

**Viability of Glioblastoma Cells and Fibroblasts in the Presence of  
Imidazole-Containing Compounds**

**Zellvitalität von Glioblastomzellen und Fibroblasten in Anwesenheit von  
imidazolhaltigen Stoffen**

**Dissertation**

**zur Erlangung des akademischen Grades**

**Dr. med.**

**an der Medizinischen Fakultät  
der Universität Leipzig**

**eingereicht von:**

**Elisabeth Christiane Seidel**

**Geburtsdatum/ Geburtsort:**

**05.01.1993/ Leipzig**

**angefertigt an der:**

**Universitätsklinik Leipzig**

**Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie**

**Betreuer:**

**Prof. Dr. rer. nat. Frank Gaunitz**

**Prof. Dr. med. Jürgen Meixensberger**

**Beschluss über die Verleihung des Doktorgrads vom: 21.11.2023**

# Inhaltsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abkürzungsverzeichnis .....   | 3  |
| Das Glioblastom.....  | 5  |
| Epidemiologie von Krebserkrankungen .....   | 5  |
| Epidemiologie des Glioblastoms .....  | 5  |
| Klinische Präsentation und Diagnostik .....   | 6  |
| Klassifizierung des Glioblastoms .....  | 6  |
| Standardtherapie des Glioblastoms .....   | 8  |
| Prognose des Glioblastoms .....   | 9  |
| Zukünftige Therapieoptionen des Glioblastoms .....  | 9  |
| Carnosin.....   | 11 |
| Entdeckung und Vorkommen von Carnosin.....  | 11 |
| Metabolismus von Carnosin.....  | 11 |
| Biologische Funktionen von Carnosin .....   | 12 |
| Physiologische Rolle von Carnosin .....   | 13 |
| Carnosin und Krebserkrankungen .....  | 14 |
| Einfluss von Carnosin auf den Energiemetabolismus maligner Zellen.....                                  | 14 |
| Einfluss von Carnosin auf Signalkaskaden und Genexpression maligner Zellen .....                        | 15 |
| Einfluss von Carnosin auf die Apoptose .....  | 15 |
| Einfluss von Carnosin auf den Zellzyklus .....  | 16 |
| Carnosin als Additiv zur konventionellen Tumorthherapie.....  | 16 |
| Carnosinderivate, L-Histidin und Imidazol .....   | 17 |
| Carnosinderivate .....  | 17 |
| L-Histidin und Imidazol.....  | 17 |
| Ziele der Arbeit.....   | 19 |
| Publikation.....  | 20 |
| Viability of Glioblastoma Cells and Fibroblasts in the Presence of Imidazole-Containing Compounds ..... | 21 |

|  |    |
|--|----|
| Anhang .....   | 34 |
| Zusammenfassung der Arbeit .....                           | 48 |
| Literaturverzeichnis .....                                 | 52 |
| Abbildungsverzeichnis.....                                 | 67 |
| Darstellung des eigenen Beitrags .....                     | 68 |
| Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit..... | 69 |
| Lebenslauf .....   | 70 |
| Veröffentlichungen.....                                    | 72 |
| Danksagung .....   | 74 |

## Abkürzungsverzeichnis

|                   |  |
|-------------------|--|
| AGEs              | <i>Advanced Glycation Endproducts</i><br>(nicht-enzymatisch glykosylierte Proteine und Lipide)         |
| ATP               | Adenosintriphosphat  |
| ATPGD1 (= CARNS1) | <i>ATP-Grasp-Domain-Containing Protein 1</i><br>(Carnosinsynthase 1)                                   |
| CDKs              | <i>Cyclin Dependent Kinases</i><br>(zyklinabhängige Kinasen)   |
| CKIs              | <i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor</i><br>(zyklinabhängige Kinaseinhibitorproteine)                  |
| CNDP 1/ 2         | <i>Carnosine Dipeptidase 1/ 2</i><br>(Carnosindipeptidase 1/ 2)  |
| CTB               | Cell Titer Blue®   |
| CTG               | Cell Titer Glow®   |
| d                 | <i>day</i><br>(Tag)  |
| DNS               | Desoxyribonukleinsäure   |
| EGFR              | <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i><br>(epidermaler Wachstumsfaktor)                               |
| EGFRvIII          | <i>Epidermal Growth Factor Receptor Variant III</i><br>(Variante III des epidermalen Wachstumsfaktors) |
| G 1/ 2-Phase      | <i>Gap-Phase 1/ 2</i><br>(Wachstumsphase 1/ 2)   |
| Gy                | Gray   |
| HIF $\alpha$      | <i>Hypoxia Inducible Factor 1<math>\alpha</math></i><br>(Hypoxie induzierbarer Faktor 1 $\alpha$ )     |
| IDH               | Isocitratdehydrogenase   |
| kg                | Kilogramm  |
| kHz               | Kilohertz  |
| M-Phase           | Mitosephase (bei Keimzellen: Meiosephase)  |
| m <sup>2</sup>    | Quadratmeter   |
| mg                | Milligramm   |
| MGMT              | O <sup>6</sup> -Methylguanin-DNS-Methyltransferase   |
| mM                | Milimolar  |

|         |   |
|---------|---|
| mmol    | Milimol   |
| mTOR    | <i>Mechanistic Target of Rapamycin</i><br>(Ziel des Rapamycins im Säugetier)                |
| mTORc   | <i>Mechanistic Target of Rapamycin Complex</i><br>(Zielkomplex des Rapamycins im Säugetier) |
| NEC     | <i>not elsewhere classified</i><br>(nicht anders klassifiziert)                             |
| NOS     | <i>not otherwise specified</i><br>(nicht anders spezifiziert)                               |
| PD-1    | <i>Programmed Cell Death-Protein 1</i><br>(programmiertes Zelltodprotein 1)                 |
| pKs     | negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante  |
| pH      | pH-Wert; potentia hydrogenii  |
| S-Phase | Synthese-Phase  |
| USA     | <i>United States of America</i><br>(Vereinigte Staaten von Amerika)                         |
| VEGF    | <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i><br>(Wachstumsfaktor von vaskulärem Endothel)      |
| WHO     | <i>World Health Organisation</i><br>(Weltgesundheitsorganisation)                           |
| ZNS     | Zentrales Nervensystem  |

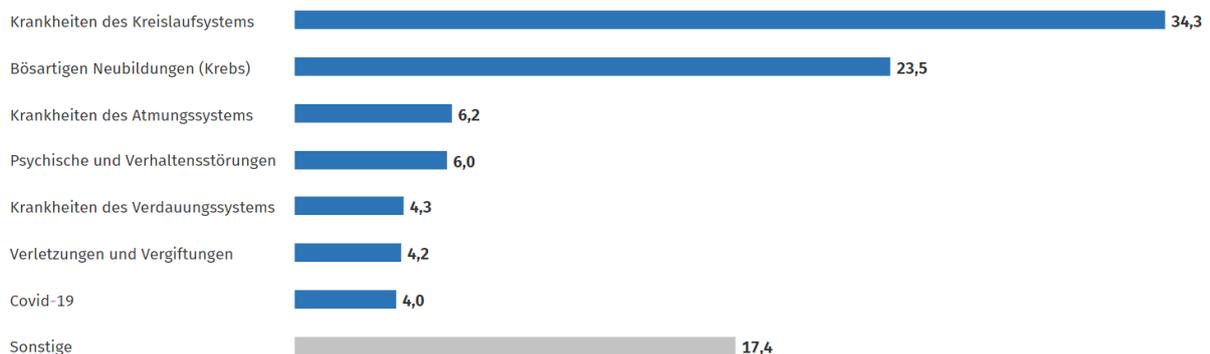
# Das Glioblastom

## Epidemiologie von Krebserkrankungen

2020 verstarben in Deutschland 985.572 Menschen, von denen knapp ein Viertel einer malignen Tumorerkrankung erlag (siehe Abbildung 1). Die bösartigen Neubildungen rangieren damit hinter den kardiovaskulären Erkrankungen auf Platz zwei der häufigsten Todesursachen [1,2]. In den letzten Jahrzehnten wurde mit der Intensivierung von Präventionsprogrammen, der Verbesserung von Screeningmethoden, der Weiterentwicklung der medizinischen Versorgung sowie neuer Behandlungsstrategien eine Senkung der altersspezifischen Mortalitätsraten für viele Krebserkrankungen erreicht [3]. Dennoch existieren für einige Tumorentitäten weiterhin keine zufriedenstellenden Therapien. Hierzu zählt unter anderem das Glioblastom, das sich durch eine schlechte Prognose mit einer medianen Überlebenszeit von 14,6 Monaten auszeichnet [4].

**Todesursachen nach Krankheitsarten 2020**

in %



© Statistisches Bundesamt (Destatis), 2022

**Abbildung 1: Todesursachen in Deutschland bezogen auf das Jahr 2020 in %, entnommen [5]**

## Epidemiologie des Glioblastoms

Maligne Tumoren des zentralen Nervensystems (ZNS) können sowohl das Gehirn als auch das Rückenmark betreffen. Die malignen Gliome sind mit einem Anteil von etwa 80% die häufigsten hirneigenen Malignome. Hierzu zählen Ependymome, Oligodendrogliome, Astrozytome und das Glioblastom [6,7]. Es ist der häufigste primäre maligne Hirntumor und erreicht in den USA eine altersadjustierte Prävalenz von 9,23/ 100.000 Einwohnern, wobei diese in Abhängigkeit von Geschlecht und Ethnie differieren kann [8]. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei etwa 65 Jahren [9]. Als einzig validen Risikofaktor für das Auftreten eines Glioblastoms wurde ionisierende Strahlung im Kopf-Hals-Bereich identifiziert [10]. In Ausnahmefällen tritt das Glioblastom aber auch im Rahmen hereditärer Syndrome auf [6,10].

## Klinische Präsentation und Diagnostik

Die klinische Präsentation von Glioblastomen ist sehr variabel. Sie hängt im Wesentlichen von ihrer Lokalisation und den entsprechenden Funktionen der betroffenen Hirnareale ab. Darüber hinaus können Symptome, die mit erhöhtem Hirndruck assoziiert sind, auftreten. Dazu gehören Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen und Vigilanzstörungen. Neben einer gründlichen Anamnese bezüglich der Symptome sowie deren Entwicklung und einer klinischen Untersuchung kommt der zerebralen Bildgebung besondere Bedeutung zu. In der Regel erfolgen eine native und eine kontrastmittelgestützte Magnetresonanztomographie des Gehirns. Klassischerweise kommt eine Raumforderung mit ringförmiger Kontrastmittelanreicherung zur Darstellung (siehe Abbildung 2) [6]. Zur endgültigen Diagnosesicherung und Erstellung eines Therapiekonzeptes ist eine histologische Untersuchung des Tumorgewebes notwendig, die entweder als stereotaktische Biopsie oder im Rahmen einer in therapeutischer Intention durchgeführten Resektion erfolgen kann [11].

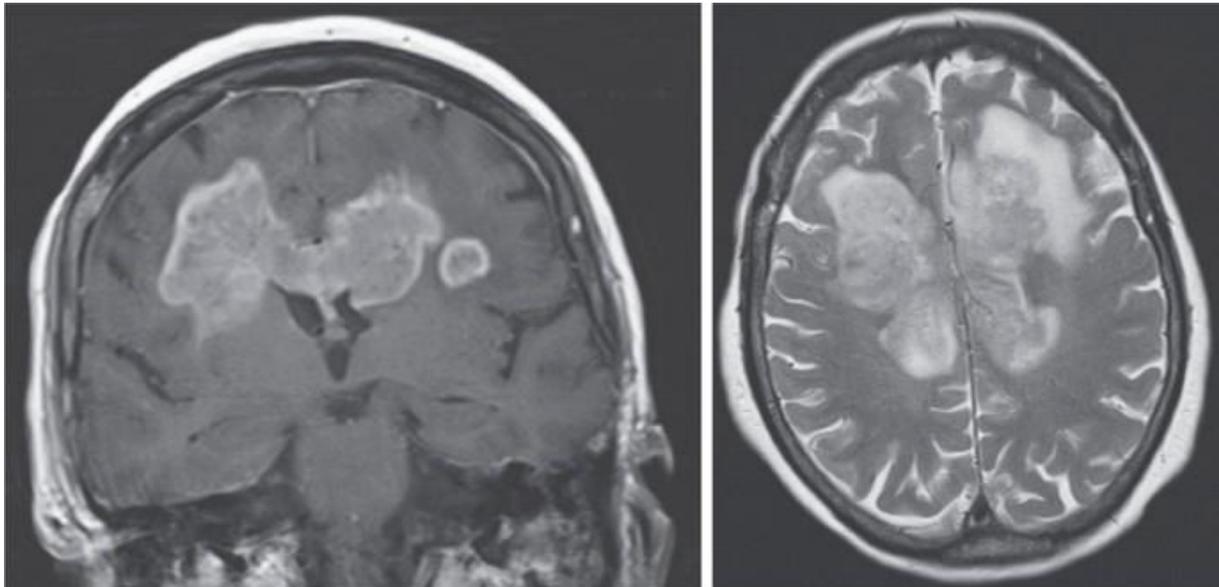


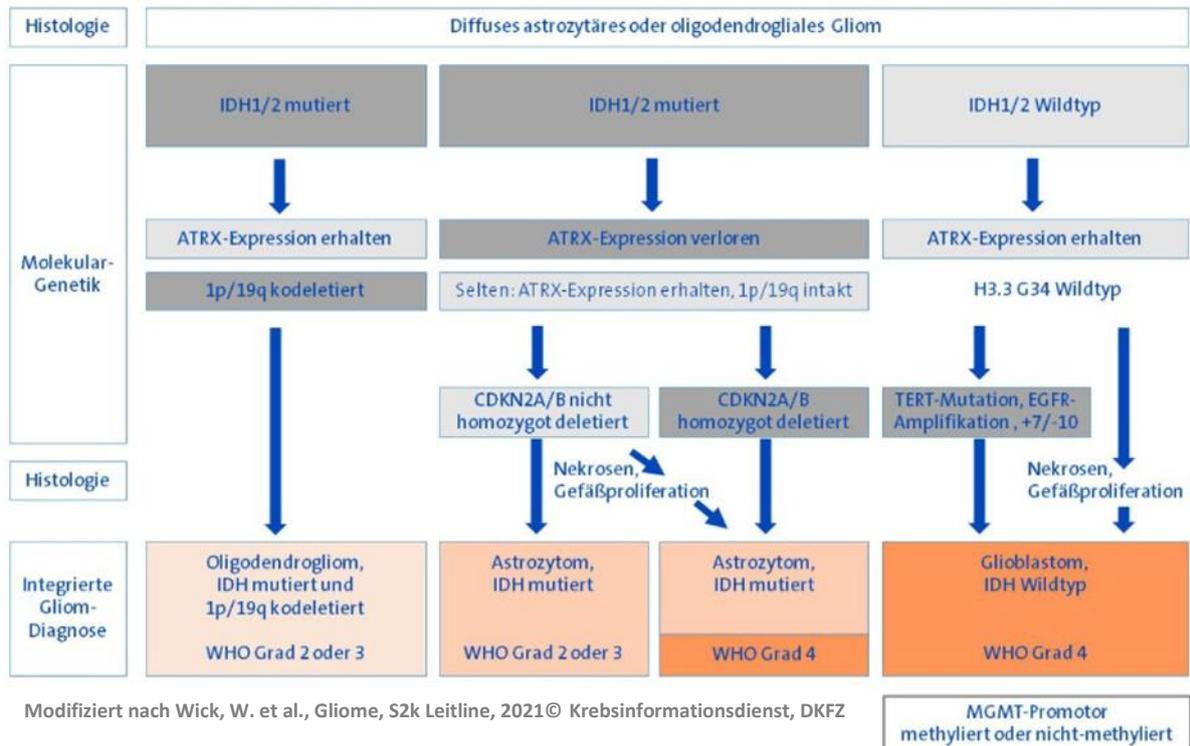
Abbildung 2: „Schmetterlingsglioblastom“ in der Magnetresonanztomographie des Gehirns, rechts kontrastmittelgestützte T1-Wichtung mit typischer randförmiger Kontrastmittelanreicherung, links hyperintense Darstellung des Tumors in der T2-Wichtung, entnommen [12]

## Klassifizierung des Glioblastoms

Zusammen mit den Oligodendrogliomen und den Astrozytomen zählt das Glioblastom zu den diffusen Gliomen. Histologisch ist es durch zellreiche, schlecht differenzierte Gliazellen mit Kernatypien, mitotischer Aktivität, mikrovaskulärer Proliferation und/ oder Nekrosen gekennzeichnet. In der 2016 erschienenen vierten Auflage der WHO-Klassifikation von Tumoren des ZNS hielten neben histomorphologischen Charakteristika erstmals genetische Veränderungen Einzug in die Einteilung der diffusen Gliome, deren Bedeutung in der fünften Auflage von 2021 nochmals

deutlich gestärkt wurde [7,13,14]. Es entsteht somit eine integrierte Diagnose bestehend aus Graduierung, histologischer und molekularer Diagnostik. Hierdurch soll die Diagnosestellung von sogenannten „Mischtumoren“ vermieden werden. Zudem soll die Unterscheidung histologisch ähnlich erscheinender Tumore, die aber verschiedene biologische Merkmale besitzen, erleichtert werden. Erstmals ist die Diagnose eines Glioblastoms allein über eine typische genetische Signatur möglich, auch wenn die klassischen histologischen Charakteristika fehlen [13]. Wie bereits in der vierten Auflage der WHO-Klassifikation kommt dem Nachweis von Mutationen in den Isocitratdehydrogenase-Genen 1 und 2 (*IDH 1* und *2*) eine zentrale Bedeutung in der Diagnostik zu. Bei Nachweis einer IDH-Mutation erfolgt die Zuordnung über weitere molekulargenetische und histologische Marker entweder zu den Oligodendrogliomen oder den Astrozytomen. Für die Diagnose eines Glioblastoms hingegen ist der Nachweis eines IDH- und Histon-H3-G34-Wildtypgens Voraussetzung (siehe Abbildung 3). Analog zu den Tumoren anderer Organsysteme erfolgt weiterhin eine Präzisierung der Diagnose anhand der Aggressivität des Tumorwachstums in vier Gruppen (Grad 1-4), wobei durch die Bezeichnung ZNS-WHO-Grad zusätzlich die prognostische Wertigkeit der Graduierung im Fall der Gliome Beachtung finden soll. Sollte trotz umfangreicher Diagnostik eine klare Zuordnung zu einem Tumor(sub-)typ nicht möglich sein, wird die Diagnose um den Zusatz „NEC“ („not elsewhere classified“) ergänzt. Der Zusatz „NOS“ („not otherwise specified“) hingegen wird verwendet, wenn eine molekulargenetische Diagnostik nicht oder nicht in ausreichendem Umfang erfolgte [13,14].

## Diffuse Gliome vom Erwachsenentyp 2021



Modifiziert nach Wick, W. et al., Gliome, S2k Leitlinie, 2021© Krebsinformationsdienst, DKFZ

Legende: IDH: Isocitratdehydrogenase-Gen, ATRX: Alpha Thalassemia/ mental Retardation Syndrome X-linked, 1p/ 19q: kodeletierter Verlust des kurzen Arms des Chromosom 1 und des langen Arms von Chromosom 19, H3.3 G34-Wildtyp: Histon 3.3, Aminosäure Glycin an Position 34 nicht ausgetauscht, CDKN2A/ B: Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A/ B-Gen, TERT: Telomerase Reverse Transkriptase-Gen, EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor Gen, +7/ -10: Trisomie 7 und Monosomie 10, WHO: World Health Organisation, MGMT: O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase, Farbkodierung Molekulargenetik Hellgrau/ Dunkelgrau: Abwesenheit/ Anwesenheit der wesentlichen molekularen Marker, Farbkodierung Integrierte Gliom-Diagnose Farbtintensität: zunehmend aggressives Tumorwachstum.

Abbildung 3: Einteilung der diffusen Gliome nach Histologie und Mutationsstatus nach der WHO-Klassifikation von 2021, entnommen [15]

## Standardtherapie des Glioblastoms

Eine Verlängerung der medianen Überlebenszeit von 12,1 Monaten auf 14,6 Monate konnte vor allem mit einem Paradigmenwechsel in der Therapie des Glioblastoms im Jahr 2005 erreicht werden. Seitdem besteht die Standardtherapie des neu diagnostizierten Glioblastoms aus der möglichst kompletten operativen Resektion, gefolgt von einer sechswöchigen Temozolomid-basierten Radiochemotherapie (75 mg/m<sup>2</sup>/d Temozolomid für 7 Tage/ Woche + 2 Gy für 5 Tage/ Woche, insgesamt 60 Gy) und einer anschließenden Erhaltungstherapie mit Temozolomid über 6 Zyklen (150-200 mg/m<sup>2</sup> Tag 1-5 aller 28 Tage) [4]. Das Ansprechen auf die Behandlung mit Temozolomid ist über einen molekulargenetischen Biomarker abschätzbar, den Methylierungsstatus des Promotors des *O<sup>6</sup>-Methylguanin-Desoxyribonukleinsäure (DNS)-Methyltransferase (MGMT)-Gens*. Die MGMT repariert DNS-Schäden, wodurch die Wirkung des Chemotherapeutikums abgeschwächt wird. Durch

die Methylierung des MGMT-Promotors wird die Genexpression des Reparaturgens verringert, sodass das Enzym die durch Temozolomid entstehenden DNS-Schäden nicht abschwächen kann und die Tumorzellen auf das Chemotherapeutikum sensibler reagieren [16]. Kürzlich wurde in einer randomisierten, multizentrischen Phase-III-Studie der Einfluss von Tumortherapiefeldern ergänzend zur Temozolomiderhaltungstherapie untersucht. Tumortherapiefelder sind elektrische Wechselfelder mit niedriger Intensität und intermediären Frequenzen um 200 kHz, die über eine Transducerreihe auf der Kopfhaut appliziert werden. Die Behandlung führte zu einer Verlängerung sowohl des progressionsfreien (6,7 Monate vs. 4,0 Monate) als auch des Gesamtüberlebens (20,9 Monate vs. 16,0 Monate) in der Interventionsgruppe ohne eine relevante Zunahme an Nebenwirkungen durch die Therapie [17]. Die Behandlung mit elektrischen Wechselfeldern gehört bisher in Deutschland nicht zur Standardtherapie des Glioblastoms, sollte den Patienten aber nach erfolgter Radiochemotherapie angeboten werden [18].

### **Prognose des Glioblastoms**

Neben dem verbesserten Ansprechen auf die alkylierende Chemotherapie bei Nachweis eines methylierten MGMT-Promotors [16] wirken sich die ethnische Zugehörigkeit zur hispanoamerikanischen Bevölkerungsgruppe, der Karnofsky-Index bei Diagnosestellung, ein jüngeres Erkrankungsalter und eine makroskopisch möglichst komplette Resektion prognostisch günstig auf den Verlauf der Erkrankung aus [7–9,11]. Nichtsdestotrotz bleibt die Prognose mit einer 5-Jahresüberlebensrate von 6,6% und einer 10-Jahresüberlebensrate von nur 4,3% auch bei Ausschöpfung der maximalen Therapie äußerst ungünstig [6]. Dabei stellt das unausweichliche Auftreten von meist therapieresistenten Rezidiven die größte Herausforderung für die Behandelnden dar, da in diesem Fall derzeit effektive Strategien in der Behandlung fehlen [19].

### **Zukünftige Therapieoptionen des Glioblastoms**

Das wachsende Verständnis in der Pathogenese von Krebserkrankungen im Allgemeinen und der Entstehung von malignen Gliomen im Speziellen hat zu dem Bestreben beigetragen, Tumortherapien selektiver und individueller zu gestalten [20–23]. Die Erforschung neuer Therapien rund um maligne Gliome umfasst derzeit alternative Applikations- und Darreichungsformen konventioneller Chemotherapeutika, zielgerichtete Therapien („targeted therapies“), Immun- und Gentherapien sowie die Kombination der genannten Therapiestrategien [21,24–27]. Im Folgenden werden ausgewählte Therapieansätze dargestellt.

Da das Glioblastom zu den am besten vaskularisierten Tumoren zählt [28], wurden Medikamente mit antiangiogenetischen Wirkungen untersucht. Bevacizumab (Avastin®), ein *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)-Inhibitor, findet in der Behandlung rezidivierender Glioblastome in einigen Ländern Anwendung (Zulassung nur außerhalb der Europäischen Union) [29,30]. Einzelne Studien

zeigten eine Verlängerung des medianen progressionsfreien Überlebens bei Patienten mit einem Glioblastomrezidiv, aber keine Verlängerung des medianen Gesamtüberlebens [18,29,31]. Diese Ergebnisse wurden jedoch aufgrund der Unzuverlässigkeit der Progressionsbeurteilung in der Magnetresonanztomographie infrage gestellt [18,32,33]. In bestimmten Fällen hat die Anwendung von Bevacizumab dennoch seine Berechtigung z. B. zur Senkung der Symptomlast und zur Einsparung von Steroiden bei großen und raumfordernden Tumoren [11]. Andere antiangiogenetische Medikamente waren Bevacizumab hinsichtlich des progressionsfreien- und des medianen Gesamtüberlebens nicht überlegen [24,34,35].

Das wachsende Feld der Immuntherapien in der Behandlung von Krebserkrankungen umfasst passive und aktive Immuntherapien [21,25]. Vielversprechende Ergebnisse zeigten erste (klinische) Studien mit Impfungen, die gegen tumorspezifische oder tumorassoziierte Antigene gerichtet sind wie beispielsweise mit dem Peptidimpfstoff Rindopepimut (CDX-110), der sich gegen die neu entstandene Exon 1-8 Verbindung der *Epidermal Growth Factor Receptor Variant III* (EGFRvIII)-Mutation richtet [36], und DC Vax<sup>®</sup>-L, einem autologen, Tumorlysat-gepulsten, dendritischen Zellimpfstoff [37]. Trotz umfangreicher Forschung fanden beide Substanzen bisher keinen Einzug in die klinische Praxis [36–39]. Immuncheckpoint-Inhibitoren, die die immunologische Eigentoleranz modifizieren, verbessern die Prognose auch sonst schlecht zu therapierender Tumoren [40,41]. Im Falle von neu diagnostizierten Glioblastomen war Nivolumab, ein *Programmed Cell Death Protein 1* (PD-1)-Immuncheckpoint-Inhibitor, Temozolomid in einer randomisierten, open-label Phase 3 Studie jedoch nicht überlegen [11].

Glioblastome können zahlreiche genetische Alterationen aufweisen [42], die Ansatzpunkte für zielgerichtete Therapien („targeted therapies“) darstellen. Viele der untersuchten Präparate verfehlten jedoch in klinischen Studien die erhofften Effekte auf Gesamt- bzw. progressionsfreies Überleben [26]. Für die hohe Rate an Therapieresistenzen wurde die interindividuelle aber auch intratumorale Heterogenität des Glioblastoms von verschiedenen Autoren als Ursache in Betracht gezogen [7,20,22,43]. Obgleich zahlreiche klinische Studien die primären Endpunkte nicht erzielten, ergaben sich wiederholt Indizien, dass molekulare Subgruppen in den untersuchten Patientenpopulationen von den jeweils getesteten Therapien profitieren könnten [20,44–46]. Vor dem Einschluss in klinische Studien erscheint daher die Identifizierung molekularer Subgruppen sinnvoll, um der Heterogenität der Glioblastome Rechnung zu tragen [20,25]. Das Vorhandensein sogenannter stammzellähnlicher Tumorstammzellen bietet eine weitere Erklärung für das geringe Ansprechen auf die Standardtherapien [47–49]. Erste experimentelle Daten weisen jedoch darauf hin, dass sich Tumorstammzellen zwar resistent gegenüber konventionellen Chemotherapeutika verhalten, aber das Ziel gerichteter molekularer Therapien sein könnten [47].

