Laktatdehydrogenase
MBq	Mega-Becquerel
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
PET	Positronenemissionstomographie
PTCL	Peripheres T-Zell-Lymphom
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SUV	<i>standardized uptake value</i>
TKZT	Testikulärer Keimzelltumor
VOI	<i>volume of interest</i>

Zusammenfassung

Die meistvorkommende maligne Erkrankung bei Männern zwischen 20 und 45 Jahren ist der testikuläre Keimzelltumor (TKZT). Mit platinbasierter Chemotherapie können bis zu 80 Prozent aller Patienten erfolgreich behandelt werden. Bei den verbleibenden 20 Prozent der Fälle hingegen kommt es häufig zur Entwicklung von Platinresistenzen, wodurch sich die Fünf-Jahres-Überlebensrate drastisch senkt. Für diese sehr junge Patientengruppe ist die Entwicklung neuer Therapieansätze dringend notwendig.

Als vielversprechender Ansatz in der Tumorthherapie hat der Einsatz von Dualinhibitoren in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen. In dieser Arbeit wurde Animacroxam, eine dual wirksame Substanz bestehend aus einer Histoneacetylase- (HDAC) und einer Zytoskelett-inhibierenden Pharmacophore, auf ihre Wirksamkeit in testikulären Keimzelltumoren untersucht. Die Wirkung von Animacroxam wurde dabei mit der Wirksamkeit des Goldstandards in der TKZT-Therapie Cisplatin und dem klinisch zugelassenen HDAC-Inhibitor (HDACi) Vorinostat verglichen.

Animacroxam zeigte dabei eine dosisabhängige Proliferationshemmung in TKZT-Zellen von bis zu 95 Prozent, ungeachtet der Cisplatinempfindlichkeit der untersuchten Zelllinien. Dabei konnte keine unspezifische Zytotoxizität in den verschiedenen Zelllinien festgestellt werden. Zellzyklusuntersuchungen ergeben, dass Animacroxam zu einer ausgeprägten Akkumulation von Zellen in der G0/G1-Phase der untersuchten TKZT-Zellen führt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Animacroxam die Bildung von Aktin-Stressfasern induziert. Dies bestätigt, dass der Imidazolanteil das Zytoskelett der untersuchten TKZT-Zellen direkt angreift. Zusätzlich wurde auch die Migration von TKZT-Zellen durch Animacroxam signifikant gehemmt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Animacroxam dosisabhängig zu einem Zusammenbruch des intrazellulären Glukosestoffwechsels in TKZT-Zellen führt und die Angiogenese von Endothelzellen *in vitro* hemmt. Zusätzlich kam es zu einer Reduktion von Connexin 43 (Cx43) und zu einer Inhibition der gapjunktionalen Zell-Zellkommunikation.

Die antineoplastischen und antiangiogenen Effekte von Animacroxam wurden in einem erweiterten Chorioallantoismembran (CAM)-Modell befruchteter Hühnereier *in vivo* untersucht. Moderne Magnetresonanztomographie-Bildgebung (MRT) und Positron-Emissions-Tomographie-Bildgebung (PET) wurden zur Bestimmung des Tumolvolumens und zur Messung der Aufnahme von radioaktiv markierter Glukose (2-Fluor-2-desoxy-D-glucose oder F^{18} -FDG) verwendet. So konnte ein deutlich reduziertes Tumolvolumen sowie eine signifikant reduzierte Aufnahme von Glukose in auf der CAM inokulierten TKZT nach Behandlung mit Animacroxam festgestellt werden.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass der Dualinhibitor Animacroxam einen vielversprechenden Ansatz zur Behandlung von TKZT darstellt. Um zu einer abschließenden Bewertung der Wirksamkeit von Animacroxam zu gelangen, werden weitere In-vivo-Untersuchungen benötigt. Die vorliegenden Daten können als Grundlage dazu dienen.

Abstract

The most common malignancy in males between 20 and 45 years of age is the testicular germ cell tumor (TGCT). Using platin-based chemotherapy, up to 80 percent of the patients can be cured. However, the remaining 20 percent often develop cisplatin resistance, which reduces the five-year survival rate considerably. Therefore, this young patient group urgently needs the development of new treatment strategies.

As a promising approach in tumor therapy, the development of dual-mode inhibitors has gained increased attention over the last years. In this study, the new dual-mode inhibitor animacroxam, comprising of a histone deacetylase- (HDAC) and a cytoskeleton-inhibitory pharmacophore, is investigated for the first time to assess the effectiveness in TGCT. The effect of animacroxam is compared with the effects of the gold standard on TGCT therapy, namely cisplatin and the established HDAC-inhibitor (HDACi) vorinostat.

Animacroxam shows a dose-dependent proliferation inhibition in TGCT cells up to 95 percent, irrespective of the cisplatin sensitivity of the investigated cell lines. Additionally, animacroxam does not induce unspecific cytotoxicity. Cell-cycle investigations reveal a pronounced accumulation of cells in the G0/G1-phase of the cell cycle after incubation with animacroxam in the investigated TGCT cell lines. Animacroxam is also able to induce the formation of actin-stressfibers, thereby directly targeting the cytoskeleton of the TGCT cells. Furthermore, the migration of TGCT cells is significantly inhibited after incubation with animacroxam. Investigations on the glucose metabolism of TGCT cells revealed that animacroxam causes a dose-dependent breakdown of cellular glycolysis. Animacroxam is also able to inhibit angiogenesis *in vitro* and cause a significant reduction of connexin 43 (cx43) and a concomitant inhibition of the gap-junctional intercellular communication in endothelial cells.

The antineoplastic and antiangiogenic effects *in vivo* were investigated using an advanced chorioallantoic membrane (CAM) model of fertilized chicken eggs. State-of-the-art magnet resonance imaging (MRI) and positron-emission tomography (PET) were used to non-invasively determine the tumor volume and the uptake of radioactive labeled glucose (¹⁸F-FDG) of inoculated TGCT on the CAM. Treatment with animacroxam induces a significantly reduced tumor volume and glucose uptake in inoculated TGCTs.

This study shows that the dual-mode inhibitor animacroxam is a promising candidate for the treatment of TGCT. Further *in vivo* investigations are warranted for a final evaluation of the effectiveness of animacroxam. The presented data may serve as a basis for these investigations.

1. Einleitung

1.1 Testikuläre Keimzelltumore

Testikuläre Keimzelltumore (TKZT) stellen die häufigste maligne Tumorerkrankung bei jungen Männern zwischen 20 und 45 Jahren dar. TKZT werden unter histologischen und klinischen Gesichtspunkten in Seminome und Nichtseminome unterteilt [1]. Bis zu 80 Prozent der Patienten können mit platinbasierter Chemotherapie (Kombinationstherapie) geheilt werden [2,3]. Diese Therapieform weist jedoch starke Nebenwirkungen auf und kann bei Patienten mit Leber- oder Nierenschäden sowie bei Patienten in schlechter körperlicher Verfassung häufig nicht eingesetzt werden [4]. Bei bis zu 20 Prozent der Patienten kommt es zur Entstehung von Cisplatinresistenzen. Patienten mit einer solchen Cisplatinresistenz können auch mit hoch dosierter Chemotherapie nur in der Hälfte der Fälle geheilt werden [5]. Zusätzlich erhöht eine platinbasierte Kombinationstherapie die Wahrscheinlichkeit von Langzeitnebenwirkungen wie neurologischen Erkrankungen, gastrointestinalen Toxizitäten, Nierenversagen und Ototoxizität [6]. Aus diesen Gründen sind die Identifizierung und Entwicklung von neuen, platinfreien Substanzen dringend notwendig.

1.2 Histondeacetylasen und ihre Bedeutung in Tumoren

Seit einigen Jahren ist die Inhibition von Histondeacetylasen (HDAC) mit niedermolekularen Inhibitoren, sogenannten HDAC-Inhibitoren (HDACi), in den Fokus der therapeutischen Behandlung verschiedener Krebsarten gerückt. HDACs und ihre molekularen Gegenstücke, die Histonacetyltransferasen (HAT), spielen eine wichtige Rolle bei der Umstrukturierung des Chromatins und damit bei der epigenetischen Regulierung des zellulären Metabolismus, Wachstums und der Zelldifferenzierung [7,8]. Bei der epigenetischen Regulierung bestimmen Faktoren wie HDACs, welche Gene in welchem Maß abgelesen werden. HDACs werden aufgrund ihrer Eigenschaften und ihrer Lokalisation innerhalb der Zellen in vier Klassen (I-IV) eingeteilt [9]. In TKZT ist eine Überexpression von HDACs der Klasse I mit einer

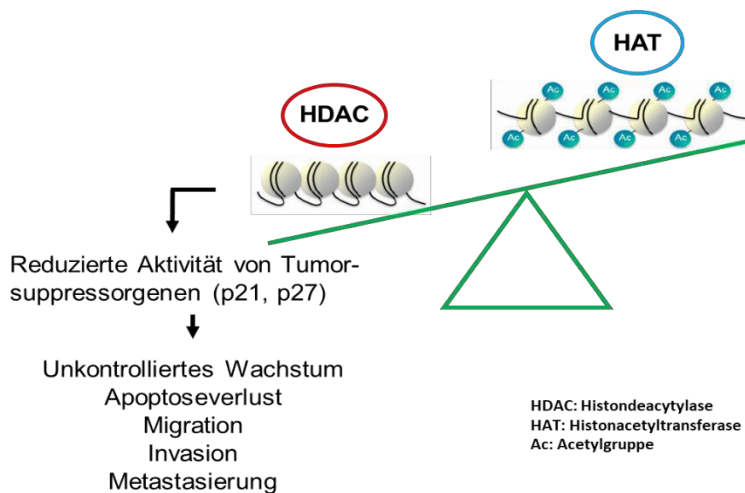


Abbildung 1. Ungleichgewicht der HDAC- und HAT-Aktivität in einer Tumorzelle. Abbildung adaptiert von: <http://www.crystalgeno->

schlechteren Prognose und einer kürzeren Überlebenszeit der betroffenen Patienten assoziiert [10]. Eine gesteigerte Deacetylierung der Histone, und damit ein Ungleichgewicht der HDAC- und HAT-Aktivität, steigert die Bindung der positiv geladenen Histone an die negativ geladene DNA. Dies sorgt für eine engere, kondensierte DNA-Struktur und verhindert damit die Transkription. Eine gesteigerte Deacetylierung kann zur Repression von Tumorsuppressorgenen wie p21 und p27 sowie von DNA-Reparaturgenen führen und dadurch zu einer erhöhten Zellaktivität und dem Verlust der Apoptosefähigkeit [11,12] (Abbildung 1).

1.3 Die Inhibition von Histondeacetylasen in der Tumorthherapie

Bis heute sind nur sehr wenige HDACi für die klinische Anwendung zugelassen. Vorinostat (suberanilohydroxamic acid oder SAHA), ein HDACi auf Hydroxamsäure-Basis, wurde im Jahr 2006 durch die *US Food and Drug Administration* (FDA) zur Therapie des kutanen T-Zell-Lymphoms (CTCL) zugelassen. Im selben Jahr wurde Vorinostat auch für die Behandlung verschiedener weiterer maligner Tumorerkrankungen zugelassen. Der HDACi Belinostat gehört wie Vorinostat zur Klasse der

Hydroxamsäuren und wurde im Jahr 2014 zur Therapie des peripheren T-Zell-Lymphoms (PTCL) zugelassen.

Romidepsin ist ein weiterer zugelassener HDACi aus der Klasse der zyklischen Peptide. Romidepsin wurde Ende des Jahres 2009 zur Therapie von T-Zell-Lymphomen und im Jahr 2011 zur Therapie des PTCL bei Patienten, die mindestens eine vorherige Therapie erfolglos durchlaufen haben, zugelassen. Die therapeutischen Erfolge dieser Verbindungen sind jedoch bislang unzureichend [13–15]. Aus diesem Grund wurden neuartige Hybridverbindungen hergestellt, welche HDAC-inhibitorische Eigenschaften mit weiteren Angriffspunkten in Tumorzellen kombinieren und dadurch additive oder synergistische Effekte, unter anderem auch in platininsensitiven Tumorentitäten, erzielen [16].

1.4 Das Zytoskelett als therapeutische Zielstruktur

Einen weiteren Ansatz zur gezielten medikamentösen Tumorthherapie stellt die Störung des Zytoskeletts dar. Das Zytoskelett besteht aus Mikrotubuli, Intermediärfilamenten und Aktinfilamenten, welche für die strukturelle Stabilität der Zellen sorgen. Die Filamente des Zytoskeletts ermöglichen intrazelluläre Transportprozesse, fixieren Zellorganellen wie Mitochondrien innerhalb der Zelle und sind an der Zellteilung beteiligt. In Tumorzellen ist das Zytoskelett häufig in seiner dynamischen Anpassungsfähigkeit modifiziert und ermöglicht damit Migration und Metastasierung. In der Therapie von TKZT wurde diese Erkenntnis bereits erfolgreich genutzt, indem die Dynamik des Zytoskeletts mit spezifischen Inhibitoren angegriffen wurde. So wird beispielsweise das Tubulin-angreifende Vinca-Alkaloid Vinblastin häufig zusammen mit Cisplatin verabreicht [17]. Dabei kondensieren die zytoskelettalen Filamente und die Zelle verliert ihre Fähigkeit, sich zu teilen und zu migrieren. Auch wurden sogenannte *vascular disrupting agents*, welche die Bildung und Funktion von Blutgefäßen hemmen, wie Combretastatin-A4 als Tubulin-Polymerisationsinhibitor geprüft [16]. Von diesem Combretastatin-A4 leitet sich Brimamin ab, die Vorläufersubstanz von Animacroxam. Brimamin besteht lediglich aus einem Imidazolanteil und ist noch nicht an eine Hydroxamsäure gekoppelt, welche die HDAC-inhibierenden Eigenschaften liefert [18].

1.5 Dualinhibitoren zur Therapie von Tumoren

Seit einiger Zeit hat sich die Entwicklung von dual wirksamen Substanzen zur Therapie von Tumorerkrankungen als wirksamer Ansatz erwiesen. Hierbei werden durch molekulare Hybridisierung zwei oder mehr Pharmakophoren in einem Molekül verschmolzen, um unterschiedliche molekulare Zielstrukturen von Tumorzellen gleichzeitig anzugreifen [16]. Verschiedene Molekülgruppen, unter anderem auch HDAC-inhibitorische Gruppen wie Hydroxamsäuren, werden an andere Substanzen wie Tyrosin-Kinase-Inhibitoren, DNA-schädigende Verbindungen oder Verbindungen, die das Zytoskelett angreifen, gekoppelt [16,19].

1.6 Der Glukosemetabolismus als Angriffspunkt

Gesunde Zellen metabolisieren Glukose durch oxidative Phosphorylierung in Mitochondrien zur Produktion von Adenosintriphosphat (ATP). In Tumorzellen hingegen wird ein Großteil der Glukose in Laktat umgesetzt. Dieses Phänomen der metabolen Veränderung wird Warburg-Effekt genannt [20]. Durch Sauerstoffmangel kann der Citratzyklus nicht mehr stattfinden, sodass direkt Laktat produziert und durch die Zellen ausgeschieden wird. Somit hat die Zelle nur noch die Möglichkeit über die ineffiziente Glykolyse Energie zu gewinnen. Otto Warburg beschrieb dies als die wichtigste metabolische Veränderung in der Entstehung von Krebs [21]. Der Warburg-Effekt spielt auch in TKZT eine Rolle und wird mit einem aggressiveren Tumorverhalten assoziiert [22].

1.7 Der dual wirksame Inhibitor Animacroxam

Bei der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Substanz Animacroxam (4-(1-methyl-4-anisylimidazol-5-yl)-N-hydroxycinnamidehydrochloride) handelt es sich um einen Dualinhibitor, der aus einem Imidazol-Anteil und einer Hydroxamsäure besteht. Mahal et al. konnten bereits zeigen, dass Animacroxam in Melanomzellen (518A2-Zellen) die HDAC-Aktivität senkt und zur Acetylierung von Tubulin, vermutlich über spezifische Inhibierung von HDAC6, führt [23]. Das gekoppelte 4,5-Diarylimidazol leitet sich aus Combretastatin-A4 ab und greift erwiesenermaßen das Zytoskelett und damit die zelluläre Integrität und Beweglichkeit von Zellen an [16,23]. Weitere Untersuchungen von Mahal et al. konnten zeigen,

dass die Eigenschaften neuartiger Imidazolderivate wie Animacroxam bei deutlich geringeren Konzentrationen, als bei dem bisher zugelassenen HDACi Vorinostat, das Wachstum von Tumorzellen hemmen und Apoptose einleiten [23].

