

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie (Direktor Prof. Dr. Henry W. S. Schroeder)
und dem Institut für Pharmakologie (Direktor Prof. Dr. Stefan Engeli)
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

Funktionelle Untersuchungen zu OCTN2 und L-Carnitin assoziierten Effekten im
Glioblastom und deren pharmakologische Beeinflussung im Tiermodell

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin

(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Universität Greifswald

2023

vorgelegt von:

Heiko Paland

geb. am: 20.06.1990

in: Hannover

Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Henry W. S. Schroeder

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Stefan Oswald

Ort, Raum: Greifswald, Hörsaal des Institutes für Pathologie

Tag der Disputation: 04.04.2024

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
MABE UND EINHEITEN	X
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XI
TABELLENVERZEICHNIS	XXI
1 EINLEITUNG	1
1.1 Das Glioblastom als primäre Neoplasie des Zentralnervensystems	1
1.1.1 Tumorerkrankungen – zweithäufigste Todesursache weltweit	1
1.1.2 Hirntumoren und ihre Vielgestaltigkeit.....	3
1.1.3 Eigenschaften, Krankheitsverlauf und Behandlung des Glioblastoms.....	5
1.2 Metabolische Veränderungen im Glioblastom und die Bedeutung der β -Oxidation	8
1.2.1 Wege der Energiegewinnung in normalen Zellen und Tumorzellen.....	8
1.2.2 Metabolische Veränderungen im Glioblastom: Bedeutung von Fettsäuremetabolismus und β -Oxidation.....	12
1.3 L-Carnitin und der Membrantransporter OCTN2 als essentielle Komponenten der β -Oxidation.....	15
1.4 Das OCTN2/L-Carnitin System im Glioblastom.....	20
1.5 Zielsetzung.....	22
2 MATERIALIEN	24
2.1 Gerätschaften und Hilfsmittel	24
2.2 Chemikalien und Enzyme	25
2.3 Genexpressionsassays	26
2.4 Kits.....	26
2.5 Lösungen und Puffer.....	26
2.6 Antikörper	28
2.7 Zelllinien	28
2.8 Hirntumorgewebe	29
2.9 Software	30
3 METHODEN	31
3.1 Molekularbiologische Methoden	31
3.1.1 RNA Isolation.....	31
3.1.2 Nukleinsäure Quantifizierung	31
3.1.3 Isolation von DNA aus Gewebe.....	32
3.1.4 Konventionelle Polymerase-Ketten-Reaktion	32
3.1.5 Genotypisierung mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus	32
3.1.6 cDNA Synthese	33
3.1.7 Quantitative Echtzeit-PCR	34
3.2 Proteinanalytische Methoden.....	36
3.2.1 Proteinisolierung und Quantifizierung aus Zellen.....	36
3.2.2 Semiquantitativer Proteinnachweis mittels Western Blot Verfahren.....	37
3.2.3 Immunfluoreszenzmikroskopie	40
3.2.4 Caspase-3 Assay.....	40
3.3 Zellbiologische Methoden	41
3.3.1 Kultivierung von Zellen	41
3.3.2 Bestimmung der Zellzahl	42
3.3.3 Bestimmung der Zellviabilität.....	42
3.3.4 Bestimmung der relativen Zellzahl und Zellvitalität.....	43
3.3.5 Bestimmung der Zellmigration im Wundheilungsassay	44
3.4 Tierexperimentelle Methoden.....	45
3.4.1 Studiendesign	45
3.4.2 Versuchstiere	46
3.4.3 Tierhaltung	47

3.4.4	Dokumentation von Tierwohl	47
3.4.5	Genotypisierung	50
3.4.6	Intrakranielle stereotaktische Tumorzellimplantation.....	50
3.4.7	Kleintier-Magnetresonanztomographie.....	52
3.4.8	Bestimmung der Tumorgröße	53
3.4.9	Substanjinjektion	54
3.4.10	Organentnahme und Aufbereitung.....	55
3.5	Datenanalyse und statistische Methoden.....	55
4	ERGEBNISSE	56
4.1	Patientenbezogene Analysen	56
4.1.1	Expressionsanalysen von OCTN1, CPT1C und CRAT	56
4.2	Experimentelle Analysen an Glioblastomzelllinien	58
4.2.1	Qualitativer Nachweis von OCTN2 in verschiedenen Glioblastomzelllinien	58
4.2.2	L-Carnitin vermittelte Effekte auf intrazelluläre Signalkaskaden in der Glioblastomzelllinie LN-18	59
4.2.3	Einfluss von L-Carnitin auf die Apoptoseinduktion in LN-18 Zellen unter verschiedenen Stimuli	62
4.2.4	Einfluss von L-Carnitin auf die Migration von LN-18 Zellen und GL261 Zellen sowie primären Glioblastomzellen.....	65
4.2.5	Einfluss von L-Carnitin, Meldonium und Etomoxir auf die Zellviabilität und Zellvitalität von LN-18 und GL261 Glioblastomzellen.....	68
4.3	Tierexperimentelle Ergebnisse	71
4.3.1	Wirkung von L-Carnitin, Etomoxir und Meldonium auf das <i>in vivo</i> Tumorstadium im orthotopen Glioblastommodell in C57BL/6 Wildtyp Mäusen	71
4.3.2	Wirkung von L-Carnitin auf das <i>in vivo</i> Tumorstadium im orthotopen Glioblastommodell in heterozygoten <i>jvs^{+/-}</i> -Mäusen	78
4.3.3	Wirkung von L-Carnitin auf das <i>in vivo</i> Tumorstadium im orthotopen Glioblastommodell in homozygoten <i>jvs^{-/-}</i> -Mäusen.....	83
4.3.4	Vergleich der untersuchten Substanzen auf das <i>in vivo</i> Tumorstadium im orthotopen Glioblastommodell in C57BL/6 Wildtyp, <i>jvs^{+/-}</i> - und <i>jvs^{-/-}</i> -Mäusen	87
5	DISKUSSION	89
5.1	Patientenbezogene Erkenntnisse zur Expression von OCTN1, CPT1C und CRAT im Glioblastom	91
5.2	Tumorzelllinien-basierte Erkenntnisse aus <i>in vitro</i> Untersuchungen zur Bedeutung des OCTN2/L-Carnitin Systems und der β -Oxidation im Glioblastom	92
5.3	Tierexperimentelle Erkenntnisse zum Einfluss von L-Carnitin, Meldonium und Etomoxir auf das <i>in vivo</i> Glioblastomwachstum.....	100
5.4	Schlussfolgerungen für die Behandlung von Patienten mit Glioblastom und übergeordnete Aspekte.....	107
5.5	Limitationen der vorliegenden Studie	109
6	ZUSAMMENFASSUNG	112
	LITERATURVERZEICHNIS.....	114

In der vorliegenden Arbeit wird für eine bessere Lesbarkeit das generische Maskulinum verwendet. Allerdings sind weibliche und anderweitige Geschlechteridentitäten hierbei explizit mitgemeint, insofern es angebracht beziehungsweise für die Aussage erforderlich ist.

Abkürzungsverzeichnis

± SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
<i>Aqua dest.</i>	Destilliertes Wasser (<i>Aqua destillata</i>)
Abb.	Abbildung
ANOVA	Varianzanalyse (<i>analysis of variance</i>)
AKT1	<i>RAC-alpha serine/threonine-protein kinase</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATB ^{0,+}	<i>Amino acid transporter B^{0,+}</i> , alternativ SLC6A14
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCA	Bicinchoninsäure (<i>bicinchonic acid</i>)
CAC	<i>Mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier</i> , alternativ SLC25A20
CDKN2A	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
CDKN2B	<i>Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor B</i>
cDNA	Komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CoA	Coenzym A, alternativ CoA-SH
CPT1	<i>Carnitine O-palmitoyltransferase 1</i>
CPT1A	<i>Carnitine O-palmitoyltransferase 1, liver isoform</i>
CPT1C	<i>Carnitine O-palmitoyltransferase 1, brain isoform</i>
C _T	<i>Threshold cycle</i>
CT2	<i>Carnitine transporter 2</i> , alternativ SLC22A16
C57BL/6	Inzucht Labormausstamm C57BL/6
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Minimal Essential Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate buffered saline</i>
D-2HG	D-2-Hydroxyglutarsäure
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFSA	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit
ERK1	<i>Extracellular signal-regulated kinase 1</i>
ERK2	<i>Extracellular signal-regulated kinase 2</i>
et al.	<i>et alii/aliae</i>

Abkürzungsverzeichnis

FCS	Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FDA	<i>U. S. Food and Drug Administration</i>
GEM	<i>Genetically engineered models</i>
GFAP	Saures Gliafaserprotein (<i>glial fibrillary acidic protein</i>)
GLUT-1	<i>Glucose transporter 1</i>
GL261	GL261 Glioblastomzelllinie
HIF1a	<i>Hypoxia-inducible factor 1-alpha</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IDH1	Isocitrat-Dehydrogenase-1
jvs	<i>Juvenile visceral steatosis</i>
LKB1	<i>Liver kinase B1, serine/threonine protein kinase 11 (STK11)</i>
KOF	Körperoberfläche
MAPK	MAP Kinase (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MCT9	<i>Monocarboxylate transporter 9, alternativ SLC16A9</i>
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
MEZ	mitteleuropäische Zeit
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MYC	<i>MYC protooncogene</i>
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NF2	<i>Neurofibromin 2</i>
OCTN1	<i>Organic cation/carnitine transporter 1, alternativ SLC22A4</i>
OCTN2	<i>Organic cation/carnitine transporter 2, alternativ SLC22A5</i>
p	phospho
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PGC1a	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i>
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Natriumchloridlösung (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PDX	<i>Patient derived xenograft</i>
pH	pH-Wert
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase(n)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR
RAS	Ras GTPase, abgeleitet von <i>rat sarcoma</i>

RB	<i>Retinoblastoma-associated protein</i>
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SLC22A5	<i>Solute carrier family 22 member 5</i> , alternativ OCTN2
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (<i>tris buffered saline</i>)
TBST	Tween-20-haltige Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TP53	<i>Cellular tumor antigen p53</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WHO	World Health Organization
ZSFV	Zentrale Service- und Forschungseinrichtung für Versuchstiere

Maße und Einheiten

°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
g	Gramm
Gy	Gray
h	Stunde
Hz	Hertz
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
log	Logarithmus
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
s	Sekunde
T	Tesla, magnetische Flussdichte
U	Enzymeinheit
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Inzidenz (A) und Mortalität (B) der zehn häufigsten Tumorerkrankungen weltweit im Jahr 2018. Die zehn häufigsten Entitäten sind einzeln dargestellt, weitere sind unter der Bezeichnung „Andere“ zusammengefasst. Die Darstellung zeigt beide Geschlechter zusammen. Quelle: modifiziert nach Bray et al. (2018) [1]. 1
- Abb. 2: Zusammenstellung der *Hallmarks of Cancer*. Darstellung der relevanten Kennzeichen von Krebserkrankungen und beispielhafter therapeutischer Angriffspunkte. Quelle: modifiziert nach Hanahan & Weinberg (2011) [5]. 2
- Abb. 3: Darstellung der Häufigkeit von primären Hirntumoren (A) und malignen Hirntumoren (B). Die Daten beziehen sich auf die Population der Vereinigten Staaten von Amerika. Quelle: modifiziert nach Ostrom et al. (2018) [7]. 4
- Abb. 4: Verteilung der bösartigen Hirntumoren für Männer (A) und Frauen (B) in Deutschland nach Histologie entsprechend WHO-Klassifikation (2016) für den Zeitraum 2015-2016. Astrozytome Grad II sind inkl. Oligodendrogliomen berechnet. Astrozytome Grad I sind per histologischer Definition gutartig und deshalb nicht dargestellt. Quelle: modifiziert nach Robert Koch-Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2019) [12]. 4
- Abb. 5: Vergleichende Darstellung der möglichen Wege zur Energiegewinnung in Zellen und Geweben. Palmitinsäure (16:0): 16 Kohlenstoffatome und Null Doppelbindungen. CoA-SH: Coenzym-A. ATP: Adenosintriphosphat. Quelle: Eigene Darstellung (2023), adaptiert nach [41–43]. 9
- Abb. 6: OCTN2 Struktur. (A) 2D-Struktur, erstellt mit Protter (<https://wlab.ethz.ch/protter/>) auf Basis der Proteinsequenz von uniprot.org. Aminosäuren sind gezeigt als Kreise oder Vierecke mit Buchstabencode. Transmembrandomänen sind dunkelgrau gefärbt und nummeriert von I bis XII. Dunkelgrau viereckig dargestellte Aminosäuren markieren Positionen für post-translationale Modifikation (zum Beispiel Glykosylierungen). Orangefarbene Aminosäuren sind ein Nukleotidbindungsmotiv. Jede zehnte Aminosäure ist nummeriert. (B) 3D-Rekonstruktion erstellt auf Basis der Aminosäuresequenz mit Phyre2 [76]. Farbige Regenbogendarstellung je nach Position vom N-Terminus bis zum C-Terminus. Quelle: Eigene Darstellung (2023). 16

- Abb. 7: L-Carnitin und assoziierte Funktionen im zellulären Stoffwechsel und molekularbiologischen Prozessen. Quelle: modifiziert nach Console et al. (2020) [87]. 18
- Abb. 8: Darstellung der funktionellen Bedeutung des OCTN2/L-Carnitin Systems in der Zelle. OCTN2: *Organic cation/carnitine transporter 2*; CoA-SH; Coenzym A; ACSL: *Acyl-CoA-Synthetase*; CPT1: *Carnitin-Palmitoyltransferase 1*; CPT2: *Carnitin-Palmitoyltransferase 2*; VDAC: *Voltage-dependent anion channel*; CACT: *Carnitine-acylcarnitin translocase*; CRAT: *Carnitine acetyltransferase*; CD36: *Cluster of differentiation 36*; FATP: *Fatty acid-transport protein*; FABP: *Fatty acid-binding protein*; Quelle: Eigene Darstellung (2023), adaptiert nach [87, 90]. 19
- Abb. 9: Beispielhafte Darstellung der Auswertungssequenz des Wundheilungsassays. (A) Veranschaulichung relevanter Zwischenschritte bei der Verarbeitung der mikroskopischen Aufnahmen unter Verwendung des Programmes *ImageJ* und durch Befehle bedingte Bildumwandlungsprozesse. (B) Vergleichende Darstellung vom mikroskopischen Ausgangsbild (links) und analysiertem Endbild (rechts) mit grafisch in grau hervorgehobenem Bereich, welcher quantifiziert wird. Quelle: Eigene Darstellung (2023). 44
- Abb. 10: Allgemeiner Versuchsablauf der tierexperimentellen Studie. Operation (OP) an Tag 0 (t₀), erste Magnetresonanztomographie (MRT) an Tag 12 (t₁₂) und zweite an Tag 26 (t₂₆). Zusätzlich tägliche Kontrolle des Tierwohls (Punkte) und in der Behandlungsphase (t₁₂ – t₂₆) zusätzlich zur Tierwohlkontrolle auch Substanzinjektionen (Viereck beziehungsweise Dreieck). Quelle: Eigene Darstellung (2023). 46
- Abb. 11: Ethische Abwägungsmatrizen. Unterschiedlich bewertende Metriken (A-C). Quelle: modifiziert nach Kirschke et al. (2015) [126]. 49
- Abb. 12: Darstellung der Positionierungen bei der stereotaktischen Tumorzellimplantation. (A) *Flat skull position*. (B) Darstellung des Bregma (mittels Blick durch das Okular), hier mit anatomischen Bezeichnungen der Knochennähte (hervorgehoben durch gestrichelte Linie). (C) Injektion der Tumorzellen (GL261) mittels Mikroliterspritze an der Zielposition. Quelle: Eigene Darstellung (2023). 51
- Abb. 13: Darstellung exemplarischer MRT-Schichtaufnahmen. Gezeigt ist eine koronare (A) und transversale (B) Sequenz mit Kontrastmittelanreicherung

- eines Tumors. Weißer Strich entspricht 10 mm. Quelle: Eigene Darstellung (2023). 53
- Abb. 14: mRNA Expressionsanalysen mittels quantitativer Echtzeit-PCR. Darstellung der Expression von OCTN1 (A-C), CPT1C (D-F) und CRAT (G-I) in Glioblastomproben im Vergleich zu Kontrollhirngewebe (A, D, G), im Vergleich zum Rezidivtumor (B, E, H) und nach Überlebenswahrscheinlichkeit (C, F, I) bei Unterteilung der Primärtumoren in Patienten mit hoher versus niedriger mRNA Expression bezogen auf den Median (Kaplan-Meier Überlebenszeitanalyse, nur verstorbene eingeschlossen, gestrichelte Linie zeigt die mittlere Überlebenswahrscheinlichkeit). Mann-Whitney-U-Test (* p-Wert < 0,05). Quelle: Eigene Darstellung (2023). 57
- Abb. 15: Nachweis von OCTN2 mittels Western Blot in verschiedenen Glioblastomzelllinien. Die Herkunft und Details der Zelllinien sind in Kapitel 2.7 aufgeführt (vgl. Tab. 9, S. 29). Die Positivkontrolle stellen Membranvesikel der menschlichen Plazenta dar und wurden freundlicherweise von Dr. Markus Grube zur Verfügung gestellt. Als OCTN2-Antikörper diente ein institutsintern durch Grube et al. (2005) hergestellter polyklonaler Kaninchenantikörper [83]. Quelle: Eigene Darstellung (2023). 58
- Abb. 16: Nachweis von GFAP und OCTN2 mittels Immunfluoreszenzfärbung in GL261 Zellen am konfokalen Laserscanning-Mikroskop. Unten links ist je Kachel die Kontrolle ohne primär Antikörperbehandlung und sonst gleichen Aufnahmebedingungen dargestellt. Balken entspricht 100 µm. Quelle: Eigene Darstellung (2023). 59
- Abb. 17: Darstellung der Phosphorylierung der Kinasen ERK1/2 durch Nachweis der phosphorylierten Form (pERK1/2) mittels Western Blot und der zugehörigen Quantifizierung. Die Normalisierung erfolgte auf den Housekeeper β-Actin (Ladungskontrolle). Zur densitometrischen Auswertung der Signale wurde Image Studio Lite verwendet. Keine signifikanten Unterschiede in ANOVA. n = 3. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung. Quelle: Eigene Darstellung (2023). 60
- Abb. 18: Darstellung der Phosphorylierung der Kinase AKT1 durch Nachweis der phosphorylierten Form (pAKT1) mittels Western Blot und der zugehörigen Quantifizierung. Die Normalisierung erfolgte auf den totalen AKT1 Gehalt

(tAKT1). Zur densitometrischen Auswertung der Signale wurde Image Studio Lite verwendet. ANOVA mit Dunnett Post-hoc-Test (* p-Wert < 0,05, n = 3). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Quelle: Eigene Darstellung (2023).

62

Abb. 19: Darstellung der Caspase-3 Aktivität. Die Caspase-3 Aktivität von LN-18 Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit Doxorubicin (A), Carmustin (B), Temozolomid (C), Vincristin (D) und Wasserstoffperoxid (E) in An- und Abwesenheit verschiedener Konzentrationen von L-Carnitin. Kruskal-Wallis-Test mit Dunns Post-hoc-Test (* p-Wert < 0,05, n = 5 für Lösungsmittelkontrolle, n = 4 für Wasserstoffperoxid, n = 3 für Doxorubicin, Carmustin, Temozolomid und Vincristin). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die durchgezogene waagerechte Linie stellt die Normierung auf 100 % (Lösungsmittelkontrolle) dar. Quelle: Eigene Darstellung (2023), adaptiert nach [95].

64

Abb. 20: Migration von Glioblastomzellen nach Behandlung mit L-Carnitin. Zur Bestimmung der migratorischen Aktivität von LN-18 Zellen (A-C), primären Glioblastom Zellen (D-F) und murinen GL261 Zellen (G-I) unter dem Einfluss von L-Carnitin (10, 50 und 100 μ M) wurde ein Wundheilungs-Assay (*Scratch-Assay*) durchgeführt. Die Migrationsrate wurde nach 16 h und 24 h anhand des Wundverschlusses (angegeben in %) der mikroskopischen Aufnahmen im Vergleich zum 0 h Wert berechnet. Keine signifikanten Unterschiede in ANOVA. n = 3. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Quelle: Eigene Darstellung (2023).

66

Abb. 21: Migration von LN-18 Zellen unter Einfluss von Temozolomid, Carmustin und Etomoxir in An- und Abwesenheit von L-Carnitin. Zur Bestimmung der migratorischen Aktivität von LN-18 Zellen wurden die Zellen für 24 h mit 250 μ M Temozolomid, 100 μ M Carmustin oder 100 μ M Etomoxir in An- und Abwesenheit von L-Carnitin (50, 100 und 250 μ M) behandelt und ein Wundheilungs-Assay (*Scratch-Assay*) durchgeführt. Die migratorische Aktivität wurde anhand des Wundverschlusses (angegeben in %) der mikroskopischen Aufnahmen im Vergleich zum 0-h-Wert berechnet. ANOVA mit Tukey Post-hoc-Test (* p-Wert < 0,05, n = 3 für DMSO und Etomoxir, n = 5 für Temozolomid und Carmustin). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Quelle: Eigene Darstellung (2023), adaptiert nach [95].

68

- Abb. 22: Viabilität (Resazurin-Assay) und Vitalität (Kristallviolett-Färbung) von LN-18 Zellen in 0,05 % FCS-haltigem DMEM-Medium nach Applikation von Meldonium oder Etomoxir in An- und Abwesenheit von L-Carnitin. Die Zellen wurden für 72 h mit 25 μ M Meldonium oder 25 μ M Etomoxir in An- bzw. Abwesenheit von L-Carnitin (50 und 100 μ M) kultiviert. Anschließend wurden Resazurin-Assay (A) und Kristallviolett-Färbung (B) durchgeführt. Kruskal-Wallis-Test mit Dunns Post-hoc-Test (* p-Wert < 0,05, n = 4). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Quelle: Eigene Darstellung (2023). 69
- Abb. 23: Viabilität (Resazurin-Assay) und Vitalität (Kristallviolett-Färbung) von GL261 Zellen in 0,05 % FCS-haltigem DMEM-Medium nach Applikation von Meldonium oder Etomoxir in An- und Abwesenheit von L-Carnitin. Die Zellen wurden für 72 h mit 25 μ M Meldonium oder 25 μ M Etomoxir in An- bzw. Abwesenheit von L-Carnitin (50 und 100 μ M) kultiviert. Anschließend wurden Resazurin-Assay (A) und Kristallviolett-Färbung (B) durchgeführt. Keine signifikanten Unterschiede. Kruskal-Wallis-Test mit Dunns Post-hoc-Test. n = 4. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Quelle: Eigene Darstellung (2023). 70
- Abb. 24: Viabilität (Resazurin-Assay) und Vitalität (Kristallviolett-Färbung) von GL261 Zellen in 0,05 % FCS-haltigem MEM-Medium nach Applikation von Meldonium oder Etomoxir in An- und Abwesenheit von L-Carnitin. Die Zellen wurden für 48 h mit 25 μ M Meldonium oder 25 μ M Etomoxir in An- bzw. Abwesenheit von L-Carnitin (50 und 100 μ M) kultiviert. Anschließend wurden Resazurin-Assay (A) und Kristallviolett-Färbung (B) durchgeführt. Kruskal-Wallis-Test mit Dunns Post-hoc-Test (* p-Wert < 0,05, n = 4). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Quelle: Eigene Darstellung (2023). 70
- Abb. 25: Darstellung exemplarischer lichtmikroskopischer Aufnahmen der zur stereotaktischen Tumorzellimplantation und Tumorinduktion genutzten GL261 Zellen. (A) zeigt für die Injektion genutzte GL261 Zellen, die für die tatsächliche Tumorzellinjektion genutzt wurden. (B) präsentiert GL261 Zellen, welche ungeöffnet als Kontrolle unter gleichen Bedingungen mitgeführt wurden. Der weiße Balken entspricht 75 μ m. Quelle: Eigene Darstellung (2023). 71

- Abb. 26: Vierarmiges Versuchsdesign für das orthotope Hirntumormodell in C57BL/6 Wildtyp Mäuse. t0 bis t26 bezeichnen die Versuchstage. OP: operative stereotaktische Implantation von murinen GL261 Zellen zur Tumorinduktion. MRT: Magnetresonanztomographie. Quelle: Eigene Darstellung (2023). 72
- Abb. 27: Darstellung des Belastungsgrades der C57BL/6 Wildtyp Mäuse im vierarmigen Versuchsdesign. Dargestellt sind gemittelte Werte für das Gewicht (A) sowie die Belastungsscores zum Körpergewicht (B), zum Allgemeinzustand (C), zu Verhaltensauffälligkeiten (D) und die Summe der einzelnen Belastungsscores (E) für die jeweiligen Versuchsarne (Kontrolle, Carnitin, Etomoxir, Meldonium). Die Tage mit Substanzinjektionen sind grau hinterlegt. Die Versuchstage auf der x-Achse nehmen nur ganzzahlige Werte an, zu Illustrationszwecken erfolgt die Darstellung mit leichten Abweichungen vom ganzzahligen Wert. Quelle: Eigene Darstellung (2023). 73
- Abb. 28: Korrelation zwischen Belastungsscore und Tumolvolumen an t26 für C57BL/6 Wildtyp Mäuse. Die blaue Linie stellt die Regressionsgerade dar, der graue Bereich dient der Illustration der Abweichung. Die farblich verschiedenen Datenpunkte gehören den jeweiligen Versuchsgruppen (Kontrolle, Carnitin, Etomoxir und Meldonium) an. Signifikante Korrelation mittels Spearmans ρ (p-Wert < 0,01). Um alle Tiere in der Korrelation darzustellen, erfolgte zu Illustrationszwecken eine Auftragung mit minimaler Differenz zum ganzzahligen Wert des Belastungsscores. Quelle: Eigene Darstellung (2023). 74
- Abb. 29: Graphische Darstellung des Tumorwachstums nach stereotaktischer Implantation von GL261 Zellen ins Gehirn von C57BL/6 Wildtyp Mäusen. Logarithmisches Tumolvolumen je Maus (A) und Mittelwerte (Punkte) \pm Standardabweichung (Fehlerbalken) der logarithmischen Tumorumina nach Behandlungsarm (B) ermittelt durch MRT an den Tagen 12 (t12) und 26 (t26) nach intrazerebraler Tumorzellimplantation. Die Versuchstage auf der x-Achse nehmen nur ganzzahlige Werte an, zu Illustrationszwecken erfolgt die Darstellung mit leichten Abweichungen vom ganzzahligen Wert. Tumorwachstum beziehungsweise logarithmische Tumorumindifferenz von t26 zu t12 in den jeweiligen Behandlungsarmen (C) dargestellt als Boxplot in üblicher Dimensionierung von Minimum bis Maximum mit Box von der 25. bis 75. Perzentile, waagerechtem Strich beim Median und Darstellung von Ausreißern als Punkte. Die Farbgebung der Darstellung

- erfolgte nach den jeweiligen Versuchsgruppen (Kontrolle, Carnitin, Etomoxir und Meldonium). ANOVA mit Tukey Post-hoc-Test (* p-Wert < 0,05, n = 10 für Kontrolle, Carnitin, n = 9 für Etomoxir, Meldonium). Quelle: Eigene Darstellung (2023), adaptiert nach [95]. 75
- Abb. 30: Darstellung von exemplarischen MRT-Aufnahmen des Gehirns nach Kontrastmittelgabe in T1 Wichtung von C57BL/6 Wildtyp Mäusen. Es sind vergleichend MRT-Bilder von Tag 12 (t12) und Tag 26 (t26) nach Tumorzellimplantation gezeigt: (A) Kontrolle, (B) Carnitin, (C) Etomoxir und (D) Meldonium. Quelle: Eigene Darstellung (2023), adaptiert nach [95]. 76
- Abb. 31: Darstellung der logarithmischen Tumolvolumendifferenzen bei C57BL/6 Wildtyp Mäusen im *waterfall plot* mit Einordnung in die verschiedenen Kategorien des Ansprechens auf die Substanzapplikation. Die Volumendifferenzen sind für die verschiedenen Behandlungsarme getrennt gezeigt: Kontrolle (A), Carnitin (B), Etomoxir (C) und Meldonium (D) in C57BL/6 Wildtyp Mäusen. Jeder Balken entspricht einem Individuum, welche der Größe nach geordnet dargestellt sind. Die zugehörige Volumendifferenz ist auf der y-Achse abgetragen, die Klassifizierung des Ansprechens auf die applizierten Substanzen (vgl. Kapitel 3.4.8, S. 53) ist farblich kodiert. Quelle: Eigene Darstellung (2023). 77
- Abb. 32: Zweiarmliges Versuchsdesign für das orthotope Hirntumormodell in heterozygoten $jvs^{+/-}$ -Mäusen. t0 bis t26 bezeichnen die Versuchstage. OP: operative stereotaktische Implantation von murinen GL261 Zellen zur Tumorinduktion. MRT: Magnetresonanztomographie. Quelle: Eigene Darstellung (2023). 78
- Abb. 33: Darstellung des Belastungsgrades der $jvs^{+/-}$ -Mäuse im zweiarmligen Versuchsdesign. Dargestellt sind gemittelte Werte für das Gewicht (A) sowie die Belastungsscores zum Körpergewicht (B), zum Allgemeinzustand (C), zu Verhaltensauffälligkeiten (D) und die Summe der einzelnen Belastungsscores (E) für die jeweiligen Versuchsarme (Kontrolle, Carnitin). Die Tage mit Substanzinjektionen sind grau hinterlegt. Die Versuchstage auf der x-Achse nehmen nur ganzzahlige Werte an, zu Illustrationszwecken erfolgte die Darstellung mit leichten Abweichungen vom ganzzahligen Wert. Quelle: Eigene Darstellung (2023). 79
- Abb. 34: Korrelation zwischen Belastungsscore und Tumolvolumen an t26 für $jvs^{+/-}$ -Mäuse. Die blaue Linie stellt die Regressionsgerade dar, der graue

Bereich dient der Illustration der Abweichung. Die farblich verschiedenen Datenpunkte gehören den jeweiligen Versuchsgruppen (Kontrolle, Carnitin) an. Keine signifikante Korrelation mittels Spearmans ρ (p-Wert: 0,21). Um alle Tiere in der Korrelation darzustellen, erfolgte zu Illustrationszwecken eine Auftragung mit minimaler Differenz zum ganzzahligen Wert des Belastungsscores. Quelle: Eigene Darstellung (2023).

80

Abb. 35: Graphische Darstellung des Tumorwachstums nach stereotaktischer Implantation von GL261 Zellen ins Gehirn von heterozygoten $jvs^{+/-}$ -Mäusen. Logarithmisches Tumolvolumen je Maus (A) und Mittelwerte (Punkte) \pm Standardabweichung (Fehlerbalken) der logarithmischen Tumorumfänge nach Behandlungsarm (B) ermittelt durch MRT an den Tagen 12 (t12) und 26 (t26) nach intrazerebraler Tumorzellimplantation. Die Versuchstage auf der x-Achse nehmen nur ganzzahlige Werte an, zu Illustrationszwecken erfolgte die Darstellung mit leichten Abweichungen vom ganzzahligen Wert. Tumorwachstum beziehungsweise logarithmische Tumorumfängendifferenz von t26 zu t12 in den jeweiligen Behandlungsarmen (C) dargestellt als Boxplot in üblicher Dimensionierung von Minimum bis Maximum mit Box von der 25. bis 75. Perzentile und waagerechtem Strich beim Median. Die Farbgebung der Darstellung erfolgt nach den jeweiligen Versuchsgruppen (Kontrolle, Carnitin). Kein signifikanter Unterschied im Student t-Test. Quelle: Eigene Darstellung (2023).

81

Abb. 36: Darstellung von exemplarischen MRT-Aufnahmen des Gehirns nach Kontrastmittelgabe in T1 Wichtung von $jvs^{+/-}$ -Mäusen. Es sind sowohl MRT-Bilder von Tag 12 (t12) und Tag 26 (t26) nach Tumorzellimplantation gezeigt: (A) Kontrolle, (B) Carnitin. Quelle: Eigene Darstellung (2023).

82

Abb. 37: Darstellung der logarithmischen Tumorumfängendifferenzen bei $jvs^{+/-}$ -Mäusen im *waterfall plot* mit Einordnung in die verschiedenen Kategorien des Ansprechens der Substanzapplikation. Die Volumendifferenzen sind für die verschiedenen Behandlungsarme getrennt gezeigt: Kontrolle (A), Carnitin (B) bei $jvs^{+/-}$ -Mäusen. Jeder Balken entspricht einem Individuum, welche der Größe nach geordnet dargestellt sind. Die zugehörige Volumendifferenz ist auf der y-Achse abgetragen, die Klassifizierung des Ansprechens auf die applizierten Substanzen (vgl. Kapitel 3.4.8, S. 53) ist farblich kodiert. Quelle: Eigene Darstellung (2023).

82

- Abb. 38: Zweiarmiges Versuchsdesign für das orthotope Hirntumormodell homozygoten $jvs^{-/-}$ -Mäusen. t0 bis t26 bezeichnen die Versuchstage. OP: operative stereotaktische Implantation von murinen GL261 Zellen zur Tumorinduktion. MRT: Magnetresonanztomographie. Quelle: Eigene Darstellung (2023). 83
- Abb. 39: Darstellung des Belastungsgrades der $jvs^{-/-}$ -Mäuse im zweiarmigen Versuchsdesign. Dargestellt sind gemittelte Werte für das Gewicht (A) sowie die Belastungsscores zum Körpergewicht (B), zum Allgemeinzustand (C), zu Verhaltensauffälligkeiten (D) und die Summe der einzelnen Belastungsscores (E) für die jeweiligen Versuchsarme (Kontrolle, Carnitin). Die Tage mit Substanzinjektionen sind grau hinterlegt. Die Versuchstage auf der x-Achse nehmen nur ganzzahlige Werte an, zu Illustrationszwecken erfolgte die Darstellung mit leichten Abweichungen vom ganzzahligen Wert. Quelle: Eigene Darstellung (2023). 84
- Abb. 40: Graphische Darstellung des Tumorwachstums nach stereotaktischer Implantation von GL261 Zellen ins Gehirn von homozygoten $jvs^{-/-}$ -Mäusen. Logarithmisches Tumolvolumen je Maus (A) und Mittelwerte (Punkte) \pm Standardabweichung (Fehlerbalken) der logarithmischen Tumorumfänge nach Behandlungsarm (B) ermittelt durch MRT an den Tagen 12 (t12) und 26 (t26) nach intrazerebraler Tumorzellimplantation. Die Versuchstage auf der x-Achse nehmen nur ganzzahlige Werte an, zu Illustrationszwecken erfolgt die Darstellung mit leichten Abweichungen vom ganzzahligen Wert. Tumorwachstum beziehungsweise logarithmische Tumorumfängendifferenz von t26 zu t12 in den jeweiligen Behandlungsarmen (C) dargestellt als Boxplot in üblicher Dimensionierung von Minimum bis Maximum mit Box von der 25. bis 75. Perzentile und waagrechtem Strich beim Median. Die Farbgebung der Darstellung erfolgt nach den jeweiligen Versuchsgruppen (Kontrolle, Carnitin). Kein signifikanter Unterschied im Mann-Whitney-U-Test. Quelle: Eigene Darstellung (2023). 85
- Abb. 41: Darstellung von exemplarischen MRT-Aufnahmen des Gehirns nach Kontrastmittelgabe in T1 Wichtung von $jvs^{-/-}$ -Mäusen. Es sind sowohl MRT-Bilder von Tag 12 (t12) und Tag 26 (t26) nach Tumorzellimplantation gezeigt: (A) Kontrolle, (B) Carnitin. Wegen der geringen Anzahl sind beide Versuchstiere (n1 und n2) aus dem jeweiligen Versuchsarm dargestellt. Quelle: Eigene Darstellung (2023). 86

- Abb. 42: Darstellung der logarithmischen Tumorumfängendifferenzen bei $jvs^{-/-}$ -Mäusen im *waterfall plot* mit Einordnung in die verschiedenen Kategorien des Ansprechens auf die Substanzapplikation. Die Volumendifferenzen sind für die verschiedenen Behandlungsarme getrennt gezeigt: Kontrolle (A), Carnitin (B) bei $jvs^{-/-}$ -Mäusen. Jeder Balken entspricht einem Individuum, welche der Größe nach geordnet dargestellt sind. Die zugehörige Volumendifferenz ist auf der y-Achse abgetragen, die Klassifizierung des Ansprechens auf die applizierten Substanzen (vgl. Kapitel 3.4.8, S. 53) ist farblich kodiert. Quelle: Eigene Darstellung (2023). 86
- Abb. 43: Vergleich der logarithmischen Tumorumfängendifferenzen von C57BL/6 Wildtyp, $jvs^{+/-}$ und $jvs^{-/-}$ -Mäusen. Darstellung der logarithmischen Tumorumfängendifferenz als Boxplot in üblicher Dimensionierung von Minimum bis Maximum mit Box von der 25. bis 75. Perzentile, waagerechtem Strich beim Median und Darstellung von Ausreißern als Punkte. Die Raute markiert jeweils den Mittelwert. Die durchgezogene horizontale Linie markiert den Mittelwert der Kontrollgruppe in C57BL/6 Wildtyp Mäusen, die gestrichelten horizontalen Linien markieren die Standardabweichung der Kontrollgruppe in C57BL/6 Wildtyp Mäusen, die gepunkteten vertikalen Linien grenzen die unterschiedlichen Versuchstiergruppen voneinander ab. Die Farbgebung der Darstellung erfolgte nach den jeweiligen Versuchsgruppen (Kontrolle, Carnitin, Etomoxir und Meldonium). Quelle: Eigene Darstellung (2023). 88

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Gerätschaften und Hilfsmittel. Quelle: Eigene Darstellung (2023).....	25
Tab. 2:	Chemikalien und Enzyme. Quelle: Eigene Darstellung (2023).....	26
Tab. 3:	Genexpressionsassays von Thermo Fisher Scientific. Quelle: Eigene Darstellung (2023).....	26
Tab. 4:	Kommerzielle Kits. Quelle: Eigene Darstellung (2023).....	26
Tab. 5:	Lösungen und Puffer. Quelle: modifizierte Darstellung nach Laborstandard (2023).....	27
Tab. 6:	Primäre Antikörper für Western Blot und Immunfluoreszenz. Quelle: Eigene Darstellung (2023).....	28
Tab. 7:	Sekundäre Antikörper für Western Blot. Quelle: Eigene Darstellung (2023).....	28
Tab. 8:	Sekundäre Antikörper für Immunofluoreszenzfärbungen. Quelle: Eigene Darstellung (2023).....	28
Tab. 9:	Übersicht über die verwendeten Zelllinien und deren Charakteristika und Referenzen. M: männlich. W: weiblich. NA: nicht verfügbar (engl. <i>not available</i>). Quelle: modifizierte Darstellung eigener Daten nach [95].....	29
Tab. 10:	Verwendete Software mit Anwendungsgebieten. Quelle: Eigene Darstellung (2023).....	30
Tab. 11:	Reaktionsansatz für die konventionelle PCR. Quelle: Eigene Darstellung nach Laborstandard (2023).....	32
Tab. 12:	Reaktionsansatz für Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RLFP). Quelle: modifizierte Darstellung nach Laborstandard (2023).....	33
Tab. 13:	Erkennungssequenzen des Restriktionsenzym Sau96I im Vergleich mit den Zielsequenzen. Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G), Thymin (T), beliebige Nukleinbase (N), Restriktionsenzymchnittstelle (I). Quelle: modifizierte Darstellung nach Laborstandard (2023).....	33
Tab. 14:	Reaktionsansatz für die Reverse Transkription zur Herstellung von cDNA. Quelle: modifizierte Darstellung nach Laborstandard (2023).....	34
Tab. 15:	Komponenten des Mastermixes für die qPCR. Quelle: modifizierte Darstellung nach Laborstandard (2023).....	35
Tab. 16:	Reaktionsansatz für die qPCR. Quelle: modifizierte Darstellung nach Laborstandard (2023).....	35
Tab. 17:	Protein-Lyse-Puffer. Quelle: modifizierte Darstellung nach Laborstandard (2023).....	37

Tabellenverzeichnis

Tab. 18:	Zusammensetzung von Sammelgel und Trenngel für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Quelle: modifizierte Darstellung nach Laborstandard (2023).	38
Tab. 19:	Eingesetzte Medien in der Zellkultur. Quelle: modifizierte Darstellung nach Laborstandard (2023).	42
Tab. 20:	Versuchsgruppen und zugehörige Versuchsarme. Quelle: Eigene Darstellung (2023).	46
Tab. 21:	Angewendeter Belastungsscore zur Dokumentation des Tierwohls im Tierversuch. Quelle: modifizierte Darstellung nach Arbeitsgruppenstandard (2023).	49
Tab. 22:	Magnetresonanztomografische Sequenzprofile. FOV (<i>field of view</i>); TR (<i>repetition time</i>); TE (<i>echo time</i>); TA (<i>aquisition time</i>); † <i>spin echo</i> ; ‡ <i>turbo spin echo</i> . Quelle: Eigene Darstellung (2023).	53
Tab. 23:	Substanzdosierungen im Tierversuch. Quelle: Eigene Darstellung (2023).	54
Tab. 24:	Tabellarische Darstellung der statistischen Kenngrößen über alle Versuchsarme hinweg. ANOVA mit Tukey Post-hoc-Test (* p-Wert < 0,05, n = 10 für Kontrolle, Carnitin, n = 9 für Etomoxir, Meldonium). Quelle: Eigene Darstellung (2023).	88

1 Einleitung

1.1 Das Glioblastom als primäre Neoplasie des Zentralnervensystems

1.1.1 Tumorerkrankungen – zweithäufigste Todesursache weltweit

Anders als noch vor mehreren Jahrzehnten und abgesehen von seltenen, großen Infektionswellen wie zum Beispiel der Corona-Pandemie, sind nichtübertragbare Krankheiten heutzutage von bedeutender und zunehmender Relevanz. So beziffert die WHO die Anzahl der Tode im Jahr 2016 aufgrund von nichtübertragbaren Krankheiten auf 41 Millionen, was 71 % aller Todesfälle eines Jahres entspricht [2]. Mit 44 % entfällt davon der Großteil auf kardiovaskuläre Erkrankungen, jedoch macht Krebs als zweithäufigste Erkrankungsgruppe immerhin 22 % der Todesursachenstatistik aus und beziffert sich damit auf circa neun Millionen Todesfälle [2]. Zum Größen- und Bedeutungsvergleich sei gesagt, dass Österreich im Jahr 2018 eine Einwohnerzahl von etwa 8,8 Millionen Menschen hatte, was in etwa der Menge der weltweiten Todesfälle durch Krebserkrankungen entspricht [3]. Absolute Vergleiche sind jedoch mit Vorsicht zu genießen, denn unter dem Schlagwort Krebs werden viele Krankheitsentitäten subsumiert. In Abb. 1 sind die Inzidenz und die Mortalität der zehn häufigsten Krebsarten gezeigt. Die Abbildung gibt einen Überblick über die Krankheitsentitäten. Nimmt man sich nur einmal Tumorerkrankungen der Organe Lunge, Kolon (inkl. Rektum), Magen, Leber und Brust heran, machen diese circa 50 % der Mortalität aus. Unter der Gruppe „Andere“ verbirgt sich entsprechend noch eine Vielzahl weiterer Tumorentitäten mit individuell seltenerem Vorkommen.

Die Bedeutung von Krebserkrankungen nimmt weltweit zu. Die Wichtigkeit von Todesfällen durch Krebserkrankungen muss dabei vor einem komplexen Hintergrund zunehmender Bevölkerungszahlen und insgesamt älter werdender Menschen betrachtet werden. Zum Teil reflektieren die Zahlen die Abnahme anderer Erkrankungen wie Schlaganfall und koronare

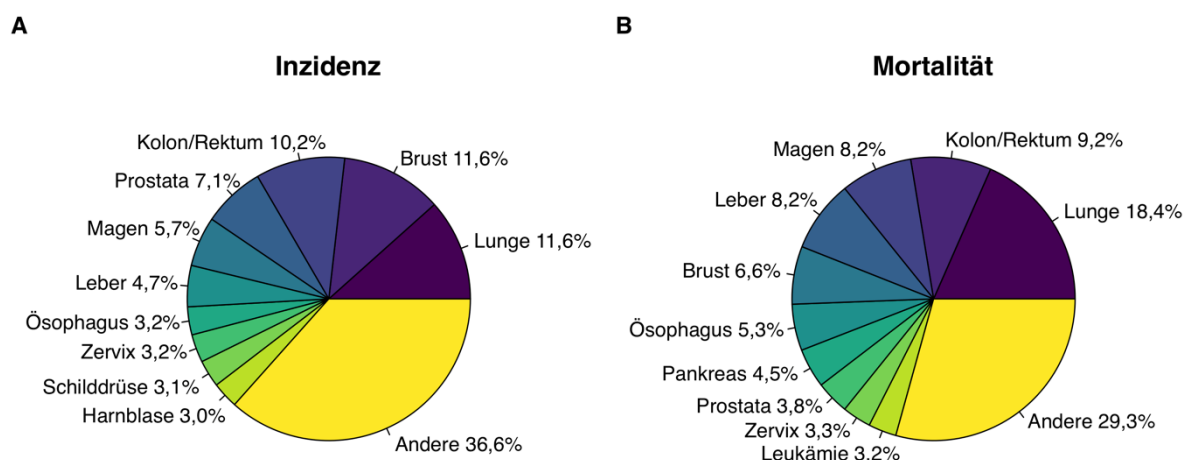


Abb. 1: Inzidenz (A) und Mortalität (B) der zehn häufigsten Tumorerkrankungen weltweit im Jahr 2018. Die zehn häufigsten Entitäten sind einzeln dargestellt, weitere sind unter der Bezeichnung „Andere“ zusammengefasst. Die Darstellung zeigt beide Geschlechter zusammen. Quelle: modifiziert nach Bray et al. (2018) [1].

Herzerkrankung. Nicht zuletzt hängt die Zunahme jedoch auch mit der ökonomischen Entwicklung der Länder zusammen [1]. Mit zunehmender wirtschaftlicher Entwicklung der Länder kann entsprechend der bisherigen Entwicklung vermutet werden, dass eine weitere Steigerung der Bedeutung von Krebserkrankungen zu erwarten ist.

Hanahan und Weinberg haben im Jahr 2000 die allgemein relevanten Kennzeichen von Krebserkrankungen als *Hallmarks of Cancer* beschrieben und im Jahr 2011 eine erweiterte Auflage des Konzepts publiziert [4, 5]. Dem aktuellen Konzept nach differenzieren sie zehn prägnante Tumorkennzeichen und potentielle therapeutische Angriffspunkte, welche in Abb. 2 illustriert sind. Die vielfältigen Kennzeichen von Tumoren verdeutlichen die vielgestaltige Komplexität von malignen Erkrankungen und unterstreichen außerdem die Bedeutung maßgeschneiderter Therapiestrategien je nach Tumorentität.

Dem Stoffwechsel im Tumor kommt hierbei eine besondere Bedeutung zu. Für das charakteristische Wachstum mit erhöhter Zellteilung wird mehr Energie benötigt. Da der Energiestoffwechsel in Tumoren sich von physiologischen Bedingungen unterscheidet und zeitlich sowie regional auf unterschiedliche Art und Weise in Tumoren aktiv sein kann, ist der veränderte Energiestoffwechsel als ein *Hallmark of cancer* beschrieben worden [5]. Die Rolle des

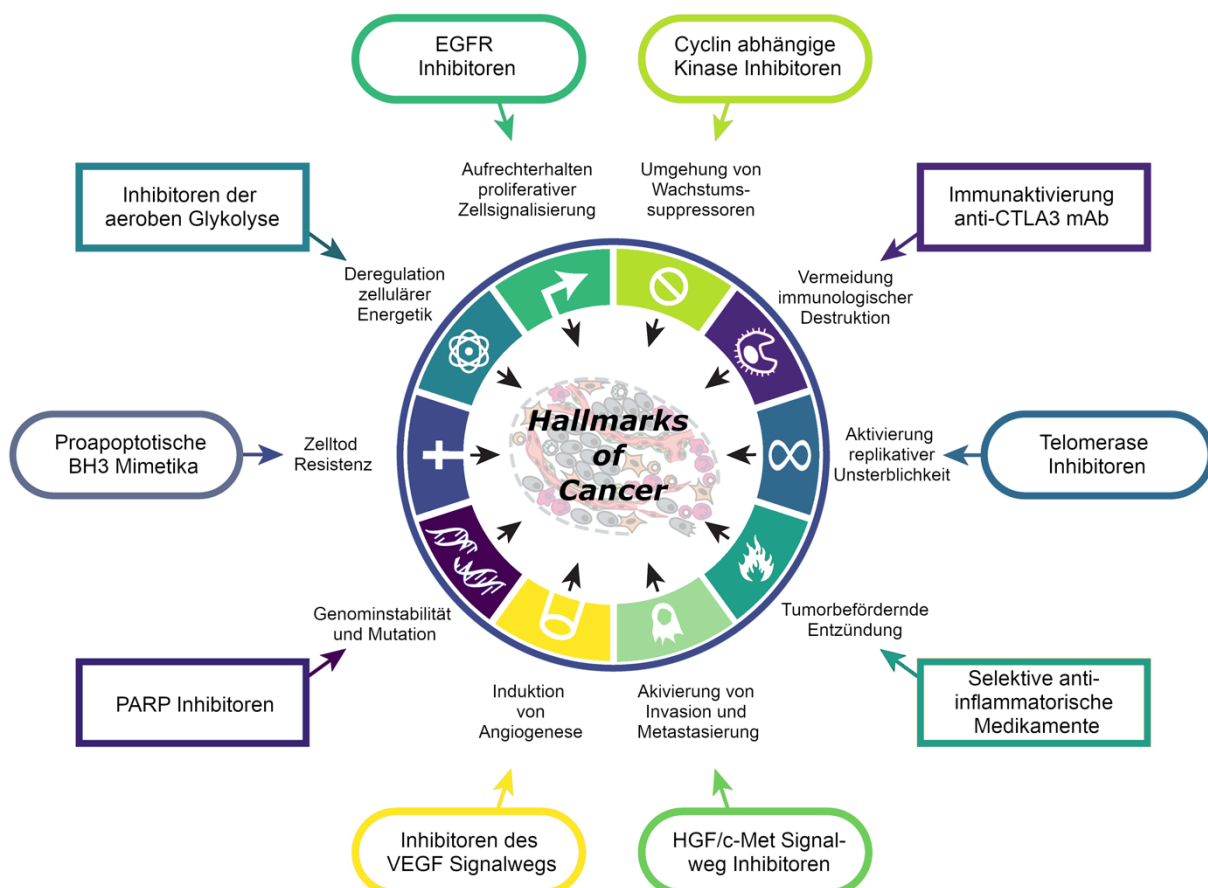


Abb. 2: Zusammenstellung der Hallmarks of Cancer. Darstellung der relevanten Kennzeichen von Krebserkrankungen und beispielhafter therapeutischer Angriffspunkte. Quelle: modifiziert nach Hanahan & Weinberg (2011) [5].

Metabolismus in Tumoren und im Glioblastom stellt ein zentrales Thema dieser Arbeit dar und wird im Kapitel 1.2 detailliert erläutert werden.

1.1.2 Hirntumoren und ihre Vielgestaltigkeit

Tumoren des Zentralnervensystems gehen direkt aus den (Vorläufer-)Zellen des Zentralnervensystems hervor, wie zum Beispiel Astrozyten, Oligodendrozyten, Ependymzellen oder Plexusepithelien. Je nach Wachstumsverhalten und Histopathologie werden die Tumoren des Zentralnervensystems analog zu allen anderen Neoplasien in benigne und maligne unterschieden [6]. Ein Beispiel für einen relativ häufig vorkommenden benignen Tumor des Zentralnervensystems ist das Meningeom [7]. In Abgrenzung zu den primären Tumoren des Zentralnervensystems gibt es auch Metastasierungen in das Zentralnervensystem durch andere, insgesamt wesentlich häufigere Tumorerkrankungen, wie malignen Tumoren der Lunge oder der Mamma, aber auch aus Melanomen, Nierentumoren und kolorektalen Karzinomen [8]. Auch gehen insgesamt mehr Tumoren im Gehirn auf Metastasierungen zurück als durch hirneigene Tumoren begründet werden [9]. Auf diese wird aufgrund ihres Ursprungs in dieser Arbeit jedoch nicht weiter eingegangen und sie werden auch nicht den Hirntumoren als solches zugerechnet. In der Betrachtung der Häufigkeitsverteilung der Hirntumoren (vgl. Abb. 3 A) imponiert direkt das Meningeom mit einer Häufigkeit von 37,1 %. Das Glioblastom als maligne, fatal verlaufende Hirntumorerkrankung macht hingegen 14,7 % aller Hirntumoren aus. In der fokussierten Ansicht der malignen Hirntumoren ist das Glioblastom jedoch mit 47,7 % am häufigsten vertreten (vgl. Abb. 3 B).

Die Daten über Todesursachen in Deutschland beziffern die Anzahl von Sterbefällen, die mit der ICD-10 Kodierung „C71 Bösartige Neubildungen des Gehirns“ erfasst wurden, auf eine Gesamtzahl von 5.770 Sterbefällen für das Jahr 2015 (weiblich: 2.492; männlich: 3.278) [10]. In Abb. 4 sind die in Deutschland häufigsten primären bösartigen Tumorentitäten des Zentralnervensystems visualisiert. Die Abbildung verdeutlicht mit einer Häufigkeit von 66 % für Männer und 67 % für Frauen die Bedeutung des Glioblastoms als häufigste primär hirneigene Tumorerkrankung auch für die deutsche Population.

Nach der WHO-Klassifikation werden Tumoren des Zentralnervensystems in 17 Gruppen mit jeweils multiplen Entitäten unterteilt. Die Klassifikation basiert auf einer Integration von phänotypischen und genetischen Merkmalen zwecks Differenzierung [6]. So vielfältig wie die Anzahl der Entitäten von Tumoren des Zentralnervensystems sind, so umfassend und unterschiedlich sind auch die Ansätze zur Erforschung der Erkrankungen mittels Tiermodellen sowie der Suche nach prognostischen Faktoren und Biomarkern zur Identifizierung von therapeutischen Zielstrukturen und Behandlungsstrategien [11].

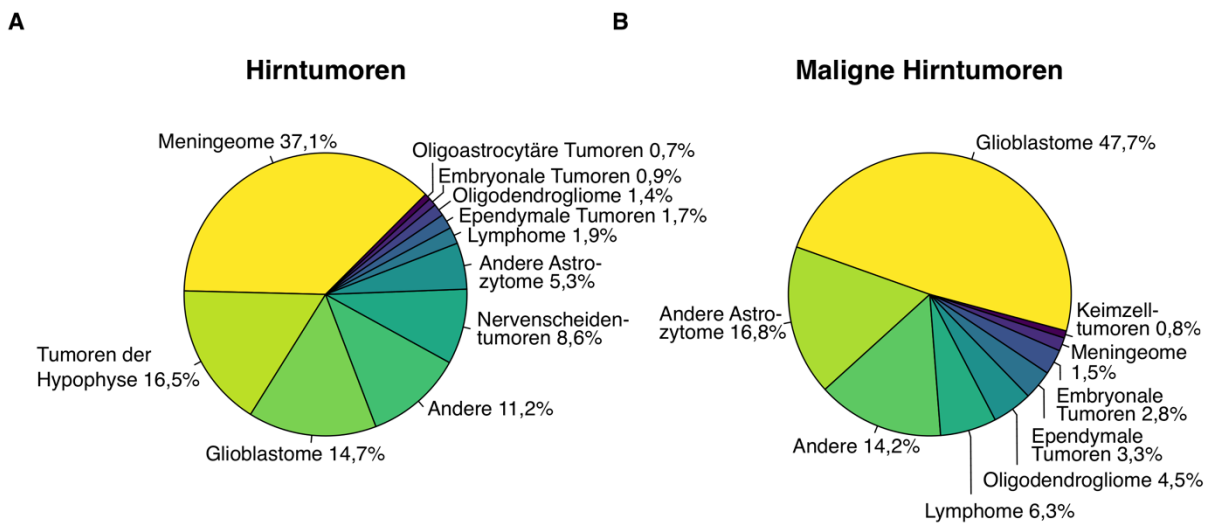


Abb. 3: Darstellung der Häufigkeit von primären Hirntumoren (A) und malignen Hirntumoren (B). Die Daten beziehen sich auf die Population der Vereinigten Staaten von Amerika. Quelle: modifiziert nach Ostrom et al. (2018) [7].

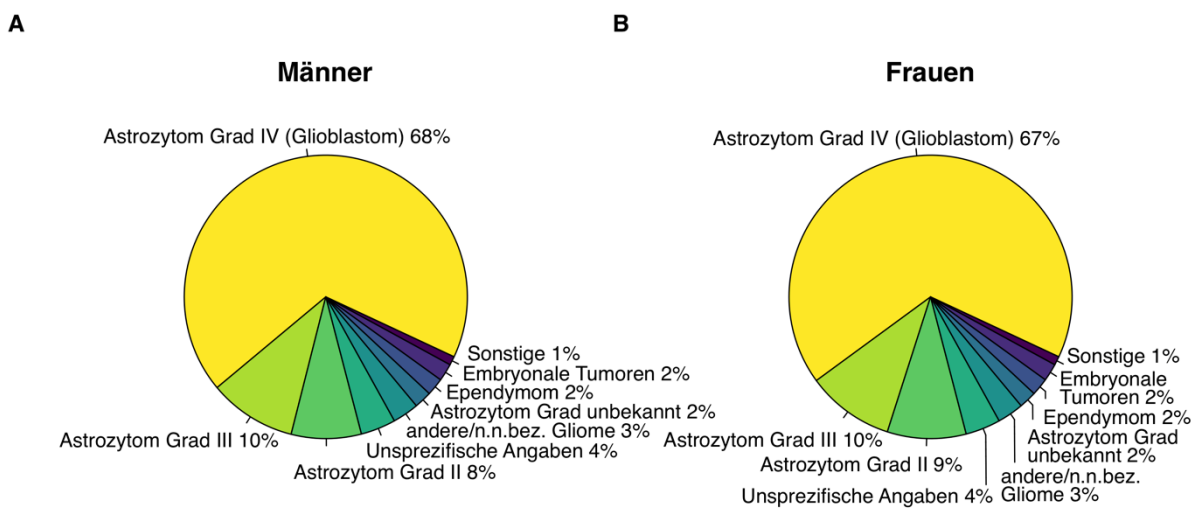


Abb. 4: Verteilung der bösartigen Hirntumoren für Männer (A) und Frauen (B) in Deutschland nach Histologie entsprechend WHO-Klassifikation (2016) für den Zeitraum 2015-2016. Astrozytome Grad II sind inkl. Oligodendrogliomen berechnet. Astrozytome Grad I sind per histologischer Definition gutartig und deshalb nicht dargestellt. Quelle: modifiziert nach Robert Koch-Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2019) [12].

Im Kontext von Hirntumoren erlangen aber nicht nur die Zellen des Tumors selbst eine spezifische Bedeutung. Aufgrund der Blut-Hirn-Schranke und dem abgegrenzten Zugriff des Immunsystems erlangt die Mikroumgebung des Tumors mit Einflüssen der nicht zum Tumor gehörenden Zellen eine besondere Bedeutung [13, 14]. Hieraus ergeben sich Besonderheiten bei der Betrachtung von Hirntumoren. Durch den begrenzten Raum und gegebenenfalls verdrängendes Wachstum können auch benigne Hirntumoren sehr problematisch werden. Je nach Lokalisation ergeben sich auch besondere Herausforderungen für eine operative Entfernung, bei der stets versucht wird gesundes Gewebe und die Hirnfunktionen umfassend zu erhalten.