# Carnosin

## Entdeckung und Vorkommen von Carnosin

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts gelang es dem russischen Forscher W. Gulewitsch erstmals, ein natürlich vorkommendes Peptid zu isolieren [50]. Es bekam den Namen Carnosin (lateinisch carno, carnis für Fleisch), abgeleitet von seiner Isolierung aus „Liebig's Fleischextrakt“. Carnosin ist ein Dipeptid bestehend aus den Aminosäuren L-Histidin und  $\beta$ -Alanin in einer  $\beta$ -Alanyl-L-Histidin-Bindung (siehe Abbildung 4) [51,52].<sup>1</sup>

Das Dipeptid kommt in verschiedenen Spezies bis hin zum Menschen vor [56,57]. Die höchsten Carnosinkonzentrationen wurden bei Säugetieren im Muskelgewebe gefunden [58]. Messungen im *Musculus quadriceps femoris* gesunder Probanden ergaben Werte zwischen  $17,5 \pm 4,8$  mmol pro kg Trockenmasse bei Frauen und  $21,3 \pm 4,2$  mmol pro kg Trockenmasse bei Männern [59]. Größere Carnosinmengen zeigten sich zudem in spezifischen Gehirnregionen wie dem *Bulbus olfactorius* [60,61].

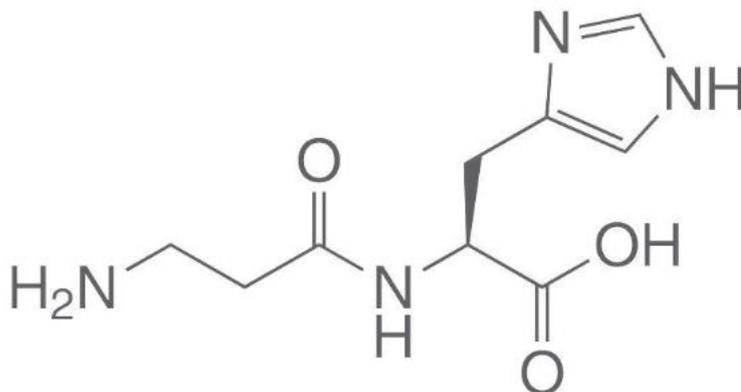


Abbildung 4: Strukturformel des Dipeptids L-Carnosin, entnommen [62]

## Metabolismus von Carnosin

Im Organismus wird die Synthese des Dipeptids durch ein spezifisches Enzym, die Carnosinsynthase (EC 6.3.2.11), katalysiert [63]. Diese zeichnet sich durch eine breite Substratspezifität aus und ist daher in der Lage, neben Carnosin beispielsweise auch die Carnosinderivate Anserin und Homocarnosin zu synthetisieren [63–65]. Die Carnosinsynthase (CARNS1) ist ein Mitglied der

<sup>1</sup> Neben L-Carnosin existiert mit D-Carnosin (=  $\beta$ -Alanyl-D-Histidin) ein Enantiomer, welches ähnliche Eigenschaften besitzt [53,54]. Aus Gründen der Übersichtlichkeit und da D-Carnosin keine antiproliferativen Eigenschaften aufweist [55], wird in der Folge darauf nicht weiter eingegangen. Wenn nicht anders gekennzeichnet, beziehen sich alle im Verlauf genannten Aussagen auf das L-Enantiomer.

Adenosintriphosphat (ATP)-Grasp-Superfamilie, weshalb sie auch als *ATP-Grasp Domain-Containing Protein 1* (ATPGD1) bezeichnet wird. Sie benötigt für die enzymatische Aktivität neben ATP auch Magnesium-Ionen [64,66–68]. Ihr Nachweis gelang in einer Reihe von Geweben: Oligodendrocyten [69], Nierenglomeruli und -tubuli [70], umhüllenden Zellen des *Bulbus olfactorius* [71] und Skelettmuskelzellen [63,64]. Auf subzellulärer Ebene ist das Enzym vermutlich im Cytosol lokalisiert [72].

Die Position der  $\beta$ -Alanin-Aminogruppe in der Struktur des Dipeptids verhindert die Spaltung Carnosins durch gewöhnliche Dipeptidhydrolasen [73]. 1949 isolierten Hanson und Smith erstmals ein spezifisches Enzym für den Abbau von Carnosin aus Schweinenieren [74]. Heute werden zwei verschiedene Dipeptidasen unterschieden: die Carnosinase 1 (EC 3.4.13.20) und die Carnosinase 2 (EC 3.4.13.18) [75–77]. Beide gehören der Familie der M20/ M28-Metalloproteasen an und werden von zwei unterschiedlichen Genen, *CNDP1* und *CNDP2*, kodiert [77]. Die Carnosinase 1, auch Serumcarnosinase genannt, findet sich nur bei wenigen Spezies - unter anderem dem Menschen [75,78]. Außer im Serum lässt sie sich im Gehirn und im Liquor nachweisen. Die weiterhin vorkommende Carnosinase 2 wurde ehemals als Gewebescarnosinase bezeichnet, da sie zwar nicht im Blut, dafür aber innerhalb vieler Gewebe (beispielsweise Niere, Leber, Gehirn, Plazenta, Herz, Skelettmuskulatur, Milz) lokalisiert werden konnte [76,79]. Heute wird sie als cytosolische nicht spezifische Dipeptidase designiert [77,80]. Dem zugrunde liegt die Erkenntnis, dass die Carnosinase 2 eine Reihe von Dipeptiden hydrolysieren kann [76,81], Carnosin jedoch optimal nur bei einem (unphysiologischen) pH-Wert von 9,5 spaltet [76,77,80]. Nichtsdestotrotz ergaben sich in Experimenten Anhaltspunkte, dass die cytosolische nicht spezifische Dipeptidase auch bei niedrigeren pH-Werten (pH = 7,2 und pH = 8,0) enzymatische Aktivität besitzt und Carnosin möglicherweise sehr langsam unter physiologischen Bedingungen spaltet [76,82]. Einen aktuellen und ausführlichen Überblick über die Carnosinasen geben Bellia *et al.* [83].

## **Biologische Funktionen von Carnosin**

Aufgrund der hohen Konzentrationen des Dipeptids im Muskelgewebe und im Gehirn wurde ein physiologischer Bezug zu diesen beiden Geweben vermutet und untersucht. Bereits 1938 schrieb E.C.B. Smith Carnosin aufgrund des pKs-Wertes von 6,5-7,5 puffernde Eigenschaften in der Muskulatur von Säugetieren zu [84]. Mit dem 1953 postulierten „Severin-Phänomen“ wurde eine Verminderung der Muskeler schöpfung bei anhaltender Kontraktion durch die Zugabe von Carnosin in das umgebende Medium isolierter Froschmuskeln beschrieben [85]. Weiterhin wurde eine Steigerung der Calciumsensitivität kontraktile Proteine sowohl im Skelett- als auch im Herzmuskel unter Carnosin *in vitro* nachgewiesen [86,87]. Als Korrelat zur Beeinflussung der Kontraktilität im Muskelgewebe scheint Carnosin im *Bulbus olfactorius* an der Informationsübermittlung im Sinne

eines Neurotransmitters bzw.-modulators teilzunehmen [88–90].

Neben den gewebspezifischen Funktionen wurden Carnosin vor allem protektive Eigenschaften zugewiesen wie beispielsweise die Reduktion von Proteinmodifikationen durch Malondialdehyd, Hypochlorit [91] und Methylglyoxal [92,93] sowie die Verhinderung der Protein-Cross-Link-Bildung [91,94] und der Bildung von Carbonylgruppen in Proteinen [95]. Weiterhin wirkt es als Aldehydfänger und verhindert damit die nicht-enzymatische Glykosylierung und Entwicklung von Advanced Glycation Endproducts (AGEs) [94,96,97]. In seiner Funktion als Antioxidans reduziert Carnosin sowohl oxidativen [98] als auch nitrosativen Stress [99]. Ebenso fungiert es als effektiver Radikalfänger vor allem Hydroxyl-Radikalen gegenüber [100,101]. Zudem besitzt Carnosin die Eigenschaft, Komplexe mit Metallionen wie etwa Zink, Cobalt oder Kupfer zu bilden [102].

### **Physiologische Rolle von Carnosin**

Aufgrund seiner protektiven und die Homöostase erhaltenden Funktionen wurde Carnosin wiederholt als Therapeutikum oder Additiv zu etablierten Therapien diskutiert. In Gegenwart des Dipeptids zeigten sich beispielsweise immunmodulatorische [103], inotrope [86] sowie antiischämische Effekte [104–106].

Verschiedene Arbeitsgruppen beobachteten eine Reduktion diabetischer Folgekomplikationen wie der diabetischen Nephropathie und der diabetischen Retinopathie durch Carnosin [107–109]. Im Rahmen einer weiteren Studie erhielten Probanden mit Katarakt N-Acetylcarnosin-haltige Augentropfen, wodurch es zu einer Verbesserung des Visus kam [110].

Im Einklang mit seinem Vorkommen im Gehirn erstrecken sich die protektiven Eigenschaften von Carnosin auch auf neurologische Erkrankungen. Boldyrev *et al.* beobachteten ein verbessertes Ansprechen von Parkinsonpatienten auf die L-Dopatherapie, wenn den Patienten zusätzlich Carnosin verabreicht wurde [111]. Preston *et al.* wiesen 1998 die Umkehr der toxischen Wirkungen des  $\beta$ -Amyloids (25-35) an Endothelzellkulturen unter Carnosinzugabe nach und diskutierten Carnosin daher als mögliches Medikament in der Behandlung von Morbus Alzheimer [112]. Die orale Supplementierung von Carnosin führte bei Kindern mit Erkrankungen aus dem Autismusspektrum [113], bei Erwachsenen mit Schizophrenie [114] sowie bei Veteranen, die an der „gulf war illness“ litten [115], zur Verbesserung von Verhalten und kognitiven Fähigkeiten. Innovative Erkenntnisse erlangten Holliday und McFarland, als sie 1994 demonstrierten, dass Carnosin eine Abnahme der seneszenzbedingten morphologischen Veränderungen und sogar Verjüngungseffekte auf humane Fibroblastenkulturen ausübt [116]. In einem darauffolgenden Tierexperiment konnte eine Verlängerung der Lebenszeit für männliche Fruchtfliegen beobachtet werden [117]. Gallant *et al.* untersuchten den Einfluss von Carnosin auf Seneszenzphänomene. Hierzu wurden Mäuse verwendet, die Zeichen eines frühzeitigen Eintritts in die Seneszenz zeigten, welche durch Zuführung von

Carnosin zur Nahrung der Mäuse abgeschwächt werden konnten [117,118]. Für die Wirkung des Dipeptids als Anti-Aging-Agens entstanden verschiedene Hypothesen wie beispielsweise der protektive Einfluss von Carnosin auf altersbedingte DNS-, Protein- und Zellveränderungen [97].

Seit der Entdeckung Carnosins vor etwa 120 Jahren konnten viele Informationen zu seinen Funktionen und Aufgaben gesammelt werden [57,119,120]. Dennoch bleiben zur physiologischen Rolle des Dipeptids bis heute noch viele Fragen offen.

## **Carnosin und Krebserkrankungen**

Der Nachweis, dass Carnosin den Alterungsprozess sowohl in Zellkultur- als auch in Tiermodellexperimenten vermindern bzw. verlangsamen kann, lässt das Dipeptid in den Fokus als mögliches Therapeutikum von verschiedenen mit dem Alter assoziierten Erkrankungen rücken. Mit steigendem Lebensalter zeigt sich auch ein Ansteigen des Auftretens vieler Krebserkrankungen [121]. Umso interessanter ist es daher, dass Carnosin nicht nur Seneszenzmechanismen zu verhindern vermag [116], sondern auch antiproliferative Effekte selektiv auf transformierte Zellen ausübt [55]. Den ersten Nachweis für die antineoplastische Wirkung von Carnosin erbrachten Nagai und Suda bereits 1986 in einem Tiermodell [122]. Bestätigende Experimente veröffentlichten 1996 Holliday und McFarland [55]. Seitdem konnte der antineoplastische Effekt von Carnosin durch verschiedene Forschungsgruppen in Zellkulturexperimenten [123–129] sowie am Tiermodell reproduziert werden [130,131].

Um die möglichen Wirkmechanismen des Dipeptids zu verstehen, ist es sinnvoll, sich vor Augen zu führen, worin sich neoplastische Zellen von differenzierten Zellen unterscheiden. Maligne Tumoren sind durch ein schnelles und invasives Wachstum sowie eine schlechte Abgrenzbarkeit vom umliegenden Gewebe charakterisiert. Histomorphologisch zeichnen sie sich durch Zellpleomorphie und eine hohe mitotische Aktivität aus. Auf molekularer Ebene sind für verschiedene Tumorarten alternative Mechanismen der Energiegewinnung [132] sowie aberrante Signalkaskaden [133–135], die unter anderem das Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Zelltod beeinflussen, beschrieben. Für Carnosin wurden seit der Entdeckung seiner antiproliferativen Eigenschaften verschiedene Wege der Einflussnahme auf das Zellwachstum maligner Zellen beschrieben [136].

## **Einfluss von Carnosin auf den Energiemetabolismus maligner Zellen**

Otto Warburg beobachtete erstmals eine Besonderheit bei der Energiegewinnung von Tumorzellen - den heute nach ihm benannten „Warburg Effekt“: Differenzierte Zellen generieren hiernach den Großteil ihrer Energie über mitochondriale Atmung und oxidative Phosphorylierung und bedienen sich erst bei Sauerstoffmangelzuständen der Glykolyse, um ATP zu produzieren (sogenannte

anaerobe Glykolyse).

Im Gegensatz dazu beziehen Tumorzellen bereits bei ausreichendem Sauerstoffangebot ihre Energie über die Glykolyse, die man in diesem Fall als aerobe Glykolyse bezeichnet [132]. Neben der gezielten Störung der Glykolyse als Therapiestrategie in der Tumorbehandlung [137,138] legen neuere Erkenntnisse die Vermutung nahe, dass die mitochondriale Aktivität ein Schlüssel der schnellen Proliferation einiger maligner Zellen ist [125,139,140]. Experimentelle Daten belegen, dass Carnosin seine antiproliferative Wirkung sowohl über die Hemmung der anaeroben [123,127,128,141,142] als auch der aeroben ATP-Produktion entfalten kann [125,128].

## **Einfluss von Carnosin auf Signalkaskaden und Genexpression maligner Zellen**

Die Identifizierung der verantwortlichen Faktoren für den veränderten Ablauf von Zellproliferation und -differenzierung auf molekularer Ebene bildet die Grundlage für neue Ansatzpunkte im Kampf gegen Krebs. Eine Reihe maligner Tumoren ist durch eine Überexpression des Transkriptionsfaktors *Hypoxia Inducible Factor 1 $\alpha$*  (HIF 1 $\alpha$ ) [133] bzw. veränderte Signale im *Mechanistic Target of Rapamycin* (mTOR) Signalweg [134] gekennzeichnet, weshalb diese in der Literatur häufig als neue Ziele in der Tumorthherapie diskutiert werden.

In Zellkulturexperimenten zeigte Carnosin sowohl in differenzierten als auch in neoplastischen Zellen inhibitorische Effekte auf die HIF 1 $\alpha$ -Expression [124,143,144]. Für die bakterielle Substanz Rapamycin, den natürlich vorkommenden Inhibitor des mTOR Komplexes 1 (mTORC1), wurden unter anderem antineoplastische Wirkungen beschrieben [145]. In der Literatur wurde Carnosin lange als Rapamycinmimetikum diskutiert [146], da experimentelle Daten Parallelen zwischen beiden Stoffen vermuten lassen [126,147]. Allerdings zeigen neuere Arbeiten, dass dies zumindest im Falle der anti-neoplastischen Wirkung auf Glioblastome nicht von Bedeutung ist [148].

## **Einfluss von Carnosin auf die Apoptose**

Der programmierte Zelltod gibt dem Organismus die Möglichkeit, ungehemmtes Zellwachstum zu unterbinden und beschädigte Zellen auszusortieren. Ein Umgehen der Apoptose gehört zu den Charakteristika maligner Zellen und ist einer von vielen Mechanismen, um ihre hohen Proliferationsraten zu erhalten und antiproliferativen Therapien zu entgehen [149,150]. Die antiproliferative Wirkung von Carnosin auf einige Tumorzelllinien wird zumindest teilweise auf die Induktion der Apoptose durch Veränderung der Expression ihrer Regulatorproteine, wie beispielsweise der Verschiebung des Verhältnisses zwischen pro- und antiapoptotischen Faktoren, zurückgeführt [124,126,129].

## **Einfluss von Carnosin auf den Zellzyklus**

Der geordnete Ablauf der Zellvermehrung im Zellzyklus wird durch die zyklinabhängigen Kinasen (CDKs) gewährleistet. Diese werden durch Zyklone gefördert und durch zyklinabhängige Kinaseinhibitorproteine (CKIs) sowie Tyrosinphosphorylierung gehemmt. Der Zellzyklus unterteilt sich in vier Abschnitte: die M-, die G1-, die S- und die G2-Phase [151]. Im Rahmen von Untersuchungen, die der Aufklärung des antineoplastischen Effekts von Carnosin dienen, konnte eine verminderte Transition der Zellen in die S-Phase beobachtet werden. Die Induktion des Zellzyklusarrests wurde daher als möglicher Teilmechanismus der antiproliferativen Wirkung des Dipeptids erwogen [108,126,128,129].

## **Carnosin als Additiv zur konventionellen Tumorthherapie**

Probleme etablierter Tumortherapieregime wie die nebenwirkungsbedingte Einschränkung der Lebensqualität sowie bestehende und aufkommende Resistenzmechanismen der Malignomzellen bedürfen dringend einer Lösung.

Gerade über die oben genannte Reduktion der HIF 1 $\alpha$ -Expression kann vermutet werden, dass Carnosin Einfluss auf die Entwicklung einer solchen Widerstandsfähigkeit nimmt, da die HIF 1 $\alpha$ -Expression häufig mit Chemotherapieresistenzen in Verbindung gebracht wird [124,143,144]. Ebenso wurde der mögliche Einfluss des Dipeptids auf tumortheraPIeassoziierte Nebenwirkungen experimentell untersucht. Durch die perorale Gabe von Polaprezink (= Chelatkomplex aus Zink und Carnosin) konnte sowohl am Tiermodell als auch in einer klinischen Studie ein geringeres Auftreten intestinaler und oraler Mukosiden beobachtet werden [152,153]. Als weitere Einsatzgebiete wurde Carnosin bzw. Polaprezink in der Behandlung der strahlentherapieassoziierten Lungenfibrose [154] und zur Minderung toxischer Effekte von Cisplatin diskutiert [155–157]. Trotz beschriebener radioprotektiver Effekte des Dipeptids [158] kam es bei der Behandlung primärer Glioblastomkulturen mit einer Kombination aus Carnosin, Temozolomid und Bestrahlung nicht zu einer Abschwächung der Wirksamkeit der Therapie. Im Gegenteil führte die Hinzunahme von Carnosin zu einer zusätzlichen Verminderung der Zellvitalität [159]. Möglicherweise könnte Carnosin somit durchaus als Additiv zu einer Radiotherapie zum Schutz intakter Gewebe in Betracht gezogen werden.

Aufgrund der Vielzahl an möglichen Ansatzpunkten des Dipeptids erscheint es plausibel, dass nicht ein Mechanismus allein für die antiproliferativen Eigenschaften verantwortlich ist. Carnosin wurde daher bereits als „smart drug“ erörtert, welches seine Wirkung auf verschiedenen Ebenen entfaltet [136]. Einen ausschnittswEisen Überblick über die möglichen Angriffspunkte des Dipeptids bietet Abbildung 5 [160].

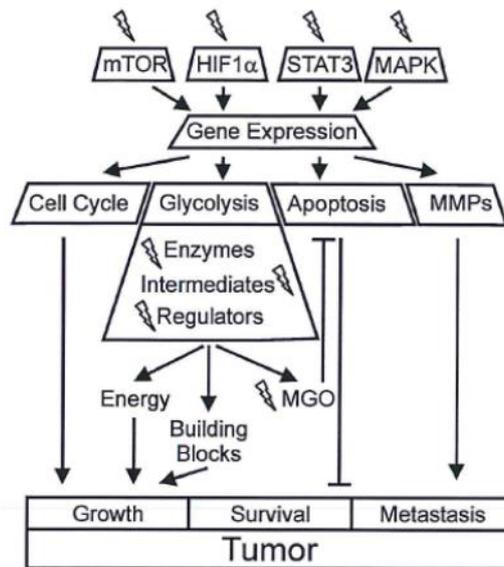


Abbildung 5: Mögliche Ansatzpunkte von Carnosin zur Beeinflussung des Tumorwachstums und des -überlebens sowie der Metastasierung von Tumoren (dargestellt als Blitze), entnommen [136]; mTOR = mechanistic target of rapamycin, HIF1α = hypoxia inducible factor α, STAT3 = signal transducer and activator of transcription 3, MAPK = mitogen-activated protein kinases, MMP = matrix metalloproteinases, MGO = methylglyoxal.

## Carnosinderivate, L-Histidin und Imidazol

### Carnosinderivate

Der Entdeckung von Carnosin folgte die Identifizierung weiterer Derivate. Zu den am besten untersuchten zählen Anserin ( $\beta$ -Alanyl-N1-Methylhistidin) und Homocarnosin ( $\gamma$ -Aminobutyryl-L-Histidin) [73]. Beide besitzen ähnliche biologische Eigenschaften wie Carnosin, zeichnen sich jedoch durch eine höhere Resistenz den Carnosinasen gegenüber aus [81,100]. Diese Beobachtungen bilden die Grundlage für die Entwicklung neuer Derivate, die unter Erhalt der positiven Eigenschaften des Dipeptids bei besserer Bioverfügbarkeit eine therapeutische Option darstellen könnten [161].

### L-Histidin und Imidazol

Ein Großteil der oben genannten Dipeptidfunktionen kann dem L-Histidinanteil zugeschrieben werden [127,162,163]. Für den Menschen ist L-Histidin eine semiessentielle Aminosäure, die vielfältige biologische Aktivitäten aufweist [127,162–166]. Diese werden teilweise auf die funktionelle Gruppe von L-Histidin, einen Imidazolring, zurückgeführt. Der Imidazolring ist eine heterocyclische aromatische Verbindung. Er ist Bestandteil von vielen weiteren biologisch aktiven Substanzen wie beispielsweise Hämoglobin, Vitamin B12 oder DNS. Für Imidazol sind antiinfektive (fungizide, antibakterielle, antituberkulöse, antiparasitäre und antivirale), antihistaminerge, antihypertensive sowie antiinflammatorische Wirkungen beschrieben, weshalb es Bestandteil

verschiedener Medikamente wie zum Beispiel von Clotrimazol oder Lorsartan ist. Die *in vitro* beobachteten antiproliferativen Effekte von imidazolhaltigen Substanzen konnten *in vivo* bestätigt werden, weshalb Imidazolringe bereits in verschiedenen Chemotherapeutika zu finden sind [167,168].

## **Ziele der Arbeit**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte eingehender untersucht werden, ob die antineoplastische Wirkung des Carnosins sich in vergleichbarer Weise beobachten lässt, wenn die Komponenten des Dipeptids einzeln oder in Verbindung mit einer anderen Aminosäure kombiniert vorliegen. Zudem sollte die Frage beantwortet werden, ob Imidazol selbst oder das möglicherweise aus L-Histidin entstehende L-Histamin eine antineoplastische Wirkung zeigen und inwiefern diese mit der Wirkung des Dipeptides verglichen werden kann. Zu diesem Zweck wurden Zelllinien von Glioblastomen und primäre Fibroblastenkulturen als Modell für differenzierte Zellen mit den unterschiedlichen Substanzen inkubiert und ihre Vitalität unter dem Einfluss der Verbindungen mittels zellbasierter Assays bestimmt. Für einen besseren Einblick in die bzw. zum Vergleich der zellulären Prozesse bei Inkubation der Glioblastomzelllinien und der primären Fibroblastenkulturen mit imidazolhaltigen Stoffen wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt und die Gesamtzellzahl, die lebenden Zellen sowie die nekrotischen Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Zudem wurde die intrazelluläre Menge an Carnosin und L-Alanyl-L-Histidin nach Inkubation der oben genannten Zellen im Medium mit diesen Dipeptiden mittels Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung analysiert und bestimmt, inwiefern es in ihrer Anwesenheit und unter dem Einfluss intrazellulärer Peptidasen zu einer Erhöhung der intrazellulären L-Histidin-Menge kommt. Schließlich sollte bestimmt werden, ob die Freisetzung von L-Histidin zu einer Erhöhung der intrazellulären Konzentration von L-Histamin führt.

## Publikation

Titel:

“Viability of Glioblastoma Cells and Fibroblasts in the Presence of Imidazole-Containing Compounds”

Autoren: Elisabeth Christiane Seidel, Claudia Birkemeyer, Rainer Baran-Schmidt, Jürgen Meixensberger, Henry Oppermann\*, Frank Gaunitz\*

\* Diese Autoren haben zu gleichen Anteilen zu der Publikation beigetragen.

Journal: International Journal of Molecular Science

Impact Factor: 6.208

Jahrgang: 23

Ausgabe: 10

Seiten: 12

Eingereicht: 19.04.2022

Akzeptiert: 19.05.2022

Publiziert: 23.05.2022

Quellen: 34

Sprache: Englisch

Verlag: MDPI Open Access Journals

PubMed ID: 35628643

DOI: 10.3390/ijms23105834

## **Viability of Glioblastoma Cells and Fibroblasts in the Presence of Imidazole-Containing Compounds**



Article

# Viability of Glioblastoma Cells and Fibroblasts in the Presence of Imidazole-Containing Compounds

Elisabeth Christiane Seidel<sup>1,2</sup>, Claudia Birkemeyer<sup>3</sup> , Rainer Baran-Schmidt<sup>1</sup>, Jürgen Meixensberger<sup>1</sup>, Henry Oppermann<sup>1,4,†</sup> and Frank Gaunitz<sup>1,\*,†</sup>

- <sup>1</sup> Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie, Universitätsklinikum Leipzig, 04103 Leipzig, Germany; christiane.seidel@medizin.uni-leipzig.de (C.E.S.); rainer.baran-schmidt@medizin.uni-leipzig.de (R.B.-S.); juergen.meixensberger@medizin.uni-leipzig.de (J.M.); henry.oppermann@medizin.uni-leipzig.de (H.O.)  
<sup>2</sup> Klinik und Poliklinik für Neurologie, Universitätsklinikum Leipzig, 04103 Leipzig, Germany  
<sup>3</sup> Institut für Analytische Chemie, Universität Leipzig, 04103 Leipzig, Germany; birkemeyer@chemie.uni-leipzig.de  
<sup>4</sup> Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Leipzig, 04103 Leipzig, Germany  
\* Correspondence: frank.gaunitz@medizin.uni-leipzig.de  
† These authors contributed equally to this work.