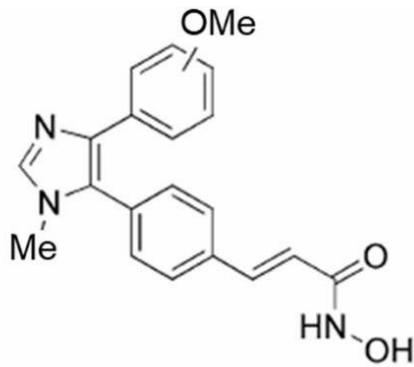


Abbildung 2. Struktur der untersuchten Substanz Animacroxam (4-(1-methyl-4-anisylimidazol-5-yl)-N-hydroxycinnamidhydrochloride).

1.8 Ziele der Arbeit

Da die aktuelle Therapie von TKZT trotz ihrer guten Erfolgschancen auf Heilung immer noch viele Patienten ausschließt, ist die Entwicklung von neuen, platinfreien Therapieansätzen essenziell. Der duale Ansatz von Animacroxam birgt die Chance, mehr Patienten, darunter auch solche, die nicht mit platinbasierter Chemotherapie geheilt werden können, erfolgreich zu therapieren.

Das erste Ziel dieser Arbeit ist festzustellen, ob Animacroxam in der Lage ist, in TKZT-Zellen mit unterschiedlicher Cisplatinempfindlichkeit *in vitro* die Proliferation zu hemmen und Apoptose auszulösen.

Das zweite Ziel der Arbeit ist zu überprüfen, ob Animacroxam auch in TKZT-Zellen *in vitro* erfolgreich als Dualinhibitor eingesetzt werden kann, um HDACs zu inhibieren und gleichzeitig das Zytoskelett anzugreifen.

Da TKZT häufig einen gesteigerten Bedarf an Glukose aufweisen, wird als drittes Ziel überprüft, ob Animacroxam den Glukosestoffwechsel von TKZT-Zellen *in vitro* beeinflussen kann.

Die Versorgung von Tumoren mit Sauerstoff und Nährstoffen über Blutgefäße spielt bei TKZT eine wichtige Rolle für das Tumorstadium. Deshalb wird als viertes Ziel überprüft, ob Animacroxam die Bildung von Kapillarstrukturen durch Endothelzellen *in vitro* hemmen kann.

Um die *in vitro*-Ergebnisse *in vivo* zu validieren, werden nachfolgend verschiedene *In-vivo*-Untersuchungen an der Chorioallantoismembran (CAM)-Modell befruchteter Hühnereier untersucht.

Das fünfte Ziel ist die *In-vivo*-Überprüfung der Wachstumsinhibition am CAM-Modell mittels der kliniknahen und nicht-invasiven Magnetresonanztomographie (MRT).

Das sechste Ziel ist die Überprüfung der Glukoseaufnahme *in vivo* mittels der Positron-Emissions-Tomographie (PET).

Das siebte Ziel ist die Bestimmung der antiangiogenen Potenz von Animacroxam *in vivo*.

2. Material und Methoden

2.1 Zellmodelle

Folgende Zellmodelle wurden in dieser Arbeit untersucht:

2102EP-Zellen: TKZT-Zellen (Nichtseminom, Teratokarzinom & Dottersacktumor). Halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC₅₀-Wert) für Cisplatin; $1.36 \pm 0.12 \mu\text{M}$). Die 2102EP-Zellen wurden freundlicherweise von Herrn PD Dr. Friedemann Honecker (ZeTuP St. Gallen, Schweiz) zur Verfügung gestellt [24].

2102EPR-Zellen: TKZT-Zellen. Herkunft wie 2102EP-Zellen (IC₅₀-Wert für Cisplatin; $8.96 \pm 0.87 \mu\text{M}$). Die Cisplatinresistenz wurde durch wiederholte Kultivierung der Zellen mit sublethalen Dosen Cisplatin erzeugt.

NCCIT-Zellen: TKZT-Zellen (Nichtseminom, Teratokarzinom) (IC₅₀-Wert für Cisplatin; $5.94 \pm 0.50 \mu\text{M}$). Die NCCIT-Zellen wurden freundlicherweise von Herrn PD Dr. Friedemann Honecker (ZeTuP St. Gallen, Schweiz) zur Verfügung gestellt.

EA.hy926-Zellen: Zelllinie aus der Kreuzung von Endothelzellen der Nabelvene und einer Lungenkarzinomzelllinie. ATCC-Nummer: CRL-2922.

Die 2102EP-Zellen, die 2102EPR-Zellen, die NCCIT-Zellen und die EA.hy926-Zellen wurden in *dulbecco's modified eagles medium* (DMEM)/F12-(1:1)-Medium (Life Technologies™ Gibco®, Carlsbad, USA) mit folgenden Zusätzen kultiviert: 10% fötales Kälberserum (FKS), $2 \mu\text{M}$ L-Glutamin, 50 Units/mL Penicillin und $50 \mu\text{g/mL}$ Streptomycin.

Alle untersuchten Zelllinien wurden bei fünf Prozent CO₂ und 37°C kultiviert.

2.2 In-vitro-Experimente

Um die Wirksamkeit von Animacroxam in TKZT-Zellen *in vitro* zu bestimmen, wurden die folgenden Versuche durchgeführt:

Bestimmung der Wachstumsinhibition

Die wachstumsinhibitorische Potenz von Animacroxam wurde mit der Kristall-Violett-Färbung ermittelt [25]. Dazu wurden TKZT-Zellen mit Animacroxam (0 - $3,2 \mu\text{M}$) oder Vorinostat (0 - $10 \mu\text{M}$) behandelt (0 - 96 Stunden). Das Kristallviolett (N-Hexamethyl-Pararosanilin) lagert sich an der DNA der Zellen an und kann in einer spektrometrischen Messung als Maß für die Zellzahl gemessen werden. Die Bestimmung der IC₅₀-Werte erfolgte über eine nichtlineare Regression mittels der Software Graphpad Prism (Version 7.00). Die Messung der Wachstumsinhibition mittels Kristall-Violett-Färbung wurde zusätzlich durch Echtzeitmessungen (0 - 72 Stunden und 0 - $2,0 \mu\text{M}$ Animacroxam) mit dem iCelligence Systems (ACEA, Biosciences, USA) bestätigt. Das iCelligence System nutzt Impedanzmessungen, um damit das Zellwachstum zu ermitteln [25].

Messung der Apoptoseinduktion

Ein Anstieg in der Caspase-3-Enzymaktivität als Maß für die Apoptoseinduktion wurde in allen untersuchten TKZT-Zelllinien nach 48-stündiger Inkubation mit Animacroxam (0 - $2,0 \mu\text{M}$) oder Vorinostat (0 - $10 \mu\text{M}$) mittels der Umsetzung eines fluorometrischen Substrats gemessen. Das Substrat AC-DEVD-AMC (N-actetyl-Aspartat-Glutamin-Valin-Aspartat) wird durch aktive Caspase-3 gespalten und ermöglicht somit die Fluoreszenz des freigesetzten AMC. Die Fluoreszenz wurde mit einem VersaFluor Fluorometer (Bio-Rad, Deutschland; Ex 360/40 nm, Em 420/60 nm) gemessen [25].

Untersuchungen der Zellzyklusverteilung

Die Zellzyklusverteilung der TKZT-Zellen nach 48-stündiger Behandlung mit Animacroxam (0 - $0,8 \mu\text{M}$) oder Vorinostat (0 - $2,2 \mu\text{M}$) wurde durchflusszytometrisch bestimmt (FACSCanto II, BD Biosciences, Deutschland). Dabei wird die DNA der Zellen mit dem Farbstoff Propidiumiodid angefärbt. Die DNA-Menge der untersuchten Zellen kann als Maß für die Zellzyklusverteilung genutzt werden [26]. So wurde die Zellzyklusverteilung der behandelten Zellen mit der Software BD

FACSDIVA v6.1.3 (BD Biosciences, Deutschland) bestimmt und ausgewertet [25].
Messungen der Proteinexpression (Western-Blot)

Veränderungen der Proteinexpression von proliferativen, apoptotischen oder zellzyklusregulierenden Proteinen wurden nach Behandlung mit Animacroxam (0 - 2,0 μM) oder Vorinostat (0 - 2,0 μM) mittels Western-Blot-Analyse in cisplatin-sensitiven und -resistenten 2102EP(R)-Zelllysaten überprüft [25]. Bilder der Blots wurden mit einem Celvin-S-Entwickler (Biostep, Burkhardtsdorf, Deutschland) und der Software SnapAndGo 1.8.1 (Rev.23) aufgenommen. Zelllysate von EA.hy926-Zellen wurden nach Behandlung mit Animacroxam (0 - 2,5 μM) oder Vorinostat (0 - 5,0 μM) überprüft. Bilder wurden mit einer Fusion SL-Kamera (Vilber Gourmet, Eberhardzell, Deutschland) gemacht. Die Quantifizierung wurde mit der Software ImageJ (Version 2.0.0) vorgenommen.

Tabelle 1. Liste der verwendeten primären und sekundären Antikörper.

Primärantikörper	Verdünnung	Hersteller
BCL-2	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
BAX	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
APAF1	1:1000	Cell Signaling Technology
Cyclin D1	1:200	Sigma-Aldrich
Connexin43	1:10000	Sigma-Aldrich
BPGM	1:5000	Novus Biologicals
Tubulin beta2B	1:5000	OriGene Technologies, Inc
GLUT1	1:1000	ThermoFischer
GAPDH	1:5000	Calbiochem, Merck
Sekundärantikörper	Verdünnung	Hersteller
ECL TM Anti-mouse igG	1:10000	GE Healthcare UK Limited
ECL TM Anti-rabbit igG	1:10000	GE Healthcare UK Limited

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

Veränderungen des Zytoskeletts wurden in 2102EP-Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt [25]. 2102EP-Zellen wurden für 3 bis 48 Stunden mit Animacroxam (0 - 2,0 μM) oder Vorinostat (0 - 2,0 μM) behandelt, anschließend mit vierprozentigem Paraformaldehyd fixiert und mit einem Maus-anti-human alpha-Tubulin-Antikörper (1:500) bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach Inkubation mit einem Sekundärantikörper (anti-Maus, 1:500) wurden die Zellen mit Phalloidin (568nm, 1:200) zur Färbung der Aktinfasern inkubiert. Zur Gegenfärbung der Zellkerne diente 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (1:10.000). Zur Kontrollbehandlung von 2102EP-Zellen wurde dimethylsulfoxid (DMSO) (< 0.01%) verwendet. Fluoreszenzmikroskopie wurde mit einem Axioskop 40-Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit einem 40-fachen Objektiv (EC Plan-Neofluar 40x/1,30 Oil, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt. Bilder wurden mit einem Kappa Digital Kamera System (Kappa optronics GmbH, Gleichen, Deutschland) aufgenommen.

Migrationsverhalten

Ob eine Veränderung der Aktin- und Tubulin-Organisation von 2102EP-Zellen Einfluss auf die Migration der Zellen hat, wurde mittels Scratch-Assays untersucht. Die Zellen wurden ausgesät, sodass ein dichter Zellrasen entstand. Dann wurde ein Schnitt in den Zellrasen gemacht und die Zellen für 24 Stunden mit Animacroxam (0 - 1,0 μM) behandelt. Nach 24 Stunden wurde gemessen, inwieweit der Schnitt durch migrierende Zellen geschlossen worden ist. Bilder wurden mit einem Axiovert 135 TV-Mikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland) aufgenommen und mit der Analysesoftware TScratch, Version 1.0 (CSE lab, Zürich, Schweiz), ausgewertet [25].

HDAC-Enzymaktivität

Um die HDAC-Inhibition durch Animacroxam nachzuweisen, wurde die gesamte Enzymaktivität der HDACs mittels eines *Epigenase HDAC Activity/Inhibition Direct Assay Kit* gemessen [25]. Dafür wurden 15µg nukleäres Extrakt pro Probe von 2102EP-Zellen mit Animacroxam (0 - 1,0 µM) auf 96-Well-Platten inkubiert. Die Deacetylierung eines hinzugefügten Substrats welches einen Farbumschlag auslöst wurde, als Maß der HDAC-Enzymaktivität, photometrisch in einem Elisa-Reader (450nm) (Dynex Technologies) gemessen.

Hexokinase Aktivität

Hexokinasen (HK) phosphorylieren Glukose zu Glukose-6-Phosphat damit Glukose nicht aus der Zelle hinaus diffundieren und in der Zelle glykosyliert werden kann. Die Gesamtaktivität der HKs wurde mittels eines kolorimetrischen HK-Aktivitätsassays (Abcam, Cambridge, MA, USA) gemessen. Bei der Umwandlung von Glukose zu Glukose-6-Phosphat wird eine Fluorophore freigesetzt, welche als Maß der HK-Enzymaktivität gemessen werden kann. 2102EP-Zellen wurden auf 6-Well-Platten bei 80-prozentiger Konfluenz ausgesät. HK-Enzymaktivität wurde 24 und 48 Stunden nach Behandlungsbeginn (0 - 1,0 µM Animacroxam) gemessen [27].

Quantifizierung der Laktatmenge

Bei der aeroben Glykolyse wird Glukose zu Laktat umgewandelt. Das produzierte Laktat kann als Maß für den Glukosestoffwechsel gemessen werden. Die Laktatmenge im Überstand behandelter 2102EP-Zellen (Animacroxam 2,0 µM, Vorinostat 2,0 µM) wurde mittels eines ABL825 Flex Blut-Gas-Messgeräts gemessen (Radiometer GmbH, Germany). Die bestimmten Werte wurden auf die Proteingesamtmenge, als Referenz zur eingesetzten Zellzahl, normalisiert [27].

Messung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Die Bildung zytosolischer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) kann in Zellen zu oxidativem Stress und Zelltod führen. Um zu ermitteln, ob die Behandlung von TKZT mit Animacroxam (2,0 µM), Vorinostat (2,0 µM) oder Brimamin (2,0 µM) zu erhöhten ROS-Werten führt, wurde die Oxidierung des ROS-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff CellROX Orange (Thermo Fisher, Massachusetts, USA) fluoreszenzmikroskopisch bestimmt [28]. Wasserstoffperoxid (H₂O₂) wurde als Positivkontrolle verwendet. Fluoreszenzaufnahmen (ex/em 546/575 nm) wurden mittels eines Axioskop 40-Mikroskops (Zeiss, Jena, Deutschland) und eines Digitalkamerasystems (DX4-285FW, Kappa Optronics, Gleichen, Germany) aufgenommen.

Messung von Glutathion als Antioxidanzmechanismus

Glutathion (GSH) gehört zu den wichtigsten als Antioxidans wirkenden Stoffen im menschlichen Körper und hält die Produktion von ROS in einem sensitiven Gleichgewicht, damit kein Zellschaden durch hohe Mengen von ROS entsteht. Die Oxidierung von GSH zu GSSG wurde nach Behandlung mit Animacroxam (2,0 µM), Vorinostat (2,0 µM) oder Brimamin (2,0 µM) mittels eines fluorometrischen Kits, dem GSH-GLO Glutathione-Assay (Promega, Heidelberg, Deutschland), gemessen [29]. Das Verhältnis von GSH zu GSSG gibt Auskunft über die antioxidative Kapazität von GSH.

In-vitro-Bestimmung der Angiogenese

Endothelzellen sind in der Lage, nach Stimulation mit dem *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) kapillarähnliche Strukturen *in vitro* auszubilden. Dieser sogenannte *Tube-Formation-Assay* eignet sich deshalb zur Untersuchung von antiangiogenen Substanzen *in vitro*. Zur Untersuchung der antiangiogenen Eigenschaften von Animacroxam und Vorinostat *in vitro* wurden 2.0×10^4 EA.hy926-Zellen auf mit Matrigel beschichteten (Corning Life Sciences, Tewksbury MA, USA) Zellkulturplatten (Ibidi, München, Deutschland) ausgesät. Nach 16-stündiger Inkubation mit Animacroxam (1,0 – 2,5 µM) oder Vorinostat (2,0 – 5,0 µM) wurden Bilder der Kapillarstrukturen mit einem Eclipse T-Mikroskop (Nikon Europe, Amsterdam, Niederlande) aufgenommen. Quantifizierung fand manuell über das Auszählen von Kapillarstrukturen statt [27].