1.1.3 Eigenschaften, Krankheitsverlauf und Behandlung des Glioblastoms

Das Glioblastom stellt die häufigste maligne hirneigene Tumorentität bei Erwachsenen dar. Der fatale Krankheitsverlauf dieser Tumoren kündigt sich selten an und wird meist erst in einem fortgeschrittenen Wachstumsstadium diagnostiziert. Ohne Therapie beläuft sich die mittlere Überlebenszeit lediglich auf circa drei Monate nach der Diagnosestellung. Mit der Standardtherapie liegt das mittlere Überleben bei etwa 15 Monaten. Leider kommt es in nahezu allen Fällen zu einem Rezidiv. Die Überlebensrate nach fünf Jahren beträgt lediglich um die zwei bis zehn Prozent [15, 16]. Eine kurative Therapie existiert bisher nicht.

Die ältere Bezeichnung *Glioblastoma multiforme* ist Ausdruck der makroskopischen und mikroskopischen Heterogenität des Glioblastoms, welche sich makroskopisch in Nekrosen und Blutungen zeigt und ebenso mikroskopisch durch pseudopalisadenartigen Nekrosen, pleomorphen Zellkerne und Zellen, sowie vaskulärer Proliferation zeigt [17]. Bis 2016 wurde der Tumor rein über seine histopathologische Morphologie klassifiziert. Mit der neuen Definition von 2016 wurde die Klassifikation um einen genetischen Bestandteil, nämlich den Mutationsstatus der Isocitrat-Dehydrogenase-1 (*IDH1*) erweitert. Die frühere Bezeichnung des primären und sekundären Glioblastom ist damit übergeleitet worden in IDH-Wildtyp und IDH-Mutante Tumoren [6, 18].

Per Definition ist das Glioblastom ein Grad IV Tumor, was bedeutet, dass die Dignität des Tumors als maligne einzuordnen ist. Die Einordnung beim *Grading* des Tumors basiert dabei weiterhin auf der Histopathologie und kann nicht ausschließlich mittels genetischer Merkmale erfolgen [6]. Metastasierungen außerhalb des Zentralnervensystems kommen beim Glioblastom sehr selten vor (ca. 0,2 – 2 %) und sind eher untypisch. Lokale Invasion und Streuungen in das Rückenmark hingegen kommen wesentlich häufiger vor [19]. Durch die häufige Rezidivrate ist ein Langzeitüberleben beim Glioblastom sehr selten. Nur in sehr wenigen Fällen überleben Patienten länger als fünf Jahre, wobei die Überlebenszeit von Faktoren wie dem Alter, dem Karnofsky-Performance-Score, sowie dem Mutationsstatus von *IDH1*, *PTEN* und *TP53* abhängig zu sein scheint [20].

Während die Entstehung von Gliomen bei einigen genetischen Syndromen (Neurofibromatose Typ 1 und Typ 2, Li Fraumeni Syndrom, Turcot-Syndrom) begünstigt sein kann, scheint dies für die Entstehung höhergradiger Gliome in Form der Glioblastome nur eine geringe Bedeutung zu haben [21, 22]. Ionisierende Strahlung zeigt eine Assoziation mit dem Vorkommen von höhergradigen Gliomen, wobei sich hier genetische Unterschiede zu spontan entstandenen Glioblastomen gezeigt haben [23]. Hinsichtlich des Ursprungs von Glioblastomen wurde längere Zeit angenommen, dass eine kleinere Fraktion von ca. 5 % aus anderen, weniger malignen

Gliomen hervorgeht und der Großteil der Glioblastome aus unbekanntem Gründen *de novo* entsteht [24]. Diese Unterscheidung in die häufigeren primären Glioblastome und selteneren sekundären Glioblastome wurde durch den IDH1-Mutationsstatus gestützt, welcher heutzutage zur Unterscheidung dient [6]. Nach der weiteren Untersuchung der Pathogenese von Glioblastomen wurde die Annahme, diese würden aus differenzierten Gliazellen entstehen, verlassen und sich der Hypothese zugewendet, dass diese aus Zellen mit Stammzelleigenschaften hervorgehen. Diese Gliomstammzellen zeichnen sich durch die Expression von Stammzellmarkern wie zum Beispiel von CD133 und Nestin aus [25, 26], wobei die Entstehung aus neuronalen Stammzellen durch replikativen Stress und die Dedifferenzierung aus Glioblastomzellen ohne Stammzelleigenschaften stipuliert wurden [27, 28]. Im Kontext von genetischer und epigenetischer Regulation, metabolischer Veränderung, immunologischen Prozessen, dem Tumormikroenvironment und hypoxischer Nischen ergeben sich multiple, noch nicht vollständig verstandene Einflussfaktoren auf die Gliomstammzellen [24]. In diesem Kontext erscheint es pragmatisch die als Ursprung und Treiber von Rezidiven verdächtigten Zellen mit Stammzelleigenschaften mit Hinblick auf eine potenzielle Behandlung ergänzend ins Visier zu nehmen.

Analog zu den bereits genannten *Hallmarks of cancer* lassen sich mit einem konkretisierten Konzept, die für Glioblastome angepassten *Hallmarks of glioblastoma*, genauer beschreiben und untersuchen. Dabei kristallisieren sich replikative Unsterblichkeit, Induzierung von Angiogenese, Reprogrammierung der zellulären Energetik und Vermeidung von immunologischer Zerstörung als zentrale *Hallmarks* für das Glioblastom heraus [29]. Es kann vermutet werden, dass in Zukunft auf Basis spezifischer Merkmale weitere Subgruppen beziehungsweise eigenständige Entitäten des Glioblastoms identifiziert werden. Eine Unterteilung in klassische, mesenchymale, proneurale und neurale Glioblastome auf Basis bestimmter genetischer Eigenschaften wurde zum Beispiel durch Verhaak et al. (2010) beschrieben, wobei sich diese Unterteilung nicht für die diagnostisch klinische Unterscheidungen etabliert hat [29, 30].

In Bezug auf die Aufrechterhaltung von proliferativen Signalwegen zeigten sich häufige Veränderungen in den Signalwegen RTK/RAS/PI3K, p53 und RB [30, 31]. Eine häufige zugrunde liegende Alteration dieser Signalwege stellen aktivierende *EGFR* Mutationen dar, wobei auch ein Verlust der Inhibierung dieser Signalkaskaden über *PTEN* Mutationen häufig eine Rolle spielt [29–32]. Bezüglich TP53 vermittelter Signalkaskaden gehen die beobachteten Veränderungen häufig auf Alterationen von *CDKN2A* oder TP53 selbst zurück [30]. Im Rahmen RB vermittelter Signalwege liegen häufig Inaktivierungen von *CDKN2A* und *CDKN2B* sowie partiell auch *RB* Gendeletionen vor [31]. Bei der Tumorprogression scheint der Funktionsverlust

von Tumorsuppressorgenen wie zum Beispiel *TP53*, *RB*, *LKB1* und *NF2* eine entscheidende Rolle zu spielen [29, 31, 33, 34].

Bei der intrazerebralen Ausbreitung des Glioblastoms, mit nur seltener Fernmetastasierung, spielen Invasion und Migration der Tumorzellen eine maßgebliche Rolle, wobei hierzu drei Hauptfaktoren identifiziert werden konnten. Erstens spielt mindestens Connexin 43 bei der Invasion der Tumorzellen in die unmittelbare Nachbarschaft des Tumors eine Rolle. Zweitens gibt es Effekte, welche durch inflammatorische Prozesse und Hypoxie bedingt Immunzellen nutzen und über eine verstärkte Aktivität von Metalloproteinasen die Möglichkeit eröffnen, dass der Tumor in umliegendes Gewebe migriert. Drittens kann eine Epithelial-mesenchymale Transition stattfinden, was meist mit einem E-Cadherin Verlust einhergeht und so eine erhöhte Zellmotilität ermöglicht [29].

Über die Induzierung von Angiogenese wird die Versorgung von Glioblastomzellen verbessert. Dies geschieht über mehrere Wege wie der Mutation von Onkogenen, aber auch über Immunzellen, welche sich im umgebenden Ödem versammeln. Dort kann eine Umwandlung in Perizyten stattfinden und so die Angiogenese und vaskuläre Versorgung stabilisieren. Genau dort setzt die therapeutische Intervention mit Bevacizumab an, welches den VEGF-Rezeptor angreift. Bevacizumab ist für die Glioblastombehandlung zugelassen, verlängerte in Studien aber lediglich das progressionsfreie Intervall und nicht das Gesamtüberleben [29, 35].

Die Resistenz der Glioblastomzellen gegenüber der Induktion des Zelltodes stellt einen weiteren wichtigen Faktor bei der Tumorprogression dar. Beispielsweise kann eine Blockade der Apoptose über mTOR, PI3K und AKT1 erfolgen [29].

Normalerweise kann das Immunsystem bis zu einem gewissen Grad die Entstehungen von Tumoren verhindern. Im Glioblastom kommt es durch eine Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen zu einer Unterdrückung immunologisch vermittelter Zerstörung von Glioblastomzellen. Dies bietet zusätzliche Ansatzpunkte für immunologisch basierte therapeutische Interventionen, wobei zugehörige Studien bisher keinen maßgeblichen Erfolg bei der Behandlung des Glioblastom zeigten [29, 36].

Des Weiteren bildet die Reprogrammierung zellulärer Energetik einen besonderen Bestandteil der *Hallmarks of glioblastoma*. Durch die Favorisierung von Glykolyse ohne Nutzung der mitochondrialen Atmungskette wird weniger ATP produziert. Allerdings werden Intermediate aus dem Citratzyklus für andere proliferative Pfade frei und durch die Hochregulation der Glukoseaufnahme über zum Beispiel GLUT1 durch RAS, MYC und TP53 erfolgt eine Umstellung des Zellmetabolismus in Richtung einer Proliferation. Auch der IDH1 hat einen Einfluss auf

die Energetik der Glioblastomzellen, wobei dies nur auf den geringeren Anteil der sekundären beziehungsweise IDH1-mutierten Glioblastome zutrifft [29].

In Zusammenschau der aufgeführten Aspekte der *Hallmarks of glioblastoma* werden die multiplen Veränderungen und die Komplexität ersichtlich, die sowohl Eigenschaften des Glioblastoms ausmachen, aber auch Ansatzpunkte für weitere Forschung und Entwicklung von Therapiestrategien liefern.

Eine umfassendere Präventions- oder Früherkennungsstrategie hat bei der Diagnostik von Gliomen allgemein keine Bedeutung. Nach Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (2021) sollte für die Diagnose eines Glioms eine Bildgebung zumeist in Form einer Magnetresonanztomographie durchgeführt werden [37]. Beim Glioblastom zeigt sich ein meist ungleichmäßig strukturierter kontrastmittelangereicherter Befund mit einer umgebenden Schwellung. Anamnestische Anhaltspunkte für eine intrakranielle Raumforderung und damit Indikation für eine Bildgebung können zum Beispiel neu aufgetretene fokale oder generalisierte Krampfanfälle, neurologische Ausfallserscheinungen, Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Bewusstseinsveränderungen oder Änderungen der Persönlichkeit sein [37]. Diagnostisch werden teils strukturierte klinische Untersuchungen und neuropsychologische Tests ergänzt [37]. Bei einer starken peritumoralen Hirnschwellung wird nach Leitlinie zunächst eine Behandlung mit Kortikosteroiden zur Abschwellung empfohlen [37]. Zur histopathologischen Diagnostik ist die Gewinnung einer Biopsie oder umfassende Resektion empfohlen, wobei dies vom spezifischen Zustand des Patienten abhängt [37]. Standardtherapie des Glioblastoms (IDH1-Wildtyp) ist die möglichst vollständige Resektion und konsekutive kombinierte Radiochemotherapie mit einer Gesamtstrahlendosis von 60 Gy und begleitender täglicher Gabe von 75 mg/m² KOF Temozolomid und anschließend sechs Zyklen Erhaltungstherapie mit Temozolomid (150 – 200 mg/m² KOF, an 5 von 28 Tagen) [15, 37]. Die Wirksamkeit einer Temozolomidtherapie hängt aber stark vom MGMT Promotorstatus ab, sodass dieser möglichst bestimmt wird, um die Therapie entsprechend anzupassen [37, 38]. Zu den neueren Therapieempfehlungen gehört die Anwendung elektrischer Wechselfelder (*Tumor treating fields*) nach Umsetzung der primären Therapie, da hierdurch ein längeres progressionsfreies Intervall und längeres Gesamtüberleben erreicht werden konnte [37, 39].

1.2 Metabolische Veränderungen im Glioblastom und die Bedeutung der β -Oxidation

1.2.1 Wege der Energiegewinnung in normalen Zellen und Tumorzellen

In Bezug auf die Energieversorgung und den Metabolismus von Zellen weisen Tumorzellen besondere Eigenschaften auf. Als zentraler Energieträger in biologischen Systemen kann

sicherlich Glukose angesehen werden [40]. Glukose wird im Menschen bei Anwesenheit von Sauerstoff meistens sehr effizient über Glykolyse, Citratzyklus und Atmungskette zu ATP umgesetzt (vgl. Abb. 5 A), welches dann als Energielieferant für zelluläre Prozesse dient [40, 41]. Steht kein Sauerstoff zur Verfügung kann Glukose über die anaerobe Glykolyse auch zu Lactat umgesetzt werden (vgl. Abb. 5 B), wobei hierbei nur 4 Mol ATP pro Mol Glukose entstehen, statt 36 Mol, wie bei der oben beschriebenen oxidativen Phosphorylierung [41]. Neben der Verwertung von Glukose stellt die β -Oxidation zur Nutzung von Fettsäuren einen weiteren wesentlichen Energielieferanten für Zellen dar (vgl. Abb. 5 D), wobei hierbei zum Beispiel pro Mol Palmitinsäure 106 Mol ATP resultieren [40, 42].

Tumorzellen können unterschiedliche Wege der Energiegewinnung nutzen, wobei die Veränderung metabolischer Funktionen in Tumorzellen ein *Hallmark of cancer* darstellen [5]. Dabei ist interessant, dass Krebszellen häufig trotz Verfügbarkeit von Sauerstoff Glukose zu Lactat umsetzen, was durch Otto Warburg als aerobe Glykolyse bezeichnet wurde (vgl. Abb. 5 C).

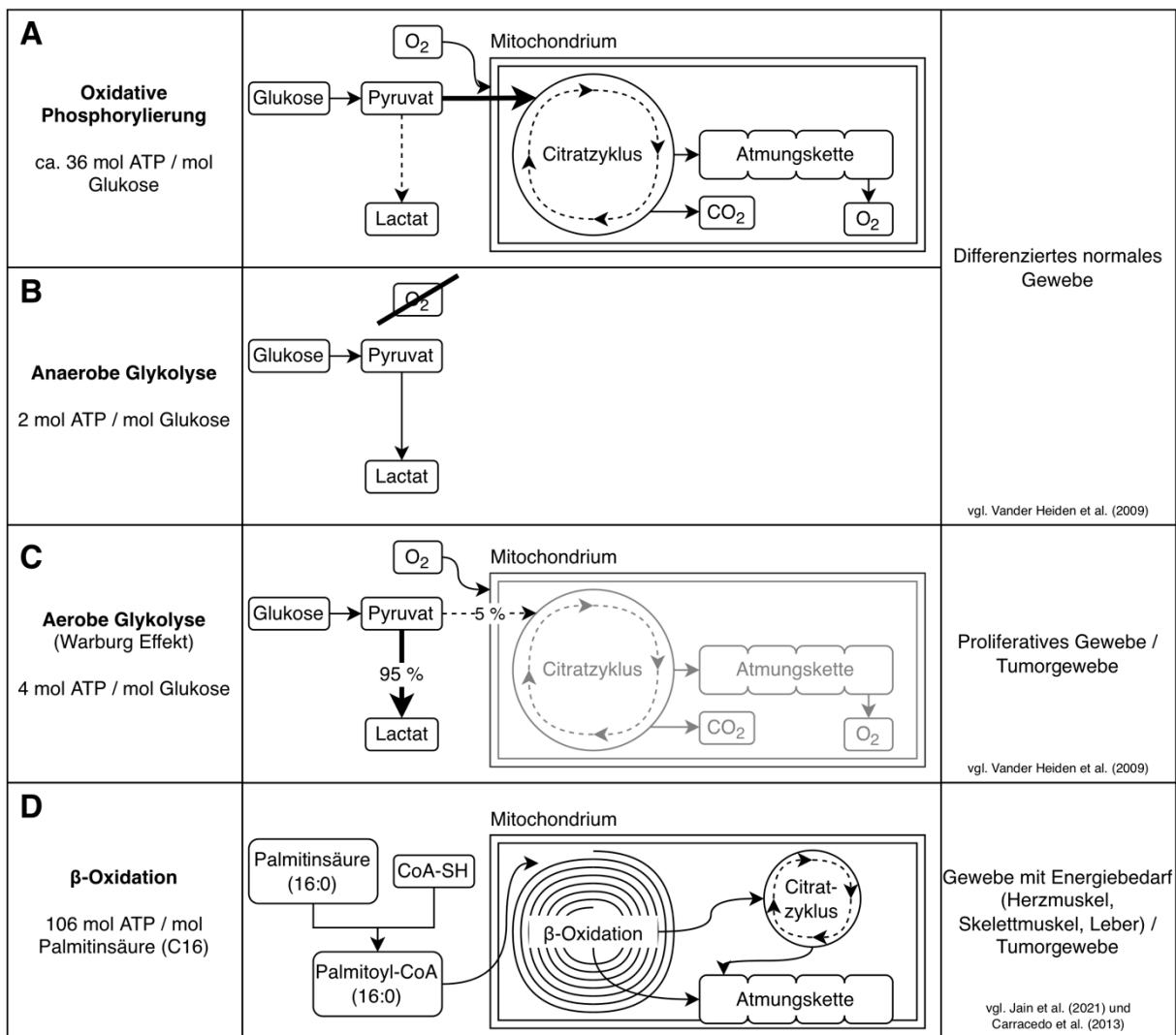


Abb. 5: Vergleichende Darstellung der möglichen Wege zur Energiegewinnung in Zellen und Geweben. Palmitinsäure (16:0): 16 Kohlenstoffatome und Null Doppelbindungen. CoA-SH: Coenzym-A. ATP: Adenosintriphosphat. Quelle: Eigene Darstellung (2023), adaptiert nach [41–43].

Der Vorgang der aeroben Glykolyse wurde durch Otto Warburg als ein typisches Merkmal von Tumorzellen dargestellt und ist als Warburg-Effekt bekannt [5, 44]. Hierbei werden bilanziell nur 2 Mol ATP pro Mol Glukose erzeugt. Somit wird hier deutlich mehr Glukose verbraucht, um gleiche Mengen ATP zu generieren, was auf den ersten Blick wenig plausibel erscheint. Die günstigen Auswirkungen dieses Mechanismus für den Organismus werden jedoch bei genauerer Betrachtung verständlich.

Betrachtet man organüberspannende Systeme, wird klar, dass das bei der aeroben Glykolyse entstehende Lactat dem gesamten Organismus nicht verloren geht, sondern in der Leber wieder zu Glukose aufgebaut werden kann [41]. Weiterhin haben proliferierende Zellen metabolische Bedürfnisse, welche weit über die Bereitstellung von hinreichenden Mengen ATP hinausgehen. Für die Zellteilung via Mitose werden alle Zellbestandteile verdoppelt, was eine große Menge von Nukleotiden, Aminosäuren und Lipiden notwendig macht und nicht allein über genügend ATP realisiert werden kann, sondern zum Beispiel auch Reduktionsäquivalente in Form von NADPH notwendig macht [41].

In proliferierendem Gewebe liefert Glukose einerseits Energie, aber auch Biomasse in Form von Kohlenstoff. Neben Glukose gibt es jedoch weitere relevante Stoffwechselbausteine, wie zum Beispiel Glutamin und Fettsäuren die in eigenen Stoffwechselwegen umgesetzt werden und im Folgenden genauer betrachtet werden sollen [41]. Mit zunehmendem Wissen über den Tumormetabolismus rückt der Fokus weg von der einfachen Betrachtung von Glukose und Glutamin hin zur Betrachtung des Zusammenspiels mit weiteren Stoffwechselwegen. Zu nennen sind beispielsweise der Metabolismus von Serin und weiteren Aminosäuren oder Fettsäuren, aber auch die Bedeutung von Nährstoffknappheit und von Sauerstoff beziehungsweise *reactive oxygen species* (ROS) in solchen Prozessen [41, 45].

Der primäre Fokus auf Glukose bleibt jedoch nicht unbegründet, denn bei hohem Umsatz von Glukose zu Pyruvat und anschließend zu Lactat wird auch ein Anteil in den Citratzyklus geschleust und zu Acetyl-CoA umgesetzt, was wiederum zum Aufbau von Fettsäuren, Lipiden oder Cholesterol, aber auch zu Aminosäuren wie Aspartat und Asparagin, genutzt werden kann [45]. Gleichzeitig stellt die Glykolyse Verbindungen zu weiteren wichtigen Stoffwechselwegen dar. Über Glukose-6-Phosphat kann ein Eintritt in den Pentosephosphatweg erfolgen, welcher neben der Nukleotidsynthese auch zur NADPH Produktion dient. Über 3-Phosphoglycerat (3PG) kann ein Stoffwechsel zum Serinmetabolismus ablaufen, welcher für die Bereitstellung von Methylgruppen bedeutsam ist [45].

Bei hohem Lactatumsatz sowie über Glutamin können NADPH Ressourcen wieder aufgefüllt werden, was für die Bereitstellung anaboler Stoffwechselprodukte notwendig ist und für die

Produktion von zum Beispiel Fettsäuren, Aminosäuren oder Nukleinsäuren benötigt wird [41]. Glutamin als am meisten im Blut zirkulierende Aminosäure dient als Quelle für Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen und trägt über die Umwandlung zu α -Ketoglutarat (α -KG) beispielsweise zur Anaplerose des Citratzyklus bei [45]. Serin stellt eine wichtige Schnittstelle zum Stoffwechsel von Methylgruppen dar (engl. *one-carbon metabolism, 1C metabolism*), welcher wiederum in viele weitere Stoffwechselffade integriert ist, da Methylgruppen für DNA-Methylierung und Nukleotidsynthese gebraucht werden [46]. Neben Serin trägt aber auch die Aminosäure Methionin zum Methylgruppenstoffwechsel bei [45]. Arginin und Ornithin hingegen sind beispielsweise bedeutsam in der Polyaminsynthese und darüber relevant für die Zellproliferation [45]. Das Molekül Acetyl-CoA wiederum dient zum Aufbau von Fettsäuren oder Cholesterolen. Beim Abbau derselben stellt Acetyl-CoA aber auch das Bindeglied zur Energieverwertung dar [45]. Ergänzt wird dies noch um die Fähigkeit von Tumorzellen zur Autophagie und Makropinozytose in Situationen von Nährstoffknappheit [45]. Eine anteilig stattfindende Nutzung von Sauerstoff in Mitochondrien trägt zur Generierung von ROS bei, welche über Glutathion und NADPH abgebaut werden [45].

Die Steuerung des Tumormetabolismus erfolgt über genetische Faktoren und zelluläre Signalkaskaden sowie über gebildete Zwischenmetabolite. Über den PI3K/AKT Signalweg wird zum Beispiel die Aufnahme und Verwertung von Glukose gesteuert, allerdings gibt es vielfältige weitere Ansatzpunkte des Metabolismus, die bei Tumorerkrankungen alterniert sein können [41]. Einen ebenfalls relevanten Aspekt in der Regulation des zellulären Metabolismus in Tumoren bilden sogenannte Onkometabolite. Durch hohe Spiegel von D-2-Hydroxyglutarat (D-2HG), Succinat oder Fumarat werden Dioxygenasen blockiert und darüber eine Zelldifferenzierung verhindert [47].

Im Tumormetabolismus ist die Betrachtung limitierender Faktoren der Proliferation besonders wichtig. Zum Beispiel scheint die ATP Produktion kaum limitierend zu sein, was sich auch in der ineffizienten aeroben Glykolyse widerspiegelt [47]. Die Generierung von NADPH scheint über verschiedene Mechanismen in Tumoren ausreichende Reserven für die Proliferation zu erzeugen, sodass NADPH am ehesten nicht limitierend hierfür ist, wenngleich das $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ Verhältnis eher limitierend zu sein scheint verglichen mit der Bereitstellung von ATP [47]. Intermediate des Citratzyklus hingegen können limitierend sein, insbesondere für die Herstellung von Aminosäuren bei der Zellteilung [47]. Ebenso stellt die Nukleotidsynthese einen limitierenden Faktor dar und benötigt ein Zusammenspiel des Metabolismus von Ribose, Aminosäuren und Methylgruppenstoffwechsel sowie der Verfügbarkeit von Sauerstoff [47].

Aus genetischen Faktoren und der spezifischen Mikroumgebung der Tumorzellen ergeben sich über den zellulären Metabolismus Auswirkungen für Metastasierung, Therapieresistenz und Therapieansätze [47]. Detaillierte Kenntnisse über den Tumormetabolismus sind von essenzieller Bedeutung, um einerseits die Tumorentwicklung und -progression besser zu verstehen und andererseits therapeutische Ansatzpunkte zu finden. Neben der Deskription entsprechender metabolischer Veränderungen stellt die gentechnische oder pharmakologische Einflussnahme einen wesentlichen methodischen Ansatz dar, wobei auch eine Ernährungsumstellung auf Ebene des Organismus zur Einflussnahme auf den Tumormetabolismus diskutiert wird. Dabei haben unterschiedliche Tumorentitäten jeweils komplexe individuelle Eigenschaften. Im Folgenden soll daher eine Darstellung relevanter Veränderungen im Metabolismus von Glioblastomen erfolgen.

1.2.2 Metabolische Veränderungen im Glioblastom: Bedeutung von Fettsäuremetabolismus und β -Oxidation

Es ist bekannt, dass Glioblastomzellen *in vitro* beispielsweise 90 % der Glukose und 60 % des Glutamins zu Lactat umsetzen, was zwar mit einer geringeren Bildung von ATP einhergeht, aber eine zuverlässige Generierung von NADPH sicherstellt [41, 48].

Zudem ist beschrieben, dass Zellen unter Stressbedingungen vermehrt Triacylglycerole bilden und intrazellulär sogenannte Lipidtropfen erzeugen. Unter kompletter Deprivation von Nährstoffen bilden beispielsweise HeLa Zervixkarzinomzellen und LN-18 Glioblastomzellen solche Lipidtropfen [49]. Bei Nährstoffmangel beziehen die Tumorzellen ihre Energie aus diesen Lipidtropfen, was die Bedeutung des Fettsäuremetabolismus für die Aufrechterhaltung der Homöostase in nährstoffdeprivierten Tumoren, wie auch im Glioblastom, verdeutlicht [49].

LN-18 Glioblastomzellen mit hoher Expression der onkogenen Kinase AKT1 zeigen eine große Abhängigkeit vom Glukosemetabolismus. Kommt es jedoch zu einer AMPK (AMP-aktivierte Proteinkinase) abhängigen Stimulation der Fettsäureoxidation, dann bleiben die Zellen auch bei Glukosemangel überlebensfähig [50]. Die metabolischen Veränderungen in Krebszellen, manchmal auch plakativ „*metabolic switch*“ genannt, waren bislang sehr stark auf den Warburg Effekt und veränderte Mechanismen des Glukosestoffwechsels fokussiert, während beispielsweise Alterationen der β -Oxidation eher vernachlässigt wurden. Fettsäuren sind äußerst energiedicht und können nach Transport mittels CPT1 über die mitochondriale Membran im Rahmen der β -Oxidation zu Acetyl-CoA abgebaut werden, was als Intermediat des Citratzyklus zur Energiegewinnung und Regeneration von für die Proliferation notwendigen NADPH dienen kann [43]. Zudem kann bei Hypoxie und Glukosemangel über AMPK und CPT1C die Fettsäureoxidation aktiviert werden, über weitere hiermit assoziierte Mechanismen die Apoptose gehemmt sowie ausreichend ATP und NADPH bereitgestellt werden [43].

Interessanterweise konnte eine Studie an Glioblastomzellen von Berge et al. (2003) zeigen, dass sich unter Gabe von Palmitinsäure eine Reduktion der Proliferation ergibt, die jedoch durch Carnitin teilweise wiederhergestellt werden konnte [51]. Unklar bleibt, ob der antiproliferative Effekt von Palmitinsäure lediglich aus der isolierten Betrachtung heraus entstand, da neuere Studien eine rege Nutzung der β -Oxidation durch Glioblastomzellen nahelegen.

So konnte gezeigt werden, dass Glioblastomzellen für die Proliferation auf die Oxidation von Fettsäuren zurückgreifen, wobei das *Acyl-CoA-binding protein* (ACBP) hierfür eine entscheidende Rolle spielt [52]. Dies rückt die Bedeutung des Fettsäuremetabolismus in Glioblastomzellen in ein neues Licht und eröffnet einen bislang verhältnismäßig wenig verstandenen Bereich des Glioblastometabolismus [53].

In einer Untersuchung zur Rolle der Rezeptortyrosinkinase c-MET im Glioblastom zeigte sich nach gentechnischer und pharmakologischer Inhibition von c-MET eine Anreicherung von Acylcarnitinen und Steigerung von PGC1 α (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*). Hierbei wurde vermehrt ein oxidativer Metabolismus über die β -Oxidation beobachtet, was durch den Glukosestoffwechsel unterstützt wurde und parallel in Mitochondrienfusion und mehr ROS resultierte [54]. Auch in SF188 Glioblastomzellen wird die β -Oxidation zur Energiegewinnung genutzt. Eine Blockade der β -Oxidation durch Etomoxir als CPT1 Inhibitor zeigt eine Reduktion von verfügbarem ATP und niedrigere Viabilität in Kombination mit geringeren NADPH und reduzierten Glutathion Spiegeln und höheren Spiegeln von ROS [55]. Dabei erfüllt die β -Oxidation vermutlich zweierlei Funktionen in Glioblastomen. Je nach Umgebungsfaktoren kann die β -Oxidation die Proliferation antreiben und in ungünstigen Nährstoffsituationen eine alternative Quelle für ATP darstellen. Hierdurch erlangen Glioblastomzellen eine gewisse metabolische Plastizität für unterschiedliche Umgebungsbedingungen [56].

In klinischen Proben von Gliomen mit IDH1 Mutation, deren Prognose deutlich besser ist als die von Tumoren ohne IDH-Mutation [57], wurden signifikant erhöhte Werte von D-2-Hydroxyglutarat (D-2HG) nachgewiesen [58]. Dies ging mit einer Reduktion von Intermediaten des Citratzyklus, aber auch verringerter β -Oxidation einher, wobei bei letzterem eine Assoziation mit verminderten Acylcarnitin- und L-Carnitin-Spiegeln hergestellt werden konnte [58].

In einer parallel zur chirurgischen Resektion durchgeführten Studie zur Stoffwechselaktivität von Glioblastomen zeigte sich eine Lactatproduktion in erwartetem Umfang. Interessanterweise wurde jedoch weniger als 50 % des Acetyl-CoA aus aufgenommener Glukose gebildet, was nahelegt, dass dies aus anderen Substraten hergestellt wird [59], wobei der β -Oxidation

hierbei eine besondere Rolle zukommt. Bei einer Inhibition der β -Oxidation in primären Glioblastomzellen sowie einem Glioblastom-Mausmodell zeigte sich ein verbessertes Überleben, was die Relevanz der β -Oxidation als fördernden Mechanismus der Tumorprogression von Glioblastomen verdeutlicht [60].

Basierend auf diesen Erkenntnissen verdichtet sich für das Glioblastom zunehmend die Hypothese einer hohen Relevanz der β -Oxidation für das Tumorgeschehen. Dies ist zum einen für das Verständnis der Pathogenese des Glioblastoms von Relevanz, bietet aber auch Ansatzpunkte zur therapeutischen Intervention.

Kontrovers diskutiert wird in diesem Zusammenhang die Rolle einer ketogenen Diät als mögliche therapeutische Intervention beim Glioblastom. Da Glukose und assoziierte Stoffwechselwege einen großen Anteil am Tumorstoffwechsel zu haben scheinen, lag die Vermutung nahe, mittels einer kohlenhydratarmen, ketogenen Diät die Tumorentstehung beziehungsweise das Tumorwachstum zu verhindern [61]. In präklinischen Studien haben sich dahingehend antitumorale Effekte gezeigt, jedoch sind die Ergebnisse in humanen Studien aktuell noch uneinheitlich und ergaben keinen eindeutigen prognostischen Nutzen einer ketogenen Diät [62].

Auch für das Glioblastom wurden bereits Überlegungen und Studien zur Etablierung einer ketogenen Diät angestellt, um das Tumorwachstum zu bremsen beziehungsweise das Überleben der Patienten zu verbessern, indem die Verfügbarkeit von Glukose für den Tumor reduziert wird [63]. Eine ketogene Diät geht mit relativ starken Einschränkungen der Ernährung einher. Vorbereitende Studien, um eine ketogene Diät als Zusatzintervention beim Glioblastom zu überprüfen, sind Gegenstand verschiedener Arbeiten [62, 64, 65]. Wegen großer Herausforderungen bei ketogenen Diäten hinsichtlich der Variabilität, Adhärenz und Durchführbarkeit wurde jüngst eine Studie mit komplettem Austausch der Mahlzeiten nach standardisierten Rezepten untersucht. Hierbei wurden jedoch nur acht Probanden rekrutiert, von denen zwei die Studie abgebrochen haben. Aus den vorliegenden Ergebnissen lässt sich zudem kein Therapievorteil ableiten [66]. Andere Studien haben ebenfalls lediglich die Sicherheit und unmittelbare Durchführbarkeit eines solchen ketogenen Therapieansatzes überprüft [67]. Dabei zeigte sich jedoch trotz positiver Ausgangsbedingungen der Probanden ein im Vergleich zu anderen Studien schlechtes Überleben. Zudem müssen in diesem Kontext durchaus auch potentielle Risiken einer ketogenen Diät beachtet werden [68], dennoch halten die Autoren der ursprünglichen Studie an ihrem Ansatz einer ketogenen Therapie beim Glioblastom fest [69]. Die Komplexität von Mechanismen, mit beispielsweise auch einer Beeinflussung des Mikrobioms, welche durch eine ketogene Diät hervorgerufen werden, bleiben bis dato nur teilweise verstanden und könnten sich unter Umständen auch negativ für den Patienten auswirken [70].

Insbesondere mit Hinblick auf die Bedeutung der β -Oxidation für das Glioblastom muss jedoch kritisch hinterfragt werden, ob eine ketogene Diät nicht mehr Nachteile und Risiken birgt als es Vorteile entfaltet. In einer Arbeit von Sperry et al. (2020) konnte gezeigt werden, dass Glioblastomzellen neben der β -Oxidation auch den Ketonstoffwechsel zur Energiegewinnung nutzen. Die Inhibition der β -Oxidation reduzierte dabei das Zellwachstum im Glioblastom *in vitro* und *in vivo*. Dabei konnte zudem beobachtet werden, dass eine ketogene Diät das Tumorstadium in GBM-Modellen verstärkt und mit einem geringeren Überleben einhergeht [71].

Zusammenfassend zeigten sich in Glioblastomen metabolische Veränderungen, welche vor allem die Bedeutung der β -Oxidation verdeutlichen. Ein „*lipidomic remodelling*“ mit Veränderungen des Fettsäuretransports, der Lipidbildung und Lipidtropfenbildung, aber auch der β -Oxidation, stellt eine generelle Eigenschaft verschiedener Krebsentitäten dar und spielt, wie oben ausgeführt, beim Glioblastom eine besondere Rolle [72]. Ein zwischenzeitlicher Trend einer metabolischen Beeinflussung von Glioblastomen mittels ketogener Diäten bleibt vor dem aktuellen Wissensstand eher kritisch zu betrachten. Mit dem genaueren Verständnis der metabolischen Prozesse im Glioblastom eröffnen sich jedoch Möglichkeiten spezifische Reaktionswege pharmakologisch zu beeinflussen.

1.3 L-Carnitin und der Membrantransporter OCTN2 als essentielle Komponenten der β -Oxidation

Damit die β -Oxidation möglichst effizient ablaufen kann, ist es für die Zelle von besonderer Bedeutung ausreichend mit L-Carnitin versorgt zu werden, damit langkettige Fettsäuren in die mitochondriale Matrix transloziert werden können. An der Aufnahme von L-Carnitin in die Zellen ist der Influx-Transporter OCTN2 entscheidend beteiligt.

Die Erstbeschreibung des Transporters OCTN2 (SLC22A5) geht auf Tamai et al. im Jahre 1998 zurück [73]. Die formelle Bezeichnung SLC22A5 deutet auf die Zugehörigkeit zur *solute carrier* (SLC) Familie hin. Genetisch ist OCTN2 auf Chromosom 5 kodiert und setzt sich aus zehn Exons und 9 Introns zusammen [74]. Weitere Vertreter aus der Gruppe der OCTN (*Organic Cation Transporters Novel*) sind OCTN1 und OCTN3.

Strukturell ist der Transporter OCTN2 aus zwölf Transmembrandomänen aufgebaut. Das C- und N-terminale Ende der Aminosäuresequenz liegen im Zytoplasma. Zwischen Transmembrandomäne I-II sowie VI-VII befinden sich lange Schleifen, während die restlichen Transmembrandomänen über kurze Schleifen verbunden sind (vgl. Abb. 6 A). Weiterhin wurden ein ATP/GTP-Bindungsmotiv in der Schleife IV-V, verschiedene Glykosylierungsstellen und funktionsrelevante Varianten beschrieben (vgl. Abb. 6 A) [74, 75]. Die zwölf Transmembrandomänen bilden eine Pore für den Transport von Substanzen durch die Membran. Eine

dreidimensionale Vorhersage der Struktur von OCTN2 ist Abb. 6 B zu entnehmen und verdeutlicht die räumliche Anordnung der Transmembrandomänen.

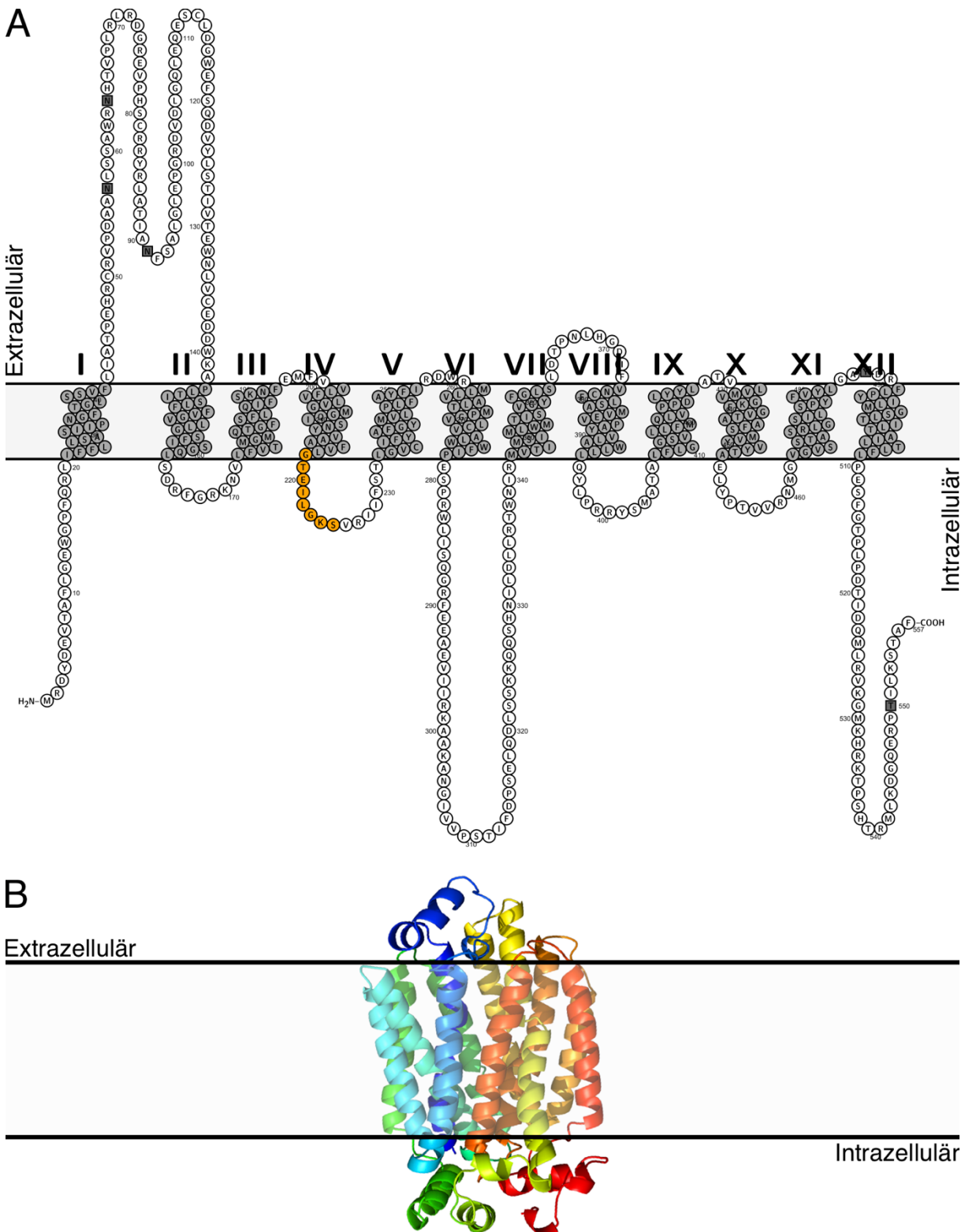


Abb. 6: OCTN2 Struktur. (A) 2D-Struktur, erstellt mit Protter (<https://wlab.ethz.ch/protter/>) auf Basis der Proteinsequenz von uniprot.org. Aminosäuren sind gezeigt als Kreise oder Vierecke mit Buchstabencode. Transmembrandomänen sind dunkelgrau gefärbt und nummeriert von I bis XII. Dunkelgrau viereckig dargestellte Aminosäuren markieren Positionen für post-translationale Modifikation (zum Beispiel Glykosylierungen). Orangefarbene Aminosäuren sind ein Nukleotidbindungsmotiv. Jede zehnte Aminosäure ist nummeriert. (B) 3D-Rekonstruktion erstellt auf Basis der Aminosäuresequenz mit Phyre2 [76]. Farbige Regenbogendarstellung je nach Position vom N-Terminus bis zum C-Terminus. Quelle: Eigene Darstellung (2023).

In der UniProt Datenbank werden für OCTN2 drei Isoformen geführt, welche durch alternative Spleißvorgänge exprimiert werden können (<https://www.uniprot.org/uniprot/O76082>) [77]. Isoform 1 (557 Aminosäuren; 62,8 kDa) ist die Standardform und kodiert für den membranständigen Transporter. Isoform 2 (221 Aminosäuren; 24,7 kDa) ist gekennzeichnet durch das Fehlen zahlreicher Aminosäuren. Die Beschreibung entstammt der Analyse von humaner cDNA, ohne das in der entsprechenden Studie spezifisch auf die Funktion und Lokalisation dieser Isoform eingegangen wird [78]. Die Isoform 3 (581 Aminosäuren; 65,3 kDa) ist eine auch als OCTN2VT bezeichnete Isoform, die im endoplasmatischen Retikulum verbleibt und nicht am Zellmembrantransport von Carnitin beteiligt ist [79].

Im Menschen ist OCTN2 in vielen Organen und Geweben exprimiert [73, 74]. Im Gehirn ist insbesondere die nachgewiesene hohe Expression von OCTN2 im Endothel der Blut-Hirn-Schranke und die Expression in Astrozyten von Bedeutung [80]. Eine hohe Expression zeigt sich insbesondere im Skelettmuskel [73], im Myokard [81, 82], in der Niere [73] und in der Plazenta [73, 83].

Die Lokalisation und Funktionalität von OCTN2 ist abhängig von genetischen Polymorphismen und dem Vorhandensein obig erläuteter Spleißvarianten [75, 79]. Für verschiedene Gewebe konnte eine membranständige, aber auch zytoplasmatische Expression sowie der kombinierte Nachweis von OCTN2 gezeigt werden mit einer teils heterogenen Verteilung auf Zellmembran und intrazellulären Lokalisationen [80, 81, 83].

Die pH-abhängige Transportfunktion von OCTN2 [74] erfolgt mittels Kotransport von Natrium im Verhältnis 1:1 mit Carnitin, aber auch der Transport organischer Kationen und Xenobiotika (zum Beispiel Acetylcarnitin, Cholin, Valproat oder Verapamil) ist möglich [84, 85].

Das wichtigste Substrat von OCTN2 stellt das für die β -Oxidation essentielle Molekül L-Carnitin (syn. Levocarnitin, (R)-Carnitin, (-)-Carnitin) dar, welches im menschlichen Körper aber noch weitere vielfältige Funktionen erfüllt. Für Carnitin gibt es zwei Enantiomere, wobei lediglich die L-Form in biologischen Systemen von Bedeutung ist [86]. Erfolgt eine Bezugnahme ohne Angabe der Chiralität, ist in der Regel, so auch in dieser Arbeit, immer die L-Form gemeint. Abb. 7 zeigt die Strukturformel sowie zelluläre Prozesse, in denen L-Carnitin eine wichtige Rolle spielt, was die funktionale Vielfältigkeit des Moleküls verdeutlicht [87]. Die Biosynthese von L-Carnitin geschieht im Körper aus Methionin und Lysin über mehrere Zwischenschritte. Der überwiegende Teil von L-Carnitin wird jedoch üblicherweise über die Nahrung aufgenommen. Muskelfleisch besitzt dabei einen besonders hohen Anteil an mit der Nahrung verfügbarem Carnitin, woher auch der Name rührt (lat. *carnus*) [86]. Der physiologische Carnitinspiegel im Plasma beträgt etwa 50 μ M, intrazellulär liegt die Konzentration jedoch

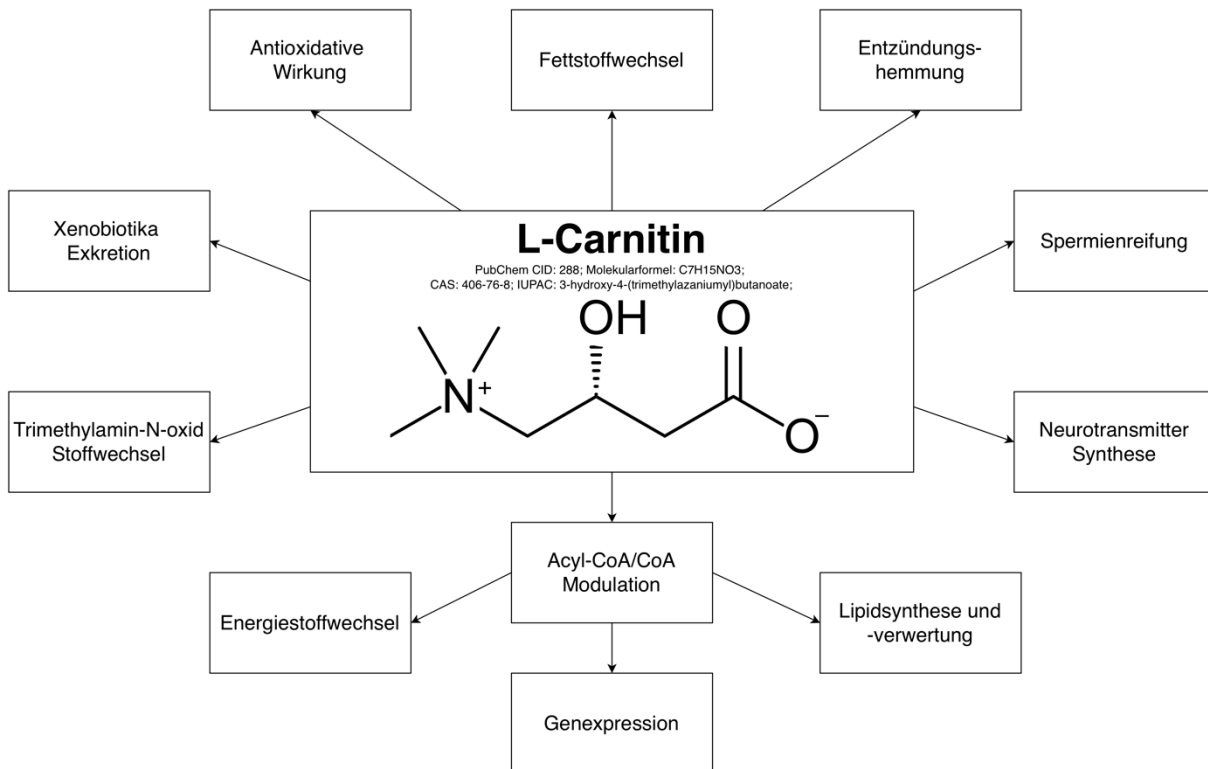


Abb. 7: L-Carnitin und assoziierte Funktionen im zellulären Stoffwechsel und molekularen Prozessen. Quelle: modifiziert nach Console et al. (2020) [87].

um ein Vielfaches höher (circa 50- bis 75-fach mehr, also 2.500 μM bis 3.750 μM , in Leber und Muskeln) [86]. Die Ausscheidung von L-Carnitin erfolgt renal, wobei ein Großteil wieder rückresorbiert wird [86].

Eine essentielle Bedeutung von L-Carnitin wird für viele Bereiche diskutiert, wobei diese sich grob in primär physiologischen Überlegungen und pathophysiologischen Ansätzen unterteilen. Darüber hinaus gibt es auch eine breite Diskussion im Bereich als Nahrungsergänzungsmittel im Sinne einer Lifestyle Thematik, ohne dass der reinen Carnitinsupplementierung bisher konsistente Effekte nachgewiesen werden konnten. Sicherlich prägnant ist die Symptomatik einer systemischen primären Carnitindefizienz durch *SLC22A5* Mutation, welche bei früher Krankheitsmanifestation zum Beispiel mit Hypoglykämie, Hepatomegalie, Kardiomyopathie und Myopathie der Skelettmuskulatur einhergehen kann [88]. Bei tatsächlichen Mangelzuständen soll die Carnitinsupplementierung einen offensichtlichen Nutzen erbringen, hinsichtlich beschriebener kardioprotektiver, antiinflammatorischer, antioxidativer und vieler weiterer Effekte für Gesunde ist die Studienlage eher vage. Letztlich scheint die Supplementierung mit L-Carnitin aber auch nicht mit besonderen Risiken oder Nebenwirkungen einherzugehen [89].

Ein zentraler Aspekt der Funktion von Carnitin im menschlichen Körper ist der Transport von Fettsäuren über Membranen und damit die Zuführung der Fettsäuren zur Energiegewinnung. Eine weitere Funktion von L-Carnitin kann bei der Regulation beziehungsweise dem Einfluss auf die Verfügbarkeit von Coenzym A (CoA) gesehen werden, welches für viele

Stoffwechselprozesse benötigt wird [87]. Die vielgestaltige Bedeutung von L-Carnitin in unterschiedlichen Bereichen des Stoffwechsels lässt auf die komplexe Modulation assoziierter Stoffwechselprozesse rückschließen. Inwiefern L-Carnitin und seine Spiegel in Blut und Geweben dabei Epiphänomene widerspiegeln, originär eigene Effekte oder direkt vermittelte Effekte darstellen, bleibt vielfach noch ungeklärt.

Die funktionelle Bedeutung für den Stoffwechsel sowohl von L-Carnitin als auch von OCTN2 ergibt sich vor allem in der Betrachtung als ein gemeinschaftliches System. Die Zusammengehörigkeit zwischen OCTN2 und L-Carnitin sowie deren Assoziation zu bekannten Stoffwechselwegen und weiteren beteiligten Enzymen und Molekülen ist in Abb. 8 dargestellt. OCTN2 ist dabei essentiell für den Transport von L-Carnitin in die Zelle. Von hier werden aktivierte Fettsäuren mit L-Carnitin enzymatisch zu Acylcarnitin umgewandelt. Dieses wird über

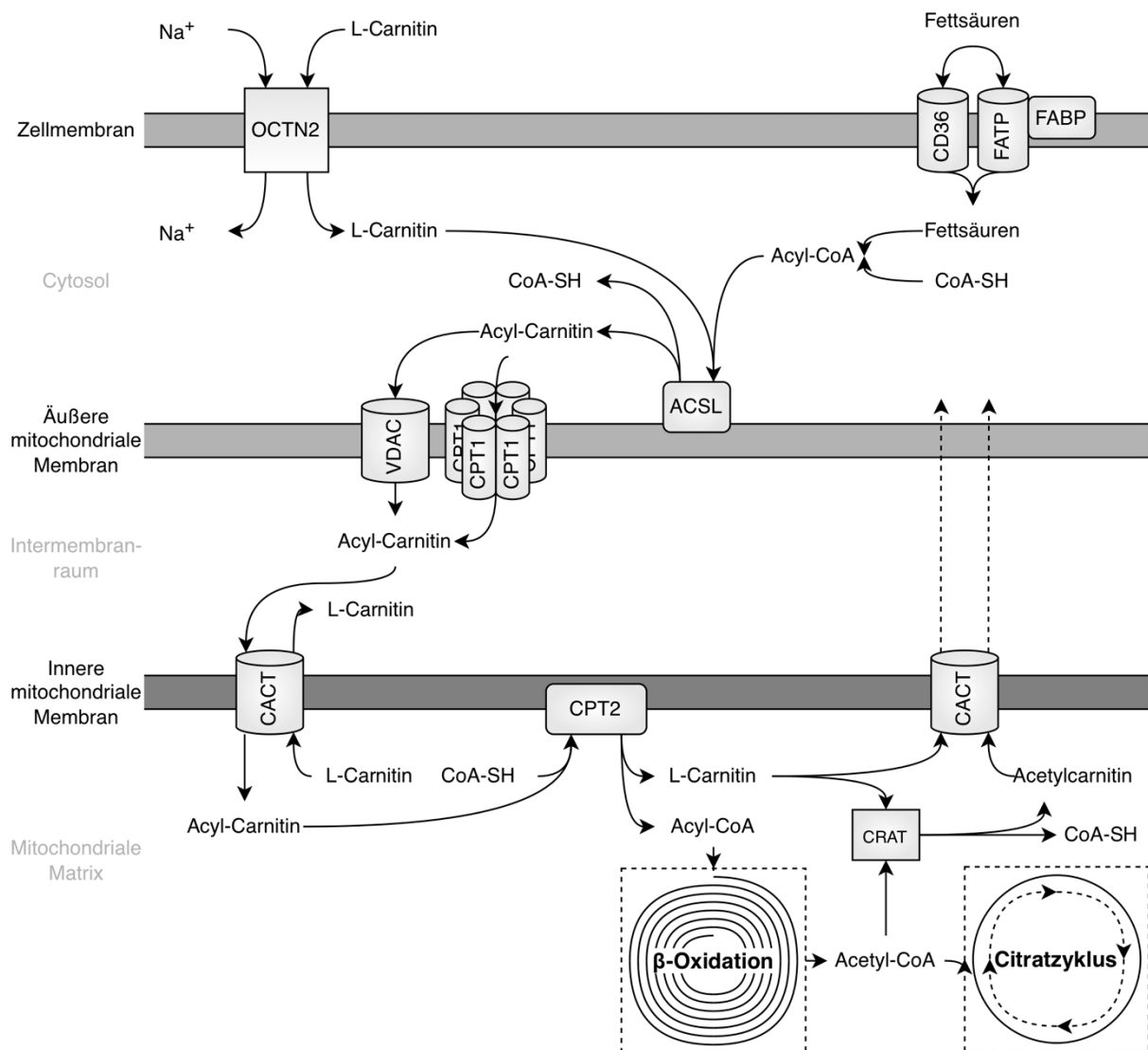


Abb. 8: Darstellung der funktionellen Bedeutung des OCTN2/L-Carnitin Systems in der Zelle. OCTN2: *Organic cation/carnitine transporter 2*; CoA-SH; Coenzym A; ACSL: *Acyl-CoA-Synthetase*; CPT1: *Carnitin-Palmitoyltransferase 1*; CPT2: *Carnitin-Palmitoyltransferase 2*; VDAC: *Voltage-dependent anion channel*; CACT: *Carnitine-acylcarnitin translocase*; CRAT: *Carnitine acetyltransferase*; CD36: *Cluster of differentiation 36*; FATP: *Fatty acid-transport protein*; FABP: *Fatty acid-binding protein*; Quelle: Eigene Darstellung (2023), adaptiert nach [87, 90].

Zwischenschritte in die mitochondriale Matrix transportiert, wo wiederum eine Umkehr der Verknüpfung von Fettsäure und L-Carnitin stattfindet. Das so freiwerdende Acyl-CoA kann der β -Oxidation zugeführt werden, wodurch Acetyl-CoA entsteht. Dieses kann wiederum im Citratzyklus genutzt werden oder vermittelt durch Carnitin ins Cytosol transportiert und anderweitig verwendet werden. In Abb. 8 wird auch die maßgebliche Bedeutung von Coenzym A vermittelten Reaktionen deutlich, sodass der Stellenwert der Coenzym-A-Homöostase abgeleitet werden kann [87, 90].

Neben OCTN2 gibt es weitere L-Carnitin Transporter, wobei diese L-Carnitin meist nur in sehr viel geringerem Umfang transportieren als OCTN2 und deren Stellenwert für die Carnitinhomöostase daher wenig bedeutsam ist. Diesbezüglich sind OCTN1, CT2, ATB^{0,+}, MCT9 und CAC als weitere Transportsysteme bekannt. Bei allen genannten Transportern zeigen sich Hinweise für einen Zusammenhang mit unterschiedlichsten neoplastischen Erkrankungen, wobei das dazugehörige Wissen und die Studienlage für OCTN2 und CT2 am umfangreichsten ausgeprägt ist [87]. Dabei gibt es teils konträre Daten mit einer reduzierten, aber auch einer gesteigerten Expression von beispielsweise OCTN2 in malignem Gewebe. In einer Studie von Scalise et al. (2012) wurde eine verringerte Expression von OCTN2 in mehreren Tumorzelllinien gezeigt [91] und auch eine Herabregulation der Expression im Ovarialkarzinom ist beschrieben [92]. Andererseits wurde eine Estrogen-abhängige Überexpression von OCTN2 in Brustkrebszellen gezeigt [93]. Weiterhin wurden *OCTN2* Mutationen beim Brustkrebs neben anderen als Treibermutation identifiziert [94]. Unlängst wurde OCTN2 als relevanter Transporter bei Krebserkrankungen beschrieben und umfassend diskutiert [90]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte aufbauend auf Vorarbeiten der Arbeitsgruppe die spezielle Rolle von OCTN2 für das Glioblastom herausgearbeitet und die Kernergebnisse gemeinsam publiziert werden, wobei die Vorarbeiten im nächsten Kapitel detailliert dargestellt und eingeordnet werden [95].