**Citation:** Seidel, E.C.; Birkemeyer, C.; Baran-Schmidt, R.; Meixensberger, J.; Oppermann, H.; Gaunitz, F. Viability of Glioblastoma Cells and Fibroblasts in the Presence of Imidazole-Containing Compounds. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 5834. <https://doi.org/10.3390/ijms23105834>

Academic Editor: David Arráez-Román

Received: 19 April 2022

Accepted: 19 May 2022

Published: 23 May 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** The naturally occurring dipeptide carnosine ( $\beta$ -alanyl-*L*-histidine) specifically attenuates tumor growth. Here, we ask whether other small imidazole-containing compounds also affect the viability of tumor cells without affecting non-malignant cells and whether the formation of histamine is involved. Patient-derived fibroblasts and glioblastoma cells were treated with carnosine, *L*-alanyl-*L*-histidine (LA-LH),  $\beta$ -alanyl-*L*-alanine, *L*-histidine, histamine, imidazole,  $\beta$ -alanine, and *L*-alanine. Cell viability was assessed by cell-based assays and microscopy. The intracellular release of *L*-histidine and formation of histamine was investigated by high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Carnosine and LA-LH inhibited tumor cell growth with minor effects on fibroblasts, and *L*-histidine, histamine, and imidazole affected viability in both cell types. Compounds without the imidazole moiety did not diminish viability. In the presence of LA-LH but not in the presence of carnosine, a significant rise in intracellular amounts of histidine was detected in all cells. The formation of histamine was not detectable in the presence of carnosine, LA-LH, or histidine. In conclusion, the imidazole moiety of carnosine contributes to its anti-neoplastic effect, which is also seen in the presence of histidine and LA-LH. Despite the fact that histamine has a strong effect on cell viability, the formation of histamine is not responsible for the effects on the cell viability of carnosine, LA-LH, and histidine.

**Keywords:** carnosine; glioblastoma; fibroblasts; imidazole-containing compounds; cell viability; high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry

## 1. Introduction

With 3.23 new cases per 100,000 inhabitants in the United States, glioblastoma (GBM) is the most frequent malignant tumor of the human brain [1]. GBM is an astrocytic tumor that is classified, according to the World Health Organization (WHO), with the highest WHO grade IV. Despite the best possible treatment, which consists of maximal safe resection of the tumor, radiotherapy, and adjuvant chemotherapy with temozolomide, the 5-year overall survival of GBM patients is only 7.2% [1]. Furthermore, the effectiveness of this therapy is highly dependent on the genetic properties of the tumor, namely, the methylation status of the *O*-6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter [2]. In view of the poor prognosis and missing alternatives to standard therapy, there is ongoing research for new treatment strategies and drugs that could improve the corresponding outcome.

In recent years, we and others have demonstrated that the naturally occurring dipeptide *L*-carnosine ( $\beta$ -alanyl-*L*-histidine; note that throughout the text, “carnosine” refers to

"*L*-carnosine"), which was originally discovered more than 120 years ago [3], may be a potential anti-neoplastic drug for different types of cancer in general and also for glioblastoma in particular (for reviews, see [4,5]). As carnosine is rapidly degraded in human plasma due to the presence of serum carnosinase, it has long been thought that its use as a systemically administered drug may be limited. Although there is now evidence that carnosine can escape from degradation by its uptake into erythrocytes [6], other compounds with higher stability may be considered as alternatives. Therefore, it is reasonable to study and better understand carnosine's mode of action on tumor cell viability, which also requires an understanding of the bioactive characteristics of the molecule. In view of the observation that *L*-histidine is able to mimic carnosine's anti-neoplastic effect [7], we asked whether other small imidazole-containing compounds are also able to mimic carnosine's effect, whether the  $\beta$ -alanyl moiety is required, and whether the effects of other compounds are indeed comparable to those of carnosine. In addition, we also wanted to know whether the formation of histamine from *L*-histidine is involved in the anti-neoplastic effect.

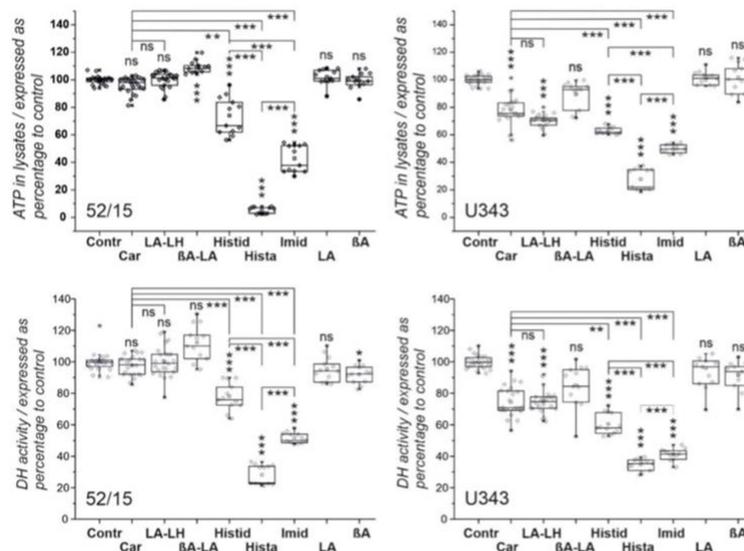
## 2. Results

### 2.1. Viability of Glioblastoma Cells and Patient-Derived Fibroblasts in the Presence of Imidazole-Containing Compounds

In the first series of experiments, we investigated the effect of imidazole-containing compounds on cell viability using five patient-derived fibroblast cell cultures (13/16, 90/15, 69/15, 60/15, 52/15) and four glioblastoma cell lines (U87, T98G, U87, G55T2). The cells were incubated for 48 h in the presence of carnosine, *L*-alanyl-*L*-histidine (LA-LH),  $\beta$ -alanyl-*L*-alanyl ( $\beta$ A-LA), *L*-histidine, histamine, imidazole, *L*-alanine, and  $\beta$ -alanine (all 50 mM), and cell viability was determined measuring the amount of ATP in cell lysates and dehydrogenase (DH) activity in living cells. The data were compared to untreated control cells. The results of experiments with fibroblasts from culture 52/15 and cells from the glioblastoma cell line U343 are presented in Figure 1 (all other experiments are presented in detail in Supplement S1 with Figure S1a for ATP in cell lysates and Figure S1b for dehydrogenase activity).

The summary of all data obtained is shown in Table 1.

In summary, as revealed by both assays, carnosine significantly reduced viability in all glioblastoma cells to at least 80% (with the exception of measuring DH in T98G). As shown in Table 1, fibroblasts also responded with a small reduction of viability in the presence of carnosine in almost all cells (maximal reduction to 90%), which was, in all cases, lower than that observed in GBM cell lines. Using LA-LH, we could also detect a significant reduction of viability in glioblastoma cells, as determined by both assays, whereas the viability of fibroblasts was not affected by the compound. Overall, carnosine and LA-LH exerted a comparable impact on glioblastoma cells, with differences regarding the various cell lines. Histidine reduced glioblastoma cell viability in a stronger manner than carnosine and LA-LH and significantly affected the viability of fibroblasts. In contrast, the non-imidazolyl-containing dipeptide  $\beta$ A-LA did not reduce GBM or fibroblast viability. Histamine strongly reduced fibroblast viability and glioblastoma cell viability without a significant difference between both cell types. Comparing the effect of histamine with histidine, a significantly stronger reduction by histamine was detected in fibroblasts but not in glioblastoma cells. Imidazole also strongly reduced the viability of fibroblasts and glioblastoma cells without discriminating between the cell types. In comparison to imidazole, histamine strongly reduced the cell viability of fibroblasts and exerted a comparable effect on glioblastoma cells.



**Figure 1.** Viability of fibroblasts from culture 52/15 (left) and glioblastoma cells from the U343 line (right) after treatment with different compounds. Cells were treated for 48 h with carnosine (Car), L-alanyl-L-histidine (LA-LH), β-alanyl-L-alanine (βA-LA), L-histidine (Histid), histamine (Hista), imidazole (Imid), L-alanine (LA), and β-alanine (βA) (all 50 mM) or vehicle control (Contr) for 48 h. Cell viability was measured by determining ATP in cell lysates (upper panels) and dehydrogenase activity (DH) in living cells (lower panels). Results are presented as box plots. Statistical analysis was performed using a one-way ANOVA. The level of significance between different compounds is indicated by horizontal lines and compared to Contr above the boxes: \*;  $p < 0.05$ ; \*\*;  $p < 0.005$ ; \*\*\*;  $p < 0.0005$ ; ns: not significant.

**Table 1.** Effect of different compounds on viability of fibroblasts and glioblastoma cells.

| Culture                          | Fibroblasts |    |       |    |               |    |              |    | Glioblastoma Cells |    |              |    |              |    |              |    |               |    |
|----------------------------------|-------------|----|-------|----|---------------|----|--------------|----|--------------------|----|--------------|----|--------------|----|--------------|----|---------------|----|
|                                  | 13/16       |    | 90/15 |    | 69/15         |    | 60/15        |    | 52/15              |    | U343         |    | T98G         |    | U87          |    | G55T2         |    |
| Assay                            | ATP         | DH | ATP   | DH | ATP           | DH | ATP          | DH | ATP                | DH | ATP          | DH | ATP          | DH | ATP          | DH | ATP           | DH |
| <b>Carnosine</b>                 |             |    |       |    |               |    |              |    |                    |    |              |    |              |    |              |    |               |    |
| <b>LA-LH</b>                     |             |    |       |    |               |    |              |    |                    |    |              |    |              |    |              |    |               |    |
| <b>Histidine</b>                 |             |    |       |    |               |    |              |    |                    |    |              |    |              |    |              |    |               |    |
| <b>Imidazole</b>                 |             |    |       |    |               |    |              |    |                    |    |              |    |              |    |              |    |               |    |
| <b>Histamine</b>                 |             |    |       |    |               |    |              |    |                    |    |              |    |              |    |              |    |               |    |
| bAla-L-Ala                       |             |    |       |    |               |    |              |    |                    |    |              |    |              |    |              |    |               |    |
| L-Ala                            |             |    |       |    |               |    |              |    |                    |    |              |    |              |    |              |    |               |    |
| b-Ala                            |             |    |       |    |               |    |              |    |                    |    |              |    |              |    |              |    |               |    |
| <b>Reduction to control (%):</b> |             |    |       |    | <b>100–90</b> |    | <b>90–80</b> |    | <b>80–70</b>       |    | <b>70–60</b> |    | <b>60–50</b> |    | <b>50–40</b> |    | <b>&lt;40</b> |    |

The reduction of ATP in cell lysates and dehydrogenase activity (DH) in living cells is color-indicated compared to untreated control cells after 48 h exposure to the compounds. Imidazole-containing compounds are shown in bold. Note: only statistically significant effects are indicated, and white fields indicate no significance.

**2.2. Necrosis and Morphological Changes of GBM Cells and Patient-Derived Fibroblasts after Treatment with Different Imidazole-Containing Compounds**

In the preceding section, we analyzed the viability of GBM cells and fibroblasts by measuring ATP in cell lysates and dehydrogenase activity in living cells after treatment with different compounds. These experiments indicated that carnosine and LA-LH more clearly reduced the investigated parameters in GBM cells than in fibroblasts; histidine and imidazole also appeared to affect GBM cells more severely than fibroblasts, and histamine

similarly affected fibroblasts and tumor cells. Nonetheless, only carnosine and LA-LH appeared to have no effect on the viability of fibroblasts, although they obviously inhibited the production of ATP and dehydrogenase activity in GBM cells in general to below 80%.

In order to get a more detailed picture of the effect of the compounds on GBM cells and fibroblasts, we investigated the subsequent morphological changes after treatment with the selected compounds, and we determined cell numbers and necrotic cells by propidium iodide staining. In addition, we also stained living cells using Calcein-AM. For this experiment, cells from the four glioblastoma cell lines (G55T2, T98G, U87, and U343) and from fibroblast cultures (90/15, 69/15, 60/15, and 52/15) were exposed to our compounds (each 50 mM) for 48 h. Then, staining with Hoechst 33343, Calcein-AM, and propidium iodide was performed, and the effects were monitored by phase contrast and fluorescence microscopy. Figure 2 presents the result of the experiment and its analysis, along with representative pictures of cells from the U343 line and from fibroblast culture 52/15. A summary of all data obtained is presented in Table 2.

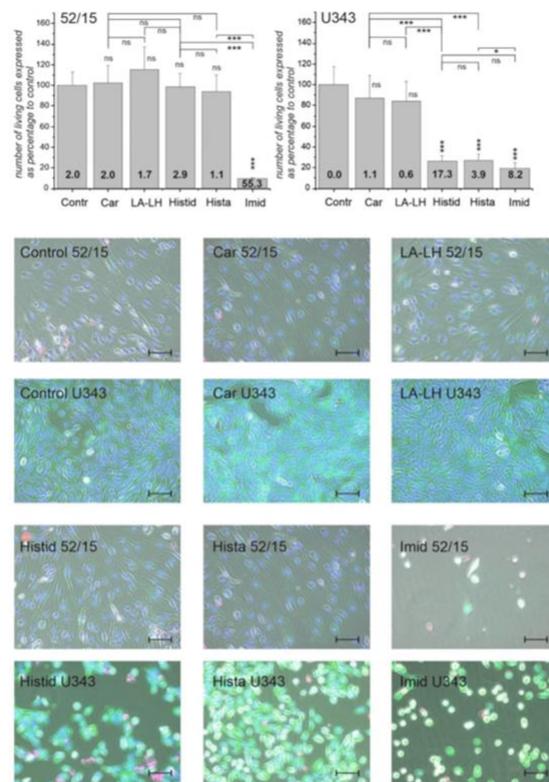
Pictures from experiments with other cell lines and fibroblast cultures are presented in Supplement S2 with microscopic images for 53/15 (Figure S2a); 60/15 (Figure S2b); 69/15 (Figure S2c); 90/15 (Figure S2d); G55T2 (Figure S2e); T98G (Figure S2f); U87 (Figure S2g); U343 (Figure S2h) and the statistical analysis (Figure S2i). In addition, a summary of the observations from all cells is given in Table 2.

In summary, the strongest reduction of the number of living cells was achieved in the presence of imidazole, which did not significantly discriminate between fibroblasts or glioblastoma cells, indicating the generally high toxicity of this compound for both cell types. In some cases (e.g., U87), the loss of cells was so high that the calculation of the ratio between dead and living cells was not useful (“nd” in Table 2). Histidine and histamine, on the other hand, affected fibroblasts and glioblastoma cells significantly differently, with many more dead cells in the latter. Compared to histidine and histamine, carnosine and LA-LH seemed to be less toxic but, in most cases, exhibited a stronger effect on glioblastoma cells than on fibroblasts. Comparing the cell counts presented in Table 2 to the effects on physiological parameters (Table 1), it seems to be likely that the effects of the different compounds on cells may differ with regard to their mechanisms of action on energy metabolism.

**Table 2.** Comparison of living cells and the ratio between dead and living cells in fibroblasts and glioblastoma cell cultures under the influence of different compounds.

| culture                     | Fibroblasts |        |       |       |        |        |        |         | Glioblastoma |        |        |        |        |        |        |        |       |
|-----------------------------|-------------|--------|-------|-------|--------|--------|--------|---------|--------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|
|                             | 90/15       |        | 69/15 |       | 60/15  |        | 52/15  |         | U343         |        | T98G   |        | G55T2  |        | U87    |        |       |
|                             | %           | ratio  | %     | ratio | %      | ratio  | %      | ratio   | %            | ratio  | %      | ratio  | %      | ratio  | %      | ratio  |       |
| Car                         | green       | green  | green | green | green  | green  | green  | green   | green        | green  | green  | green  | green  | green  | green  | green  |       |
| LALH                        | green       | green  | green | green | green  | green  | green  | green   | green        | green  | green  | green  | green  | green  | green  | green  |       |
| Histid                      | green       | green  | green | green | green  | green  | green  | green   | green        | green  | green  | green  | green  | green  | green  | green  |       |
| Imid                        | orange      | orange | red   | red   | orange | orange | orange | orange  | orange       | orange | black  | black  | black  | black  | black  | black  | nd    |
| Hista                       | green       | green  | green | green | green  | green  | green  | green   | green        | green  | green  | green  | green  | green  | green  | green  | green |
| living cells to control (%) |             |        |       |       |        |        | ≥100   | <100–90 | <90–80       | <80–70 | <70–60 | <60–50 | <50–40 | <40–30 | <30–20 | <20–10 | <10   |
| ratio dead/living           |             |        |       |       |        |        | ≤0.5   | >0.5–1  | >1–2         | >2–4   | >4–8   | >8–16  | >16–32 | >32–64 | >65    |        |       |

The total number of living cells in four fibroblast cultures and four glioblastoma cell lines after treatment with different compounds compared to untreated control cells (in %); the ratios between dead cells and living cells are color-indicated.

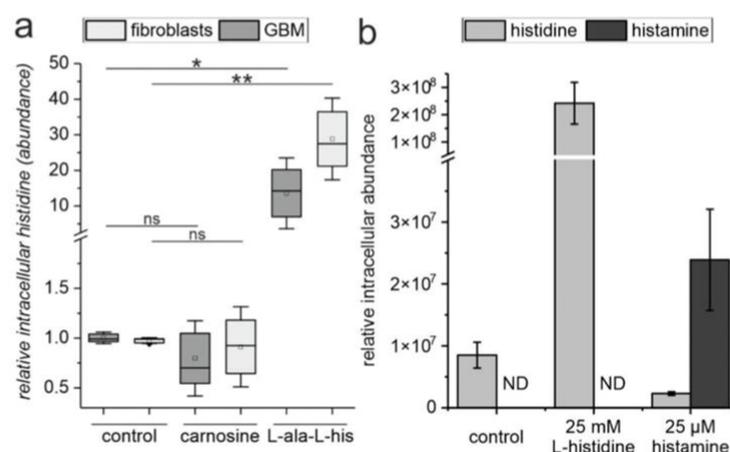


**Figure 2.** Microscopic analysis of fibroblasts (52/15) and glioblastoma cells (U343) in the presence of different compounds. Cells were treated for 48 h with carnosine (Car), *L*-alanyl-*L*-histidine (LA-LH),  $\beta$ -alanyl-*L*-alanine ( $\beta$ A-LA), *L*-histidine (Histid), histamine (Hista), imidazole (Imid), *L*-alanine (LA), and  $\beta$ -alanine ( $\beta$ A) (all 50 mM) or vehicle control (Contr) for 48 h. Then, microscopic images after staining with Hoechst 33343 (nuclei, blue), propidium iodide (dead cells, red), and Calcein-AM (living cells, green) were compared (representative images are presented as overlays in the lower panels, which also include an image obtained by phase contrast). In order to determine the number of living cells using ImageJ, the total number of nuclei was determined, subtracting the nuclei of dead cells (bars in upper panel; note: determination of living cells from images of cells positive for Calcein-AM staining was not performed because of high errors due to technical reasons). The ratio of dead cells to living cells is presented by bold numbers in the bars in the upper panel. Statistical analysis was performed using a one-way ANOVA. The level of significance between different compounds is indicated by horizontal lines and compared to Contr above the bars: \*:  $p < 0.05$ ; \*\*\*:  $p < 0.0005$ ; ns: not significant. (Size bars: 100  $\mu$ m).

### 2.3. The Release of *L*-Histidine from *L*-Alanyl-*L*-Histidine Does Not Result in the Formation of Histamine

Next, we investigated whether different amounts of *L*-histidine are released from carnosine and LA-LH and whether significant intracellular amounts of histamine can be formed from intracellular *L*-histidine. Figure 3a presents the intracellular amounts of *L*-histidine when cells are incubated in the presence of carnosine or LA-LH, respectively (both 50 mM), as determined in fibroblast cell cultures ( $n = 5$ ) and glioblastoma cell lines ( $n = 4$ ). As can be seen, no significant increase of intracellular *L*-histidine compared to

untreated control cells was observed in cells incubated in the presence of carnosine. In contrast, incubation in the presence of LA-LH resulted in a significant increase in intracellular *L*-histidine. In order to detect a possible formation of histamine, we incubated cells from the GBM line T98G directly in the presence of *L*-histidine (25 mM) and histamine (25  $\mu$ M) and determined the amount of both compounds in the cells. As can be seen in Figure 3b, we could not detect histamine in cells incubated in the presence of *L*-histidine, although we observed a steep rise in the intracellular amount of histamine when added to the medium. In addition, we did not detect histamine or its degradation products in cells exposed to carnosine, LA-LH, or *L*-histidine, whereas we observed the formation of *N*-methylhistamine in cells cultivated in the presence of histamine.



**Figure 3.** Release of histidine from carnosine and LA-LH and formation of histamine from histidine in fibroblasts and glioblastoma cells. (a) Four different glioblastoma cell lines and five different fibroblast cultures were treated with carnosine or *L*-alanyl-*L*-histidine (LA-LH) (both 50 mM) or vehicle control for 48 h. Afterwards, metabolites were extracted and intracellular histidine was determined by LC–MS. Results are presented as box plots that were obtained from the median of the replicates of each cell culture. (b) T98G cells were treated with 25 mM *L*-histidine, 25  $\mu$ M histamine, or vehicle control for 48 h. Afterwards, metabolites were extracted, and intracellular histamine and *L*-histidine were determined by LC–MS. Statistical analysis was performed using a one-way ANOVA with the Games–Howell post hoc test. The level of significance is indicated as \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.005$ ; not significant (ns):  $p > 0.05$ . ND: not detected.

### 3. Discussion

Several decades ago, the anti-neoplastic effect of carnosine was first described in vivo by Nagai and Suda [8]. Later, this observation was confirmed in vivo and in vitro by several groups and for different types of cancer, such as gastric carcinoma [9], colon carcinoma [10], cervical carcinoma [11], and glioblastoma [12]. Just recently, we demonstrated that *L*-histidine, one amino acid of the dipeptide, reduces GBM cell viability even more potently than carnosine [13]. Therefore, we wondered whether *L*-histidine itself or other histidine-containing compounds would also discriminate between malignant GBM cells and non-malignant fibroblasts, as demonstrated for carnosine [14,15]. Here, we observed that carnosine significantly reduced cell viability in GBM cells, whereas there was no significant effect observed in fibroblasts with regard to the amount of ATP in cell lysates and only a small but significant effect with regard to dehydrogenase activity. A comparable discrimination between tumor and non-tumor cells was also observed after the application of LA-LH. Although *L*-histidine did significantly reduce the viability of fibroblasts, the effect

was stronger in GBM cells but significantly different between GBM cells and fibroblasts only with regard to dehydrogenase activity.

As *L*-histidine also has anti-neoplastic effects on GBM cells, this observation raises the question of whether *L*-histidine could be used as a therapeutic agent instead of carnosine. First of all, at the concentrations employed in our experiments (50 mM), the amino acid obviously also affects fibroblasts. Comparable observations have been made by Rauen et al., who detected that in cultivated liver cells, *L*-histidine at a concentration of 76 mM had a ~2.5 higher toxicity compared to carnosine at a concentration of 198 mM [16]. As *L*-histidine is a proteinogenic amino acid, it could also be assumed that orally ingested *L*-histidine is taken up by other cells and may not reach the tumor. Orally applied carnosine, on the other hand, is rapidly degraded by serum carnosinase [17] and may, therefore, be limited in delivering its histidine moiety to cancer cells. In this regard, it has to be noted that we recently demonstrated that carnosine can escape from degradation by uptake into erythrocytes [6], explaining the observation that the dipeptide can be detected in the urine of volunteers up to 5 h after oral ingestion [18]. In addition, there are several reports of the therapeutic effects of orally ingested carnosine that point towards the delivery of intact carnosine, especially to the brain [19–21].

Given the fact that LA-LH has an anti-neoplastic effect comparable to carnosine, being able to discriminate between tumor and non-tumor cells, the other question is whether this compound or other imidazole-containing dipeptides could be a useful alternative to carnosine. This question cannot be answered yet, but it is interesting to note that our experiments demonstrate that LA-LH is intracellularly more rapidly degraded to its amino acid constituents than carnosine (Figure 3). Therefore, future experiments should investigate whether the release of *L*-histidine results in a more rapid loss of the bioactive imidazolyl moiety in the cells and whether more stable *L*-histidine-containing dipeptides could be an alternative to carnosine or LA-LH. More complex synthetic compounds derived from imidazole have already been discussed as potential anti-cancer drugs (for a review, see [22]). In fact, some of the more complex imidazole-derived compounds have already entered the clinics with regard to a number of diseases (for a review, see [23]), but one has to take into account that synthetic drugs require intensive testing before being used in therapy. On the other hand, carnosine is a naturally occurring compound that has already been used in a number of studies with human patients, and, together with its constituent  $\beta$ -alanine, it has a high acceptance as a food supplement for athletes [24]. At this point, it is also interesting to note that carnosine, instead of negatively affecting non-malignant cells, has protective effects on normal cells and has been discussed as a neuroprotector, especially in various pathological brain conditions [25]. Imidazole itself has also been discussed as a potential drug for the treatment of colon cancer [26]. However, although Long and Wang used low concentrations in their culture experiments with colon carcinoma cells (up to 36  $\mu$ M), the high toxicity towards fibroblasts, as seen in our experiments, should be taken into account when considering the use of imidazole as an anti-cancer drug.

Another question addressed by the presented experiments is whether histamine obtained by decarboxylation of *L*-histidine could be responsible for carnosine's and *L*-histidine's anti-neoplastic effect. This notion has been discussed by others [27] and could have been deduced by the fact that histamine has a very strong effect on viability (Figure 1). However, we now rule out this possibility by the observation that we could not detect the formation of histamine after the exposure of GBM cells to carnosine, LA-LH, or *L*-histidine. In addition, we also did not detect *N*-methylhistamine, a degradation product of histamine, in cells exposed to carnosine, LA-LH, or *L*-histidine, which were detectable in cells exposed to histamine. At this point, it should also be noted that *AOC1* (gene encoding diamine oxidase (EC 1.4.3.22), which is responsible for the conversion of *L*-histidine to histamine) is almost never present in GBM cells and normal brain tissue (transcripts per million transcripts ~2), as revealed by *in silico* analysis using data from the TCGA Research Networks (<https://www.cancer.gov/tcga>; accessed on 24 December 2022) and the GTex database (<https://gtexportal.org/home/>; accessed on 24 December 2022) using GEPIA (Gene Express-

sion Profiling Interactive Analysis; <http://gepia.cancer-pku.cn/>; accessed on 24 December 2022 [28]). In addition, it should be noted that the neuroprotective properties of carnosine are also independent of its metabolization via the *L*-histidine-histamine pathway [29].