Messung der gapjunktionalen Zell-Zellkommunikation

Die interzelluläre Zell-Zellkommunikation über sogenannte Gap Junctions, die Verbindungskanäle zwischen Zellen bestehend aus Connexinen, ist eine wichtige Eigenschaft mikrovaskulärer Endothelzellen und Voraussetzung für lokale vaskuläre Adaptation und das angiogene Wachstum von Kapillaren [30]. Connexine sind Transmembranmoleküle, welche sich als Poren zusammensetzen und die Zell-Zellkommunikation ermöglichen. Als Maß für die Zell-Zellverbindungen kann die Diffusionsweite eines Farbstoffes durch die Zellen mittels eines Scrape-Loading-Assays gemessen werden. Dazu wurden EA.hy926-Zellen konfluent auf Deckgläschen ausgesät und für 24 Stunden mit Animacroxam (2,5 μM), Vorinostat (2,5 μM) oder Carbenoxolon (50 μM) behandelt. Carbenoxolon ist ein etablierter Connexininhibitor und diente als Positivkontrolle. Dann wurde ein Kratzer in die Zellschicht gemacht und die Zellen mit dem Farbstoff Lucifer Yellow (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) inkubiert. Pro Ansatz wurden acht Fluoreszenzbilder des Verteilungsmusters des Lucifer Yellow mit einem Eclipse T-Fluoreszenzmikroskop (Nikon Europe, Amsterdam, Niederlande) aufgenommen. Bilder eines unbeschädigten Zellrasens dienten zur Bestimmung des Hintergrundsignals. ImageJ Software (Version 2.0.0) wurde zur Bestimmung der Diffusionsweite verwendet wie von Bader et al. beschrieben [31].

2.3 In-vivo-Experimente

Als weiterführende Experimente wurde das CAM-Modell als etabliertes Modell für Angiogeneseuntersuchungen und als Xenotransplantat-Modell untersucht [32,33]. Die Untersuchungen am CAM-Modell wurden durchgeführt, um die Verträglichkeit von Animacroxam sowie erste Erkenntnisse der antineoplastischen und antiangiogenen Potenz *in vivo* zu bestimmen. Zusätzlich können das Überleben und die Entwicklung der Embryonen longitudinal, über einen Zeitraum von bis zu 14 Tagen, erforscht werden.

Das CAM-Modell

Die CAM ist eine stark vaskularisierte Membran befruchteter Hühnereier, welche für die Versorgung des Embryos mit Sauerstoff und Nährstoffen verantwortlich ist. Als immuninkompetente Membran eignet sich die CAM hervorragend zum Inokulieren von humanen Tumoren aus Tumorsektaten oder aus Zellkulturmaterial. Auch wenn Xenotransplantat-Modelle von athymischen Mäusen immer noch den präklinischen Standard definieren, hat die tumortragende CAM innerhalb der letzten Jahrzehnte stark an Bedeutung gewonnen. Die CAM hat sich dabei als valides und einfach anzuwendendes Modell zur Studie von antineoplastischen oder antiangiogenen Effekten [34,35] und der Wirksamkeit von antitumorösen Verbindungen etabliert [36], die auch intravenös (iv) verabreicht werden können.

Tumorpräparation

Für die Untersuchung von inokulierten Tumorplaques wurden 10×10^6 2102EP-Zellen mit 150 μL Matrigel (Corning Life Sciences, Tewksbury MA, USA) vermischt. Diese Zellsuspension wurde auf eine 6-Well-Platte pipettiert und für mindestens vier Stunden bei fünf Prozent CO_2 , 37°C und feuchter Atmosphäre inkubiert, um stabile Plaques zu bilden. Danach wurde Zellkulturmedium hinzugefügt und die Tumorplaques über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Tumorplaques auf einer sieben Tagen alten CAM ausgebracht und für drei Tage inkubiert, damit die Tumorplaques Anschluss an das Gefäßsystem der CAM bekommen konnten.

Antineoplastische Wirkung am CAM-Assay

Eine bleibende Komplikation bei der Bestimmung des Tumolvolumens stellt die mikroskopische Vermessung von inokulierten Tumoren dar. Die Bestimmung des Tumolvolumens erfolgt dabei über ein Ausschneiden des Tumors aus der CAM und eine manuelle Vermessung des Tumors, wobei eine erhebliche Abweichung entstehen kann. Um das Tumolvolumen präzise zu bestimmen, wurde eine Tumorummetrie von inokulierten TKZT mittels MRT vorgenommen. Tumorplaques aus 2102EP-Zellen wurden auf der CAM ausgebracht und das Gefäßsystem der CAM iv (20 μL), mit einer Endkonzentration im gesamten Blutvolumen von 5,0 μM (Animacroxam) oder 2,5 μM (Cisplatin) behandelt. Als Kontrollbehandlung (iv) dienten 20 μL 0,9% NaCl. Der Veränderung des Tumolvolumens wurde über einen Zeitraum von acht Tagen nicht-invasiv mithilfe der MRT gemessen. Dabei wird der Tumor mit einer Schichtdicke von 0,5 mm gescannt und nachfolgend mit einer Software

zu einem 3D-Modell zusammengesetzt. Dies erlaubt eine präzise und nicht-invasive Bestimmung des Tumolvolumens über einen Zeitraum von sieben Tagen [27]. Ausgewertet wurde das Tumolvolumen mit der interviewFUSION Software (Mediso, Version 3.01.004.000).

Histologische Bestimmung des Proliferationsgrades und der Mikrogefäßeinsprossung in behandelten Tumorplaques

Die untersuchten Tumorplaques wurden nach den MRT- und PET-Messungen histologisch aufgearbeitet [27]. Zum Anfärben wurden die Tumorplaques in Paraffin eingebettet und in 1 - 2 μm breite Schnitte zerlegt. Immunohistochemische Färbung erfolgte mit anti-Ki67 (Clone MIB-1, Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) zur Ermittlung des Proliferationsgrades und anti-Desmin (Clone D33, Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) für die Detektion eingesprosser Gefäße. Humanes Cytokeratin wurde mit anti-Cytokeratin (Lu-5, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) angefärbt, um die Tumormasse von der CAM abzugrenzen. Zellkerne wurden mit Hämatoxylin (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) gegengefärbt.

Bestimmung der Aufnahme von radioaktiv markierter Glukose in inokulierten TKZT-Plaques am CAM-Modell

Moderne PET-Analysen wurden genutzt, um die Aufnahme von radioaktiv markierter Glukose (Fluordesoxyglukose oder F^{18} -FDG) kliniknah und nicht-invasiv in inokulierten Tumorplaques auf der CAM zu bestimmen [37,38]. Die zuvor mittels MRT gescannten CAM-Präparate mit inokulierten Tumorplaques wurden mit 0,1 mL NaCl, welches 12MBq F^{18} -FDG enthielt, iv injiziert. Vierzig Minuten nach Injektion des F^{18} -FDG wurden die PET-Scans bei 37°C für 20 Minuten gescannt. Die Aufnahme von F^{18} -FDG im Tumorgewebe wurde durch manuelle Bestimmung der *volume of interest* (VOI) auf den PET-Bildern mit der Software PMOD 3.5 (PMOD Technologies Ltd., Schweiz) gemessen. Ein *standardized uptake value* (SUV) wurde aus den zehn Pixeln mit dem intensivsten Signal, sogenannte *hottest voxels* ($\text{SUV}_{\text{max}10}$), errechnet [27].

Tumorangiogenese

Die Angiogenese beschreibt die Aussprossung von Blutgefäßen aus bestehenden Blutgefäßen [39]. Dieser Prozess spielt auch bei der Entwicklung von Tumoren eine entscheidende Rolle. Tumore können sich nur bis zu einer Größe von 2mm^3 durch Diffusion mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen. Um weiteres Wachstum zu ermöglichen, muss der Tumor die Einsprossung von Blutgefäßen induzieren [40]. Zusätzlich ist die Induktion von Angiogenese ein entscheidender Schritt in der Metastasierung von Tumorzellen [41]. Eine Hemmung dieses Prozesses über die Induktion antiangiogener Effekte ist daher in der Tumorthherapie ein interessanter Behandlungsansatz.

Untersuchung der antiangiogenen und avaskulären Potenz am CAM-Modell

Angiogenese und Perfusion auf Kapillarebene wurde mittels Intravitalmikroskopie gemessen und ausgewertet. Videosequenzen (zehn Sekunden pro Sequenz) von kontrollbehandelten (0,9% NaCl) sowie für 48 Stunden mit Animacroxam (0,8 μM) oder Vorinostat (0,8 μM) behandelten Bereichen wurden aufgenommen (CMOS-Kamera, Sony ICE 6000, Tokio, Japan) und bearbeitet wie von Xiang et al. beschrieben [42].

Die Anzahl der Gefäße der CAM wurde durch das manuelle Auszählen in kontrollbehandelten (0,9% NaCl), mit Animacroxam (0 - 2,0 μM), oder Vorinostat (0 - 2,0 μM) behandelten Bereichen (0 - 48 Stunden) der CAM ermittelt. Bilder wurden mit einem Stereomikroskop und einem Di-Li 1009-SHD HD-Digitalkamerasystem (Distelkamp-Electronic, Kaiserslautern, Deutschland) aufgenommen [27].

2.21 Statistische Methoden

Zur statistischen Auswertung wurde die Software Graphpad Prism (Version 7.00) genutzt. Alle Experimente wurden $n = 3 - 16$ mal als unabhängiges Experiment wiederholt und die Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung oder Standardfehler abgebildet wie jeweils angegeben. Statistische Signifikanz wurde folgendermaßen angegeben: *P-Wert von ≤ 0.05 , **P-Wert von ≤ 0.005 , ***P-Wert von ≤ 0.0005 , ****P-Wert von ≤ 0.0001 . Statistische Signifikanz wurde mit folgenden Tests durchgeführt; one- way ANOVA post hoc Tukey's test, student's t-Test oder paired t-Test wie jeweils angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Wachstumsinhibition und Apoptoseinduktion in TKZT *in vitro*

3.1.1 Proliferationsinhibition und Bestimmung der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration

Versuche an TKZT-Zellen mit unterschiedlicher Cisplatinempfindlichkeit konnten zeigen, dass 24- bis 96- stündige Inkubation mit Animacroxam *in vitro* eine ausgeprägte zeit- und dosisabhängige Inhibition der Proliferation bewirkt. Der IC₅₀-Wert (nach 48-stündiger Inkubation mit Animacroxam) für cisplatinempfindliche 2102EP-Zellen lag bei 0,22 ±0,02 µM, in NCCIT-Zellen bei 0,42 ±0,06 µM und in cisplatinresistenten 2102EPR-Zellen bei 0,30 ±0,01 µM (Tabelle 2). Für Vorinostat war die eingesetzte Konzentration vier- bis siebenmal so hoch, um eine vergleichbare Wachstumsinhibition zu erreichen (Tabelle 2).

Tabelle 2. Halbmaximale inhibitorische Konzentrationen von Animacroxam und Vorinostat und nach 48-stündiger Inkubation in TKZT-Zelllinien mit unterschiedlicher Cisplatinempfindlichkeit. Ergebnisse werden dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung von n = 5 unabhängigen Versuchen. Tabelle modifiziert nach Steinemann et al. 2017, Molecular Cancer Therapeutics, Abbildung 2D.

Zelllinie	Animacroxam	Vorinostat
cisplatinempfindliche 2102EP-Zellen	0,22 ±0,02µM	1,43 ±0,22µM
NCCIT-Zellen	0,42 ±0,06µM	1,73 ±0,13µM
cisplatinresistente 2102EPR-Zellen	0,30 ±0,01µM	2,22 ±0,30µM

3.1.2 Induktion von Apoptose in Tumorzellen

Es konnte gezeigt werden, dass 48-stündige Inkubation mit Animacroxam in allen untersuchten TKZT-Zelllinien Apoptose einleitet, ohne dabei unspezifische Zytotoxizität zu induzieren (Abbildung 4 & 5a,b, Steinemann et al. 2017 Molecular Cancer Therapeutics). Auch Vorinostat induziert Apoptose in den untersuchten Zelllinien, jedoch mussten vier- bis siebenmal höhere Konzentrationen eingesetzt werden, um eine vergleichbare Induktion der Caspase-3-Aktivität zu erreichen (Abbildung 5b, Steinemann et al. 2017, Molecular Cancer Therapeutics).

Zusätzlich zur Caspase-3-Aktivierung wurden verschiedene Apoptosemarker in den 2102EP- und 2102EPR-Zellen untersucht. Dabei zeigte sich, dass das antiapoptotische Protein BCL-2 in cisplatinempfindlichen 2102EP-Zellen herunter-, und das mitochondriale Protein APAF1 in beiden Zelllinien hochreguliert wurde, was für eine mitochondrial vermittelte Apoptose spricht (Abbildung 5c,d, Steinemann et al. 2017, Molecular Cancer Therapeutics).

3.1.3 Zellzyklusuntersuchungen

Um zu bestimmen, wie Animacroxam diese ausgeprägten wachstumsinhibitorischen und apoptoseinduzierenden Effekte auslöst, wurde der Zellzyklus behandelter TKZT-Zellen untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Animacroxam nach 48-stündiger Inkubation im Zellzyklus aller untersuchten TKZT-Zelllinien eine dosisabhängige G0/G1-Phasenarretierung induziert. Dieser Effekt war bei cisplatinempfindlichen 2102EP-Zellen und cisplatinresistenten 2102EPR-Zellen ausgeprägter als bei NCCIT-Zellen (Abbildung 6, Steinemann et al. 2017, Molecular Cancer Therapeutics). Vorinostat löste nur eine minimale G0/G1-Phasenarretierung aus. Diese Ergebnisse wurden durch Expressionsmessungen des Zellzyklusproteins Cyclin-D1 bestätigt (Abbildung 6, Steinemann et al. 2017, Molecular Cancer Therapeutics).

3.2 Nachweis der dualen Wirksamkeit von Animacroxam bei TKZT-Zellen *in vitro*

3.2.1 Inhibition der HDAC-Enzymaktivität bei TKZT-Zellen

Die Deregulierung der HDAC-Aktivität spielt eine wichtige Rolle in der Proliferation von TKZT. Deshalb wurde die Enzymaktivität der HDACs in TKZT-Zelllinien mit unterschiedlicher Cisplatinempfindlichkeit untersucht. In cisplatinempfindlichen 2102EP- und resistenten 2102EPR-Zellen wurde, nach Behandlung mit Animacroxam, die Gesamtaktivität der HDACs effektiv und dosisabhängig um mehr als 85 Prozent reduziert (Abbildung 3, Steinemann et al. 2017, Molecular Cancer Therapeutics).

3.2.2 Ausbildung von Aktin-Stressfasern bei TKZT-Zellen

Die Untersuchung des Zytoskeletts wurde an cisplatin sensitiven 2102EP-Zellen durchgeführt. Hierbei konnte festgestellt werden, dass es nach 3- bis 48-stündiger Inkubation mit Animacroxam zur Ausbildung von Aktin-Stressfasern kommt (Abbildung 3). Das Tubulinskelett jedoch wies keine Veränderungen auf. Nach einer Behandlung mit Vorinostat hingegen, bildeten sich keine Aktin-Stressfasern in 2102EP-Zellen.