1.4 Das OCTN2/L-Carnitin System im Glioblastom

Im Folgenden werden die relevanten Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe, welche in gemeinsamer Erstautorenschaft im Jahr 2019 publiziert wurden, sowie veröffentlichte Daten zur Bedeutung von OCTN2 von Juraszek et al. (2021) zusammenfassend dargestellt [95, 96]. In Tumorproben von Gliompatienten zeigte sich, dass der OCTN2 mRNA Gehalt in WHO Grad III Astrozytomen 2,3-fach und in Glioblastomproben 4,4-fach jeweils signifikant stärker exprimiert war als in nichtneoplastischem Kontrollhirngewebe des Frontal- und Temporallappens, in welchen auch Glioblastome hauptsächlich lokalisiert sind. Dieses Ergebnis konnte auch auf Proteinebene übertragen werden, wo sich bei Glioblastomproben eine 34,5-fach signifikant stärkere Expression von OCTN2 zeigte. Zudem lag die Konzentration von freiem L-Carnitin in

Glioblastomgewebe signifikant über der des Kontrollhirngewebes. Bei einer Überlebenszeitanalyse ergab sich für eine hohe OCTN2 Expression eine signifikant geringere Überlebenszeit mit im Mittel 268 Tagen im Gegensatz zu 528 Tagen bei Patienten mit geringerer OCTN2 mRNA Expression. Auf Proteinebene zeigten sich ähnliche, signifikante Ergebnisse im Sinne eines verminderten Überlebens der Glioblastompatienten bei hoher OCTN2 Expression. Ein Zusammenhang des Überlebens mit den gemessenen freien L-Carntinspiegeln im Gewebe konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. In Zellkulturexperimenten konnte jedoch gezeigt werden, dass die Zellviabilität von LN-18 Glioblastomzellen durch Gabe von L-Carnitin signifikant verstärkt werden konnte. Die durch das Standardtherapeutikum Temozolomid hervorgerufene Reduktion der Zellviabilität von LN-18 Zellen konnte durch L-Carnitin Gabe verhindert werden. Auch bei der durch oxidativen Stress in Form der Zugabe von H₂O₂ verursachten Beeinträchtigung von LN-18 Zellen konnte L-Carnitin die Zellviabilität signifikant verbessern. Ebenso zeigte sich bei der Etomoxir vermittelten Blockade der β -Oxidation und dadurch ausgelösten Reduktion der Zellviabilität von LN-18 Zellen durch Zugabe von L-Carnitin ein signifikant protektiver Effekt auf die Zellviabilität, wobei dieser unter hypoxischen Kultivierungsbedingungen noch stärker ausgeprägt war. Durch einen siRNA vermittelten OCTN2 *Knockdown* konnte die Aufnahme von L-Carnitin in LN-18 Zellen signifikant verringert werden, einhergehend mit einer Abnahme der Zellviabilität. Ein positiver Effekt auf die Zellviabilität konnte nach OCTN2 *Knockdown* durch die Gabe von L-Carnitin, wie erwartet, nicht mehr herbeigeführt werden. Durch die Gabe von Meldonium als Hemmstoff der OCTN2 Transportfunktion konnte die Aufnahme von L-Carnitin in LN-18 Zellen signifikant und effektiv verringert werden [95].

Die Arbeitsgruppe um Juraszek et al. (2021) konnte ebenfalls zeigen, dass OCTN2 in Gliomzellen signifikant hochreguliert ist, jedoch kann die Expression des Transporters in der Plasmamembran stark variieren. Zudem wurde nachgewiesen, dass der OCTN2 Gehalt in Glioblastomzellen mit der Fettsäureoxidationsrate und dem L-Carnitin Transport korreliert. Eine Hemmung der OCTN2-vermittelten Carnitinaufnahme durch Chemotherapeutika wie Vinorelbin und Vincristin führte zur Inhibition der Fettsäureoxidation, was durch gleichzeitige Gabe des CPT1 Inhibitors Etomoxir potenziert wurde, verbunden mit einer Abnahme der Zellviabilität und Induktion von Apoptose bei den behandelten Glioblastomzellen. Im Einklang mit den Daten unserer Arbeitsgruppe zeigte eine Modulation der OCTN2 Expression durch siRNA *silencing* oder Überexpression deutliche funktionelle Unterschiede mit Einfluss auf das Überleben und Viabilität von Glioblastomzellen durch transportierte Substanzen [96].

Es kann also zusammengefasst werden, dass das Überleben von Glioblastomzellen in hohem Maße sowohl von einer intakten OCTN2 Transportfunktion als auch von einer funktionierenden Fettsäureoxidation abhängig ist. Somit könnten eine Beeinträchtigung der OCTN2 Funktion oder der Fettsäureoxidation neue potenzielle Zielstrukturen bei der Behandlung des Glioblastoms darstellen.

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass es grundlegende experimentelle Evidenz für einen starken Zusammenhang eines veränderten Energiestoffwechsels und dem aggressiven Wachstumsverhalten des Glioblastoms gibt. Die Arbeiten unseres Arbeitskreises, wie auch anderer Forschungsgruppen, legen nahe, dass Glioblastomzellen speziell durch das OCTN2/L-Carnitin System und assoziierte Prozesse einen Überlebensvorteil erhalten. Aufgrund fehlender präklinischer und klinischer Studien mit pharmakologischer Hemmung der OCTN2 Transportfunktion und damit reduzierter L-Carnitin Aufnahme und konsekutiv beeinträchtigter β -Oxidation kann die Bedeutung des OCTN2/L-Carnitin Systems für die Progression des Glioblastoms bislang nicht abschließend beurteilt werden.

1.5 Zielsetzung

Das Glioblastom stellt im Sinne der Forschung und medizinischen Therapie eine besondere Herausforderung dar. Zwar sind die absoluten Zahlen verglichen mit anderen Tumorentitäten eher gering, das Glioblastom zeichnet sich jedoch durch einen nahezu immer fatalen Ausgang innerhalb kurzer Zeit aus. Der letzte große Durchbruch in der Therapie des Glioblastoms gelang mit der Einführung des heute standardmäßig genutzten Therapieregimes nach Stupp et al. (2005). Somit sind Neuerungen in der Therapie dieses hochaggressiven Tumors dringend erforderlich.

Basierend auf dem von unserer Arbeitsgruppe erhobenen Befundes einer erhöhten OCTN2 Expression in Glioblastomen, die mit einem signifikant schlechteren Überleben einhergeht, ergaben sich auch in Zellkulturexperimenten zahlreiche Hinweise für eine Beteiligung des OCTN2/L-Carnitin Systems an der Progression des Glioblastoms. Zielsetzung dieser Arbeit war es, zugrunde liegende Fragestellungen aufzugreifen und im Sinne der *Hallmarks of glioblastoma* weitere assoziierte Teilbereiche zu überprüfen. Hierzu dienten umfassende Experimente mit Glioblastom-Zelllinien, aber auch ein Übertragen von bestehenden *in vitro* Daten und humanen deskriptiven Ergebnissen auf das *in vivo* Glioblastomwachstum, um den therapeutischen Zugang einer pharmakologischen Beeinflussung des OCTN2/L-Carnitin Systems in einem komplexeren Modell zu überprüfen.

Neben der bereits bekannten Überexpression von OCTN2 im Glioblastomgewebe sollten in dieser Arbeit zusätzlich der niedrig-affine L-Carnitin Transporter OCTN1 und weitere mit der

β -Oxidation assoziierte Gene (*CPT1C*, *CRAT*) hinsichtlich ihrer Expression im Glioblastom und deren Einfluss auf das Überleben der Patienten betrachtet werden. Des Weiteren sollte der Einfluss von OCTN2 und L-Carnitin auf die Zellviabilität in verschiedenen Glioblastom-Zelllinien überprüft werden. Auch die Relevanz proliferationsfördernder Signalkaskaden in L-Carnitin vermittelten zellulären Prozessen sowie der Einfluss von L-Carnitin auf Migration und Apoptose von Glioblastomzellen wurden bislang noch nicht näher betrachtet und sollten daher analysiert werden. In einem orthotopen Glioblastommodell in der Maus sollten abschließend und umfassend sowohl verschiedene pharmakologische Interventionen und deren Auswirkungen auf die *in vivo* Glioblastomprogression überprüft werden. Hierfür wurden sowohl C57BL/6 Wildtyp Mäuse als auch heterozygote und homozygote OCTN2-defiziente Mäuse nach intrazerebraler Implantation von GL261 Glioblastom-Zellen auf das *in vivo* Tumorwachstum untersucht und zusätzlich der Einfluss von Carnitin sowie von Meldonium als OCTN2-Inhibitor auf die Progression des Glioblastoms betrachtet.

2 Materialien

2.1 Gerätschaften und Hilfsmittel

Bezeichnung	Anbieter
20G Kanülen, BD Microlance 3	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
24G Kanülen, BD Microlance 3	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
27G Kanülen, BD Microlance 3	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
96-well Piko PCR Platten	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Absaugvorrichtung	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Adhesive Clear qPCR Seals	Biozyme Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Analysenwaage Research R200D	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Blotapparatur	Biometra, Göttingen, Deutschland
Brutschrank BBD 6220	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Chirurgisches Nahtmaterial Prolene	Ethicon Inc., New Jersey, USA
Deckgläser 14 mm Ø	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Einwegskalpell	Feather Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan
Feinschere	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Filterpapier	Whatman International, Buckinghamshire, England
Gel Logic 200 Imaging System	Eastman Kodak Company, Rochester, USA
Heizblock Grant QBT	Grant Instruments, Cambridgeshire, England
Inkubator Compact Line OV4	Biometra, Göttingen, Deutschland
Kleintier-MRT ClinScan 70/30	Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Deutschland
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop LSM 780	Zeiss, Jena, Deutschland
Kryoröhrchen Cryo.S	Greiner BioOne GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Magnetrührer MR 3001	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Mikro-Dismembrator S	B. Braun Biotech International, Melsungen, Deutschland
Mikrodissektionsmikroskop PALMRobo	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Mikroliterspritze Agilent 10 µl	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Mikrotiterplatten, 96-well	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Mikrotiterplattenlesegerät	Infinite200, Tecan, Crailsheim, Deutschland
Molecular Imager ChemiDoc XRS System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
MRT-Spule, Mouse brain 2x2	Bruker BioSpin GmbH, Billerica, USA
Multiwell 12-Well-Platten	BD Falcon, Heidelberg, Deutschland
Multiwell 24-Well-Platten	BD Falcon, Heidelberg, Deutschland
Multiwell 48-Well-Platten	BD Falcon, Heidelberg, Deutschland
Nahthalter	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
NanoDrop 1000 Spektralphotometer	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Narkosemittelverdampfer, Isofluran Vet. Med. Vapor	Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland
Nitrozellulose-Membran	Proton, Schleicher und Schüll, Dassel, Deutschland
Odyssey CLx Imager	LI-COR Biotechnology, Bad Homburg, Deutschland
Parafilm M	American National Can, Chicago, USA
pH-Meter Typ 526	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland
PikoReal 96 Real Time PCR System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pinzette	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Pipetboy acu	Integra Biosciences Deutschland GmbH, Konstanz, Deutschland
Schüttler Rocking Platform	Biometra, Göttingen, Deutschland
SDS-Page Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen, Deutschland
Spritze, 1 ml	BD Plastipak, Heidelberg, Deutschland
Spritze, 1 ml, Injekt-F	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Stereotaktischer Kopfhalter, Digital Lab Standard Stereotaxic	Stoelting Co., Chicago, USA
Sterilwerkbank, HERASafe KS	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Stickstofftank 1500 Series-190	Cryo-Tech, Geilnau, Deutschland

SuperFrost Plus Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Thermocycler T100	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Vakuumpumpe	Vacuubrand, Wertheim, Deutschland
Vismark chirurgischer Hautmarkierungsstift	Viscot Medical, LLC., East Hanover, USA
Vortexer Reax top	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Wasserbad, Lauda Aqualine AL 25	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Zellkulturflaschen, 75 cm ²	BD Falcon, Heidelberg, Deutschland
Zellzählgerät, CASYOne	Schärfe System, Reutlingen, Deutschland
Zentrifuge 5430 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Biofuge fresco	Thermo Scientific Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Thermo Scientific Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland

Tab. 1: Gerätschaften und Hilfsmittel. Quelle: Eigene Darstellung (2023).

2.2 Chemikalien und Enzyme

Bezeichnung	Anbieter
37 % Formalin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Agarose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Aprotinin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Aqua ad iniectiones	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Bepanthen Augen- und Nasensalbe	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Deutschland
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Buprenorphin 0,3 mg/ml	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland
Casyton	Schärfe System, Reutlingen, Deutschland
DAKO Fluorescent Mounting Medium	Dako North West Inc., Carpinteria, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DMEM Medium	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
dNTPs (10 mM)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DPBS	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Etomoxir	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Glutamin	GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Hydrogenchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Isofluran	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Deutschland
Isotonische Natriumchloridlösung 0,9 %, 50 ml Durchstechflasche	AlleMan Pharma GmbH, Pfullingen, Deutschland
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ketamin 10 %	selectavet Dr. Otto Fischer GmbH, Weyarn-Holzolling, Deutschland
Kristallviolett Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
L-Carnitin	Euro OTC Pharma GmbH, Bönnen, Deutschland
Leupeptin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

Materialien

Magermilchpulver Milbona	Krüger GmbH & Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland
Meldonium	Selleck Chemicals, Houston, USA
MEM Medium	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Nicht essentielle Aminosäuren	GIBCO, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Orthovanadat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Platinum Taq Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ponceau S	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Protein Marker VI (10-245)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Roti-Mount FluorCare DAPI	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Rox Reference Dye	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Temozolomid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Tergazyme	Alconox, Inc., White Plains, USA
Tetramethylethylendiamin (Temed)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trishydroxymethylaminomethanhydrochlorid (Tris-HCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Serva, Heidelberg, Deutschland
Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Xylazin	selectavet Dr. Otto Fischer GmbH, Weyarn-Holzolling, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Tab. 2: Chemikalien und Enzyme. Quelle: Eigene Darstellung (2023).

2.3 Genexpressionsassays

Gen Symbol	Gen Name	Gene ID	Assay ID
18S rRNA	eukaryotic 18S rRNA	-	4319413E
OCTN1	solute carrier family 22 member 4	6583	Hs00268200_A1
CRAT	carnitine O-acetyltransferase	1384	Hs00912963_m1
CPT1C	carnitine palmitoyltransferase 1C	126129	Hs00380581_m1

Tab. 3: Genexpressionsassays von Thermo Fisher Scientific. Quelle: Eigene Darstellung (2023).

2.4 Kits

Bezeichnung	Anbieter
BCA Protein Assay	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
TaqMan Reverse Transkription Reagent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NucleoSpin Tissue Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
peqGOLD RNA Pure	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Resazurin Assay	Promocell GmbH, Heidelberg, Deutschland

Tab. 4: Kommerzielle Kits. Quelle: Eigene Darstellung (2023).

2.5 Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Bestandteil	Menge
Agarosegel 2,5 %	Agarose	2,5 g
	Ethidiumbromid Stammlösung	7,5 μ l
	TBE-Puffer	ad 100 ml

Ammoniumpersulfat 10 % (w/v)	Ammoniumpersulfat <i>Aqua dest.</i>	1 g ad 10 ml
Blockierlösung Western Blot (FCS)	FCS TBST (1x)	5 ml ad 100 ml
Blockierlösung Western Blot (Magermilchpulver)	Magermilchpulver TBST (1x)	5 g ad 100 ml
Ethidiumbromid Stammlösung	Ethidiumbromid <i>Aqua dest.</i>	10 mg ad 1 ml
Injektionsnarkose Ketamin/Xylazin	Xylazin Ketamin NaCl 0,9 %	0,1 ml 0,35 ml 1,55 ml
Laemmli-Puffer (4x)	0,25 mM Tris-HCl (pH 6,8) SDS Glycerol Bromphenolblau β -Mercaptoethanol <i>Aqua dest.</i>	3,125 ml 1 g 5,8 ml 5 mg 2,5 ml ad 12,5 ml
Natriumdodecylsulfat (SDS) 10 % (w/v)	SDS <i>Aqua dest.</i>	1 g ad 10 ml
Paraformaldehyd 4 %	Paraformaldehyd 1x PBS (pH 7,2)	2 g ad 50 ml
Phosphatgepufferte Salzlösung (10x PBS)	NaCl KCl (NH ₄) ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ <i>Aqua dest.</i>	80,0 g 2,0 g 14,4 g 2,4 g ad 1.000 ml
Phosphatgepufferte Salzlösung (1x PBS)	10x PBS	100 ml ad 1.000 ml
Sammelgelpuffer (pH = 6,8)	500 mM Tris-HCL <i>Aqua dest.</i>	7,8 g ad 100 ml
Stripping-Puffer	62,5 mM Tris SDS <i>Aqua dest.</i>	7,57 g 20 g ad 1 l
Tankpuffer (10x)	Tris Glycin SDS <i>Aqua dest.</i>	60 g 288 g 20 g ad 2 l
Tankpuffer (1x)	Tankpuffer (10x) <i>Aqua dest.</i>	100 ml ad 1.000 ml
Towbinpuffer (10x)	Tris-HCl Glycin <i>Aqua dest.</i>	30,3 g 144 g ad 1 l
Towbinpuffer (1x)	Towbinpuffer (10x) Methanol <i>Aqua dest.</i>	100 ml 200 ml ad 1 l
TBE (10x)	Tris EDTA-Na Borsäure <i>Aqua dest.</i>	121 g 7,7 g 53,4 g ad 1.000 ml
TBE (1x)	TBE (10x) <i>Aqua dest.</i>	100 ml ad 1.000 ml
TBS (10x) (pH = 7,4)	Tris-HCl NaCl KCl <i>Aqua dest.</i>	60 g 160 g 2g ad 2 l
TBST	TBS (10x) Tween-20 <i>Aqua dest.</i>	200 ml 800 μ l ad 2 l
Trenngelpuffer (pH = 8,8)	500 mM Tris-HCL <i>Aqua dest.</i>	59,1 g ad 250 ml

Tab. 5: Lösungen und Puffer. Quelle: modifizierte Darstellung nach Laborstandard (2023).

2.6 Antikörper

Bezeichnung	Spezies	Anbieter
anti-OCTN2	Kaninchen	Institut für Pharmakologie, AG Grube, Greifswald, Deutschland, [83]
anti-phospho-ERK1/2	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Boston, USA
anti-phospho-AKT1	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Boston, USA
anti-total-AKT1	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Boston, USA
anti- β -Actin	Ziege	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland
anti-GFAP	Maus	Cell Signaling Technology, Boston, USA

Tab. 6: Primäre Antikörper für Western Blot und Immunfluoreszenz. Quelle: Eigene Darstellung (2023).

Bezeichnung	Spezies	Anbieter
anti-Kaninchen HRP	Ziege	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
anti-Ziege HRP	Pferd	Vector Laboratories, Burlingame, USA
anti-Kaninchen IRDye 800CW	Ziege	LI-COR Biotechnology, Bad Homburg, Deutschland
anti-Ziege IRDye 680RD	Esel	LI-COR Biotechnology, Bad Homburg, Deutschland

Tab. 7: Sekundäre Antikörper für Western Blot. Quelle: Eigene Darstellung (2023).

Bezeichnung	Spezies	Anbieter
anti-Maus Alexa Fluor 568	Ziege	Molecular Probes, Inc., Eugene, USA
anti-Kaninchen Alexa Fluor 488	Affe	Molecular Probes, Inc., Eugene, USA

Tab. 8: Sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen. Quelle: Eigene Darstellung (2023).

2.7 Zelllinien

Die murine Zelllinie GL261 wurde in dieser Arbeit sowohl für Zellkultur und darauf basierende Experimente genutzt als auch zur Induktion von orthotopen Tumoren *in vivo* in der Maus. Der Ursprung der Zelllinie geht auf die Induktion von Hirntumoren in Mäusen durch die Gabe von 20-Methylcholanthren zurück. Zellen aus daraus entstanden Tumoren wurden isoliert und in C57BL/6 Mäusen reimplantiert, bis eine stabile Zelllinie resultierte [97]. Hieraus ergeben sich in hohem Maße morphologische, histologische und molekularbiologische Übereinstimmungen dieser Tumore mit menschlichen Glioblastomen [98, 99]. Die Zelllinie wurde von Prof. Dr. Michael Synowitz (Direktor der Klinik für Neurochirurgie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Kiel, Deutschland) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Zelllinie	Ursprung	Klassifikation	Geschlecht	Alter	Referenz
A-172	Homo sapiens	Glioblastom	M	53	CVCL_0131 [102]
GaMG	Homo sapiens	Glioblastom	W	42	CVCL_1226 [102]
GL261	Mus musculus, C57BL/6	Glioblastom	NA	NA	CVCL_Y003 [95, 102, 103]
HF66	Homo sapiens	Glioblastom	NA	NA	[104]
LN-18	Homo sapiens	Glioblastom	M	61	CVCL_0392 [102]
primäre Glioblastom Zellen	Homo sapiens	Glioblastom	M	73	[95]
U251MG	Homo sapiens	Astrozytom	M	75	CVCL_0021 [102]
U373	Homo sapiens	Astrozytom	M	75	CVCL_2219 [102]
U87MG	Homo sapiens	Glioblastom	M	NA	CVCL_0022 [102]

Tab. 9: Übersicht über die verwendeten Zelllinien und deren Charakteristika und Referenzen. M: männlich. W: weiblich. NA: nicht verfügbar (engl. *not available*). Quelle: modifizierte Darstellung eigener Daten nach [95].

Die humane Zelllinie LN-18 wurde von ATCC (American type culture collection, Rockville, USA) bezogen. Die Herkunft dieser Zellen geht auf einen 61-jährigen männlichen Patienten mit einem rechtsseitigen, schlecht differenzierten Glioblastom des Temporallappens zurück [100].

Die primären humanen Glioblastomzellen wurden durch Dr. Sandra Bien-Möller und Dr. Sascha Marx, wie andernorts beschreiben [101], aus einem *de novo* Glioblastom eines an der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie (Direktor Prof. Dr. Henry W. S. Schroeder, Universitätsmedizin Greifswald, Greifswald, Deutschland) behandelten Patienten isoliert und standen für weitere Experimente in der Arbeitsgruppe zur Verfügung.

Die humanen Zelllinien A172, GaMG, HF66, U251MG, U373 wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Hrvoje Miletic (Universität Bergen, Bergen, Norwegen) zur Verwendung überlassen. In den hier gezeigten Experimenten wurden lediglich vorhandene Zellpellets dieser Zelllinien für qualitative Nachweise genutzt. Tab. 9 gibt einen Überblick über die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen und Zelllinien.

2.8 Hirntumorgewebe

Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden Gewebeproben aus Glioblastomen von Patienten (WHO Grad IV) verwendet, die von der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie der Universitätsmedizin Greifswald (Direktor Prof. Dr. Henry W. S. Schroeder) bereitgestellt wurden. Die Tumorproben wurden standardisiert während der Resektion des Tumors im Rahmen der Behandlung entnommen und in flüssigem Stickstoff bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt. Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Greifswald genehmigte die Entnahme und Verwendung der humanen Hirngewebe für Forschungszwecke (BB 89/08). Makroskopisch und histologisch wurden die Tumorproben vom Institut für Neuropathologie der Universitätsmedizin Greifswald unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Silke

Vogelgesang der entsprechenden Tumorentität zugeordnet. Der Vitalstatus der Patienten wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Community Medicine (Direktor Prof. Dr. Wolfgang Hoffmann) der Universitätsmedizin Greifswald beim Zentralen Informationsregister des Landes Mecklenburg-Vorpommerns erfragt. Die letzte Abfrage im Rahmen der vorliegenden Analysen erfolgte am 05.04.2016.

Vergleichend wurden nichtmaligne Gehirngewebe von Patienten analysiert, die vom Institut für Neuropathologie der Universitätsmedizin Greifswald zur Verfügung gestellt wurden, sowie zwei bei BioChain Institute Inc. (Newark, CA, USA) kommerziell erworbene Hirngewebeproben (Frontal- und Temporallappengewebe). Bei den Hirngeweben handelte es sich um Gewebeproben Verstorbener, bei denen keine neurologischen Erkrankungen diagnostiziert wurden. Entsprechend den zwei Hauptlokalisationen der Glioblastome wurden im Rahmen des Autopsieprozesses Proben des Frontal- und des Temporallappens entnommen und unverzüglich bei -80 °C tiefgefroren.

2.9 Software

Bezeichnung	Anwendungsgebiet	Referenz
GNU R	Datenverarbeitung inkl. Statistik und Illustration	https://www.r-project.org/ [105]
Gimp	Illustration, Rastergrafiken	https://www.gimp.org/ [106]
Horos	MRT-Bildanalyse	horosproject.org , unterstützt von Nimble Co LLC d/b/a Purview, Annapolis, USA
Image Studio Lite	Western Blot Auswertung	http://www.licor.com
ImageJ/Fiji	Bildanalysen und -darstellung	https://fiji.sc/ [107, 108]
Inkscape	Illustration, Vektorgrafiken	https://inkscape.org [109]
Microsoft Word	Textverarbeitung	www.microsoft.com , Microsoft, Redmond, USA
Microsoft Excel	Datenverarbeitung	www.microsoft.com , Microsoft, Redmond, USA
RStudio	Integrierte Entwicklungsumgebung für GNU R	https://www.rstudio.com/ [110]
R Pakete: tidyverse, cowplot, viridis, survival, survminer	Siehe GNU R	[111–115]

Tab. 10: Verwendete Software mit Anwendungsgebieten. Quelle: Eigene Darstellung (2023).

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 RNA Isolation

Für die Isolation der gesamten RNA wurde das jeweilige Gewebe in kleinen Portionen zunächst homogenisiert, dann mittels peqGOLD RNA Pure extrahiert und schließlich weiter gereinigt. Die Homogenisierung des Gewebes erfolgte mittels einer 5 mm Stahlkugel in einer Kugelmühle (TissueLyser II, Qiagen, Hilden, Deutschland) bei 30 Hz für zwei Minuten in vorgekühlten Behältern. Hieraus entstandenes Pulver wurde dann mittels peqGOLD RNA Pure nach Herstellerprotokoll isoliert. In der vorgefertigten Lösung ist Phenol und Guanidinisothiozyanat enthalten, welches das Gewebepulver lysiert, RNasen deaktiviert und als Lösungsmittel für die RNA dient. Nach Zugabe von Chloroform und Zentrifugation trennen sich die Bestandteile des Lysates auf und die RNA kann mit der wässrigen Phase abgenommen werden.

Das homogenisierte Gewebepulver wurde mit 250 µl peqGOLD Reagenz versetzt, resuspendiert und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgte die Zugabe von 125 µl Chloroform und eine Durchmischung der Lösung durch mehrfaches Invertieren der Probengefäße, gefolgt von einer Inkubation für fünf Minuten bei Raumtemperatur. Die Auftrennung der Phasen erfolgte mittels Zentrifugation (12.000 rpm, bei 4 °C für fünf Minuten). Die DNA und Proteine enthaltende organische Phase und Zwischenphase wurden verworfen, während die wässrige obere Phase mit der enthaltenen RNA abgenommen wurde, in ein steriles Reaktionsgefäß überführt, mit gleicher Menge Isopropanol gemischt und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Danach folgte eine Zentrifugation für zehn Minuten bei 4 °C und 12.000 rpm. Der Überstand wurde abgenommen und das RNA Pellet zweimal mit 350 µl 75-%igen Ethanol gewaschen und jeweils nochmals wie zuvor zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen, das RNA Pellet unter dem Abzug getrocknet und im Anschluss in RNase freiem Wasser aufgenommen. Die Lagerung erfolgte danach bei -80 °C. Die RNA Quantifizierung und Kontrolle der Reinheit erfolgte mittels Spektralphotometer wie unter Kapitel 3.1.2 beschrieben.

3.1.2 Nukleinsäure Quantifizierung

Die Quantifizierung von Nukleinsäuren (RNA oder DNA) erfolgte photometrisch mithilfe eines Spektralphotometers (Nano Drop 1000, PeqLab, Erlangen, Deutschland). Hierfür wurde je Probe 1 µl zur Konzentrationsbestimmung auf den Messbereich aufgetragen. Aromatische Ringsysteme in Nukleinsäuren haben die Eigenschaft elektromagnetische Strahlung im Bereich von 250 – 270 nm zu absorbieren. Mithilfe des Lambert-Beer Gesetzes kann dann die Konzentration der Probe bestimmt werden, wobei dies durch eine gerätespezifische Software erfolgt und in ng/µl ausgegeben wird. Parallel dazu werden geräteseitig die Reinheitsquotienten

Methoden

A_{260}/A_{280} und A_{260}/A_{230} bestimmt. Proteine haben ein Absorptionsmaximum bei 280 nm, der Wert von A_{260}/A_{280} sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. A_{260}/A_{230} zeigt Verunreinigungen mit Phenol oder anderen organischen Lösungsmitteln an und sollte bei geringer Verunreinigung über 2,0 liegen.

3.1.3 Isolation von DNA aus Gewebe

Zur Isolation der genomischen DNA aus den Gewebeproben, wurden diese mittels eines Kits nach Herstellervorgaben verarbeitet (NucleoSpin Tissue-Kit, Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland). In mehreren Vorbereitungsschritten erfolgt hierbei die Lyse der Gewebeprobe durch Auflösung von Wasserstoffbrückenbindungen mittels chaotroper Salze im Reaktionsgemisch. Darauf erfolgte die Bindung der DNA an eine Silica-Membran, gefolgt von einer Aufbereitung und Reinigung des Materials durch mehrere Waschschriffe. Abschließend erfolgte die Elution der DNA von der Membran und Aufnahme in einem Elutionspuffer beziehungsweise *Aqua dest.* Die Aufbereitung der DNA fand bei Raumtemperatur statt, die konsequente Lagerung der isolierten DNA erfolgte bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung.

3.1.4 Konventionelle Polymerase-Ketten-Reaktion

Mittels konventioneller Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) ist es möglich geringe Mengen DNA zu vervielfältigen und so der weiteren Verwendung und Analyse zugänglich zu machen. Hierfür wurde der in Tab. 11 dargestellte Reaktionsansatz verwendet. Dieser wurde im Thermocycler (T100, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) zunächst für drei Minuten bei 95 °C denaturiert. Hierauf folgten 35 Zyklen aus den Schritten Denaturierung für 45 Sekunden bei 94 °C , Anlagerung für 30 Sekunden bei 67 °C und Elongation für 90 Sekunden bei 72 °C . Abgeschlossen wurde die Reaktion mit einer finalen Elongationsphase für zehn Minuten bei 72 °C . Mit jedem Elongationszyklus kann die DNA-Menge verdoppelt werden, wodurch insgesamt eine exponentielle Vermehrung der DNA-Template erfolgte.

Bestandteil	Volumen
10x PCR-Puffer	2,5 μl
50 mM MgCl_2	1,0 μl
10 μM Vorwärts-Primer (mOCTN2 275 for)	1,0 μl
10 μM Rückwärts-Primer (mOCTN2 rev 716)	1,0 μl
10 mM dNTPs	1,0 μl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/ μl)	0,5 μl
DNA	nach Konzentration (ca. 100 - 200 ng)
<i>Aqua dest.</i>	ad 25 μl

Tab. 11: Reaktionsansatz für die konventionelle PCR. Quelle: Eigene Darstellung nach Laborstandard (2023).

3.1.5 Genotypisierung mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus

Eine Genotypisierung kann mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) erfolgen. Bei der Nutzung von RFLP zur Genotypisierung wird mittels eingesetzter

Restriktionsenzyme die zu untersuchende DNA spezifisch verdaut. Je nachdem, ob die Erkennungssequenz des genutzten Restriktionsenzymes in der untersuchten DNA vorhanden ist, erfolgt eine Spaltung in zwei Fragmente. In einer anschließenden Gelelektrophorese ergeben sich variable Bandenmuster aufgrund der Entstehung unterschiedlich großer Fragmente während des Restriktionsverdaus, wenn in der DNA an der zu analysierenden Stelle unterschiedliche Sequenzen vorliegen beziehungsweise Mutationen vorhanden sind.

Durch einen enzymatischen Verdau mit dem Restriktionsenzym Sau96l erfolgte die spezifische Spaltung der isolierten DNA, um den Genotyp der jvs-Mäuse bezüglich des OCTN2-Status (*SLC22A5* Genotyp) zu bestimmen. Nach Auftrennung der durch die Restriktionsspaltung entstandenen Fragmente im Agarosegel können *SLC22A5* Wildtyp-DNA-Sequenz und jvs-DNA-Sequenz (*SLC22A5* Mutation mit resultierender Defizienz des Carnitintransporters) voneinander abgegrenzt werden und es kann so eine Zuordnung zu *SLC22A5* Wildtyp beziehungsweise heterozygotem oder homozygotem jvs-Genotyp erfolgen [116].

Die isolierte DNA (vgl. Kapitel 3.1.3, S. 32) wurde hierzu im Wasserbad mit den Restriktionsenzym Sau96l (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) für zehn Minuten bei 37 °C im Reaktionsansatz (vgl. Tab. 12 und Tab. 13) inkubiert. Anschließend erfolgte eine Gelelektrophorese in 2,5 %-igem Agarosegel, welche ein spezifisches Bandenmuster der jeweiligen Genotypen sichtbar machte [116].

Bestandteil	Volumen
10x FastDigest Green Buffer	2,0 µl
FastDigest Sau96l	5,0 µl
DNA-Template	6,0 µl
<i>Aqua dest.</i>	11,0 µl

Tab. 12: Reaktionsansatz für Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RLFP). Quelle: modifizierte Darstellung nach Laborstandard (2023).

Bezeichnung	Sequenz
Sau96l Erkennungssequenz	5' - G G N C G -3' 3' - C C N G G -5'
<i>SLC22A5</i> Wildtyp	5' - G G T C A -3' 3' - C C A G T -5'
jvs-Genotyp	5' - G G T C C -3' 3' - C C A G G -5'

Tab. 13: Erkennungssequenzen des Restriktionsenzym Sau96l im Vergleich mit den Zielsequenzen. Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G), Thymin (T), beliebige Nukleinbase (N), Restriktionsenzym-schnittstelle (|). Quelle: modifizierte Darstellung nach Laborstandard (2023).

3.1.6 cDNA Synthese

Zur Quantifizierung von mRNA mittels PCR muss die zuvor isolierte RNA in komplementäre DNA (engl. *complementary DNA*, cDNA) umgeschrieben werden, da die RNA nicht als Matrize durch die DNA-Polymerase erkannt wird. Für die Synthese von cDNA wird eine Reverse Transkriptase viralen Ursprungs genutzt, welche anhand einer RNA Sequenz eine komplementäre DNA erzeugen kann. Durch diesen Teil der Reaktion wird ein RNA-DNA-Hybrid erzeugt.

Die zusätzlich vorhandene RNase H Aktivität der Reversen Transkriptase bewirkt einen Abbau der RNA, sodass nach Durchlaufen der Reaktion lediglich doppelsträngige cDNA vorliegt. Diese kann anschließend mittels PCR amplifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde das *TaqMan Reverse Transcription Reagents Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) für die cDNA-Synthese nach Herstellervorgabe verwendet. Hierbei kommen Hexanukleotide als Primer zum Einsatz, was ein Umschreiben inklusive mRNA und rRNA erlaubt. Dies macht eine Bestimmung der Expression von 18S rRNA möglich, was als Housekeeping-Gen zur Normalisierung genutzt werden kann. Der Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese ist Tab. 14 zu entnehmen. Die Reaktion fand in einem Thermocycler (T100, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) statt, wobei drei Phasen durchlaufen wurden. Zunächst erfolgt eine Anlagerung der Primer bei 25 °C für zehn Minuten. Es folgte eine Phase der reversen Transkription bei 48 °C für 30 Minuten. Der Prozess endete mit einer Erhitzung auf 95 °C für fünf Minuten zur dauerhaften Deaktivierung der Reversen Transkriptase. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20 °C.

Komponente	Volumen
10x TaqMan RT-Puffer	2,0 µl
25 mM MgCl ₂	4,5 µl
10 mM dNTP-Mix	4,0 µl
50 µM Random Hexamer Primer	1,0 µl
Reverse Transkriptase (50 U/µl)	0,5 µl
RNase Inhibitor (20 U/µl)	0,4 µl
RNA (500 ng/µl)	nach Konzentration
Aqua ad iniectionabilia	ad 20 µl

Tab. 14: Reaktionsansatz für die Reverse Transkription zur Herstellung von cDNA. Quelle: modifizierte Darstellung nach Laborstandard (2023).

3.1.7 Quantitative Echtzeit-PCR

Die Quantifizierung der mRNA Expression eines Genes erfolgte mittels quantitativer Echtzeit-PCR (engl. *real-time quantitative PCR*, qPCR). Hierfür kam die zuvor umgeschriebene cDNA zum Einsatz (vgl. Kapitel 3.1.6, S. 33). Bei der qPCR werden markierte DNA-Sonden genutzt, die einen *Reporter*- und *Quencher*-Farbstoff enthalten. Bei *Reporter* und *Quencher* handelt es sich um Fluorochrome, die so gewählt werden, dass bei geringer räumlicher Nähe ein Förster Resonanz Energie Transfer (FRET) stattfinden kann. Die räumliche Nähe wird durch die Kürze der DNA-Sonde gewährleistet. Im experimentellen Ablauf erfolgt eine photometrische Anregung der Wellenlänge für den *Reporter*. In einem isolierten System des *Reporters* würde dieser nun seine spezifische Fluoreszenzwellenlänge abgeben. In Kombination mit einer räumlichen Nähe zum *Quencher* ist dieser so gewählt, dass stattdessen ein FRET stattfindet und keine Fluoreszenz vom *Reporter* abgegeben und detektiert werden kann. Je nach Konstruktion des *Quenchers* gibt dieser ein Fluoreszenzsignal ab oder ist als nicht fluoreszierender, nur absorbierender *Quencher* gestaltet. Das Signal des *Reporters* kann nur gemessen werden, wenn ausreichende

Distanz zum *Quencher* besteht. Dies kann bei der qPCR nur vorkommen, wenn die DNA-Sonde nach Anlagerung an ihre Zielsequenz während des Elongationsschrittes durch die Polymerase abgebaut wird. Dadurch entsteht genug räumliche Distanz zwischen *Reporter* und *Quencher*, dass das Reportersignal nicht mehr vom *Quencher* unterdrückt und dadurch messbar wird. In der vorliegenden Arbeit wurde auf kommerziell verfügbare Primer beziehungsweise Sonden des TaqMan Systems (*Assays On Demand*, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) zurückgegriffen, wodurch die Effizienz der PCR bei Verwendung dieser Primer herstellerseitig kontrolliert sowie vergleichbar ist und eine optimale Qualität des Experimentes erreicht werden kann. Die hier eingesetzten Sonden bestehen je aus einem kurzen DNA-Fragment, welches spezifisch eine DNA-Sequenz zwischen den Primerpaaren bindet. Das 5'-Ende ist mit einem als *Reporter* bezeichneten Fluoreszenzfarbstoff, wie zum Beispiel FAM (6-carboxyfluorescein), markiert. Das 3'-Ende ist an einen absorbierenden *Quencher* (hier ein nicht fluoreszierender *Quencher*) gekoppelt. Während der PCR erfolgt eine durch die DNA-Polymerase vermittelte Spaltung der Sonde, sodass mehr Distanz zwischen *Reporter* und *Quencher* entsteht und der FRET nicht mehr stattfindet. Dadurch wird mit jedem Elongationsschritt und dabei einhergehenden Spaltung der Sonde eine Zunahme der Fluoreszenzsignale als Messung möglich. Schließlich kann die Auftragung der Fluoreszenzsignale gegen den PCR Zyklus erfolgen. Anhand eines deutlich über dem Hintergrundsignal liegenden Grenzwertes kann derjenige Zyklus bestimmt werden, an dem ein Schwellenwert überschritten wird, welcher mit dem C_T -Wert (*Threshold Cycle*) bezeichnet wird. Je mehr Kopien cDNA vor Beginn der Reaktion vorliegen, desto schneller steigt die Fluoreszenz an und desto geringer ist der resultierende C_T -Wert. Zur Durchführung des Experimentes wurde das Piko 96 Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) genutzt. Zunächst wurde die Reaktionskomponenten vorbereitet (vgl. Tab. 15 und Tab. 16). Anschließend wurde 1 μ l der cDNA und 9 μ l des fertigen

Bestandteil	Volumen
Aqua ad injectabilia	595,5 μ l
25 mM MgCl ₂	276 μ l
2 M KCL	57,5 μ l
Glycerol	92 μ l
1 M Tris-HCL (pH: 8,4)	46 μ l
10 mM dNTP-Mix	46 μ l
ROX	23 μ l

Tab. 15: Komponenten des Mastermixes für die qPCR. Quelle: modifizierte Darstellung nach Laborstandard (2023).

Komponente	Volumen
Mastermix (vgl. Tab. 15)	1150 μ l
Aqua ad injectabilia	396,4 μ l
Primer/Sonden-Mix (10x)	26,4 μ l
Taq-Polymerase	3,7 μ l

Tab. 16: Reaktionsansatz für die qPCR. Quelle: modifizierte Darstellung nach Laborstandard (2023).

Reaktionsansatzes in eine 96-well-Platte pipettiert und kurz abzentrifugiert. Der Ablauf der qPCR erfolgte in mehreren Schritten. Zunächst erfolgte für 10 Sekunden bei 50 °C eine Vorinkubation und für 10 Minuten bei 95 °C für die initiale Denaturierung. Darauf folgten 45 Zyklen von 15 Sekunden bei 95 °C zur Denaturierung der DNA-Stränge, gefolgt von je einer Minute bei 60 °C für die Anlagerung der Primer und die Elongation.

Zur Kontrolle der experimentellen Daten wurde eine *no-template-control* mitgeführt, welche anstelle der cDNA nur *Aqua dest.* enthielt, um DNA-Kontaminationen festzustellen. Die Fluoreszenzkontrolle wurde mittels mitgeführtem Standard ROX (Rhodamin X) durchgeführt. Die Normalisierung der gemessenen qPCR Daten erfolgte zum einen anhand der 18S rRNA und zum anderen anhand von humanem Gehirngewebe, die als Vergleichsgewebe zur Kontrolle herangezogen wurden. Die 18S rRNA hat sich in arbeitsgruppeninternen, nicht publizierten Versuchsreihen, als am stabilsten exprimiertes Housekeeping-Gen in den verfügbaren Glioblastomgewebeproben gezeigt, sodass dies zur Normalisierung herangezogen wurde. Beim Vergleich verschiedener experimenteller PCR-Läufe wurden mittels *interplate correction* normalisiert, indem bei jedem PCR-Lauf identische Proben vermessen werden, deren C_T -Mittelwerte zur Errechnung eines Normierungsfaktors herangezogen wurden.

Die Auswertung der Daten erfolgte mittels $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode. Zunächst wurde die Differenz zwischen den C_T -Werten des Zielgenes und des Referenzgenes bestimmt (ΔC_T). Daraufhin erfolgte die Bestimmung des Mittelwertes der ΔC_T -Werte der Kontrollhirngewebe, welcher von den ΔC_T -Werten der Glioblastomgewebe subtrahiert wurde ($\Delta\Delta C_T$). Durch die weitere Transformation ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) erhält man das n-fache der Expression der Kontrollen, beziehungsweise die relative Expression bezogen auf das Kontrollgewebe und das Referenzgen.

3.2 Proteinanalytische Methoden

3.2.1 Proteinisolierung und Quantifizierung aus Zellen

Zur Isolierung des Gesamtproteins aus kultivierten Zellen wurden diese zunächst mittels Zellschabern von der Zellkultur-Plastikware abgelöst und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Es folgte eine Zentrifugation für fünf Minuten bei 6.000 rpm. Der Überstand wurde abgenommen und das entstandene Zellpellet mit 150 μ l Protein-Lyse-Puffer (vgl. Tab. 17) versetzt. Die Reaktionsgefäße wurden für mindestens 30 Minuten auf Eis inkubiert und intermittierend mittels Vortexer resuspendiert, um einen guten Zellaufschluss zu erreichen. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation für fünf Minuten und der proteinreiche Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Lysate wurden entweder direkt weiterverwendet oder bei -80 °C gelagert.

Bezeichnung	Konzentration
Tris-HCL pH 7,4	50 mM
NaCl	100 mM
Triton-X100	0,10 %
EDTA	5 mM
PMSF	1 mM
Leupeptin	1 mM
Aprotinin	1 mM
Orthovanadat	250 µg/ml

Tab. 17: Protein-Lyse-Puffer. Quelle: modifizierte Darstellung nach Laborstandard (2023).

Die Bestimmung der in den Proben enthaltenen Proteinmenge erfolgte mittels BCA-Methode [117]. Hierbei werden je nach Proteingehalt unterschiedlich viele Kupferionen im Nachweisreagenz reduziert, was in Kombination mit Bicinchoninsäure (BCA) bei 562 nm messbare Farbkomplexe bildet. Für die Proteinbestimmung wurden die Lysate 1:10 mit *Aqua dest.* verdünnt und anschließend mit 200 µl BCA-Reagenz (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) versetzt. Neben den zu analysierenden Proteinlysaten wurde eine Verdünnungsreihe mit bekanntem Proteingehalt (Bovines Serumalbumin 1 mg/ml, BSA) mitgeführt. Die Proben wurden für 45 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend im Mikrotiterplattenmessgerät (Infinite 200, Tecan, Crailsheim, Deutschland) analysiert. Anhand der mitgeführten BSA-Verdünnungsreihe erfolgte eine lineare Regression zur Bestimmung des Proteingehaltes in den Proben.

3.2.2 Semiquantitativer Proteinnachweis mittels Western Blot Verfahren

Beim Western Blot Verfahren werden zunächst Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und nachfolgend, hier mittels Nassblotverfahren, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, um sie der weiteren Immundetektion zugänglich zu machen. Mittels Antigen-Antikörper-Reaktionen können dann der spezifische Nachweis und eine relative Quantifizierung der Zielproteine durchgeführt werden.

Zwecks vergleichender Analyse wurden jeweils gleiche Proteinmengen verwendet. Hierzu erfolgte die oben beschriebene Proteinbestimmung mittels BCA-Methode. Die Proben wurden dann entsprechend ihres Proteingehaltes verdünnt, um gleiche Mengen (meist 40 µg) zu erhalten. In einem weiteren Schritt wurden die Proben im Verhältnis 1:4 mit Laemmli-Puffer (vgl. Tab. 5, [118]) versetzt und fünf Minuten bei 95 °C in einem Heizblock denaturiert. Zusätzlich wurde jeweils ein Proteinmarker mitgeführt, der aufgereinigte Proteine bekannter Größe enthält (Marker VI, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland).

Es wurde eine aus zwei Geltypen bestehende diskontinuierliche Gelelektrophorese durchgeführt. Zunächst wurde hierfür das Trenngel (vgl. Tab. 18) zwischen zwei Glasplatten im Abstand von 1,5 mm bis etwa dreiviertel der Höhe gefüllt und durch die Übersichtung mit Isopropanol begradigt. Nach Polymerisation des Trenngels wurde der Isopropanolüberstand

Methoden

Bezeichnung	Bestandteil	Volumen
Sammelgel	<i>Aqua dest.</i>	3,0 ml
	Acrylamid	650 µl
	Sammelgel-Puffer (pH 6,8)	1,23 ml
	10 % SDS	50 µl
	10 % APS	50 µl
	TEMED	5 µl
Trenngel	<i>Aqua dest.</i>	3,0 ml
	Acrylamid	2,5 ml
	Trenngel-Puffer (pH 8,8)	1,9 ml
	10 % SDS	75 µl
	10 % APS	75 µl
	TEMED	7,5 µl

Tab. 18: Zusammensetzung von Sammelgel und Trenngel für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Quelle: modifizierte Darstellung nach Laborstandard (2023).

entfernt, mit dem Sammelgel überschichtet und mit einem Plastikkamm, zur Formung von Taschen für die spätere Aufnahme der Proteinproben, versehen. Nach Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm entfernt und alle Bestandteile in der Gelelektrophoresekammer positioniert und mit Tankpuffer aufgefüllt (vgl. Tab. 5). In die vorgefertigten Geltaschen wurden dann die, wie oben beschrieben, vorbereiteten Proteinproben pipettiert.

Das im Laemmli-Puffer enthaltene Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert wie das β -Mercaptoethanol die enthaltenen Proteine. Das SDS bindet an die Seitenkette der im Protein enthaltenen Aminosäuren und gibt der nach Denaturierung vorliegenden Primärstruktur der Proteine eine insgesamt negative Ladung, wodurch die Proteine nach Anlegen eines elektrischen Feldes in Richtung der Anode wandern und nur nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.

Zur Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE wurde eine definierte Spannung über dem Gel angelegt (90 Volt im Sammelgel, 130 Volt im Trenngel). Im Sammelgel liegt der pH-Wert bei 6,8. Dadurch liegt im Puffer vorhandenes Glyzin mit einer positiveren Ladung vor. Zwischen den negativ geladenen und in ihrer Mobilität kaum eingeschränkten Chloridionen und dem Glycin werden die durch das SDS negativ geladenen, aber weniger mobilen Proteinketten, aufkonzentriert. Dadurch wird ein möglichst gleichzeitiger Übertritt der Proteine in das Trenngel erreicht. Der im Trenngel höhere pH-Wert von 8,8 sorgt für eine negative Ladung des Glycins, sodass Chloridionen, Glycin und Bromphenolblau das Trenngel als erstes passieren. Dies dient auch der visuellen Fortschrittskontrolle. Ihnen folgen die Proteinketten, die durch die dichtere Struktur des Trenngels entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Je nach Größe der Zielproteine und gewünschter Auftrennung können unterschiedliche Konzentrationen von Acrylamid im Trenngel verwendet werden, welche eine inerte Matrix bilden und einen Siebeffekt auf die Proteinketten entfalten. Für die vorliegende Arbeit wurden primär 10%-ige Trenngele verwendet.

Es folgte der Transfer der nach Größe aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran mittels Nassblotverfahren nach Towbin [119]. Entsprechend der Gelgröße wurden Filterpapiere und Nitrozellulosemembran zugeschnitten. Anschließend erfolgte eine luftblasenfreie Schichtung nach dem folgenden Schema: Anode, Schwamm, drei Lagen Filterpapier, Nitrozellulosemembran, Gel, drei Lagen Filterpapier, Schwamm, Kathode. Der Transfer der Proteine erfolgte in Towbinpuffer bei 370 mA für zwei Stunden, wobei während des gesamten Transferprozesses kontinuierlich eisgekühlt wurde. Nach Übertragung auf die Nitrozellulosemembran erfolgte die Kontrolle des erfolgreichen Transfers mittels unspezifischer Ponceau-S-Färbung, was außerdem eine Fixierung der Proteine auf der Membran durch enthaltene Essigsäure bewirkte. Durch mehrfache Spülung mit *Aqua dest.* konnte die Ponceau-S-Färbung entfernt werden und die Membranen für die Immundetektion von Proteinen weiterverwendet werden.

Vor der Immundetektion erfolgte zunächst die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen durch Inkubation der Membran in 5 % FCS in TBST (vgl. Tab. 5) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Membranen wurden daraufhin jeweils dreimal für fünf Minuten mit TBST gewaschen. Es folgte die Zugabe des gegen das Zielprotein gerichteten Primärantikörpers nach etablierten Konzentrationen (Verdünnung 1:1.000 bzw. 1:2.000) in 1 % BSA/TBST über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurde wiederum ein dreimaliges fünfminütiges Waschen mittels TBST durchgeführt, gefolgt von einer zweistündigen Inkubation mit den Sekundärantikörpern bei Raumtemperatur, welche passend zur Spezies des Primärantikörpers gewählt wurden. Bei den Sekundärantikörpern wurden mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelte Antikörper (IRDye 680RD/800CW, LI-COR Biotechnology, Bad Homburg, Deutschland) verwendet. Die Bildaufnahmen erfolgten im Nahinfrarotbereich mit dem Odyssey CLx Imager (LI-COR Biotechnology, Bad Homburg, Deutschland). Alternativ erfolgte die Detektion mit Sekundärantikörpern mit angekoppelter *horseradish peroxidase* (HRP). Hierzu wurden die Membranen mit *Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) überschichtet, was nach Umsatz durch die HRP ein messbares chemilumineszentes Signal produziert, welches im Molecular Imager ChemiDoc XRS System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) gemessen wurde.

Zur erneuten Verwendung der Membranen und Nachweis weiterer Zielproteine wurden die Membranen anschließend mit *Stripping*-Puffer behandelt (52 °C für 15 Minuten, 50 ml *Stripping*-Puffer mit 350 µl β-Mercaptoethanol), wodurch die Antikörperbindungen gelöst werden.

Zur Auswertung wurden die jeweiligen, spezifischen Banden unter Nutzung der geräteinternen Software markiert und quantifiziert. Für die relative Quantifizierung erfolgte eine Normalisierung auf die Gesamtproteinintensität [120].

3.2.3 Immunfluoreszenzmikroskopie

Als weiteres Verfahren zur Darstellung der zellulären Expression und Lokalisation von Proteinen kam die Immunfluoreszenzmikroskopie zum Einsatz. Mittels spezifischer Primärantikörper wurden, wie beim Western Blot Verfahren, Zielstrukturen immunologisch markiert. Dazu wurden gegen Primärantikörper gerichtete mit Fluorochromen markierte Sekundärantikörper, nach Bindung, durch spezifische Exzitation und Messung der resultierenden Emission, detektiert.

Zum Nachweis von Proteinen mittels Immunfluoreszenzfärbung in Tumorzellen wurden diese in 12-Well-Platten auf Glasdeckgläschen ausgesät und bis zum Erreichen einer Konfluenz von etwa 70 % in Kulturmedium, wie unter Kapitel 3.3.1 beschrieben, inkubiert.

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurde das jeweilige Zielmaterial mit 4%igem Paraformaldehyd für zehn Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Bei den Zelllinien wurde nach Entfernung des Kulturmediums und einmaligem Waschen mit PBS das Paraformaldehyd zugegeben. Zur Permeabilisierung der Zellen wurde 0,1 % Triton X-100 in PBS als Detergenz für zehn Minuten bei Raumtemperatur hinzugegeben. Danach erfolgte dreimaliges Waschen mit PBS. Zelllinien und Gewebeschnitte wurden für zwei Stunden bei Raumtemperatur in 5 % FCS in PBS inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Danach wurde für zwei Stunden mit dem jeweiligen Primärantikörper bei Raumtemperatur inkubiert (vgl. Tab. 6). Hierzu kam jeweils 50 µl verdünnte Antikörperlösung zum Einsatz. Zur optimalen Verteilung der Antikörperlösung und Schutz vor Verdunstung erfolgte eine Abdeckung mit Parafilm. Anschließend erfolgte dreimaliges Waschen mit PBS und nachfolgend die Zugabe des fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers für etwa anderthalb Stunden unter Lichtausschluss. Zusätzlich wurde eine Zellkernfärbung mit DAPI in 1:1.000 Verdünnung für zehn Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Zelllinien wurden mit Deckgläschen auf einen Objektträger übertragen und mit *Dako Fluorescent Mounting Medium* (Dako North West Inc., Carpintera, USA) eingedeckt. Die auf den Objektträgern befindlichen Gewebeschnitte wurden ebenso mit einem Deckgläschen eingedeckt. Über Nacht und unter Lichtausschluss trockneten die Objektträger bis zur Mikroskopie. Nachfolgend wurden Bildaufnahmen am konfokalen Laserscanning-Mikroskop LSM780 (Zeiss, Jena, Deutschland) akquiriert.

3.2.4 Caspase-3 Assay

Zur Bestimmung der Caspase-3 Aktivität wurde ein kommerzielles Assay (Caspase-3 Fluorometric Assay, R&D Systems, Minneapolis, USA) eingesetzt und nach Herstellervorgaben durchgeführt. Das Assay basiert auf der spezifischen Erkennung der DEVD-Sequenz (Asp-Glu-Val-Asp) durch die Caspase-3. Durch die Aktivität der Caspase-3 wird ein an die Sequenz gekoppeltes Fluorochrom AFC (7-Amino-4-trifluormethyl-cumarin) frei, welches fluorometrisch bei 505 nm messbar ist. Das ungespaltene DEVD-AFC hingegen hat sein

Emissionsmaximum bei 400 nm. Durch den Vergleich mit einer Kontrollbedingung wird die Berechnung der relativen Caspase-3 Aktivität möglich.

Hierfür wurden die Zellen in 12-well-Platten in einer Zellzahl von 100.000 pro Vertiefung ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen sechs Stunden mit der jeweiligen L-Carnitin Konzentration in Hungermedium (vgl. Tab. 19) vorinkubiert. Nach 48 Stunden Inkubation mit den zu untersuchenden Zytostatika beziehungsweise Substanzen wurden die Zellen geerntet und in 30 µl Protein-Lyse-Puffer (ohne Proteaseinhibitoren) aufgenommen. Die Zellen wurden dann zehn Minuten auf Eis inkubiert und danach bei 10.000 rcf abzentrifugiert. Die Proteinbestimmung erfolgte wie zuvor beschrieben (vgl. Kapitel 3.2.1, S. 36). Basierend auf den Herstellervorgaben wurden die Proben verdünnt und der Reaktionspuffer hinzugegeben. Nach einstündiger Inkubation erfolgte die Messung im Mikrotiterplattenmessgerät bei einer Exzitation von 400 nm und Emission von 505 nm. Von dem Messergebnis wurde die Hintergrundfluoreszenz der nach Herstellervorgaben mitgeführten Negativkontrollen abgezogen und eine Normalisierung auf den Proteingehalt durchgeführt. Technische Replikate wurden gemittelt und als Vielfaches der Lösungsmittelkontrolle berechnet.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Kultivierung von Zellen

Die für Zellkulturarbeiten verwendeten Tumorzelllinien (GL261, LN-18, primäre Glioblastomzellen) wurden unter sterilen Bedingungen in 75 cm² Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C und 95 % relativer Luftfeuchte in 5 % CO₂ Atmosphäre kultiviert. Die experimentelle Handhabung fand stets unter sterilen Bedingungen an einer Sterilwerkbank statt. Kulturmedien und andere Substanzen beziehungsweise Lösungen wurden nach Bedarf auf 37 °C im Wasserbad vorgewärmt. Es wurden regelmäßig visuelle Wachstums- und Kontaminationskontrollen am Lichtmikroskop durchgeführt und auf eine geringe Zahl von Passagen geachtet. Weiterhin erfolgte regelmäßig eine visuelle Kontrolle des pH-Wertes anhand der Farbänderung des verwendeten Mediums, welches Phenolrot als pH-Indikator enthielt. Die eingesetzten Medien sind in Tab. 19 aufgeführt, wobei Hungermedium nur zur experimentellen Untersuchung genutzt wurde.

Sobald die Fläche der Zellkulturflasche mit Zellen konfluent bewachsen war und die Zellen langsam in Richtung eines Energiemangels gingen, wurde eine Fraktion der Zellen in eine neue Zellkulturflasche passagiert. Unter normalen Umständen war eine Passage pro Woche notwendig. Hierzu wurde das alte Medium zunächst abgesaugt und die Zellen einmal mit DPBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 3 ml Trypsin-EDTA für fünf bis zehn Minuten. Die Protease Trypsin sorgt für einen proteolytischen Verdau von Zell-Zell- und Zell-

Methoden

Bezeichnung	Bestandteil	Volumen
DMEM Kulturmedium (10 % FCS)	DMEM (4,5 g/l Glucose)	500 ml
	FCS	50 ml
	L-Glutamin	5,5 ml
	Nicht essenzielle Aminosäuren	5,5 ml
DMEM Hungermedium (0,05 % FCS)	DMEM (4,5 g/l Glucose)	500 ml
	FCS	0,25 ml
	L-Glutamin	5,5 ml
	Nicht essenzielle Aminosäuren	5,5 ml
MEM Hungermedium (0,05 % FCS)	MEM (1,0 g/l Glucose)	500 ml
	FCS	0,25 ml
	L-Glutamin	5,5 ml
	Nicht essenzielle Aminosäuren	5,5 ml

Tab. 19: Eingesetzte Medien in der Zellkultur. Quelle: modifizierte Darstellung nach Laborstandard (2023).