In conclusion, our experiments demonstrate the importance of the *L*-histidine moiety of carnosine for its anti-neoplastic effect. Although the molecular mechanisms by which this moiety exerts its anti-neoplastic effect have to be revealed in detail, there is evidence that imidazolyl-containing compounds are able to inhibit mitochondrial ATP production [30]. In addition, it has been shown that they can induce cell cycle arrest [31], most likely by binding the imidazolyl moiety to DNA [32]. Despite the observation that the imidazolyl moiety contributes to the anti-neoplastic effect, it is important to note that we recently demonstrated that carnosine's influence on tumor cell viability is accompanied by an influence on the pentose phosphate pathway through its interaction with the glycolytic intermediates glyceraldehyde-3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate. Therefore, carnosine may have a broader influence on tumor cells than *L*-histidine alone or other imidazolyl-containing dipeptides [13]. Finally, it would also be interesting to test whether the other compounds used in our study also affect the migration of GBM cells, as demonstrated for carnosine [15]. On the other hand, at least for compounds with high toxicity, such as *L*-histidine, imidazole, or histamine, one certainly needs to test lower concentrations than those used in our present investigation.

#### 4. Material and Methods

##### 4.1. Reagents

If not stated otherwise, all chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany), Merck (Darmstadt, Germany), or Carl Roth (Karlsruhe, Germany). Carnosine was kindly provided by Flamma s.p.a. (Chignolo d'Isola, Italy); *L*-alanyl-*L*-histidine and  $\beta$ -alanyl-*L*-alanine were purchased from Bachem (Bubendorf, Switzerland).

##### 4.2. Cell Lines and Fibroblast Cultures

The glioblastoma cell line G55T2 was obtained from Sigma (Taufkirchen, Germany), the cell lines U87 and T98G from the ATCC (Manassas, VA, USA), and the U343 line from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Braunschweig, Germany). All cells were genotyped (Genolytic GmbH, Leipzig, Germany), and their identities were confirmed.

For cultivation, cells were propagated in 250 mL culture flasks (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Germany) using 10 mL of standard culture medium (DMEM/4.5 g/L glucose, without pyruvate (Life Technologies, Darmstadt, Germany) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS superior, Biochrom, Berlin, Germany), 2 mM GlutaMax (Life Technologies), and penicillin–streptomycin (Life Technologies)) at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> in humidified air in an incubator.

Fibroblast cultures were established as described previously [15]. Briefly, freshly removed galea tissue was washed with PBS (phosphate-buffered saline) and minced with a scalpel blade. After mincing, small tissue pieces were transferred to a 25 cm<sup>2</sup> culture flask (TPP, Trasadingen, Switzerland) sprinkled with AmnioMax complete medium (Gibco, Darmstadt, Germany). Tissue pieces were incubated for 30 min at room temperature, and finally, 1 mL AmnioMax complete medium was added. Incubation was then performed at 37 °C, with 5% CO<sub>2</sub> and humidified air in an incubator. Medium was changed after 72 h. As soon as a confluent layer was obtained, cells were removed from culture flasks by the use of Accutase (PAA, Pasching, Austria) and transferred to 75 cm<sup>2</sup> culture flasks (TPP). AmnioMax medium with AmnioMax supplement was used for the first 2–3 weeks of cultivation. Thereafter, fibroblasts were cultivated under the same conditions as glioblastoma cells. Galea tissue was obtained during standard surgery performed at the Neurosurgery Department of the University Hospital Leipzig in 2015 and 2016. All patients provided written informed consent according to German law, as confirmed by the local committee (144/08-ek).

#### 4.3. Cell Viability Assays

For cell viability assays, cells were counted and seeded into sterile 96-well plates ( $\mu$ Clear, Greiner Bio One, Frickenhausen, Germany) at a density of 5000 cells/well in 200  $\mu$ L standard medium. After 24 h of cultivation (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>/95% air), the medium was aspirated and fresh medium containing supplements was added, as indicated in each experiment (100  $\mu$ L/well), and the cells were incubated for an additional 48 h. Then, the CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Mannheim, Germany) was employed to determine viable cells by measuring ATP in cell lysates, and the CellTiter-Blue Cell Viability Assay (Promega) was used to quantify the cell's dehydrogenase activity in living cells. All assays were carried out according to the manufacturer's protocols. Luminescence and fluorescence were measured using a SpectraMax M5 multilabel reader (Molecular Devices, Biberach, Germany).

#### 4.4. Staining and Determination of Live and Dead Cells

The number of live and dead cells after treatment with different compounds was determined in 12-well plates (TPP). Cells were seeded at a density of 80,000 cells per well in 1 mL of medium. After 24 h, cells received fresh medium with the test compounds. After 48 h in the presence of the compounds, cells were washed with Hanks balanced salt solution (calcium, magnesium, 1 g/L glucose, pH 7.4; Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Germany) before DMEM containing Calcein-AM (2  $\mu$ M), propidium iodide (1.5  $\mu$ M), and Hoechst 33343 (2  $\mu$ M) was added for 1 h. Microscopic pictures were taken using a BZ-X800 microscope (Keyence, Neu-Isenburg, Germany) using phase contrast and fluorescence to identify nuclei (360/460 nm), living cells (470/525 nm), and dead cells (560/630 nm). For the determination of the number of nuclei and of dead cells, 9 images (at 4 $\times$  magnification) from each well were taken, and ImageJ was used to determine the number of dead cells and nuclei [33]. (Note: we used this approach instead of a FACS analysis, as the detachment of fibroblasts, especially under high toxicity conditions, contributes to additional toxicity.)

#### 4.5. Determination of Intracellular L-Histidine

Intracellular amounts of histidine and histamine were determined as described previously [13]. Briefly, cells were seeded at a density of 300,000 cells per well into a 6-well plate in 2 mL of culture medium. After 24-h cultivation, the culture medium was removed and replaced with fresh medium containing specific compounds for each experiment, and cells were incubated for an additional 48 h. Then, cells were washed thrice with 1 mL of ice-cold washing buffer, followed by extraction and by the addition of 400  $\mu$ L of ice-cold methanol. After 10 min of gentle shaking on ice, extracts were collected in 1.5 mL Eppendorf tubes and wells were rinsed twice in 400  $\mu$ L distilled high-quality water (Milli-Q). Samples were evaporated to dryness by lyophilization (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen, Osterode, Germany). For derivatization, the freeze-dried extracts were redissolved in 100  $\mu$ L high-quality water (Milli-Q), and 100  $\mu$ L 0.5% *ortho*-phthalaldehyde (dissolved in methanol) was added. Derivatization was carried out at 37 °C in a thermomixer for 45 min, followed by the addition of 800  $\mu$ L 0.1% formic acid in HPLC grade water. The obtained solution (200  $\mu$ L) was transferred into 250  $\mu$ L conic glass inserts of 2 mL ND10 vials, followed by high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (HPLC–MS). After extraction, the protein of the remaining layer of fixed cells was extracted by the addition of 200  $\mu$ L lysis buffer (77 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 23 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2% TritonX-100, pH 7.8). Then, the total protein was determined by using the Pierce 660 nm Protein Assay (Thermo Scientific, Braunschweig, Germany).

#### 4.6. HPLC–MS Set Up and Data Analysis

An Agilent 1100 series HPLC consisting of a variable wavelength detector, a well plate autosampler, and a binary pump, coupled with a Bruker Esquire 3000 plus electrospray ionization mass spectrometer, was used. The column was a Phenomenex Gemini 5  $\mu$  C18 110 Å 150 mm  $\times$  2 mm column with a precolumn. The eluent system consisted of two

solvents, with eluent A: 0.1% formic acid in acetonitrile and eluent B: 0.1% formic acid in HPLC grade water. Mobile phase flow rate was 0.5 mL/min with the following gradient for separation: 0–10 min 90% B, 90% to 0% B within 15 min, 25–35 min 0% B, 0% to 90% B within 5 min, and 40–47 min 90% B for column equilibration. The mass spectrometer operated in positive mode (target mass:  $m/z$  300; mass range:  $m/z$  70–400), and the dry gas temperature was set to 360 °C (flow rate: 11 L/min; 70 psi). Data were analyzed using OpenChrom version 2.0.103.v20150204-1700 [34]. Histidine and histamine were identified by standards, and target masses  $m/z$  272 (histidine) and 228 (histamine) were used for quantification. If not stated otherwise, the abundance of a metabolite is defined by the peak area determined from the selected ion chromatogram of an experiment, normalized to the total cellular protein ( $\mu\text{g}$ ). It should be noted that this method does not allow discrimination between *D* and *L* stereoisomers. Thus, when referring to signals obtained by HPLC–MS, only histidine (and not *L*-histidine) is mentioned.

#### 4.7. Statistical Analysis and Graphical Representation

Statistical analysis was carried out using SPSS (IBM, Armonk, NY, USA; version: 28.0.0.0 (190)). For multiple comparisons, a one-way ANOVA after testing for normality of distribution (Kolmogorov–Smirnov test) was employed, using a Games–Howell or Bonferroni post hoc test after testing for equality of variances (Levene’s test). Results were considered to be statistically significant at a value of  $p < 0.05$ . Graphical representations were prepared using OriginPro (2021b; OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) and CorelDraw Graphics Suite 2020 (Corel Corporation, Ottawa, ON, Canada).

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms23105834/s1> Supplement S1: Viability of cells from four glioblastomas and from five fibroblast cultures derived from patients, cultivated in the presence of imidazole-containing compounds. Supplement S2: Microscopic analysis of fibroblast cell cultures and glioblastoma cells in the presence of different compounds.

**Author Contributions:** Conceptualization, H.O. and F.G.; Methodology, H.O., C.B. and F.G.; Formal Analysis, H.O., C.B., C.E.S. and F.G.; Investigation, H.O., C.B., C.E.S., R.B.-S. and F.G.; Resources, F.G. and J.M.; Data Curation, H.O. and F.G.; Writing—Original Draft Preparation, H.O., C.E.S., and F.G.; Writing—Review and Editing, H.O., C.B., C.E.S., J.M. and F.G.; Visualization, H.O., C.E.S. and F.G.; Supervision, H.O. and F.G.; Project Administration, F.G. and J.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** Funded by the Open Access Publishing Fund of Leipzig University supported by the German Research Foundation within the program Open Access Publication Funding.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the Medical Faculty of the University of Leipzig (#144/08-ek) (approval date: 5 June 2008).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** All data used in this study are presented in the manuscript and Supplementary Materials.

**Acknowledgments:** LC–MS analyses were carried out at the mass spectrometry core facility of the Faculty of Chemistry and Mineralogy at Leipzig University, MS-UL; we thank Susan Billig for technical assistance. We like to thank Flamma (Flamma s.p.a. Chignolo d’Isola, Italy (<http://www.flammagroup.com>); accessed on 18 May 2022) for the generous supply of very high-quality carnosine for all our experiments. In addition, we like to thank Hans-Heinrich Foerster from Genolytic GmbH (Leipzig, Germany) for genotyping and confirmation of cell identity.

**Conflicts of Interest:** The authors declare that they have no potential conflicts of interest.

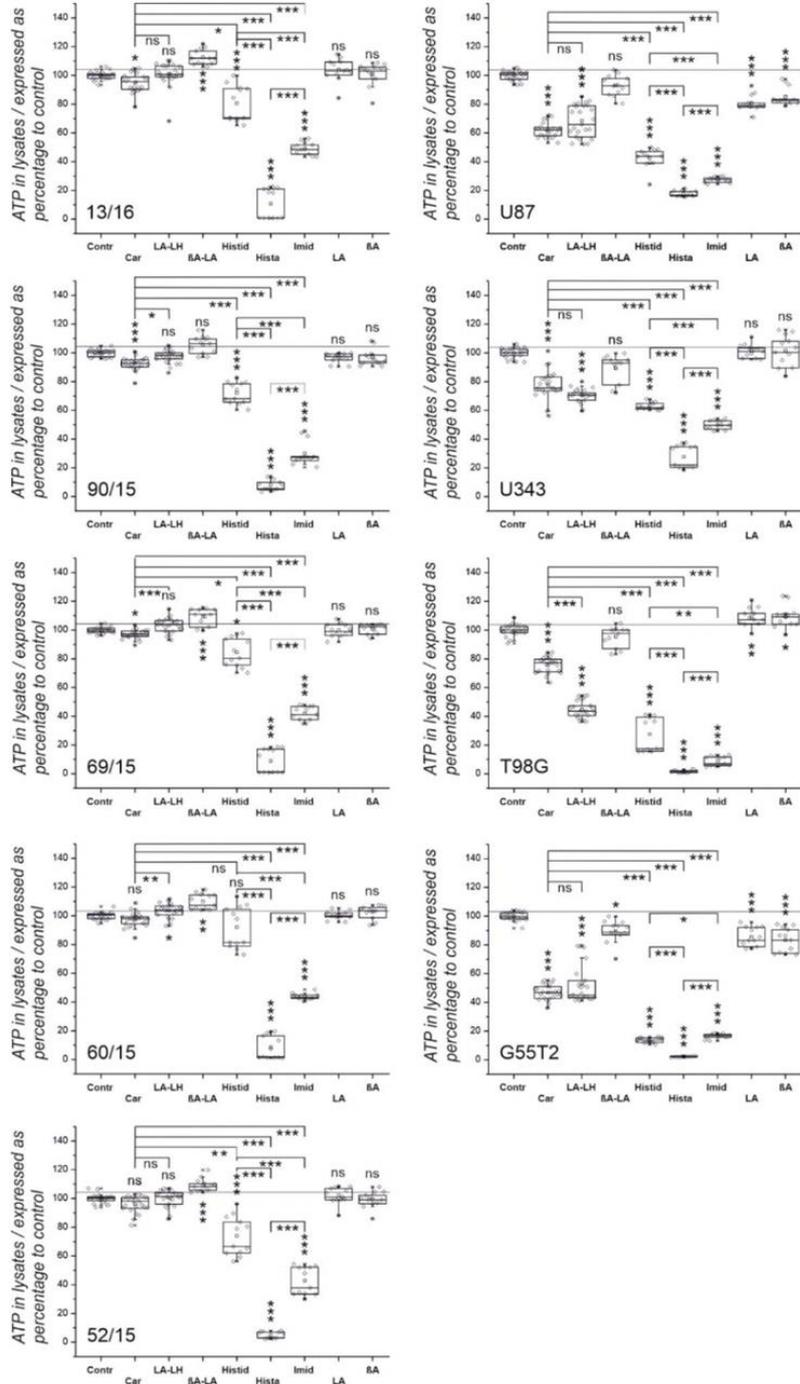
## References

1. Ostrom, Q.T.; Patil, N.; Cioffi, G.; Waite, K.; Kruchko, C.; Barnholtz-Sloan, J.S. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2013–2017. *Neuro-Oncology* **2020**, *22*, iv1–iv96. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Hegi, M.E.; Dierens, A.-C.; Gorlia, T.; Hamou, M.-F.; de Tribolet, N.; Weller, M.; Kros, J.M.; Hainfellner, J.A.; Mason, W.; Mariani, L.; et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 997–1003. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Gulewitsch, W.; Amiradzibi, S. Ueber das Carnosin, eine neue organische Base des Fleischextraktes. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1900**, *33*, 1902–1903. [\[CrossRef\]](#)
4. Turner, M.D.; Sale, C.; Garner, A.C.; Hipkiss, A.R. Anti-cancer actions of carnosine and the restoration of normal cellular homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2021**, *1868*, 119117. [\[CrossRef\]](#)
5. Hipkiss, A.R.; Gaunitz, F. Inhibition of tumour cell growth by carnosine: Some possible mechanisms. *Amino Acids* **2014**, *46*, 327–337. [\[CrossRef\]](#)
6. Oppermann, H.; Elsei, S.; Birkemeyer, C.; Meixensberger, J.; Gaunitz, F. Erythrocytes Prevent Degradation of Carnosine by Human Serum Carnosinase. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 12802. [\[CrossRef\]](#)
7. Letzien, U.; Oppermann, H.; Meixensberger, J.; Gaunitz, F. The antineoplastic effect of carnosine is accompanied by induction of PDK4 and can be mimicked by L-histidine. *Amino Acids* **2014**, *46*, 1009–1019. [\[CrossRef\]](#)
8. Nagai, K.; Suda, T. Antineoplastic effects of carnosine and beta-alanine—Physiological considerations of its antineoplastic effects. *J. Physiol. Soc. Jpn.* **1986**, *48*, 741–747.
9. Shen, Y.; Yang, J.; Li, J.; Shi, X.; Ouyang, L.; Tian, Y.; Lu, J. Carnosine inhibits the proliferation of human gastric cancer SGC-7901 cells through both of the mitochondrial respiration and glycolysis pathways. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e104632. [\[CrossRef\]](#)
10. Iovine, B.; Iannella, M.L.; Nocella, F.; Pricolo, M.R.; Baldi, M.R.; Bevilacqua, M.A. Carnosine inhibits KRas-mediated HCT-116 proliferation by affecting ATP and ROS production. *Cancer Lett.* **2012**, *315*, 122–128. [\[CrossRef\]](#)
11. Ditte, Z.; Ditte, P.; Labudova, M.; Simko, V.; Iuliano, F.; Zatovicova, M.; Csaderova, L.; Pastorekova, S.; Pastorek, J. Carnosine inhibits carbonic anhydrase IX-mediated extracellular acidosis and suppresses growth of HeLa tumor xenografts. *BMC Cancer* **2014**, *14*, 358. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Renner, C.; Seyffarth, A.; de Arriba, S.; Meixensberger, J.; Gebhardt, R.; Gaunitz, F. Carnosine Inhibits Growth of Cells Isolated from Human Glioblastoma Multiforme. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2008**, *14*, 127–135. [\[CrossRef\]](#)
13. Oppermann, H.; Purcz, K.; Birkemeyer, C.; Baran-Schmidt, R.; Meixensberger, J.; Gaunitz, F. Carnosine's inhibitory effect on glioblastoma cell growth is independent of its cleavage. *Amino Acids* **2019**, *51*, 761–772. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Holliday, R.; McFarland, G.A. Inhibition of the growth of transformed and neoplastic cells by the dipeptide carnosine. *Br. J. Cancer* **1996**, *73*, 966–971. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Oppermann, H.; Dietherle, J.; Purcz, K.; Morawski, M.; Eisenlöffel, C.; Müller, W.; Meixensberger, J.; Gaunitz, F. Carnosine selectively inhibits migration of IDH-wildtype glioblastoma cells in a co-culture model with fibroblasts. *Cancer Cell Int.* **2018**, *18*, 111. [\[CrossRef\]](#)
16. Rauen, U.; Klempt, S.; de Groot, H. Histidine-induced injury to cultured liver cells, effects of histidine derivatives and of iron chelators. *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64*, 192–205. [\[CrossRef\]](#)
17. Qiu, J.; Hauske, S.J.; Zhang, S.; Rodriguez-Niño, A.; Albrecht, T.; Pastene, D.O.; van den Born, J.; van Goor, H.; Ruf, S.; Kohlmann, M.; et al. Identification and characterisation of carnostatine (SAN9812), a potent and selective carnosinase (CN1) inhibitor with in vivo activity. *Amino Acids* **2019**, *51*, 7–16. [\[CrossRef\]](#)
18. Gardner, M.L.G.; Illingworth, K.M.; Kelleher, J.; Wood, D. Intestinal-Absorption of the Intact Peptide Carnosine in Man, and Comparison with Intestinal Permeability to Lactulose. *J. Physiol.* **1991**, *439*, 411–422. [\[CrossRef\]](#)
19. Baraniuk, J.N.; El-Amin, S.; Corey, R.; Rayhan, R.; Timbol, C. Carnosine Treatment for Gulf War Illness: A Randomized Controlled Trial. *GJHS* **2013**, *5*, 69–81. [\[CrossRef\]](#)
20. Hajizadeh-Zaker, R.; Ghajar, A.; Mesgarpour, B.; Afarideh, M.; Mohammadi, M.-R.; Akhondzadeh, S. l-Carnosine as an Adjunctive Therapy to Risperidone in Children with Autistic Disorder: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *J. Child Adolesc. Psychopharmacol.* **2018**, *28*, 74–81. [\[CrossRef\]](#)
21. Mehrzad-Saber, Z.; Kheirouri, S.; Noorazar, S.-G. Effects of l-Carnosine Supplementation on Sleep Disorders and Disease Severity in Autistic Children: A Randomized, Controlled Clinical Trial. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2018**, *123*, 72–77. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Akhtar, J.; Khan, A.A.; Ali, Z.; Haider, R.; Shahar Yar, M. Structure-activity relationship (SAR) study and design strategies of nitrogen-containing heterocyclic moieties for their anticancer activities. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *125*, 143–189. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Siwach, A.; Verma, P.K. Synthesis and therapeutic potential of imidazole containing compounds. *BMC Chem.* **2021**, *15*, 12. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Saunders, B.; Elliott-Sale, K.; Artioli, G.G.; Swinton, P.A.; Dolan, E.; Roschel, H.; Sale, C.; Gualano, B.  $\beta$ -alanine supplementation to improve exercise capacity and performance: A systematic review and meta-analysis. *Br. J. Sports Med.* **2017**, *51*, 658–669. [\[CrossRef\]](#)

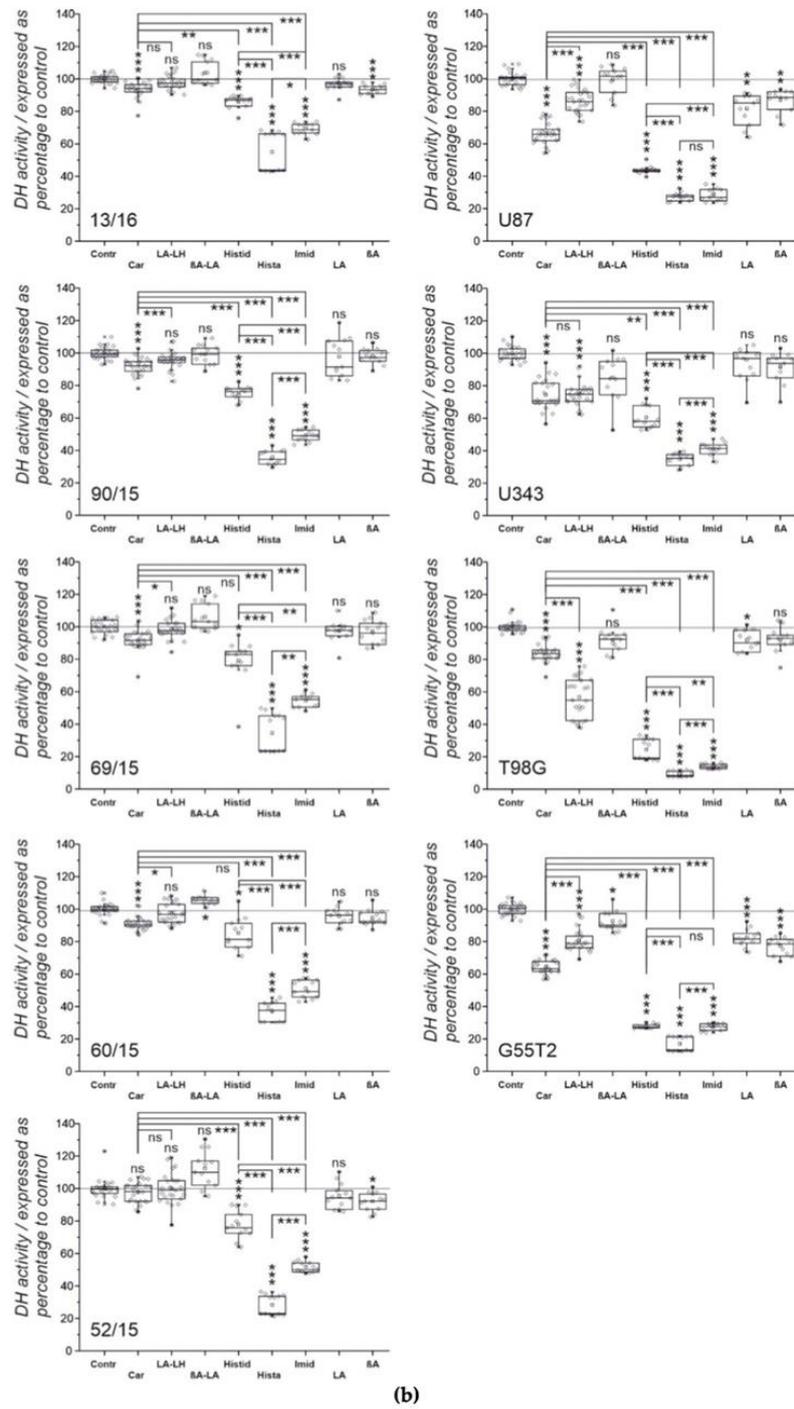
25. Lopachev, A.V.; Abaimov, D.A.; Filimonov, I.S.; Kulichenkova, K.N.; Fedorova, T.N. An assessment of the transport mechanism and intraneuronal stability of L-carnosine. *Amino Acids* **2021**, 1–8. [[CrossRef](#)]
26. Long, Y.; Wang, D. Inhibition of Colon Cancer Cell Growth by Imidazole Through Activation of Apoptotic Pathway. *Med. Sci. Monit.* **2019**, *25*, 7597–7604. [[CrossRef](#)]
27. Zhang, L.; Yao, K.; Fan, Y.; He, P.; Wang, X.; Hu, W.; Chen, Z. Carnosine protects brain microvascular endothelial cells against rotenone-induced oxidative stress injury through histamine H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub> receptors in vitro. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2012**, *39*, 1019–1025. [[CrossRef](#)]
28. Tang, Z.; Li, C.; Kang, B.; Gao, G.; Li, C.; Zhang, Z. GEPIA: A web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, W98–W102. [[CrossRef](#)]
29. Bae, O.-N.; Majid, A. Role of histidine/histamine in carnosine-induced neuroprotection during ischemic brain damage. *Brain Res.* **2013**, *1527*, 246–254. [[CrossRef](#)]
30. Shi, Y.; Lim, S.K.; Liang, Q.; Iyer, S.V.; Wang, H.-Y.; Wang, Z.; Xie, X.; Sun, D.; Chen, Y.-J.; Tabar, V.; et al. Gboxin is an oxidative phosphorylation inhibitor that targets glioblastoma. *Nature* **2019**, *567*, 341–346. [[CrossRef](#)]
31. Morelli, M.B.; Amantini, C.; Nabissi, M.; Cardinali, C.; Santoni, M.; Bernardini, G.; Santoni, A.; Santoni, G. Axitinib induces senescence-associated cell death and necrosis in glioma cell lines: The proteasome inhibitor, bortezomib, potentiates axitinib-induced cytotoxicity in a p21(Waf/Cip1) dependent manner. *Oncotarget* **2017**, *8*, 3380–3395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Uzlíkova, M.; Nohynkova, E. The effect of metronidazole on the cell cycle and DNA in metronidazole-susceptible and -resistant *Giardia* cell lines. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2014**, *198*, 75–81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Schneider, C.A.; Rasband, W.S.; Eliceiri, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 671–675. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Wenig, P.; Odermatt, J. OpenChrom: A cross-platform open source software for the mass spectrometric analysis of chromatographic data. *BMC Bioinform.* **2010**, *11*, 405. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