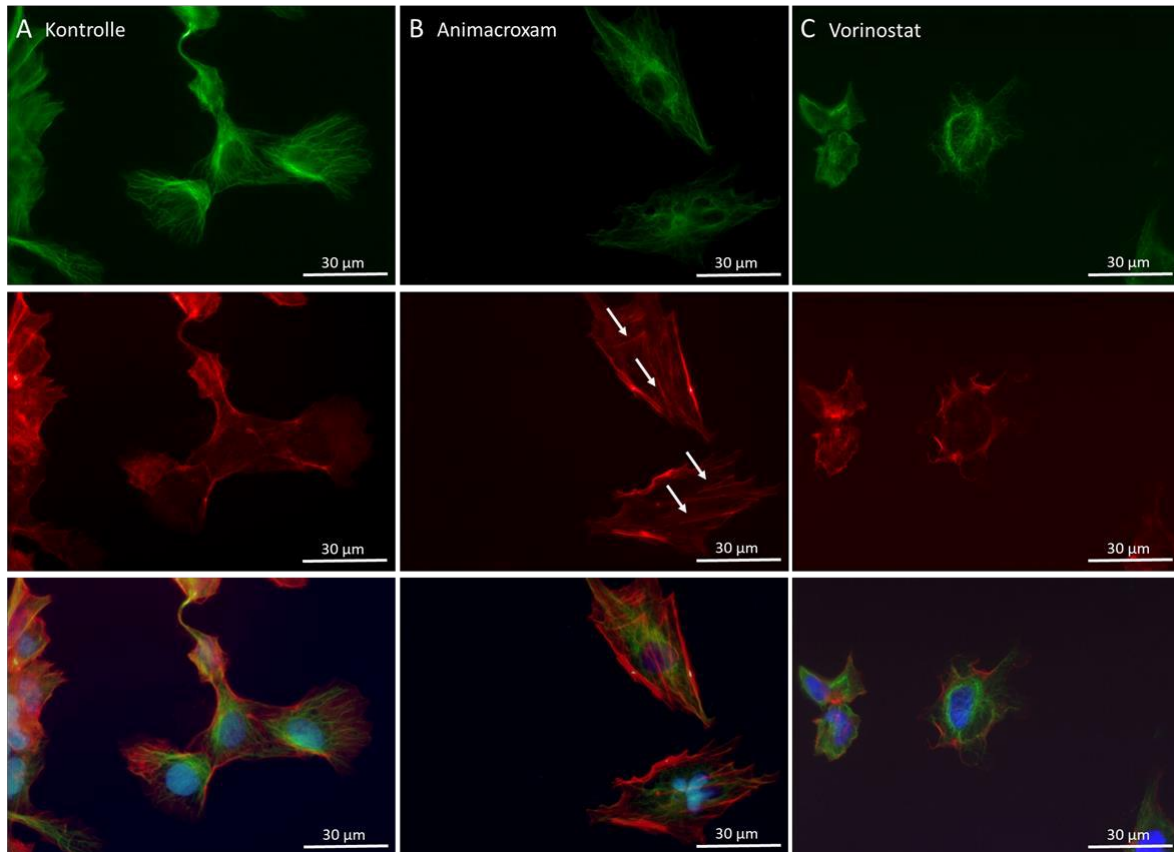


Abbildung 3. Nachweis der Bildung von Aktin-Stressfasern in TKZT nach Inkubation mit Animacroxam. A, Kontrollbehandlung mit DMSO zeigte keine Veränderungen des Aktin- oder Tubulin-Zytoskeletts von TKZT-Zellen. B, Inkubation mit Animacroxam (0,22 μM) für 48 Stunden führte zur Bildung von Aktin-Stressfasern in 2102EP-Zellen. C, Behandlung von TKZT-Zellen mit Vorinostat (1,5 μM) zeigte keine Bildung von Aktin-Stressfasern. Repräsentative Darstellung von $n = 3$ unabhängigen Versuchen. Abbildung modifiziert nach Steinemann et al. 2017, Molecular Cancer Therapeutics, Abbildung 7A,B,C.

3.2.3 Reduktion der Migrationsfähigkeit von TKZT-Zellen

Da ein funktionelles Zytoskelett für die Migration von Tumorzellen essentiell ist und Animacroxam die Bildung von Aktin-Stressfasern induzierte, wurde die Migrationsfähigkeit von cisplatin sensitiven 2102EP-Zellen mittels eines Scratch-Assays untersucht. Die Migration in den untersuchten TKZT-Zellen wurde dosisabhängig inhibiert und findet bei Behandlung mit 1,0 μM Animacroxam nahezu nicht mehr statt (< fünf Prozent) (Abbildung 7d,e, Steinemann et al. 2017, Molecular Cancer Therapeutics).

3.3 Überprüfung der Glukoseaufnahme und des Glukosemetabolismus in TKZT-Zellen *in vitro*

Um das reduzierte Wachstum und die Induktion von Apoptose in TKZT nach Behandlung mit Animacroxam zu erklären, wurden zugrundeliegende Signalwege der Aufnahme und des Metabolismus von Glukose näher untersucht. Hexokinasen sind wichtige Enzyme für den zellulären Glukosestoffwechsel, welche Glukose zu Glukose-6-Phosphat (G-6-P) umsetzen. So wird die Diffusion der Glukose aus der Zelle hinaus verhindert und der Eintritt der Glukose in die Glykolyse ermöglicht. Es konnte nachgewiesen werden, dass die gesamte Enzymaktivität der Hexokinasen nach Inkubation mit Animacroxam in cisplatin sensitiven 2102EP-Zellen dosisabhängig um mehr als 85 Prozent reduziert

wurde (Abbildung 4). Die Aufnahme von Glukose in die untersuchten TKZT-Zellen wurde durch

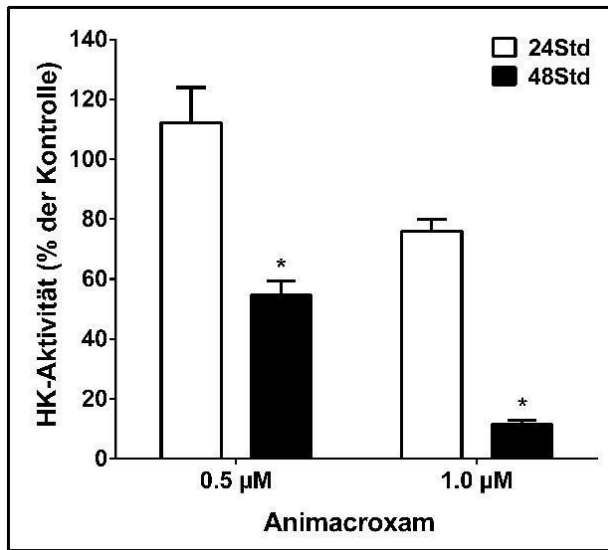


Abbildung 4. Messung der Enzymaktivität der Hexokinasen nach Behandlung mit Animacroxam. Behandlung mit Animacroxam (24 bis 48 Stunden, 0,5 - 1,0 µM) zeigte eine zeit- und dosisabhängige Reduktion der HK- Aktivität um bis zu >85 Prozent. Ergebnisse werden dargestellt als Mittelwert ± SEM von n = 3 unabhängigen Versuchen. *P-Wert von ≤ 0.05, one-way ANOVA post hoc Tukey's Test.

Expressionsmessungen von GLUT1, einem wichtigen Glukosetransporter in TKZT, untersucht [43]. Hierbei konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in der Expression nach Behandlung mit Animacroxam festgestellt werden (Abbildung 5A). Da GLUT1 nicht signifikant beeinflusst wurde, wurde die intrazelluläre Verstoffwechslung von Glukose untersucht, um eventuelle Substratlimitationen festzustellen. Dabei wurde nachgewiesen, dass die Expression des glykolytischen Enzyms Bisphosphoglyceratmutase (BPGM) um 50 Prozent reduziert wurde. Eine vergleichbare Reduktion wurde auch durch Vorinostat, jedoch nicht durch Cisplatin erreicht (Abbildung 5B). Um Veränderungen in der glykolytischen Energieproduktion zu messen, wurde die Laktatmenge aus Überständen von mit Animacroxam behandelten 2102EP-Zellen bestimmt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die von den Zellen abgegebene Laktatmenge und damit die glykolytische Energiegewinnung zeit- und dosisabhängig auf unter 25 Prozent reduziert wurde (Abbildung 5C) und der Effekt von Animacroxam die Wirkung von Vorinostat signifikant übersteigt.

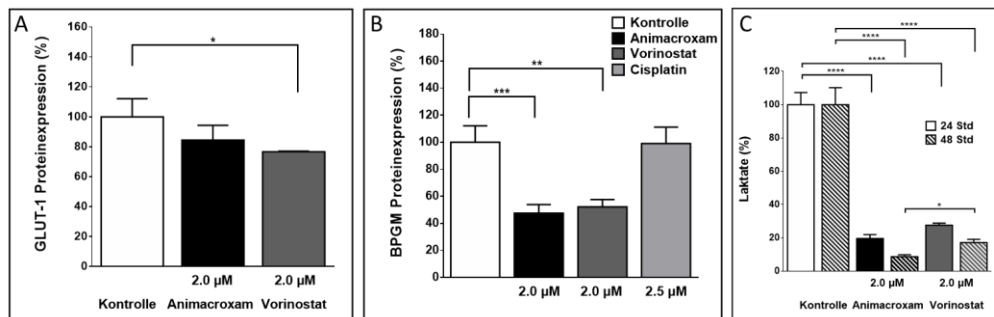


Abbildung 5. Messung der Proteinexpression von GLUT1 und BPGM sowie der Laktatmenge von behandelten TKZT-Zellen. **A**, Quantifizierung der GLUT1 Proteinexpression nach 24-stündiger Inkubation mit Animacroxam (2,0 µM) oder Vorinostat (2,0 µM). Behandlung mit Animacroxam konnte die Expression von GLUT1 nicht signifikant reduzieren. **B**, Proteinexpression von BPGM nach 24-stündiger Inkubation mit Animacroxam (2,0 µM), Vorinostat (2,0 µM) oder Cisplatin (2,5 µM). Animacroxam senkte, wie auch Vorinostat, die Proteinexpression von BPGM signifikant. **C**, Messung der Laktatmenge aus Überständen von behandelten TKZT-Zellen nach 24 oder 48 Stunden. Behandlung mit Animacroxam wie auch Vorinostat reduzierte die Laktatproduktion nach 24 und 48 Stunden signifikant. Der Effekt von Animacroxam übertraf die Laktatreduktion durch Vorinostat signifikant. Ergebnisse werden dargestellt als Mittelwert ± SEM von mindestens n = 3 unabhängigen Versuchen. *P-Wert von ≤ 0.05, **P-Wert von ≤ 0.005, ***P-Wert von ≤ 0.0005, ****P-Wert von ≤ 0.0001; one-way ANOVA post hoc Tukey's test. Abbildung modifiziert nach Steinemann et al., 2019, Molecular Oncology, Abbildung 3C,D,E.

Parallel zu einer Reduktion der glykolytischen Energiegewinnung kam es zu einem dosisabhängigen Anstieg von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in den mit Animacroxam behandelten TKZT-Zellen (Abbildung 3F, Steinemann et al. 2019, Molecular Oncology). Dieser Effekt war nach Behandlung mit Vorinostat nicht nachweisbar. Versuche mit Brimamin, welches den gleichen Imidazolanteil wie Animacroxam vorweist, zeigten eine deutlich erhöhte Menge von ROS in behandelten TKZT-Zellen (Abbildung 3F, Steinemann

et al. 2019, Molecular Oncology). Der Anstieg von ROS in mit Animacroxam behandelten TKZT-Zellen ist entweder auf eine gesteigerte ROS-Produktion oder auf eine reduzierte Aktivität des ROS-reduzierenden GSH zurückzuführen. Untersuchungen der GSH-Menge in behandelten TKZT-Zellen zeigt keine Reduktion von GSH nach Behandlung mit Animacroxam oder Vorinostat (Abbildung 3G, Steinemann et al. 2019, Molecular Oncology). Animacroxam kann im Gegensatz zu Vorinostat eine erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies induzieren. Dies deutet darauf hin, dass der Zytoskelett-angreifende Imidazolanteil von Animacroxam und nicht der HDAC-inhibierende Hydroxamsäureanteil dieses Dualinhibitors für eine erhöhte ROS-Produktion verantwortlich ist.

3.4 Antiangiogene Effekte von Animacroxam *in vitro*

Ein Ziel der Arbeit ist zu bestimmen, ob Animacroxam antiangiogene Effekte induzieren kann. Deshalb wurde die Bildung von Kapillarstrukturen durch Endothelzellen *in vitro* nach Inkubation mit Animacroxam untersucht. Es wurde festgestellt, dass es nach Inkubation mit Animacroxam zu einer dosisabhängigen Reduktion von mehr als 70 Prozent der Kapillarstrukturen kommt (Abbildung 5, Steinemann et al. 2019, Molecular Oncology). Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt auf die *In-vitro*-Kapillarbildung ist eine gestörte Zell-Zellkommunikation über Gap Junctions. In der gapjunktionalen Kommunikation (GJIC) werden Poren zwischen Zellen aus Transmembranmolekülen, sogenannten Connexinen, gebildet. Die gapjunktionale Kommunikation ist entscheidend für die vaskuläre Adaptation und die Steuerung des proangiogenen Wachstums von Kapillarnetzwerken [30]. Nach Behandlung mit Animacroxam wurde die Expression von Connexin43 (Cx43), einem zur gapjunktionalen Kommunikation notwendigen Membranmolekül, auf Proteinebene um mehr als 75 Prozent herunterreguliert (Abbildung 6A, Steinemann et al. 2019, Molecular Oncology). Vorinostat hingegen konnte die Expression von Cx43 nicht signifikant reduzieren (Abbildung 6A, Steinemann et al. 2019, Molecular Oncology). Zudem wurde eine Reduktion der gapjunktionalen Kommunikation nach Behandlung mit Animacroxam festgestellt. Dies wurde mit einem Scrape-loading Assay nachgewiesen, wobei die Diffusion des Farbstoffes Lucifer Yellow durch die Zellen als Maß für gapjunktionale Kommunikation bestimmt wird. Dabei konnte gezeigt werden, dass Animacroxam die Zell-Zellkommunikation um annähernd 35 Prozent reduziert. Dies entspricht dem Effekt von Carbenoxolon, einem etablierten Connexininhibitor. Inkubation mit Vorinostat hingegen hatte keinen signifikanten Effekt auf die interzelluläre Diffusionsweite von Lucifer Yellow über Gap Junctions (Abbildung 6B/C, Steinemann et al. 2019, Molecular Oncology).

3.5 In-vivo-Bestimmung des Tumolvolumens am CAM-Modell mittels MRT

Als Erweiterung des CAM-Modells wurde die klinisch relevante und hochauflösende Methode der MRT zur Volumenbestimmung von inokulierten TKZT verwendet. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass das Tumorstadium der mit Animacroxam behandelten Tumore auf der CAM vollständig inhibiert wird und es darüber hinaus zu einer mehr als 60-prozentigen Reduktion des Tumolvolumens nach sieben Tagen kommt (Abbildung 6).

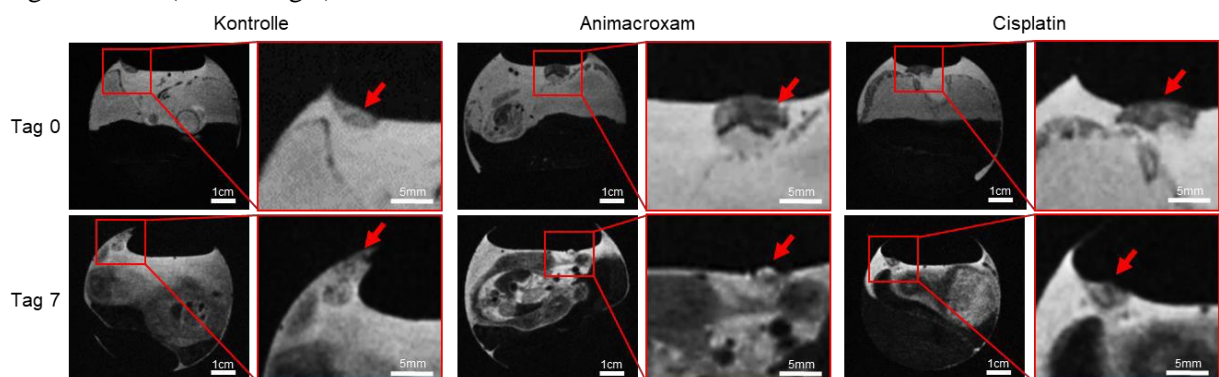


Abbildung 6. Bestimmung des Tumolvolumens von inokulierten Mikrotumoren aus TKZT-Zellen auf der CAM nach Behandlung mit Animacroxam oder Cisplatin. T2-gewichtete MRT-Aufnahmen von TKZT auf der CAM befruchteter Hühnereier null und sieben Tage nach Behandlung mit 0,9% NaCl, Animacroxam (5,0 µM) oder Cisplatin (2,5 µM). Das Tumorstadium von inokulierten TKZT auf der CAM wurde sieben Tage nach Behandlung in Kontrolltumoren um >110 Prozent erhöht. Sieben Tage nach iv-Gabe von Animacroxam (5,0 µM) war das Tumorstadium um mehr als 60 Prozent reduziert. Behandlung mit Cisplatin (2,5 µM) sorgte im selben Zeitraum

für eine Reduktion des Tumervolumens um beinahe 60 Prozent. Repräsentative Darstellung von n = 4 unabhängigen Präparationen. Abbildung modifiziert nach Steinemann et al. 2019, Molecular Oncology, Abbildung 1B,C,D.