Matrixkontakten. EDTA bildet mit Magnesium- und Calciumionen Chelatkomplexe, wodurch die Ionen für Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte nicht mehr zur Verfügung stehen. Durch leichtes Schlagen an den Rand der Kulturflasche erfolgte zusätzlich eine mechanische Lösung der Zellen. Die Trypsinreaktion wurde durch Zugabe von 7 ml Kulturmedium mit dem enthaltenen FCS gestoppt. Es wurden ca. 0,3 ml der Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche mit 20 ml Kulturmedium übertragen und dann weiter unter Standardbedingungen inkubiert.

3.3.2 Bestimmung der Zellzahl

Um Experimente mit gleichen Ausgangsbedingungen zu schaffen, wurden jeweils gleiche Zellzahlen in den Versuchen verwendet. Dazu wurde die Zellzahl mittels CASYOne (Schärfe System, Reutlingen, Deutschland) bestimmt. Es wurden 50 µl der zu messenden Zellsuspension in 10 ml CASYton Elektrolytlösung verdünnt und dem Gerät zur Messung zugeführt. Bei der Messung wird die Suspension aus Zellen und Elektrolytlösung durch eine Kapillare definierten Durchmessers bei konstanter Geschwindigkeit geleitet. Hierdurch werden die Zellen einzeln nacheinander eingesaugt. In der Kapillare wird vom Gerät ein Spannungsfeld erzeugt, beim Durchfluss einer Zelle durch eben diese Pore wird das Spannungsfeld verändert und die Spannung fällt je nach Volumen der Zelle mehr oder weniger stark ab. Daraus errechnet das Gerät das Volumen jeder Zelle und kann aus den gemessenen Ereignissen die Zellzahl pro Milliliter der gemessenen Probe errechnen. Zur Steigerung der Präzision wurde die Messung mehrfach durchgeführt und gemittelt.

3.3.3 Bestimmung der Zellviabilität

Als Maß für die Zellviabilität kam das Resazurin-Assay zum Einsatz. Hierbei werden Reduktionsäquivalente als Maß für die Viabilität der untersuchten Zellen gemessen. Je stoffwechsellaktiver die untersuchten Zellen sind, desto mehr Reduktionsäquivalente stehen in der Zelle zu Verfügung. Gibt man Resazurin (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-on-10-oxid) hinzu, so wird der Stoff zunächst zu Resorufin und später zu Hydroresorufin umgesetzt. Diese Umsetzung findet hauptsächlich durch die Reaktion mit NADH und NADPH statt. Resazurin (lila) und

Hydroresorufin (farblos) sind beide nicht fluoreszierend, wohingegen Resorufin rot erscheint und fluoresziert.

Die Zellen wurden hierfür in einer Zellzahl von 5.000 pro Vertiefung einer 96-Well-Platte ausgesät. Circa 24 bis 48 Stunden später bei einer Konfluenz von etwa 70 % erfolgte die Applikation der Testsubstanzen gefolgt von einem Behandlungszeitraum von 24 bis 96 Stunden, je nach Versuchsbedingung. Die Messung der Zellviabilität erfolgte dann mit einem kommerziellen Assay nach Herstellervorgabe (PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland). Das entsprechende Reagenz wurde 1:10 mit Kulturmedium verdünnt und dann zu den Zellen gegeben, nachdem das Medium mit den Testsubstanzen entfernt worden war. Daraufhin folgte eine ein- bis zweistündige Inkubationsperiode bei 37 °C im Brutschrank. Anschließend wurden die Platten im Mikrotiterplattenmessgerät ausgewertet. Die Exzitationswellenlänge betrug 530 nm, die gemessene Emissionswellenlänge lag bei 590 nm. In jedem Experiment wurden Leerwerte der frisch hergestellten Resazurinlösung mitgeführt und als Hintergrundfluoreszenz herausgerechnet. Die Auswertung erfolgte immer in Relation zur Lösungsmittelkontrolle.

3.3.4 Bestimmung der relativen Zellzahl und Zellvitalität

In Experimenten mit adhärent wachsenden Zellen kann Kristallviolett dazu verwendet werden, die relative Zellzahl zu bestimmen. Bei den in dieser Arbeit verwendeten, adhärent wachsenden Gliomzellen wurde durch das nachfolgend beschriebene Prozedere lediglich der Anteil der lebenden Zellen nachgewiesen, sodass sich hier auch die Zellvitalität als Maß für die lebendige Zellmasse ergibt. Durch das eingesetzte Kristallviolett werden unspezifisch Zellbestandteile (Nukleoproteine) angefärbt, wodurch die Zellen photometrisch nachweisbar werden.

Die Färbung der Zellen mit Kristallviolett erfolgte im Anschluss an das oben beschriebene Resazurin-Assay (vgl. Kapitel 3.3.3, S. 42). Im hier genutzten Protokoll wurden zunächst Zelltrümmer und abgestorbene, abgelöste Zellen durch Waschen mit PBS entfernt. Danach wurden die adhären Zellen mit 4%igem Paraformaldehyd für 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, mit PBS überschichtet und abgedeckt bei 4 °C gelagert oder sofort weiterverarbeitet. Zur Färbung der Zellen wurden die 3 ml Kristallviolett mit 10,8 ml Ethanol verdünnt. Die Zellen wurden nach Zugabe von 50 µl der Färbelösung für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die Lösung wurde wieder entfernt. Anschließend wurde die Platte mehrfach mit *Aqua dest.* gespült bis die Spüllösung klar blieb. Der an die Zellen gebundene Farbstoff wurde mit 1 % SDS in Lösung gebracht, wofür die Zellen für 20 Minuten bei Raumtemperatur bei 900 rpm auf einem Schüttler bewegt wurden. Der Überstand wurde im Anschluss bei 560 nm photometrisch vermessen. Die Auswertung erfolgte immer in Relation zur Lösungsmittelkontrolle.

3.3.5 Bestimmung der Zellmigration im Wundheilungsassay

Für die Untersuchung der Migrationseigenschaften wurden Zellen in 24-well Platten bis zur Konfluenz inkubiert. In der Mitte des so entstandenen Zellrasens wurde sodann mit einer 100 μ l Pipettenspitze einmal in vertikaler Richtung von oben nach unten geschabt und so eine zellfreie Fläche im jeweiligen Reaktionsraum hergestellt. Nach dem Setzen dieser Wunde im Zellrasen wurden die Zellen jeweils vorsichtig mit DPBS zweimal gewaschen, um abgelöste Zellen zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen wieder mit 200 μ l Hungermedium überschichtet. Diesem wurde vorab 5 mM Hydroxyharnstoff hinzugefügt, um die Zellproliferation zu hemmen, um nur die Zellmigration zu untersuchen. Von den Zellen wurden im PalmRobo Mikroskop (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) pro Reaktionsraum drei Positionen aufgenommen und deren Koordinaten für spätere Aufnahmen abgespeichert. Danach erfolgte die Hinzugabe der experimentellen Substanzen und die anschließende Inkubation für 24 Stunden im Brutschrank. Die Zellen wurden vor der Akquise der finalen Aufnahmen mit DPBS gewaschen und die abgespeicherten Koordinaten für die automatisierte Ansteuerung der Position und dortige Aufnahme des Wundverschlusses durch die Zellen genutzt. Die Bestimmung der Wundfläche erfolgte mittels eines modifizierten *ImageJ* Makros, das anhand einer Befehlssequenz die zellfreie Fläche ermittelt. Eine beispielhafte Sequenz ist in Abb. 9 gezeigt. Die Auswertung erfolgte als relativer Wundverschluss durch Einwanderung der umliegenden Zellen in den zellfreien Bereich.

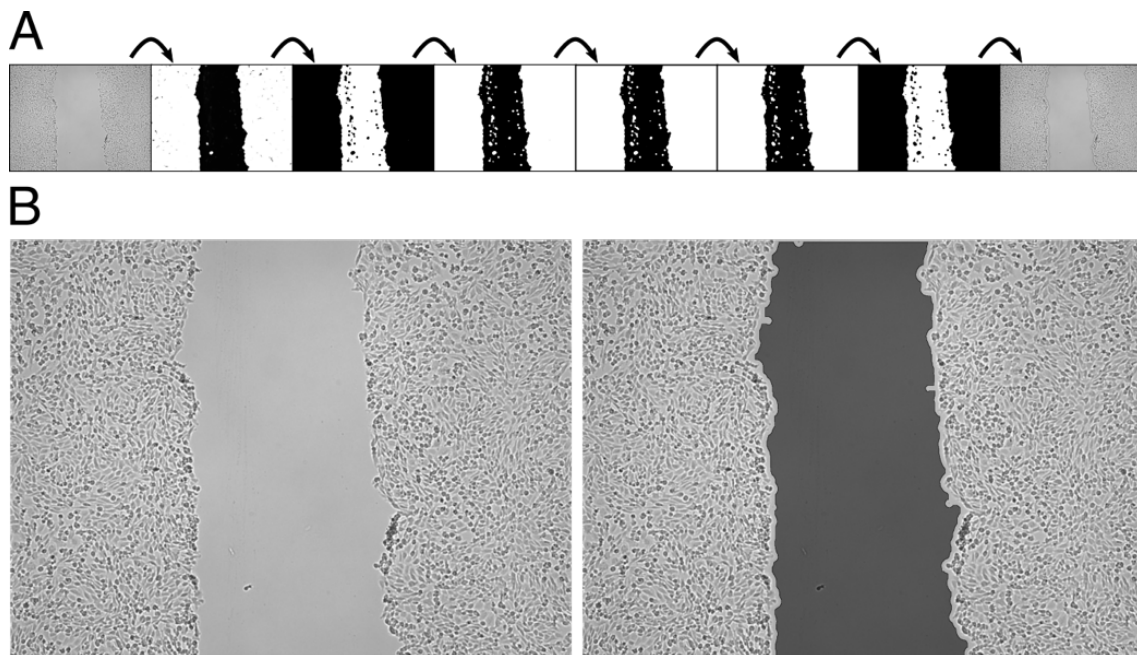


Abb. 9: Beispielhafte Darstellung der Auswertungssequenz des Wundheilungsassays. (A) Veranschaulichung relevanter Zwischenschritte bei der Verarbeitung der mikroskopischen Aufnahmen unter Verwendung des Programmes *ImageJ* und durch Befehle bedingte Bildumwandlungsprozesse. (B) Vergleichende Darstellung vom mikroskopischen Ausgangsbild (links) und analysiertem Endbild (rechts) mit grafisch in grau hervorgehobenem Bereich, welcher quantifiziert wird. Quelle: Eigene Darstellung (2023).

3.4 Tierexperimentelle Methoden

Der hier beschriebene Tierversuch wurde nach Maßgabe des Tierschutzgesetzes und der Tierschutz-Versuchstierverordnung genehmigt und durchgeführt. Die zuständige Behörde, das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern (LALLF MV) führt diesen Tierversuch unter dem Aktenzeichen 7221.3-1-063/14.

Tierversuche sollten aus ethisch-moralischen Gründen einem hohen Standard unterliegen, weshalb der Tierversuch und seine Umsetzung an den ARRIVE Richtlinien (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*) orientiert ist [121]. Diese Richtlinien stellen einen hohen Standard ähnlich den CONSORT Richtlinien (*Consolidated Statement of Reporting Trials*) im Bereich randomisierter Therapiestudien dar und sollen eine hohe Qualität für die wissenschaftliche Durchführung und Berichterstattung der tierexperimentellen Studien sicherstellen.

3.4.1 Studiendesign

Der Versuchsablauf erstreckte sich für jedes Tier über 27 Tage und ist schematisch in Abb. 10 dargestellt. Am ersten Tag (t0) erfolgte die stereotaktische Tumorzellimplantation (vgl. Kapitel 3.4.6, S. 50). Hierauf folgten zwölf Tage, in denen der Tumor bei Erfolg der Implantation auf eine gewisse Größe anwachsen konnte. An t12 wurde dann eine initiale MRT durchgeführt und bei vorhandenem Tumor eine randomisierte Zuordnung in einen Versuchsarm vorgenommen. Von t12 bis t26 erfolgten tägliche verblindete Substanzinjektionen entsprechend des Versuchsarmes. Am letzten Tag (t26) fand eine abschließende MRT und anschließend eine Euthanasie und Organentnahme statt. Die drei eigenständigen Versuchsgruppen mit einmal vier Versuchsarmen und zweimal zwei Versuchsarmen sind in Tab. 20 aufgeschlüsselt.

Es wurde eine balancierte Blockrandomisierung genutzt. Die Anzahl der Versuchsarme bestimmte die Blockgröße, also vier für die C57BL/6 Versuchsgruppe und jeweils zwei für $jvs^{+/-}$ - und $jvs^{-/-}$ -Versuchsgruppen. Die Vorhersagbarkeit der nächsten Zuweisung wurde durch die Messung mehrerer Tiere pro MRT-Termin mit einer unbekanntem Anzahl (je nach Erfolg der Tumorinduktion) an aufzunehmenden Tieren erschwert. Die Zuweisung erfolgte auf Nachfrage bei einer nicht direkt mit der Versuchsdurchführung betrauten Person. Die Randomisierungsliste wurde mithilfe des Programms Researchrandomizer erstellt [122].

Die Verblindung erfolgte zum Zeitpunkt der Substanzvorbereitung durch zwei unterschiedliche Personen, wobei die Testsubstanzen in je gleich aussehenden Gefäßen angesetzt wurden. Der archivierte Verblindungsschlüssel wurde an unabhängige Personen verteilt und erst nach Abschluss der Auswertung angefordert, um eine Entblindung durchzuführen.

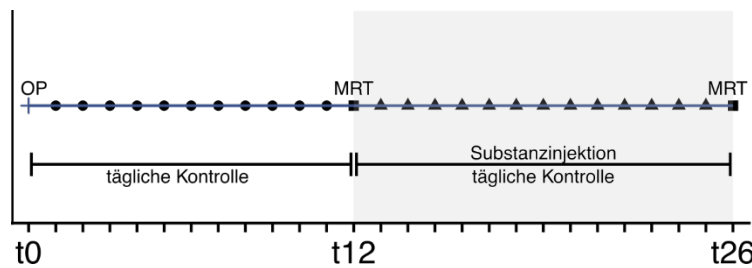


Abb. 10: Allgemeiner Versuchsablauf der tierexperimentellen Studie. Operation (OP) an Tag 0 (t0), erste Magnetresonanztomographie (MRT) an Tag 12 (t12) und zweite an Tag 26 (t26). Zusätzlich tägliche Kontrolle des Tierwohls (Punkte) und in der Behandlungsphase (t12 – t26) zusätzlich zur Tierwohlkontrolle auch Substanzinjektionen (Viereck beziehungsweise Dreieck). Quelle: Eigene Darstellung (2023).

Versuchsgruppe / Mauslinie	Versuchsarme / Substanzen
1. C57BL/6	A: 0,9%ige NaCl-Lösung B: Carnitin (250 mg/Tag und kg Körpergewicht) C: Etomoxir (20 mg/Tag und kg Körpergewicht) D: Meldonium (200 mg/Tag und kg Körpergewicht)
2. <i>jvs</i> ^{+/-}	A: 0,9%ige NaCl-Lösung B: Carnitin (250 mg/Tag und kg Körpergewicht)
3. <i>jvs</i> ^{-/-}	A: 0,9%ige NaCl-Lösung B: Carnitin (250 mg/Tag und kg Körpergewicht)

Tab. 20: Versuchsgruppen und zugehörige Versuchsarme. Quelle: Eigene Darstellung (2023).

3.4.2 Versuchstiere

In den Tierversuchen der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Mauslinien verwendet. Zum einen kamen die häufig tierexperimentell genutzten C57BL/6J Mäuse zum Einsatz. Weiterhin wurden sogenannte *jvs*-Mäuse (siehe unten) verwendet, die eine natürliche rezessiv vererbte Punktmutation im *SLC22A5* Gen (*OCTN2*) auf Chromosom 11 tragen (MGI ID: 1856926, <http://www.informatics.jax.org/allele/key/1092>). Der murine und der humane *OCTN2* Transporter weisen eine Homologie von 85,5 % auf [116]. Die ursprünglichen Zuchtpaare wurden freundlicherweise von Prof. Krähenbühl (Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsspital Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt und gehen ursprünglich auf Prof. Horiuchi (Universität Kagoshima, Japan) zurück. Die erste Beschreibung erfolgte im Jahr 1988 durch Koizumi et al. und eine ausführlichere Definition als Carnitin defizientes Mausmodell wurde etwas später durch Kuwajima et al., unter der Mitarbeit von Prof. Horiuchi und Weiteren, durchgeführt [123, 124]. Aufgrund des Phänotyps wird dies Mausmodell als *juvenile visceral steatosis* (*jvs*) bezeichnet. Die genaueren genetischen Zusammenhänge wurden durch Nezu et al. (1999) beschrieben [116].

Die heterozygoten Tiere werden mit *jvs*^{+/-} und die homozygoten mit *jvs*^{-/-} abgekürzt. Zuchtpaare für die *jvs*-Tierzucht bestanden aus C57BL/6 × *jvs*^{+/-} und zur Optimierung der Zuchterfolge für *jvs*^{-/-} auch aus *jvs*^{+/-} × *jvs*^{+/-}. Allgemein kam ein Inzuchtschema mit Geschwisterverpaarung zum Einsatz.

Für die Aufzucht der *jvs*^{-/-} Tiere wurde eine Supplementierung mit L-Carnitin angereichertem Trinkwasser bis eine Woche vor Versuchsbeginn durchgeführt. Alle Versuchstiere erhielten eine Ohrmarkierung in jungem Alter nach einem festgelegten Schema, wodurch jedes Versuchstier einwandfrei identifizierbar wurde.

3.4.3 Tierhaltung

Die Tiere wurden in den Räumlichkeiten der Zentralen Service- und Forschungseinrichtung für Versuchstiere (ZSFV) in einem 12 h Tag/Nacht Rhythmus gehalten (Tag: 06:00 Uhr bis 18:00 Uhr MEZ; Nacht: 18:00 Uhr bis 06:00 Uhr MEZ). Die Tiere gehörten dem Pathogenitätsstatus nach zum spezifisch pathogenfreien Haltungsbereich, welcher einem vierteljährlichen Hygienemonitoring nach den Empfehlungen der *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA) unterlag. Hierbei war haltungsweit lediglich der sporadische Nachweis von murinem Norovirus auffällig, ohne dass sich hieraus bekannte Einflüsse für die verwendeten Versuchstiere ergaben. Die Umgebungstemperatur lag bei 22 °C mit maximal 2 °C Abweichung nach oben und nach unten. Die Luftfeuchtigkeit betrug 40 – 70 %. Luftfeuchtigkeit und Temperatur wurden täglich kontrolliert und dokumentiert. Die Tiere wurden in Euronorm Typ III Käfigen gehalten (maximal acht Mäuse mit Körpergewicht >20 g, Grundfläche von 820 cm², Maße 425 mm × 276 mm × 153 mm). Als Einstreumaterial wurden ein bis zwei Millimeter große staubfreie, harzfreie, sterilisierte, chargenkontrollierte Espenholzschnitzel genutzt (Abedd Espen MINI, H0234-200, LAB & VET Service GmbH, Wien, Österreich). Trinkwasser (gegen Keimwachstum mit Salzsäure angesäuert) und Futtermittel (Maus – Zucht Extrudat, ca. Ø 16 mm, V1126-003, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) stand den Tieren *ad libitum* zu Verfügung. Die Tiere wurden zweimal wöchentlich durch das Personal der ZSFV in frische Käfige umgesetzt und täglich kontrolliert. Als Material für die Umgebungsanreicherung wurden Nestbaumaterialien (*Nestlets*, Datasand Ltd., Bredbury, England) und Mausspieltunnel (*Mouse Play Tunnel*, Datasand Ltd., Bredbury, England) genutzt.

3.4.4 Dokumentation von Tierwohl

In der Betrachtung des Tierwohls sind mindestens zwei Perspektiven notwendig. Ex ante sind tierethische Überlegungen und regulatorische Anforderungen zu betrachten. Während der Durchführung des Versuches sind die individuellen Faktoren der Versuchstiere für das Tierwohl in den Mittelpunkt zu stellen.

In der ex ante Betrachtung eines durch Tierversuche bedrohten Tierwohls muss vor allem der Forschungskontext gesehen werden. Bei nach wie vor nur sehr geringen Therapieerfolgen und Heilungschancen des Glioblastoms ergibt sich hier für viele Forschungsansätze immer auch die Notwendigkeit *in vitro* Ergebnisse und Erkenntnisse *in vivo* zu überprüfen. Halten Hypothesen der Überprüfung im Tierversuch stand, kann auch eine Translation der Forschungsergebnisse

auf den Menschen in Betracht gezogen werden. Um also Behandlungserfolge und eine Verbesserung der Therapie zu erreichen, bleiben Tierversuche im Bereich vieler Erkrankungen, wie auch des Glioblastoms, notwendig.

Weiterhin gibt es teils immer wieder Rückschläge bei der Translation von Forschungsergebnissen in den komplexeren Systemen eines Organismus. Im Versuchstier ergeben sich viel komplexere, weniger kontrollierbare Einflussfaktoren verschiedener Organsysteme sowie humoraler und genetischer Faktoren, welche in ihrer Abstraktion in vielen *in vitro* Studien nicht abgebildet werden können.

Sind Tierversuche als Notwendigkeit akzeptiert, so ergibt sich doch die Pflicht mit hinreichender Qualität und ohne Verschwendung vorzugehen. Hierzu gibt es international anerkannt die 3R Prinzipien, welche für *Replacement*, *Reduction*, *Refinement* stehen [125]. In Bezug auf *Replacement*, also die Vermeidung durch Alternativmethoden, lässt sich im vorliegenden Falle feststellen, dass Alternativmethoden wie zum Beispiel Zellkultursysteme unterschiedlicher Komplexität für Hirntumoren vorliegen, hierdurch aber kein adäquates Modell für einen (patho-)physiologisch realistischen Hirntumor beziehungsweise ein Glioblastom *in vivo* dargestellt wird. Hinsichtlich *Reduction* kann festgestellt werden, dass im vorliegenden Fall durch den Einsatz von Magnetresonanztomographie eine erhebliche Reduktion von Tierzahlen erreicht werden konnte. Auch fand eine Beschränkung auf zielführende, wichtige Substanztestungen statt. In Bezug auf *Refinement*, also die Verbesserung der Durchführung wurde insbesondere auf eine rigorose Umsetzung von Randomisierung, Verblindung und Kontrollierung von Einflussfaktoren geachtet und nach ARRIVE Standard geplant, um qualitativ ein hohes Niveau zu erreichen. Durch den Einsatz von Magnetresonanztomographie wurde ebenfalls eine Verbesserung erreicht. Auch das umfassende Training in der Versuchsdurchführung trug zu einer Verbesserung der tierexperimentellen Studie bei.

In der Abwägung der ethischen Vertretbarkeit von Tierversuchen gibt es unterschiedliche Ansichten. Hier muss stets eine Gegenüberstellung von Nutzen und Schaden erfolgen. Der Schaden ist dabei gewiss, der Nutzen jedoch fraglich. Der Tod als schlimmster Schaden für das Versuchstier wird bei vielen medizinischen Forschungsfragen in Kauf genommen werden müssen, da nur so die relevanten Zielstrukturen den Auswertungsmethoden zugänglich gemacht werden können. Hier steht auf der Nutzenseite die Identifizierung und Vorbereitung neuer Therapieverfahren für das Glioblastom sowie ein allgemeiner Erkenntnisgewinn über die Pathomechanismen beim Glioblastom. Auf der Schadenseite steht ein potentiell unterschiedlich hoch ausfallendes Leid der Tiere durch die Versuchsdurchführung, unabhängig vom Versuchsende. Aus den bisherigen Erfahrungen mit der hier angewandten Methode und dem Wissen um die

einzusetzenden Substanzen ergibt sich die Erwartung von allenfalls geringem Leid bis maximal mittelgradigem Leid durch den Versuchsablauf [103].

Nach einer Herangehensweise von Kirschke et al. (2015) ergeben sich je nach Gewichtung des Tierwohls verschiedene Abwägungsmöglichkeiten (vgl. Abb. 11) [126]. Hiernach ist der vorliegende Versuch als Forschung zur Vorbereitung klinischer Studien anzusehen oder mindestens als Forschung mit translationaler Perspektive, denn das auf das humane Krankheitsbild mittels Substanzintervention ausgerichtete Projekt zielt deutlich auf eine Heilung und nicht nur das bloße Verstehen von grundsätzlichen Zusammenhängen ab. Im Rahmen des hier durchgeführten Tierversuches ist mit geringem bis maximal mittlerem Leid zu rechnen. Nach Zusammenschau aller hier gezeigten Metriken ergibt sich somit eine ethische Vertretbarkeit des Versuches für die überwiegende Anzahl der Ansichtsweisen.

In der Betrachtung des Tierwohls während des Versuches sind vor allem die individuellen Faktoren des Tieres tragend. Es erfolgten daher tägliche Kontrollen der Versuchstiere und eine

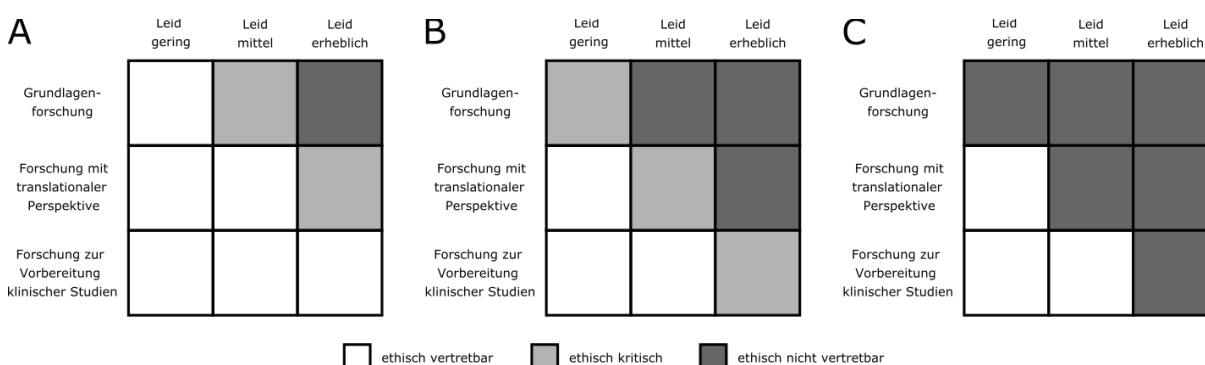


Abb. 11: Ethische Abwägungsmatrizen. Unterschiedlich bewertende Metriken (A-C). Quelle: modifiziert nach Kirschke et al. (2015) [126].

Kategorie	Bewertungsmaßstab	Punkte
Körpergewicht	Keine Änderung	0
	Gewichtsreduktion < 5 %	1
	Gewichtsreduktion 5 – 10 %	5
	Gewichtsreduktion 11 – 20 %	10
	Gewichtsreduktion > 20 %	20
Allgemeinzustand	Fell glatt und glänzend, Körperöffnungen sauber, Augen klar	0
	Fell stumpf und ungeordnet, ungepflegte Körperöffnungen, Augen trüb	5
	Schmutziges Fell, verklebte/feuchte Körperöffnungen, Augen trüb, anormale Körperhaltung	10
	Verkrampfungen/Lähmungen (Rumpf, Extremitäten), Atemgeräusche, Tier fühlt sich kalt an	20
Verhalten	Normales Verhalten (z. B. Reaktion auf Berührung, Neugier, Sozialkontakte)	0
	Ungewöhnliches Verhalten wie eingeschränkte Motorik oder Hyperkinetik	5
	Selbstisolation, Lethargie, starke Hyperkinetik und Stereotypien, Koordinationsstörungen	10
	Schmerzlaute beim Ergreifen, Selbstamputation/Autoaggression	20

Tab. 21: Angewendeter Belastungsscore zur Dokumentation des Tierwohls im Tierversuch. Quelle: modifizierte Darstellung nach Arbeitsgruppenstandard (2023).

Bewertung in den Kategorien Körpergewicht, Allgemeinzustand und Verhalten. Hieraus wurde durch Addition der einzelnen Teilpunkte anhand von vor Versuchsbeginn festgelegten Bewertungskriterien ein Belastungsscore errechnet (vgl. Tab. 21). Um übermäßiges Leid der Tiere zu verhindern, sehen die Tierschutzaspekte beim Überschreiten von 20 Punkten die Euthanasie der jeweiligen Tiere vor. Der hier angewandte Belastungsscore orientiert sich dabei an früheren Erfahrungen mit derselben Methode [103]. Der Tod der Versuchstiere wurde durch die Kombination von zwei Methoden schmerzfrei herbeigeführt. Zunächst wurden die Tiere einer tödlichen Dosis des Inhalationsnarkotikums Isofluran ausgesetzt. Ergänzend zur Isofluran-Überdosis, wurde bei den Tieren, die keine Behandlung mit den Testsubstanzen erhielten, eine zervikale Dislokation durchgeführt. Bei Tieren, die im Versuch eingeschlossen waren, wurde ergänzend eine finale Blutentnahme durchgeführt.

3.4.5 Genotypisierung

Als Materialgrundlage für die Genotypisierung der jvs-Mäuse (vgl. Kapitel 3.4.2, S. 46) dienten durch die Mitarbeiter der ZSFV zur Verfügung gestellte Schwanzbiopsien. Diese wurden im Zuchtablauf früh gewonnen und bis zur Verarbeitung bei -20 °C gelagert. Aus den Biopsien wurde die DNA isoliert. Durch Nutzung eines Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus erfolgte nach Amplifizierung des Zielgens mittels einfacher PCR und enzymatischer Spaltung die Bestimmung des Genotyps anhand spezifischer Bandenmuster nach Gelelektrophorese (vgl. Kapitel 3.1.5, S. 32).

3.4.6 Intrakranielle stereotaktische Tumorzellimplantation

Zur Induktion eines Tumors im Gehirn des Versuchstieres wurden zunächst die später injizierten Zellen vorbereitet. Hierzu wurden die GL261-Zellen einer nahezu konfluenten 75 cm^2 Zellkulturflasche mit Trypsin vom Flaschenboden gelöst und in Suspension gebracht (vgl. Kapitel 3.3.1, S. 41). Von der Zellsuspension wurden 9 ml mit 100 rcf für fünf Minuten zentrifugiert. Zur Bestimmung der Zellzahl (vgl. Kapitel 3.3.2, S. 42) wurde vorab eine Probe entnommen. Nach dem Entfernen des Überstands wurde das Zellpellet basierend auf der gemessenen Zellzahl in entsprechendem Volumen DPBS aufgenommen, um eine Konzentration von 25.000 Zellen/ μl zu erreichen. Diese Zellsuspension wurde in zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und durchgehend auf Eis in einer Styroporbox gelagert. Eines der Gefäße diente primär der Kontrolle der Zellviabilität und wurde während der folgenden Prozeduren verschlossen mitgeführt. Die Entnahme von Zellen erfolgte während der Inokulation nur aus dem zweiten Gefäß. Aus beiden Gefäßen wurde nach Beendigung der operativen Prozedur wiederum eine Zellkultur angelegt, um auf normales Zellwachstum und Kontaminationen zu kontrollieren.

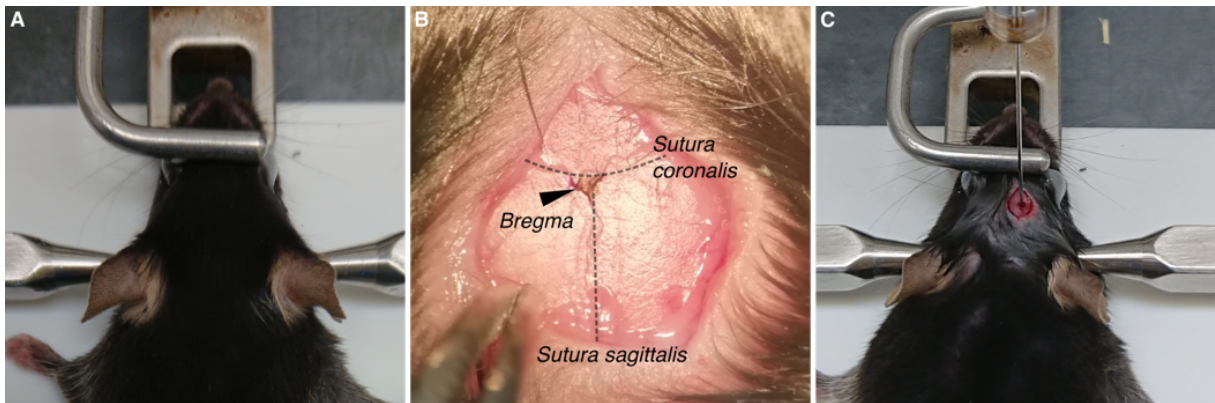


Abb. 12: Darstellung der Positionierungen bei der stereotaktischen Tumorzellimplantation. (A) *Flat skull position*. (B) Darstellung des Bregma (mittels Blick durch das Okular), hier mit anatomischen Bezeichnungen der Knochennähte (hervorgehoben durch gestrichelte Linie). (C) Injektion der Tumorzellen (GL261) mittels Mikroliterspritze an der Zielposition. Quelle: Eigene Darstellung (2023).

Vor dem eigentlichen Eingriff wurde die Maus gewogen, um gewichtsadaptiert 0,006 ml/g des Ketamin-Xylazin-Injektionsnarkotikums (vgl. Tab. 5, S. 27) intraperitoneal zu injizieren. Die Maus wurde während der operativen Prozedur in Narkose auf einer automatisch gesteuerten Wärmeplatte gelagert und die Temperatur mittels rektaler Temperaturmessung überwacht. Die Tiefe der Narkose wurde anhand von Reflexen getestet. Bei Areflexie wurde weiter im Prozedere fortgefahren und die Maus in der *flat skull position* in dem stereotaktischen Kopfhalter (Digital Lab Standard Stereotaxic, Stoelting Co., USA) positioniert (vgl. Abb. 12 A). Die Zunge wurde leicht seitlich aus dem Mund des Tieres herausgezogen, um freie Atemwege zu garantieren. Zum Schutze der Augen wurde Augen- und Nasensalbe (Bepanthen, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) aufgetragen.

Die Kopfhaut wurde im Bereich der geplanten Inzision zweimal mit 70 %-Ethanol desinfiziert. Danach erfolgte mit einem Skalpell eine etwa 0,5 cm lange rostrokaudal verlaufende Inzision der Kopfhaut in der Medianlinie. Unter Verwendung eines Okulars wurde das Bregma mit einem chirurgischen Hautmarkierungsstift (Viscot Medical, LLC., East Hanover, USA) mit einem Punkt markiert. Dieser Markierung stellte den Bezugspunkt für die folgende Navigation dar (vgl. Abb. 12 B). Mit der stereotaktischen Apparatur wurde von diesem Punkt aus 1,5 mm rechtslateral und 1,5 mm anterior navigiert und dort mit einer 20 G Kanüle vorsichtig der Schädelknochen trepaniert.

Zur Vorbereitung der Zellsuspension wurde diese stets vor dem Aufziehen durch wiederholtes sanftes Anstoßen mit dem Finger resuspendiert, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen zu erreichen. Vor Aufnahme der Zellsuspension erfolgte immer die Überprüfung der Mikroliterspritze auf freie Beweglichkeit und Funktion des Spritzenstempels sowie Kontrolle auf Luftblasen. Bei einwandfreier Funktionalität der Mikroliterspritze (Agilent 10 µl, Agilent

Technologies, Santa Clara, USA) wurden 2 µl der vorbereiteten Zellsuspension darin aufgenommen und die Spritze daraufhin im stereotaktischen Kopfhalter eingespannt.

An der zuvor trepanierten Position wurde die Spritzenadel zunächst 3,5 mm tief in das Gehirn vorgeschoben. Jeweils in 3 mm und 2 mm Tiefe erfolgte die langsame Abgabe von je 1 µl Zellsuspension (25.000 Zellen/µl), jeweils gefolgt von einer zweiminütigen Wartezeit (vgl. Abb. 12 C). Danach wurde die Mikroliterspritze langsam aus dem Gehirn zurückgezogen. Die Maus wurde aus der Kopfhalterung entfernt. Zur Schmerzprophylaxe erfolgte eine einmalige intraperitoneale Gabe von 0,1 mg/kg Buprenorphin (Buprenovet, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland). Die Inzision der Kopfhaut wurde mit Einzelknopfnähten genäht. Zum Schutz vor Unterkühlung wurden die Mäuse nach dem Eingriff in mehreren Lagen Papierhandtücher eingewickelt und zum Aufwachen in ihren Käfig transferiert. Nach Abklingen der Injektionsnarkose erwachten die Mäuse und wurden nochmals kontrolliert.

3.4.7 Kleintier-Magnetresonanztomographie

Im hier dargelegten Tierversuch kam ein 7,1 Tesla Hochfeld-Magnetresonanztomograph mit einer Gradientenfeldstärke von 290 mT/m der Firma Bruker (Clinscan, Bruker Biospin GmbH, Ettlingen, Deutschland) zum Einsatz. Zur Untersuchung des Mausgehirns wurde eine phasengesteuerte spezifische Oberflächenspule mit vier Spulenelementen verwendet (Mousebrain 2x2, Bruker Biospin GmbH, Ettlingen, Deutschland). Hilfestellung bei der Durchführung der Experimente und die Verfügbarkeit der nötigen Infrastruktur wurde freundlicherweise durch Prof. Dr. Norbert Hosten und Mitarbeiter des Instituts für Diagnostische Radiologie und Neuroradiologie der Universitätsmedizin Greifswald (Prof. Dr. Jens-Peter Kühn, PD Dr. Sönke Langner, PD Dr. Michael Kirsch, Dr. Susan Mouchantat, Stefan Hadlich) gewährleistet. Fachliche Rückfragen konnten bei Bedarf mit den Kollegen des Institutes geklärt werden.

Für die Durchführung der MRT-Messung wurden die Mäuse mittels Isofluran narkotisiert. Die Lagerung der Tiere im Vorbereitungsbereich erfolgte auf einer Wärmematte. Die Tiere wurden während der MRT-Messung auf einem speziellen Schlitten gelagert, sodass ein darin verlaufender Warmwasserkreislauf für Aufrechterhaltung der Körpertemperatur sorgte. Außerdem wurde die Atemfrequenz abgeleitet und überwacht. Die Augen des Tieres wurden in der Narkose zum Schutz vor Austrocknung mit Salbe bedeckt (Bepanthen Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland). Nach Anfertigung einer Übersichtsaufnahme wurde bedarfsweise eine Korrektur der Positionierung der Maus in der genutzten Halterung vorgenommen, um optimale Bilderergebnisse zu erhalten. Anschließend erfolgte dann die Messung der nativen MRT-Sequenzen (vgl. Tab. 22). Danach wurde die Maus kurzzeitig aus der Halterung entfernt, um 50 µl Gadolinium-haltiges Kontrastmittel in die Schwanzvene zu

	Orientierung	Kontrast	FOV (mm)	Schichtdicke (mm)	TR (ms)	TE (ms)	Voxelgröße (mm × mm × mm)	TA (mm:ss)
T2 [‡]	koronar	nativ	25	0,7	2750	46	0,098 × 0,098 × 0,7	03:26
T2 [‡]	transversal	nativ	25	0,7	2750	46	0,098 × 0,098 × 0,7	03:26
T1 [‡]	transversal	nativ	25	0,7	578	13	0,078 × 0,078 × 0,7	03:07
T2 [‡]	transversal	nativ	33	0,5	2750	44	0,129 × 0,129 × 0,5	03:26
T1 [†]	koronar	Gadovist	25	0,7	500	12	0,078 × 0,078 × 0,7	02:44
T1 [†]	transversal	Gadovist	25	0,7	500	12	0,078 × 0,078 × 0,7	02:44

Tab. 22: Magnetresonanztomografische Sequenzprofile. FOV (*field of view*); TR (*repetition time*); TE (*echo time*); TA (*aquisition time*); † *spin echo*; ‡ *turbo spin echo*. Quelle: Eigene Darstellung (2023).

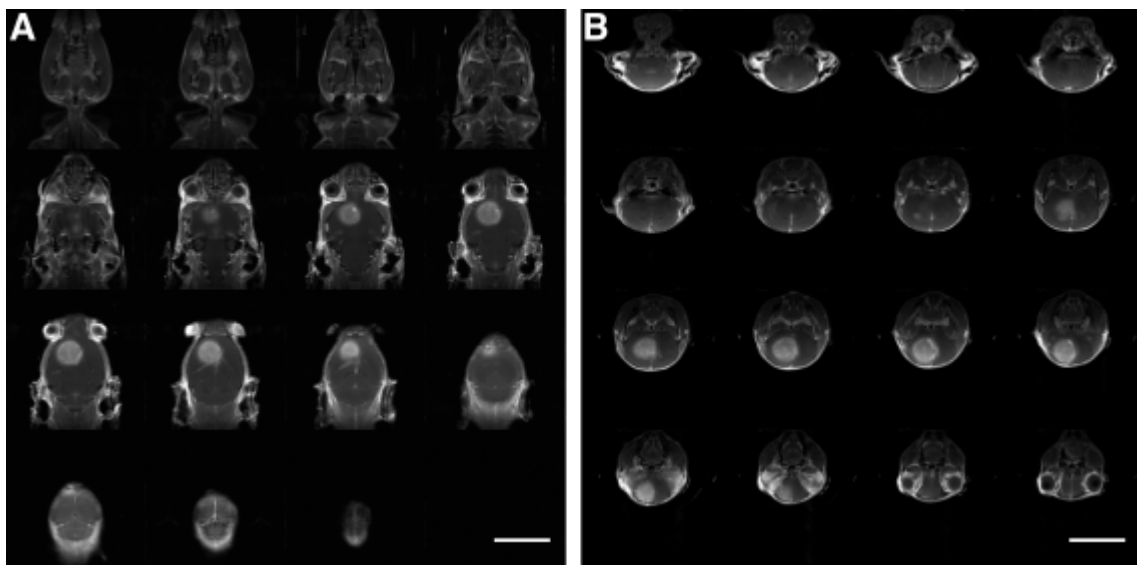


Abb. 13: Darstellung exemplarischer MRT-Schichtaufnahmen. Gezeigt ist eine koronare (A) und transversale (B) Sequenz mit Kontrastmittelanreicherung eines Tumors. Weißer Strich entspricht 10 mm. Quelle: Eigene Darstellung (2023).

injizieren (Gadovist 1 mmol/ml, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland). Nach circa fünf Minuten erfolgte die erneute Positionierung der Maus für die Aufnahme der Kontrastmittel-Sequenzen.

Zu jeder MRT-Sequenz erhält man als Ergebnis einen Datensatz, der je nach Sequenzcharakteristika unterschiedlich viele Ebenen enthält. Ein Beispiel für die vollständige Darstellung aller akquirierten Ebenen in koronarer und transversaler Orientierung ist in Tab. 22 und Abb. 13 zu sehen, hier nach Kontrastmittelgabe und deutlich sichtbarem Tumor in der rechten Hemisphäre (nach radiologischer Konvention links dargestellt).

3.4.8 Bestimmung der Tumorgröße

Die Tumorgröße wurde mit der freien Open-Source-Software Horos (horosproject.org, unterstützt von Nimble Co LLC d/b/a Purview, Annapolis, USA) bestimmt. Dafür wurde in den T1 gewichteten Sequenzen, welche unter Gabe von Kontrastmittel akquiriert wurden, schichtweise die Tumorfläche umrandet und der Flächeninhalt pro Schichtaufnahme ermittelt. Durch

Überlagerung der Einzelflächen errechnet das Programm das dreidimensionale Volumen des Tumors. Um das Tumolvolumen möglichst präzise zu bestimmen, wurden jeweils Sequenzen in koronarer und transversaler Ausrichtung erhoben und die Volumina beider Sequenzen gemittelt.

Die volumetrisch ausgewerteten MRT-Daten wurden vor weiterer Analyse logarithmisch transformiert, um eine Normalverteilung der Daten zu erreichen. Zur Überprüfung auf Normalverteilung kam der Shapiro-Wilk Test zum Einsatz. Durch die Transformation der Daten ist außerdem eine lineare Darstellung von Verdopplung und Halbierung der Messwerte gegeben. Weiterhin wird die logarithmische Transformation in der Nutzung präklinischer Tiermodelle in der Literatur empfohlen, da häufig von einem exponentiellem Tumorwachstum ausgegangen werden kann [127, 128].

Für die Klassifikation des Tumorwachstums in *progressive disease*, *stable disease*, *minor response*, *partial response* und *complete response* gibt es in der Radiologie die RECIST Kriterien [129]. Diese sind allerdings für Messungen anhand vereinfachender Annahmen gedacht, sodass für eine Vollvolumetrie andere Grenzwerte angebracht sind [130]. Weiterhin wurde im vorliegenden Fall die Kategorie der *complete response* ausgespart, da aufgrund der methodischen Induktion ein residualer Flurschaden entsteht, der bei sehr kleinen Tumoren nicht mit voller Gewissheit von diesen unterschieden werden kann. Folgende Kategorien wurden genutzt und die Einteilung anhand des nicht transformierten Tumolvolumens vorgenommen: *partial response* > 65 % Volumenreduktion; *minor response* ≤ 65 % bis 40 % Volumenreduktion; *stable disease* 40 % Volumenreduktion bis 40 % Volumenzunahme; *progressive disease* > 40 % Volumenzunahme.

3.4.9 Substanzinjektion

Die Testsubstanzen wurden den Tieren intraperitoneal in Übereinstimmung mit den aktuellen Empfehlungen appliziert [131]. Die Substanzapplikation erfolgte täglich. Die Substanzen wurden in der Zwischenzeit bei 4 °C lichtgeschützt gelagert. Vor der Herstellung der Substanzlösungen zur Applikation wurden alle Materialien desinfiziert und auf eine aseptische Arbeitsweise geachtet. Eine Durchmischung erfolgte durch sanftes Schütteln. Die Substanzinjektion erfolgte nach einem gewichtsadaptierten Schema, so dass je Gramm Körpergewicht 10 µl Volumen injiziert wurden. Einen Überblick über die eingesetzten Dosierungen zeigt Tab. 23.

Bezeichnung	Konzentration der Einzeldosis in mg pro kg Körpergewicht	Kumulative Dosis für eine 20 g schwere Maus in mg
L-Carnitin	250	75
Etomoxir	20	6
Meldonium	200	60

Tab. 23: Substanzdosierungen im Tierversuch. Quelle: Eigene Darstellung (2023).

3.4.10 Organentnahme und Aufbereitung

Nach Euthanasie des Versuchstiers wurde zunächst der Thorax und das Abdomen eröffnet, um unmittelbar nach dem Tod des Tieres eine terminale Blutentnahme aus dem rechten Vorhof des Herzens durchzuführen. Anschließend wurden die inneren Organe freigelegt als auch der Schädel eröffnet. Nach Präparation mit Schere und Pinzette wurden Gehirn, Herz, Lunge, Leber, Niere und Milz im Ganzen entnommen. Von Dünndarm und Dickdarm wurden Teilabschnitte asserviert. Die Lagerung der Gewebe erfolgte direkt nach der Entnahme in flüssigen Stickstoff.

3.5 Datenanalyse und statistische Methoden

Die experimentellen Daten wurden mittels der genannten Software (vgl. Tab. 10, S. 30) verarbeitet. Grundsätzlich wurden technische Replikate gemittelt. Biologische Replikate dienten der experimentellen Wiederholung. Normalisierungen erfolgten auf die Kontrollbedingung. Für die Durchführung von Inferenzstatistik kamen je nach Gruppengröße und Rahmenbedingungen unterschiedliche empfohlene Testverfahren zum Einsatz. Ein p-Wert von $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant erachtet. Wenn testspezifische Grundvoraussetzungen nicht gegeben waren, wie zum Beispiel die Annahme von Normalverteilung, wurde auf ein jeweils robustes alternatives Testverfahren zurückgegriffen. Beim Vergleich von zwei Gruppen wurde der Student t-Test oder alternativ der Mann-Whitney-U-Test genutzt. Beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen kam eine Varianzanalyse (engl. *analysis of variance*, ANOVA) mit Tukey oder Dunnetts Post-hoc-Test oder alternativ der Kruskal-Wallis-Test mit Dunns Post-hoc-Test mit Korrektur für multiples Testen zum Einsatz. Der Post-hoc-Test wurde jeweils nur bei signifikantem Ergebnis der Varianzanalyse durchgeführt. Dargestellt werden jeweils die p-Werte des Post-hoc-Tests. Überlebensdaten wurden mittels Kaplan-Meier Methode aufgetragen und statistisch miteinander verglichen.

4 Ergebnisse

4.1 Patientenbezogene Analysen

4.1.1 Expressionsanalysen von OCTN1, CPT1C und CRAT

Die klinisch-pathologischen Daten der untersuchten Patientenproben sind bereits weiter oben dargestellt worden (vgl. Kapitel 1.4, S. 20 und Kapitel 2.8, S. 29) und entstammen den gemeinsam bei Fink et al. (2019) publizierten Daten der Arbeitsgruppe [95].

Als schlüssige Ergänzung zu den Expressionsanalysen von OCTN2 und CPT1A, welche bereits früher in der Arbeitsgruppe analysiert und auch publiziert wurden und insbesondere für OCTN2 eine molekulare Bedeutung bei der Progression des Glioblastoms ergeben haben [95], erfolgte die Analyse von weiteren Zielgenen im Kontext des Stoffwechsels von Carnitin beziehungsweise der β -Oxidation. Die mRNA-Expression der Gene OCTN1 (niedrig-affiner Carnitin-Transporter) und CPT1C sowie CRAT, die eine essentielle Rolle beim mitochondrialen Carnitin-Shuttle spielen, wurden hierzu in aus von Glioblastompatienten stammendem Tumorgeewebe mittels qPCR analysiert. Die Ergebnisse der Analyse sind in Abb. 14 gezeigt. In einigen Patientenproben ließ sich kein aussagekräftiges Expressionssignal detektieren (C_T -Wert > 37), sodass diese von der Auswertung ausgeschlossen wurden.

Die mittlere relative mRNA Expression von OCTN1 lag in den untersuchten Glioblastomproben mit $10,6 (\pm 13,9)$ signifikant höher verglichen mit derjenigen von nichtmalignem Hirngewebe (p -Wert: $0,0095$). Die Unterteilung in Primärtumoren ($9,51 \pm 11,6$) und Rezidive ($13,2 \pm 18,1$) ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen. Auch in der Überlebenszeitanalyse zeigte sich kein signifikanter Unterschied bei Vergleich von Patienten mit einer oberhalb beziehungsweise unterhalb des Medians gelegenen OCTN1 mRNA Expression. In acht der untersuchten Proben ($9,6\%$) konnte keine Expression von OCTN1 nachgewiesen werden.

Die mittlere relative mRNA Expression von CPT1C lag in den Glioblastomproben dem analysierten Material bei $2,66 (\pm 8,85)$ und war damit nicht signifikant unterschiedlich zur Expression im Kontrollhirngewebe. Die Unterteilung in Primärtumoren mit einer mittleren CPT1C Expression von $1,85 (\pm 1,63)$ und Rezidivtumoren mit Expressionswerten von $4,5 (\pm 15,9)$ blieb ohne signifikanten Unterschied. Die Überlebenszeitanalyse brachte ebenso keinen signifikanten Unterschied beim Vergleich hoher mit niedriger CPT1C Expression nach Gruppierung der Patienten anhand des Medians der CPT1C mRNA Expression. Im Gegensatz zu OCTN1, konnte in allen untersuchten Proben die Expression von CPT1C nachgewiesen werden.

Die mittlere relative mRNA Expression von CRAT lag in dem untersuchten Glioblastomgewebe bei $10,9 (\pm 14,0)$, wobei kein signifikanter Unterschied zum Kontrollhirngewebe zu

verzeichnen war. Für die Primärtumoren ergab sich eine mittlere relative CRAT mRNA Expression von 11,4 ($\pm 12,8$) und war damit nicht signifikant unterschiedlich zu den Rezidiven (10,1 $\pm 16,4$). Auch die Überlebenszeitanalyse zeigte keinen signifikanten Unterschied, bei Gruppierung der Patienten in solche mit hoher beziehungsweise niedriger CRAT mRNA Expression anhand des Medians der CRAT mRNA Expression. In vier der untersuchten Glioblastomproben (7,3 %) konnte keine Expression von CRAT nachgewiesen werden.

Durch die Analyse der Gewebeproben mittels qPCR zeigte sich zwar ein signifikant erhöhter Wert der Expression von OCTN1 in Glioblastomen, jedoch ohne Auswirkung auf das

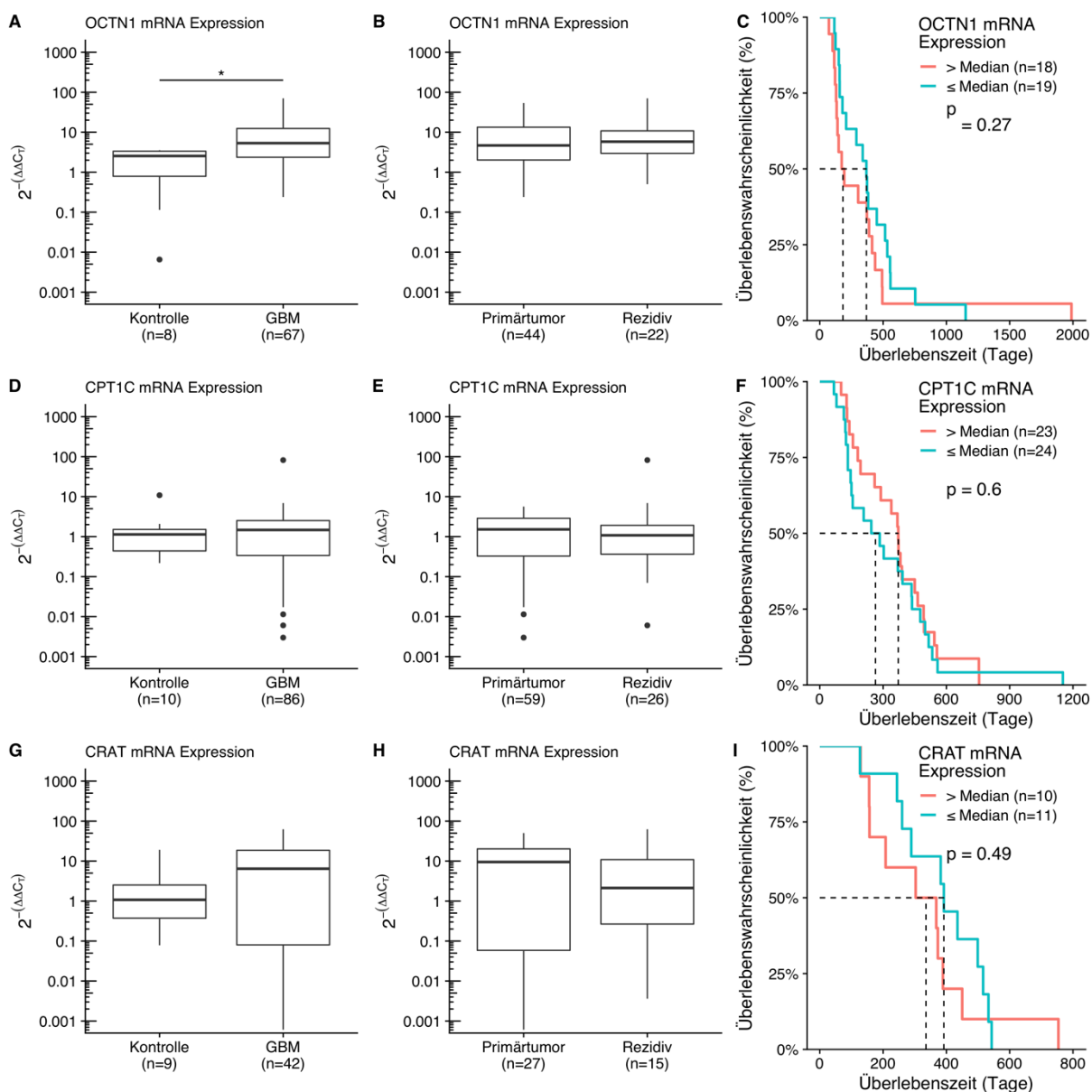


Abb. 14: mRNA Expressionsanalysen mittels quantitativer Echtzeit-PCR. Darstellung der Expression von OCTN1 (A-C), CPT1C (D-F) und CRAT (G-I) in Glioblastomproben im Vergleich zu Kontrollhirngewebe (A, D, G), im Vergleich zum Rezidivtumor (B, E, H) und nach Überlebenswahrscheinlichkeit (C, F, I) bei Unterteilung der Primärtumoren in Patienten mit hoher versus niedriger mRNA Expression bezogen auf den Median (Kaplan-Meier Überlebenszeitanalyse, nur verstorbene eingeschlossen, gestrichelte Linie zeigt die mittlere Überlebenswahrscheinlichkeit). Mann-Whitney-U-Test (* p-Wert < 0,05). Quelle: Eigene Darstellung (2023).

Überleben der Patienten. Für die weiteren untersuchten Gene zeigte sich, wie oben erläutert, kein Unterschied der Expression oder relevanter Einfluss auf das Überleben der Patienten.

4.2 Experimentelle Analysen an Glioblastomzelllinien

4.2.1 Qualitativer Nachweis von OCTN2 in verschiedenen Glioblastomzelllinien

Mittels Western Blot erfolgte die Analyse der Proteinexpression von OCTN2 in verschiedenen Glioblastomzelllinien. Hierbei zeigte sich eine Expression von OCTN2 in allen der untersuchten Glioblastomzelllinien (vgl. Abb. 15). Dies erfolgte unter Verwendung des institutsinternen anti-OCTN2-Antikörpers [83]. Zur Kontrolle diente eine mitgeführte Positivkontrolle, welche aus der Membranfraktion von Plazentazellen stammt und ebenfalls ein positives OCTN2-Signall liefert. Als Ladungskontrolle wurde der *Housekeeper* β -Actin bestimmt.

Des Weiteren wurde eine Immunfluoreszenzfärbung von OCTN2 in den murinen GL261 Glioblastomzellen durchgeführt. Hintergrund hierfür ist, dass die GL261 Zellen ein anerkanntes Modell für Glioblastome sowohl für *in vitro* als auch *in vivo* Untersuchungen darstellen [99] und im Rahmen dieser Arbeit auf diese Zellen in den tierexperimentellen Studien zurückgegriffen werden sollte. Ein weiterer Grund für den zusätzlichen Nachweis von OCTN2 durch Immunfluoreszenzfärbung war, dass die mittels Western Blot gefundene OCTN2 Bande im Vergleich zu den humanen Glioblastomzelllinien relativ schwach ausfiel. In Abb. 16 ist die Immunfluoreszenzfärbung von OCTN2 und GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*, ein astrozytäres Markerprotein) in GL261 Zellen dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die GL261 Zellen sowohl GFAP (roter Kanal) als auch OCTN2 (grüner Kanal) exprimieren. Auffallend ist, dass OCTN2, obwohl als Membranprotein beschrieben, in den Glioblastomzellen nicht eindeutig membrangebunden vorliegt, sondern sich die relativ starke Färbung über den gesamten Zellverband erstreckt. In den Kontrollen ohne Zusatz des primären, gegen OCTN2 gerichteten Antikörpers (vgl. jeweils kleine Kachel unten links) ergab sich kein visueller Hinweis auf unspezifisches Bindungsverhalten des Sekundärantikörpers.