## Anhang

**Supplement S1**



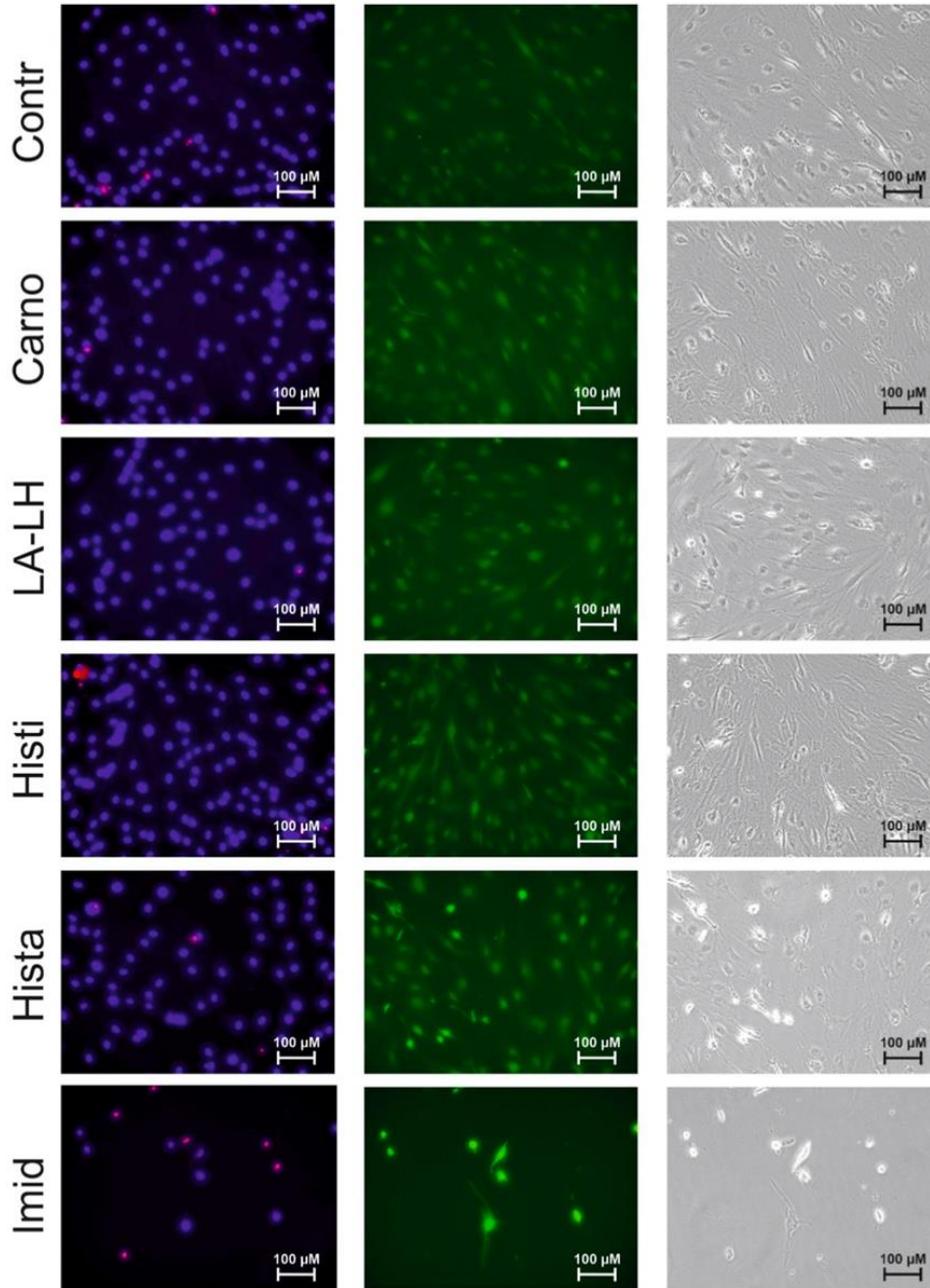
(a)



**Figure S1.** Viability of cells from four glioblastoma and from five fibroblasts cultures derived from patients, cultivated in the presence of imidazole-containing compounds. Patient-derived fibroblast cell cultures (13/16, 90/15, 69/15, 60/15, 52/15) and glioblastoma cell lines (U87, T98G, U87, G55T2)

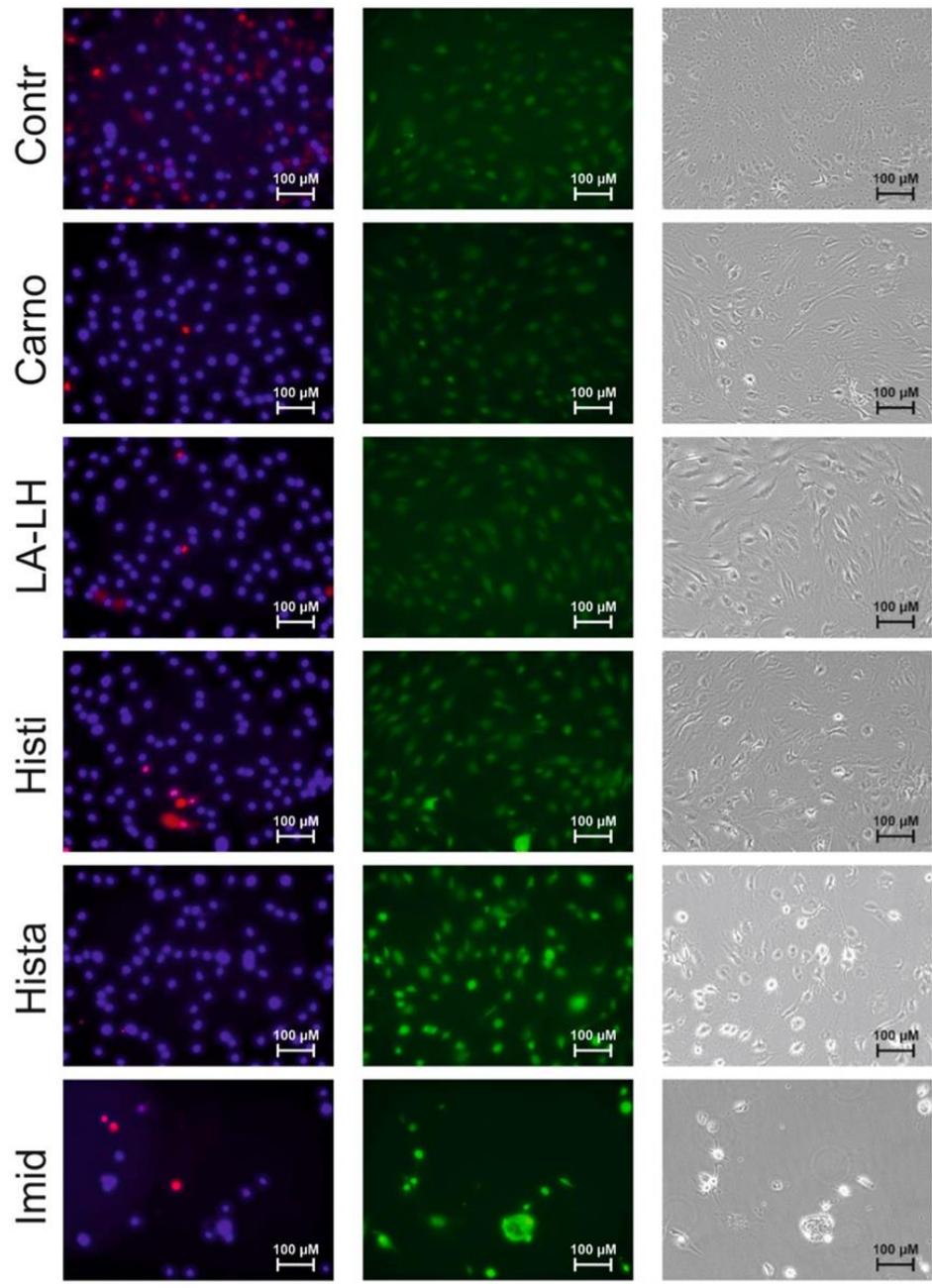
were incubated for 48 hours in the presence of carnosine (Car), L-alanyl-L-histidine (LA-LH),  $\beta$ -alanyl-L-alanyl ( $\beta$ A-LA), L-histidine (Histid), histamine (Hista), imidazole (Imid), L-alanine (LA) and  $\beta$ -alanine ( $\beta$ A) (all 50 mM). Cell viability was determined measuring the amount of ATP in cell lysates (a) and dehydrogenase (DH) activity in living cells (b). Results are presented as box-plots. Statistical analysis was performed using a one-way ANOVA after testing for normality of distribution (Kolmogorov-Smirnov test) and dependent on testing for equality of variances (Levene's test) using a Games-Howell or Bonferroni post hoc test. The level of significance between different compounds is indicated by horizontal lines and compared to Contr above the boxes: \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.005$ ; \*\*\*:  $p < 0.0005$ ; ns: not significant.

Supplement S2



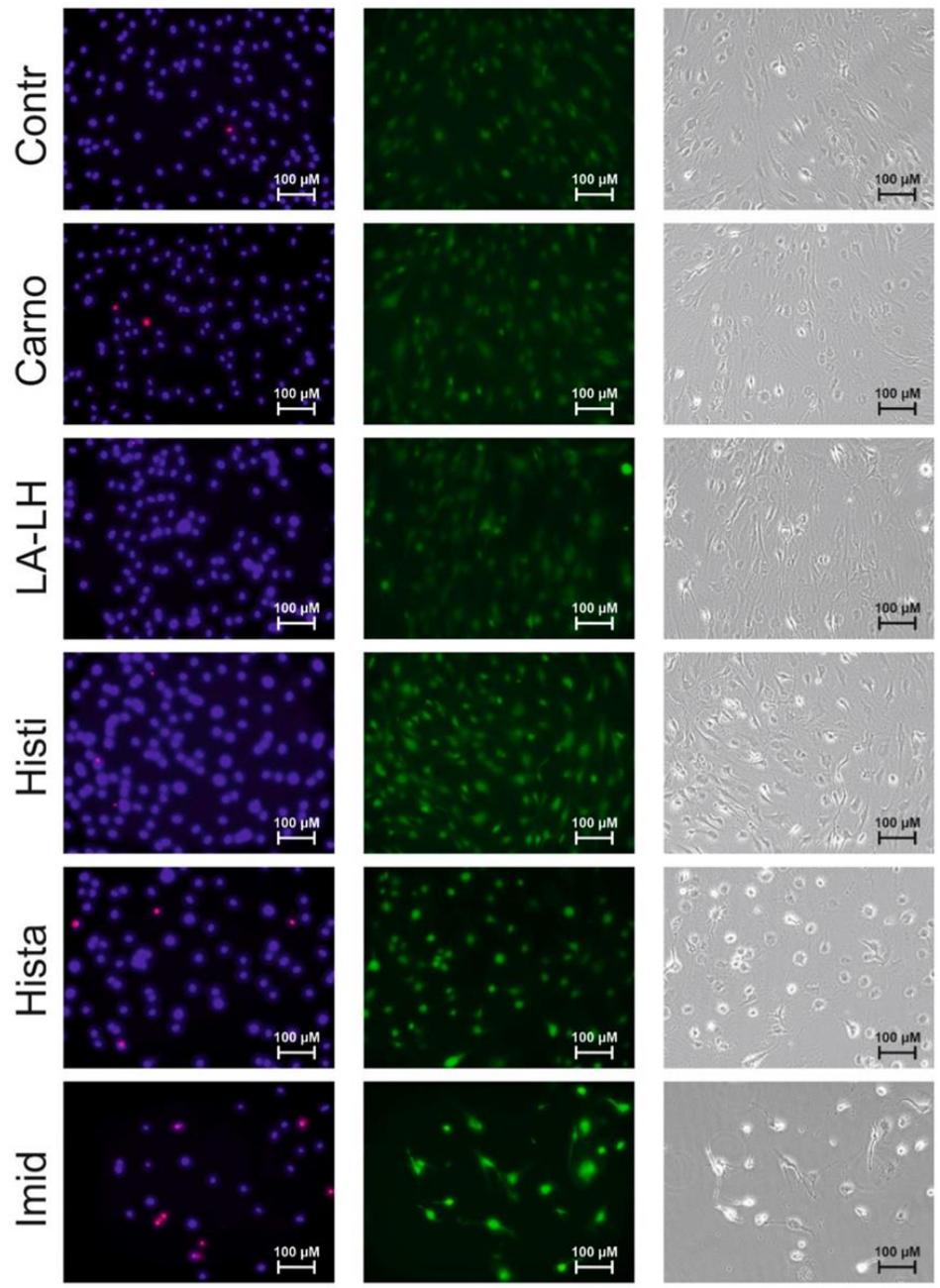
52/15

(a)



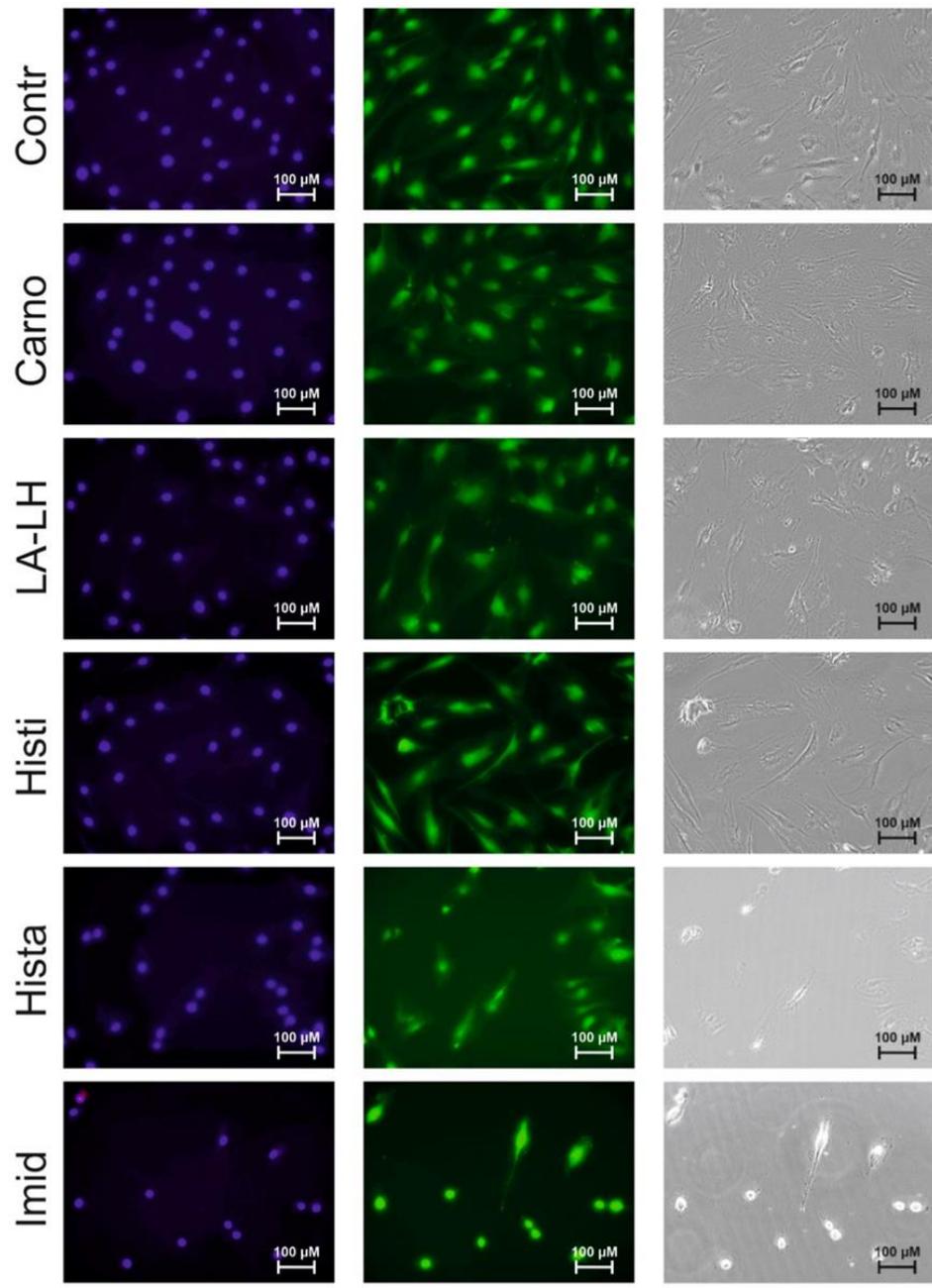
60/15

(b)



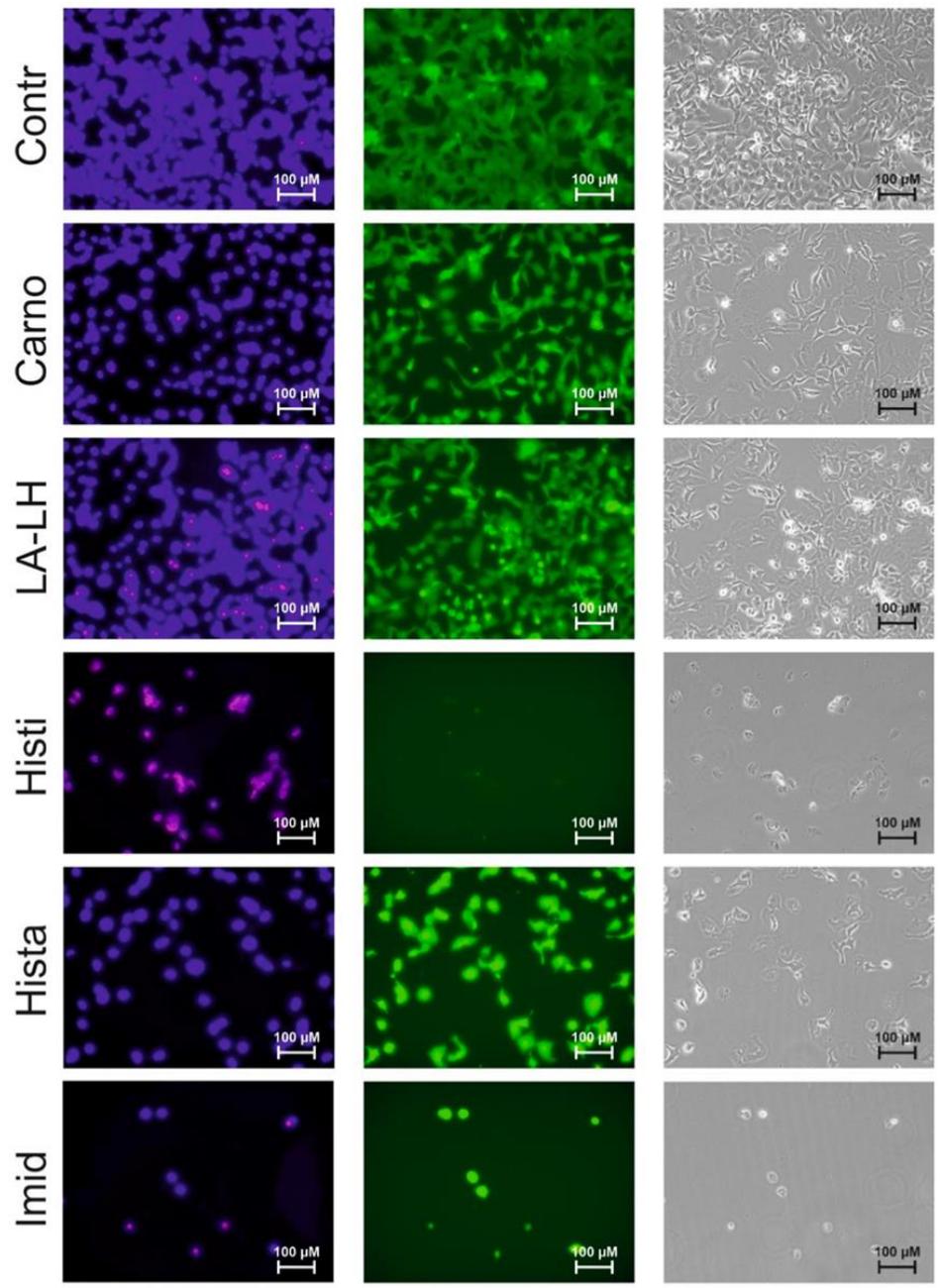
69/15

(c)



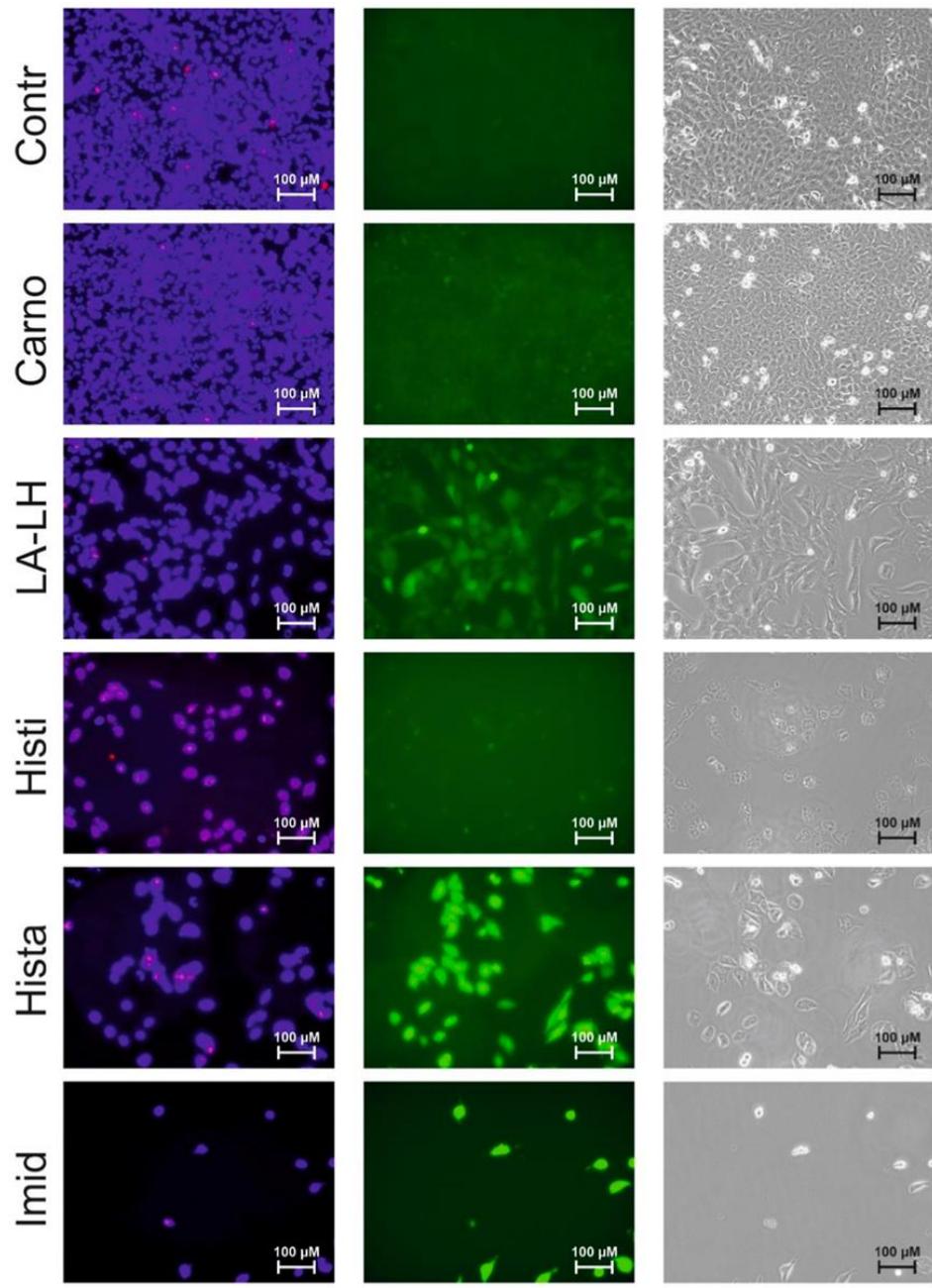
90/15

(d)



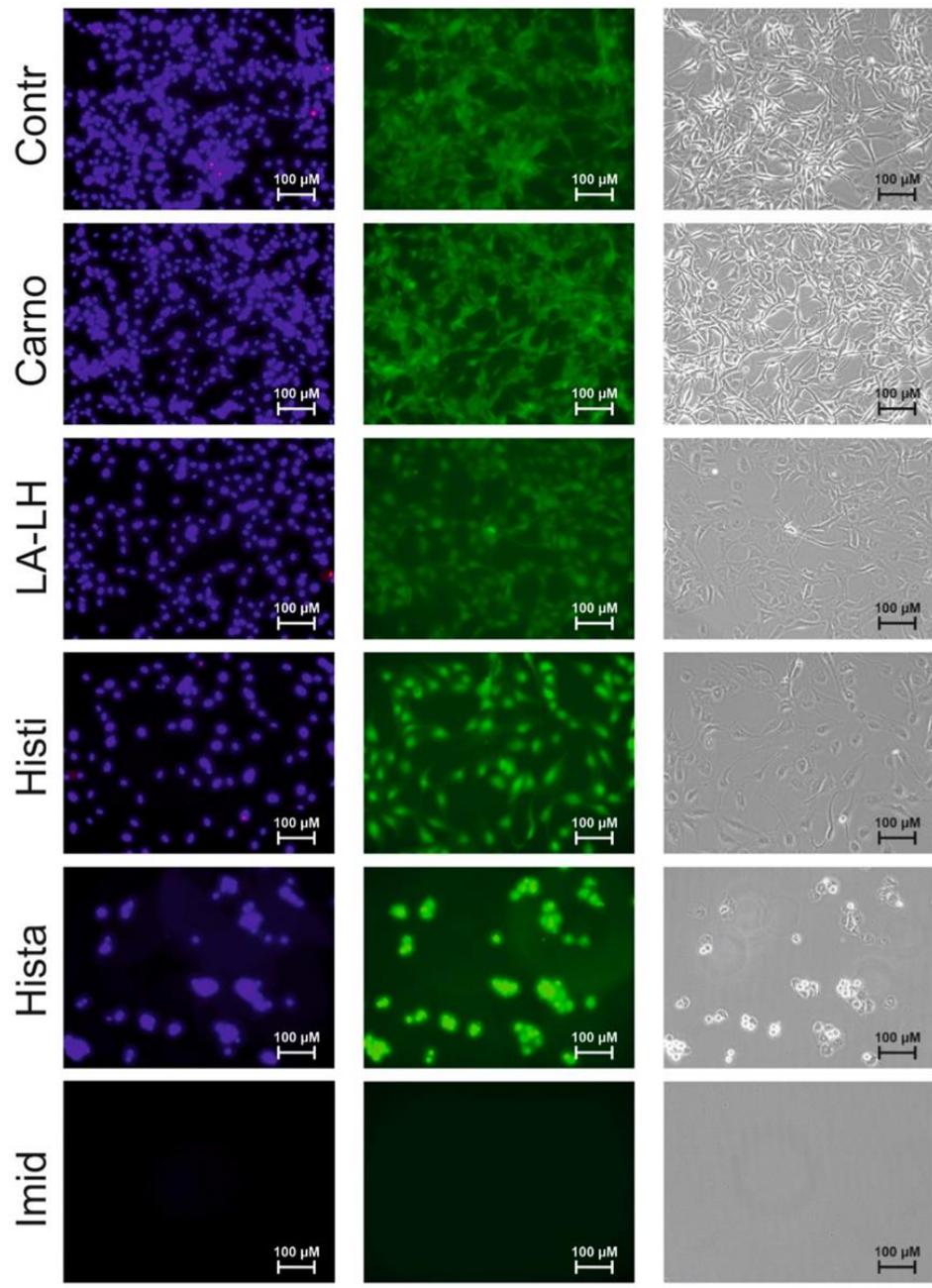
G55T2

(e)