In histologischen Präparaten von 2102EP-Tumorplaques, welche aus der CAM entfernt und histologisch verarbeitet wurden, konnte zudem festgestellt werden, dass die Anzahl der proliferierenden Zellen um mehr als 35 Prozent reduziert war (Abbildung 1F, Steinemann et al. 2019, Molecular Oncology). Animacroxam induziert bei den inokulierten Tumoren eine auffällige morphologische Veränderung durch die Bildung einer Kappe auf der Oberseite der Tumore (Abbildung 2A, Steinemann et al. 2019, Molecular Oncology). Mithilfe der MRT-Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass diese Kappe eine proteinreiche Flüssigkeit ist, die maßgeblich aus nekrotischen Zellresten besteht (Hell in T1-gewichteten Aufnahmen, dunkel in T2-gewichteten Aufnahmen) [44,45].

3.6 Überprüfung der Glukoseaufnahme *in vivo* nach Behandlung mit Animacroxam

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist zu ermitteln, ob Animacroxam die Glukoseaufnahme von inokulierten TKZT *in vivo* hemmt. So konnte mittels PET-Analysen der Nachweis erbracht werden, dass die Aufnahme von F¹⁸-FDG durch die inokulierten Tumorzellen acht Tage nach iv-Gabe von Animacroxam um mehr als 40 Prozent reduziert wurde (Abbildung 7). Die Kappe auf den mit Animacroxam behandelten Tumoren zeigt keinerlei Aufnahme von F¹⁸-FDG und bestätigt damit, dass diese Kappe keine vitalen Tumorzellen, sondern lediglich nekrotische Zellmasse enthält.

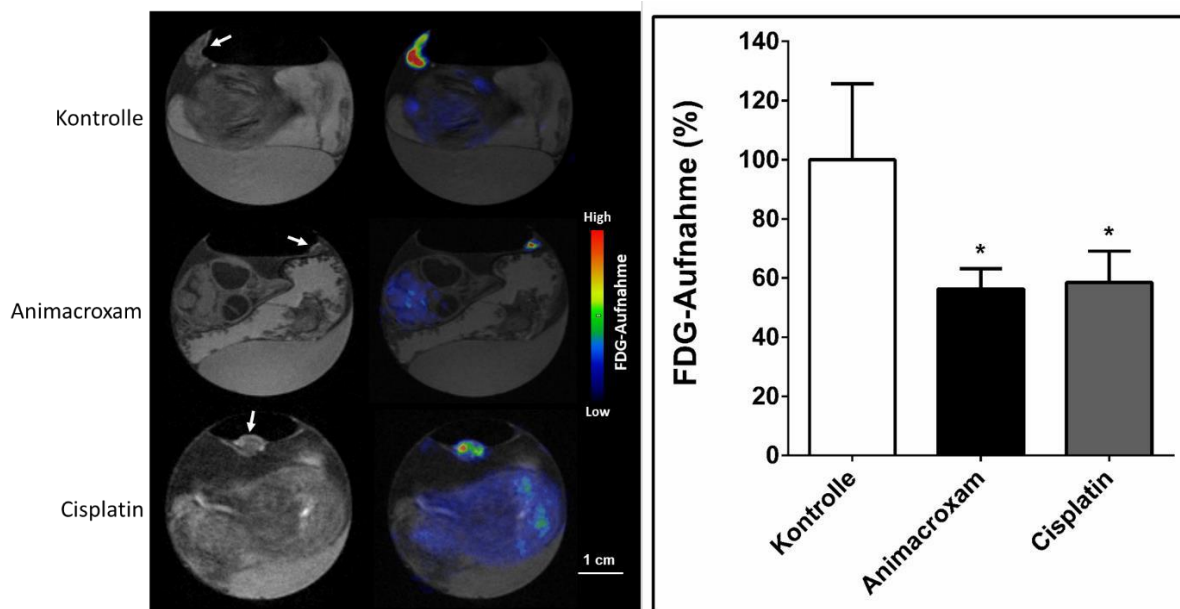


Abbildung 7. Bestimmung der Aufnahme von F¹⁸-FDG in inokulierten Mikrotumoren auf der CAM nach Behandlung mit Animacroxam oder Cisplatin. A. T1-gewichtete Aufnahmen und korrespondierende PET-Aufnahmen der Aufnahme von F¹⁸-FDG in Inokulierten TKZT auf der CAM befruchteter Hühnereier. B. Inokulierte Mikrotumore auf der CAM zeigten, acht Tage nach iv-Gabe von Animacroxam (5,0 µM) oder Cisplatin (2,5 µM), eine mehr als 40 Prozent reduzierte Aufnahme von F¹⁸-FDG. Ergebnisse werden als Mittelwert ± SEM von n = 3 unabhängigen Experimenten dargestellt. * = P-Wert von ≤ 0.05, unpaired t-Test. Abbildung modifiziert nach Steinemann et al. 2019, Molecular Oncology, Abbildung 2B,C.

3.7 Überprüfung der antiangiogenen Wirkung von Animacroxam *in vivo*

Neben der Wirkung von Animacroxam auf die Proliferation und den Glukosestoffwechsel der untersuchten 2102EP-Zellen *in vivo*, wird die antiangiogene Potenz von Animacroxam am CAM-Modell untersucht. Deshalb wurden Veränderungen in der Perfusion und der Mikrogefäßanzahl von unbehandelten und behandelten Bereichen der CAM untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass nach 48-stündiger Inkubation mit Animacroxam die Perfusion von Kapillaren auf der CAM deutlich reduziert ist (Abbildung 8A). Dieser Effekt konnte nach Inkubation mit Vorinostat nicht festgestellt werden. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass die Gefäßaussprossung auf der CAM 24 bis 48 Stunden nach topischer Applikation von Animacroxam effektiv inhibiert wird. Darüber hinaus wurden avaskuläre Effekte festgestellt. Dabei wurden bestehende

Blutgefäße zeit- und dosisabhängig um bis zu 35 Prozent zurückgebildet (Abbildung 8B). Bei der Kontrollbehandlung hingegen kam es im selben Zeitraum zu einem Anstieg der Gefäßanzahl um mehr als 30 Prozent (Abbildung 8B). Vorinostat konnte die Anzahl der Gefäßausprossungen auf der CAM nicht reduzieren und es kam im selben Zeitraum zu einem Anstieg der Gefäßausprossungen, die der Kontrollbehandlung entsprach. Um den Wirkmechanismus von Animagroxam genauer bestimmen zu können, wurde auch die antiangiogene Potenz von Brimamin untersucht. Hierbei reduzierte Brimamin die Anzahl der Blutgefäße auf der CAM um mehr als 70 Prozent (Abbildung 8B). Dieser Effekt war durch Zugabe von Vorinostat als HDACi nur minimal steigerbar. Um zu ermitteln, ob die inokulierten Tumore auf der CAM auch antiangiogene Effekte nach Behandlung mit Animagroxam aufweisen, wurden diese Tumore histologisch gefärbt und es konnte eine 22-prozentige Reduktion der Einsprossung von Mikrogefäßen festgestellt werden. Außerdem konnten, im Gegensatz zu den kontrollbehandelten Tumoren, nach Behandlung mit Animagroxam keinerlei peritumorale Gefäße detektiert werden (Abbildung 4D/E, Steinemann et al. 2019, Molecular Oncology).

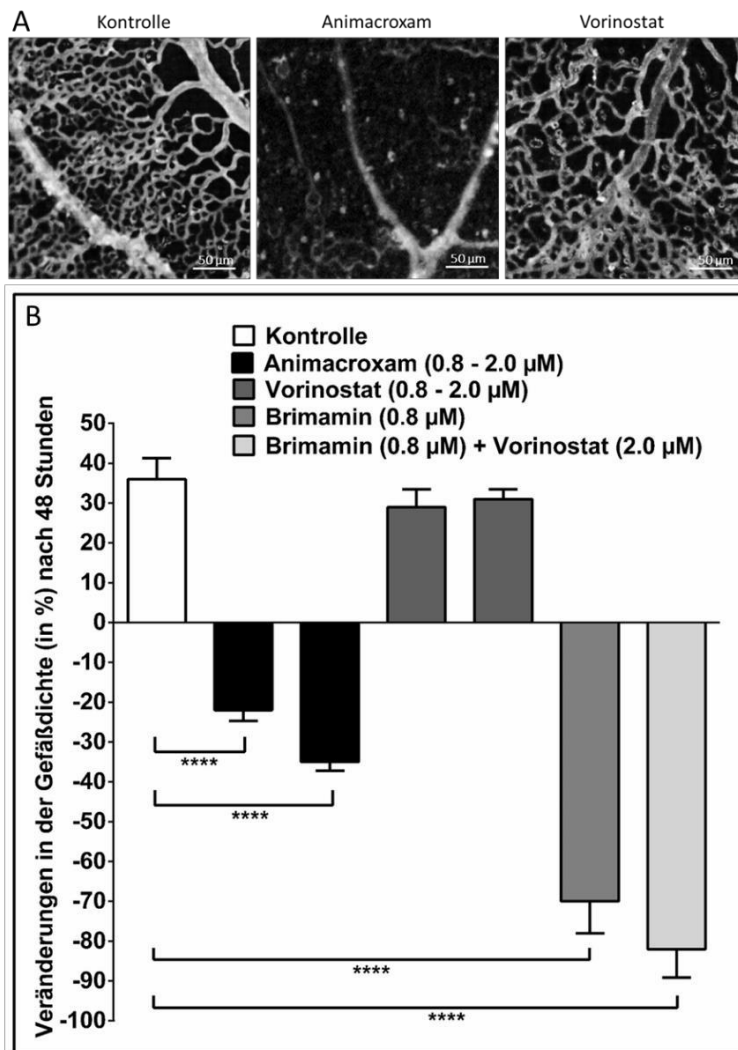


Abbildung 8. Bestimmung der Perfusion der Kapillargefäße der CAM und Messung der Gefäßausprossung der Blutgefäße der CAM nach Behandlung mit Animagroxam, Vorinostat oder Brimamin. **A**, Animagroxam sorgt nach 48-stündiger Inkubation für eine deutlich reduzierte Perfusion der CAM auf Kapillarebene. Die Behandlung mit Vorinostat zeigte keine reduzierte Perfusion der Kapillargefäße der CAM. **B**, Animagroxam sorgte auf der CAM für eine zeit- und dosisabhängige Reduktion der Anzahl von Blutgefäßen um bis zu 35 Prozent. Die Behandlung mit Vorinostat zeigte keine inhibitorischen Effekte auf die Gefäßausprossung. Behandlung mit Brimamin zeigte eine um mehr als 70 Prozent reduzierte Gefäßanzahl auf der CAM. Dieser Effekt war durch Zugabe von Vorinostat nur minimal steigerbar. Ergebnisse werden dargestellt als Mittelwert \pm SEM von $n = 3$ unabhängigen Versuchen. ****P-Wert von ≤ 0.0001 ; one-way ANOVA post hoc Tukey's test. Abbildung modifiziert nach Steinemann et al. 2019, Molecular Oncology, Abbildung 4A,C.

4. Diskussion

Aufgrund des relativ jungen Alters der meisten Patienten mit TKZT ist diese Tumorerkrankung trotz der verhältnismäßig guten Behandlungschancen von besonderer therapeutischer Bedeutung. Zudem sind immer noch viele Patienten von einer Therapie ausgeschlossen, da die platinbasierte Chemotherapie eine hohe körperliche Belastung darstellt und deshalb nur Patienten in guter Verfassung und ohne vorherige Organschädigungen für eine Behandlung in Frage kommen.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb erstmals Animacroxam, eine neue dual wirksame Verbindung, welche eine HDAC-inhibitorische und eine Zytoskelett-angreifende Pharmacophore verbindet, auf ihre antineoplastische und antiangiogene Wirksamkeit in TKZT-Zellen mit unterschiedlicher Cisplatinempfindlichkeit überprüft.

4.1 Proliferationsinhibition und Induktion der Apoptose durch Animacroxam *in vitro*

Das erste Ziel dieser Arbeit ist die Überprüfung der Wirksamkeit von Animacroxam auf die Proliferation und die Induktion von Apoptose in TKZT-Zelllinien mit unterschiedlicher Cisplatinempfindlichkeit.

Es konnte gezeigt werden, dass die Proliferation von TKZT-Zelllinien, ungeachtet der Cisplatinempfindlichkeit der untersuchten Zelllinien, durch Animacroxam inhibiert werden kann. Auffällig hierbei ist, dass Animacroxam für diese Proliferationsinhibition deutlich geringere Konzentrationen benötigt als der klinisch etablierte HDACi Vorinostat [25]. Auch liegen die eingesetzten Konzentrationen von Animacroxam in den TKZT-Zelllinien deutlich unterhalb der in der Klinik verwendeten Dosen des etablierten HDACi Vorinostat [46].

Zusätzlich induziert Animacroxam einen ausgeprägten Anstieg der apoptosespezifischen Aktivierung von Caspase-3 in den untersuchten TKZT-Zelllinien [25]. Die Induktion der Apoptose bei Animacroxam ist doppelt so hoch wie die Induktion von Apoptose durch Vorinostat. Dieses Ergebnis ist unabhängig von der Cisplatinempfindlichkeit der untersuchten TKZT-Zellmodelle. Dies ist besonders günstig, da cisplatinresistente TKZT-Zellen über eine erhöhte Aktivität von Reparaturmechanismen wie *nucleotide excision repair* und *interstrand crosslink repair* verfügen und deshalb deutlich weniger schnell Apoptose induziert werden kann [47].

Auch ist die Induktion von Apoptose besonders vorteilhaft, da der Prozess der Apoptose im Gegensatz zu Nekrosen keine entzündliche Reaktion auslöst [48]. Die dosisabhängige Reduktion des antiapoptotischen Proteins BCL-2 deutet auf eine mitochondrial vermittelte Apoptose hin. Das proapoptotische Protein APAF-1 wurde nach Inkubation mit Animacroxam sowohl in cisplatinempfindlichen 2102EP-Zellen als auch in cisplatinresistenten 2102EPR-Zellen hochreguliert und untermauert damit die Annahme der mitochondrial vermittelten Apoptose. Wie Apoptoseuntersuchungen zeigten, reichte eine vier- bis siebenmal geringere Konzentration von Animacroxam verglichen mit Vorinostat aus, um eine gleichwertige Apoptoseinduktion zu verursachen.

Regulation des Zellzyklus durch Animacroxam

Bei Tumoren ist eine Fehlregulation des Zellzyklus durch ein Ungleichgewicht von Zellzyklusregulatoren eine häufige Ursache für die ungehemmte Zellproliferation und Tumorprogression [49]. Mit Animacroxam behandelte TKZT-Zellen zeigten einen dosisabhängigen Zellzyklusarrest in der G₀/G₁-Phase, ungeachtet der Cisplatinempfindlichkeit der Zellen. Dies belegt die Proliferationsinhibition von Animacroxam in den untersuchten TKZT-Zellen. Ein wichtiger Regulator des Zellzyklus ist Cyclin D1. Cyclin D1 steuert durch die Bindung an die cyclinabhängigen Kinasen 4 und 6 (Cdk4/6) die Transition von Zellen aus der G₁-Phase in die S-Phase. Cyclin D1 ist in vielen Tumoren überexprimiert und wird mit der malignen Transformation und Tumorprogression assoziiert [50]. Animacroxam reduziert die Expression von Cyclin D1 in cisplatinempfindlichen 2102EP-Zellen und sorgt damit für Zellzyklusarrest in der G₀/G₁-Phase. Da Cyclin D1 dafür bekannt ist, in TKZT dereguliert zu sein, beschreiben Freemantle et al. Cyclin D1 als potentielle therapeutische Zielstruktur, um das Wachstum von TKZT zu hemmen [51]. Entgegen dieser Studienlage konnte die Reduktion von Cyclin D1 nicht in cisplatinresistenten 2102EPR-Zellen festgestellt werden. Dies deutet auf eine Beteiligung von weiteren Signalwegen hin wie von Fung *et al.* für verschiedene TKZT-Zelllinien beschreibt [52].