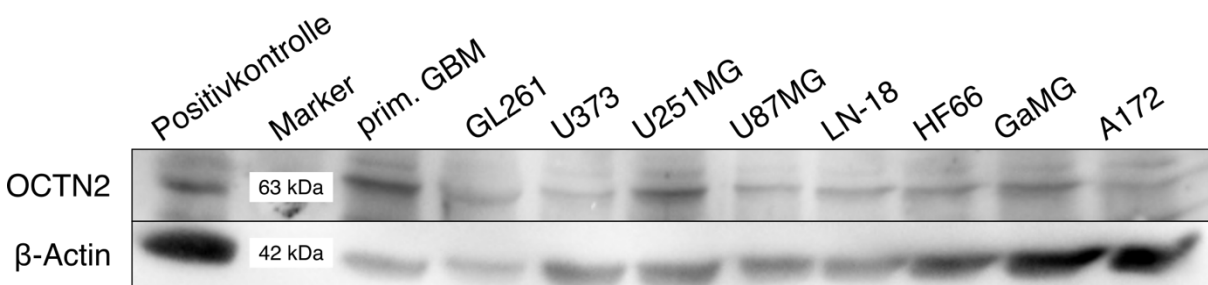


Abb. 15: Nachweis von OCTN2 mittels Western Blot in verschiedenen Glioblastomzelllinien. Die Herkunft und Details der Zelllinien sind in Kapitel 2.7 aufgeführt (vgl. Tab. 9, S. 29). Die Positivkontrolle stellen Membranvesikel der menschlichen Plazenta dar und wurden freundlicherweise von Dr. Markus Grube zur Verfügung gestellt. Als OCTN2-Antikörper diente ein institutsintern durch Grube et al. (2005) hergestellter polyklonaler Kaninchenantikörper [83]. Quelle: Eigene Darstellung (2023).

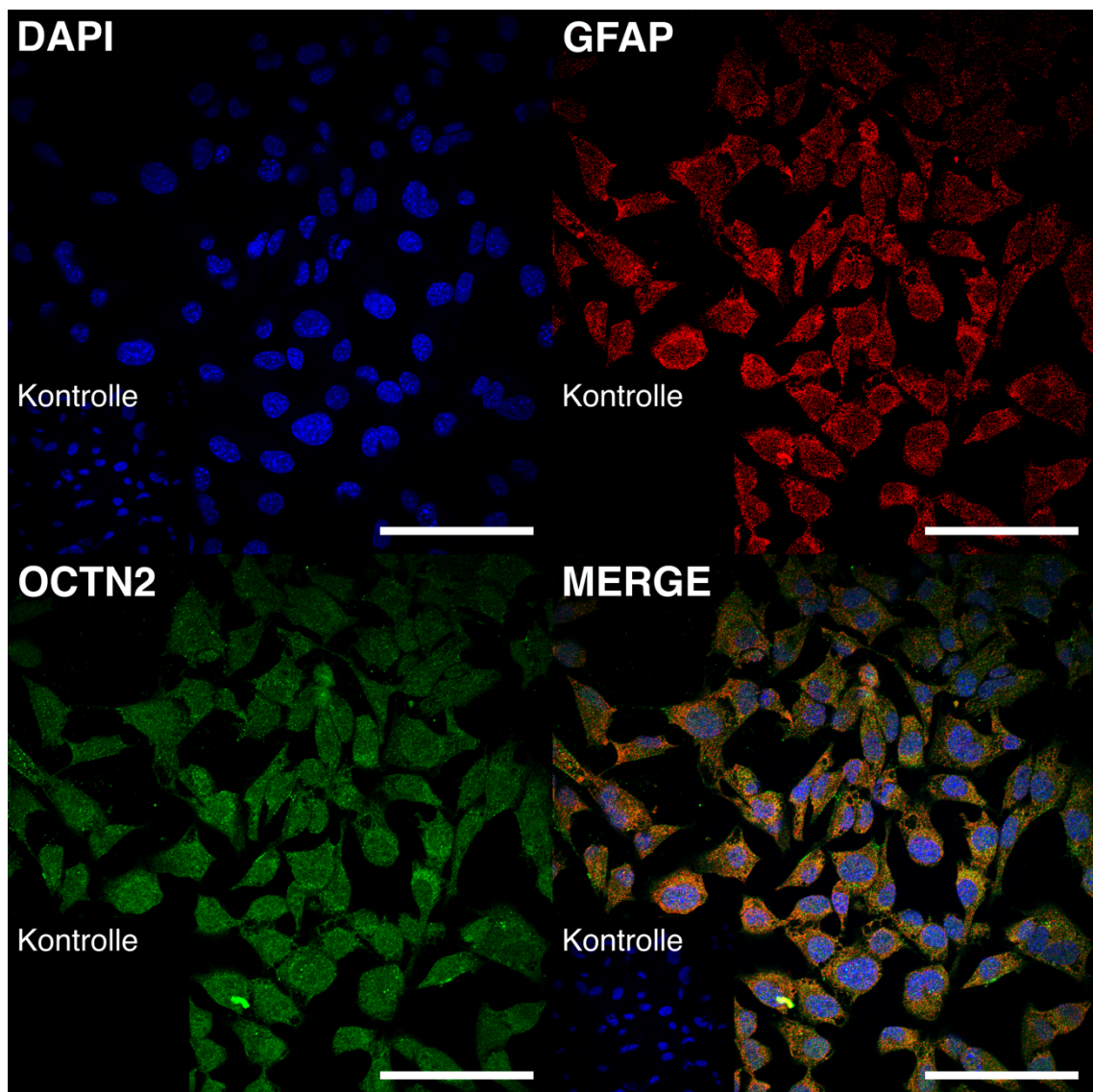


Abb. 16: Nachweis von GFAP und OCTN2 mittels Immunfluoreszenzfärbung in GL261 Zellen am konfokalen Laserscanning-Mikroskop. Unten links ist je Kachel die Kontrolle ohne primär Antikörperbehandlung und sonst gleichen Aufnahmebedingungen dargestellt. Balken entspricht 100 μm . Quelle: Eigene Darstellung (2023).

4.2.2 L-Carnitin vermittelte Effekte auf intrazelluläre Signalkaskaden in der Glioblastomzelllinie LN-18

Da *in vitro* Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe an der humanen Glioblastomzelllinie LN-18 eine viabilitätsfördernde Wirkung von L-Carnitin ergeben haben, sollte weiterführend geklärt werden, welche Signalkaskaden hierbei involviert sind. Zwei proliferationsfördernde Signalkaskaden, welche auch beim Glioblastom bekannte Bedeutung haben, werden über die Serin-Threonin-Kinase AKT1 und die *extracellular signal regulated kinase 1/2* (ERK1/2) vermittelt [132–134]. Mittels Western Blot wurde deren Aktivierungszustand durch Nachweis der phosphorylierten und dadurch aktivierten Kinasen mit Normalisierung auf den *Housekeeper* β -Actin (für die ERK1/2 Phosphorylierung) beziehungsweise das totale AKT1 (für die AKT1 Phosphorylierung) ermittelt. Untersucht wurden sowohl kurzfristige Wirkungen von L-Carnitin nach zehn und 30 Minuten als auch Effekte der Substanz nach sechs und 24 Stunden.

Ergebnisse

Bei der interexperimentellen Betrachtung der Wirkung von L-Carnitin auf die Phosphorylierung von ERK1/2 (vgl. Abb. 17) zeigten sich insgesamt recht hohe Standardabweichungen. Dadurch ergaben sich in der statistischen Testung keine signifikanten Wirkungen von L-Carnitin auf den Phosphorylierungsgrad von ERK1/2. Für den Zeitraum von zehn Minuten und 30

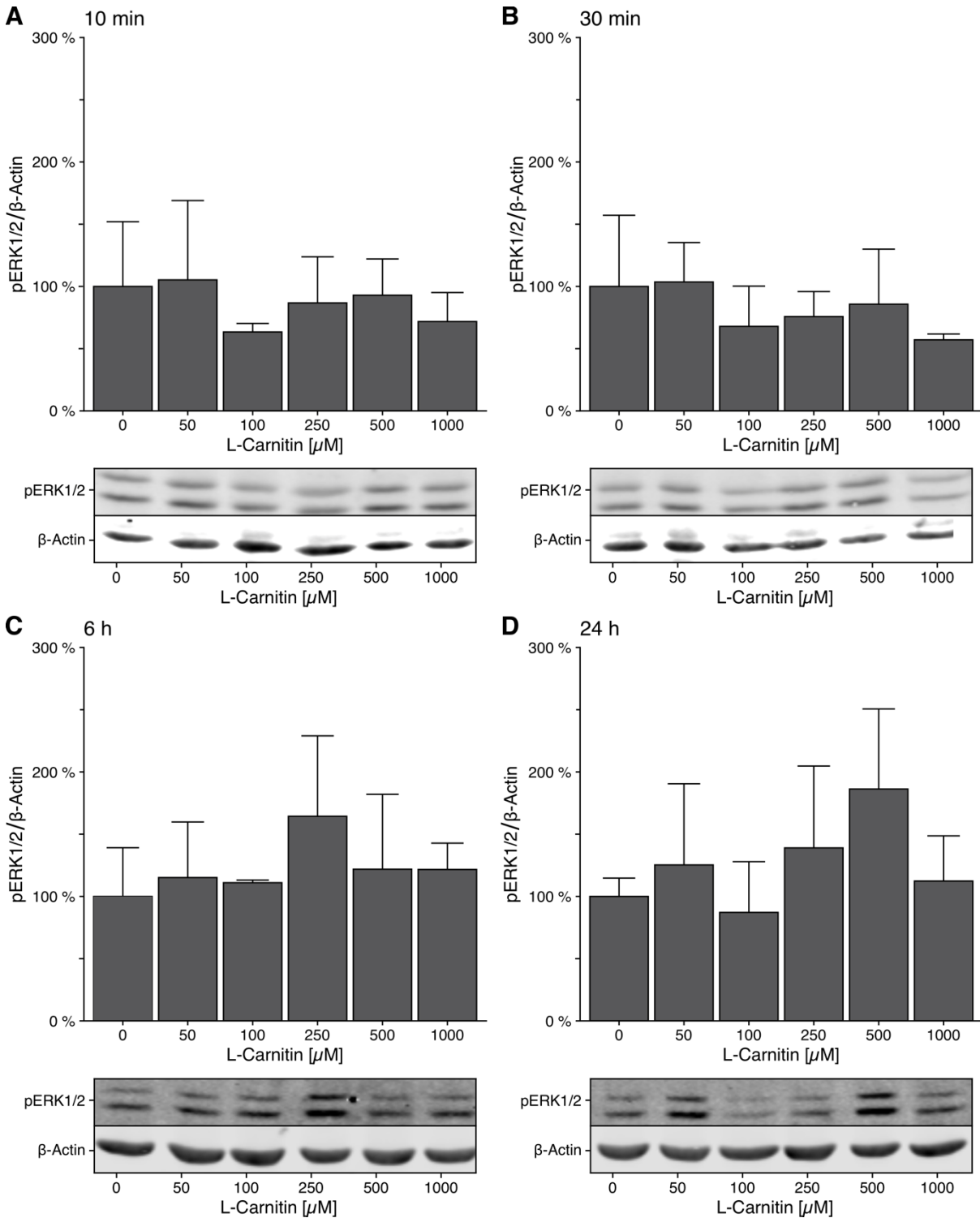


Abb. 17: Darstellung der Phosphorylierung der Kinasen ERK1/2 durch Nachweis der phosphorylierten Form (pERK1/2) mittels Western Blot und der zugehörigen Quantifizierung. Die Normalisierung erfolgte auf den Housekeeper β -Actin (Ladungskontrolle). Zur densitometrischen Auswertung der Signale wurde Image Studio Lite verwendet. Keine signifikanten Unterschiede in ANOVA. $n = 3$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Quelle: Eigene Darstellung (2023).

Minuten ließ sich allerdings tendenziell eine Verminderung der Phosphorylierung von ERK1/2 für L-Carnitin Konzentrationen von 100 μM und höher erkennen (vgl. Abb. 17 A, B). So betrug die relative Phosphorylierung der Kinasen ERK1/2 unter 100 μM L-Carnitin nach zehn Minuten und 30 Minuten 63 % (± 7 %) beziehungsweise 68 % (± 32 %) der Kontrolle. Nach 30 Minuten konnte zudem eine Abnahme der Phosphorylierung von ERK1/2 unter 1.000 μM L-Carnitin auf 57 % (± 5 %) vorgefunden werden. Es ließ sich jedoch keine klare dosis-abhängige Wirkung von L-Carnitin auf ERK1/2 nachweisen. Nach sechs Stunden konnte lediglich für 250 μM L-Carnitin eine tendenzielle Zunahme der ERK1/2 Phosphorylierung auf mit 164 % (± 65 %) beobachtet werden. Nach 24 Stunden Inkubation wurde für 250 μM und 500 μM L-Carnitin eine Erhöhung der ERK1/2 Phosphorylierung auf 139 % (± 66 %) beziehungsweise 186 % (± 64 %) beobachtet.

Die Analysen zur Wirkung von L-Carnitin in verschiedenen Konzentrationen auf die Phosphorylierung der Kinase AKT1 ließen für die Zeiträume nach zehn und 30 Minuten sowie sechs Stunden eine Verringerung der AKT1 Phosphorylierung erkennen (vgl. Abb. 18). Nach zehn Minuten Inkubation lag der Phosphorylierungsgrad von AKT1 unter Verwendung von 250 μM L-Carnitin bei 73 % (± 10 %) und war mit einem p-Wert von 0,043 signifikant niedriger als unter Kontrollbedingungen. Auch für 500 μM L-Carnitin ergab sich mit einer Reduktion der AKT1 Phosphorylierung auf 67 % (± 10 %) und einem p-Wert von 0,012 ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle. Darüber hinaus zeigte sich für die Konzentration von 1.000 μM L-Carnitin mit einer Abnahme der AKT1 Phosphorylierung auf 73 % (± 19 %) und einem p-Wert von 0,036 ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle. Nach 30 Minuten Inkubation ergab sich hingegen kein signifikanter Unterschied unter den eingesetzten L-Carnitin Konzentrationen bezüglich des AKT1 Phosphorylierungsstatus (vgl. Abb. 18 B).

Nach sechs Stunden Inkubation konnte für 250 μM L-Carnitin eine Reduktion der AKT1 Phosphorylierung auf 73 % (± 6 %) nachgewiesen werden, wobei dies mit einem p-Wert von 0,015 signifikant niedriger als die Kontrolle war. Auch für die Applikation von 1.000 μM L-Carnitin lag die AKT1 Phosphorylierung mit 77 % (± 7) und einem p-Wert von 0,033 signifikant niedriger als in der Kontrolle. Nach 24 Stunden Inkubation zeigte sich für L-Carnitin Konzentrationen von 50 bis 500 μM eine gleichwertige Phosphorylierung wie unter Kontrollbedingungen. Allerdings zeigte sich mit einem p-Wert von 0,003 eine signifikante Zunahme der Phosphorylierung der Kinase AKT1 unter der Inkubation mit 1.000 μM L-Carnitin mit einem Wert von 134 % (± 14 %) verglichen mit den Kontrollzellen.

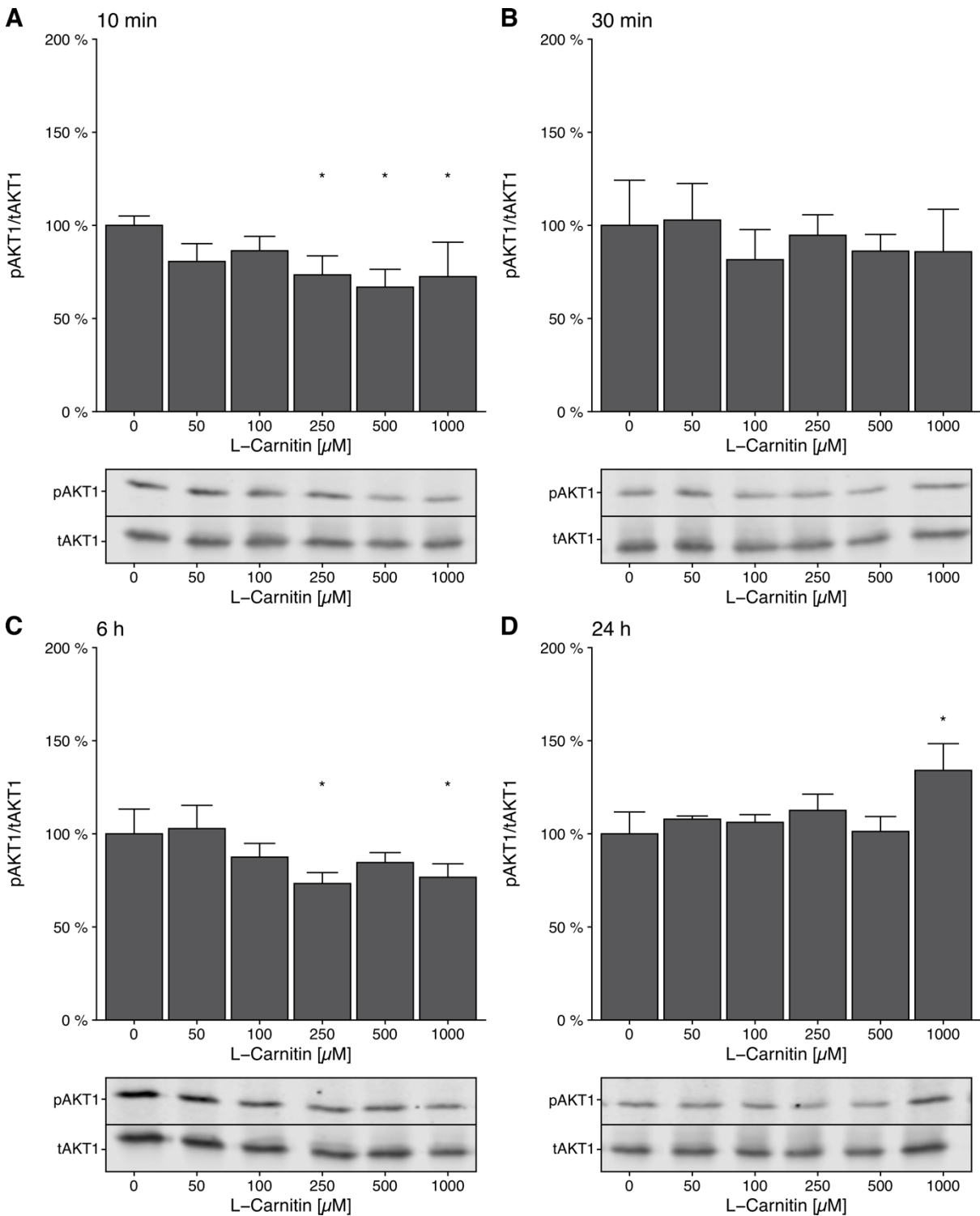


Abb. 18: Darstellung der Phosphorylierung der Kinase AKT1 durch Nachweis der phosphorylierten Form (pAKT1) mittels Western Blot und der zugehörigen Quantifizierung. Die Normalisierung erfolgte auf den totalen AKT1 Gehalt (tAKT1). Zur densitometrischen Auswertung der Signale wurde Image Studio Lite verwendet. ANOVA mit Dunnett Post-hoc-Test (* p-Wert < 0,05, n = 3). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Quelle: Eigene Darstellung (2023).

4.2.3 Einfluss von L-Carnitin auf die Apoptoseinduktion in LN-18 Zellen unter verschiedenen Stimuli

Da Vorversuche unserer Arbeitsgruppe in LN-18 Zellen gezeigt haben, dass L-Carnitin viabilitätsfördernde Effekte aufweist, sollte in der vorliegenden Arbeit überprüft werden, ob die

Applikation von L-Carnitin einer Apoptoseinduktion entgegenwirken kann. Zur Induktion von Apoptose wurden die LN-18 Zellen mit verschiedenen zytotoxischen Substanzen (Doxorubicin, Carmustin, Temozolomid, Vincristin, Wasserstoffperoxid), die teils im Rahmen einer antitumoralen Therapie eingesetzt werden, in An- oder Abwesenheit von L-Carnitin in verschiedenen Konzentrationen für 48 Stunden inkubiert. Durch die Gabe von Doxorubicin in drei verschiedenen Konzentrationen (100 μ M, 500 μ M, 1.000 μ M) zeigten sich unterschiedlich stark ausgeprägte Aktivierungen der Caspase-3 in LN-18 Zellen. Ohne Zugabe von L-Carnitin betrug die Caspase-3 Aktivierung für 100 μ M Doxorubicin 122 % (\pm 26%), für 500 μ M 272 % (\pm 72 %) und für 1.000 μ M 699 % (\pm 202%) verglichen mit den Kontrollzellen (100 %, Lösungsmittel-behandelt). Bei Inkubation der LN-18 Zellen mit 100 μ M Doxorubicin zeigte sich eine leichte Abnahme der relativen Caspase-3 Aktivität mit steigender Dosis von L-Carnitin Konzentration, die jedoch nicht statistisch signifikant war: 122 % (\pm 26 %) für 100 μ M Doxorubicin, 117 % (\pm 13 %) für 50 μ M L-Carnitin plus 100 μ M Doxorubicin, 108 % (\pm 7 %) für 100 μ M L-Carnitin plus 100 μ M Doxorubicin und 104 % (\pm 26 %) für 500 μ M L-Carnitin plus 100 μ M Doxorubicin. Bei 500 μ M und 1.000 μ M Doxorubicin konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der An- und Abwesenheit von L-Carnitin bei insgesamt höheren Standardabweichungen beobachtet werden (vgl. Abb. 19 A).

Bei der Untersuchung der Caspase-3 Aktivität bei gleichzeitiger Anwesenheit von 100 μ M Carmustin und L-Carnitin (vgl. Abb. 19 B) zeigte sich für 50 μ M L-Carnitin ein signifikant niedrigerer Wert (p -Wert: 0,028) der Caspase-3 Aktivierung von 124 % (\pm 15%) im Vergleich zu 182 % (\pm 20 %) bei den LN-18 Zellen, die nur mit 100 μ M Carmustin behandelt wurden. Für die gleichzeitige Applikation von 100 μ M beziehungsweise 500 μ M L-Carnitin war ebenfalls eine Reduktion der Carmustin-induzierten Caspase-3 Aktivierung zu verzeichnen, allerdings war dieser Effekt statistisch nicht signifikant: 130 % (\pm 15%) für 100 μ M L-Carnitin plus 100 μ M Carmustin und 144 % (\pm 2%) für 500 μ M L-Carnitin plus 100 μ M Carmustin. Für die Gabe von 250 μ M Carmustin zeigte sich eine geringere Caspase-3 Aktivität von 135 % (\pm 41 %) verglichen mit 182 % (\pm 20 %) für 100 μ M Carmustin. Für die zusätzliche Applikation von L-Carnitin konnte kein signifikanter Unterschied in der Caspase-3 Aktivität zur alleinigen Inkubation der LN-18 Zellen mit 250 μ M Carmustin nachgewiesen werden: 127 % (\pm 47 %) für 50 μ M L-Carnitin plus 250 μ M Carmustin, 168 % (\pm 63 %) für 100 μ M L-Carnitin plus 250 μ M Carmustin und 209 % (\pm 93 %) für 500 μ M L-Carnitin plus 250 μ M Carmustin (vgl. Abb. 19 B).

Die Behandlung der LN-18 Zellen mit 100 μ M Temozolomid löste keine Aktivierung der Caspase-3 aus und die verschiedenen L-Carnitin Konzentrationen zeigten ebenfalls nur

marginale Effekte mit Werten, die ähnlich den Kontrollzellen waren (vgl. Abb. 19 C). Durch die alleinige Gabe von 250 μM Temozolomid wurde hingegen eine Caspase-3 Aktivierung auf 240 % (± 146 %) erreicht. Bei ebenfalls insgesamt hohen Standardabweichungen ergab sich kein signifikanter Einfluss der zusätzlichen Applikation von L-Carnitin auf die Caspase-3 Aktivität: 261 % (± 142 %) für 50 μM L-Carnitin plus 250 μM Temozolomid, 287 % (± 134 %) für 100 μM L-Carnitin plus 250 μM Temozolomid, 239 % (± 94 %) für 500 μM L-Carnitin plus 250 μM Temozolomid.

Auch bei der Inkubation der LN-18 Zellen mit 10 nM Vincristin für 48 Stunden in An- und Abwesenheit von verschiedenen L-Carnitin Konzentrationen zeigte sich keine Änderung der Caspase-3 Aktivität im Vergleich zur Kontrolle und kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen (vgl. Abb. 19 D).

Bei der Inkubation von LN-18 Zellen mit 200 μM Wasserstoffperoxid wurde keine relevante Aktivierung der Caspase-3 beobachtet und die gleichzeitige Gabe der verschiedenen L-Carnitin

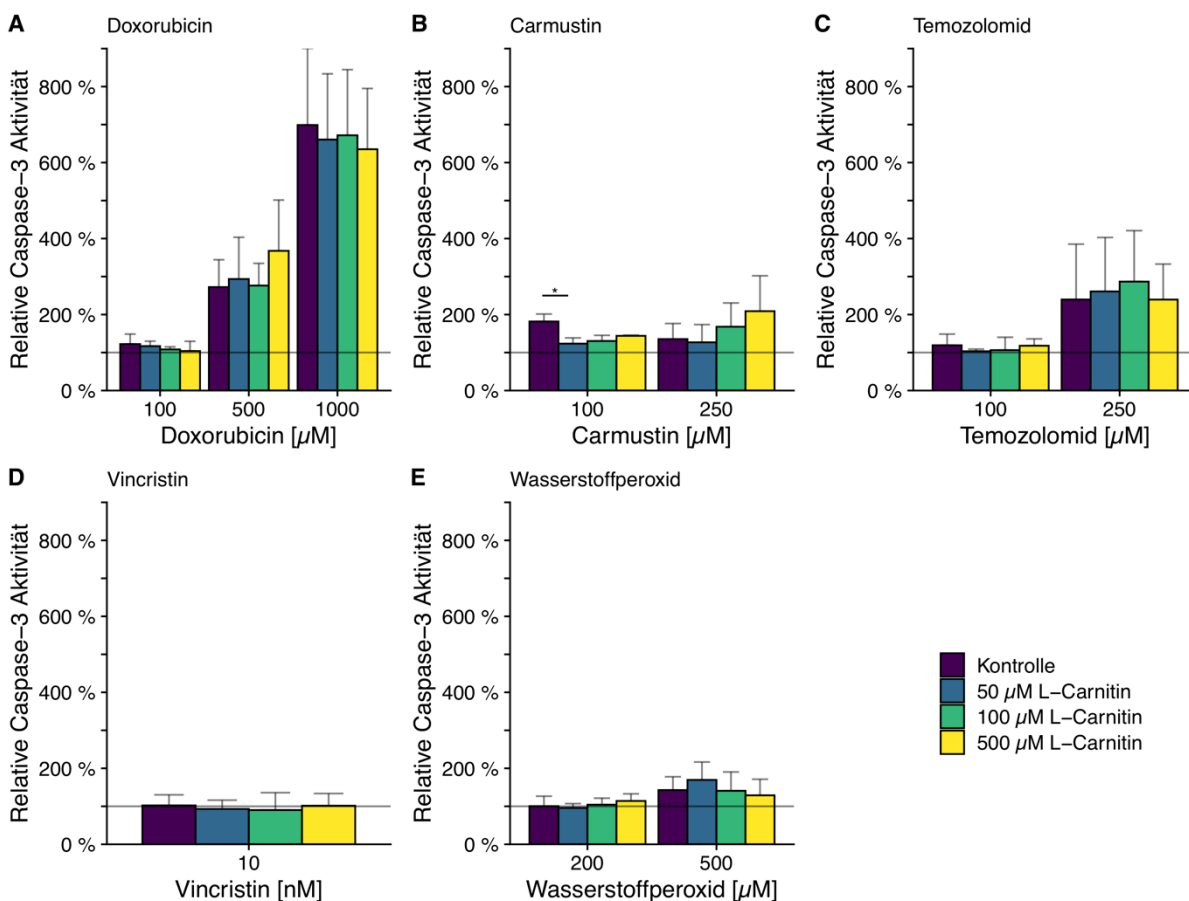


Abb. 19: Darstellung der Caspase-3 Aktivität. Die Caspase-3 Aktivität von LN-18 Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit Doxorubicin (A), Carmustin (B), Temozolomid (C), Vincristin (D) und Wasserstoffperoxid (E) in An- und Abwesenheit verschiedener Konzentrationen von L-Carnitin. Kruskal-Wallis-Test mit Dunns Post-hoc-Test (* p-Wert < 0,05, n = 5 für Lösungsmittelkontrolle, n = 4 für Wasserstoffperoxid, n = 3 für Doxorubicin, Carmustin, Temozolomid und Vincristin). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die durchgezogene waagerechte Linie stellt die Normierung auf 100 % (Lösungsmittelkontrolle) dar. Quelle: Eigene Darstellung (2023), adaptiert nach [95].

Konzentrationen wirkte sich ebenfalls nicht auf die Caspase-3 Aktivität aus (vgl. Abb. 19 E). Die Behandlung der LN-18 Zellen mit 500 μM Wasserstoffperoxid resultierte in einer geringfügig erhöhten Caspase-3 Aktivität, allerdings waren die Effekte nicht statistisch signifikant unterschiedlich zu den Kontrollzellen. Auch die zusätzliche Gabe von L-Carnitin zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Caspase-3 Aktivität. Die relativen Caspase-3 Aktivitätswerte betrugen 143 % (± 35 %) für die alleinige Applikation von 500 μM Wasserstoffperoxid, 170 % (± 47 %) für 50 μM L-Carnitin plus 500 μM Wasserstoffperoxid, 141 % (± 50 %) für 100 μM L-Carnitin plus 500 μM Wasserstoffperoxid und 129 % (± 42 %) für 500 μM L-Carnitin plus 500 μM Wasserstoffperoxid.

4.2.4 Einfluss von L-Carnitin auf die Migration von LN-18 Zellen und GL261 Zellen sowie primären Glioblastomzellen

Zur Untersuchung eines Einflusses von L-Carnitin auf die Migration von Glioblastomzellen wurden verschiedene Glioblastomzellmodelle (murine GL261, humane LN-18 und primäre Zellen) eingesetzt und mit steigenden Konzentrationen L-Carnitin stimuliert und die Migration nach 16 h und 24 h mittels Wundheilungs-Assay (*Scratch-Assay*) analysiert.

Die Migration von LN-18 Zellen nach 16 h (vgl. Abb. 20 A) lag unter Kontrollbedingungen (ohne L-Carnitin) bei 33,0 % ($\pm 7,6$ %). Eine ähnliche Migrationsrate zeigte sich bei Applikation von für 10 μM und 100 μM L-Carnitin mit 32,7 % ($\pm 10,4$ %) beziehungsweise 32,1 % ($\pm 7,9$ %). Lediglich bei der Zugabe von 50 μM L-Carnitin ergab sich eine im Mittel höhere Migrationsrate von 36,4 % ($\pm 9,6$ %), wobei dieser Effekt gegenüber der Kontrolle nicht signifikant war. Nach 24 h (vgl. Abb. 20 B) zeigte sich bei den LN-18 Kontrollzellen eine Migration von 45,0 % ($\pm 8,5$ %), die ähnlich hoch lag wie bei der Inkubation mit 50 μM L-Carnitin mit 46,5 % ($\pm 9,1$ %). Für die Applikation von 10 μM und 100 μM L-Carnitin ergaben sich jeweils geringfügig verringerte Migrationsraten von 40,4 % ($\pm 6,9$ %) und 41,5 % ($\pm 8,4$ %). Auch hier war der Effekt jedoch nicht statistisch signifikant unterschiedlich zu den Kontrollzellen. Die in Abb. 20 C dargestellten mikroskopischen Beispielaufnahmen zeigen die Ergebnisse exemplarisch für die Kontrollzellen.

Die primären Glioblastomzellen zeigten ein ähnliches Migrationsverhalten wie die LN-18 Zellen. Nach 16 h (vgl. Abb. 20 D) betrug die Migrationsrate der Kontrollzellen (ohne L-Carnitin) bei 39,6 % ($\pm 10,0$ %). Die Inkubation der primären Zellen mit 10 μM , 50 μM und 100 μM L-Carnitin führte ebenfalls zu keiner signifikant veränderten Migrationsrate mit mittleren Werten von 36,9 % ($\pm 6,7$ %), 35,8 % ($\pm 5,0$ %) und 39,2 % ($\pm 7,4$ %). Nach 24 h (vgl. Abb. 20 E) betrug die Migrationsrate der Kontrollzellen (ohne L-Carnitin) 39,1 % ($\pm 11,1$ %). Die Inkubation der primären Glioblastomzellen für 24 h mit 10 μM , 50 μM und 100 μM L-Carnitin resultierte in ähnlichen Migrationsraten von 38,7 % ($\pm 11,2$ %), 38,7 % ($\pm 12,7$ %) und 39,0 %

($\pm 10,5\%$). Während bei den LN-18 Zellen eine Steigerung der Migration von 16 zu 24 Stunden erkennbar war, trat eine Migrationszunahme bei den primären Glioblastomzellen nach 24 h im Vergleich zu den 16 h-Werten nicht auf.

Direkt augenscheinlich ist eine deutlich niedrigere Migrationsrate der untersuchten murinen GL261 Zellen. Hier ergab sich nach 16 h (vgl. Abb. 20 G) bei den Kontrollzellen (ohne L-Carnitin) eine Migrationsrate von $3,3\%$ ($\pm 1,9\%$). Für die Inkubation der GL261 Zellen mit $10\ \mu\text{M}$ und $50\ \mu\text{M}$ L-Carnitin stieg die Migrationsrate im Mittel auf $4,7\%$ ($\pm 1,8\%$) beziehungsweise $4,2\%$ ($\pm 2,6\%$) an, jedoch war dieser Effekt nicht statistisch signifikant. Die Applikation von

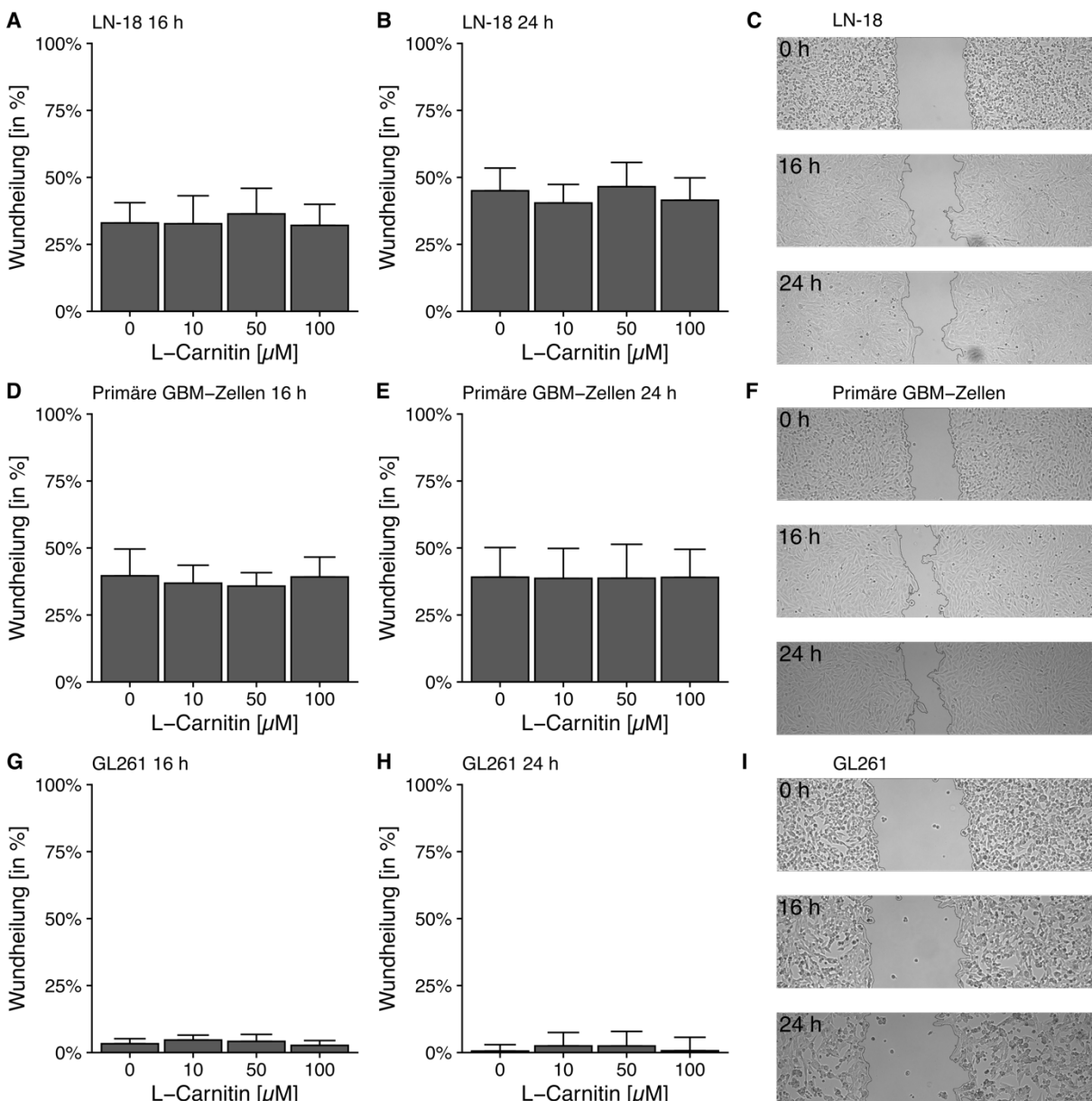


Abb. 20: Migration von Glioblastomzellen nach Behandlung mit L-Carnitin. Zur Bestimmung der migratorischen Aktivität von LN-18 Zellen (A-C), primären Glioblastom Zellen (D-F) und murinen GL261 Zellen (G-I) unter dem Einfluss von L-Carnitin (10 , 50 und $100\ \mu\text{M}$) wurde ein Wundheilungs-Assay (*Scratch-Assay*) durchgeführt. Die Migrationsrate wurde nach $16\ \text{h}$ und $24\ \text{h}$ anhand des Wundverschlusses (angegeben in %) der mikroskopischen Aufnahmen im Vergleich zum $0\ \text{h}$ Wert berechnet. Keine signifikanten Unterschiede in ANOVA. $n = 3$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Quelle: Eigene Darstellung (2023).

100 μM L-Carnitin war hingegen mit einer leichten Reduktion der Migrationsrate auf 2,7 % ($\pm 1,8$ %). Für 24 h (vgl. Abb. 20 H) ergab sich bei den Kontrollzellen (ohne L-Carnitin) eine Migrationsrate von lediglich 0,6 % ($\pm 2,4$ %). Die Inkubation der GL261 Zellen mit 10 μM und 50 μM L-Carnitin steigerte die Migrationsrate im Mittel auf einen Wert von 2,5 % ($\pm 5,0$ %) beziehungsweise 2,5 % ($\pm 5,4$ %), während die Migrationsrate der mit 100 μM L-Carnitin behandelten Zellen auf Kontrollniveau bei 0,7 % ($\pm 5,0$ %) lag. Bei den GL261 Zellen ergab sich also eine insgesamt sehr geringe Migration mit einer zunächst nicht plausibel erscheinenden Reduktion nach 24 h. Die Inspektion der beispielhaft ausgewählten mikroskopischen Aufnahmen (vgl. Abb. 20 I) erklären diese Resultate teilweise. Nach 24 h zeigte sich für die GL261 Zellen eine Abnahme der individuellen Zellgröße und teilweise apoptotische Zellen, sodass es aus nicht näher geklärten Gründen zum Absterben der Zellen kam und somit nur eine sehr geringe Migration der Zellen nachweisbar war.

Nachfolgend wurde untersucht, inwiefern die bei der Therapie des Glioblastoms eingesetzten Zytostatika Temozolomid und Carmustin sowie Etomoxir als Inhibitor der β -Oxidation die Migration von LN-18 Zellen beeinflussen und ob L-Carnitin hier modulierende Effekte besitzt. Im Rahmen dieser Versuchsreihe zeigte sich schon unter den Kontrollbedingungen mit der zusätzlichen Zugabe von DMSO als Lösungsmittel der genannten Substanzen eine im Vergleich zu den vorherigen Experimenten (vgl. Abb. 20) stärker ausgeprägte Migration. Hier betrug die Migrationsrate ohne die Zugabe von L-Carnitin (Abb. 21) 75,3 % ($\pm 5,7$ %). Für die Inkubation der Zellen mit 50 μM , 100 μM und 250 μM L-Carnitin wurden Migrationsraten von 79,0 % ($\pm 10,3$ %), 79,8 % ($\pm 14,3$ %) und 80,1 % ($\pm 9,9$ %) beobachtet. Dabei ließ sich zwischen den genannten Substanzbehandlungen kein signifikanter Unterschied feststellen.

Bei Zugabe von 250 μM Temozolomid (vgl. Abb. 21) ergab sich eine geringere Migrationsrate von 65,5 % ($\pm 8,5$ %) verglichen mit 75,3 % ($\pm 5,7$ %) der Kontrollzellen. Die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit Temozolomid und 50 μM oder 100 μM L-Carnitin führte zu einer leichten Erhöhung der mittleren Migrationsrate auf 71,2 % ($\pm 11,1$ %) beziehungsweise 68,3 % ($\pm 9,2$ %), jedoch waren die Unterschiede nicht signifikant. Bei zusätzlicher Applikation von 250 μM L-Carnitin lag die Migrationsrate im Mittel hingegen ähnlich niedrig bei 64,7 % ($\pm 10,1$ %) wie bei alleiniger Temozolomidgabe 65,5 % ($\pm 8,5$ %).

Auch bei der Inkubation der LN-18 Zellen mit 100 μM Carmustin (vgl. Abb. 21) konnte eine leichte Reduktion der Migrationsrate auf 66,8 % ($\pm 8,3$ %) verglichen mit 75,3 % ($\pm 5,7$ %) der Kontrollzellen nachgewiesen werden. Die zusätzliche Gabe von 50 μM , 100 μM beziehungsweise 250 μM L-Carnitin resultierte in keinem signifikanten Anstieg der Migrationsrate auf 68,8 % ($\pm 8,6$ %), 70,4 % ($\pm 8,1$ %) und 68,7 % ($\pm 8,9$ %).

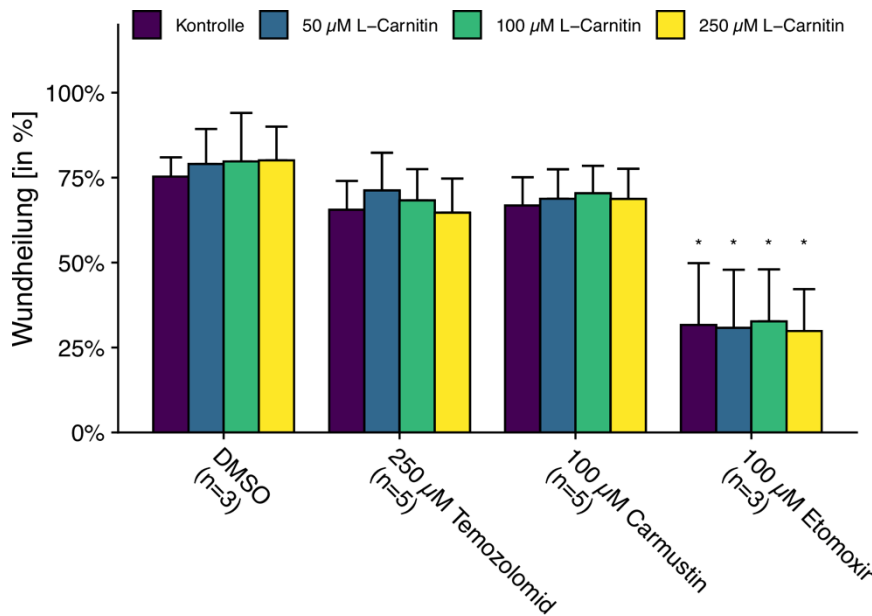


Abb. 21: Migration von LN-18 Zellen unter Einfluss von Temozolomid, Carmustin und Etomoxir in An- und Abwesenheit von L-Carnitin. Zur Bestimmung der migratorischen Aktivität von LN-18 Zellen wurden die Zellen für 24 h mit 250 µM Temozolomid, 100 µM Carmustin oder 100 µM Etomoxir in An- und Abwesenheit von L-Carnitin (50, 100 und 250 µM) behandelt und ein Wundheilungs-Assay (*Scratch-Assay*) durchgeführt. Die migratorische Aktivität wurde anhand des Wundverschlusses (angegeben in %) der mikroskopischen Aufnahmen im Vergleich zum 0-h-Wert berechnet. ANOVA mit Tukey Post-hoc-Test (* p-Wert < 0,05, n = 3 für DMSO und Etomoxir, n = 5 für Temozolomid und Carmustin). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung. Quelle: Eigene Darstellung (2023), adaptiert nach [95].

Der stärkste Effekt auf die Migration von LN-18 Zellen wurde durch die Applikation von Etomoxir, der durch irreversible Hemmung der CPT-1 die β -Oxidation blockiert, hervorgerufen. Durch die Gabe von 100 µM Etomoxir wurde eine im Vergleich zur Migrationsrate von 75,3 % ($\pm 5,7$ %) der Kontrollzellen eine stark reduzierte Migrationsrate von 31,7 % ($\pm 18,2$ %) erreicht. Die zusätzliche Behandlung mit 50 µM, 100 µM beziehungsweise 250 µM L-Carnitin zeigte keinen Einfluss auf die durch Etomoxir verminderte Migrationsrate der LN-18 Zellen: 30,8 % ($\pm 17,1$ %) für 50 µM L-Carnitin plus 100 mM Etomoxir, 32,7 % ($\pm 15,3$ %) für 100 µM L-Carnitin plus 100 mM Etomoxir und 29,9 % ($\pm 12,4$ %) 250 µM L-Carnitin plus 100 mM Etomoxir. Zusammenfassend zeigte sich hauptsächlich ein hemmender Effekt auf die Migration durch Etomoxir aber hingegen wenig Beeinflussung durch L-Carnitin Konzentrationen.

4.2.5 Einfluss von L-Carnitin, Meldonium und Etomoxir auf die Zellviabilität und Zellvitalität von LN-18 und GL261 Glioblastomzellen

Zur Untersuchung der Bedeutung von L-Carnitin, OCTN2 und β -Oxidation auf das Wachstumsverhalten von Glioblastomzellen wurden verschiedene Zellkulturexperimente in humanen LN-18 Zellen und murinen GL261 Zellen durchgeführt, die im Folgenden erläutert werden.

Bei der Messung der Zellviabilität mittels der Resazurinmethode in LN-18 Zellen, welche in 0,05 % FCS-haltigem DMEM Medium inkubiert wurden, konnte eine signifikante Reduktion der Zellviabilität bei der Hinzugabe von Meldonium und Etomoxir gegenüber der

Kontrollgruppe (Abb. 22 A) erzielt werden. Durch 25 μM Meldonium wurde die Zellviabilität nach einer 72 h Inkubation auf 89,2 % ($\pm 6,6$ %) der Kontrollgruppe signifikant reduziert (p-Wert: 0,038). Durch Etomoxir wurde die Viabilität der LN-18 Zellen nach 72 h auf 86,7 % ($\pm 14,1$ %) signifikant vermindert (p-Wert: 0,033).

Bei zusätzlicher Gabe von 50 μM L-Carnitin wurde die durch Meldonium oder Etomoxir hervorgerufene Abnahme der Zellviabilität wieder aufgehoben und es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied mehr zur Kontrolle. Ergänzt wurden die Untersuchungen durch den Kristallviolett-Assay, welches als indirektes Maß für die Zellzahl weitestgehend um die Kontrolle schwankende Werte ohne erkennbare Effekte der einzelnen Substanzen zeigte. Lediglich für die Kombination aus 100 μM L-Carnitin und 25 μM Meldonium ergab sich eine Erhöhung auf 116,0 % ($\pm 7,6$ %), wobei dieser Unterschied gegenüber der Kontrolle nicht signifikant war (p-Wert: 0,138).

Im Gegensatz zu den aufgetretenen Effekten von L-Carnitin, Meldonium und Etomoxir in LN-18 Zellen konnte unter gleichen Kultivierungsbedingungen (0,05 % FCS-haltiges DMEM Medium) in GL261 Zellen kein signifikanter Einfluss der genannten Substanzen beobachtet werden. Etomoxir bewirkte eine geringfügige Verminderung von Zellviabilität und Zellzahl, was durch die Hinzugabe von L-Carnitin revertiert wurde, aber statistisch nicht signifikant war (vgl. Abb. 23).

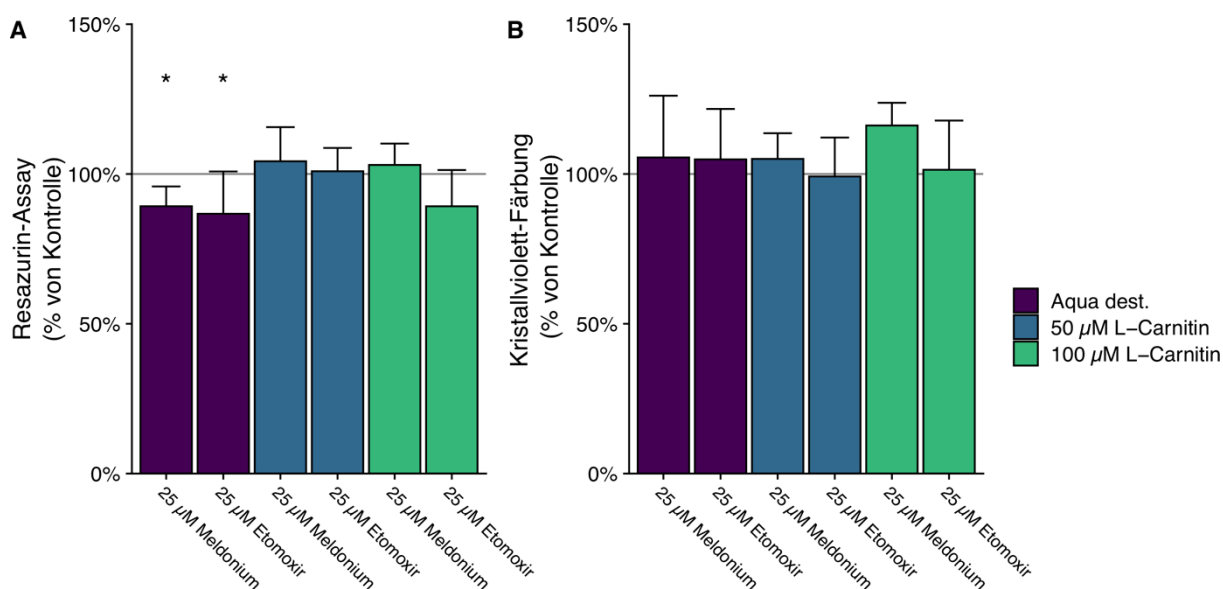


Abb. 22: Viabilität (Resazurin-Assay) und Vitalität (Kristallviolett-Färbung) von LN-18 Zellen in 0,05 % FCS-haltigem DMEM-Medium nach Applikation von Meldonium oder Etomoxir in An- und Abwesenheit von L-Carnitin. Die Zellen wurden für 72 h mit 25 μM Meldonium oder 25 μM Etomoxir in An- bzw. Abwesenheit von L-Carnitin (50 und 100 μM) kultiviert. Anschließend wurden Resazurin-Assay (A) und Kristallviolett-Färbung (B) durchgeführt. Kruskal-Wallis-Test mit Dunns Post-hoc-Test (* p-Wert < 0,05, n = 4). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Quelle: Eigene Darstellung (2023).

Ergebnisse

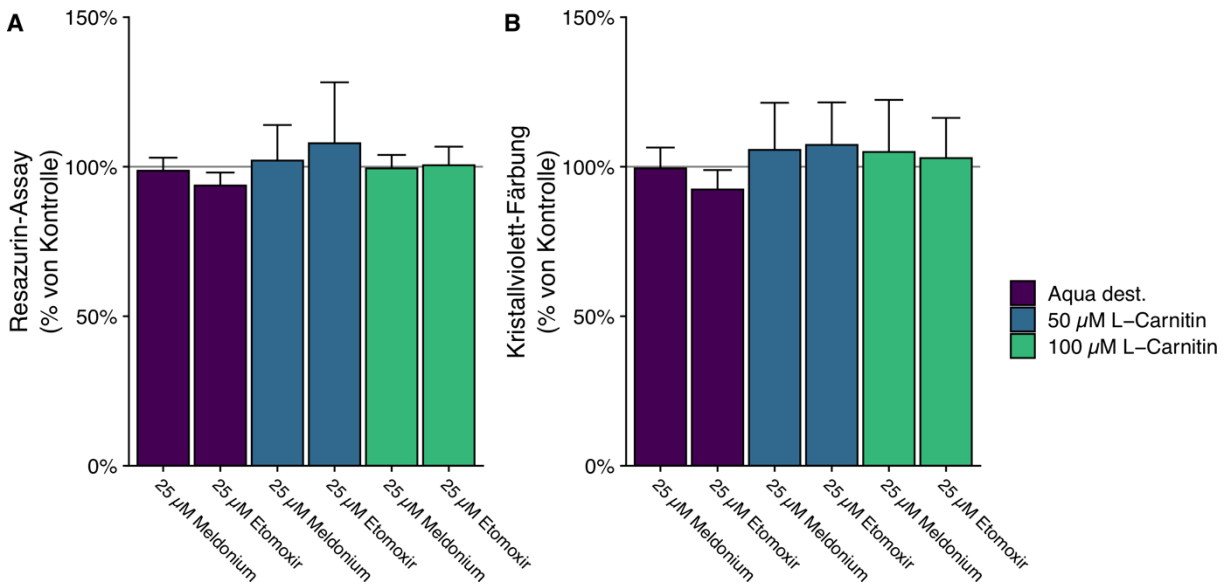


Abb. 23: Viabilität (Resazurin-Assay) und Vitalität (Kristallviolett-Färbung) von GL261 Zellen in 0,05 % FCS-haltigem DMEM-Medium nach Applikation von Meldonium oder Etomoxir in An- und Abwesenheit von L-Carnitin. Die Zellen wurden für 72 h mit 25 µM Meldonium oder 25 µM Etomoxir in An- bzw. Abwesenheit von L-Carnitin (50 und 100 µM) kultiviert. Anschließend wurden Resazurin-Assay (A) und Kristallviolett-Färbung (B) durchgeführt. Keine signifikanten Unterschiede. Kruskal-Wallis-Test mit Dunns Post-hoc-Test. n = 4. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung. Quelle: Eigene Darstellung (2023).

Anschließend wurde der gleiche Versuchsablauf in 0,05 % FCS-haltigem MEM Medium, welches im Gegensatz zum DMEM Medium mit 4.500 mg/l Glukose hingegen nur 1.000 mg/l Glukose enthält, durchgeführt, um zu überprüfen, ob Meldonium und Etomoxir unter nährstoffärmeren Kultivierungsbedingungen in GL261 Zellen einen Effekt verursachen. Interessanterweise ergaben sich unter diesen Konditionen andere Substanzeffekte (vgl. Abb. 24).

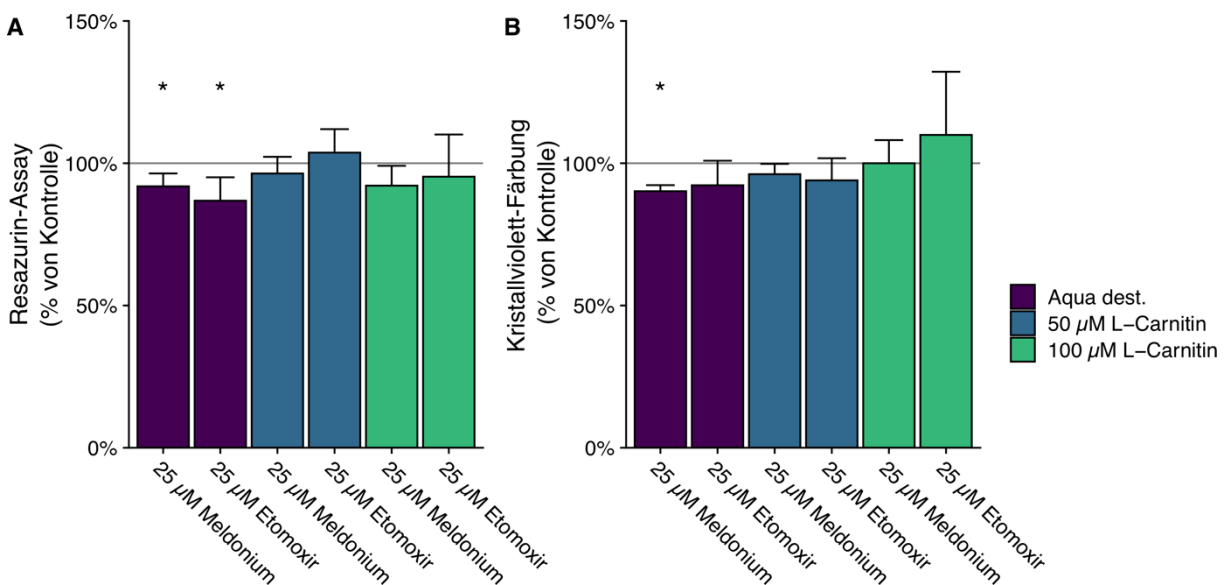


Abb. 24: Viabilität (Resazurin-Assay) und Vitalität (Kristallviolett-Färbung) von GL261 Zellen in 0,05 % FCS-haltigem MEM-Medium nach Applikation von Meldonium oder Etomoxir in An- und Abwesenheit von L-Carnitin. Die Zellen wurden für 48 h mit 25 µM Meldonium oder 25 µM Etomoxir in An- bzw. Abwesenheit von L-Carnitin (50 und 100 µM) kultiviert. Anschließend wurden Resazurin-Assay (A) und Kristallviolett-Färbung (B) durchgeführt. Kruskal-Wallis-Test mit Dunns Post-hoc-Test (* p-Wert < 0,05, n = 4). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung. Quelle: Eigene Darstellung (2023).

Die Behandlung der GL261 Zellen mit Meldonium und Etomoxir in An- und Abwesenheit von L-Carnitin bei Verwendung des glukoseärmeren Mediums (MEM Medium) ergab ähnliche Effekte wie für LN-18 Zellen bei Kultivierung im glukosereichen DMEM-Medium. Bei der Zellviabilität zeigte sich bei der alleinigen Zugabe von Meldonium oder Etomoxir jeweils eine geringe, aber statistisch signifikante Reduktion gegenüber der Kontrolle auf 91,9 % (\pm 4,5 %) für Meldonium (p-Wert: 0,033) und 86,8 % (\pm 8,2 %) für Etomoxir (p-Wert: 0,038) nach 48 h Inkubationsdauer. Bei der zusätzlichen Applikation von 50 μ M L-Carnitin kam es zu einer Revertierung der durch Meldonium und Etomoxir ausgelösten Viabilitätsabnahme der GL261 Zellen, jedoch konnte dies nicht für Inkubation mit 100 μ M L-Carnitin verzeichnet werden (vgl. Abb. 24 A). Die Zellzahl, ermittelt durch Färbung der Zellen mit Kristallviolett, zeigte unter der Gabe von 25 μ M Meldonium ebenfalls eine signifikante Reduktion (p-Wert: 0,016) gegenüber der Kontrolle auf 90,2 % (\pm 2,2 %). Auch unter Etomoxir konnte eine Abnahme der relativen Zellzahl auf 92,3 % (\pm 8,6 %) beobachtet werden, jedoch erreichte dieser Unterschied keine Signifikanz gegenüber der Kontrolle (p-Wert: 0,069). Durch die zusätzliche Gabe von 50 μ M L-Carnitin konnte die relative Zellzahl nicht erhöht werden. Unter 100 μ M L-Carnitin konnte hingegen eine Revertierung der durch Meldonium und Etomoxir verursachten Reduktion der Zellzahl bewirkt werden und ergab keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle (vgl. Abb. 24 B).