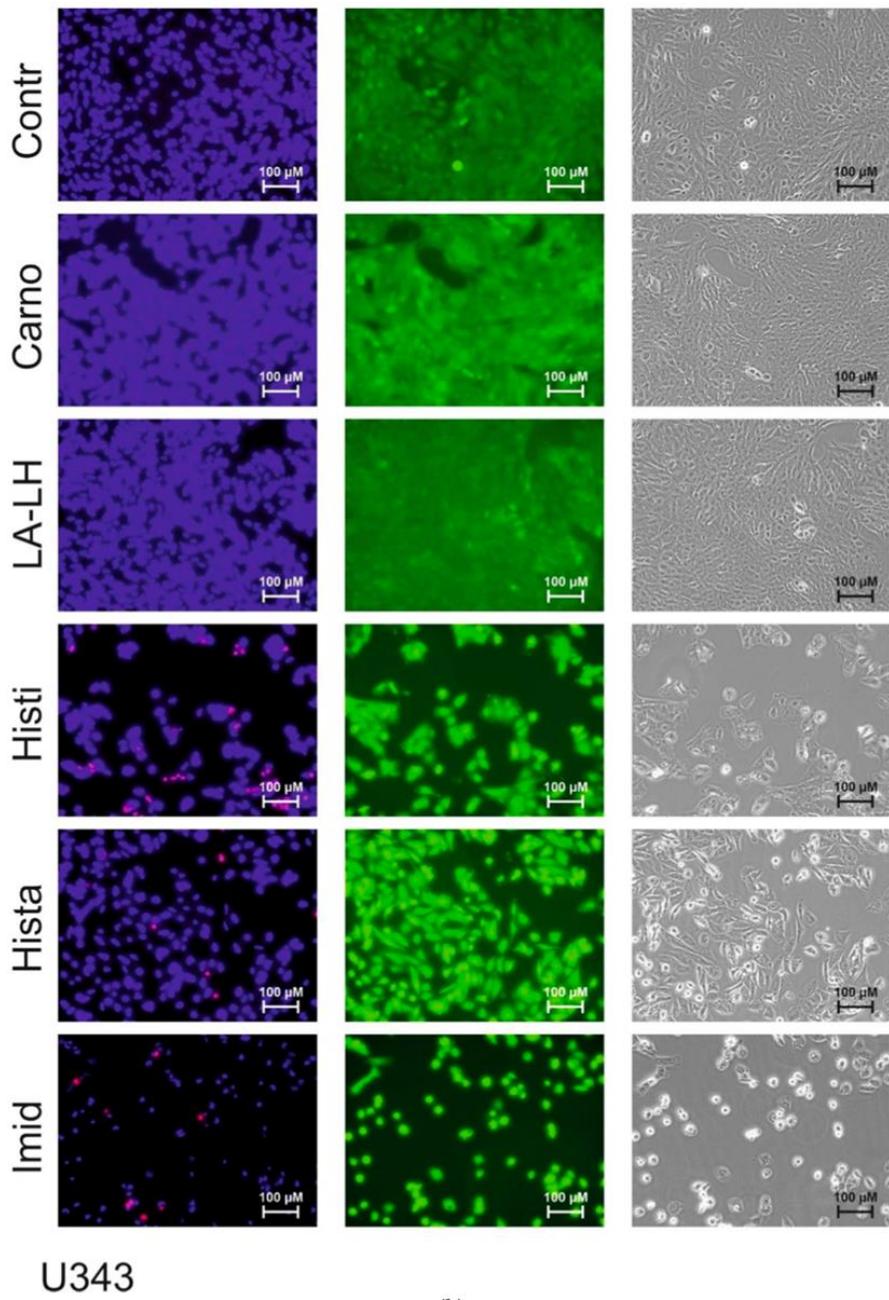
T98G

(f)

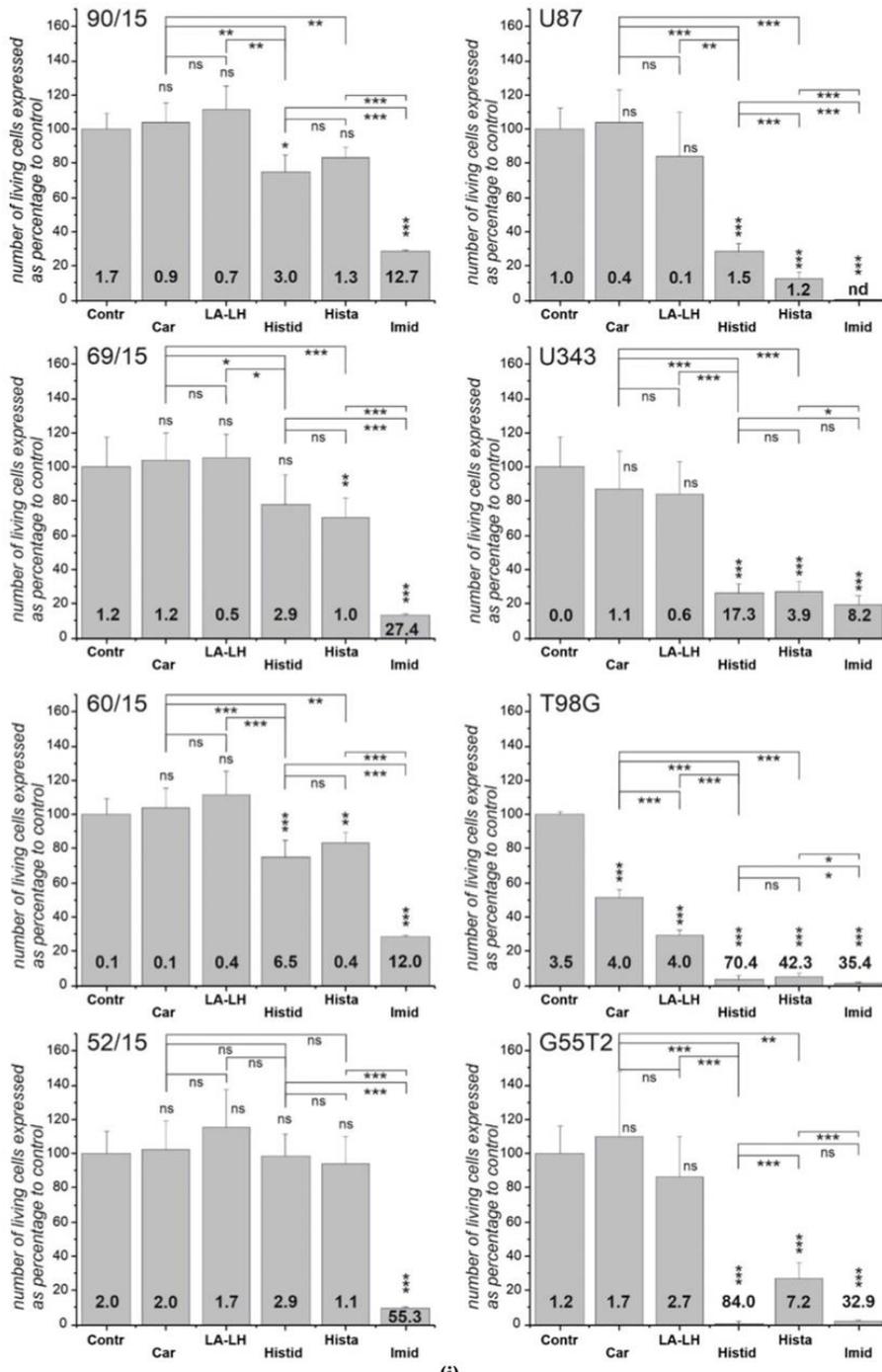


U87

(g)



(h)



(i)

**Figure S2.** Microscopic analysis of fibroblast cell cultures and glioblastoma cells in the presence of different compounds. Cells were treated for 48 hours with camosine (Carno), L-alanyl-L-histidine

(LA-LH), L-histidine (Histi), histamine (Hista), imidazole (Imid) (all 50 mM) or vehicle control (Contr) for 48 hours. Then, microscopic images after staining with Hoechst 33343 (nuclei, blue), propidium iodide (dead cells, red) and Calcein-AM (living cells, green) was performed. Representative images for all investigated cultures are presented on the following pages (a: Fibroblasts 52/15; b: Fibroblasts 60/15; c: Fibroblasts 69/15; d: Fibroblasts 90/15; e: GBM cell line G55T2; f: GBM cell line T98G; g: GBM cell line U87; h: GBM cell line U343). On the left of each panel collection an overlay of nuclei (blue) and of dead cells (red) is shown. The center of each panel collection shows images obtained visualizing Calcein-AM staining of living cells and to the right phase contrast images are shown. Note: in order to compare all images with each other, the same exposition times were used which in some cases results in a blurring image. In (i) box blots are shown that represent the number of living cells under each condition and for all cultures employed (bars) and the ratio of living to dead cells (bold numbers in the bars) as determined by cell counting using ImageJ. Statistical analysis was performed using a one-way ANOVA. The level of significance between different compounds is indicated by horizontal lines and compared to Contr above the bars: \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.005$ ; \*\*\*:  $p < 0.0005$ ; ns: not significant. (Size bars: 100  $\mu\text{m}$ ).

# Zusammenfassung der Arbeit

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

“Viability of Glioblastoma Cells and Fibroblasts in the Presence of Imidazol-Containing Compounds”  
„Zellvitalität von Glioblastomzellen und Fibroblasten in Anwesenheit von imidazolhaltigen Stoffen“

eingereicht von

Elisabeth Christiane Seidel

angefertigt an der

Universitätsklinik Leipzig

Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie

betreut von

Prof. Dr. rer. nat. Frank Gaunitz

Prof. Dr. med. Jürgen Meixensberger

Monat und Jahr (der Einreichung): 01/ 2023

2020 starben 239.600 Menschen in Deutschland an einer Krebserkrankung, davon 5.929 infolge einer bösartigen Neubildung des Gehirns. Damit zählen die Hirntumoren zu den 10 häufigsten Krebserkrankungen in Deutschland [2]. Der häufigste primäre maligne Hirntumor ist das Glioblastom [8]. Selbst unter Ausschöpfung aller Therapiemöglichkeiten ist die Prognose von Glioblastompatienten mit einer 5-Jahresüberlebensrate von 6,6 % sehr schlecht [6]. Durch die hochsensible Lokalisation des Tumors im Gehirn und aufgrund seines invasiven Wachstums sind den therapeutischen Möglichkeiten, wie der Resektion bzw. stereotaktischen Bestrahlung, Grenzen gesetzt. Zusätzlich erschwert die Blut-Hirn-Schranke die Erreichbarkeit des Tumors für systemische Therapien. Ein möglicher therapeutischer Ansatz könnte L-Carnosin sein, ein endogen vorkommendes Dipeptid, für das bereits antineoplastische Effekte - auch für das Glioblastom - nachgewiesen worden sind [55,127]. L-Carnosin setzt sich aus den Aminosäuren L-Histidin und  $\beta$ -

Alanin zusammen. Es findet sich unter anderem in der Muskulatur und im *Bulbus olfactorius* des Menschen [52,59,60]. Neben den antineoplastischen Wirkungen wurden seit der Entdeckung 1900 viele weitere Eigenschaften von L-Carnosin, wie beispielsweise die Reduktion von oxidativem Stress und seine Funktion als Neurotransmitter identifiziert [120].

Ein wesentliches Ziel aktueller Forschung ist die Entschlüsselung des antineoplastischen Wirkmechanismus. L-Histidin, eine Komponente des L-Carnosins, hemmt die Vitalität von Glioblastomzellen ebenfalls [127]. Beiden gemein ist ein Imidazolring als bioaktive Struktur. Da für imidazolhaltige Verbindungen bereits antiproliferative Wirkungen beschrieben wurden, liegt die Vermutung nahe, dass auch die antineoplastischen Effekte von L-Carnosin über Imidazol vermittelt werden [167].

In einer ersten Serie von Experimenten wurde daher der Einfluss von verschiedenen imidazolhaltigen Substanzen auf die Zellvitalität von Glioblastomzelllinien (U87, U343, T98G, G55T2) im Vergleich zu primären Fibroblastenkulturen (13/16, 90/15, 69/15, 60/15, 52/15) untersucht. Hierfür wurden die Zellen jeweils für 48 Stunden im Medium mit jeweils 50 mM unterschiedlicher Testsubstanzen inkubiert und die Zellvitalität einerseits über den ATP-Gehalt im Zelllysat (Cell Titer Glow®, CTG) und andererseits über die Dehydrogenaseaktivität in lebenden Zellen (Cell Titer Blue®, CTB) bestimmt. Unter dem Einfluss der beiden Dipeptide L-Carnosin und L-Alanyl-L-Histidin zeigte sich eine signifikante Reduktion der Zellvitalität der Glioblastomzellen auf mindestens 80 % im Vergleich zu den Kontrollbedingungen in beiden Vitalitätsassays (Ausnahmen: L-Carnosin: T98G im CTB, L-Alanyl-L-Histidin: G55T2 und U87 im CTB). Im Gegensatz dazu fiel die Abnahme der Zellvitalität der primären Fibroblastenkulturen auf maximal 90 % deutlich geringer aus und erreichte nur im Falle von L-Carnosin die statistische Signifikanz. Unter der Annahme, dass der antiproliferative Effekt über L-Histidin bzw. über die Bildung von L-Histamin vermittelt wird, wurde deren Einfluss auf die Zellvitalität untersucht. Nach Inkubation mit beiden Stoffen zeigte sich ebenso wie nach Inkubation mit Imidazol eine signifikante Abnahme der Zellvitalität aller Zellen, wobei der stärkste Effekt unter L-Histamin zu beobachten war (< 40 %). In der Literatur werden auch der zweiten Komponente von L-Carnosin, dem  $\beta$ -Alanin, antineoplastische Wirkungen zugeschrieben [169]. Nach Inkubation mit  $\beta$ -Alanin wie auch seinem L-Enantiomer, L-Alanin, kam es zu einer leichten, aber signifikanten Abnahme der Zellvitalität der malignen Zellen auf maximal 80 %. Die Behandlung mit einem Dipeptid aus beiden Aminosäuren, dem  $\beta$ -Alanyl-L-Alanin, führte zu keiner signifikanten Änderung der Vitalität beider Zelltypen (Ausnahme: G55T2 mit signifikanter Reduktion auf maximal 80 % im CTG und CTB). Insgesamt war der Effekt der getesteten Stoffe vor allem in Bezug auf die Glioblastomzelllinien sehr heterogen.

Unter der Annahme, dass unterschiedliche Wirkprinzipien die Unterschiede im Ansprechen auf die verschiedenen imidazolhaltigen Substanzen bedingen, wurden in einer nächsten Serie von

Experimenten die morphologischen Veränderungen der einzelnen Zellen als ein erster Einblick in die zellulären Prozesse unter den verschiedenen imidazolhaltigen Stoffen und Imidazol selbst untersucht. Hierzu wurden mittels immunhistochemischer Färbungen die Gesamtzellzahl (mit Hoechst 33343), die Anzahl nekrotischer Zellen (mit Propidiumiodid) und die Anzahl der lebenden Zellen (mit Calcein-AM) ermittelt, nachdem die oben genannten Glioblastomzelllinien und vier der oben genannten primären Fibroblastenkulturen (außer 13/16) mit jeweils 50 mM L-Carnosin, L-Alanyl-L-Histidin, L-Histidin, L-Histamin und Imidazol für 48 Stunden inkubiert worden waren. Unter dem Einfluss der beiden Dipeptide L-Carnosin und L-Alanyl-L-Histidin wurde ein tumorspezifischer Effekt bei insgesamt geringer Toxizität ersichtlich. Der Anteil an nekrotischen Zellen war nach Behandlung der Zellen mit L-Histidin, L-Histamin und Imidazol deutlich höher, was z. B. ein Hinweis auf eine unterschiedliche Beeinflussung des Zellmetabolismus durch die verschiedenen Substanzen sein könnte.

Um zu klären, ob der antineoplastische Effekt der Dipeptide L-Carnosin und L-Alanyl-L-Histidin auf eine Freisetzung von L-Histidin zurückzuführen ist und ob es diesbezüglich Unterschiede zwischen malignen und differenzierten Zellen gibt, wurden die Glioblastomzelllinien und die primären Fibroblastenkulturen für 48 Stunden mit 50 mM L-Carnosin und mit 50 mM L-Alanyl-L-Histidin inkubiert. Danach wurden mittels Flüssigchromatographie, gekoppelt mit Massenspektrometrie, die intrazellulären Konzentrationen von L-Carnosin und L-Alanyl-L-Histidin sowie die freigesetzte Menge an L-Histidin gemessen. Während nach Inkubation mit L-Carnosin in allen Zelllinien keine signifikante Menge an L-Histidin gemessen werden konnte, wurde ein signifikanter Anstieg der L-Histidinkonzentration in malignen und differenzierten Zellen nach Inkubation mit L-Alanyl-L-Histidin detektiert. Weder unter dem Einfluss von L-Carnosin noch unter dem Einfluss von L-Alanyl-L-Histidin wurden relevante Mengen von L-Histamin gemessen. Exemplarisch behandelten wir eine Glioblastomzelllinie (T98G) mit 50 mM L-Histidin und 50 mM L-Histamin über 48 Stunden. L-Histamin sowie sein Abbauprodukt N-Methylhistamin konnte nach Inkubation der Zellen mit L-Histamin in den Zellen nachgewiesen werden. Nach Inkubation mit L-Histidin hingegen zeigte sich kein signifikanter Anstieg der L-Histaminmenge.

Zusammenfassend kann für die beiden Dipeptide L-Carnosin und L-Alanyl-L-Histidin ein tumorspezifischer, wachstumshemmender Effekt postuliert werden. Trotz vergleichbarer Ergebnisse in den Vitalitätsassays und den immunhistochemischen Färbungen wurde unter dem Einfluss von L-Alanyl-L-Histidin eine signifikante intrazelluläre Freisetzung von L-Histidin gemessen, während L-Carnosin nicht gespalten wurde. Ob mit der intrazellulären Spaltung von L-Alanyl-L-Histidin auch eine verringerte Halbwertszeit der antiproliferativen Wirkung einhergeht, kann mit den vorliegenden Experimenten nicht beantwortet werden. Die höhere Toxizität des L-Histidins gegenüber differenzierten Zellen wurde unabhängig von der intrazellulären Freisetzung der Aminosäure durch die Kopplung mit einem Alanin abgeschwächt. Ebenfalls unabhängig von der intrazellulären

Freisetzung des L-Histidins ließen sich keine Belege dafür finden, dass der antineoplastische Effekt auf die Bildung von L-Histamin, was ebenfalls antiproliferative Eigenschaften aufwies, zurückzuführen ist. Insgesamt scheint der Imidazolring im Histidinanteil des L-Carnosins als bioaktive Struktur für die antineoplastische Wirkung verantwortlich zu sein. Aufgrund seines im Vergleich zu L-Histidin, L-Histamin und Imidazol spezifischeren Effekts ist davon auszugehen, dass die antineoplastische Wirkung von L-Carnosin noch über andere Mechanismen vermittelt wird z. B. über eine Beeinflussung des Zellmetabolismus [170]. Weitere Untersuchungen zum Wirkmechanismus von L-Carnosin sind jedoch erforderlich, ehe ein Einsatz als Therapeutikum vorstellbar ist. Dem Problem der schnellen Spaltung durch die Serumcarnosinase könnte dann beispielsweise mit der Derivatentwicklung entgegengewirkt werden, über die die antineoplastische Wirkung bei verbesserter Bioverfügbarkeit erhalten bleiben könnte [83,161].

## Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt. Gesundheit: Todesursachen in Deutschland 2015. verfügbar online: [https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen2120400157004.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen2120400157004.pdf?__blob=publicationFile) (zuletzt abgerufen am 25 June 2018).
2. Statistisches Bundesamt. Todesursachenstatistik 2020: Zahl der Todesfälle um 4,9 % gestiegen. verfügbar online: [https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2021/11/PD21\\_505\\_23211.html](https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2021/11/PD21_505_23211.html) (zuletzt abgerufen am 9 August 2022).
3. Hashim, D.; Boffetta, P.; La Vecchia, C.; Rota, M.; Bertuccio, P.; Malvezzi, M.; Negri, E. The global decrease in cancer mortality: Trends and disparities. *Ann. Oncol.* **2016**, *27*, 926–933, doi:10.1093/annonc/mdw027.
4. Stupp, R.; Mason, W.P.; van den Bent, M.J.; Weller, M.; Fisher, B.; Taphoorn, M.; Belanger, K.; Brandes, A.A.; Marosi C.; Bogdahn, U.; et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *Cancer/Radiothérapie* **2005**, *9*, 196–197, doi:10.1016/j.canrad.2005.05.001.
5. Statistisches Bundesamt. Todesursachen in Deutschland. verfügbar online: [https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/\\_inhalt.html](https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html) (zuletzt abgerufen am 9 August 2022).
6. Low, J.T.; Ostrom, Q.T.; Cioffi, G.; Neff, C.; Waite, K.A.; Kruchko, C.; Barnholtz-Sloan, J.S. Primary brain and other central nervous system tumors in the United States (2014-2018): A summary of the CBTRUS statistical report for clinicians. *Neurooncol. Pract.* **2022**, *9*, 165–182, doi:10.1093/nop/npac015.
7. Louis, D.N.; Suva, M.L.; Burger, P.C.; Perry, A.; Kleihues, P.; Aldape, K.D.; Brat, D.J.; Biernat, W.; Bigner, D.D.; Nakazato, Y.; et al. Diffuse gliomas. In *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*, 4.th ed.; Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestier, O.D., Caeneë, K., Ellison, D.W., Figarella-Branger, D., Perry, A., Reifenberger, G., Deimling, A. von, Eds.; International Agency for Research on Cancer (IARC): 69372 Lyon Cedex 08, France, 2016; pp 28–47, ISBN 978-92-832-4492-9.
8. Gittleman, H.; Boscia, A.; Ostrom, Q.T.; Truitt, G.; Fritz, Y.; Kruchko, C.; Barnholtz-Sloan, J.S. Survivorship in Adults with Malignant Brain and other Central Nervous System Tumor from 2000-2014. *Neuro-oncology.* **2018**, *20*, vii6–vii16, doi:10.1093/neuonc/noy090.

9. Ostrom, Q.T.; Patil, N.; Cioffi, G.; Waite, K.; Kruchko, C.; Barnholtz-Sloan, J.S. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2013-2017. *Neuro-oncology*. **2020**, *22*, iv1-iv96, doi:10.1093/neuonc/noaa200.
10. Ostrom, Q.T.; Bauchet, L.; Davis, F.G.; Deltour, I.; Fisher, J.L.; Langer, C.E.; Pekmezci, M.; Schwartzbaum, J.A.; Turner, M.C.; Walsh, K.M.; et al. The epidemiology of glioma in adults: A "state of the science" review. *Neuro-oncology*. **2014**, *16*, 896–913, doi:10.1093/neuonc/nou087.
11. Weller, M.; van den Bent, M.; Preusser, M.; Le Rhun, E.; Tonn, J.C.; Minniti, G.; Bendszus, M.; Balana, C.; Chinot, O.; Dirven, L.; et al. EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2021**, *18*, 170–186, doi:10.1038/s41571-020-00447-z.
12. Siddiqui, J.; Krishnan, A.S. Butterfly Glioma. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *378*, 281, doi:10.1056/NEJMicm1704713.
13. Weller, M.; Knobbe-Thomsen, C.B.; Le Rhun, E.; Reifenberger, G. Die WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems 2021. *Onkologie* **2022**, *28*, 155–163, doi:10.1007/s00761-021-01083-7.
14. Louis, D.N.; Perry, A.; Wesseling, P.; Brat, D.J.; Cree, I.A.; Figarella-Branger, D.; Hawkins, C.; Ng, H.K.; Pfister, S.M.; Reifenberger, G.; et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-oncology*. **2021**, *23*, 1231–1251, doi:10.1093/neuonc/noab106.
15. Krebsinformationsdienst. Deutsches Krebsforschungszentrum. Gliome: Neues aus der Diagnostik - Genetische Veränderungen bei Hirntumoren entscheidend. verfügbar online: <https://www.krebsinformationsdienst.de/fachkreise/nachrichten/2022/fk06-hirntumor-diagnostik-gliom-klassifikation-neu.php> (zuletzt abgerufen am 9 August 2022).
16. Hegi, M.E.; Diserens, A.-C.; Gorlia, T.; Hamou, M.-F.; Tribolet, N. de; Weller, M.; Kros, J.M.; Hainfellner, J.A.; Mason, W.; Mariani, L.; et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 997–1003, doi:10.1056/NEJMoa043331.
17. Stupp, R.; Taillibert, S.; Kanner, A.; Read, W.; Steinberg, D.; Lhermitte, B.; Toms, S.; Idbaih, A.; Ahluwalia, M.S.; Fink, K.; et al. Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* **2017**, *318*, 2306–2316, doi:10.1001/jama.2017.18718.
18. Wick W. et al. Gliome, S2k-Leitlinie. Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. verfügbar online: [https://dgn.org/wp-content/uploads/2021/07/030099\\_LL\\_Gliome\\_2021\\_final.pdf](https://dgn.org/wp-content/uploads/2021/07/030099_LL_Gliome_2021_final.pdf) (zuletzt abgerufen am 14 July 2022).