4.2 Der duale Wirkmechanismus von Animacroxam *in vitro*

Das zweite Ziel dieser Arbeit ist die Überprüfung der dualen Wirksamkeit von Animacroxam. Ein dualer Ansatz in der Tumorthherapie, bei dem die HDAC-Aktivität und das Zytoskelett der Tumorzellen gleichzeitig angegriffen werden, bietet eine Vielzahl von Vorteilen gegenüber der Monotherapie. Bei dem Einsatz von Monotherapien kann die Zelle über sogenannte Escape-Mechanismen, wobei verstärkt alternative Signalwege genutzt werden, die Wirkung der verwendeten Substanzen teilweise oder gänzlich umgehen und es kommt häufig zu Resistenzbildungen [53]. Auch der klinisch etablierte HDACi Vorinostat wird bereits in der Kombinationstherapie eingesetzt um die antineoplastischen Effekte von Platinverbindungen zu verbessern [54].

Nachweis der HDAC-Inhibition durch Animacroxam

Eine Hemmung von HDACs in TKZT-Zellen wird mit einer Reduktion der Proliferation, zytotoxischen Effekten und Zellzyklusarrest in Zusammenhang gebracht [55]. Daher ist der Nachweis einer ausgeprägten Inhibition der HDAC-Aktivität (85 Prozent) durch Animacroxam als wichtige Wirkweise dieses Dualinhibitors zu bewerten. Zusätzlich zeigt sich, dass die eingesetzten Konzentrationen von Animacroxam deutlich unterhalb der in der Klinik verwendeten Dosen von Vorinostat liegen [46]. Die verbleibenden 15 Prozent HDAC-Aktivität nach Behandlung mit Animacroxam könnte auf eine nicht vollständige pan-HDAC-Inhibition oder auf eine subtypspezifische Inhibition von bestimmten HDACs zurückzuführen sein. Da hierzu bislang unzureichend Daten vorliegen, sind weiterführende Experimente notwendig, um die Wirkung von Animacroxam in Bezug auf die Expressionsmuster von HDACs in TKZT und anderen Tumorentitäten zu klären.

Nachweis der zytoskelettalen Inhibition durch Animacroxam

Eine weitere Frage ist, ob Animacroxam das Zytoskelett von TKZT-Zellen modifizieren kann. Bonezzi et al. konnten zeigen, dass Imidazolderivate das Zytoskelett von Tumorzellen angreifen [56] und Mahal et al. zeigte, dass es in primären *human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC)-Zellen zur Ausbildung von Aktin-Stressfasern kommt [18]. Die Bildung von Aktin-Stressfasern verhindert eine normale Organisation des Zytoskeletts, wodurch diesen Zellen nach Behandlung mit Animacroxam die Fähigkeit verlieren, die benötigten Strukturen für Proliferation und Migration auszubilden [57]. Es konnte gezeigt werden, dass die Inkubation mit Animacroxam zur Ausbildung von Aktin-Stressfasern in TKZT-Zellen führt. Zusätzlich zu der Stressfaserbildung konnte festgestellt werden, dass Animacroxam die Migration der TKZT-Zellen im Scratch-Assay um bis zu 95 Prozent reduziert. Die Zellen begannen darüber hinaus, sich vom Boden der Zellkulturschale abzulösen, was einen Verlust der Adhäsionsfähigkeit des Zytoskeletts belegt [57]. Des Weiteren kennzeichnet sich die Migration von Tumorzellen durch die Ausbildung von fingerartigen Aussprossungen, sogenannten Filopodien [58]. Diese Strukturen, welche für die Motilität von Tumorzellen essentiell sind, sind nach Behandlung mit Animacroxam nicht mehr vorhanden. Ob die Migrationsfähigkeit von TKZT-Zellen durch Animacroxam auch *in vivo* inhibiert wird, sollte deshalb in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

4.3 Untersuchungen der Glukoseaufnahme und des Glukosestoffwechsels in TKZT *in vitro*

Otto Warburg stellte vor mehr als 80 Jahren fest, dass Tumore häufig eine gesteigerte Glykolyse zur Energieversorgung mit ATP aufweisen (*Warburg Effekt*) [59]. Daher war das dritte Ziel dieser Arbeit herauszufinden, ob Animacroxam die Aufnahme von Glukose oder den Glukosestoffwechsel *in vitro* hemmen kann.

Für viele humane Tumore konnte gezeigt werden, dass ein erhöhter Glukosestoffwechsel mit einer Überexpression von Glukosetransportern und Hexokinasen einhergeht [43,60]. Nach Behandlung mit Animacroxam war die Expression von GLUT1, einem wichtigen Glukosetransporter in TKZT [43], jedoch nicht signifikant verändert. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die intrazelluläre Verarbeitung von Glukose und damit die Energieproduktion für die Tumorzellen. Es zeigte sich, dass die Enzymaktivität der Hexokinasen zeit- und dosisabhängig um mehr als 85 Prozent reduziert wurde. Dadurch ist eine weitere Umsetzung von Glukose zu Glukose-6-Phosphat nicht möglich, sodass keine glykolytische Energiegewinnung stattfinden kann [61]. Das glykolytische Enzym BPGM ist nach Inkubation mit

Animacroxam herunterreguliert. Für BPGM konnte festgestellt werden, dass es neben der Bindung an Hämoglobin weitere Funktionen innerhalb der Zelle erfüllt [43]. Eine dieser Funktionen ist die Regulation der Serin- Biosynthese. Oslund et al. konnten zeigen, dass BPGM als ein entscheidender Faktor in die Serin-Biosynthese von Krebszellen eingreift und damit eine wichtige Rolle bei der Proliferation und Migration von Tumoren spielt [62]. Bonucelli et al. fanden heraus, dass hohe Laktatwerte in Tumoren das Tumorwachstum fördern können [63]. Auch klinische Studien weisen bei erhöhten Laktatwerten eine verschlechterte Prognose und eine reduzierte Lebenserwartung bei Patienten mit Zervix und Lungenkarzinomen nach [64,65]. Veränderungen in der Laktatproduktion wurden im Überstand behandelte 2102EP-Zellen gemessen. Eine um mehr als 90 Prozent reduzierte Menge Laktat im Überstand behandelte Zellen bestätigte die Repression der glykolytischen Aktivität in TKZT durch Animacroxam. Obwohl Animacroxam die Expression von GLUT1 nicht signifikant hemmen kann, zeigt sich eine deutliche Reduktion der glykolytischen ATP-Produktion in den untersuchten TKZT-Zellen. Eine reduzierte Glykolyse nimmt dem Tumor die Möglichkeit der schnellen Energiegewinnung und wird zusätzlich mit einem Anstieg von oxidativem Stress und einer Inhibition des Tumorwachstums in Verbindung gebracht [66]. Außerdem wird die Reduktion der glykolytischen ATP-Produktion in Tumoren in der Radiotherapie bereits erfolgreich angewendet und zusätzlich mit einer Sensitivierung von Tumorzellen für bestimmte chemotherapeutische Ansätze und einer Sensitivierung für Immunotherapie assoziiert [67]. In den untersuchten TKZT-Zellen wurde in dieser Arbeit zudem ein Anstieg in der ROS-Produktion *in vitro* nach Behandlung mit Animacroxam festgestellt und durch Untersuchungen an Brimamin mit hoher Wahrscheinlichkeit auf einen Effekt des Imidazolanteils von Animacroxam zurückgeführt. Zu welchen Teilen der Anstieg von ROS durch den Zusammenbruch der glykolytischen Energiegewinnung oder durch eine Steigerung der endothelialen Permeabilität verursacht wird, gilt es in zukünftigen Versuchen herauszufinden. Diese Ergebnisse legen jedoch nahe, dass Animacroxam, im Gegensatz zu Vorinostat, die endotheliale Permeabilität und damit die Gefäßorganisation und die Versorgung des Tumors entscheidend beeinflussen kann. So wurde in nachfolgenden Versuchen erforscht, ob Animacroxam die Glukoseaufnahme in inokulierten TKZT und die Angiogenese *in vivo* hemmen kann (vgl. 3.7).

4.4 Untersuchung der antiangiogenen Potenz *in vitro*

Eine weitere Frage dieser Arbeit ist, ob Animacroxam die Bildung von Kapillarstrukturen *in vitro* hemmen kann. Die Inhibition von angiogenen Strukturen ist eine wertvolle Eigenschaft antitumoraler Substanzen und ein wichtiger erster Hinweis auf die antiangiogene Potenz *in vivo*. Die Inkubation mit Animacroxam zeigte, dass die Bildung von kapillarähnlichen Strukturen signifikant gehemmt wird. Über welchen Mechanismus Animacroxam die Bildung von Kapillarstrukturen *in vitro* hemmt ist jedoch bislang unklar. Sato et al. beschrieben bereits im Jahr 2002, dass intrazelluläre Glukosekonzentrationen auch einen Einfluss auf die Expression von Cx43 und die GJIC haben und so zu einer verringerten Angiogenese beitragen können [68]. Connexin43 ist für die über die intrazellulären Gap Junctions stattfindende Zell-Zellkommunikation zuständig [69]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Cx43 zwar durch Animacroxam, nicht jedoch durch Vorinostat inhibiert, und dass gleichzeitig die Zell-Zellkommunikation signifikant reduziert wird. Wang et al. haben gezeigt, dass die Reduktion von Cx43 in endothelialen Vorläuferzellen mit einer Reduktion von Proliferation und Migration sowie reduzierten VEGF, einem der wichtigsten proangiogenen Signalmolekülen, einhergeht [70]. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Reduktion von Cx43 eine wichtige Rolle bei der Hemmung von Kapillarstrukturen *in vitro* durch Animacroxam spielt.

4.5 Untersuchungen der In-vivo-Wachstumshemmung und Reduktion des Tumolvolumens von inokulierten TKZT am erweiterten CAM-Modell

Das fünfte Ziel dieser Arbeit ist die In-vivo-Untersuchung der antineoplastischen Potenz von Animacroxam mittels einer Erweiterung des CAM-Modells.

Das Wachstum von inokulierten Mikrotumoren wurde mittels MRT-gestützter Bildgebung, analog zur klinischen und nicht-invasiven Bildgebung von Tumoren, bestimmt [71]. Die Untersuchungen zur Veränderung des Tumolvolumens auf der CAM zeigten ein zeitabhängiges Wachstum der kontrollbehandelten Tumore von mehr als 110 Prozent nach sieben Tagen. Behandlung mit Animacroxam hingegen sorgte nicht nur für eine Wachstumshemmung, sondern reduzierte das initiale Tumolvolumen um mehr als 60 Prozent nach sieben Tagen. Diese Wachstumshemmung ist vergleichbar

mit der wachstumsinhibitorischen Wirkung von Cisplatin. Dieses Ergebnis zeigt, dass Animacroxam auch im CAM-Modell das Wachstum von TKZT inhibiert und damit das Tumolvolumen reduziert. Die immunhistologische Färbung der mit Animacroxam behandelten Tumorschnitte aus der CAM mit dem proliferativen Marker Ki67 zeigte, dass Animacroxam die Proliferationsrate in behandelten Tumoren senkt [72].

Eine interessante morphologische Veränderung ist die Bildung einer Kappe auf den mit Animacroxam behandelten Tumoren, die sich auf den MRT-Aufnahmen klar vom Tumorkern abhebt. Die Analyse der MRT-Daten zeigt, dass diese Kappe aus einer proteinreichen Flüssigkeit und nekrotischen Zellresten besteht. Solche proteinreichen Ödeme sind bei inflammatorischen Erkrankungen beschrieben worden, wobei das Endothel seine junctionale Integrität verliert und durchlässig wird [73]. Dies hat einen wichtigen Einfluss auf die Beschaffenheit und Funktion von Blutgefäßen und damit die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des Tumors. Eine gesteigerte endotheliale Permeabilität wird mit einem Anstieg der Produktion von ROS in Verbindung gebracht, welche die primäre Ursache endothelialer Dysfunktion darstellt [73]. Die erhöhte ROS-Produktion konnte, wie oben beschrieben, auch in TKZT-Zellen *in vitro* nachgewiesen werden (vgl. 3.3).

4.6 Verringerte *in vivo* Glukoseaufnahme in inokulierten TKZT auf der CAM

In der Klinik werden PET-Messungen bei TKZT zur Diagnose und Einstufung von TKZT genutzt [74]. Darüber hinaus wird die PET in der Forschung, bei Kleintieren wie Mäusen und Ratten, zur Bestimmung der Glukoseaufnahme *in vivo* verwendet [75]. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist zu klären, ob eine veränderte Aufnahme von Glukose auch *in vivo* mittels PET-Analysen gemessen werden kann. Die Aufnahme von F¹⁸-FDG wurde in inokulierten TKZT auf der CAM bestimmt. Nach Behandlung mit Animacroxam zeigte sich eine um mehr als 40 Prozent reduzierte Aufnahme von F¹⁸-FDG in TKZT *in vivo*. Die Tatsache, dass dennoch F¹⁸-FDG aufgenommen wurde, zeigt, dass Animacroxam die Glukoseaufnahme *in vivo* nicht vollständig hemmt. Diese Daten zeigen, dass die in Mäusen genutzte Kleintier-PET auch auf das CAM-Modell übertragbar ist und eine Bestimmung des Tumolvolumens mittels MRT und der Glukoseaufnahme *in vivo* desselben Tumors longitudinal und nicht-invasiv ermöglicht. Darüber hinaus zeigt dieser Versuch, dass die inokulierten TKZT Anschluss an das Gefäßsystem der CAM gefunden haben.

4.7 Die antiangiogene Wirkung von Animacroxam *in vivo*

Das letzte Ziel dieser Arbeit ist herauszufinden, ob Animacroxam auch *in vivo* die Angiogenese hemmen kann. Eine Hemmung der Tumovaskularisierung kann die Versorgung des Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen reduzieren und so zu einer Wachstumsinhibition beitragen. Silvan et al. stellten bereits fest, dass die Inhibition der Angiogenese eine sehr vorteilhafte Ergänzung zur Standardtherapie bei TKZT sein kann. Zusätzlich können dabei sauerstoffarme (hypoxische) Bereiche minimiert werden, wodurch das aggressive Metastasierungsverhalten reduziert wird [41]. Untersuchungen auf Kapillarebene zeigen eine deutlich reduzierte Angiogenese und Perfusion in den mit Animacroxam behandelten Bereichen. Auch zeigt Animacroxam auf die großen Blutgefäße der CAM eine deutlich antiangiogene Wirkung. Dieser Effekt war so ausgeprägt, dass bestehende Blutgefäße bis zu 35 Prozent zurückgebildet wurden und avaskuläre Bereiche entstanden. Vorinostat zeigte keine antiangiogene Wirkung in diesen Versuchen. Dies steht im Gegensatz zu Ergebnissen von Eckschlager et al. die zeigen konnten, dass die Inhibition von HDACs die Angiogenese über Suppression von proangiogenen Genen hemmt [76]. Weiterführende In-vivo-Versuche sollen diesen Widerspruch aufgreifen. Untersuchungen am Imidazolderivat Brimamin unterstützen die Annahme, dass die Effekte auf das Zytoskelett durch Animacroxam entscheidend mitverantwortlich für die nachgewiesenen antiangiogene und avaskuläre Wirkung sind. Diese Annahme wird durch Ergebnisse von Kanthou et al. unterstützt, welche zeigen konnten, dass durch die Inhibition des Zytoskeletts die Zelldifferenzierung und Gefäßreifung, und damit die Angiogenese gehemmt wird [77,78]. Die antiangiogenen Effekte von Animacroxam konnten zusätzlich, nach histologischer Aufarbeitung, auch in auf der CAM inokulierten TKZT festgestellt werden.