4.3 Tierexperimentelle Ergebnisse

4.3.1 Wirkung von L-Carnitin, Etomoxir und Meldonium auf das *in vivo* Tumorwachstum im orthotopen Glioblastommodell in C57BL/6 Wildtyp Mäusen

Zur Überprüfung einer potentiellen Bedeutung von L-Carnitin, OCTN2 und β -Oxidation für die Glioblastomprogression *in vivo* wurde ein orthotopes Mausmodell mit stereotaktischer Implantation von murinen GL261 Glioblastomzellen in das Gehirn der Mäuse verwendet. In Abb. 25 sind mikroskopische Aufnahmen der murinen GL261 Zellen dargestellt. Der detaillierte Versuchsablauf und seine vier Behandlungsarme (Kontrolle, Carnitin, Etomoxir und

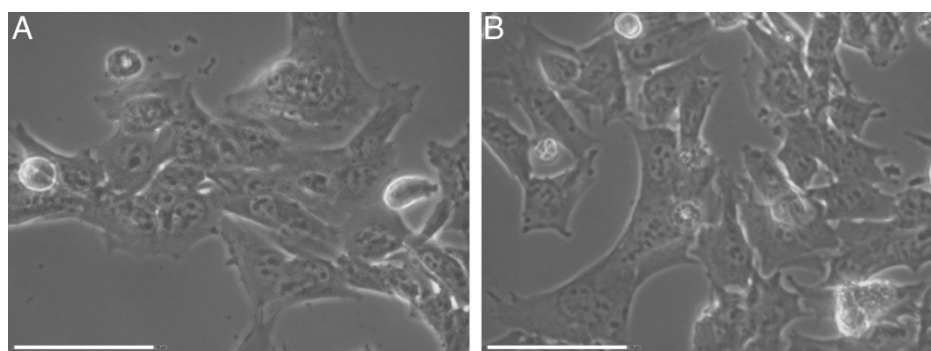


Abb. 25: Darstellung exemplarischer lichtmikroskopischer Aufnahmen der zur stereotaktischen Tumorzellimplantation und Tumorinduktion genutzten GL261 Zellen. (A) zeigt für die Injektion genutzte GL261 Zellen, die für die tatsächliche Tumorzellinjektion genutzt wurden. (B) präsentiert GL261 Zellen, welche ungeöffnet als Kontrolle unter gleichen Bedingungen mitgeführt wurden. Der weiße Balken entspricht 75 μ m. Quelle: Eigene Darstellung (2023).

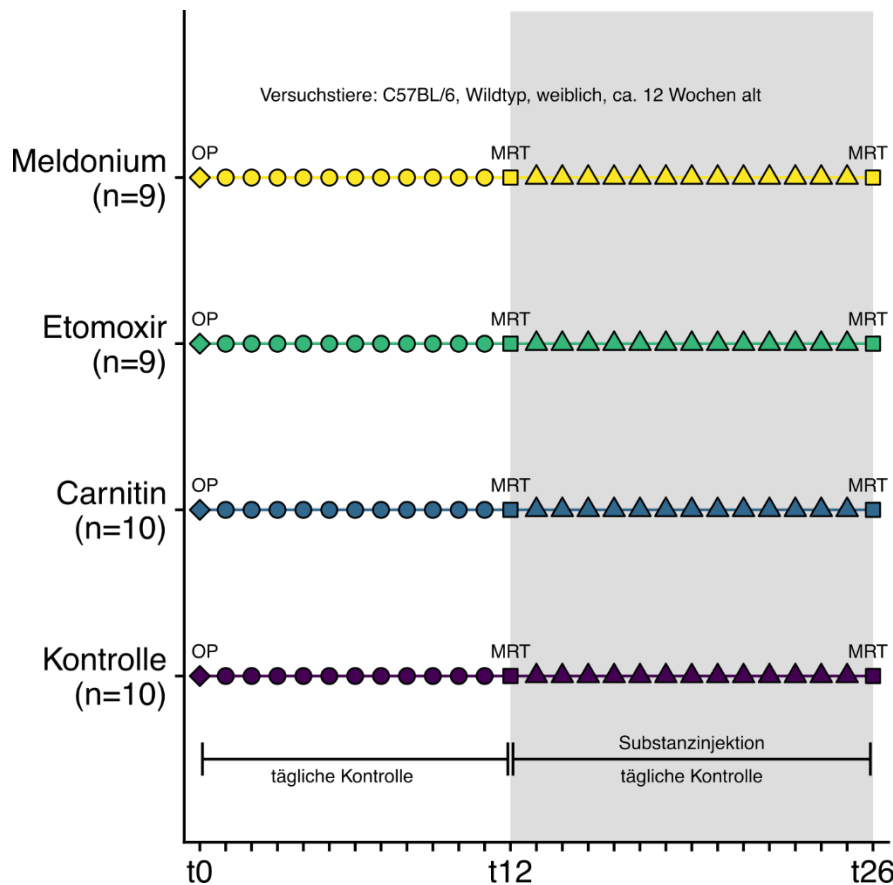


Abb. 26: Vierarmiges Versuchsdesign für das orthotopie Hirntumormodell in C57BL/6 Wildtyp Mäusen. t0 bis t26 bezeichnen die Versuchstage. OP: operative stereotaktische Implantation von murinen GL261 Zellen zur Tumorinduktion. MRT: Magnetresonanztomographie. Quelle: Eigene Darstellung (2023).

Meldonium) sind übersichtlich in Abb. 26 dargestellt. Nach der stereotaktischen Tumorzellimplantation an Tag 0 (t0) wurden tägliche Kontrollen der Tiere durchgeführt. Es erfolgte stets eine mikroskopische Kontrolle der für die Tumorzellimplantation eingesetzten GL261 Zellen hinsichtlich Kontaminationen und Wachstumsverhalten (vgl. Abb. 25). Zwischen den beiden MRT-Untersuchungen (t12, t26) wurden die Substanzen (L-Carnitin, Meldonium oder Etomoxir) täglich intraperitoneal injiziert.

In der Kontrollgruppe konnten 10, in der Carnitingruppe 10, in der Etomoxirgruppe 9 und in der Meldoniumgruppe 9 Tieren eingeschlossen und analysiert werden, sodass insgesamt 38 Tiere in den Versuch eingegangen sind.

Entsprechend der Vorgaben und Planungen zum Tierwohl wurden die Mäuse regelmäßig hinsichtlich Gewichtsveränderungen, Allgemeinzustand und Verhalten beurteilt. Ein daraus erstellter Punktescore (vgl. Tab. 21, S. 49) stellt die individuelle Belastung des Versuchstieres dar. Bei einem Punktescore von ≥ 20 wären Versuchstiere zur Vermeidung übermäßiger Belastung vorzeitig getötet worden. Dies kam in keinem der vier Versuchsarme vor. In Abb. 27 sind die erfassten Parameter zur Belastung der Versuchstiere zusammenfassend dargestellt.

Über alle Gruppen hinweg kam es zu einer geringfügigen Belastung hinsichtlich des Körpergewichts. So zeigten 34/38 Tieren (89,5 %) zu mindestens einem Zeitpunkt des Versuches eine Gewichtsabnahme im Vergleich zum Ausgangsgewicht. 33/38 Tieren (86,8 %) hatten zu mindestens einem Zeitpunkt im Versuchsablauf eine Körpergewichtsreduktion von weniger als 5 % des Ausgangsgewichts. 18/38 Tieren (47,4 %) hatten zu mindestens einem Zeitpunkt im Versuchsablauf eine Körpergewichtsreduktion von 5 bis 10 % des Ausgangsgewichts. 5/38 Tieren (13,2 %) hatten zu mindestens einem Zeitpunkt im Versuchsablauf eine Körpergewichtsreduktion von 11 bis 20 % des Ausgangsgewichts. Eine Körpergewichtsreduktion von mehr als 20 % kam nicht vor. Der Gesamtscore lag an t26 in der Kontrollgruppe im Mittel bei 3,9 ($\pm 5,55$), in

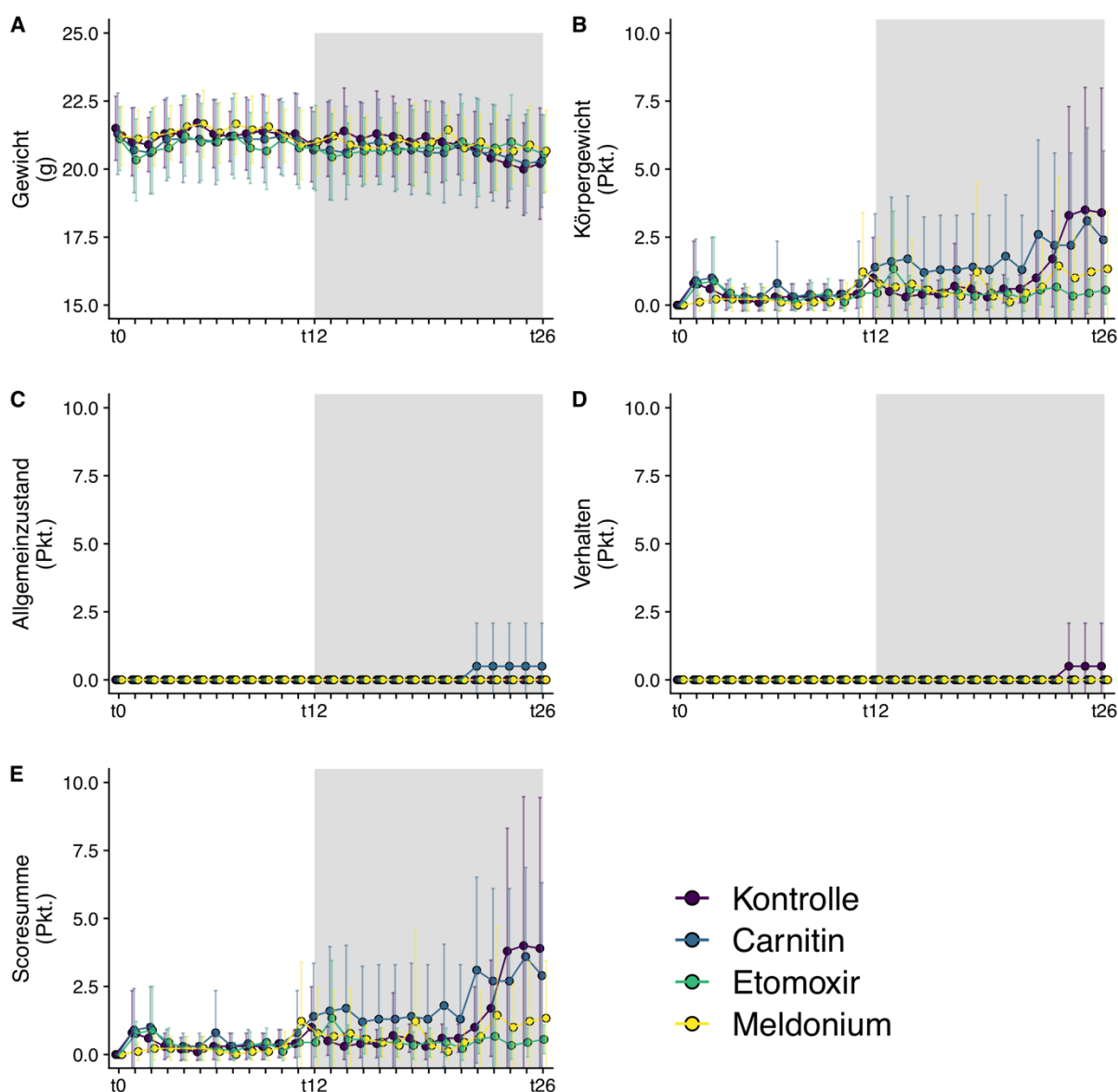


Abb. 27: Darstellung des Belastungsgrades der C57BL/6 Wildtyp Mäuse im vierarmigen Versuchsdesign. Dargestellt sind gemittelte Werte für das Gewicht (A) sowie die Belastungsscores zum Körpergewicht (B), zum Allgemeinzustand (C), zu Verhaltensauffälligkeiten (D) und die Summe der einzelnen Belastungsscores (E) für die jeweiligen Versuchsarme (Kontrolle, Carnitin, Etomoxir, Meldonium). Die Tage mit Substanzinjektionen sind grau hinterlegt. Die Versuchstage auf der x-Achse nehmen nur ganzzahlige Werte an, zu Illustrationszwecken erfolgt die Darstellung mit leichten Abweichungen vom ganzzahligen Wert. Quelle: Eigene Darstellung (2023).

der Carnitingruppe bei $2,9 (\pm 3,41)$, in der Etomoxirgruppe bei $0,56 (\pm 0,53)$ und in der Meldoniumgruppe bei $1,33 (\pm 2,12)$.

Über alle Gruppen hinweg gab es nur äußerst selten Auffälligkeiten hinsichtlich des Verhaltens oder des Allgemeinzustandes (vgl. Abb. 27). Lediglich 1/38 Tieren (2,6 %) in der mit Carnitin behandelten Gruppe zeigte ab t22 bis t26 eine leichte Auffälligkeit des Allgemeinzustandes (stumpfes, ungeordnetes Fell). Bezüglich des Verhaltens trat bei 1/38 Tieren (2,6 %) von t24 bis t26 in der Kontrollgruppe eine leichte Auffälligkeit auf (eingeschränkte Motorik). Die Tumorinduktion, MRT-Untersuchungen und täglichen Kontrollen und Injektionen wurden gut toleriert.

Vergleicht man den Belastungsscore und das Tumolvolumen am Versuchstag t26 so ergibt sich eine positive Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,48 (Spearman's ρ), die mit einem p-Wert $< 0,01$ statistisch signifikant ist (vgl. Abb. 28).

Die volumetrisch ausgewerteten MRT-Aufnahmen wurden vor der weiteren Analyse logarithmisch transformiert, um eine Normalverteilung der Daten zu erreichen. Der Shapiro-Wilk Test auf Normalverteilung der transformierten Daten fiel nicht statistisch signifikant aus (p-Wert:

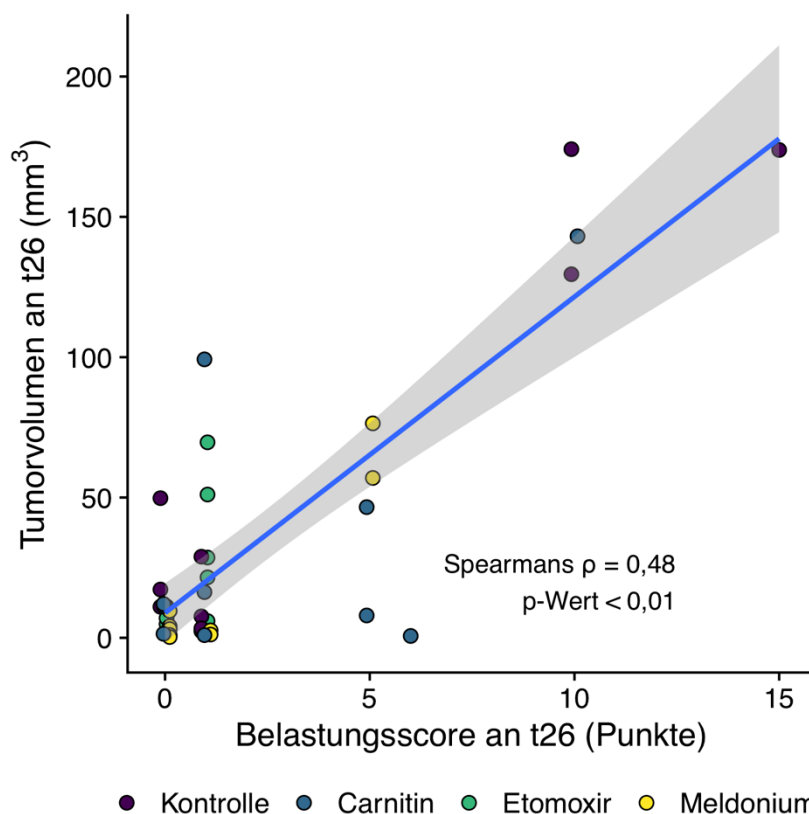


Abb. 28: Korrelation zwischen Belastungsscore und Tumolvolumen an t26 für C57BL/6 Wildtyp Mäuse. Die blaue Linie stellt die Regressionsgerade dar, der graue Bereich dient der Illustration der Abweichung. Die farblich verschiedenen Datenpunkte gehören den jeweiligen Versuchsgruppen (Kontrolle, Carnitin, Etomoxir und Meldonium) an. Signifikante Korrelation mittels Spearman's ρ (p-Wert $< 0,01$). Um alle Tiere in der Korrelation darzustellen, erfolgte zu Illustrationszwecken eine Auftragung mit minimaler Differenz zum ganzzahligen Wert des Belastungsscores. Quelle: Eigene Darstellung (2023).

0,315), sodass eine Normalverteilung angenommen werden kann. Die Tumorgrößen an t12 und t26 sowie das errechnete Tumorwachstum sind der Abb. 29 zu entnehmen. Exemplarische MRT-Aufnahmen unterschiedlicher Tumorgrößen sind in Abb. 30 dargestellt.

Das Tumolvolumen lag an t12, dem Tag der Beginn der Substanzgabe, in der Kontrollgruppe bei $2,04 (\pm 1,19) \log_2(\text{mm}^3)$, in der Carnitingruppe bei $1,66 (\pm 1,01) \log_2(\text{mm}^3)$, in der

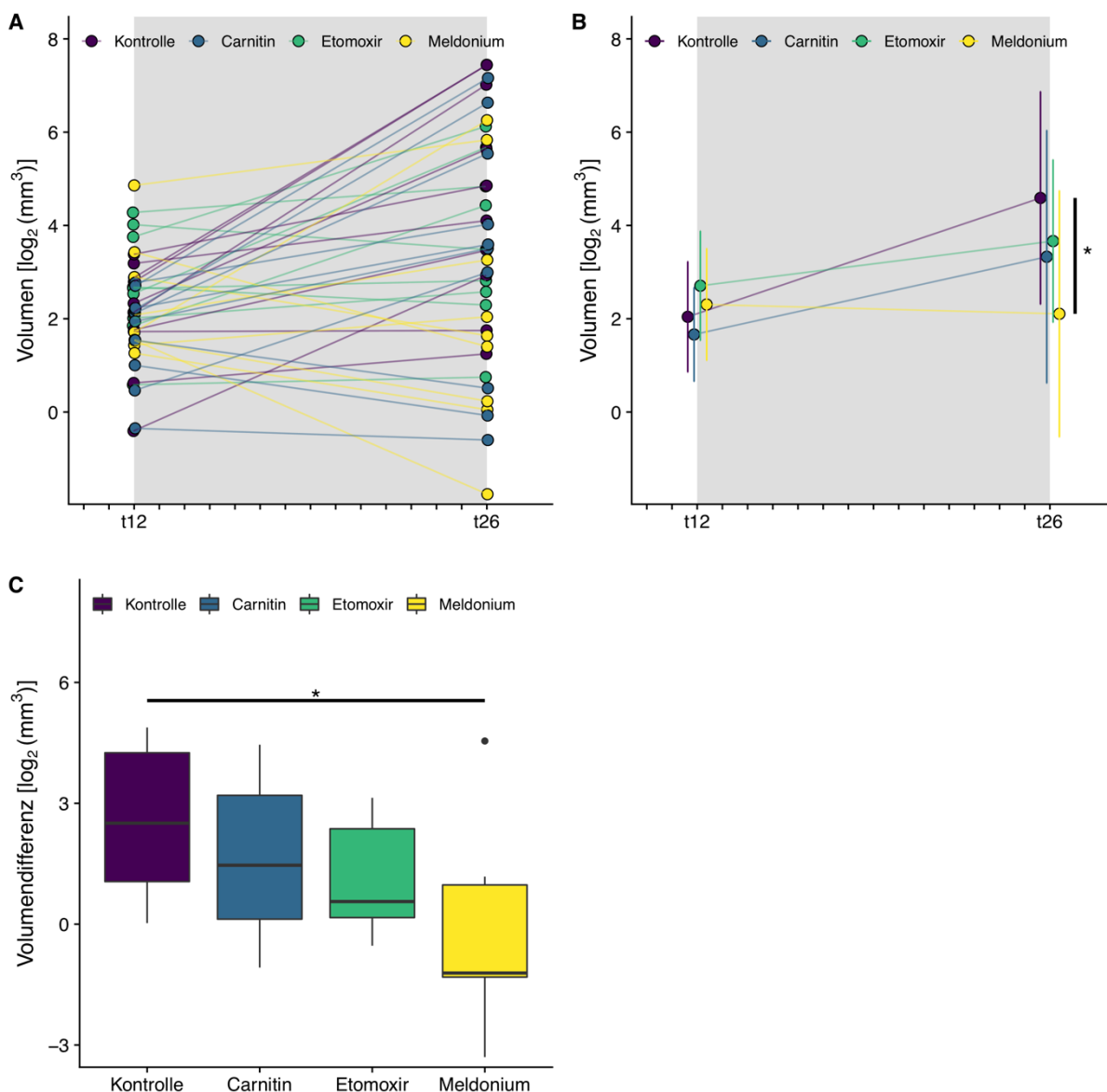


Abb. 29: Graphische Darstellung des Tumorwachstums nach stereotaktischer Implantation von GL261 Zellen ins Gehirn von C57BL/6 Wildtyp Mäusen. Logarithmisches Tumolvolumen je Maus (A) und Mittelwerte (Punkte) \pm Standardabweichung (Fehlerbalken) der logarithmischen Tumolvolumina nach Behandlungsarm (B) ermittelt durch MRT an den Tagen 12 (t12) und 26 (t26) nach intrazerebraler Tumorzellimplantation. Die Versuchstage auf der x-Achse nehmen nur ganzzahlige Werte an, zu Illustrationszwecken erfolgt die Darstellung mit leichten Abweichungen vom ganzzahligen Wert. Tumorwachstum beziehungsweise logarithmische Tumolvolumendifferenz von t26 zu t12 in den jeweiligen Behandlungsarmen (C) dargestellt als Boxplot in üblicher Dimensionierung von Minimum bis Maximum mit Box von der 25. bis 75. Perzentile, waagerechtem Strich beim Median und Darstellung von Ausreißern als Punkte. Die Farbgebung der Darstellung erfolgte nach den jeweiligen Versuchsgruppen (Kontrolle, Carnitin, Etomoxir und Meldonium). ANOVA mit Tukey Post-hoc-Test (* p-Wert < 0,05, n = 10 für Kontrolle, Carnitin, n = 9 für Etomoxir, Meldonium). Quelle: Eigene Darstellung (2023), adaptiert nach [95].

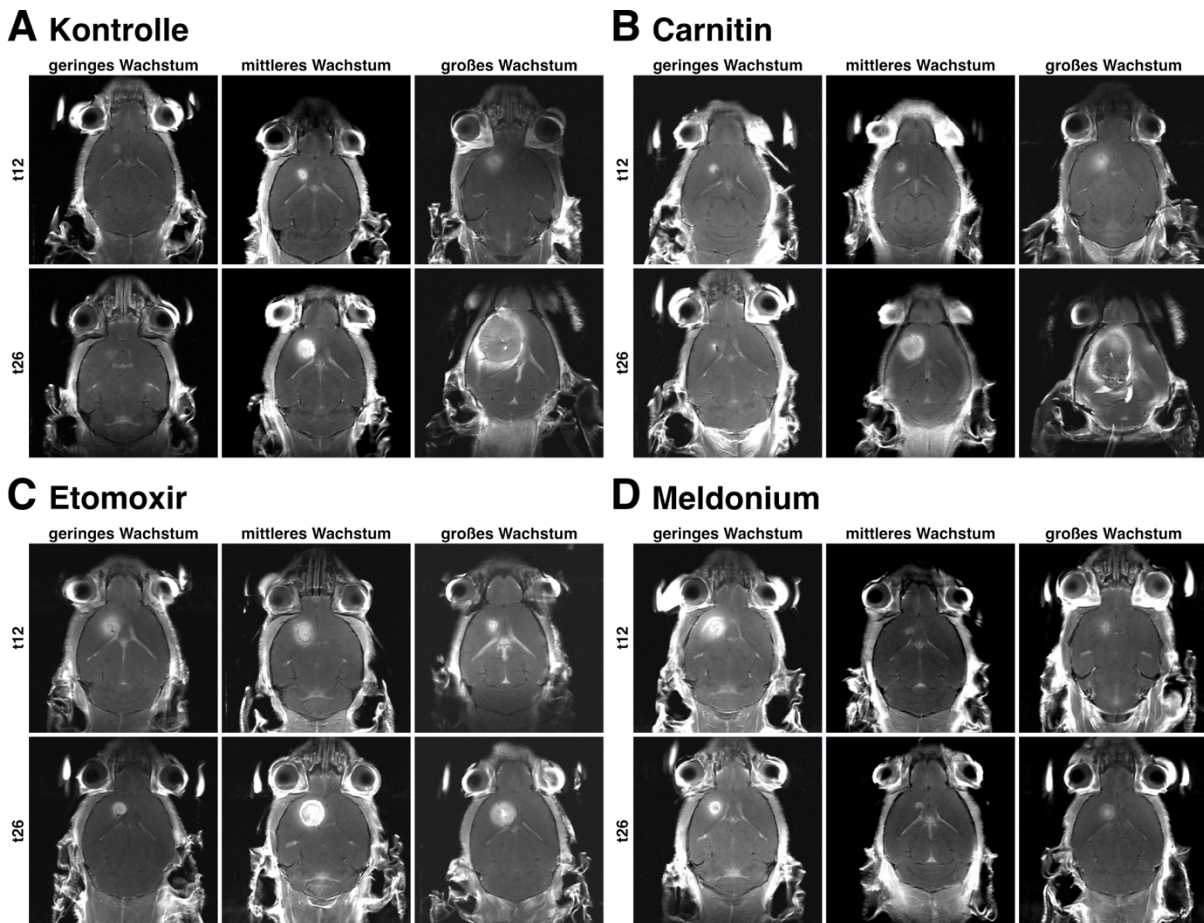


Abb. 30: Darstellung von exemplarischen MRT-Aufnahmen des Gehirns nach Kontrastmittelgabe in T1 Wichtung von C57BL/6 Wildtyp Mäusen. Es sind vergleichend MRT-Bilder von Tag 12 (t12) und Tag 26 (t26) nach Tumorzellimplantation gezeigt: (A) Kontrolle, (B) Carnitin, (C) Etomoxir und (D) Meldonium. Quelle: Eigene Darstellung (2023), adaptiert nach [95].

Etomoxirgruppe bei $2,71 (\pm 1,17) \log_2(\text{mm}^3)$ und in der Meldoniumgruppe bei $2,31 (\pm 1,20) \log_2(\text{mm}^3)$. Somit gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede im Tumolvolumen zum Startzeitpunkt der Substanzapplikation. Das Tumolvolumen ergab an t26 in der Kontrollgruppe $4,59 (\pm 2,28) \log_2(\text{mm}^3)$, in der Carnitingruppe $3,33 (\pm 2,71) \log_2(\text{mm}^3)$, in der Etomoxirgruppe $3,67 (\pm 1,74) \log_2(\text{mm}^3)$ und in der Meldoniumgruppe $2,11 (\pm 2,64) \log_2(\text{mm}^3)$. Das Tumorstadium zwischen den Tagen t12 und t26 betrug damit in der Kontrollgruppe $2,55 (\pm 1,82) \log_2(\text{mm}^3)$, in der Carnitingruppe $1,67 (\pm 2,05) \log_2(\text{mm}^3)$, in der Etomoxirgruppe $0,958 (\pm 1,37) \log_2(\text{mm}^3)$ und in der Meldoniumgruppe $-0,200 (\pm 2,31) \log_2(\text{mm}^3)$. Die Meldoniumgruppe weist somit als einzige Gruppe ein im Mittel reduziertes Tumorstadium auf, wobei auch das Tumorstadium in der Carnitingruppe und der Etomoxirgruppe im Mittel unter dem der Kontrollgruppe lag.

In der statistischen Analyse zeigte sich mit einem p-Wert von 0,027 eine signifikante Varianzunterscheidung in der ANOVA. In der Post-hoc-Testung ergab sich mit einem p-Wert von 0,019 eine signifikante Differenz im Tumorstadium (t25 - t12) zwischen der Meldoniumgruppe und der Kontrollgruppe. Die Effektstärke η^2 von 0,234 zeigte einen großen Effekt. Die

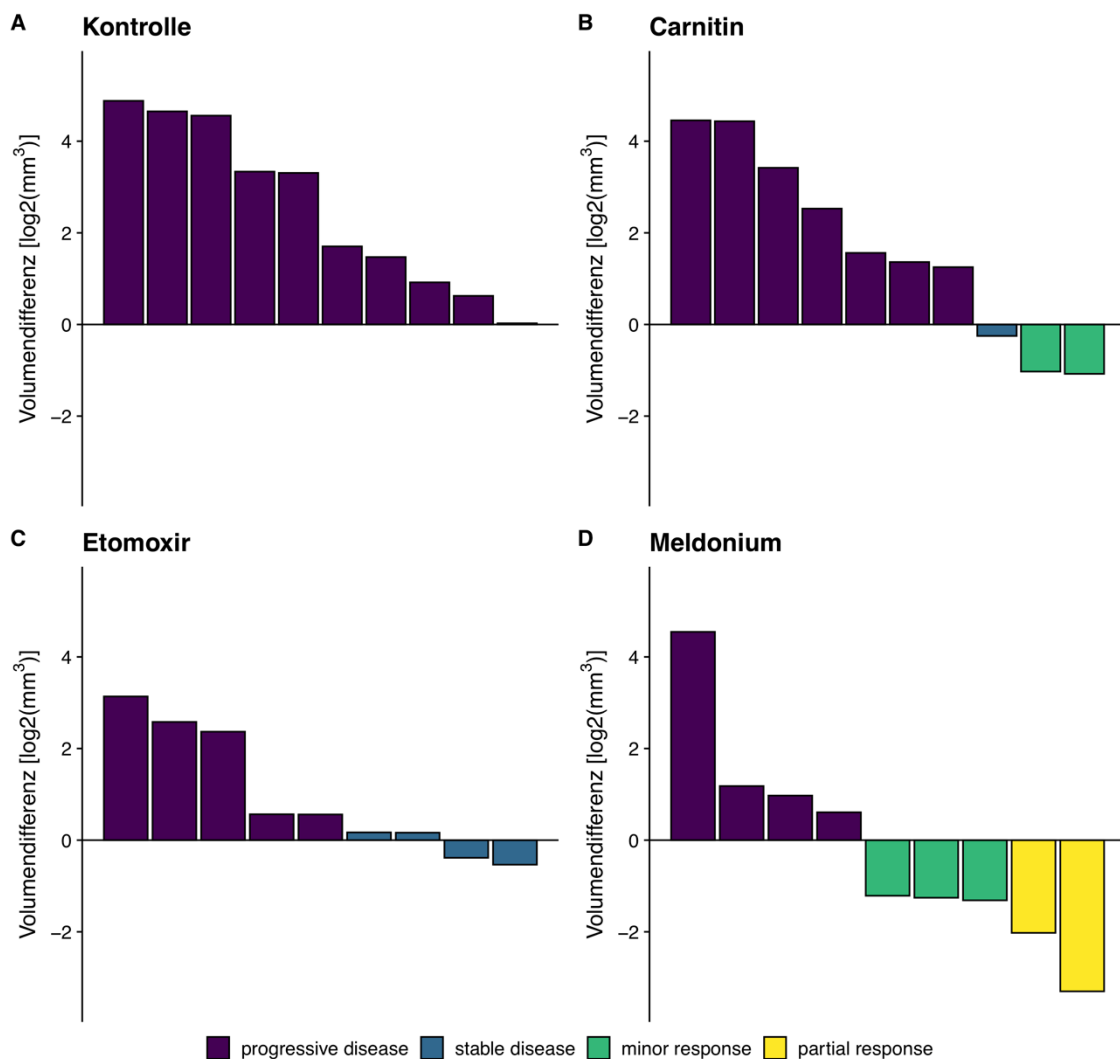


Abb. 31: Darstellung der logarithmischen Tumolvolumendifferenzen bei C57BL/6 Wildtyp Mäusen im *waterfall plot* mit Einordnung in die verschiedenen Kategorien des Ansprechens auf die Substanzapplikation. Die Volumendifferenzen sind für die verschiedenen Behandlungsarme getrennt gezeigt: Kontrolle (A), Carnitin (B), Etomoxir (C) und Meldonium (D) in C57BL/6 Wildtyp Mäusen. Jeder Balken entspricht einem Individuum, welche der Größe nach geordnet dargestellt sind. Die zugehörige Volumendifferenz ist auf der y-Achse abgetragen, die Klassifizierung des Ansprechens auf die applizierten Substanzen (vgl. Kapitel 3.4.8, S. 53) ist farblich kodiert. Quelle: Eigene Darstellung (2023).

geringeren Wachstumsraten der anderen Gruppen waren im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht statistisch signifikant.

Die Abb. 31 zeigt für jedes Versuchstier die logarithmische Volumenänderung und die Einordnung in eine Kategorisierung der Tumorprogression als *waterfall plot*. Hierbei ist erkenntlich, dass der Anteil der Tiere, die als *progressive disease* klassifiziert werden, in der Kontrollgruppe am höchsten und analog zum Tumorwachstum in den anderen Gruppen geringer ist. Außerdem ist ersichtlich, dass in der Gruppe, der mit Meldonium behandelten Tiere 5/9 (55,5 %) ein Ansprechen mit reduziertem Tumorwachstum vorlag und nur ein Tier ein deutlich größeres Tumorwachstum als alle anderen hatte. Hier ist auch ersichtlich, dass drei Tiere der

Meldoniumgruppe mit einer *progressive disease* im Vergleich zu den anderen Gruppen ein eher geringeres Tumorwachstum hatten.

In der Betrachtung der beispielhaften MRT-Aufnahmen (vgl. Abb. 30) zeigt sich auch, dass in der Kontrollgruppe und der Carnitingruppe deutlich größere Tumorzunahmen zu verzeichnen waren und sich in der Etomoxir- und Meldoniumgruppe ein geringeres Wachstum beziehungsweise eine Tumolvolumenabnahme auftrat.

4.3.2 Wirkung von L-Carnitin auf das *in vivo* Tumorwachstum im orthotopen Glioblastommodell in heterozygoten $jvs^{+/-}$ -Mäusen

Um zu untersuchen, ob sich das intrazerebrale Tumorwachstum in einer Mikroumgebung mit geringer L-Carnitin Konzentration von derjenigen mit physiologischen L-Carnitin-Spiegeln unterscheidet, sollten im Verlauf dieser Arbeit tierexperimentelle Studien an heterozygoten $jvs^{+/-}$ -Mäusen durchgeführt werden. Die $jvs^{+/-}$ -Mäuse weisen im kodierenden Bereich des *SLC22A5*-Gens eine nichtsynonyme Mutation auf, welche zu einem Verlust bzw. einer Verminderung der Transportaktivität des Carnitintransporters OCTN2 führt (vgl. Kapitel 3.4.2, S. 46) [135]. Zur Untersuchung der (patho-)physiologischen Funktion von OCTN2 stellen die jvs -Mäuse daher ein wichtiges Tiermodell dar. In Abb. 32 ist das zweiarmige Versuchsdesign für die heterozygoten $jvs^{+/-}$ -Mäuse dargestellt.

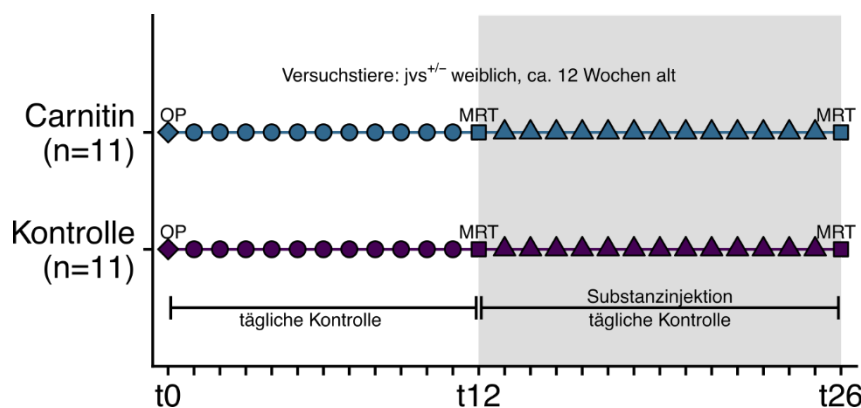


Abb. 32: Zweiarmiges Versuchsdesign für das orthotope Hirntumormodell in heterozygoten $jvs^{+/-}$ -Mäusen. t0 bis t26 bezeichnen die Versuchstage. OP: operative stereotaktische Implantation von murinen GL261 Zellen zur Tumorinduktion. MRT: Magnetresonanztomographie. Quelle: Eigene Darstellung (2023).

Entsprechend der Vorgaben und Planungen zum Tierwohl wurden die Versuchstiere regelmäßig hinsichtlich Gewichtsveränderungen, Allgemeinzustand und Verhalten beurteilt. Ein daraus erstellter Punktescore (vgl. Tab. 21, S. 49) stellt die individuelle Belastung des Versuchstieres dar. Bei einem Punktescore von ≥ 20 wären Versuchstiere zur Vermeidung übermäßiger Belastung vorzeitig getötet worden. Dies kam in keinem der beiden Versuchsarme vor. In Abb. 33 sind die erfassten Parameter zur Belastung der Versuchstiere zusammenfassend dargestellt. Die mikroskopische Kontrolle der injizierten Zellen in Zellkultur ergab auch hier keine Kontaminationen und ein normales Wachstum (vgl. Abb. 25).

Über alle Gruppen hinweg kam es zu einer geringgradigen Belastung hinsichtlich des Körpergewichts. So zeigten 18/22 Tieren (81,8 %) zu mindestens einem Zeitpunkt des Versuches eine Gewichtsabnahme im Vergleich zum Ausgangsgewicht. 18/22 Tieren (81,8 %) hatten zu mindestens einem Zeitpunkt im Versuchsablauf eine Körpergewichtsreduktion von weniger als 5 % des Ausgangsgewichts. 10/22 Tieren (45,5 %) hatten zu mindestens einem Zeitpunkt im Versuchsablauf eine Körpergewichtsreduktion von 5 % bis 10 % des Ausgangsgewichts. 1/22 Tieren (4,5 %) hatten zu mindestens einem Zeitpunkt im Versuchsablauf eine Körpergewichtsreduktion von 11 % bis 20 % des Ausgangsgewichts. Eine Körpergewichtsreduktion von mehr als 20 % kam nicht vor. Der Gesamtscore zum Belastungsgrad der

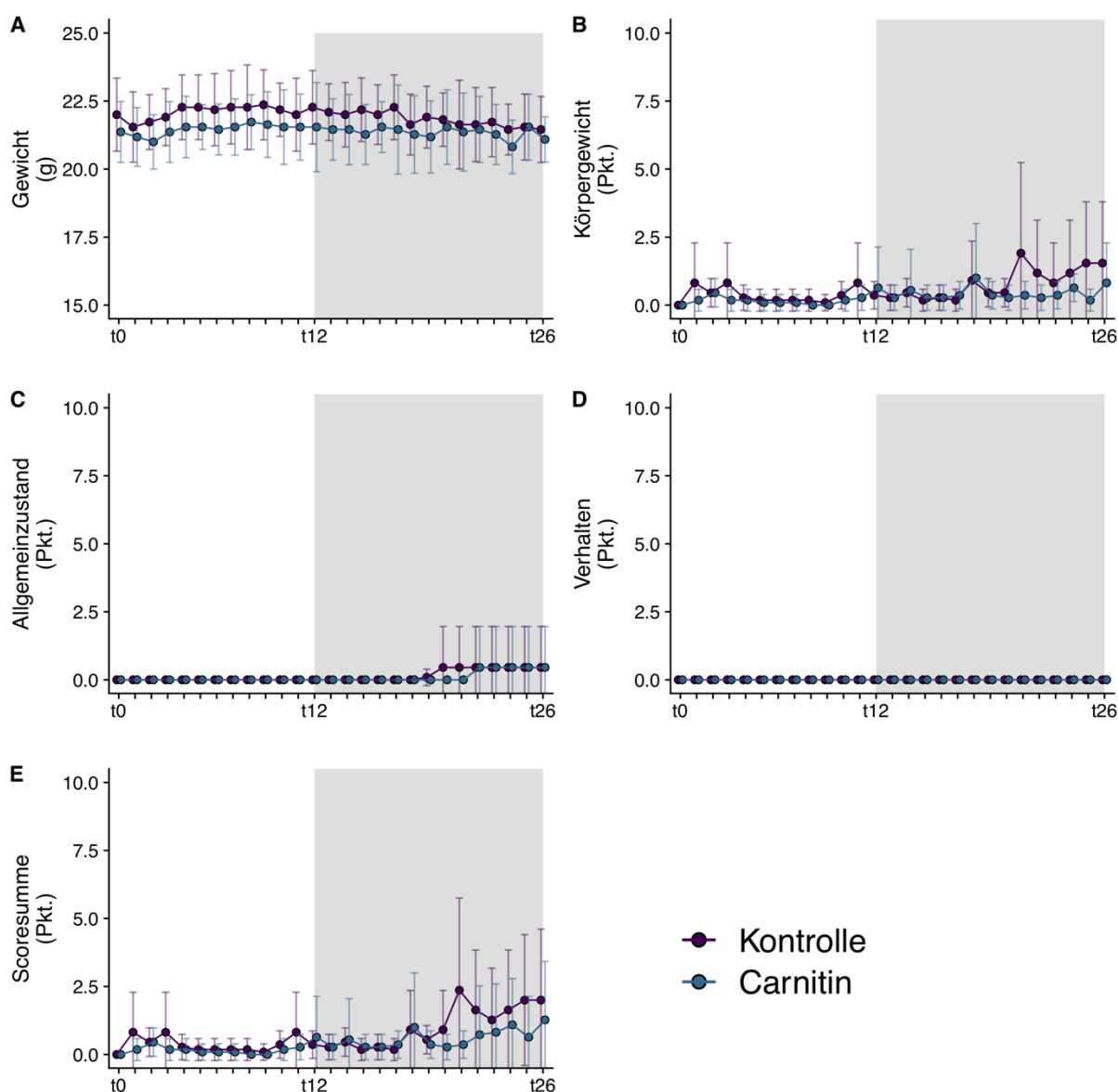


Abb. 33: Darstellung des Belastungsgrades der *jvs*^{+/-}-Mäuse im zweiarmigen Versuchsdesign. Dargestellt sind gemittelte Werte für das Gewicht (A) sowie die Belastungsscores zum Körpergewicht (B), zum Allgemeinzustand (C), zu Verhaltensauffälligkeiten (D) und die Summe der einzelnen Belastungsscores (E) für die jeweiligen Versuchsarme (Kontrolle, Carnitin). Die Tage mit Substanzinjektionen sind grau hinterlegt. Die Versuchstage auf der x-Achse nehmen nur ganzzahlige Werte an, zu Illustrationszwecken erfolgte die Darstellung mit leichten Abweichungen vom ganzzahligen Wert. Quelle: Eigene Darstellung (2023).

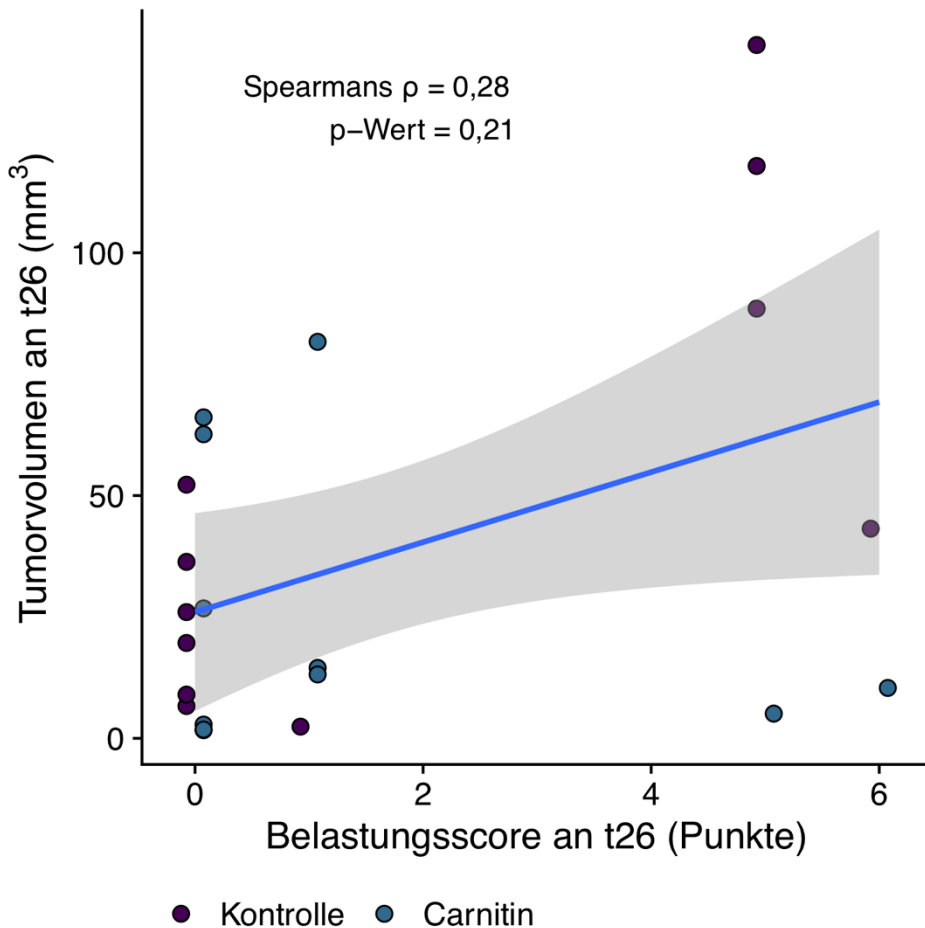


Abb. 34: Korrelation zwischen Belastungsscore und Tumorvolumen an t26 für t26 für $jvs^{+/-}$ -Mäuse. Die blaue Linie stellt die Regressionsgerade dar, der graue Bereich dient der Illustration der Abweichung. Die farblich verschiedenen Datenpunkte gehören den jeweiligen Versuchsgruppen (Kontrolle, Carnitin) an. Keine signifikante Korrelation mittels Spearman's ρ (p-Wert: 0,21). Um alle Tiere in der Korrelation darzustellen, erfolgte zu Illustrationszwecken eine Auftragung mit minimaler Differenz zum ganzzahligen Wert des Belastungsscores. Quelle: Eigene Darstellung (2023).

heterozygoten $jvs^{+/-}$ -Mäuse lag an t26 in der Kontrollgruppe bei im Mittel 2,00 ($\pm 2,61$) und in der Carnitingruppe bei 1,27 ($\pm 2,15$).

Über alle Gruppen hinweg gab es nur äußerst selten Auffälligkeiten hinsichtlich des Verhaltens oder des Allgemeinzustandes. Lediglich 3/22 (13,6 %) Tieren waren bezüglich des Allgemeinzustandes davon betroffen. 1/22 (4,5 %) Tieren war nur einen einzigen Tag (t19) in Form von stumpfem, ungeordnetem Fell betroffen. Die anderen 2/22 (9,0 %) Tieren waren ab t22 in der Carnitingruppe und ab t20 in der Kontrollgruppe mit Auffälligkeiten im Allgemeinzustand in Form von stumpfen, ungeordnetem Fell betroffen. Bezüglich des Verhaltens waren alle 22/22 (100 %) Tiere unauffällig. Die Tumorinduktion, MRT-Untersuchungen und täglichen Kontrollen sowie die Injektionen wurden gut toleriert.

Vergleicht man den Belastungsscore und das Tumorvolumen am Versuchstag t26, so ergibt sich eine leichte positive Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,28 (Spearman's ρ), die mit einem p-Wert von 0,21 jedoch statistisch nicht signifikant ist (vgl. Abb. 34).

Die volumetrisch ausgewerteten MRT-Aufnahmen wurden vor der weiteren Analyse logarithmisch transformiert, um eine Normalverteilung der Daten zu erreichen. Der Shapiro-Wilk Test auf Normalverteilung war nicht signifikant (p -Wert: 0,248), sodass eine Normalverteilung angenommen werden kann. Die Tumorgrößen an t12 und t26 sowie das errechnete Tumorwachstum sind der Abb. 35 zu entnehmen. Exemplarische MRT-Aufnahmen unterschiedlicher Tumorgrößen sind in Abb. 36 dargestellt. Das Tumolvolumen lag an t12 in der Kontrollgruppe

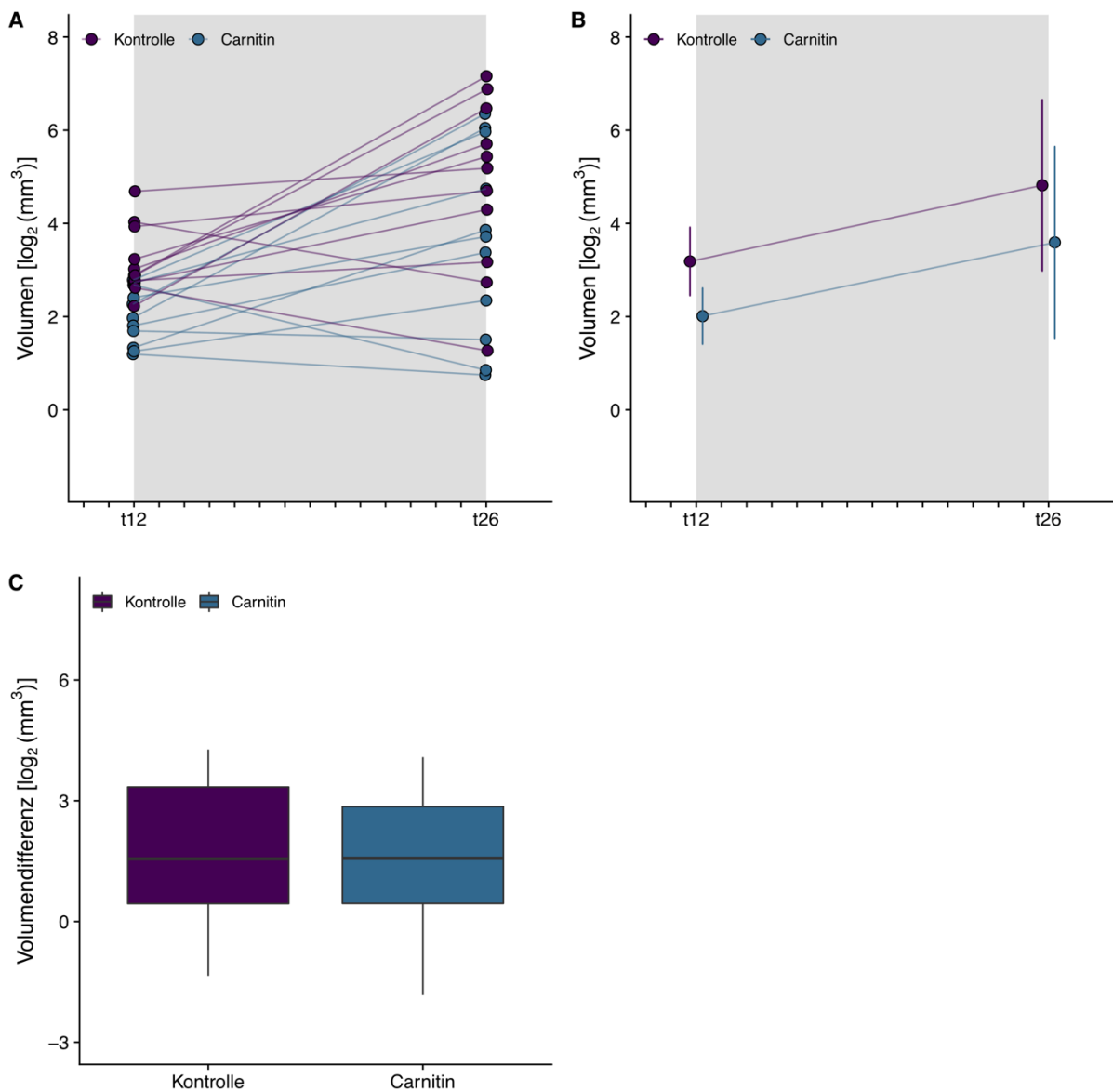


Abb. 35: Graphische Darstellung des Tumorwachstums nach stereotaktischer Implantation von GL261 Zellen ins Gehirn von heterozygoten $jvs^{+/-}$ -Mäusen. Logarithmisches Tumolvolumen je Maus (A) und Mittelwerte (Punkte) \pm Standardabweichung (Fehlerbalken) der logarithmischen Tumolvolumina nach Behandlungsarm (B) ermittelt durch MRT an den Tagen 12 (t12) und 26 (t26) nach intrazerebraler Tumorzellimplantation. Die Versuchstage auf der x-Achse nehmen nur ganzzahlige Werte an, zu Illustrationszwecken erfolgte die Darstellung mit leichten Abweichungen vom ganzzahligen Wert. Tumorwachstum beziehungsweise logarithmische Tumolvolumendifferenz von t26 zu t12 in den jeweiligen Behandlungsarmen (C) dargestellt als Boxplot in üblicher Dimensionierung von Minimum bis Maximum mit Box von der 25. bis 75. Perzentile und waagerechtem Strich beim Median. Die Farbgebung der Darstellung erfolgt nach den jeweiligen Versuchsgruppen (Kontrolle, Carnitin). Kein signifikanter Unterschied im Student t-Test. Quelle: Eigene Darstellung (2023).

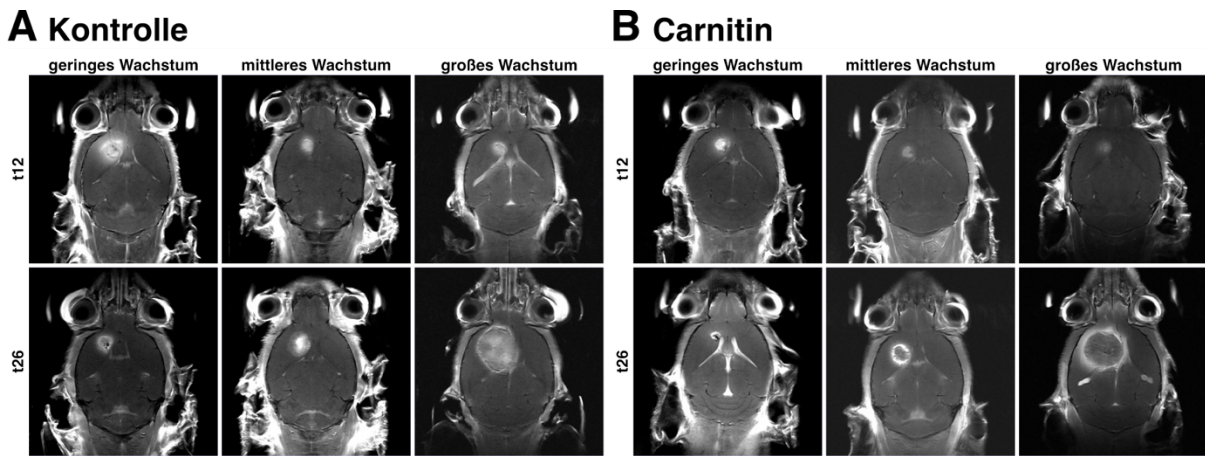


Abb. 36: Darstellung von exemplarischen MRT-Aufnahmen des Gehirns nach Kontrastmittelgabe in T1 Wichtung von $jvs^{+/-}$ -Mäusen. Es sind sowohl MRT-Bilder von Tag 12 (t12) und Tag 26 (t26) nach Tumorzellimplantation gezeigt: (A) Kontrolle, (B) Carnitin. Quelle: Eigene Darstellung (2023).

bei $3,18 (\pm 0,73) \log_2(\text{mm}^3)$ und in der Carnitingruppe bei $2,01 (\pm 0,60) \log_2(\text{mm}^3)$. Das Tumolvolumen lag an t26 in der Kontrollgruppe bei $4,82 (\pm 1,84) \log_2(\text{mm}^3)$ und in der Carnitingruppe bei $3,59 (\pm 2,06) \log_2(\text{mm}^3)$. Somit betrug das Tumorwachstum zwischen den Tagen t12 und t26 in der Kontrollgruppe $1,63 (\pm 2,05) \log_2(\text{mm}^3)$ und in der Carnitingruppe $1,58 (\pm 1,88) \log_2(\text{mm}^3)$. Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied im Tumorwachstum zwischen der Kontrollgruppe und der Carnitingruppe (p-Wert: 0,951).

Die Abb. 37 zeigt für jedes Versuchstier die logarithmische Volumenänderung und die Einordnung in eine Kategorisierung der Tumorprogression als *waterfall plot*. Hierbei ist erkenntlich,

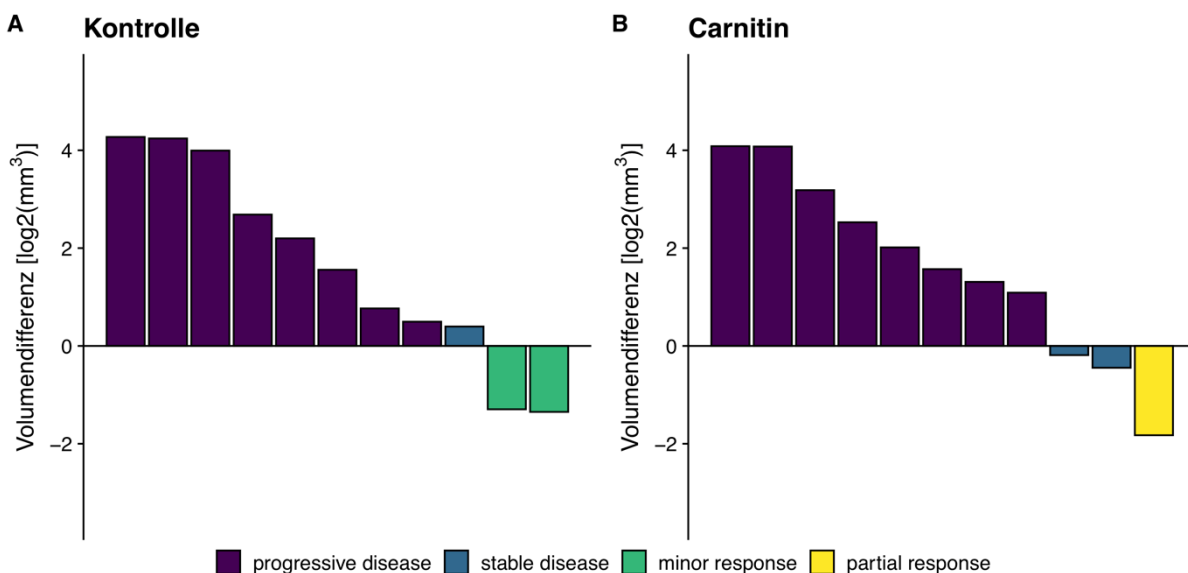


Abb. 37: Darstellung der logarithmischen Tumolvolumendifferenzen bei $jvs^{+/-}$ -Mäusen im *waterfall plot* mit Einordnung in die verschiedenen Kategorien des Ansprechens der Substanzapplikation. Die Volumendifferenzen sind für die verschiedenen Behandlungsarme getrennt gezeigt: Kontrolle (A), Carnitin (B) bei $jvs^{+/-}$ -Mäusen. Jeder Balken entspricht einem Individuum, welche der Größe nach geordnet dargestellt sind. Die zugehörige Volumendifferenz ist auf der y-Achse abgetragen, die Klassifizierung des Ansprechens auf die applizierten Substanzen (vgl. Kapitel 3.4.8, S. 53) ist farblich kodiert. Quelle: Eigene Darstellung (2023).

dass in beiden Gruppen (Kontrolle und Carnitin) eine ähnliche Verteilungsstruktur vorherrscht. Jeweils 8/11 (72,7 %) Versuchstieren sind als *progressive disease* klassifiziert mit einem ähnlichen Spektrum des Tumorwachstums. Geringfügige Unterschiede ergeben sich bei den verbleibenden drei Individuen je Gruppe, ohne jedoch eine deutliche Tendenz hieraus ableiten zu können.