19. Weller, M.; Cloughesy, T.; Perry, J.R.; Wick, W. Standards of care for treatment of recurrent glioblastoma-are we there yet? *Neuro-oncology*. **2013**, *15*, 4–27, doi:10.1093/neuonc/nos273.
20. Olar, A.; Aldape, K.D. Using the molecular classification of glioblastoma to inform personalized treatment. *J. Pathol.* **2014**, *232*, 165–177, doi:10.1002/path.4282.
21. Alifieris, C.; Trafalis, D.T. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacol. Ther.* **2015**, *152*, 63–82, doi:10.1016/j.pharmthera.2015.05.005.
22. Huang, B.; Zhang, H.; Gu, L.; Ye, B.; Jian, Z.; Stary, C.; Xiong, X. Advances in Immunotherapy for Glioblastoma Multiforme. *J. Immunol. Res.* **2017**, *2017*, 11 pages, doi:10.1155/2017/3597613.
23. Kurz, S.C.; Wen, P.Y. Quo Vadis-Do Immunotherapies Have a Role in Glioblastoma? *Curr. Treat. Options Neurol.* **2018**, *20*, 23 pages, doi:10.1007/s11940-018-0499-0.
24. Seystahl, K.; Gramatzki, D.; Roth, P.; Weller, M. Pharmacotherapies for the treatment of glioblastoma - current evidence and perspectives. *Expert Opin. Pharmacother.* **2016**, *17*, 1259–1270, doi:10.1080/14656566.2016.1176146.
25. Wilson, T.A.; Karajannis, M.A.; Harter, D.H. Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. *Surg. Neurol. Int.* **2014**, *5*, 18 pages, doi:10.4103/2152-7806.132138.
26. Khaddour, K.; Johanns, T.M.; Ansstas, G. The Landscape of Novel Therapeutics and Challenges in Glioblastoma Multiforme: Contemporary State and Future Directions. *Pharmaceutical* **2020**, *13*, 26 pages, doi:10.3390/ph13110389.
27. Birzu, C.; French, P.; Caccese, M.; Cerretti, G.; Idbaih, A.; Zagonel, V.; Lombardi, G. Recurrent Glioblastoma: From Molecular Landscape to New Treatment Perspectives. *Cancers (Basel)* **2020**, *13*, 29 pages, doi:10.3390/cancers13010047.
28. Chaudhry, I.H.; O'Donovan, D.G.; Brenchley, P.E.C.; Reid, H.; Roberts, I.S.D. Vascular endothelial growth factor expression correlates with tumour grade and vascularity in gliomas. *Histopathology* **2001**, *39*, 409–415, doi:10.1046/j.1365-2559.2001.01230.x.
29. Friedman, H.S.; Prados, M.D.; Wen, P.Y.; Mikkelsen, T.; Schiff, D.; Abrey, L.E.; Yung, W.K.A.; Paleologos, N.; Nicholas, M.K.; Jensen, R.; et al. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 4733–4740, doi:10.1200/JCO.2008.19.8721.
30. Weller, M.; van den Bent, M.; Hopkins, K.; Tonn, J.C.; Stupp, R.; Falini, A.; Cohen-Jonathan-Moyal, E.; Frappaz, D.; Henriksson, R.; Balana, C.; et al. EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma. *Lancet Oncol.* **2014**, *15*, e395-e403, doi:10.1016/S1470-2045(14)70011-7.
31. Wick, W.; Gorlia, T.; Bendszus, M.; Taphoorn, M.; Sahm, F.; Harting, I.; Brandes, A.A.; Taal, W.; Domont, J.; Idbaih, A.; et al. Lomustine and Bevacizumab in Progressive Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *377*, 1954–1963, doi:10.1056/NEJMoa1707358.

32. Clarke, J.L.; Chang, S. Pseudoprogression and pseudoresponse: challenges in brain tumor imaging. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **2009**, *9*, 241–246, doi:10.1007/s11910-009-0035-4.
33. Strauss, S.B.; Meng, A.; Ebani, E.J.; Chiang, G.C. Imaging Glioblastoma Posttreatment: Progression, Pseudoprogression, Pseudoresponse, Radiation Necrosis. *Neuroimaging Clin. N. Am.* **2021**, *31*, 103–120, doi:10.1016/j.nic.2020.09.010.
34. Wick, W.; Puduvalli, V.K.; Chamberlain, M.C.; van den Bent, M.J.; Carpentier, A.F.; Cher, L.M.; Mason, W.; Weller, M.; Hong, S.; Musib, L.; et al. Phase III study of enzastaurin compared with lomustine in the treatment of recurrent intracranial glioblastoma. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 1168–1174, doi:10.1200/JCO.2009.23.2595.
35. Groot, J.F. de; Lamborn, K.R.; Chang, S.M.; Gilbert, M.R.; Cloughesy, T.F.; Aldape, K.; Yao, J.; Jackson, E.F.; Lieberman, F.; Robins, H.I.; et al. Phase II study of aflibercept in recurrent malignant glioma: A North American Brain Tumor Consortium study. *J. Clin. Oncol.* **2011**, *29*, 2689–2695, doi:10.1200/JCO.2010.34.1636.
36. Swartz, A.M.; Li, Q.-J.; Sampson, J.H. Rindopepimut: A promising immunotherapeutic for the treatment of glioblastoma multiforme. *Immunotherapy* **2014**, *6*, 679–690, doi:10.2217/imt.14.21.
37. Liau, L.M.; Ashkan, K.; Tran, D.D.; Campian, J.L.; Trusheim, J.E.; Cobbs, C.S.; Heth, J.A.; Salacz, M.; Taylor, S.; D'Andre, S.D.; et al. First results on survival from a large Phase 3 clinical trial of an autologous dendritic cell vaccine in newly diagnosed glioblastoma. *J. Transl. Med.* **2018**, *16*, 9 pages, doi:10.1186/s12967-018-1507-6.
38. Schuster, J.; Lai, R.K.; Recht, L.D.; Reardon, D.A.; Paleologos, N.A.; Groves, M.D.; Mrugala, M.M.; Jensen, R.; Baehring, J.M.; Sloan, A.; et al. A phase II, multicenter trial of rindopepimut (CDX-110) in newly diagnosed glioblastoma: The ACT III study. *Neuro-oncology.* **2015**, *17*, 854–861, doi:10.1093/neuonc/nou348.
39. Reardon, A.D.; Desjardins, A.; Schuster, J.; Tran, D.D.; Fink, K.L.; Nabors, L.B.; Li, G.; Bota, D.A.; Lukas, R.V.; Ashby, L.S.; et al. IMCT-08. ReACT: Long-Term Survival from a randomized phase II study of Rindopepimut(CDX-110) plus Bevacicumab in relapsed Glioblastoma. *Neuro-oncology.* **2015**, *17*, v107–v112. doi:10.1093.
40. Robert, C.; Long, G.V.; Brady, B.; Dutriaux, C.; Maio, M.; Mortier, L.; Hassel, J.C.; Rutkowski, P.; McNeil, C.; Kalinka-Warzocha, E.; et al. Nivolumab in previously untreated Melanoma without BRAF mutation. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *372*, 320–330, doi:10.22334/jbhost.v6i2.217.s47.
41. Esfahani, K.; Roudaia, L.; Buhlaiga, N.; Del Rincon, S.V.; Papneja, N.; Miller, W.H. A review of cancer immunotherapy: from the past, to the present, to the future. *Curr Oncol.* **2020**, *27*, 87–97, doi:10.3747/co.27.5223.

42. Brennan, C.W.; Verhaak, R.G.W.; McKenna, A.; Campos, B.; Nounshmehr, H.; Salama, S.R.; Zheng, S.; Chakravarty, D.; Sanborn, J.Z.; Berman, S.H.; et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* **2013**, *155*, 462–477, doi:10.1016/j.cell.2013.09.034.
43. Anjum, K.; Shagufta, B.I.; Abbas, S.Q.; Patel, S.; Khan, I.; Shah, S.A.A.; Akhter, N.; Hassan, S.S.U. Current status and future therapeutic perspectives of glioblastoma multiforme (GBM) therapy: A review. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *92*, 681–689, doi:10.1016/j.biopha.2017.05.125.
44. Ma, D.J.; Galanis, E.; Anderson, S.K.; Schiff, D.; Kaufmann, T.J.; Peller, P.J.; Giannini, C.; Brown, P.D.; Uhm, J.H.; McGraw, S.; et al. A phase II trial of everolimus, temozolomide, and radiotherapy in patients with newly diagnosed glioblastoma: NCCTG N057K. *Neuro-oncology.* **2015**, *17*, 1261–1269, doi:10.1093/neuonc/nou328.
45. Westphal, M.; Heese, O.; Steinbach, J.P.; Schnell, O.; Schackert, G.; Mehdorn, M.; Schulz, D.; Simon, M.; Schlegel, U.; Senft, C.; et al. A randomised, open label phase III trial with nimotuzumab, an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in the treatment of newly diagnosed adult glioblastoma. *Eur. J. Cancer* **2015**, *51*, 522–532, doi:10.1016/j.ejca.2014.12.019.
46. Cloughesy, T.; Finocchiaro, G.; Belda-Iniesta, C.; Recht, L.; Brandes, A.A.; Pineda, E.; Mikkelsen, T.; Chinot, O.L.; Balana, C.; Macdonald, D.R.; et al. Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicenter Phase II Study of Onartuzumab Plus Bevacizumab Versus Placebo Plus Bevacizumab in Patients With Recurrent Glioblastoma: Efficacy, Safety, and Hepatocyte Growth Factor and O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase Biomarker Analyses. *J. Clin. Oncol.* **2017**, *35*, 343–351, doi:10.1200/JCO.2015.64.7685.
47. Gong, X.; Schwartz, P.H.; Linskey, M.E.; Bota, D.A. Neural stem/progenitors and glioma stem-like cells have differential sensitivity to chemotherapy. *Neurology* **2011**, *76*, 1126–1134, doi:10.1212/WNL.0b013e318212a89f.
48. Chen, J.; Li, Y.; Yu, T.-S.; McKay, R.M.; Burns, D.K.; Kernie, S.G.; Parada, L.F. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature* **2012**, *488*, 522–526, doi:10.1038/nature11287.
49. Galli, R.; Binda, E.; Orfanelli, U.; Cipelletti, B.; Gritti, A.; Vitis, S. de; Fiocco, R.; Foroni, C.; Dimeco, F.; Vescovi, A. Isolation and Characterization of Tumorigenic, Stem-like Neural Precursors from Human Glioblastoma. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 7011–7021., doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1364.
50. Gulewitsch, W.I.; Amiradzibi, S. Ueber das Carnosin, eine neue organische Base des Fleischextractes. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1900**, *33*, 1902-1903, doi:10.1002/cber.19000330275.
51. Bauman, L.; Ingvaldsen, T. Concerning histidine and carnosin. The synthesis of carnosine. *J. Biol. Chem.* **1918**, *35*, 263–276, doi:10.3181/00379727-15-197.

52. Barger, G.; Tutin, F. Carnosine, constitution and synthesis. *Biochem. J.* **1918**, *12*, 402–407, doi:10.1042/bj0120402.
53. Attanasio, F.; Cataldo, S.; Fisichella, S.; Nicoletti, S.; Nicoletti, V.G.; Pignataro, B.; Savarino, A.; Rizzarelli, E. Protective Effects of l - and d -Carnosine on  $\alpha$ -Crystallin Amyloid Fibril Formation: Implications for Cataract Disease. *Biochemistry* **2009**, *48*, 6522–6531, doi:10.1021/bi900343n.
54. Menini, S.; Iacobini, C.; Ricci, C.; Blasetti Fantauzzi, C.; Pugliese, G. Protection from diabetes-induced atherosclerosis and renal disease by D-carnosine-octylester: Effects of early vs late inhibition of advanced glycation end-products in Apoe-null mice. *Diabetologia* **2015**, *58*, 845–853, doi:10.1007/s00125-014-3467-6.
55. Holliday, R.; McFarland, G.A. Inhibition of the growth of transformed and neoplastic cells by the dipeptide carnosine. *Br. J. Cancer* **1996**, *73*, 966–971, doi:10.1038/bjc.1996.189.
56. Crush, K. Carnosine and related substances in animal tissues. *Comp. Biochem. Physiol.* **1970**, *34*, 3–30, doi:10.1016/0010-406X(70)90049-6.
57. Boldyrev, A.A.; Aldini, G.; Derave, W. Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiol. Rev.* **2013**, *93*, 1803–1845, doi:10.1152/physrev.00039.2012.
58. Christman A. A. Determination of Anserine, Carnosine and Other Histidine Compounds in Muscle Extractives. *Anal. Biochem.* **1971**, *39*, 181–187, doi:10.1016/0003-2697(71)90474-x.
59. Mannion, A.F.; Jakeman, P.M.; Dunnett, M.; Harris, R.C.; Willan, P.L.T. Carnosine and anserine concentrations in the quadriceps femoris muscle of healthy humans. *Europ. J. Appl. Physiol.* **1992**, *64*, 47–50, doi:10.1007/BF00376439.
60. Neidle, A.; Kandra, J. Carnosine — an olfactory bulb peptide. *Brain Res.* **1974**, *80*, 359–364, doi:10.1016/0006-8993(74)90701-X.
61. Kish, S.J.; Perry, T.L.; Hansen, S. Regional distribution of Homocarnosine, Homocarnosine-Carnosine Synthetase and Homocarnosinase in Human Brain. *J. Neurochem.* **1979**, *32*, 1629–1636, doi:10.1111/j.1471-4159.1979.tb02272.x.
62. o. V. L-Carnosin. verfügbar online: <https://www.carlroth.com/de/de/aminosaeuren-dimere/l-carnosin/p/4148.1> (zuletzt abgerufen am 9 August 2022).
63. Winnick R. E.; Winnick T. Carnosine-Anserine Synthetase of Muscle: Preparation and Properties of a soluble Enzyme from Chicken Muscle. *Biochim. Biophys. Acta* **1959**, *31*, 47–55, doi:10.1016/0006-3002(59)90437-8.
64. Kalyankar, G.D.; Meister, A. Enzymatic Synthesis of Carnosine and related  $\beta$ -Alanyl and  $\gamma$ -Aminobutyryl Peptides. *J. Biol. Chem.* **1959**, *234*, 3210–3218, doi:10.1016/S0021-9258(18)69651-6.

65. Bauer, K.; Hallermayer, K.; Salnikow, J.; Kleinkauf, H.; Hamprecht, B. Biosynthesis of Carnosine and Related Peptides Primary Culture. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 3593–3597, doi:10.1016/S0021-9258(18)34821-X.
66. Winnick, T.; Winnick, R.E. Pathways and the physiological site of anserine formation. *Nature* **1959**, *183*, 1466–1468, doi:10.1038/1831466a0.
67. Drozak, J.; Chrobok, L.; Poleszak, O.; Jagielski, A.K.; Derlacz, R. Molecular identification of carnosine N-methyltransferase as chicken histamine N-methyltransferase-like protein (hnmt-like). *PLoS ONE* **2013**, *8*, 11 pages, doi:10.1371/journal.pone.0064805.
68. Drozak, J.; Veiga-da-Cunha, M.; Vertommen, D.; Stroobant, V.; van Schaftingen, E. Molecular identification of carnosine synthase as ATP-grasp domain-containing protein 1 (ATPGD1). *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 9346–9356, doi:10.1074/jbc.M109.095505.
69. Hoffmann, A.M.; Bakardjiev, A.; Bauer, K. Carnosine-synthesis in cultures of rat glial cells is restricted to oligodendrocytes and carnosine uptake to astrocytes. *Neurosci. Lett.* **1996**, *215*, 29–32, doi:10.1016/S0304-3940(96)12937-2.
70. Peters, V.; Klessens, C.Q.F.; Baelde, H.J.; Singler, B.; Veraar, K.A.M.; Zutinic, A.; Drozak, J.; Zschocke, J.; Schmitt, C.P.; Heer, E. de. Intrinsic carnosine metabolism in the human kidney. *Amino Acids* **2015**, *47*, 2541–2550, doi:10.1007/s00726-015-2045-7.
71. Bakardjiev, A. Biosynthesis of carnosine in primary cultures of rat olfactory bulb. *Neurosci. Lett.* **1997**, *227*, 115–118, doi:10.1016/S0304-3940(97)00315-7.
72. Harding, J.W.; O'Fallon, J.V. The subcellular distribution of carnosine, carnosine synthetase, and carnosinase in mouse olfactory tissues. *Brain Res.* **1979**, *173*, 99–108, doi:10.1016/0006-8993(79)91099-0.
73. Boldyrev, A.A.; Severin, S.E. The Histidine-containing Dipeptides, Carnosine and Anserine: Distribution, Properties and biological Significance. *Adv Enzyme Regul.* **1990**, *30*, 175–188, doi:10.1016/0065-2571(90)90017-v.
74. Hanson, H.T.; Smith, E.L. Carnosinase: an enzyme of swine kidney. *J. Biol. Chem.* **1949**, *179*, 789–801, doi:10.1016/S0021-9258(19)51272-8.
75. Lenney, J.F.; George, R.P.; Weiss, A.M.; Kucera, C.M.; Chan, P.W.H.; Rinzler, G.S. Human serum carnosinase: characterization, distinction from cellular carnosinase, and activation by cadmium. *Clin. Chim. Acta* **1982**, *123*, 221–231, doi:10.1016/0009-8981(82)90166-8.
76. Lenney, J.F.; Peppers, S.C.; Kucera-Orallo, C.M.; George, R.P. Characterization of human tissue carnosinase. *Biochem. J.* **1985**, *228*, 653–660, doi:10.1042/bj2280653.
77. Teufel, M.; Saudek, V.; Ledig, J.-P.; Bernhardt, A.; Boularand, S.; Carreau, A.; Cairns, N.J.; Carter, C.; Cowley, D.J.; Duverger, D.; et al. Sequence identification and characterization of human

- carnosinase and a closely related non-specific dipeptidase. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 6521–6531, doi:10.1074/jbc.M209764200.
78. Jackson, M.C.; Kucera, C.M.; Lenney, J.F. Purification and properties of human serum carnosinase. *Clin. Chim. Acta* **1991**, *196*, 193–205, doi:10.1016/0009-8981(91)90073-L.
  79. Lenney, J.F. Specificity and distribution of mammalian carnosinase. *Biochim Biophys Acta* **1976**, *429*, 214–219, doi:10.1016/0005-2744(76)90044-9.
  80. Lenney, J.F. Separation and characterization of two carnosine-splitting cytosolic dipeptidases from hog kidney (carnosinase and non-specific dipeptidase). *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* **1990**, *371*, 433–440, doi:10.1515/bchm3.1990.371.1.433.
  81. Pegova, A.; Abe, H.; Boldyrev, A. Hydrolysis of carnosine and related compounds by mammalian carnosinases. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* **2000**, *127*, 443–446, doi:10.1016/S0305-0491(00)00279-0.
  82. Pandya, V.; Ekka, M.K.; Dutta, R.K.; Kumaran, S. Mass spectrometry assay for studying kinetic properties of dipeptidases: Characterization of human and yeast dipeptidases. *Anal. Biochem.* **2011**, *418*, 134–142, doi:10.1016/j.ab.2011.06.029.
  83. Bellia, F.; Vecchio, G.; Rizzarelli, E. Carnosinases, their substrates and diseases. *Molecules* **2014**, *19*, 2299–2329, doi:10.3390/molecules19022299.
  84. Smith, E.C.B. The buffering of Muscle in Rigor; Protein, Phosphate and Carnosine. *J. Physiol.* **1938**, *92*, 336–343, doi:10.1113/jphysiol.1938.sp003605.
  85. Severin, S.E.; Kirzon, M.V.; Kaftanova, T.M. Effect of carnosine and anserine on action of isolated frog muscles. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **1953**, *91*, 691–694.
  86. Zaloga, G.P.; Roberts, P.R.; Black, K.W.; Lin, M.; Zapata-Sudo, G.; Sudo, R.T.; Nelson, T.E. Carnosin is a novel peptide modulator of intracellular calcium and contractility in cardiac cells. *Am. J. Physiol.* **1997**, *272*, H462-H468, doi:10.1152/ajpheart.1997.272.1.H462.
  87. Dutka, T.L.; Lambole, C.R.; McKenna, M.J.; Murphy, R.M.; Lamb, G.D. Effects of carnosine on contractile apparatus  $Ca^{2+}$  sensitivity and sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  release in human skeletal muscle fibers. *J. Appl. Physiol.* **2012**, *112*, 728–736, doi:10.1152/jappphysiol.01331.2011.
  88. Margolis, F.L.; Roberts, N.; Ferriero, D.; Feldman, J. Denervation in the primary olfactory pathway of mice: Biochemical and morphological effects. *Brain Res.* **1974**, *81*, 469–483, doi:10.1016/0006-8993(74)90844-0.
  89. Ferriero, D.; Margolis, F.L. Denervation in the primary olfactory pathway of mice. II. Effects on Carnosine and other Amine compounds. *Brain Res.* **1975**, *94*, 75–86, doi:10.1016/0006-8993(75)90878-1.

90. Nadi, N.S.; Hirsch, J.D.; Margolis, F.L. Laminar Distribution of Putative Neurotransmitter Amino Acids and Ligand Binding Sites in the Dog Olfactory Bulb. *J Neurochem* **1980**, *34*, 138–146, doi:10.1111/j.1471-4159.1980.tb04632.x.
91. Hipkiss, A.R.; Worthington, V.C.; Himsworth, D.T.; Herwig, W. Protective effects of carnosine against protein modification mediated by malondialdehyde and hypochlorite. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* **1998**, *1380*, 46–54, doi:10.1016/S0304-4165(97)00123-2.
92. Hipkiss, A.R.; Chana, H. Carnosine protects proteins against methylglyoxal-mediated modifications. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *248*, 28–32, doi:10.1006/bbrc.1998.8806.
93. Hipkiss, A.R. Glycotoxins: Dietary and Metabolic Origins; Possible Amelioration of Neurotoxicity by Carnosine, with Special Reference to Parkinson's Disease. *Neurotox. Res.* **2018**, *34*, 164–172, doi:10.1007/s12640-018-9867-5.
94. Hipkiss, A.R.; Michaelis, J.; Syrris, P. Non-enzymatic glycosylation of the dipeptide l-carnosine, a potential anti-protein-cross-linking agent. *FEBS Lett.* **1995**, *371*, 81–85, doi:10.1016/0014-5793(95)00849-5.
95. Kang, J.H.; Kim, K.S.; Choi, S.Y.; Kwon, H.Y.; Won, M.H.; Kang, T.-C. Protective effects of carnosine, homocarnosine and anserine against peroxy radical-mediated Cu,Zn-superoxide dismutase modification. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* **2002**, *1570*, 89–96, doi:10.1016/S0304-4165(02)00158-7.
96. Hipkiss, A.R. Carnosine, a protective, anti-ageing peptide? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1998**, *30*, 863–868, doi:10.1016/S1357-2725(98)00060-0.
97. Hipkiss, A.R.; Preston, J.E.; Himsworth, D.T.; Worthington, V.C.; Keown, M.; Michaelis, J.; Lawrence, J.; Mateen, A.; Allende, L.; Eagles, P.A.; et al. Pluripotent Protective Effects of Carnosine, a Naturally Occurring Dipeptide. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2006**, *854*, 37–53, doi:10.1111/j.1749-6632.1998.tb09890.x.
98. Kulebyakin, K.; Karpova, L.; Lakonsteva, E.; Krasavin, M.; Boldyrev, A. Carnosine protects neurons against oxidative stress and modulates the time profile of MAPK cascade signaling. *Amino Acids* **2012**, *43*, 91–96, doi:10.1007/s00726-011-1135-4.
99. Calabrese, V.; Colombrita, C.; Guagliano, E.; Sapienza, M.; Ravagna, A.; Cardile, V.; Scapagnini, G.; Santoro, A.M.; Mangiameli, A.; Butterfield, D.A.; et al. Protective effect of carnosine during nitrosative stress in astroglial cell cultures. *Neurochem. Res.* **2005**, *30*, 797–807, doi:10.1007/s11064-005-6874-8.
100. Aruoma, O.I.; Lughton, M.J.; Halliwell, B. Carnosine, homocarnosine and anserine: could they act as antioxidants in vivo? *Biochem. J.* **1989**, *264*, 863–869, doi:10.1042/bj2640863.
101. Babizhayev, M.A.; Seguin, M.C.; Gueyne, J.; Evstigneeva, R.P.; Ageyeva, E.A.; Zheltukhina, G.A. L-Carnosine ( $\beta$ -alanyl-l-histidine) and carbinine ( $\beta$ -alanylhistamine) act as natural antioxidants

- with hydroxyl-radical-scavenging and lipid-peroxidase activities. *Biochem. J.* **1994**, *304*, 509–516, doi:10.1042/bj3040509.
102. Baran, E.J. Metal Complexes of Carnosine. *Biochemistry* **2000**, *65*, 789–797.
103. Tan, K.M.L, Candlish, J.K. Carnosine and anserine as modulators of neutrophil function. *Clin Lab Haematol* **1998**, *20*, 239–244, doi:10.1046/j.1365-2257.1998.00123.x.
104. Stvolinsky, S.; Kukley, M.; Dobrota, D.; Mezesova, V.; Boldyrev, A. Carnosine protects rats under global ischemia. *Brain Res. Bull.* **2000**, *53*, 445–448, doi:10.1016/S0361-9230(00)00366-X.
105. Fujii, T.; Takaoka, M.; Muraoka, T.; Kurata, H.; Tsuruoka, N.; Ono, H.; Kiso, Y.; Tanaka, T.; Matsumura, Y. Preventive effect of l-carnosine on ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **2003**, *474*, 261–267, doi:10.1016/S0014-2999(03)02079-X.
106. Dobrota, D.; Fedorova, T.; Stvolinsky, S.; Babusikova, E.; Likavcanova, K.; Drgova, A.; Strapkova, A.; Boldyrev, A. Carnosine protects the brain of rats and Mongolian gerbils against ischemic injury: After-stroke-effect. *Neurochem. Res.* **2005**, *30*, 1283–1288, doi:10.1007/s11064-005-8799-7.
107. Janssen, B.; Hohenadel, D.; Fischer, C.; Rychlik, I.; Bakker, S.J.L.; Meyer, J.; Köppel, H.; Hammes, H.-P. Carnosine as a Protective Factor in Diabetic Nephropathy Association With a Leucine Repeat of the Carnosinase Gene CNDP1. *Diabetes* **2005**, *54*, 2320-2327, doi:10.2337/diabetes.54.8.2320.
108. Jia, H.; Qi, X.; Fang, S.; Jin, Y.; Han, X.; Wang, Y.; Wang, A.; Zhou, H. Carnosine inhibits high glucose-induced mesangial cell proliferation through mediating cell cycle progression. *Regul. Pept.* **2009**, *154*, 69–76, doi:10.1016/j.regpep.2008.12.004.
109. Pfister, F.; Riedl, E.; Wang, Q.; Hagen, F. von; Deinzer, M.; Harmsen, M.C.; Molema, G.; Yard, B.; Feng, Y.; Hammes, H.-P. Oral Carnosine Supplementation Prevents Vascular Damage in Experimental Diabetic Retinopathy. *Cell. Physiol. Biochem.* **2011**, *28*, 125–136, doi:10.1159/000331721.
110. Babizhayev, M.A.; Micans, P.; Guiotto, A.; Kasus-Jacobi, A. N-acetylcarnosine lubricant eyedrops possess all-in-one universal antioxidant protective effects of L-carnosine in aqueous and lipid membrane environments, aldehyde scavenging, and transglycation activities inherent to cataracts: A clinical study of the new vision-saving drug N-acetylcarnosine eyedrop therapy in a database population of over 50,500 patients. *Am. J. Ther.* **2009**, *16*, 517–533, doi:10.1097/MJT.0b013e318195e327.
111. Boldyrev, A.; Fedorova, T.; Stepanova, M.; Dobrotvorskaya, I.; Kozlova, E.; Boldanova, N.; Bagyeva, G.; Ivanova-Smolenskaya, I.; Illarioshkin, S. Carnosine corrected increases efficiency of DOPA therapy of Parkinson's disease: A pilot study. *Rejuvenation Res.* **2008**, *11*, 821–827, doi:10.1089/rej.2008.0716.