In dieser Arbeit wird erstmals gezeigt, dass der neuartige Dualinhibitor Animacroxam in TKZT-Zellen mit unterschiedlicher Cisplatin sensitivität eine ausgeprägte Wachstumsinhibition *in vitro* und *in vivo* hervorruft und die Angiogenese auf der CAM signifikant inhibieren kann. Diese Effekte sind nicht nur

vergleichbar mit der Wirkung des klinisch etablierten HDACi Vorinostat oder dem Goldstandard in der TKZT-Therapie Cisplatin, sondern übertreffen deren Wirkung in vielen Fällen sogar deutlich. Die Tatsache, dass Animacroxam diese Effekte unabhängig von der Cisplatinsensitivität der untersuchten Zelllinien erzielen kann, stellt einen besonderen Vorteil dar, da sich die Therapieansätze für Patienten mit cisplatinresistenten TKZT bislang als unzureichend erweisen.

Die Effekte von Animacroxam sind dabei auf die duale Wirkweise zurückzuführen, wobei zum einen die HDAC-Aktivität inhibiert und zum anderen die zytoskelettale Integrität der Tumorzellen angegriffen wird. Auf diese Weise kann Animacroxam zellzyklusarretierende Effekte induzieren, den Glukosestoffwechsel und die Glukoseaufnahme in TKZT hemmen und gleichzeitig ausgeprägte antineoplastische und antiangiogene Effekte *in vitro* und *in vivo* erzielen. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die kliniknahen und nicht-invasiven Bildgebungsmethoden, die MRT und die PET, an dem etablierten CAM-Modell erfolgreich angewendet werden können und eine Überprüfung von Tumolvolumetrie und Glukoseaufnahme longitudinal und in bisher nicht dagewesenem Maße ermöglichen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Animacroxam ein vielversprechendes Potenzial als Dualinhibitor in TKZT besitzt. Die beschriebenen Ergebnisse stellen dabei eine solide Grundlage zur weiterführenden *in vivo* Charakterisierung von Animacroxam und können eine Grundlage für alternative Therapieoptionen in der zukünftigen Behandlung von TKZT darstellen.

5. Literaturverzeichnis

1. Chia VM, Quraishi SM, Devesa SS, Purdue MP, Cook MB, McGlynn KA. International trends in the incidence of testicular cancer, 1973-2002. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19(5):1151–9.
2. Oosterhuis JW, Looijenga LHJ. Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(3):210–22.
3. Oechsle K, Kollmannsberger C, Honecker F, Mayer F, Waller CF, Hartmann JT, Boehlke I, Bokemeyer C. Long-term survival after treatment with gemcitabine and oxaliplatin with and without paclitaxel plus secondary surgery in patients with cisplatin-refractory and/or multiply relapsed germ cell tumors. *Eur Urol.* 2011;60(4):850–5.
4. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy : molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2015;5(0):364–78.
5. Gerwing M, Jacobsen C, Dyshlovoy S, Oldenburg J, Oechsle K, Bokemeyer C, Amsberg G Von. Cabazitaxel overcomes cisplatin resistance in germ cell tumour cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2016;142(9):1979–94.
6. Barabas K, Milner R, Lurie D, Adin C. Cisplatin : a review of toxicities and therapeutic applications. *Vet Comp Oncol.* 2008;6(1):1–18.
7. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 2002;16:6–21.
8. Hong L, Schrot GP, Matthews HR, Yau P, Bradbury EM. Studies of the DNA Binding Properties of Histone H4 Amino Terminus. *J Biol Chem.* 1993;268(1):305–14.
9. Dokmanovic M, Clarke C, Marks PA. Histone Deacetylase Inhibitors: Overview and Perspectives. *Mol Cancer Res.* 2007;5(10):981–9.
10. Fritzsche FR, Hasler A, Bode PK, Adams H, Seifert HH, Sulser T, Moch H, Barghorn A, Kristiansen G. Expression of histone deacetylases 1, 2 and 3 in histological subtypes of testicular germ cell tumours. *Histol Histopathol.* 2011;26(12):1555–61.
11. Khan O, La Thangue NB. HDAC inhibitors in cancer biology: emerging mechanisms and clinical applications. *Immunol Cell Biol.* 2012;90(1):85–94.
12. Müller BM, Jana L, Kasajima A, Lehmann A, Prinzler J, Budczies J, Winzer K-J, Dietel M, Weichert W, Denkert C. Differential expression of histone deacetylases HDAC1, 2 and 3 in human breast cancer-overexpression of HDAC2 and HDAC3 is associated with clinicopathological indicators of disease progression. *BMC Cancer.* 2013;3:215.
13. Olsen EA, Kim YH, Kuzel TM, Pacheco TR, Foss FM, Parker S, Frankel SR, Chen C, Ricker JL, Arduino JM, Duvic M. Phase IIB multicenter trial of vorinostat in patients with persistent, progressive, or treatment refractory cutaneous t-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2007;25(21):3109–15.
14. Duvic M, Talpur R, Ni X, Zhang C, Hazarika P, Kelly C, Judy H, Reilly JF, Ricker JL, Richon VM, Frankel SR, Dc W, Chiao JH. for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Blood.* 2014;109(1):31–9.
15. Mackay, J. H, Hirte H, Colgan T, Covens A, MacAlpine K, Greci P, Wang L, Mason J, Pham P-A, Tsao M-S, Pan J, Zwiebel J, MA. Phase II trial of the histone deacetylase inhibitor Belinostat in women with platinum resistant epithelial ovarian cancer and micropapillary (LMP) ovarian tumors. *Eur J Cancer.* 2010;46(9):1573–9.
16. Schobert R, Biersack B. Multimodal HDAC inhibitors with improved anticancer activity. *Curr Cancer Drug Targets.* 2017;(1):1–18.
17. Sánchez-Muñoz A, Jiménez-Rodríguez B, Navarro-Pérez V, Medina-Rodríguez L, Llácer C, Vicioso L, Machuca J, Alba E. Targeted therapies in the treatment of germ cell tumors: The need for new approaches against “ orphan” tumors. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2012;83(3):444–51.
18. Mahal K, Biersack B, Caysa H, Schobert R, Mueller T. Combretastatin A-4 derived imidazoles show cytotoxic, antivascular, and antimetastatic effects based on cytoskeletal reorganisation. *Invest New Drugs.* 2015;33(3):541–54.
19. Hesham HM, Lasheen DS, Abouzid KAM. Chimeric HDAC inhibitors: Comprehensive review on the HDAC-based strategies developed to combat cancer. *Med Res Rev.* 2018;(April):1–52.
20. Soga T. Cancer metabolism : Key players in metabolic reprogramming. *Cancer Sci.* 2013;104(3):275–81.
21. Warburg O. On the Origin of Cancer Cells. *Science.* 1956;123(3191):309–14.

22. Bonatelli M, Silva ECA, Cárcano FM, Zaia MG. The Warburg Effect Is Associated With Tumor Aggressiveness in Testicular Germ Cell Tumors. *Front Endocrinol.* 2019;10:1–10.
23. Mahal K, Schrufer S, Steinemann G, Rausch F, Schobert R, Biersack B, Höpfner M. Biological evaluation of 4,5-diarylimidazoles with hydroxamic acid appendages as novel dual mode anticancer agents. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2015;75(4):691–700.
24. Port M, Glaesener S, Ruf C, Riecke A, Bokemeyer C, Meineke V, Honecker F, Abend M. Micro-RNA expression in cisplatin resistant germ cell tumor cell lines. *Mol Cancer.* 2011;10(52):1–8.
25. Steinemann G, Dittmer A, Kuzyniak W, Hoffmann B, Schrader M, Schobert R, Biersack B, Nitzsche B, Höpfner M. Animacroxam, a novel dual-mode compound targeting histone deacetylases and cytoskeletal integrity of testicular germ cell cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2017;16(11):2364–74.
26. Höpfner M, Sutter AP, Huether A, Schuppan D, Zeitz M, Scherübl H. Targeting the epidermal growth factor receptor by gefitinib for treatment of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2004;41(6):1008–16.
27. Steinemann G, Dittmer A, Schmidt J, Josuttis D, Fähling M, Biersack B, Beindorff N, Koziolok EJ, Schobert R, Nitzsche B, Michael H. Antitumor and antiangiogenic activity of the novel chimeric inhibitor animacroxam in testicular germ cell cancer. *Mol Oncol.* 2019;13: 2679–2696.
28. Schmidt J, Kuzyniak W, Berkholz J, Steinemann G, Ogbodu R, Hoffmann B, Nouailles G, Gürek AG, Nitzsche B, Höpfner M. Novel zinc- and silicon-phthalocyanines as photosensitizers for photodynamic therapy of cholangiocarcinoma. *Int J Mol Med.* 2018;42(1):534–46.
29. Starheim KK, Holien T, Misund K, Johansson I, Baranowska KA, Sponaas A, Hella H, Buene G, Waage A, Sundan A, Bjorkoy G. Intracellular glutathione determines bortezomib cytotoxicity in multiple myeloma cells. *Blood Cancer J.* 2016;6:e446.
30. Pries AR, Höpfner M, le Noble F, Dewhirst MW, Secomb TW. The shunt problem: control of functional shunting in normal and tumour vasculature. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(8):587–93.
31. Bader A, Bintig W, Begandt D, Klett A, Siller IG, Gregor C, Schaarschmidt F, Weksler B, Romero I, Couraud P-O, Hell SW, Ngezahayo A. Adenosine receptors regulate gap junction coupling of the human cerebral microvascular endothelial cells hCMEC/D3 by Ca²⁺ influx through cyclic nucleotide-gated channels. *J Physiol.* 2017;595(8):2497–517.
32. Balke M, Neumann A, Kersting C, Agelopoulos K, Gebert C, Gosheger G, Buerger H, Hagedorn M. Morphologic characterization of osteosarcoma growth on the chick chorioallantoic membrane. *BMC Res Notes.* 2010;3(58):2–8.
33. Jefferies B, Lenze F, Sathe A, Truong N, Anton M, Von Eisenhart-Rothe R, Nawroth R, Mayer-Kuckuk P. Non-invasive imaging of engineered human tumors in the living chicken embryo. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–9.
34. Ma Z, Chen X, Huang Y, He L, Liang C, Liang C, Liu Z. MR diffusion-weighted imaging-based subcutaneous tumour volumetry in a xenografted nude mouse model using 3D Slicer: An accurate and repeatable method. *Sci Rep.* 2015;5:1–9.
35. Kind C. The development of the circulating blood volume of the chick embryo. *Anat Biol.* 1975;147(2):127–32.
36. Barnes AE, Jensen WN. Blood Volume and Red Cell Concentration in the Normal Chick Embryo. *Am J Physiol.* 1959;197(2):403–5.
37. Warnock G, Turtoi A, Blomme A, Bretin F, Bahri MA, Lemaire C, Libert LC, Seret AEJJ, Luxen A, Castronovo V, Plenevaux AREG. In Vivo PET/CT in a Human Glioblastoma Chicken Chorioallantoic Membrane Model: A New Tool for Oncology and Radiotracer Development. *J Nucl Med.* 2013;54(10):1782–8.
38. Gebhardt P, Würbach L, Heidrich A, Heinrich L, Walther M, Opfermann T, Sørensen B, Saluz HP. Dynamic behaviour of selected PET tracers in embryonated chicken eggs. *Rev Esp Med Nucl Imagen Mol.* 2013;32(6):371–7.
39. Folkman J. Angiogenesis in Cancer, Vascular, Rheumatoid and Other Disease. *Nat Med.* 1995;1(1):27–31.
40. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(6):401–10.
41. Silván U, Díez-Torre A, Bonilla Z, Moreno P, Díaz-Núñez M, Aréchaga J. Vasculogenesis and angiogenesis in nonseminomatous testicular germ cell tumors. *Urol Oncol Semin Orig Investig.* 2015;33(6):268.e17-268.e28.
42. Xiang W, Reglin B, Nitzsche B, Maibier M, Rong WW, Hoffmann B, Ruggeri A, Guimarães P, Secomb TW, Pries AR. Dynamic remodeling of arteriolar collaterals after acute occlusion in chick chorioallantoic membrane. *Microcirculation.* 2017;24(4):1–14.
43. Younes M, Lechago L V, Somoano JR, Mosharaf M, Lechago J. Wide Expression of the Human Erythrocyte

- Glucose Transporter Glut I in Human Cancers. *Cancer Res.* 1996;56:1164–7.
44. Benveniste H, Blackband S. MR microscopy and high resolution small animal MRI: applications in neuroscience research. *Prog Neurobiol.* 2002;67:393–420.
 45. Okamoto K, Ito J, Furusawa T, Sakai K, Horikawa S, Tokiguchi S. MRI of enlarged endolymphatic sacs in the large vestibular aqueduct syndrome. *Neuroradiology.* 1998;40:167–72.
 46. Moj D, Britz H, Burhenne J, Stewart CF, Egerer G, Haefeli WE, Lehr T. A physiologically based pharmacokinetic and pharmacodynamic (PBPK/PD) model of the histone deacetylase (HDAC) inhibitor vorinostat for pediatric and adult patients and its application for dose specification. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2017;80(5):1013–26.
 47. Köberle B, Tomicic MT, Usanova S, Kaina B. Cisplatin resistance: Preclinical findings and clinical implications. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer.* 2010;1806(2):172–82.
 48. Krysko D V., Vanden Berghe T, D'Herde K, Vandenabeele P. Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. *Methods.* 2008;44(3):205–21.
 49. Vermeulen K, Van Bockstaele D.R, Berneman ZN, Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 2003;36(3):131–49.
 50. Diehl JA. Cycling to cancer with cyclin D1. *Cancer Biol Ther.* 2002;1(3):226–31.
 51. Freemantle SJ, Vaseva A V., Ewings KE, Bee T, Krizan KA, Kelley MR, Hattab EM, Memoli VA, Black CC, Spinella MJ, Dmitrovsky E. Repression of cyclin D1 as a target for germ cell tumors. *Int J Oncol.* 2007;30(2):333–40.
 52. Fung MKL, Cheung HW, Wong HL, Yuen HF, Ling MT, Chan KW, Wong YC, Cheung ALM, Wang X. MAD2 expression and its significance in mitotic checkpoint control in testicular germ cell tumour. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2007;1773(6):821–32.
 53. Koch S, Mayer F, Honecker F, Schittenhelm M, Bokemeyer C. Efficacy of cytotoxic agents used in the treatment of testicular germ cell tumours under normoxic and hypoxic conditions in vitro. *Br J Cancer.* 2003;89(11):2133–9.
 54. Ramalingam SS, Maitland ML, Frankel P, Argiris AE, Koczywas M, Gitlitz B, Thomas S, Espinoza-delgado I, Vokes EE, Gandara DR, Belani CP. Carboplatin and Paclitaxel in Combination With Either Vorinostat or Placebo for First-Line Therapy of Advanced Non – Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28(1):56–62.
 55. Jostes S, Nettersheim D, Schorle H. Epigenetic drugs and their molecular targets in testicular germ cell tumours. *Nat Rev Urol.* 2019;16(April).
 56. Bonezzi K, Taraboletti G, Borsotti P, Bellina F, Rossi R, Giavazzi R. Vascular disrupting activity of tubulin-binding 1,5-diaryl-1H-imidazoles. *J Med Chem.* 2009;52(23):7906–10.
 57. Schwartz EL. Antivascular actions of microtubule-binding drugs. *Clin Cancer Res.* 2009;15(8):2594–601.
 58. Yamaguchi H, Condeelis J. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2007;1773(5):642–52.
 59. Warburg O, Wind F, Negelein E. The metabolism of tumors in the body. *J Gen Physiol.* 1926;8(6):519–30.
 60. Patra KC, Wang Q, Bhaskar PT, Miller L, Wang Z, Chandel N, Laakso M, Muller WJ, Allen EL, Jha K, Smolen G a, Clasquin MF, Robey B, Nissim H. Hexokinase 2 is required for tumor initiation and maintenance and its systemic deletion is therapeutic in mouse models of cancer. *Cancer Cell.* 2014;24(2):213–28.
 61. Wilson JE. Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *J Exp Biol.* 2003;206(12):2049–57.
 62. Oslund RC, Su X, Haugbro M, Kee J-M, Esposito M, David Y, Wang B, Ge E, Perlman DH, Kang Y, Muir TW, Rabinowitz JD. Bisphosphoglycerate mutase controls serine pathway flux via 3- phosphoglycerate. *Nat Chem Biol.* 2017;13(10):1081–7.
 63. Bonuccelli G, Tsirigos A, Whitaker-menezes D, Pavlides S, Pestell RG, Chiavarina B, Frank PG, Flomenberg N, Howell A, Martinez-outschoorn UE, Sotgia F, Lisanti MP. Ketones and lactate “fuel” tumor growth and metastasis. *Cell Cycle.* 2010;9(17):3506–14.
 64. Yokota H, Guo J, Matoba M, Higashi K, Tonami H, Nagao Y. Lactate, Choline, and Creatine Levels Measured by Vitro 1 H-MRS as Prognostic Parameters in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Magn Reson Imaging.* 2007;25:992–9.
 65. Walenta S, Wetterling M, Lehrke M, Schwickert G, Sundfør K, Rofstad EK, Mueller-kliester W. High Lactate