Beispielhafte MRT-Aufnahmen wurden in Abb. 36 zusammengestellt. Dabei wird ersichtlich, dass in beiden Gruppen (Kontrolle und Carnitin) ein ähnliches Wachstumsverhalten der Tumoren mit geringer bis großer Tumolvolumenzunahme auftrat.

4.3.3 Wirkung von L-Carnitin auf das *in vivo* Tumorwachstum im orthotopen Glioblastommodell in homozygoten $jvs^{-/-}$ -Mäusen

In heterozygoten $jvs^{+/-}$ -Mäusen ist die Plasmakonzentration von freiem L-Carnitin auf etwa 60 % vermindert, während diese in homozygoten Tieren sogar auf unter 40 % reduziert ist [135]. Daher sollten auch homozygote $jvs^{-/-}$ -Mäuse in die tierexperimentellen Betrachtungen zum intrazerebralen Tumorwachstum nach stereotaktischer Implantation von GL261 Zellen einbezogen werden. Das Versuchsdesign für die homozygoten $jvs^{-/-}$ -Mäuse ist in Abb. 38 dargestellt.

Entsprechend der Vorgaben und Planungen zum Tierwohl wurden die homozygoten $jvs^{-/-}$ -Versuchstiere ebenfalls täglich hinsichtlich Gewichtsveränderungen, Allgemeinzustand und Verhalten beurteilt. Ein daraus erstellter Punktescore (vgl. Tab. 21, S. 49) stellt die individuelle Belastung des Versuchstieres dar. Auch hier galt, dass bei einem Punktescore von ≥ 20 die Versuchstiere zur Vermeidung übermäßiger Belastung vorzeitig getötet worden wären. Dies kam in keinem der beiden Versuchsarme vor. In Abb. 39 sind die erfassten Parameter zur Belastung der Versuchstiere zusammenfassend dargestellt. Die mikroskopische Kontrolle der injizierten Zellen in Zellkultur ergab auch hier keine Kontaminationen und ein normales Wachstum (vgl. Abb. 25).

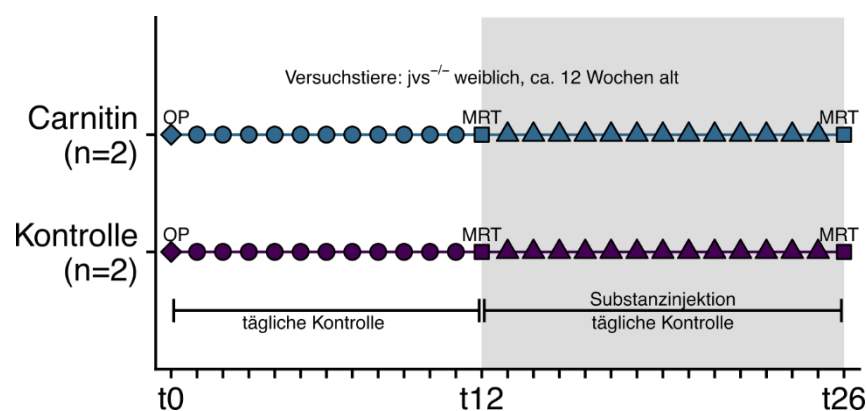


Abb. 38: Zweiarmliges Versuchsdesign für das orthotope Hirntumormodell homozygoten $jvs^{-/-}$ -Mäusen. t0 bis t26 bezeichnen die Versuchstage. OP: operative stereotaktische Implantation von murinen GL261 Zellen zur Tumorinduktion. MRT: Magnetresonanztomographie. Quelle: Eigene Darstellung (2023).

Über alle Gruppen hinweg kam es zu einer geringfügigen Belastung hinsichtlich des Körpergewichts. So zeigten 3/4 Tieren (75 %) zu mindestens einem Zeitpunkt des Versuches eine Gewichtsabnahme im Vergleich zum Ausgangsgewicht. 2/4 Tieren (50 %) hatten zu mindestens einem Zeitpunkt im Versuchsablauf eine Körpergewichtsreduktion von weniger als 5 % des Ausgangsgewichtes. 2/4 Tieren (50 %) hatten zu mindestens einem Zeitpunkt im Versuchsablauf eine Körpergewichtsreduktion von 5 % bis 10 % des Ausgangsgewichtes. 1/4 Tieren (25 %) hatte zu mindestens einem Zeitpunkt im Versuchsablauf eine Körpergewichtsreduktion von 11 % bis 20 % des Ausgangsgewichtes. Eine Körpergewichtsreduktion von mehr als 20 %

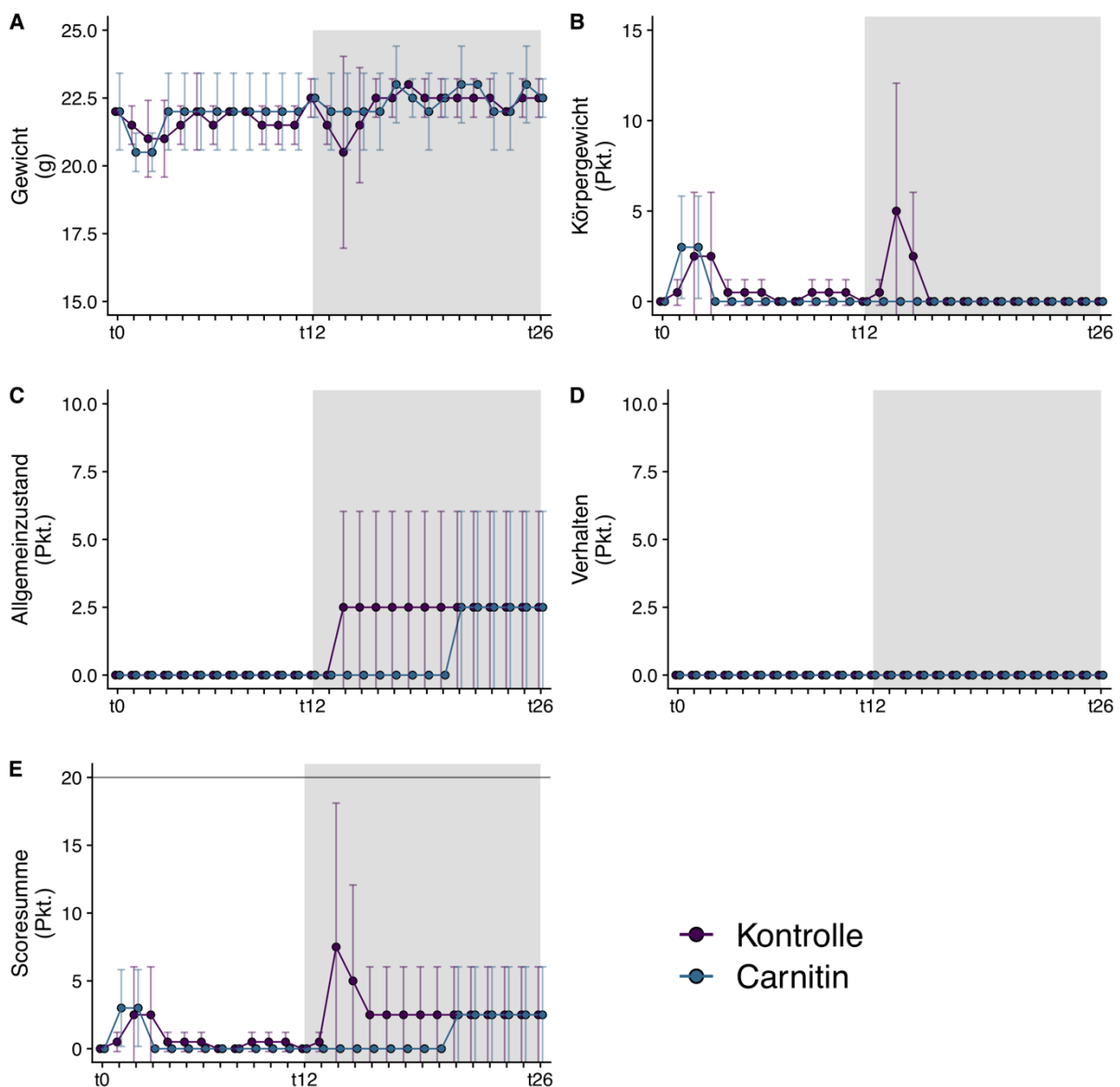


Abb. 39: Darstellung des Belastungsgrades der *jvs*^{-/-}-Mäuse im zweiarmigen Versuchsdesign. Dargestellt sind gemittelte Werte für das Gewicht (A) sowie die Belastungsscores zum Körpergewicht (B), zum Allgemeinzustand (C), zu Verhaltensauffälligkeiten (D) und die Summe der einzelnen Belastungsscores (E) für die jeweiligen Versuchsarme (Kontrolle, Carnitin). Die Tage mit Substanzinjektionen sind grau hinterlegt. Die Versuchstage auf der x-Achse nehmen nur ganzzahlige Werte an, zu Illustrationszwecken erfolgte die Darstellung mit leichten Abweichungen vom ganzzahligen Wert. Quelle: Eigene Darstellung (2023).

kam nicht vor. Der Gesamtscore zum Belastungsgrad der homozygoten $jvs^{-/-}$ -Mäuse lag an t26 in der Kontrollgruppe im Mittel bei $2,5 (\pm 3,54)$ und in der Carnitingruppe bei $2,54 (\pm 3,54)$.

Verhaltensauffälligkeiten wurden bei den homozygoten $jvs^{-/-}$ -Mäusen über den gesamten Versuchsablauf nicht beobachtet. Bei 2/4 Tieren (50 %) gab es jedoch geringe Auffälligkeiten des Allgemeinzustandes (stumpfes, ungeordnetes Fell), wobei je ein Tier auf einen der beiden Versuchsarme entfiel. In der Kontrollgruppe trat dies ab t14 bis t26 auf. In der Carnitingruppe

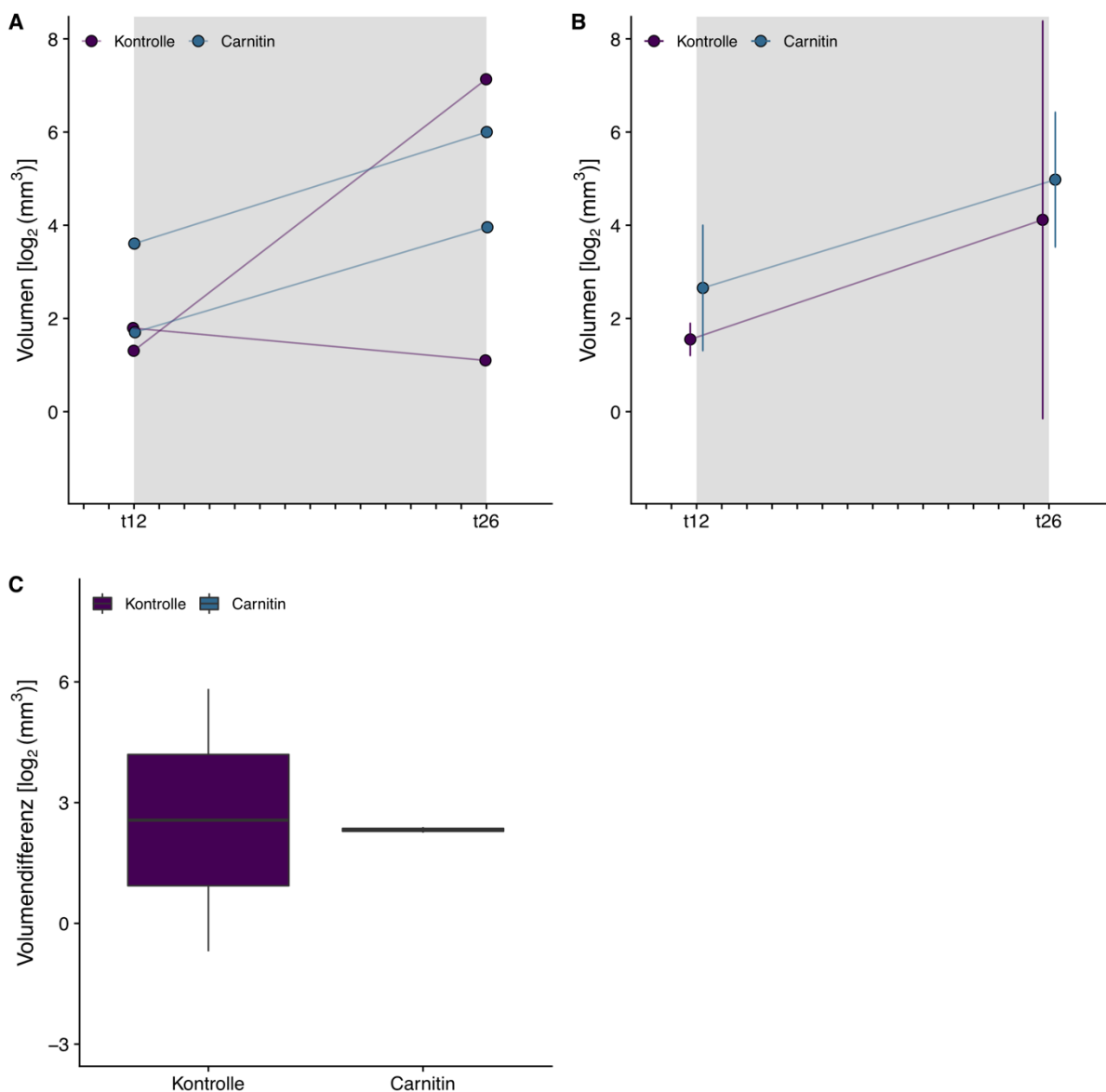


Abb. 40: Graphische Darstellung des Tumorwachstums nach stereotaktischer Implantation von GL261 Zellen ins Gehirn von homozygoten $jvs^{-/-}$ -Mäusen. Logarithmisches Tumorumfängen je Maus (A) und Mittelwerte (Punkte) \pm Standardabweichung (Fehlerbalken) der logarithmischen Tumorumfängen nach Behandlungsarm (B) ermittelt durch MRT an den Tagen 12 (t12) und 26 (t26) nach intrazerebraler Tumorzellimplantation. Die Versuchstage auf der x-Achse nehmen nur ganzzahlige Werte an, zu Illustrationszwecken erfolgt die Darstellung mit leichten Abweichungen vom ganzzahligen Wert. Tumorwachstum beziehungsweise logarithmische Tumorumfängendifferenz von t26 zu t12 in den jeweiligen Behandlungsarmen (C) dargestellt als Boxplot in üblicher Dimensionierung von Minimum bis Maximum mit Box von der 25. bis 75. Perzentile und waagerechtem Strich beim Median. Die Farbgebung der Darstellung erfolgt nach den jeweiligen Versuchsgruppen (Kontrolle, Carnitin). Kein signifikanter Unterschied im Mann-Whitney-U-Test. Quelle: Eigene Darstellung (2023).

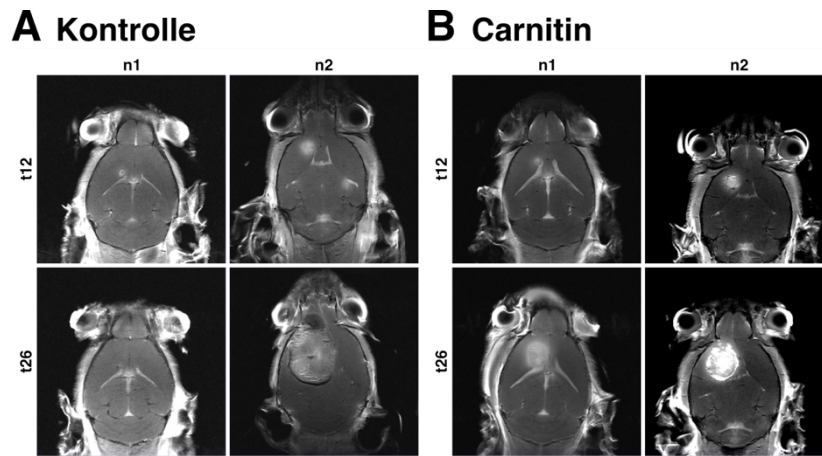


Abb. 41: Darstellung von exemplarischen MRT-Aufnahmen des Gehirns nach Kontrastmittelgabe in T1 Wichtung von $jvs^{-/-}$ -Mäusen. Es sind sowohl MRT-Bilder von Tag 12 (t12) und Tag 26 (t26) nach Tumorzellimplantation gezeigt: (A) Kontrolle, (B) Carnitin. Wegen der geringen Anzahl sind beide Versuchstiere (n1 und n2) aus dem jeweiligen Versuchsarm dargestellt. Quelle: Eigene Darstellung (2023).

wurde dies ab t21 bis t26 beobachtet. Die Tumorinduktion, MRT-Untersuchungen und täglichen Kontrollen und Injektionen wurden bei den homozygoten $jvs^{-/-}$ -Mäusen ebenfalls gut toleriert.

Die volumetrierten MRT-Aufnahmen wurden vor der weiteren Analyse ebenfalls logarithmisch transformiert, um eine Normalverteilung der Daten zu erreichen. Die Testung auf Normalverteilung konnte aufgrund der kleinen Stichprobengröße von $n = 4$ nicht sinnvoll durchgeführt werden. Die Tumorgrößen an t12 und t26 sowie das errechnete Tumorwachstum sind der Abb. 40 zu entnehmen. Exemplarische MRT-Aufnahmen der Tumoren sind in Abb. 41 dargestellt.

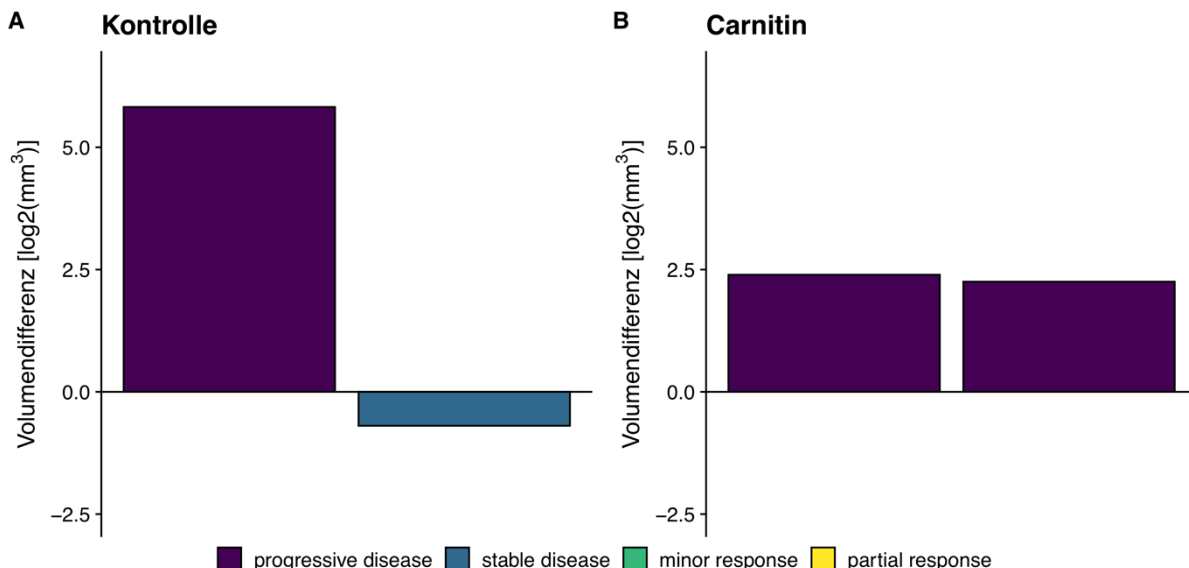


Abb. 42: Darstellung der logarithmischen Tumolvolumendifferenzen bei $jvs^{-/-}$ -Mäusen im waterfall plot mit Einordnung in die verschiedenen Kategorien des Ansprechens auf die Substanzapplikation. Die Volumendifferenzen sind für die verschiedenen Behandlungsarme getrennt gezeigt: Kontrolle (A), Carnitin (B) bei $jvs^{-/-}$ -Mäusen. Jeder Balken entspricht einem Individuum, welche der Größe nach geordnet dargestellt sind. Die zugehörige Volumendifferenz ist auf der y-Achse abgetragen, die Klassifizierung des Ansprechens auf die applizierten Substanzen (vgl. Kapitel 3.4.8, S. 53) ist farblich kodiert. Quelle: Eigene Darstellung (2023).

Das Tumolvolumen lag an t12 in der Kontrollgruppe bei $1,55 (\pm 0,35) \log_2(\text{mm}^3)$ und in der Carnitingruppe bei $2,66 (\pm 1,34) \log_2(\text{mm}^3)$. Das Tumolvolumen lag an t26 in der Kontrollgruppe bei $4,12 (\pm 4,26) \log_2(\text{cm}^3)$ und in der Carnitingruppe bei $4,98 (\pm 1,44) \log_2(\text{mm}^3)$. Das Tumorstadium beziehungsweise die Tumolvolumenzunahme zwischen den Tagen t12 und t26 betrug in der Kontrollgruppe $2,57 (\pm 4,61) \log_2(\text{mm}^3)$ und in der Carnitingruppe $2,32 (\pm 0,10) \log_2(\text{mm}^3)$. Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied im Tumorstadium zwischen der Kontrollgruppe und der Carnitingruppe (p-Wert: 1).

Bei der Interpretation dieser Ergebnisse sind die geringen n-Zahlen ($n = 2$) je Versuchstier zu beachten. Aufgrund der geringen Stichprobengröße sind alle Individuen in Abb. 41 abgebildet. Hier zeigte sich in der Kontrollgruppe bei einem Versuchstier ein sehr großes Wachstum und bei einem Tier hingegen eine Abnahme des Tumorstadiums. In der Carnitingruppe ergab sich für beide Individuen eine Zunahme des Tumorstadiums.

4.3.4 Vergleich der untersuchten Substanzen auf das *in vivo* Tumorstadium im orthotopen Glioblastommodell in C57BL/6 Wildtyp, $jvs^{+/-}$ - und $jvs^{-/-}$ -Mäusen

Abschließend wurde eine direkte Gegenüberstellung der Ergebnisse zum intrazerebralen *in vivo* Tumorstadium nach stereotaktischer, intrazerebraler Implantation von GL261 Glioblastomzellen in C57BL/6 Wildtyp, $jvs^{+/-}$ - und $jvs^{-/-}$ -Mäusen unter jeweiliger Substanzapplikation durchgeführt (vgl. Abb. 43).

Betrachtet man alle Versuchsgruppen, können die Einflüsse des genetischen Status der Versuchstiere, unter sonst gleichen Versuchsbedingungen für die Kontrollgruppe und die Carnitingruppe, in allen drei Mausmodellen verglichen werden. Zur Veranschaulichung sind auch die bei C57BL/6 zusätzlich getesteten Substanzen Etomoxir und Meldonium in Abb. 43 dargestellt. Hierbei fällt auf, dass die Tumorstadiumsdifferenz bei vielen der $jvs^{+/-}$ -Mäuse unabhängig von der Substanz unter dem Mittelwert der Kontrollgruppe in C57BL/6 liegt. In der $jvs^{+/-}$ -Kontrollgruppe betrifft dies 7/11 (63,6 %) der Tiere und in der $jvs^{+/-}$ -Carnitingruppe sind davon sogar 8/11 (72,7 %) der Tiere betroffen. Wegen der geringen n-Zahlen bei den $jvs^{-/-}$ -Mäusen erscheinen Aussagen hier nur wenig zielführend, es gibt aber sowohl Tiere mit größerer als auch geringerer Volumendifferenz der Tumoren.

Die Volumendifferenz in der Kontrollgruppe von C57BL/6 Tieren lag bei $2,55 (\pm 1,82) \log_2(\text{mm}^3)$. In der Kontrollgruppe der $jvs^{+/-}$ -Mäuse betrug die Volumendifferenz bei $1,63 (\pm 2,05) \log_2(\text{mm}^3)$ und in der Carnitingruppe der $jvs^{+/-}$ -Mäuse bei $1,58 (\pm 1,88) \log_2(\text{mm}^3)$, was einer Reduktion um 36,1 % beziehungsweise 38,0 % im Vergleich zur C57BL/6 Kontrollgruppe entspricht. Die unterschiedlichen Volumendifferenzen (t26 – t12) zwischen C57BL/6 Wildtyp Mäusen und jvs -Mäusen erreichte jedoch keine statistische Signifikanz (p-Wert:

0,413) in der Varianzanalyse. Die detaillierte Aufschlüsselung der statistischen Kenngrößen über alle Versuchsgruppen hinweg, inklusive des prozentualen Bezugs zur Substanzkontrolle und zur C57BL/6 Kontrolle, ist in Tab. 24 dargestellt.

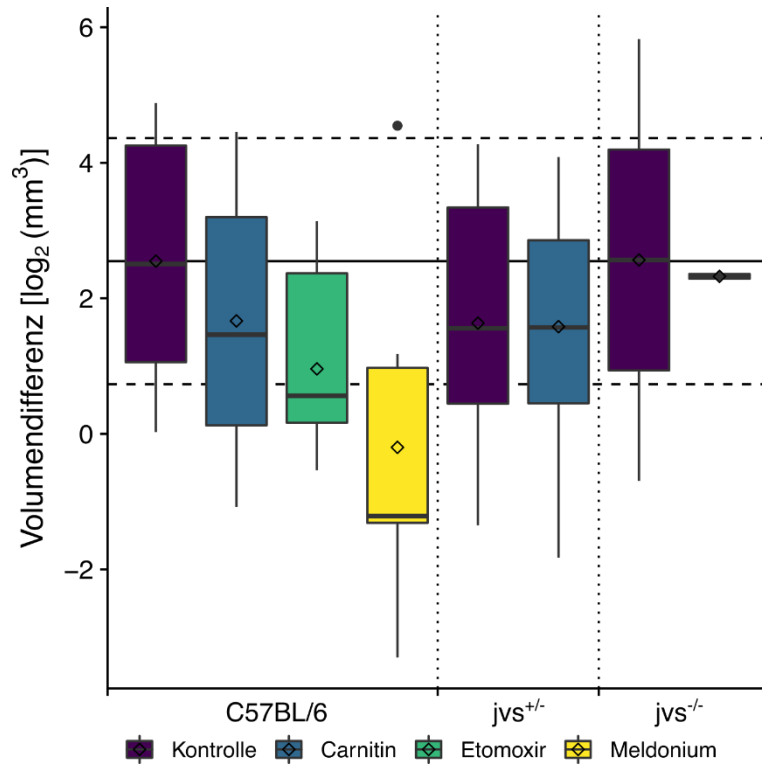


Abb. 43: Vergleich der logarithmischen Tumorumfugendifferenzen von C57BL/6 Wildtyp, jvs^{+/-}- und jvs^{-/-}-Mäusen. Darstellung der logarithmischen Tumorumfugendifferenz als Boxplot in üblicher Dimensionierung von Minimum bis Maximum mit Box von der 25. bis 75. Perzentile, waagerechtem Strich beim Median und Darstellung von Ausreißern als Punkte. Die Raute markiert jeweils den Mittelwert. Die durchgezogene horizontale Linie markiert den Mittelwert der Kontrollgruppe in C57BL/6 Wildtyp Mäusen, die gestrichelten horizontalen Linien markieren die Standardabweichung der Kontrollgruppe in C57BL/6 Wildtyp Mäusen, die gepunkteten vertikalen Linien grenzen die unterschiedlichen Versuchstiergruppen voneinander ab. Die Farbgebung der Darstellung erfolgte nach den jeweiligen Versuchsgruppen (Kontrolle, Carnitin, Etomoxir und Meldonium). Quelle: Eigene Darstellung (2023).

Maus	Substanz	n	Median log ₂ (mm ³)	Mittelwert log ₂ (mm ³)	SD log ₂ (mm ³)	Prozent der Substanzkontrolle	Prozent der C57BL/6-Kontrolle
C57BL/6	Kontrolle	10	2,51	2,55	1,82	100,0	100,0
	Carnitin	10	1,46	1,67	2,05	65,5	65,5
	Etomoxir	9	0,561	0,96	1,37	37,6	37,6
	Meldonium	9	-1,21	-0,2 *	2,31	-7,8	-7,8
jvs ^{+/-}	Kontrolle	11	1,56	1,63	2,05	100,0	63,9
	Carnitin	11	1,57	1,58	1,88	96,9	62,0
jvs ^{-/-}	Kontrolle	2	2,57	2,57	4,61	100,0	100,8
	Carnitin	2	2,32	2,32	0,1	90,3	91,0

Tab. 24: Tabellarische Darstellung der statistischen Kenngrößen über alle Versuchsarme hinweg. ANOVA mit Tukey Post-hoc-Test (* p-Wert < 0,05, n = 10 für Kontrolle, Carnitin, n = 9 für Etomoxir, Meldonium). Quelle: Eigene Darstellung (2023).

5 Diskussion

Wie bereits im Kapitel 1.1 (S. 1) ausgeführt, gestalteten sich therapeutische Fortschritte im Bereich des Glioblastoms nach wie vor schwierig und es existiert bislang keine kurative Behandlung. Den umfangreichsten Zugewinn erbringt aktuell die Therapie mit wechselnden elektrischen Feldern, mit der für neu diagnostizierte Glioblastome in einer Metaanalyse ein mittleres Überleben von 21,7 Monaten erreicht wurde (95%-Konfidenzintervall: 19,6 - 23,8) [136]. Darüber hinaus gab es bis dato lediglich modulierende Verfeinerungen des Therapieregimes, ohne durchgreifende Verlängerung des Gesamtüberlebens. Erschwerend für die Behandlung ist die Tatsache, dass Glioblastome eine starke Heterogenität aufweisen und ein singulärer Faktor für die Entstehung und Progression von Glioblastomen, der therapeutisch angreifbar wäre, noch nicht gefunden wurde.

Die bereits 1924 publizierten Beobachtungen von Otto Warburg, dass Tumorzellen auch in Anwesenheit von Sauerstoff die ATP-bilanziell eher ungünstige Glykolyse betreiben, zeigt schon eine früh entdeckte Verbindung des Energie- und Intermediatstoffwechsels mit neoplastischen Erkrankungen auf. Letztlich handelt es sich bei dem Warburg-Effekt um einen physiologischen Vorgang proliferativer Zellen, der aber eben wegen der äußerst hohen proliferativen Aktivität von Tumorzellen eine besondere Bedeutung in der Tumorforschung erlangt hat [47].

Auch Glioblastomzellen weisen einen tiefgreifend veränderten Energiestoffwechsel auf, der auch als „*metabolic switch*“ bezeichnet werden kann [43]. Neben den Umstellungen bei der Glukoseverwertung spielt bei Tumoren, einschließlich des Glioblastoms, auch ein veränderter Lipidmetabolismus und die Energiegewinnung mittels Fettsäureoxidation eine maßgebliche Rolle [72, 87]. Fettsäuremetabolismus sowie β -Oxidation treten zunehmend in den Fokus der Tumorforschung, da diese auch mit besonders aggressiven Phänotypen sowie einer Therapieresistenz assoziiert wurden [137, 138]. Neben der Verwendung für die Membranbiosynthese repräsentiert der Abbau von Fettsäuren mittels β -Oxidation eine effiziente alternative Energieressource im Vergleich zur Glykolyse (vgl. Kapitel 1.2, S. 8) [43]. Für den Ablauf der β -Oxidation ist L-Carnitin essentiell, welches über den zellmembranständigen Transporter OCTN2 (SLC22A5) in die Zellen aufgenommen wird.

Basierend auf der Tatsache, dass unsere Arbeitsgruppe eine signifikante Assoziation einer erhöhten Expression des Carnitin-Transporters OCTN2 mit einem schlechteren Gesamtüberleben von Patienten mit Glioblastom beobachtet hat und den Literaturdaten zur Bedeutung der β -Oxidation, ergab sich die Notwendigkeit für weitere Untersuchungen, um zugrunde liegende Effekte besser zu verstehen und die Möglichkeit einer therapeutischen Intervention mit Blockade der OCTN2 Funktion abzuklären. Im Folgenden sollen die Ergebnisse dieser Arbeit vor dem

Hintergrund der bereits bekannten Effekte und publizierten Literaturdaten diskutiert werden. Um zu erklären, wie ein schlechteres Überleben von Glioblastompatienten durch eine erhöhte OCTN2 Expression zustande kommt, sind unterschiedliche Erklärungsansätze denkbar. Eine sicherlich zentrale Frage dabei ist, ob L-Carnitin selbst eine intrinsische, zum Beispiel zytoprotektive Funktionalität zukommt. Plausibler erscheint, dass normale physiologische Vorgänge die Carnitineffekte bedingen und in Tumorzellen genutzt werden und so deren Überleben sichern. Aus der Beobachtung einer erhöhten OCTN2 Expression heraus kann nicht mit abschließender Sicherheit belegt werden, dass assoziierte Effekte überhaupt durch L-Carnitin bedingt oder damit verknüpft sind. Inwiefern tatsächlich zytoprotektive Effekte oder veränderte Migrationsprozesse hier eine Rolle spielen, soll anhand der erhobenen Daten der vorliegenden Arbeit erläutert werden.

Eine grundsätzliche Frage zur Wirkung von OCTN2 und L-Carnitin ist, welche Konzentration von L-Carnitin einen Effekt auf die jeweilige Zelle ausübt. Dabei ist die Bezugsgröße zunächst das extrazelluläre freie L-Carnitin, da das intrazelluläre L-Carnitin und seine Derivate ohnehin um ein vielfaches höher konzentriert sind [86]. In einer Arbeit von Mao et al. (2014) haben sich für L-Carnitin wirksame Konzentrationen im Bereich von 10 μM bis 2 mM erwiesen, wobei substantielle Effekte für Konzentrationen von 50 bis 200 μM gezeigt wurden [139]. Dies entspricht den in dieser Arbeit genutzten Konzentrationen von L-Carnitin. Interessanterweise konnte Yamada et al. (2012) zeigen, dass bei verringerter FCS Konzentration im DMEM Medium eine signifikant höhere intrazelluläre L-Carnitin Konzentration resultierte [140]. Im Einklang hiermit wurden die Zellkulturexperimente mit Applikation von L-Carnitin in Serumreduzierten Medium (0,05 % FCS) durchgeführt.

In der Zusammenschau ergibt sich aus den Erkenntnissen zu den Eigenschaften von OCTN2 und L-Carnitin in dieser und anderen Arbeiten ein grundsätzlicher Konflikt, welcher möglicherweise, die zugrundeliegenden Stoffwechselfunktionen maskiert. OCTN2 transportiert im Ko-transport mit Natriumionen insbesondere Zwitterionen wie L-Carnitin oder Acylcarnitin, hat darüber hinaus aber auch noch weitere Funktionen wie den Transport von organischen Kationen (z.B. TEA, Amisulprid) und nicht geladene Komponenten (z.B. Entecavir) sowie den Efflux von Acylcarnitin und den elektrogenen Transport von organischen Kationen [141]. Zu den von OCTN2 transportierten Substanzen gehören beispielsweise auch Zytostatika wie Etoposid, Oxaliplatin und Imatinib [90, 142], die allerdings nicht bei Patienten mit Glioblastom im Rahmen der Therapie eingesetzt werden. Auch wurde eine pH-abhängige Transportfunktion von OCTN2 nachgewiesen [143]. Es sind zudem auch verschiedene Regulatoren der Expression von OCTN2 beschrieben, wie beispielsweise der *peroxisome proliferator-activated receptor γ*

(PPAR γ) oder der Estrogenrezeptor [90, 144]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Transporteigenschaften von OCTN2 auch vom Cholesterolgehalt abhängen, was eine weitere Ebene der Komplexität hinzufügt, wenn die Funktionalität des Transporters derart von Umgebungsbedingungen beeinflusst wird [145]. Nun liegt der Schluss nicht weit entfernt, aus einer erhöhten Expression von OCTN2 und erhöhten Konzentrationen von L-Carnitin auf einen mechanistischen Zusammenhang mit der Überlebenszeit der Glioblastompatienten zurückzuschließen. Allgemein wird experimentell in vielen Arbeiten auf die Intervention durch Gabe von L-Carnitin zurückgegriffen. Bei den hieraus resultierenden Effekten könnte es sich jedoch auch um Nebeneffekte oder Epiphänomene handeln, welche an den eigentlichen protumorigenen Mechanismen nur einen geringen oder gar keinen Anteil haben. Diese und weitere Aspekte sollen im Kontext der in dieser Arbeit beobachteten Ergebnisse nachfolgend weiter eingeordnet werden.

5.1 Patientenbezogene Erkenntnisse zur Expression von OCTN1, CPT1C und CRAT im Glioblastom

Die Komplexität des OCTN2/L-Carnitin Systems sowie der β -Oxidation wurde im Kapitel 1.3 bereits ausführlich illustriert (vgl. Abb. 8, S. 19). Hieraus ergeben sich neben OCTN2, dessen Expression in humanen Glioblastomproben signifikant gesteigert ist, weitere relevante Proteine beziehungsweise mit der β -Oxidation assoziierte Enzyme, deren Expression im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde. Aus demselben Patientenkollektiv wie unter Fink et al. (2019) mit den dort beschriebenen Stichprobencharakteristika [95] wurden entsprechende mRNA Analysen zur Untersuchung der Expression des niedrig-affinen Carnitintransporters OCTN1 sowie von CPT1C und CRAT, die eine essentielle Rolle beim mitochondrialen Carnitin-*Shuttle* spielen, durchgeführt. Ziel war es herauszufinden, ob diese Gene ebenfalls im Glioblastomgewebe verändert exprimiert sind oder einen Einfluss auf das Überleben der Patienten haben (vgl. Kapitel 4.1.1, S. 56). Interessanterweise zeigte sich in den Glioblastomproben eine circa 11-fach erhöhte Expression für OCTN1 verglichen mit den nichtmalignen Kontrollhirngeweben. Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass eine große interindividuelle Streuung hinsichtlich der OCTN1 mRNA-Expression in den Patientenproben vorlag. In der Überlebenszeitanalyse zeigte sich jedoch kein Überlebensvorteil oder -nachteil einer hohen beziehungsweise niedrigen OCTN1 Expression. Im Umkehrschluss lässt dies die Annahme zu, dass die in Vorarbeiten beobachtete erhöhte OCTN2 Expression maßgeblich im Hinblick auf Carnitin-vermittelte Effekte sein muss und zu dem daraus resultierenden Überlebensnachteil der Patienten führt. Für die zusätzlich untersuchten, mit der β -Oxidation assoziierten Gene (CRAT, CPT1C), ergab sich auf Basis der mRNA Expressionsanalysen kein Unterschied zwischen Glioblastomgewebe und nichtmalignem Kontrollhirngewebe sowie kein Einfluss auf das Überleben der Patienten,

sodass diese eher unwahrscheinlich die steuernde Schlüsselposition in der Progression des Glioblastoms darstellen. Basierend auf den hier gezeigten Ergebnissen und Analysen sowie in Ergänzung zu den publizierten Befunden bezüglich der Expression von CPT1A und OCTN2 [95], kann letztlich eine experimentelle Fokussierung auf OCTN2 als primäre Zielstruktur innerhalb des betrachteten Stoffwechselbereiches angenommen werden. Die Ergebnisse hinsichtlich des Überlebensnachteils von Patienten mit hoher OCTN2 Expression wurden in einer neueren Studie mittels Analysen von Datenbanken auf mRNA und Proteinebene bestätigt [96]. Interessant erscheint in diesem Kontext auch eine Arbeit von Sperry et al. (2020), in welcher die Expression von CPT1A über einen *small hairpin RNA* (shRNA) *Knockdown* vermindert wurde. Dort zeigten die Versuchstiere bei Ausschaltung von CPT1A, dem geschwindigkeitslimitierenden Enzym der Fettsäureoxidation, ein signifikant reduziertes Tumorwachstum und längeres Überleben als die Kontrolltiere, was zunächst einmal nicht im Einklang mit den humanen Daten unserer Arbeitsgruppe steht [71]. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Wichtigkeit der weiteren Bestandteile des OCTN2/L-Carnitin Systems und der damit eng verbundenen β -Oxidation nicht zwingend über die native Expression einzelner Komponenten erklärbar sein muss, sondern auch über ihre Bedeutung im Gesamtprozess und ihrer potenziellen therapeutischen Beeinflussung betrachtet werden muss. So könnte die Beeinflussung der CPT1A-assoziierten β -Oxidation einen Teilaspekt von durch OCTN2 und L-Carnitin bedingten Effekten darstellen, welcher natürlicherweise nicht isoliert für sich vorkommt.

5.2 Tumorzelllinien-basierte Erkenntnisse aus *in vitro* Untersuchungen zur Bedeutung des OCTN2/L-Carnitin Systems und der β -Oxidation im Glioblastom

Tumorzelllinien stellen als Model des eigentlichen Tumors einen relevanten Anteil der Tumorforschung dar. Im Bereich der Tumorforschung allgemein und der Glioblastomforschung im Speziellen haben sich Zelllinien als wertvolles Werkzeug zur Erforschung biologischer Mechanismen und therapeutischer Interventionen bewährt [95, 103, 146–148]. Um eine mechanistische Aufklärung hinsichtlich beteiligter pro-tumorigener Signalwege des aktiven, durch OCTN2 in die Zelle transportierten L-Carnitins zu entschlüsseln, wurde daher in der vorliegenden Arbeit auf Glioblastomzellmodelle zurückgegriffen. Vorteile einer 2D-Zellkultur sind zudem die Homogenität der Zellen, die kommerzielle Verfügbarkeit und leichte Durchführung von Screenings für Medikamenteneffekte. Modelle mit Tumorzelllinien bergen aber auch Nachteile, wie beispielsweise genotypische und phänotypische Variation, sehr unterschiedliche Wachstumsbedingungen und Veränderungen unter *in vitro* Bedingungen, welche die Repräsentation des ursprünglichen Tumors beeinträchtigen [149, 150]. Diese Distanz zu originären Tumoren zeigt sich auch in dem fehlenden Mikroenvironment und einer reduzierten genetischen

Heterogenität verglichen mit nativen Tumoren [151]. Dementsprechend ist vor Durchführung von Zellkulturexperimenten zunächst eine Überprüfung auf das Vorhandensein des zu untersuchenden Zielsystems, hier dem Carnitintransporter OCTN2, mittels geeigneter qualitativer Nachweise erforderlich.

Mittels des in dieser Arbeit angewandten Western Blot Verfahrens wurde ersichtlich, dass die Proteinexpression von OCTN2 in allen untersuchten Gliom- und Glioblastomzelllinien konserviert vorhanden ist, jedoch hinsichtlich des Proteingehalts durchaus Schwankungen bestehen können. Auch in einem exemplarisch analysierten Proteinlysat primärer Glioblastomzellen konnte OCTN2 auf der Höhe der mitgeführten Positivkontrolle (Membranvesikel humaner Plazenta) bei etwa 63 kDa nachgewiesen werden (vgl. Abb. 15, S. 58). Dies deckt sich mit bereits veröffentlichten Daten [95]. Es kann also davon ausgegangen werden, dass OCTN2 in Glioblastomzellen exprimiert wird und damit in allen der dargestellten Zellen die OCTN2 vermittelten Effekte auf die Tumorbilogie untersucht werden können. Aufgrund der unterschiedlich starken Expression von OCTN2, aber auch der interindividuellen Unterschiede in der genetischen Ausstattung der Zelllinien, können jedoch Divergenzen in Effekten beziehungsweise der tatsächlichen Aktivität eines oder mehrerer verknüpfter Signalwege nicht ausgeschlossen werden.

Neben dem Nachweis von OCTN2 mittels Western Blot, erfolgte ergänzend der qualitative Nachweis des Carnitintransporters in Immunfluoreszenzfärbungen von murinen GL261 Zellen (vgl. Abb. 16, S. 59), welche auch in den *in vivo* Untersuchungen im orthotopen Mausmodell zum Einsatz kamen. In weiteren Versuchen (nicht dargestellt) und in der Literatur konnte dieser Nachweis von OCTN2 auch für humane Glioblastomzellen erbracht werden [96]. Bei den durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen war unerwarteterweise keine eindeutige membranständige Lokalisation von OCTN2 in den untersuchten Zellen nachweisbar. Eine ähnliche Beobachtung mit intrazellulärer Lokalisation von OCTN2 wurde auch in der von Juraszek et al. (2021) publizierten Studie an verschiedenen humanen Glioblastomzellen gemacht [96] und zuvor im Kontext der OCTN2VT Variante beschrieben [79]. Denkbar wäre auch eine divergierende Translokation in die Zellmembran bei unterschiedlich glykosylierten Formen von OCTN2, wobei für OCTN2 tatsächlich verschiedene Glykosylierungsprozesse beschrieben sind [143, 152, 153]. Dies könnte somit für die partielle intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung von OCTN2 in den Glioblastomzellen verantwortlich sein. Eine weitere Erklärung für die intrazelluläre Färbung von OCTN2 könnte auch, wie zuvor bereits erwähnt, auf dem Vorliegen der Splicevariante OCTN2VT basieren, für die eine intrazelluläre Lokalisation und ähnliche Darstellung in der Immunfluoreszenzfärbung bereits beschrieben wurde [79]. Wenig

Informationen existieren derzeit über die Splicevariante OCTN2VT, die eine Insertion von 24 Aminosäuren in der ersten extrazellulären Schleife aufweist und im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist [79, 154]. Ob und inwiefern im Endoplasmatischen Retikulum oder in anderen intrazellulären Membranen lokalisierte OCTN2 Varianten funktional sind, verbleibt bislang unklar. Wie bereits erläutert, fiel in neueren Untersuchungen in Gliomzelllinien vielfach eine intrazelluläre OCTN2-Lokalisation auf. Außerdem war in diesen Studien ersichtlich, dass nur der zellmembranständige Anteil von OCTN2 mit einer stärkeren Transportaktivität von L-Carnitin einherging [96]. Die zelluläre Lokalisation von OCTN2 wirft zusätzliche Fragen auf, da eine weitere Ebene der Komplexität hinzukommt, wenn nicht nur zellmembranständiges OCTN2, sondern unter Umständen auch verschiedene intrazellulär lokalisierte Varianten des Transporters, divergierende Transportaktivität zeigen sowie unterschiedliche Effekte vermitteln und die Dynamik der Lokalisation von OCTN2 noch unverstanden ist. Sollten die intrazellulären OCTN2 Transporter ebenfalls funktionstüchtig sein, so würde sich eine vielfältige Beeinflussung der Zellkompartimente und des Zellstoffwechsels ergeben.

Der Nachweis von OCTN2 in Zelllinien lässt die Annahme zu, dass es sich hierbei um geeignete Modelle handelt, um OCTN2 assoziierte Prozesse zu untersuchen, da zudem bereits die Möglichkeit der pharmakologischen Hemmung des L-Carnitin Transportes gezeigt wurde [95, 96].

Als relevante Eigenschaften von Tumoren allgemein und dem Glioblastom im Speziellen, wurden Alterationen von intrazellulären Signalkaskaden, welche Einfluss auf Proliferation, Zellmigration, Zellüberleben und Angiogenese haben, untersucht. Hierzu wurden die MAP-Kinasen ERK1/2 und der PI3K/AKT1 Signalwege [155] und deren Beeinflussung durch Applikation von L-Carnitin zu definierten Zeitpunkten anhand des Nachweises des Phosphorylierungsgrades von ERK1/2 und AKT1 mittels Western Blot untersucht.

Hier zeigte sich, dass keine signifikante Alteration des ERK1/2 Signalweges durch L-Carnitin nachgewiesen werden konnte. Allerdings ergab sich bei einer Kurzzeitinkubation mit L-Carnitin über zehn und 30 Minuten tendenziell eine geringere Phosphorylierung und damit Aktivierung von ERK1/2, während sich nach sechs und 24 Stunden im Mittel aller L-Carnitin Konzentrationen eine diskrete Phosphorylierung beziehungsweise Aktivierung dieser Kinasen zeigte. Für die Inkubation mit 250 μ M und 500 μ M L-Carnitin ergaben sich hier die ausgeprägtesten Effekte mit 139 % (\pm 66 %) und 186 % (\pm 64 %) der Kontrolle (vgl. Kapitel 4.2.2, S. 59). In der Zusammenschau ergibt sich zunächst keine konkrete Erklärung für die beobachteten divergierenden Effekte im Kurzzeitbereich oder nach längerfristiger Einwirkung von L-Carnitin. Es bleibt fraglich, ob es einen unmittelbaren Effekt von L-Carnitin auf den ERK1/2

Signalweg gibt oder ob die Ergebnisse sekundäre Folge anderer Mechanismen sind. Die Testung weiterer und auch längerer Inkubationszeiten könnte zur Entschlüsselung der Zusammenhänge beitragen, wobei auch eine Reduktion der Streuung durch zum Beispiel eine größere Stichprobe erstrebenswert wäre. Kritisch anzumerken ist an dieser Stelle, dass bedingt durch Probleme mit den eingesetzten Antikörpern kein spezifischer Nachweis von unphosphoryliertem ERK1/2, welcher den gesamten Proteingehalt von ERK1/2 in der Zelle repräsentiert, gelungen ist, sodass eine Normalisierung lediglich auf β -Actin vorgenommen werden konnte. Dies ist insofern kritisch, da somit nicht beurteilt werden kann, ob Änderungen im Phosphorylierungsgrad der Kinasen auf Alterationen in der Proteinexpression beruhen.

In der Untersuchung des Einflusses von L-Carnitin auf die Aktivierung des AKT1 Signalweges zeigten sich hingegen signifikante Effekte. So lag sowohl nach zehn Minuten als auch sechs Stunden eine um etwa ein Viertel erniedrigte AKT1 Phosphorylierung für 250, 500 und 1.000 μ M L-Carnitin vor. Interessanterweise kehrten sich die Effekte nach einer Inkubation für 24 Stunden um, sodass entweder eine Normalisierung auf das Kontrollniveau auftrat oder sogar eine signifikant stärkere Phosphorylierung von AKT1, unter Inkubation mit 1.000 μ M L-Carnitin, im Vergleich zur Kontrollbedingung zu verzeichnen war. Erwähnt werden muss hier, dass typische extrazelluläre L-Carnitin Konzentrationen bei etwa 50 μ M liegen, wobei für Gewebe wie Muskulatur und Leber ca. 50-fach bis 75-fach höhere Konzentrationen (entspricht 2.500 μ M bis 3.750 μ M) beschrieben sind [86]. Es ist bekannt, dass L-Carnitin teilweise erst in hohen Konzentrationen bis 2.000 μ M signifikante Effekte hervorruft, wobei experimentell zu meist Konzentration von 50 μ M bis 200 μ M verwendet werden [139]. Auch scheint eine von der extrazellulären L-Carnitin- oder Serumkonzentration abhängige Dynamik zwischen intrazellulärem und extrazellulärem L-Carnitin zu bestehen, wobei die zugrunde liegenden Mechanismen hier noch nicht vollständig verstanden sind [140]. Basierend auf der Dynamik der Ergebnisse bei unterschiedlicher Inkubationsdauer ist es folglich aber naheliegend, kurzzeitige und längerfristige Effekte von L-Carnitin zu unterscheiden. Weiterhin ist bilanziell von einem divergenten Energieumsatz unter den längeren Inkubationsbedingungen auszugehen, sodass sich hier möglicherweise andere Umgebungsbedingungen für die Zellen eingestellt haben und dadurch andere Aktivierungsmuster wichtiger Signalwege resultieren. Längere Inkubationszeiten entsprechen damit möglicherweise eher Bereichen eines Tumors, in denen ein Nährstoffmangel herrscht, wie es zum Beispiel im Tumorzentrum der Fall sein müsste [156]. Sowohl ERK1/2 als auch AKT1 spielen in der Tumorbilogie und Pathogenese des Glioblastoms eine nachgewiesene Rolle [155]. Dass sich diese Signalwege einer Alteration durch die Gabe von L-Carnitin, welches in Glioblastomzellen zytoprotektive Effekte entfaltet, zugänglich zeigen, könnte dessen Bedeutung für die Glioblastombiologie unterstreichen. Zudem ist eine

Assoziation dieser beiden Signalwege mit Zellseneszenz beschrieben [157] und könnte damit möglicherweise den zugrunde liegenden Mechanismus der antiapoptotischen und zytoprotektiven L-Carnitin Effekte erklären.

Die Apoptose selbst ist ein komplexer Vorgang in Zellen, welcher über einen intrinsischen und extrinsischen Pfad gesteuert werden kann. Gemeinsamer Bestandteil ist die Aktivierung der Caspase-3, welche als Protease intrazelluläre Zellkomponenten zerlegt. Daher eignet sich die Messung der Caspase-3 Aktivität zur Quantifizierung apoptotischer Prozesse in der Zellkultur [158].

Bei der Untersuchung der Caspase-3 Aktivität und einer Modulation durch L-Carnitin konnte nach Zugabe verschiedener proapoptotischer Agenzien von schwacher bis starker Aktivierung der Caspase-3 ein breites Spektrum beobachtet werden (vgl. Abb. 19 A, S. 64). Unter starkem Apoptosedruck konnten auf Basis der Versuchsreihe mit dem Zytostatikum Doxorubicin keine ausgeprägten *Rescue*-Effekte durch L-Carnitin hervorgerufen werden, sodass mit den weiteren eingesetzten Substanzen (Carmustin, Temozolomid, Vincristin und Wasserstoffperoxid) eine Caspase-3 Aktivierung im unteren bis mittleren Bereich anvisiert wurde. Hierbei zeigte sich für das beim Glioblastom standardmäßig angewandte Zytostatikum Temozolomid bei gleichzeitiger Applikation von 50 μM und 100 μM L-Carnitin eine leicht reduzierte Caspase-3 Aktivität, wobei dieser Effekt nicht signifikant war. Ein ähnliches Muster ergab sich für die apoptotische Stimulation mit 100 μM Carmustin, einem ebenfalls beim Glioblastom eingesetzten Nitrosostoffderivat [159, 160]. Jedoch zeigte sich interessanterweise eine signifikante Reduktion der Carmustin-induzierten Caspase-3 Aktivität unter gleichzeitiger Gabe von 50 μM L-Carnitin. Der reduzierende Effekt auf die Carmustin-induzierte Caspase-3 Aktivität war auch für 100 und 500 μM L-Carnitin ersichtlich, aber aufgrund der Streuung statistisch nicht signifikant. Bei Verwendung höherer Konzentrationen an Temozolomid und Carmustin (jeweils 250 μM) konnte hingegen kein protektiver Effekt von L-Carnitin mehr beobachtet werden. Es ließ sich bei der Gabe von L-Carnitin auch keine klare Dosis-Wirkungs-Beziehung auf die Apoptose der untersuchten Zellen nachweisen. Dass sich eher protektive Effekte bei geringerem Apoptosedruck zeigen, erscheint plausibel, da eine vollständig angelaufene Caspasekaskade sich gegenseitig verstärkt und schwieriger zu unterbrechen sein dürfte. Insgesamt betrachtet, konnte der eigentlich erwartete und beschriebene antiapoptotische Einfluss von L-Carnitin [161, 162] nur bedingt nachgewiesen werden. Ein divergenter Effekt könnte sich allerdings ergeben, wenn innerhalb der heterogenen Zellpopulation des Glioblastoms auf Zellen mit Stammzeleigenschaften fokussiert wird [163]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur adhären-

Glioblastomzellen kultiviert, ein geeignetes Modell zur Untersuchung von stammzellartigen Glioblastomzellen wäre die Kultivierung als dreidimensionale Neurosphären [151].

Die ausgeprägte Migration von Glioblastomzellen spielt für deren invasives Wachstum und die Entstehung von Rezidiven eine entscheidende Rolle, weshalb ein Teilbereich der Forschungsarbeiten die mechanistische Aufklärung und therapeutische Beeinflussung solcher Migrationsprozesse betrachtet [164–166]. Wegen der hohen Bedeutung der Migration von Glioblastomzellen für das intrazerebrale Tumorwachstum sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch eine mögliche Assoziation mit dem OCTN2/L-Carnitin System mittels Wundheilungs-Assay untersucht werden.

In der zunächst reinen Betrachtung einer Applikation von L-Carnitin auf die Migration verschiedener Glioblastomzelllinien zeigte sich kein signifikanter Einfluss, wobei die migratorische Kapazität von LN-18 und primären Glioblastomzellen stark ausgeprägt war, während die Migration von murinen GL261 Glioblastomzellen unter den experimentellen Bedingungen nur sehr gering ausfiel. Dies könnte zum Beispiel durch eine erhöhte Suszeptibilität von GL261 Zellen gegenüber dem zur Proliferationshemmung eingesetzten Hydroxyharnstoff begründet sein. Eine Studie von Teng et al. (2018) konnte für andere Glioblastomzelllinien, die mit Temozolomid und Hydroxyharnstoff behandelt wurden, eine Hemmung der Migration im Wundheilungsassay zeigen. Die Effekte waren insbesondere für die Kombination von Temozolomid und Hydroxyharnstoff am stärksten, es zeigten sich aber auch in Abhängigkeit von der untersuchten Zelllinie unterschiedlich stark ausgeprägte Effekte bei alleiniger Behandlung mit Hydroxyharnstoff [167]. In diesem Sinne könnte Hydroxyharnstoff auf die Zelllinie GL261 eine besonders ausgeprägte Toxizität oder Migrationshemmung entfaltet haben. Neben der gewählten Methode zur Quantifizierung von Migrationseigenschaften gibt es vielfältige weitere Migrationsassays [168, 169], die gegebenenfalls besser das Migrationsverhalten von GL261 [99, 170, 171] erfassen. In der Betrachtung von Migrationsunterschieden in LN-18 Zellen unter chemotherapeutischem Stress (Temozolomid, Carmustin) zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Effekt für die eingesetzten L-Carnitin Konzentrationen. Auffällig war allerdings ein Unterschied hinsichtlich der Migration der LN-18 Zellen unter Kontrollbedingungen, welche nach 24 Stunden einmal im Bereich von 40 - 47 % und einmal im Bereich von ca. 75 - 80 % lag. Der Unterschied zwischen den beiden experimentellen Durchgängen bestand darin, dass in der zweiten Versuchsreihe mit Applikation von L-Carnitin zusätzlich zu den Stimuli Temozolomid beziehungsweise Carmustin zum einen die Zellen nur einmal abschließend nach 24 h (statt nach 16 h und 24 h) mittels Mikroskop außerhalb des Brutschanks vermessen wurden. Zum anderen könnten eine Modulation der Zellmigration durch das zusätzlich als Lösungsmittelkontrolle

applizierte DMSO in diesem Experiment erfolgt sein. Ein stimulierender Effekt von DMSO auf die Migration von Zellen konnte bereits in anderen Studien gezeigt werden [172].