112. Preston, J.E.; Hipkiss, A.R.; Himsworth, D.T.J.; Romero, I.A.; Abbott, J.N. Toxic effects of  $\beta$ -amyloid(25–35) on immortalised rat brain endothelial cell: protection by carnosine, homocarnosine and  $\beta$ -alanine. *Neurosci. Lett.* **1998**, *242*, 105–108, doi:10.1016/s0304-3940(98)00058-5.
113. Chez, M.G.; Buchanan, C.P.; Aimonovitch, M.C.; Becker, M.; Schaefer, K.; Black, C.; Komen, J. Double-blind, placebo-controlled study of L-carnosine supplementation in children with autistic spectrum disorders. *J. Child Neurol.* **2002**, *17*, 833–837, doi:10.1177/08830738020170111501.
114. Chengappa, K.N.R.; Turkin, S.R.; DeSanti, S.; Bowie, C.R.; Brar, J.S.; Schlicht, P.J.; Murphy, S.L.; Hetrick, M.L.; Bilder, R.; Fleet, D. A preliminary, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of L-carnosine to improve cognition in schizophrenia. *Schizophr. Res.* **2012**, *142*, 145–152, doi:10.1016/j.schres.2012.10.001.
115. Baraniuk, J.N.; El-Amin, S.; Corey, R.; Rayhan, R.; Timbol, C. Carnosine treatment for gulf war illness: A randomized controlled trial. *Glob. J. Health Sci.* **2013**, *5*, 69–81, doi:10.5539/gjhs.v5n3p69.
116. McFarland, G.A.; Holliday, R. Retardation of the Senescence of Cultured Human Diploid Fibroblasts by Carnosine. *Exp. Cell Res.* **1994**, *212*, 167–175, doi:10.1006/excr.1994.1132.
117. Yuneva, A.O.; Kramarenko, G.G.; Vetreshchak, T.V.; Gallant, S.; Boldyrev, A.A. Effect of Carnosine on Drosophila Melanogaster Lifespan. *Bull. Exp. Biol. Med.* **2002**, *133*, 559–561, doi:10.1023/a:1020273506970.
118. Gallant, S.; Semyonova, M.; Yuneva, M. Carnosine as a Potential Anti-Senescence Drug. *Biochemistry* **2000**, *65*, 866–868.
119. Chmielewska, K.; Dzierzbicka, K.; Inkielewicz-Stępnia, I.; Przybyłowska, M. Therapeutic Potential of Carnosine and Its Derivatives in the Treatment of Human Diseases. *Chem. Res. Toxicol.* **2020**, *33*, 1561–1578, doi:10.1021/acs.chemrestox.0c00010.
120. Quinn, P.J.; Boldyrev, A.A.; Formazuyk, V.E. Carnosine: Its properties, functions and potential therapeutic applications. *Mol. Aspects Med.* **1992**, 379–444, doi:10.1016/0098-2997(92)90006-l.
121. Yancik, R.; Ries L. A. G. Cancer in older persons: An international issue in an aging world. *Semin.Oncol.* **2004**, *31*, 128–136, doi:10.1053/j.seminoncol.2003.12.024.
122. Nagai, K.; Suda, T. Antineoplastic effects of carnosine and beta-alanine-physiological considerations of its antineoplastic effects. *Journal of the Physiological Society of Japan* **1986**, *48*, 741–747.
123. Iovine, B.; Iannella, M.L.; Nocella, F.; Pricolo, M.R.; Bevilacqua, M.A. Carnosine inhibits KRAS-mediated HCT116 proliferation by affecting ATP and ROS production. *Cancer Lett.* **2012**, *315*, 122–128, doi:10.1016/j.canlet.2011.07.021.

124. Iovine, B.; Guardia, F.; Irace, C.; Bevilacqua, M.A. L-carnosine dipeptide overcomes acquired resistance to 5-fluorouracil in HT29 human colon cancer cells via downregulation of HIF1- $\alpha$  and induction of apoptosis. *Biochimie* **2016**, *127*, 196–204, doi:10.1016/j.biochi.2016.05.010.
125. Shen, Y.; Yang, J.; Li, J.; Shi, X.; Ouyang, L.; Tian, Y.; Lu, J. Carnosine inhibits the proliferation of human gastric cancer SGC-7901 cells through both of the mitochondrial respiration and glycolysis pathways. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e104632, doi:10.1371/journal.pone.0104632.
126. Zhang, Z.; Miao, L.; Wu, X.; Liu, G.; Peng, Y.; Xin, X.; Jiao, B.; Kong, X. Carnosine Inhibits the Proliferation of Human Gastric Carcinoma Cells by Retarding Akt/mTOR/p70S6K Signaling. *J. Cancer* **2014**, *5*, 382–389, doi:10.7150/jca.8024.
127. Letzien, U.; Oppermann, H.; Meixensberger, J.; Gaunitz, F. The antineoplastic effect of carnosine is accompanied by induction of PDK4 and can be mimicked by L-histidine. *Amino Acids* **2014**, *46*, 1009–1019, doi:10.1007/s00726-014-1664-8.
128. Bao, Y.; Ding, S.; Cheng, J.; Liu, Y.; Wang, B.; Xu, H.; Shen, Y.; Lyu, J. Carnosine Inhibits the Proliferation of Human Cervical Gland Carcinoma Cells Through Inhibiting Both Mitochondrial Bioenergetics and Glycolysis Pathways and Retarding Cell Cycle Progression. *Integr. Cancer Ther.* **2018**, *17*, 80–91, doi:10.1177/1534735416684551.
129. Lee, J.; Park, J.-R.; Lee, H.; Jang, S.; Ryu, S.-M.; Kim, H.; Kim, D.; Jang, A.; Yang, S.-R. L-carnosine induces apoptosis/cell cycle arrest via suppression of NF- $\kappa$ B/STAT1 pathway in HCT116 colorectal cancer cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **2018**, *54*, 505–512, doi:10.1007/s11626-018-0264-4.
130. Renner, C.; Zemitzsch, N.; Fuchs, B.; Geiger, K.D.; Hermes, M.; Hengstler, J.; Gebhardt, R.; Meixensberger, J.; Gaunitz, F. Carnosine retards tumor growth in vivo in an NIH3T3-HER2/neu mouse model. *Mol. Cancer* **2010**, *9*, 7 pages, doi:10.1186/1476-4598-9-2.
131. Horii, Y.; Shen, J.; Fujisaki, Y.; Yoshida, K.; Nagai, K. Effects of L-carnosine on splenic sympathetic nerve activity and tumor proliferation. *Neurosci. Lett.* **2012**, *510*, 1–5, doi:10.1016/j.neulet.2011.12.058.
132. Warburg, O. On the Origin of Cancer Cell. *Science* **1956**, *123*, 309–314, doi:10.1126/science.
133. Semenza, G.L. Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1. *Semin. Cancer Biol.* **2009**, *19*, 12–16, doi:10.1016/j.semcancer.2008.11.009.
134. Pópulo, H.; Lopes, J.M.; Soares, P. The mTOR signalling pathway in human cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 1886–1918, doi:10.3390/ijms13021886.
135. Santoni, M.; Conti, A.; Piva, F.; Massari, F.; Ciccarese, C.; Burattini, L.; Cheng, L.; Lopez-Beltran, A.; Scarpelli, M.; Santini, D.; et al. Role of STAT3 pathway in genitourinary tumors. *Future Sci. OA* **2015**, *1*, 9 pages, doi:10.4155/fso.15.13.

136. Hipkiss, A.R.; Gaunitz, F. Inhibition of tumour cell growth by carnosine: some possible mechanisms. *Amino Acids* **2014**, *46*, 327–337, doi:10.1007/s00726-013-1627-5.
137. Jiang, X.; Kenerson, H.L.; Yeung, R.S. Glucose deprivation in tuberous sclerosis complex-related tumors. *Cell Biosci.* **2011**, *1*, 15 pages, doi:10.1186/2045-3701-1-34.
138. Polet, F.; Feron, O. Endothelial cell metabolism and tumour angiogenesis: Glucose and glutamine as essential fuels and lactate as the driving force. *J. Intern. Med.* **2013**, *273*, 156–165, doi:10.1111/joim.12016.
139. Barbi de Moura, M.; Vincent, G.; Fayewicz, S.L.; Bateman, N.W.; Hood, B.L.; Sun, M.; Suhan, J.; Duensing, S.; Yin, Y.; Sander, C.; et al. Mitochondrial respiration-an important therapeutic target in melanoma. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e40690, doi:10.1371/journal.pone.0040690.
140. Diers, A.R.; Broniowska, K.A.; Chang, C.-F.; Hogg, N. Pyruvate fuels mitochondrial respiration and proliferation of breast cancer cells: Effect of monocarboxylate transporter inhibition. *Biochem. J.* **2012**, *444*, 561–571, doi:10.1042/BJ20120294.
141. Asperger, A.; Renner, C.; Menzel, M.; Gebhardt, R.; Meixensberger, J.; Gaunitz, F. Identification of factors involved in the anti-tumor activity of carnosine on glioblastomas using a proteomics approach. *Cancer Invest.* **2011**, *29*, 272–281, doi:10.3109/07357907.2010.550666.
142. Renner, C.; Asperger, A.; Seyffarth, A.; Meixensberger, J.; Gebhardt, R.; Gaunitz, F. Carnosine inhibits ATP production in cells from malignant glioma. *Neurol. Res.* **2010**, *32*, 101–105, doi:10.1179/016164109X12518779082237.
143. Bharadwaj, L.A.; Davies, G.F.; Xavier, I.J.; Ovsenek, N. L-carnosine and verapamil inhibit hypoxia-induced expression of hypoxia inducible factor (HIF-1 alpha) in H9c2 cardiomyoblasts. *Pharmacol. Res.* **2002**, *45*, 175–181, doi:10.1006/phrs.2001.0911.
144. Iovine, B.; Oliviero, G.; Garofalo, M.; Orefice, M.; Nocella, F.; Borbone, N.; Piccialli, V.; Centore, R.; Mazzone, M.; Piccialli, G.; et al. The anti-proliferative effect of L-carnosine correlates with a decreased expression of hypoxia inducible factor 1 alpha in human colon cancer cells. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e96755, doi:10.1371/journal.pone.0096755.
145. Saxton, R.A.; Sabatini, D.M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* **2017**, *168*, 960–976, doi:10.1016/j.cell.2017.02.004.
146. Hipkiss, A.R. Energy metabolism, proteotoxic stress and age-related dysfunction - protection by carnosine. *Mol. Aspects Med.* **2011**, *32*, 267–278, doi:10.1016/j.mam.2011.10.004.
147. Son, D.O.; Satsu, H.; Kiso, Y.; Totsuka, M.; Shimizu, M. Inhibitory effect of carnosine on interleukin-8 production in intestinal epithelial cells through translational regulation. *Cytokine* **2008**, *42*, 265–276, doi:10.1016/j.cyto.2008.02.011.

148. Oppermann, H.; Faust, H.; Yamanishi, U.; Meixensberger, J.; Gaunitz, F. Carnosine inhibits glioblastoma growth independent from PI3K/Akt/mTOR signaling. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0218972, doi:10.1371/journal.pone.0218972.
149. Fulda, S. Regulation of apoptosis pathways in cancer stem cells. *Cancer Lett.* **2013**, *338*, 168–173, doi:10.1016/j.canlet.2012.03.014.
150. Hassan, M.; Watari, H.; AbuAlmaaty, A.; Ohba, Y.; Sakuragi, N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res. Int.* **2014**, *2014*, 23 pages, doi:10.1155/2014/150845.
151. Barnum, K.J.; O'Connell, M.J. Cell cycle regulation by checkpoints. *Methods Mol. Biol.* **2014**, *1170*, 29–40, doi:10.1007/978-1-4939-0888-2\_2.
152. Liu, Z.; Xie, W.; Li, M.; Teng, N.; Liang, X.; Zhang, Z.; Yang, Z.; Wang, X. Oral Administration of Polaprezinc Attenuates Fluorouracil-induced Intestinal Mucositis in a Mouse Model. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2017**, *121*, 480–486, doi:10.1111/bcpt.12841.
153. Watanabe, T.; Ishihara, M.; Matsuura, K.; Mizuta, K.; Itoh, Y. Polaprezinc prevents oral mucositis associated with radiochemotherapy in patients with head and neck cancer. *Int. J. Cancer* **2010**, *127*, 1984–1990, doi:10.1002/ijc.25200.
154. Guney, Y.; Turkcu, U.O.; Hicsonmez, A.; Andrieu, M.N.; Guney, H.Z.; Bilgihan, A.; Kurtman, C. Carnosine may reduce lung injury caused by radiation therapy. *Med. Hypotheses* **2006**, *66*, 957–959, doi:10.1016/j.mehy.2005.11.023.
155. Fouad, A.A.; Morsy, M.A.; Gomaa, W. Protective effect of carnosine against cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2008**, *25*, 292–297, doi:10.1016/j.etap.2007.10.026.
156. Banerjee, S.; Sinha, K.; Chowdhury, S.; Sil, P.C. Unfolding the mechanism of cisplatin induced pathophysiology in spleen and its amelioration by carnosine. *Chem. Biol. Interact.* **2018**, *279*, 159–170, doi:10.1016/j.cbi.2017.11.019.
157. Tang, W.; Liu, H.; Ooi, T.C.; Rajab, N.F.; Cao, H.; Sharif, R. Zinc carnosine: Frontiers advances of supplement for cancer therapy. *Biomed. Pharmacother.* **2022**, *151*, 8 pages, doi:10.1016/j.biopha.2022.113157.
158. Doi, H.; Kuribayashi, K.; Kijima, T. Utility of polaprezinc in reducing toxicities during radiotherapy: a literature review. *Future Oncol.* **2018**, *14*, 1977–1988, doi:10.2217/fon-2018-0021.
159. Dietterle, J.; Oppermann, H.; Glasow, A.; Neumann, K.; Meixensberger, J.; Gaunitz, F. Carnosine increases efficiency of temozolomide and irradiation treatment of isocitrate dehydrogenase-wildtype glioblastoma cells in culture. *Future Oncol.* **2019**, *15*, 3683–3691, doi:10.2217/fon-2019-0447.

160. Turner, M.D.; Sale, C.; Garner, A.C.; Hipkiss, A.R. Anti-cancer actions of carnosine and the restoration of normal cellular homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2021**, *1868*, 119117, doi:10.1016/j.bbamcr.2021.119117.
161. Bellia, F.; Oliveri, V.; Rizzarelli, E.; Vecchio, G. New derivative of carnosine for nanoparticle assemblies. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *70*, 225–232, doi:10.1016/j.ejmech.2013.10.002.
162. Hobart, L.J.; Seibel, I.; Yeargans, G.S.; Seidler, N.W. Anti-crosslinking properties of carnosine: Significance of histidine. *Life Sci.* **2004**, *75*, 1379–1389, doi:10.1016/j.lfs.2004.05.002.
163. Abe, H. Role of Histidine-Related Compounds as Intracellular Proton Buffering Constituents in Vertebrate Muscle. *Biochemistry*, **2000**, *65*, 757–765.
164. Kremer, J.N.; Vitolina, S.P.; Puppele, O.Y.; Schmid, A.A. Zur Frage der semiessentiellen und nichtessentiellen Aminosäuren in der parenteralen Ernährung. *Nahrung* **1978**, *22*, 843–851, doi:10.1002/food.19780220502.
165. Wade, A.M.; Tucker, H.N. Antioxidant characteristics of L-histidine. *J. Nutr. Biochem.* **1998**, *9*, 308–315, doi:10.1016/S0955-2863(98)00022-9.
166. Sundberg, R.J.; Martin, R.B. Interactions of histidine and other imidazole derivatives with transition metal ions in chemical and biological systems. *Chem. Rev.* **1973**, *74*, 471–517, doi:10.1021/cr60290a003.
167. Zhang, L.; Peng, X.-M.; Damu, G.L.V.; Geng, R.-X.; Zhou, C.-H. Comprehensive review in current developments of imidazole-based medicinal chemistry. *Med. Res. Rev.* **2014**, *34*, 340–437, doi:10.1002/med.21290.
168. Kadavakollu, S.; Stailey, C.; Kunapareddy, C.S.; White, S. Clotrimazole as a Cancer Drug: A Short Review. *Med. Chem. (Los Angeles)* **2014**, *4*, 722–724, doi:10.4172/2161-0444.1000219.
169. Vaughan, R.A.; Gannon, N.P.; Garcia-Smith, R.; Licon-Munoz, Y.; Barberena, M.A.; Bisoffi, M.; Trujillo, K.A.  $\beta$ -alanine suppresses malignant breast epithelial cell aggressiveness through alterations in metabolism and cellular acidity in vitro. *Mol. Cancer* **2014**, *13*, 10 pages, doi:10.1186/1476-4598-13-14.
170. Oppermann, H.; Birkemeyer, C.; Meixensberger, J.; Gaunitz, F. Non-enzymatic reaction of carnosine and glyceraldehyde-3-phosphate accompanies metabolic changes of the pentose phosphate pathway. *Cell Prolif.* **2020**, *53*, e12702, doi:10.1111/cpr.12702.

## Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 1: Todesursachen in Deutschland bezogen auf das Jahr 2020 in %, entnommen [5] .....   | 5  |
| Abbildung 2: „Schmetterlingsglioblastom“ in der Magnetresonanztomographie des Gehirns, rechts kontrastmittelgestützte T1-Wichtung mit typischer randförmiger Kontrastmittelanreicherung, links hyperintense Darstellung des Tumors in der T2-Wichtung, entnommen [12] ..... | 6  |
| Abbildung 3: Einteilung der diffusen Gliome nach Histologie und Mutationsstatus nach der WHO-Klassifikation von 2021, entnommen [15] .....  | 8  |
| Abbildung 4: Strukturformel des Dipeptids L-Carnosin, entnommen [62] .....  | 11 |
| Abbildung 5: Mögliche Ansatzpunkte von Carnosin zur Beeinflussung des Tumorwachstums und des -überlebens sowie der Metastasierung von Tumoren (dargestellt als Blitze), entnommen [136]. .....  | 17 |

## Darstellung des eigenen Beitrags

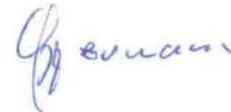
Christiane Seidel führte die Zellkulturexperimente sowie die Zellvitalitätsassays eigenständig durch und wurde bei der Zellkultivierung teils von Herrn Rainer Baran-Schmidt unterstützt. Die Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektroskopie wurde von Christiane Seidel unter Anleitung von Herrn Dr. habil. Henry Oppermann und unter Supervision von Frau Dr. Claudia Birkemeyer durchgeführt. Die immunhistochemischen Färbungen sowie die Fluoreszenzmikroskopie wurden mittels Unterstützung von Christiane Seidel von Herrn Prof. Dr. Frank Gaunitz und Herrn Rainer Baran-Schmidt durchgeführt. Die Datenauswertung sowie die graphische Darstellung nahm Christiane Seidel größtenteils eigenständig unterstützt durch Herrn Prof. Dr. Frank Gaunitz und Herrn Dr. habil. Henry Oppermann vor. Die Operationen und Gewebeentnahmen führten Herr Prof. Dr. Jürgen Meixensberger und seine ärztlichen Mitarbeiter durch. Das Manuskript der Publikation verfassten Christiane Seidel, Dr. habil. Henry Oppermann und Prof. Dr. Frank Gaunitz. Alle an der Publikation beteiligten Wissenschaftler waren bei der schriftlichen Fassung des final publizierten Manuskripts beteiligt.

18.01.23

Datum



Unterschrift  
UNIVERSITÄTSKLINIKUM LEIPZIG A&R  
Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie  
Professor Dr. Frank Gaunitz  
Liebigstraße 20 • 04103 Leipzig  
Tel. (0341) 97-1 79 53 • Fax 97-1 75 09



R. Baran -  
Schmidt

Ch. Seidel

## **Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

18.01.2023

Datum

C. Güdel

Unterschrift

## Lebenslauf

### Elisabeth Christiane Seidel

geboren am 05.01.1993

in Leipzig

Staatsangehörigkeit deutsch

### Schulbildung

1999 – 2003 Friedrich-Ludwig-Jahn-Grundschule in Leuna

2003 – 2011 Elisabeth-Gymnasium in Halle/ Saale

Abschluss: Abitur (1,2)

### Universitäre Bildung

10/2011 – 07/2018 Studium der Humanmedizin an der Universität Leipzig

08/2013 Erstes Staatsexamen (2,0)

04/2017 Zweites Staatsexamen (1,0)

06/2018 Drittes Staatsexamen (1,0)

08/2018 Erlangung der ärztlichen Approbation im Freistaat Sachsen

### Berufserfahrung

05/2012 – 08/2016 studentische Hilfskraft, Klinik für Neurologie, BG Kliniken Bergmannstrost, Halle/ Saale

03 – 04/2014 Famulatur Hämatologie und internistische Onkologie, Praxis Dr. med. Eva-Maria Schwabe, Leipzig

07 – 08/2014 Famulatur Allgemeinmedizin, Praxis Dr. med. Constanze Kießhauer, Bad Dürrenberg

09/2014 – 12/2014 Praktikum am Rudolf-Böhm-Institut für Allgemeine Pharmakologie der Universität Leipzig

02 – 03/2015 Famulatur Neurologie, Sächsisches Krankenhaus Altscherbitz, Schkeuditz

07/2015 Famulatur Anästhesie, BG Kliniken Bergmannstrost, Halle/ Saale

08/2015 Famulatur Gynäkologie, Klinik und Poliklinik für Gynäkologie, Universitätsklinikum Leipzig

|                   |   |
|-------------------|---|
| 05/2017 – 04/2018 | Praktisches Jahr<br>Innere Medizin, Klinikum Altenburger Land<br>Neurologie, Klinikum Altenburger Land<br>Chirurgie, Saale-Unstrut Klinikum Naumburg                      |
| seit 08/2018      | Ärztin in Weiterbildung für Neurologie, Klinik und Poliklinik für Neurologie,<br>Universitätsklinikum Leipzig   |
|                   | <b>Wissenschaftliche Tätigkeit</b>  |
| seit 02/2016      | Doktorandin an der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie,<br>Universitätsklinikum Leipzig, betreut durch Prof. Dr. Frank Gaunitz und Prof.<br>Dr. Jürgen Meixensberger |
| seit 01/2019      | Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe für Neuroimmunologie an der Klinik für<br>Neurologie, Universitätsklinikum Leipzig, unter Leitung von Prof. Dr. Florian<br>Then Bergh  |
| seit 01/2019      | Prüfärztin für verschiedene klinische Studien im Bereich Neurologie der<br>Phasen III und IV  |
|                   | <b>Kenntnisse</b>   |
| Sprachen          | Deutsch als Muttersprache<br>erweiterte Englischkenntnisse (C 1)<br>erweiterte Lateinkenntnisse („Großes Latinum“)<br>Grundkenntnisse Französisch (B 1)                   |
| Qualifikationen   | EEG Zertifikat der DGKN   |

## Veröffentlichungen

### Paper

Oppermann, Henry, Athanasios Alvanos, **Christiane Seidel**, Meixensberger, Jürgen and Gaunitz, Frank (2019): „Carnosine influences transcription via epigenetic regulation as demonstrated by enhanced histone acetylation of the pyruvate dehydrogenase kinase 4 promoter in glioblastoma cells“; Amino Acids

**Elisabeth Christiane Seidel**, Claudia Birkemeyer, Rainer-Baran Schmidt, Jürgen Meixensberger, Henry Oppermann and Frank Gaunitz (2022): „Viability of Glioblastoma Cells and Fibroblasts in the Presence of Imidazole-Containing Compounds“; International Journal of Molecular Science

### Poster

Frank Gaunitz, Henry Oppermann, **Christiane Seidel**, Katharina Purcz, Athanasios Alvanos, Johannes Dietterle, Stefanie Elsel, Sebastian Strube and Jürgen Meixensberger (2017): „Carnosine and Cancer – mechanisms, physiology and specificity“; 4th International Congress on Carnosine and Anserine; Louisville, USA

Purcz, Katharina; **Seidel, Christiane**; Elsel, Stefanie; Birkemeyer, Claudia; Meixensberger, Jürgen; Gaunitz, Frank and Oppermann, Henry (2017): „Carnosine’s effect on tumor cells is independent from its degradation and the release of L-histidine“; 4th International Congress on Carnosine and Anserine; Louisville, USA

Purcz, Katharina; **Seidel, Christiane**; Birkemeyer, Claudia; Dietterle, Johannes; Meixensberger, Jürgen; Gaunitz, Frank and Oppermann, Henry (2017): „Imidazole containing compounds are potential drugs for the treatment of glioblastoma“; Brain Tumor Meeting Berlin

Purcz, Katharina; **Seidel, Christiane**; Birkemeyer, Claudia; Dietterle, Johannes; Meixensberger, Jürgen; Gaunitz, Frank and Oppermann, Henry (2017): „Carnosine’s anti-neoplastic effect on glioblastoma cell growth is independent of its cleavage“; 68th Annual Meeting of the German Society for Neurosurgery

**Seidel, Christiane**; Purcz, Katharina; Birkemeyer, Claudia; Meixensberger, Jürgen; Gaunitz, Frank; Oppermann, Henry (2018): „Viability of tumor cells and fibroblasts under the influence of imidazole containing compounds“; 14th Research Festival for Life Sciences Leipzig; ISBN: 978-3- 00-058756-6

Purcz, Katharina; **Seidel, Christiane**; Birkemeyer, Claudia; Dietterle, Johannes; Meixensberger, Jürgen; Gaunitz, Frank; Oppermann, Henry (2018): „Carnosine’s effect on tumor cells is independent

from its degradation and the release of L-histidine”; 14th Research Festival for Life Sciences Leipzig;  
ISBN: 978-3-00-058756-6

## **Danksagung**

An erster Stelle möchte ich meine Hochachtung und meinen großen Dank den Patienten entgegen bringen, die trotz der schwierigen persönlichen Situation, in der sie sich bei Diagnosestellung des Glioblastoms befunden haben müssen, bereit waren die Forschung durch die Bereitstellung der Gewebeproben zu unterstützen, obgleich sie dadurch keinen individuellen Nutzen hatten. Nur durch die Mithilfe dieser Menschen ist es möglich präklinische und klinische Forschung zu betreiben.

Für die Möglichkeit der Arbeit in einem Forschungslabor und die Erstellung meiner Doktorarbeit an der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie der Universitätsklinik Leipzig möchte ich mich bei Prof. Dr. Jürgen Meixensberger und Prof. Dr. Frank Gaunitz bedanken.

Weiterhin geht mein besonderer Dank nochmals an Prof. Dr. Frank Gaunitz für seine beständige Supervision und den dauerhaften Beistand von der Generierung der Hypothese, der Planung und Durchführung der Experimente bis zur Erstellung der Publikation sowie Fertigstellung des Manuskripts der Dissertation. Danke für den langen Atem.

Mein weiterer Dank gilt PD Dr. Henry Oppermann für seine tatkräftige praktische Hilfestellung bei der Durchführung der Experimente und seine Expertise hinsichtlich der statistischen Aufarbeitung der erhobenen Daten und deren Interpretation.

Zudem bedanke ich mich bei Herrn Rainer Baran-Schmidt für die Einarbeitung in die grundlegenden Abläufe in einem Forschungslabor und im Besonderen für seine Einführung und Unterstützung bei der Zellkultivierung und vielen Stunden des Pipettierens.

Bedanken möchte ich mich noch bei Frau Dr. Claudia Birkemeyer und Frau Dr. Susan Billig für die Möglichkeit und die Unterstützung bei der Durchführung der Chromatographie am Institut für Analytische Chemie der Universität Leipzig.

Zuletzt geht mein unendlicher und unermesslicher Dank an meine Familie insbesondere meine Eltern und meine Schwester, die mir so vieles in meinem Leben ermöglicht und erleichtert haben. Ein Leben ohne eure tägliche Unterstützung kann ich mir nicht vorstellen.