- Levels Predict Likelihood of Metastases, Tumor Recurrence, and Restricted Patient Survival in Human Cervical Cancers. *Cancer Res.* 2000;60:916–21.
66. Le A, Cooper CR, Gouw AM, Dinavahi R, Maitra A, Deck LM, Royer RE. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *PNAS.* 2010;107(5):2037–42.
 67. Ganapathy-kanniappan S, Geschwind JH. Tumor glycolysis as a target for cancer therapy: progress and prospects. *Mol Cancer.* 2013;12(152):1–11.
 68. Sato T, Haimovici R, Kao R, Li A, Roy S. Downregulation of Connexin 43 Expression by High Glucose Reduces Gap Junction Activity in Microvascular Endothelial Cells. *Diabetes.* 2002;51:1565–71.
 69. Pogoda K, Kameritsch P, Mannell H, Pohl U. Connexins in the control of vasomotor function. *Acta Physiol.* 2019;225:e13108.
 70. Wang H-H, Su C-H, Wu Y-J, Li J-L, Tseng Y-M, Lin Y-C, Hsieh C-L, Tsai C-H, Yeh H-I. Reduction of connexin43 in human endothelial progenitor cells impairs the angiogenic potential. *Angiogenesis.* 2013;16:553–60.
 71. Zuo Z, Syrovets T, Genze F, Abaei A, Ma G, Simmet T, Rasche V. High-resolution MRI analysis of breast cancer xenograft on the chick chorioallantoic membrane. *NMR Biomed.* 2015;28(4):440–7.
 72. Nitzsche B, Gloesenkamp C, Schrader M, Hoffmann B, Zengerling F, Balabanov S, Honecker F, Höpfner M. Anti-tumour activity of two novel compounds in cisplatin-resistant testicular germ cell cancer. *Br J Cancer.* 2012;107(11):1853–63.
 73. Di A, Mehta D, Malik AB. ROS-activated calcium signaling mechanisms regulating endothelial barrier function. *Cell Calcium.* 2016;60(3):163–71.
 74. Bouchelouche K, Choyke PL. PET/CT in renal, bladder and testicular cancer. *PET Clin.* 2015;10(3):361–74.
 75. Cherry SR, Gambhir S. Use of Positron Emission Tomography in Animal Research. *ILAR J.* 2001;42(3):219–32.
 76. Eckschlager T, Plch J, Stiborova M, Hrabeta J. Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs. *Int J Mol Sci.* 2017;18(7):1414.
 77. Kanthou C, Tozer GM. Tumour targeting by microtubule-depolymerising vascular disrupting agents. *Expert Opin Ther Targets.* 2007;11(11):1443–57.
 78. Kanthou C, Tozer GM. Microtubule depolymerizing vascular disrupting agents: Novel therapeutic agents for oncology and other pathologies. *Int J Exp Pathol.* 2009;90(3):284–94.

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Gustav Steinemann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Charakterisierung der Wirkmechanismen des neuartigen, dual wirksamen HDAC-Inhibitors „Animacroxam“ am Beispiel testikulärer Keimzelltumore – Characterization of the mode-of-action of the new, dual-mode HDAC-inhibitor animacroxam in testicular germ cell tumors, selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Berlin, den 18.05.2020

Gustav Steinemann

Detallierte Aufstellung der selbst erbrachten Leistungen

Publikation 1

Mahal K, Schrufer S, **Steinemann G**, Rausch F, Schobert R, Biersack B, Höpfner M. Biological evaluation of 4,5-diarylimidazoles with hydroxamic acid appendages as novel dual mode anticancer agents. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2015;75(4):691–700.

IF: 2.737

Erbrachte Leistungen in dieser Publikation

- Bestimmung der Caspase-3-Aktivierung in Melanom-Zellen (518A2), Pankreaskarzinomzellen (Kyse-140) und Ösophaguskarzinomzellen (BON).
- Schreiben der Material & Methoden der Caspase-messung für das Manuskript sowie Erstellen der Figuren.

Publikation 2

Steinemann G, Dittmer A, Kuzyniak W, Hoffmann B, Schrader M, Schobert R, Biersack B, Nitzsche B, Höpfner M. Animacroxam, a novel dual-mode compound targeting histone deacetylases and cytoskeletal integrity of testicular germ cell cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2017;16(11):2364–74.

IF: 5.764

Erbrachte Leistungen in dieser Publikation

- Projektplanung, Zellkulturarbeiten, Datenakquise und -Analyse
 - *In vitro*: Proliferationsstudien und IC₅₀ Bestimmungen, Bestimmung der Apoptose e.g. Caspase-3 Aktivitätsassay, Western Blot, Zellzyklusanalyse, Fluoreszenzmikroskopie, Scratch Assay.
 - *In vivo*: CAM Assay: Toxizitätsstudien zur Verträglichkeit von Animacroxam *in vivo*, Ermittlung des Tumorwachstums auf dem CAM Assay.
- Schreiben des Textes und Erstellung der Figuren und Bilder außer: Erstellung der Abbildung der chemischen Struktur von Animacroxam, Abbildung 2E&F, Abbildung 3 und Abbildung 4.

Publikation 3

Steinemann G, Dittmer A, Schmidt J, Josuttis D, Föhling D, Biersack B, Beindorff N, Koziolok EJ, Schobert R, Brenner W, Müller T, Nitzsche B und Höpfner M. Antitumor and antiangiogenic activity of the novel chimeric inhibitor animacroxam in testicular germ cell cancer. *Mol Onc.* 2019; 13: 2679-2696.

IF: 5.962

Erbrachte Leistungen in dieser Publikation

- Projektplanung, Zellkulturarbeiten, Datenakquise und -Analyse
 - *In vitro*: Erstellung und Vorbereitung der Proben zur Messung der HK-Aktivität sowie Protein-, Laktat- und GSH-Messungen. Erweiterung der ROS-Versuche um Brimamin und H₂O₂. Präparation der Tumorplaques zur Applikation *in vivo*, Analyse der GSH-Werte.

- *In vivo*: CAM Assay: Applikation der Tumore und Behandlung (iv), Erstellung der Bilder und Auswertung der Tumolvolumetrie, topische Behandlung der CAM für Angiogeneseuntersuchungen, Bild- und Datenakquise mittels Intravitalmikroskopie, Auszählung der Gefäße auf der CAM vor und nach Behandlung. Auswertung der histologischen Daten, Erstellen der Bilder und Graphen zu den histologischen Daten für die Publikation. Schreiben des Textes der Publikation.

Berlin den 18.05.2020

Prof. Michael Höpfner

Berlin den 18.05.2020

Gustav Steinemann

Druckexemplar der Originalpublikation 1

Mahal K, Schrufer S, **Steinemann G**, Rausch F, Schobert R, Biersack B, et al. Biological evaluation of 4,5-diarylimidazoles with hydroxamic acid appendages as novel dual mode anticancer agents. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2015 Apr; 75(4): 691–700.

<https://doi.org/10.1007/s00280-015-2685-z>

Druckexemplar der Originalpublikation 2

Steinemann G, Dittmer A, Kuzyniak W, Hoffmann B, Schrader M, Schobert R, et al. Animacroxam, a novel dual-mode compound targeting histone deacetylases and cytoskeletal integrity of testicular germ cell cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2017;16(11):2364–74.

<https://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-17-0293>

Druckexemplar der Originalpublikation 3

Steinemann G, Dittmer A, Schmidt J, Josuttis D, Fähling D, Biersack B, Beindorff N, Koziolok EJ, Schobert R, Brenner W, Müller T, Nitzsche B und Höpfner M. Antitumor and antiangiogenic activity of the novel chimeric inhibitor animacroxam in testicular germ cell cancer. *Mol Onc.* 2019; 13: 2679-2696.

<https://doi.org/10.1002/1878-0261.12582>

Lebenslauf

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

Publikationsliste

Erstautorenschaften

1. **Steinemann G**, Dittmer A, Schmidt J, Josuttis D, Föhling D, Biersack B, Beindorff N, Koziolok EJ, Schobert R, Brenner W, Müller T, Nitzsche B und Höpfner M. Antitumor and antiangiogenic activity of the novel chimeric inhibitor animacroxam in testicular germ cell cancer. *Mol Onc.* 2019; 13: 2679-2696.

Impact factor: 5.962

2. **Steinemann G**, Dittmer A, Kuzyniak W, Hoffmann B, Schrader M, Schobert R, et al. Animacroxam, a novel dual-mode compound targeting histone deacetylases and cytoskeletal integrity of testicular germ cell cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2017;16(11):2364–74.

Impact factor: 5.764

3. **Steinemann G**, Jacobsen C, Gerwing M, Hauschild J, Amsberg G Von, Höpfner M, et al. Activity of nintedanib in germ cell tumors. *Anti-Cancer Drug.* 2016; 27(2): 89–98.

Impact factor: 2.268

Ko-Autorenschaften

1. Mahal K, Schrufer S, **Steinemann G**, Rausch F, Schobert R, Biersack B, et al. Biological evaluation of 4,5-diarylimidazoles with hydroxamic acid appendages as novel dual mode anticancer agents. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2015 Apr; 75(4): 691–700.

Impact factor: 2.824

2. Jacobsen C, Oechsle K, Hauschild J, **Steinemann G**, Spath B, Bokemeyer C, et al. Regulation of tissue factor in NT2 germ cell tumor cells by cisplatin chemotherapy. *Thromb Res.* Elsevier Ltd; 2015; 136(3): 673–81.

Impact factor: 2.230

3. Kuzyniak W, Ermilov EA, Atilla D, Gürek AG, Nitzsche B, Derkow K, Hoffmann B, **Steinemann G**, Ahsen V, Höpfner M. Tetra-triethyleneoxysulfonyl substituted zinc phthalocyanine for photodynamic cancer therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2016 Mar; 13: 148-57.

Impact factor: 2.412

4. Kuzyniak W, Schmidt J, Glac W, Berkholtz B, **Steinemann G**, Hoffmann B, Ermilov EA, Gürek AG, Ahsen V, Nitzsche B, Höpfner M. Novel zinc phthalocyanine as a promising photosensitizer for photodynamic treatment of esophageal cancer. *Int J Oncol.* 2017; 50(3): 953-963.

Impact factor: 3.079

5. Schmidt J, Kuzyniak W, Berkholtz J, **Steinemann G**, Ogbodu R, Hoffmann B, et al. Novel zinc- and silicon-phthalocyanines as photosensitizers for photodynamic therapy of cholangiocarcinoma. *Int J Mol Med.* 2018;42(1):534–546.

Impact factor: 2.341

Kurzveröffentlichungen

1. **G. Steinemann**, B. Nitzsche, B. Hoffmann, W. Kuzyniak, K. Mahal, B. Biersack, AR. Pries, M. Höpfner. 'Evaluation of newly developed histone deacetylase inhibitors for the treatment of solid tumors'. Experimental Biology (EB 2015), Boston, USA, 28 March - 1 April 2015.
Journal: FASEB Journal

Impact factor: 5.043

2. **G. Steinemann**, S. Broszeit, J. Ologge, B. Nitzsche, B. Hoffmann, W. Kuzyniak, B. Biersack, M. Höpfner. Evaluation of Animacroxam, a newly developed dual-mode compound for the treatment of testicular germ cell cancer. The 95th Annual Meeting of the German Physiological Society, Lübeck, Germany, 3 - 5 March 2016.
Journal: Acta Physiologica
Impact factor: 4.382

Kongressbeiträge/Poster

1. **Steinemann G**, Nitzsche B, Hoffmann B, Kuzyniak W, Mahal K, Biersack B, Pries AR, Höpfner M. Evaluation of Newly Developed HDAC Inhibitors for the Treatment of Testicular Germ Cell Tumors. Experimental Biology (EB 2015), Boston, USA, 28 March - 1 April 2015.
2. Kuzyniak W, Ermilov E, Atilla D, Gürek A, Nitzsche B, Derkow K, Hoffmann B, **Steinemann G**, Pries AR, Ahsen V, Höpfner M. Tetra-triethyleneoxysulfonyl substituted zinc phthalocyanines are promising new photosensibilisators for cancer treatment with Photodynamic Therapy (PDT). Experimental Biology (EB 2015), Boston, USA, 28 March - 1 April 2015.
3. Heucke N, **Steinemann G**, Kuzyniak W, Hoffmann B, Höpfner M. Evaluation of the new HDAC Inhibitor Ethyl-Animacroxam-Gold for the Treatment of Testicular Germ Cell Tumours. 26th European Students` Conference, Charité Berlin, Berlin, Germany, 23 – 26 September 2015.
4. Tsotsas N, Kuzyniak W, **Steinemann G**, Hoffmann B, Nitzsche B, Höpfner M. Photodynamic therapy with a novel zinc phthalocyanine photosensitizer inhibits growth and induces apoptosis in esophageal carcinoma cells. 26th European Students` Conference, Charité Berlin, Berlin, Germany, 23 – 26 September 2015.
5. **Steinemann G**, Broszeit S, Ologge J, Nitzsche B, Hoffmann B, Kuzyniak W, Biersack B, Höpfner M: Evaluation of a newly developed dual-mode compound animacroxam for the treatment of testicular germ cell tumors. The 95th Annual Meeting of the German Physiological Society, Lübeck, Germany, 3 - 5 March 2016.
6. Kuzyniak W, Berkholz J, Hoffmann B, Nitzsche B, **Steinemann G**, Schmidt J, Glac W, Ahsen V, Ermilov E, Höpfner M. Novel zinc phthalocyanine as a promising photosensitizer for photodynamic therapy of esophageal cancer. The 95th Annual Meeting of the German Physiological Society, Lübeck, Germany, 3 - 5 March 2016.
7. **Steinemann G**, Dittmer A, Cramer A, Nitzsche B, Hoffmann B, Kuzyniak W, Höpfner M. A new histone deacetylase inhibitor for targeted therapy of testicular germ cell cancer. The 96th Annual Meeting of the German Physiological Society, Greifswald, Germany, 16 - 18 March 2017.

Danksagung

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Michael Höpfner für seine herausragende Betreuung über die Jahre bedanken. Durch sein Vertrauen und seine Geduld habe ich die Gelegenheit bekommen, in die Welt der wissenschaftlichen Forschung einzutauchen.

Ich möchte mich bei Frau Dr. Bianca Nitzsche als meiner Zweitbetreuerin für ihre Unterstützung, gerade bei der Weiterentwicklung des CAM Assays, und ihr stetiges Interesse an meiner Arbeit bedanken.

Ein großes Dankeschön gebührt auch der FAZIT-Stiftung sowie der Nachwuchsförderung der Charité Berlin, die mir als erstem Ruth-Jeschke-Stipendiaten finanziell diese Promotion ermöglicht haben.

Ein herzliches Dankeschön an Weronika Karle, Björn Hoffmann, Janine Berkholz, Jacob Schmidt sowie all meine Kolleginnen und Kollegen des Institutes für Physiologie für ihr Vertrauen und ihre Unterstützung in den schönen und schweren Momenten dieser Promotion und darüber hinaus.

Ich möchte mich bei meiner Familie, meinen Freundinnen und Freunden für ihre Unterstützung, gerade in den schwierigen Momenten dieser Arbeit, herzlichst bedanken.

Zuletzt möchte ich mich bei Elena bedanken für ihr grenzenloses Vertrauen in mich und meine Arbeit, ohne die diese Promotion nicht zustande gekommen wäre.