Zudem trat sowohl unter den Zytostatika Temozolomid und Carmustin als auch dem CPT1-Inhibitor Etomoxir eine Reduktion der Migration von LN-18 Zellen auf, die für Etomoxir statistisch signifikant ausfiel. Der stärkste Effekt zeigte sich für Etomoxir mit einer Reduktion auf etwa 40 % der Migrationsbewegung verglichen mit den Kontrollbedingungen (vgl. Abb. 21, S. 68). Das lässt darauf schließen, dass eine Verminderung der CPT1 Aktivität gefolgt von einer eingeschränkten β -Oxidation auch das Migrationsverhalten von Glioblastomzellen beeinflusst. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit bereits publizierten Daten, welche den negativen Einfluss einer Hemmung der β -Oxidation durch Etomoxir auf die Zellmigration konsistent darlegen. Beispielsweise konnten Peng et al. (2021) durch Etomoxir eine Hemmung von Migration und Invasion in Darmkrebsmodellen zeigen [173]. Migrationshemmende Effekte von Etomoxir konnten außerdem in Brustkrebszellen [174] und im Leberzellkarzinom nachgewiesen werden [175].

Insgesamt betrachtet kann basierend auf den Ergebnissen der Migrationsuntersuchungen kein direkter Zusammenhang mit dem OCTN2/L-Carnitin System für LN-18 Glioblastomzellen abgeleitet werden. Allerdings kann auch hier nicht ausgeschlossen werden, dass in anderen Glioblastomzelllinien oder primären Tumorzellen sowie einer Subpopulation von Zellen mit Stammzeleigenschaften ein Einfluss von L-Carnitin auf die Migration auftritt [176–178]. Zusätzlich wären Migrationsanalysen unter Applikation von Meldonium als spezifischen Inhibitor der OCTN2 Transportfunktion in weiteren Experimenten sinnvoll, um die Bedeutung dieses L-Carnitin Transporters für Migrationsprozesse zu beurteilen.

Die Zellviabilität stellt einen zentralen Messpunkt für die Beurteilung des Vitalzustands von Zellen dar, denn bei hoher Zellviabilität kann davon ausgegangen werden, dass auch Stoffwechselprozesse in Zellen besser ablaufen [147]. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die Viabilität von Glioblastomzellen mittels Resazurin-Assay im Sinne der Stoffwechselkapazität und die Zellvitalität durch Kristallviolett-Färbung im Hinblick auf den lebenden Zellanteil untersucht.

Hierfür wurden humane LN-18 Zellen und murine GL261 Zellen mit Meldonium oder Etomoxir zur Blockade der OCTN2 Transportfunktion beziehungsweise der β -Oxidation in An- und Abwesenheit von 50 μ M oder 100 μ M L-Carnitin inkubiert. Unter Verwendung von Glukose-reichem DMEM-Medium (4.500 mg/l Glukose, 0,05 % FCS) zeigte sich, dass die Zellviabilität von LN-18 Zellen nach 72 h Behandlung mit 25 μ M Meldonium beziehungsweise Etomoxir signifikant verringert wurde. Dieser Effekt wurde durch die gleichzeitige Gabe von

50 μM oder 100 μM L-Carnitin aufgehoben. Bezogen auf die Zellvitalitätsbestimmung mittels Kristallviolett-Färbung ergaben sich keine signifikanten Effekte der eingesetzten Substanzen. Das spricht dafür, dass Meldonium und Etomoxir die LN-18 Zellzahl nicht beeinflusst haben, jedoch deren metabolische Aktivität unter Einbeziehung NADPH-abhängiger Enzyme beeinträchtigen. Die gleichen Analysen an den murinen GL261 Zellen, kultiviert in DMEM-Medium, zeigten hingegen die in humanen LN-18 Zellen beobachtete Reduktion der Zellviabilität durch Meldonium und Etomoxir nicht. Somit kann postuliert werden, dass es zelltyp-abhängige Unterschiede in der Beeinflussung des Stoffwechsels durch Meldonium und Etomoxir gibt. Bei der Verwendung von Glukose-ärmeren MEM-Medium (1.000 mg/ml Glukose, 0,05 % FCS) zeigte sich für GL261 Zellen interessanterweise ein ähnliches Ergebnis wie bei den LN-18 Zellen in DMEM-Medium. Es konnte eine signifikante Reduktion der GL261 Viabilität nach 48 h unter Gabe von Meldonium beziehungsweise Etomoxir nachgewiesen werden. Die zusätzliche Applikation von L-Carnitin bewirkte eine Revertierung der durch Meldonium und Etomoxir ausgelösten Abnahme der Zellviabilität auf das Kontrollniveau. Auch die Zellvitalität der murinen GL261 Zellen wurde durch Meldonium und Etomoxir reduziert, was für Meldonium auch statistisch signifikant war. Jedoch konnten diese Effekte nicht durch L-Carnitin revertiert werden. Neben der geringeren Glukoseverfügbarkeit zeigte sich der Effekt in den GL261 Zellen auch bereits nach 48 h, was zum einen mit dem Energiegehalt und zum anderen mit der zellindividuellen Stoffwechselrate zu tun haben könnte. Die erhobenen Befunde zum Einfluss von Etomoxir auf die Viabilität von Glioblastomzellen stehen im Einklang mit bereits publizierten Daten [71, 96]. Im Gegensatz dazu liegen bislang keine veröffentlichten Studien zum Einfluss von Meldonium auf das *in vitro* Wachstumsverhalten von Glioblastom- oder anderen Tumorzellen vor.

Zusammenfassend ergeben sich je nach verwendeter Zelllinie und Umgebungsmilieu in Form des Kulturmediums unterschiedliche Einflüsse einer Hemmung von OCTN2 durch Meldonium beziehungsweise einer Hemmung der β -Oxidation durch Etomoxir auf den Tumorstoffwechsel. In einer Studie von Aftab & Shakoori (2019) zeigten sich abhängig von hohen (4.500 mg/l) und niedrigen (1.000 mg/l) Glukosekonzentrationen im DMEM-Medium signifikante Effekte auf Glioblastomzellen, mit besserem Zellüberleben und stärkerer Zelladhäsion bei hohen Glukosekonzentrationen und andererseits verstärkter epithelial-mesenchymaler Transition und veränderter Expression von strukturellen und regulatorischen Genen bei niedrigen Glukosekonzentrationen [179]. Auf ähnliche Weise zeigt die Arbeit von Bielecka-Wajdman et al. (2022) unterschiedliche Effekte auf die Zellviabilität und Zellproliferation in primären Glioblastomzelllinien abhängig von der verwendeten Glukosekonzentration [180]. Die spezifischen Ursachen hierfür benötigen weitere Untersuchungen. Die Anpassung des Stoffwechsels

an veränderte Umgebungsbedingungen beziehungsweise das Tumormikromilieu im Rahmen des sogenannten *lipidomic remodelling* erscheint jedoch plausibel. Die dargelegten Ergebnisse zeigen mechanistisch verknüpfte Effekte, sodass es unwahrscheinlich erscheint, dass es sich um bloße Epiphänomene handeln könnte. Da Zellkulturexperimente zwar einen hohen Standardisierungsgrad aufweisen, aber dadurch immer nur ausschnittsweise bestimmte homöostatische Situationen darstellen können, weisen die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse auf die Notwendigkeit einer Überprüfung der Wirkung von Meldonium und Etomoxir im lebenden Organismus hin. Nur im lebenden Organismus ergibt sich eine realistische Stoffwechseldynamik sowie die Einbeziehung der Mikroumgebung und damit ein komplexeres Zusammenspiel unterschiedlicher Zelltypen, mit zwar weniger kontrollierbaren Faktoren, aber der robusteren Überprüfbarkeit relevanter Zielstrukturen.

5.3 Tierexperimentelle Erkenntnisse zum Einfluss von L-Carnitin, Meldonium und Etomoxir auf das *in vivo* Glioblastomwachstum

Da ein wesentlicher Nachteil von Tumorzellmodellen die fehlende physiologische Komplexität und Interaktion unterschiedlicher Zelltypen darstellt, können *in vitro* Studien stets nur Hinweise auf anti- oder pro-tumorigene Wirkungen von Substanzen oder Proteinen geben. Diese müssen anschließend an einem intakten Organismus verifiziert werden, um eine detailliertere Beurteilung der Wirksamkeit von Substanzen zu erzielen. Um experimentell gewonnene Ergebnisse aus der Grundlagenforschung auch der therapeutischen Medizin zugänglich zu machen, sind derzeit Tiermodelle unabdingbar. Hierdurch wird die potentiell bestehende Diskrepanz zwischen *in vitro* Experimenten und realen Krankheitsprozessen überwunden [127]. In einer Analyse von 47 Studien wurden verschiedene Tumormodelle des Gehirns in der Maus identifiziert. Davon entfielen 91 % auf aus Zelllinien abgeleitete Tumoren, 15 % auf genetisch modifizierte Mäuse und 6 % auf aus Patientenmaterial abgeleitete Tumoren. Die große Mehrzahl der eingesetzten Tumormodelle basiert somit auf Zelllinien. Die selteneren genetisch modifizierten Organismen oder aus Patientenmaterial abgeleiteten Modelle gehen mit einem erhöhten finanziellen und methodischen Aufwand einher, können dafür aber sicherer bestimmte Tumorcharakteristika abbilden [127]. In einer Zusammenfassung der etablierten Mausmodelle für die Erforschung von Glioblastomen wurden genetisch modifizierte, *xenograft*, *allograft*, viralvermittelte und chemisch induzierte Mausmodelle genauer beleuchtet. Von 20 betrachteten genetisch modifizierten Mausmodellen konnten nur vier sicher dem WHO Grad IV zugeordnet werden. Weitere sieben Modelle entsprachen partiell dem gewünschten Tumorgrad im Sinne eines Glioblastoms. Darunter waren verschiedenste transgene Modelle mit unterschiedlichen *Knockouts* und *Knockins*. Unter den betrachteten 16 *xenograft* und *allograft* Mausmodellen waren lediglich zwei *allograft* Modelle, eines hiervon das auf der GL261 Zelllinie basierende

Modell [181]. Die Zelllinie GL261 als häufig verwendetes Tumormodell in der Maus geht auf die chemische Tumorinduktion mit der karzinogenen Substanz 20-Methylcholanthren in Studien von Seligman et al. (1939) zurück [181]. Das mit der zerebralen Implantation von GL261 Zellen assoziierte Glioblastommodell wurde bereits umfassend in der Literatur beschrieben, wobei relevante Eigenschaften hier nochmals auszugsweise dargestellt werden sollen [98, 99]. Da es sich bei dem GL261 Modell um ein allogenes Mausmodell handelt, kann hierbei ein intaktes Immunsystem als Modellbestandteil erhalten bleiben. Dies könnte für die Abbildung der Interaktion zwischen Tumor und Immunsystem wichtig sein. Neben dieser Eigenschaft imitiert das GL261 Modell viele Eigenschaften von humanen Glioblastomen, wobei dies insbesondere für invasive Eigenschaften und Angiogenese gilt. In histologischen Untersuchungen zeigen durch GL261 gebildete Tumoren unscharfe Grenzen und leicht erkenntliche Invasion in das umliegende Gewebe und bilden eine zum humanen Glioblastom ähnliche Histopathologie aus [99, 182, 183]. Im direkten Vergleich humaner Glioblastome mit GL261 induzierten Hirntumoren der Maus zeigt sich eine ähnliche anaplastische Zelleigenschaft, Proliferation, Nekrose mit Pseudopalisaden aus Tumorzellen und Angiogenese. Auch der Ursprung aus Gliazellen wurde bei den GL261 basierten Hirntumoren immunhistochemisch durch *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) und S-100 Protein nachgewiesen. Der immunhistochemische Nachweis einer hohen Zellproliferation wurde bei GL261-Tumoren ebenso gezeigt [99]. Der invasive Charakter des humanen Glioblastoms findet sich auch bei dem GL261 Hirntumormodell mit invasiv wachsenden Tumorrändern, Zellpallisaden entlang von Blutgefäßen und zeigt auch eine ähnliche Proteinexpression von VEGF. Auch der Signalweg über PI3K-AKT ist im Glioblastom sowohl in humanen wie auch in murinen GL261-Tumoren in ähnlicher Weise alterniert und zeigt eine Aktivierung [99]. Bildgebende Verfahren, insbesondere die Magnetresonanztomographie, zeigen sich sowohl in der klinischen Praxis wie auch im tierexperimentellen präklinischen Einsatz als adäquates Tool zur Darstellung des Tumorwachstums *in vivo*. Hier konnten gute Korrelationen für den Vergleich zwischen Mensch und Maus hinsichtlich Bildgebung (Computertomographie, Magnetresonanztomographie) und Histologie gezeigt werden [183, 184]. Im Bereich der Behandlung von Glioblastompatienten gehört die Bestrahlung zur Standardbehandlung und zeigt auch im Vergleich der Strahlensensibilität von humanen und murinen GL261 Glioblastomen eine ähnliche Radioresistenz [99, 184]. Ein Vorteil des syngen GL261 *allograft* Modells ist die unveränderte, arteigene Immunkompetenz im Gegensatz zu vielen *xenograft* Modellen mit notwendigerweise eingeschränkter oder aufgehobener Immunkompetenz [127]. Durch die orthotope Tumorinduktion ist von einem erhaltenen Mikroenvironment auszugehen, welche die orthotopen Spezifika des Tumorwachstums im Wechselspiel mit dem umgebenden, gesunden Gewebe respektiert. Das Mikroenvironment und tumorspezifische

Veränderungen der Blut-Hirn-Schranke zeigen sich beim Glioblastom als besonders bedeutend, sodass eine adäquate Repräsentation dieser Umstände im Tiermodell sinnvoll erscheint [149].

Anhand der vorangegangenen Ausführungen wird deutlich, dass das orthotope GL261 Maus-tumormodell ein geeigneter Kandidat zur experimentellen Überprüfung von Hypothesen zum Glioblastom darstellt. Wie bei jedem Tiermodell kann nur ein Anteil des abzubildenden humanen Systems erfasst werden kann. In vielen Kernmerkmalen repräsentiert das GL261 Glioblastommodell jedoch das Zielsystem in hinreichender Qualität. Zusammenfassend handelt es sich um eine verbreitete, gut untersuchte und etablierte Methode zur Erforschung von Glioblastomen [95, 98, 99, 103].

In den nachfolgend dargestellten Ergebnissen, welche bereits anteilig publiziert wurden [95], und durch Vorerfahrungen der Arbeitsgruppe mit dem genutzten Tiermodell hat sich stets eine gute Verträglichkeit der Versuchsanwendung für die Versuchstiere gezeigt [103], sodass mit der genutzten Methode ein praktisches und allgemein verwendbares, experimentelles Instrument für die Überprüfung von pharmakologischen Interventionen *in vivo* gegeben ist. Für eine spezifischere Abbildung bestimmter Tumoreigenschaften wären unter Umständen PDX (PDX, *patient-derived xenografts*) beziehungsweise GEM Modelle (GEM, *genetically engineered mouse*) geeignetere Methoden. Diese gehen jedoch mit einem hohen methodischen und finanziellen Aufwand einher, sodass sich hier Limitationen in der Umsetzung solcher Methoden ergeben [127].

Oftmals existieren teilweise sehr große Probleme der Translation von im Tiermodell gewonnenen Erkenntnissen auf den Menschen. So werden teils Quoten von weniger als acht Prozent erfolgreicher Übertragung der Ergebnisse von präklinischer Tumorforschung auf Behandlungen im Menschen berichtet [185], wobei dies aber nicht bedeutet, dass sich durch Tierversuche kein Erkenntnisgewinn ergibt. In jüngerer Vergangenheit wurde intensiv geforscht, in welcher Hinsicht sich Maus und Mensch unterscheiden, um besser zu verstehen unter welchen Bedingungen Mausmodelle geeignete Nachbildungen der humanen Physiologie und Pathophysiologie sein können [186]. Zwar gibt es genetisch erhaltene Ähnlichkeiten in der Struktur der Gene zwischen Maus und Mensch, aber auch sehr viele Ebenen des genetischen Codes und seiner Transkription, durch die sich Unterschiedlichkeiten manifestieren können. Vor dem Hintergrund von technisch-methodischen Bias können hier nur teilweise Gemeinsamkeiten und Unterschiede herausgearbeitet werden [186]. Speziell was das Gehirn betrifft, gibt es jüngere, sehr umfassende Untersuchungen, die konservierte Zelltypen mit teils abweichenden Eigenschaften in menschlichen und murinen Gehirn zeigen [187]. Insbesondere für Gliome ist vor allem die Betrachtung der nichtneuronalen Zellen von Relevanz. Hier konnte gezeigt werden, dass es

ähnliche Typen von nichtneuronalen Zellen in Mäusen und Menschen gibt, die jedoch teilweise starke Expressionsunterschiede verschiedener Gene aufweisen. Der größere Anteil dieser starken Expressionsunterschiede entfällt jedoch auf Endothelzellen und Mikroglia, nichtsdestotrotz bestehen auch Expressionsunterschiede bei Astrozyten [187]. In der Zusammenschau der Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen humanen und murinen Astrozyten beziehungsweise Glioblastomen muss geschlussfolgert werden, dass eine direkte, unmittelbare Übertragbarkeit von einer auf die andere Spezies nicht zwingend gegeben sein muss. Durch umfassende Überschneidungen der Tumoreigenschaften von GL261-Tumoren mit humanen Glioblastomen kann aber zumindest von einer teilweisen Übertragbarkeit ausgegangen werden [99]. Zur Verifizierung von in GL261-Tumoren gewonnenen Erkenntnissen könnte daher vor einer ersten klinischen Anwendung am Menschen eine zusätzliche Überprüfung mittels weiterer Tiermodelle stattfinden. So können in PDX Modellen humane Glioblastomzellen verwendet werden. Nachteilig könnte hier jedoch die notwendige Verwendung immundefizienter Mäuse sein, da so das Wechselspiel von Tumorzellen mit Immunzellen, welches beim Glioblastom von Bedeutung ist [170], nicht im Modell abgebildet werden kann. Auch sogenannte GEM Modelle, bei denen durch die Einführung genetischer Mutationen eine Assoziation mit bestimmten humanen Erkrankungen erzeugt werden kann, stellen eine spezifische tierexperimentelle Option dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde, wie zuvor beschrieben, ein syngenes, orthotopes Glioblastommodell der Maus mit stereotaktischer Implantation von murinen GL261 Zellen in das Gehirn der Mäuse genutzt. Die zur stereotaktischen Injektion eingesetzten GL261 Zellen wurden sorgfältig kontrolliert und es zeigte sich bei ihrer anschließenden Kultivierung eine erhaltene normale Zellfunktion und erhaltene Sterilität trotz der zwischenzeitlichen Manipulation und Lagerung auf Eis, sodass hieraus kein negativer Einflussfaktor für die induzierten Tumoren konstituiert werden kann. Außerdem konnte bei der Untersuchung der verschiedenen Testsubstanzen (L-Carnitin, Meldonium, Etomoxir) insgesamt auch bei großen Tumoren eine gute Verträglichkeit mit einer geringen Belastung der Versuchstiere beobachtet werden. Die Belastung der Tiere korrelierte dabei gut mit der Tumorgroße. Für einen substanzspezifischen Einfluss auf die Belastung der Versuchstiere fanden sich keine Anhaltspunkte im hier durchgeführten Tierversuch. Vielmehr wäre bei Substanzen, die ein Tumorwachstum fördern, durch die damit einhergehende antizipierbare Belastung Vorsicht geboten [188].

Der eigentliche Zielparameter des durchgeführten Tierversuchs stellte die Untersuchung des Einflusses von L-Carnitin, Meldonium und Etomoxir auf das *in vivo* Glioblastomwachstum dar. L-Carnitin selbst ist als Nahrungsergänzungsmittel auch für Menschen frei verfügbar und unterliegt keinen medizinischen Regularien der amerikanischen U. S. Food and Drug

Administration (FDA) oder der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA), sodass für die Einschätzung der Sicherheit der Substanz im Menschen auf andere wissenschaftliche Literatur mit teils unterschiedlichen Ergebnissen zurückgegriffen werden muss, wobei der Substanz eine breite Verträglichkeit zugesprochen wird [189]. Meldonium besitzt keine FDA Zulassung und wird wegen missbräuchlicher Verwendung durch Sportler kritisch diskutiert [190]. Wegen der missbräuchlichen Verwendung im Sport wurde Meldonium 2016 durch die Welt-Anti-Doping-Agentur (WADA) als verbotener Wirkstoff auf die Dopingliste gesetzt. Durch die strukturelle Ähnlichkeit zu L-Carnitin und dem Vorläufer γ -Butyrobetain wirkt Meldonium als kompetitiver Inhibitor von Carnitin-Transportern, einiger Enzyme der β -Oxidation und der L-Carnitin Biosynthese. Neben der ursprünglich beabsichtigten Modulation der β -Oxidation zur Steigerung der Glykolyse, um eine optimalere Nutzung von Sauerstoff zu bewirken, finden sich verschiedene andere Wirkeffekte in präklinischen und teilweise in klinischen Studien wieder [191]. Pharmakologisch betrachtet ist die Substanz gut verträglich und zeigt eine niedrige Toxizität. Meldonium wird heutzutage unter dem Handelsnamen Mildronat für die Behandlung zerebraler und kardialer Ischämien, insbesondere in osteuropäischen Ländern und Russland, vertrieben und eingesetzt [191].

Neben der Hemmung der γ -Butyrobetain-Hydroxylase in der L-Carnitin Biosynthese wurde in den letzten Jahren als primärer Wirkmechanismus von Meldonium die Hemmung des Carnitintportes über die Plasmamembran erkannt, welche auf einer Interaktion von Meldonium mit dem wichtigsten membranären Carnitintporter OCTN2 beruht. Mit Etomoxir wurde darüber hinaus ein präklinisch weit verbreiteter Inhibitor von CPT1 zur Blockade der β -Oxidation in dem hier durchgeführten Tierversuch genutzt [192].

In der hier durchgeführten Tierversuchsstudie mit vier Armen in C57BL/6 Mäusen konnte unter Applikation der getesteten Substanzen (L-Carnitin, Etomoxir, Meldonium) ein unterschiedliches Tumorwachstum beobachtet werden. Bei den berechneten Volumendifferenzen von Tag 26 zu Tag 12 zeigte sich eine reduzierte Tumorumfangdifferenz im Sinne eines geringeren Tumorumfangs beziehungsweise eines geringeren Tumorumfangs bei allen Substanzgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Für Carnitin war diese Reduktion des Tumorumfangs jedoch nicht sehr stark ausgeprägt und zeigte statistisch keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Möglicherweise präsentiert sich hier ein moderater paradoxer Effekt, bei dem höhere L-Carnitin Konzentrationen im Serum eine geringere intrazelluläre L-Carnitin Konzentration bewirken, vergleichbar mit den beschriebenen höheren intrazellulären Konzentrationen bei erniedrigten Serumkonzentrationen [140]. Hinsichtlich der Reduktion des Tumorumfangs konnte jedoch für den OCTN2 Inhibitor Meldonium ein starker und statistisch

signifikanter Effekt nachgewiesen werden, da sich durch die Gabe von Meldonium in einer Vielzahl von Versuchstieren wachstumsreduzierende Effekte eingestellt haben. Es bleibt jedoch ungeklärt, ob sich dieser Effekt primär durch Blockade der OCTN2-vermittelten Carnitinaufnahme in die Tumorzellen selbst oder durch eine Veränderung der physiologischen Bedingungen oder des Tumormikroenvironments durch Meldonium ergeben haben.

Allerdings führte auch die Applikation von Etomoxir, ein Hemmstoff der CPT1 und damit der β -Oxidation, zu einem verringerten Tumorwachstum, jedoch war dieser Effekt schwächer als bei Meldonium ausgeprägt und erreichte keine statistische Signifikanz (vgl. Abb. 43, S. 88). Die Gabe von Etomoxir als Modellsubstanz für die Blockade der β -Oxidation konnte nicht denselben starken wachstumsreduzierenden Effekt wie Meldonium erzielen. Dies könnte darauf hindeuten, dass neben der Blockade der β -Oxidation durch verminderten Transport von L-Carnitin über OCTN2 in die Zelle noch weitere von der β -Oxidation unabhängige Funktionen des L-Carnitins bei der Tumorprogression bedeutsam sind. So kommt L-Carnitin neben seiner essentiellen Rolle im Rahmen der β -Oxidation eine wichtige Funktion im Rahmen der Regulation der Coenzym A (CoA) Homöostase zu. Indem L-Carnitin Acetyl-Gruppen von Acetyl-CoA übernimmt wird freies Coenzym A regeneriert [193, 194]. Außerdem sind verschiedene anti-apoptotische, anti-oxidative und membran-stabilisierende Eigenschaften von L-Carnitin beschrieben [195–200]. Hier muss allerdings auf die fehlende wachstumsfördernde Wirkung der Applikation von L-Carnitin sowohl in den C57BL/6 Wildtyp Mäusen als auch den jvs-Mäusen hingewiesen werden, die einer alleinigen Bedeutung von L-Carnitin beim Glioblastomwachstum entgegensteht. Möglicherweise spielt der Transport weiterer endogener und exogener Substanzen durch OCTN2, wie zum Beispiel Cholin oder Valproat [84, 85], eine bislang unterschätzte Bedeutung, wobei die Effekte durch Meldonium, wegen seiner strukturellen Ähnlichkeit in Richtung L-Carnitin assoziierter Effekte deuten.

Außerdem können OCTN2-unabhängige, bislang unbekannt zelluläre Effekte von Meldonium für die ausgelöste Wachstumshemmung beim Glioblastom verantwortlich sein, sodass weitere Untersuchungen zur Aufklärung der anti-tumoralen Wirkung von Meldonium zwingend erforderlich sind. Basierend auf den Daten der durchgeführten Tierstudie scheint eine pharmakologische Intervention der OCTN2-vermittelten L-Carnitin Aufnahme jedoch eine neue potenzielle Therapieoption für das Glioblastom darzustellen, welche einer weiteren Validierung bedarf.

Daher wurden nachfolgend tierexperimentelle Studien an OCTN2-defizienten jvs-Mäusen (*juvenile visceral steatosis*) durchgeführt. Heterozygote jvs-Mäuse sind phänotypisch kaum bis gar nicht beeinträchtigt und weisen nur in Einzelfällen Symptome eines Carnitin-Mangels auf

[201]. Allerdings weisen die heterozygoten $jvs^{+/-}$ -Mäuse verminderte Carnitin-Gewebespiegel auf [135]. Homozygote $jvs^{-/-}$ -Mäuse zeigen noch deutlich niedrigere Carnitin-Gewebespiegel [135], sind allerdings auch durch eine starke metabolische Dysregulation mit Skelettmyopathie, Kardiomyopathie, Hypoglykämie und Hyperammonämie charakterisiert, welche dem klinischen Bild einer systemischen Carnitin-Defizienz (SCD, *systemic carnitine deficiency*) beim Menschen entspricht [201]. Die Verwendung OCTN2-defizienter jvs -Mäuse erfolgte vor dem Hintergrund, dass diese Tiere insgesamt massiv verringerte Carnitin-Gewebespiegel aufweisen und sich die ins Gehirn implantierten GL261 Zellen somit in einer Carnitin-reduzierten Umgebung befinden. Dieses Tiermodell diene somit zur Überprüfung der Bedeutung einer blockierten OCTN2 Carnitintransportfunktion und damit einhergehend stark verminderter (intrazerebraler) Carnitin-Gewebespiegel auf das Glioblastomwachstum.

In den heterozygoten $jvs^{+/-}$ -Mäusen zeigte sich eine im Vergleich zur C57BL/6 Kontrollgruppe verringertes Tumorstadium, welches jedoch nicht statistisch signifikant war (vgl. Abb. 43, S. 88). Eine finale Beurteilung der Versuchsgruppe der homozygoten $jvs^{-/-}$ -Mäuse erscheint vor dem Hintergrund der geringen Gruppengröße ($n = 2$) nicht sinnvoll. In dieser geringen Tierzahl ließ sich im Mittel aber kein Hinweis auf ein im Vergleich zur C57BL/6 Kontrollgruppe verändertes Tumorstadium finden. Um eine abschließende Aussage bezüglich des Einflusses einer carnitinarmer Umgebung auf das Glioblastomwachstum tätigen zu können, sind somit weitere Tierstudien, eventuell auch unter Implantation von OCTN2-defizienten GL261 Zellen, erforderlich. Zusätzlich wäre es sinnvoll, die Konzentration an L-Carnitin im Gehirn der Mäuse zu bestimmen und mit dem Tumorstadium zu korrelieren.

Geplant war zudem ein Vergleich des Tumorstadiums von $jvs^{-/-}$ -Mäusen unter Kontrollbedingungen mit Carnitindefizienz versus der parenteralen Gabe von L-Carnitin, um den Einfluss von L-Carnitin auf das Glioblastomwachstum zu evaluieren, was aber aufgrund der geringen Tierzahlen nicht möglich war. Eines von zwei Tieren in der Kontrollgruppe der $jvs^{-/-}$ -Mäuse, folglich mit zu erwartenden geringen Carnitingewebespiegeln, hatte jedoch ein negatives Tumorstadium zwischen den MRT-Aufnahmen. In der Carnitingruppe der $jvs^{-/-}$ -Mäuse trat bei beiden Versuchstieren ein positives Tumorstadium auf. Wegen der geringen Tierzahlen ($n = 2$) kann dies jedoch nur als plausibles Indiz verbleiben.

Die niedrige Endzahl in der $jvs^{-/-}$ Gruppe begründet sich in einem unerwartet geringen Zuchterfolg. Es kamen $jvs^{+/-} \times jvs^{+/-}$ Verpaarungen und im späteren Verlauf auch $jvs^{+/-} \times jvs^{-/-}$ Verpaarungen zum Einsatz. Bei der heterozygoten Verpaarung wären, nach klassischen Vorstellungen der Vererbung, Nachkommen mit einem Viertel homozygoter Tiere zu erwarten. In der Verpaarung der mit einem homozygoten Elternteil mit einem Heterozygoten wäre sogar

die Hälfte der Nachkommen erwartungsgemäß homozygot. Faktisch zeigte sich hier jedoch leider ein Zuchtproblem, sodass nur sehr wenige $jvs^{-/-}$ -Mäuse verfügbar wurden. Dies könnte sich dadurch erklären, dass die $jvs^{-/-}$ -Nachkommen trotz reichlicher Versorgung mit Carnitin angereichertem Trinkwasser dieses nur ungenügend aufnehmen konnten und daher die ersten Tage und Wochen nach Geburt verstorben sind. Damit konnten sie auch der genetischen Testung nicht mehr zugeführt werden. Auch wären andere generelle Probleme bei den genutzten Zuchtpaaren denkbar, die außerhalb der Sphäre des jvs -Genotyps liegen. Teilweise eingesetzte Ammen hatten keinen nennenswerten Einfluss auf den Zuchterfolg. Wegen des geringen Zuchterfolges konnte der $jvs^{-/-}$ -Genotyp bedauerlicherweise nur in äußerst geringem Umfang (vier Tiere verteilt auf zwei Versuchsarme) getestet werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass durch den CPT1-Inhibitor Etomoxir und den OCTN2-Hemmstoff Meldonium spezifische Effekte in Form einer Reduktion des Tumorstwachstums in C57BL/6 Mäusen festgestellt werden konnte. Die partielle, aber nicht signifikante, Reduktion des Glioblastomwachstums in den $jvs^{+/-}$ -Mäusen kann ein Indiz für den Zusammenhang mit verminderten Carnitinspiegeln im Tier darstellen. Eine komplette OCTN2 freie Situation und ein damit nahezu carnitinfreies Milieu konnte nicht in hinreichender Quantität erzeugt werden, um eindeutige Schlüsse zu ziehen. Außerdem muss an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass es niedrig-affine membranständige Carnitrintransporter wie beispielsweise OCTN1 (SLC22A4), CT2 (SLC22A16) oder ATB^{0,+} (SLC6A14) gibt [87]. Diese könnten bei genetischer Ausschaltung von OCTN2 möglicherweise den Carnitrintransport in die Zelle übernehmen. Diese Hypothese würde allerdings dem geringen Zuchterfolg bei den OCTN2-defizienten $jvs^{-/-}$ -Mäusen widersprechen, da bei der durchgeführten Carnitinsupplementierung Carnitin über solche niedrig-affinen Transporter aufgenommen werden könnte. Es sei denn, Carnitin stellt nicht das einzige pro-tumorigene Substrat von OCTN2 dar. Dies verdeutlicht nochmal einen weiter bestehenden starken Forschungsbedarf zur Aufklärung der Bedeutung von OCTN2 und des daran gekoppelten Carnitinsystems für die Progression von Glioblastomen.

5.4 Schlussfolgerungen für die Behandlung von Patienten mit Glioblastom und übergeordnete Aspekte

Die Analyse von Patientenmaterial ermöglicht anhand der gewonnenen Erkenntnisse, wie hier der Zusammenhang einer erhöhten OCTN2-Expression mit einem verringerten Gesamtüberleben von Patienten mit Glioblastom, die zugrunde liegenden Mechanismen aufzuklären und mit dem daraus entstehenden pathophysiologischen Verständnis neue Therapiealternativen zu entwickeln. Die Tatsache, dass das OCTN2/L-Carnitin System und der Fettstoffwechsel im Glioblastom im weiteren Sinne als relevante Zielstruktur analog zu den Ergebnissen unserer

Arbeitsgruppe bestätigt wurde, zeigt das große Potenzial dieses metabolischen Bereichs für die Verbesserung der Therapie des Glioblastoms auf [71, 90, 95, 96].

Die Rolle von Fettstoffwechsel und OCTN2 wird auch vor dem Hintergrund deutlich, dass im Glioblastom nur circa 50 % des Acetyl-CoA aus Glukose stammen und in bildgebenden Untersuchungen mittels radioaktiv markierter Glukose eine Fraktion von Glioblastomen nicht detektiert werden [59, 202, 203]. Glioblastome nutzen demzufolge neben Glukose weitere Stoffwechselwege wie die β -Oxidation zur Energiegewinnung [204]. Auch die Tatsache, dass durch die Blockade der β -Oxidation mittels Etomoxir die Überlebensdauer in einem Glioblastom Mausmodell verlängert werden konnte [60], zeigt die Wichtigkeit des identifizierten Zielsystems. Die Beeinflussung des verfügbaren Coenzym-A in der Zelle durch Carnitin verdeutlicht dies weiter [205].

Interessant ist darüber hinaus, dass entgegen einer typischen membrangebundenen Lokalisation, wie zum Beispiel in der Plazenta, beim Glioblastom in dieser und in anderen Arbeiten vielfach auch eine intrazelluläre Lokalisation von OCTN2 gezeigt wurde, wobei eine funktionelle Bedeutung der intrazellulären Transporter noch nicht nachgewiesen wurde [83, 96].

Aus den gewonnenen Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit lassen sich Ansätze für neue Therapieoptionen ableiten. Naheliegend wäre zunächst die weitere präklinische Testung einer Kombination von Etomoxir und Meldonium analog zu einer recht erfolgreichen Kombination von Vincristin beziehungsweise Vinorelbin mit Etomoxir [96]. Möglicherweise wäre eine Testung in PDX oder GEM Mausmodellen ebenfalls angezeigt, um gleichzeitig eine höhere Wahrscheinlichkeit der Übertragbarkeit auf den Menschen zu erreichen [127]. Ergänzt werden sollte dies um die konkrete Überprüfung von Endpunkten wie Gesamtüberleben und progressionsfreiem Überleben. Anschließend könnte dann der Schritt zur Testung einer Intervention am OCTN2/L-Carnitin System und der β -Oxidation im Menschen gemacht werden, wobei sich hierfür zunächst Rezidivtumoren mit einer Add-on-Therapie, zum Beispiel mit Etomoxir und Meldonium oder ähnlich wirksame Substanzen, eignen würde. Erwähnt werden sollte diesbezüglich, dass eine solche Therapie mit den aktuellen Überprüfungen des Nutzens von ketogenen Diäten beim Glioblastom konkurriert. Hierbei bleibt kontrovers, ob die Senkung der Glukose, bei der für ketogene Diäten typischen hohen Fettzufuhr, alleine ausreicht, um die Energieversorgung der Tumoren zu durchbrechen oder diese möglicherweise sogar unterstützt wird, indem auf alternative Stoffwechselwege zur Energiegewinnung, wie der β -Oxidation, genutzt werden. Die Datenlage über Studien zur ketogenen Diät weitet sich aus, zeigt eine bisher gute Verträglichkeit, bleibt aber bisher Wirksamkeitsnachweise hinsichtlich klinisch relevanter Endpunkte für Patienten schuldig [206–209]. Zudem zeigte eine tierexperimentelle Studie aus dem Jahr

2020, dass Glioblastomzellen während einer ketogenen Diät verstärkt Fettsäuren und Ketonkörper nutzen und darüber die Progression des Tumors gefördert wurde [71].

Neben der experimentellen Überprüfung metabolischer Kaskaden als therapeutische Option scheint auch eine Fokussierung auf Glioblastomzellen mit Stammzeleigenschaften angezeigt, da hierüber eventuell substanziellere Therapieerfolge erzielt werden können. Denn in der letzten Dekade weisen zunehmend Daten auf einen Ursprung von Glioblastomen aus solchen stammzellartigen Zellen hin. So konnte durch Lee et al. (2018) der subventrikuläre Ursprung mit typischen Treibermutationen in Mensch und Mausmodell nachgewiesen werden [210]. Diese Ergebnisse werden von Studien unterstützt, in denen therapeutischen Interventionen gegen eben diese stammzellähnlichen Zellen diskutiert werden [211–213]. Im Kontext des Glioblastoms ist letztlich aber auch ein Fokus auf das Mikroenvironment sowie der gegenseitigen Symbiose von Tumorzellen mit ihrer Umgebung und beispielsweise der Interaktion mit Immunzellen zu betrachten [214, 215].

Insgesamt ergeben sich viele pharmakologische Ansatzpunkte und Möglichkeiten einer weiteren Entwicklung von Therapieoptimierungen. Allerdings sind weiterhin viele Mechanismen noch nicht vollständig verstanden, sodass weitere Forschung in diesen Bereichen notwendig ist, um adaptierte Therapien zu entwickeln.

5.5 Limitationen der vorliegenden Studie

Aus den in dieser Arbeit genutzten Methoden heraus ergeben sich naturgemäß einige Limitationen, die im Folgenden beleuchtet werden sollen. Durch die Verwendung von Patientenmaterial in Form von Glioblastomgewebe bedingt sich, dass das jeweils gewonnene Probenmaterial unter Umständen inhomogen in seiner Struktur ist, da für das Glioblastom eine große intratumorale Heterogenität nachgewiesen werden konnte. Dabei wurde die Koexistenz verschiedener molekularer Subklone beschrieben, die möglicherweise auch Ursache für das Versagen zielgerichteter Therapien sein könnte [216]. In den durchgeführten Expressionsanalysen wurde jeweils nur ein kleiner Teil des chirurgisch resezierten Glioblastomgewebes der RNA-Isolation zugeführt, sodass der mittels qPCR erhobene Expressionswert für jedes betrachtete Zielgen (OCTN1, CPT1 und CRAT) nur einen Ausschnitt der gesamten Tumorprobe darstellt. In zukünftigen Analysen könnte es daher sinnvoll sein, die Expression der Zielgene in verschiedenen Bereichen des Glioblastoms, beispielsweise im Tumorzentrum, Tumorrandbereich oder nekrotischen Bereichen, getrennt zu analysieren. Ein weiteres Problem von mRNA-Expressionsanalysen humaner Proben stellt die Integrität der Probe, insbesondere der RNA dar. Daher erfolgte eine Normalisierung der mRNA-Expression des Zielgens auf ein Referenzgen, dessen Expression keiner transkriptionellen Regulation unterliegt. Die 18S rRNA, ein sogenanntes

Housekeeping-Gen, hat sich in arbeitsgruppeninternen, nicht publizierten Versuchsreihen als am stabilsten exprimiertes *Housekeeping*-Gen in den verfügbaren Glioblastomgewebeproben gezeigt, sodass diese zur Normalisierung herangezogen wurde. Der Vorteil der Normalisierung mit einem internen Referenzgen wie der 18S rRNA, liegt in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse. Gewebe- und Matrixeffekte, unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienzen und Fehler bei der reversen Transkription innerhalb einer experimentellen Probe werden normalisiert, da sie gleichermaßen beide Gene, das Referenz- und auch das Zielgen, betreffen. Bezüglich der RNA-Integrität im Falle von menschlichem Gehirn wurde beschrieben, dass der gesamte RNA-Gehalt bis zu 48 h stabil bleibt [217]. Die in dieser Studie verwendeten Proben, aus humanen Glioblastomen, wurden innerhalb einer Stunde nach chirurgischer Resektion in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, sodass von intakter RNA ausgegangen werden kann. Bei den Kontrollhirngeweben handelte es sich um postmortal nach etwa 48 h entnommenes Hirngewebe (Frontal- und Temporallappen) von Körperspendern, welches bei -80°C tiefgefroren wurde. Heinrich et al. (2007) konnten keine Korrelation zwischen Leichenliegezeit und RNA-Degradation in den von ihnen untersuchten Geweben (Skelettmuskel, Herz und Gehirn) mit einem postmortalen Intervall zwischen 15 h und 118 h feststellen [218]. Eine Messung von der RNA Qualität mittels *RNA Integrity Number* (RIN) zur Quantifizierung der RNA-Integrität wurde in der hier vorliegenden Studie nicht vorgenommen, wäre aber in weiteren Studien zur mRNA-Expression empfehlenswert, da gezeigt wurde, dass diese die Ergebnisse von quantitativen PCR-Analysen beeinflussen kann [219, 220].

Auch die Tatsache der Endlichkeit einer humanen Probe muss berücksichtigt werden, da eine gleichzeitige Bestimmung breit gestreuter Zielstrukturen auf verschiedenen Ebenen der Expression und Genmodifikation kaum kosteneffizient gelöst werden kann. Eine Begrenzung auf rational abgewogene Relevanz der durchzuführenden Analysen muss daher stattfinden.

In der Verwendung von Zelllinien bestehen weitere typische Limitationen, auf welche weiter oben schon im jeweiligen Kontext eingegangen wurde. Kurzum kann eine zweidimensionale Zellkultur nur als abstraktes Abbild eines heterogenen Gewebes gelten und Mechanismen nur begrenzt, dafür aber mit mehr Standardisierung untersucht werden. Der zusätzliche Einsatz primärer Zellkulturen, also direkt aus dem Tumorgewebe isolierter Zellen, sowie dreidimensionaler Neurosphären, denen Stammzeleigenschaften zugeschrieben werden, könnte weitere Hinweise auf die potentielle Bedeutung von Zielmolekülen erbringen. Dies konnte bereits an anderer Stelle erfolgreich genutzt werden [221]. Auch die jeweils durchgeführten Kultivierungsbedingungen können maßgeblichen Einfluss auf Resultate haben, wie in dieser Arbeit bei

den Untersuchungen zur Zellviabilität von LN-18 und GL261 Glioblastomzellen zu erkennen war.

Nachteil des in dieser Arbeit angewandten syngen, orthotopen Tiermodells, mit stereotaktischer Implantation von murinen GL261 Zellen ins Gehirn der Mäuse, ist die Verwendung muriner anstelle von humanen Glioblastomzellen, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass es relevante Unterschiede im Wachstum und Therapieansprechen geben kann. Diese Limitation könnte, wie bereits erwähnt, durch Einsatz spezifischer PDX- oder GEM-Modelle zur Klärung spezifischer Fragestellungen behoben werden. Auch ist durch die verwendete GL261 Zellzahl bei Implantation und durch das Versuchsdesign die absolute Wachstumsdauer des Tumors über die Zeit vorgegeben. Hier könnte eine Variation der implantierten Tumorzellzahl, beispielsweise im Sinne eines längerfristigen und langsameren Wachstums, abweichende Ergebnisse liefern. Auch wäre eine Überprüfung des Gesamtüberlebens der Versuchstiere nahe am tatsächlichen Krankheitsgeschehen, ginge jedoch mutmaßlich mit einer umfassenderen Belastung der Versuchstiere während des Versuches einher. Denkbar wäre auch, Anteile der humanen Therapiebedingungen in den Tierversuch zu integrieren, wie beispielsweise die Kombination der Substanzapplikation (Meldonium, Etomoxir) mit Bestrahlung und Chemotherapie.

In der Gesamtzusammenschau scheint keine der methodisch implizierten oder erkennbaren Limitationen so schwerwiegend, dass die daraus gewonnenen Ergebnisse nicht interpretationsfähig oder verwendbar wären.

6 Zusammenfassung

Das Glioblastom ist ein hochmaligner und aggressiver Hirntumor, der von der WHO als Grad IV eingestuft wird. Die Betroffenen haben eine mittlere Überlebenszeit von 12 bis 15 Monaten, was auf dem invasiven Wachstum und der Chemo- und Radioresistenz des Tumors beruht. Dadurch existiert keine kurative Behandlung und es kommt in nahezu allen Fällen zu Rezidiven. Zunehmend wird deutlich, dass das Glioblastom einen stark veränderten Energiestoffwechsel aufweist, wobei das sogenannte *lipidomic remodelling* [72], welches für maßgebliche Alterationen im Fettsäuremetabolismus sorgt, besonders interessant erscheint. Die Fettsäureoxidation sowie damit assoziierte Prozesse und Proteine sind als eine bedeutende Energiequelle in den Fokus der Forschung getreten. So auch der hoch-affine Carnitintransporter OCTN2 (SLC22A5), welcher essentiell für den Carnitinhaushalt und damit die β -Oxidation der Zelle ist. In der vorgelegten Arbeit wurde daher das komplexe OCTN2/L-Carnitin System in seiner Funktion als potenzielle pharmakologische Zielstruktur zur therapeutischen Intervention beim Glioblastom tiefgehend untersucht und vorhandenes Wissen weiter ausgebaut. Hierzu diente eine Vielzahl experimenteller Bedingungen und Methoden, um Teilcharakteristiken des Glioblastoms darzustellen und die Bedeutung des OCTN2/L-Carnitin System zu überprüfen.

Da in vorausgegangenen Studien eine erhöhte Expression von OCTN2 mit einem signifikant schlechteren Überleben von Patienten mit Glioblastom nachgewiesen werden konnte, wurden als weitere potentiell interessante Zielstrukturen der niedrig-affine Carnitintransporter OCTN1 (SLC22A4) sowie Komponenten der β -Oxidation (CPT1C, CRAT) in die Patientenanalysen eingeschlossen. Zwar konnte für OCTN1 eine signifikant erhöhte mRNA-Expression in den humanen Glioblastomproben festgestellt werden, diese war jedoch nicht mit dem Überleben der Patienten assoziiert. Auch CPT1C und CRAT zeigten sich nicht als relevante Zielstrukturen beim Glioblastom.

In den durchgeführten Zellkulturexperimenten mit humanen LN-18 und murinen GL261 Glioblastomzellen zeigten sich partiell signifikante Effekte auf die wachstumsfördernden Kinasen AKT1 und ERK1/2, deren Phosphorylierungsgrad durch L-Carnitin moduliert wurde und die damit möglicherweise an carnitinvermittelten Wirkungen beteiligt sein könnten. Auf die Zellviabilität und Zellvitalität ließen sich hemmende Wirkungen des OCTN2-Inhibitors Mel-donium sowie des CPT1-Hemmstoffes Etomoxir nachweisen, welche teilweise durch die zusätzliche Gabe von L-Carnitin revertiert wurden. Hinsichtlich der durch Zytostatika (Doxorubicin, Carmustin, Vincristin und Temozolomid) induzierten Apoptose konnte L-Carnitin nur die durch Carmustin in niedriger Dosierung ausgelöste Caspase-3 Aktivierung verhindern. Ein durch L-Carnitin ausgelöster Effekt auf die Migration der Glioblastomzellen konnte

nicht nachgewiesen werden, jedoch wurde die migratorische Aktivität durch die Zytostatika Temozolomid und Carmustin, sowie interessanterweise auch durch den CPT1-Inhibitor Etomoxir, beeinträchtigt.

Um die Möglichkeit einer zielgerichteten Therapie gegen das OCTN2/L-Carnitin System präklinisch zu evaluieren, wurden tierexperimentelle Studien durchgeführt. Unter Verwendung eines orthotopen Glioblastommodelles der Maus konnte gezeigt werden, dass Etomoxir und Meldonium einen hemmenden Einfluss auf das *in vivo* Tumorwachstum besitzen, wobei dieser Effekt nur für den OCTN2-Inhibitor Meldonium signifikant ausfiel. In den OCTN2-defizienten $jvs^{-/-}$ -Mäusen konnte keine ausreichende Anzahl von Versuchstieren erreicht werden, um zuverlässige und finale Aussagen zu tätigen. In den heterozygoten $jvs^{+/-}$ -Mäusen, die zwar phänotypisch unauffällig sind, aber durch die geringere OCTN2 Ausstattung verminderte Carnitin-Gewebespiegel aufweisen, zeigte sich eine leichte, nicht signifikante Reduktion des intrazerebralen Tumorwachstums im Vergleich zu den C57BL/6 Wildtyp Mäusen.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit das OCTN2/L-Carnitin System und seine Bedeutung für das Glioblastom umfassend dargelegt und experimentell überprüft. Als Endresultat dieser Studie können Etomoxir und Meldonium als Substanzen zur zielgerichteten Beeinflussung des Glioblastomwachstums angesehen werden und sollten in weiteren Versuchsreihen detailliert auf ihre Eignung für die Entwicklung neuer Therapieformen überprüft werden.

Literaturverzeichnis

- [1] Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68 (6), 394–424
- [2] World Health Organization. (2018). World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. World Health Organization, Geneva
- [3] STATISTIK AUSTRIA. (2019). Bevölkerungsstatistik der Bundesanstalt Statistik Österreich (Zugriff vom 17.01.2020). http://www.statistik.at/web_de/statistiken/menschen_und_gesellschaft/bevoelkerung/index.html
- [4] Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100 (1), 57–70
- [5] Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144 (5), 646–674
- [6] Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica* 131 (6), 803–820
- [7] Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Truitt, G., Boscia, A., Kruchko, C., Barnholtz-Sloan, J. S. (2018). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011–2015. *Neuro-Oncology* 20 (suppl_4), iv1–iv86
- [8] Davis, F. G., Dolecek, T. A., McCarthy, B. J., Villano, J. L. (2012). Toward determining the lifetime occurrence of metastatic brain tumors estimated from 2007 United States cancer incidence data. *Neuro-Oncology* 14 (9), 1171–1177
- [9] Ostrom, Q. T., Wright, C. H., Barnholtz-Sloan, J. S. (2018). Brain metastases: epidemiology. in *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier, Bd. 149 27–42
- [10] Statistisches Bundesamt (Destatis). (2017). Todesursachen in Deutschland 2015, Fachserie 12 Reihe 4
- [11] Meir, E. G. (Hrsg.). (2009). *CNS Cancer*. Humana Press, Totowa, NJ
- [12] Robert Koch-Institut, Gesellschaft Der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.). (2019). *Krebs in Deutschland für 2015/2016*. Berlin, 12. Aufl.
- [13] Charles, N. A., Holland, E. C., Gilbertson, R., Glass, R., Kettenmann, H. (2011). The brain tumor microenvironment. *Glia* 59 (8), 1169–1180
- [14] Quail, D. F., Joyce, J. A. (2017). The Microenvironmental Landscape of Brain Tumors. *Cancer Cell* 31 (3), 326–341
- [15] Stupp, R., Weller, M., Belanger, K., Bogdahn, U., Ludwin, S. K., Lacombe, D., Mirimanoff, R. O. (2005). Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *The New England Journal of Medicine* 10
- [16] Johnson, D. R., O’Neill, B. P. (2012). Glioblastoma survival in the United States before and during the temozolomide era. *J Neurooncol* 107 (2), 359–364
- [17] Holland, E. C. (2000). Glioblastoma multiforme: The terminator. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (12), 6242–6244
- [18] Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvet, A., Scheithauer, B. W., Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica* 114 (2), 97–109
- [19] Turk, O., Ozdemir, N. G., Atci, I. B., Yilmaz, H., Gunver, F., Antar, V., Yilmaz, A. (2021). A rare case of cervical metastasis of glioblastoma after cranial tumor resection: case report and review of literature. *British Journal of Neurosurgery* 35 (3), 341–347
- [20] Ferguson, S. D., Hodges, T. R., Majd, N. K., Alfaro-Munoz, K., Al-Holou, W. N., Suki, D., de Groot, J. F., Fuller, G. N., Xue, L., Li, M., Jacobs, C., Rao, G., Colen, R. R., Xiu, J., Verhaak, R., Spetzler, D., Khasraw, M., Sawaya, R., Long, J. P., Heimberger, A. B.

- (2021). A validated integrated clinical and molecular glioblastoma long-term survival-predictive nomogram. *Neuro-Oncology Advances* 3 (1), 1–10
- [21] Farrell, C. J., Plotkin, S. R. (2007). Genetic Causes of Brain Tumors: Neurofibromatosis, Tuberous Sclerosis, von Hippel-Lindau, and Other Syndromes. *Neurologic Clinics* 25 (4), 925–946
- [22] Wen, P. Y., Kesari, S. (2008). Malignant Gliomas in Adults. *N Engl J Med* 359 (5), 492–507
- [23] Prasad, G., Haas-Kogan, D. A. (2009). Radiation-induced gliomas. *Expert Rev Neurother* 9 (10), 1511–1517
- [24] Biserova, K., Jakovlevs, A., Uljanovs, R., Strumfa, I. (2021). Cancer Stem Cells: Significance in Origin, Pathogenesis and Treatment of Glioblastoma. *Cells* 10 (3), 621
- [25] Chen, J., Li, Y., Yu, T.-S., McKay, R. M., Burns, D. K., Kernie, S. G., Parada, L. F. (2012). A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature* 488 (7412), 522–526
- [26] Bao, S., Wu, Q., McLendon, R. E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A. B., Dewhirst, M. W., Bigner, D. D., Rich, J. N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444 (7120), 756–760
- [27] Carruthers, R. D., Ahmed, S. U., Ramachandran, S., Strathdee, K., Kurian, K. M., Hedley, A., Gomez-Roman, N., Kalna, G., Neilson, M., Gilmour, L., Stevenson, K. H., Hammond, E. M., Chalmers, A. J. (2018). Replication Stress Drives Constitutive Activation of the DNA Damage Response and Radioresistance in Glioblastoma Stem-like Cells. *Cancer Research* 78 (17), 5060–5071
- [28] Friedmann-Morvinski, D., Bushong, E. A., Ke, E., Soda, Y., Marumoto, T., Singer, O., Ellisman, M. H., Verma, I. M. (2012). Dedifferentiation of Neurons and Astrocytes by Oncogenes Can Induce Gliomas in Mice. *Science* 338 (6110), 1080–1084
- [29] Nørøxe, D. S., Poulsen, H. S., Lassen, U. (2016). Hallmarks of glioblastoma: a systematic review. *ESMO Open* 1 (6), e000144
- [30] Verhaak, R. G. W., Hoadley, K. A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M. D., Miller, C. R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J. P., Alexe, G., Lawrence, M., O’Kelly, M., Tamayo, P., Weir, B. A., Gabriel, S., Winckler, W., Gupta, S., Jakkula, L., Feiler, H. S., Hodgson, J. G., James, C. D., Sarkaria, J. N., Brennan, C., Kahn, A., Spellman, P. T., Wilson, R. K., Speed, T. P., Gray, J. W., Meyerson, M., Getz, G., Perou, C. M., Hayes, D. N. (2010). Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17 (1), 98–110
- [31] The Cancer Genome Atlas Research Network. (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455 (7216), 1061–1068
- [32] Zandi, R., Larsen, A. B., Andersen, P., Stockhausen, M.-T., Poulsen, H. S. (2007). Mechanisms for oncogenic activation of the epidermal growth factor receptor. *Cellular Signalling* 19 (10), 2013–2023
- [33] Zhang, K., Wang, J., Wang, J., Luh, F., Liu, X., Yang, L., Liu, Y.-R., Su, L., Yang, Y.-C. S., Chu, P., Yen, Y. (2019). LKB1 deficiency promotes proliferation and invasion of glioblastoma through activation of mTOR and focal adhesion kinase signaling pathways. *Am J Cancer Res* 9 (8), 1650–1663
- [34] Guerrero, P. A., Yin, W., Camacho, L., Marchetti, D. (2015). Oncogenic role of Merlin/NF2 in glioblastoma. *Oncogene* 34 (20), 2621–2630
- [35] Fu, P., He, Y.-S., Huang, Q., Ding, T., Cen, Y.-C., Zhao, H.-Y., Wei, X. (2016). Bevacizumab treatment for newly diagnosed glioblastoma: Systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Molecular and Clinical Oncology* 4 (5), 833–838
- [36] Razavi, S.-M., Lee, K. E., Jin, B. E., Aujla, P. S., Gholamin, S., Li, G. (2016). Immune Evasion Strategies of Glioblastoma. *Front. Surg.* 3, 1–9

- [37] Wick, W. (2021). Gliome, S2k-Leitlinie. in Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.). Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie
- [38] Hegi, M. E., Diserens, A.-C., Gorlia, T., Hamou, M.-F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J. M., Hainfellner, J. A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J. E. C., Hau, P., Mirimanoff, R. O., Cairncross, J. G., Janzer, R. C., Stupp, R. (2005). *MGMT* Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *N Engl J Med* 352 (10), 997–1003
- [39] Stupp, R., Taillibert, S., Kanner, A., Read, W., Steinberg, D. M., Lhermitte, B., Toms, S., Idbaih, A., Ahluwalia, M. S., Fink, K., Di Meco, F., Lieberman, F., Zhu, J.-J., Stragliotto, G., Tran, D. D., Brem, S., Hottinger, A. F., Kirson, E. D., Lavy-Shahaf, G., Weinberg, U., Kim, C.-Y., Paek, S.-H., Nicholas, G., Bruna, J., Hirte, H., Weller, M., Palti, Y., Hegi, M. E., Ram, Z. (2017). Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 318 (23), 2306–2316
- [40] Rasso, J. (Hrsg.). (2012). Biochemie. Thieme, Stuttgart, 3. Aufl.
- [41] Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* 324 (5930), 1029–1033
- [42] Jain, P., Singh, S., Arya, A. (2021). A student centric method for calculation of fatty acid energetics: Integrated formula and web tool. *Biochem Mol Biol Educ* 49 (3), 492–499
- [43] Carracedo, A., Cantley, L. C., Pandolfi, P. P. (2013). Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight. *Nat Rev Cancer* 13 (4), 227–232
- [44] Warburg, O. (1956). On the Origin of Cancer Cells. *Science* 123 (3191), 309–314
- [45] Vazquez, A., Kamphorst, J. J., Markert, E. K., Schug, Z. T., Tardito, S., Gottlieb, E. (2016). Cancer metabolism at a glance. *Journal of Cell Science* 129 (18), 3367–3373
- [46] Clare, C. E., Brassington, A. H., Kwong, W. Y., Sinclair, K. D. (2019). One-Carbon Metabolism: Linking Nutritional Biochemistry to Epigenetic Programming of Long-Term Development. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 7 (1), 263–287
- [47] Vander Heiden, M. G., DeBerardinis, R. J. (2017). Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. *Cell* 168 (4), 657–669
- [48] DeBerardinis, R. J., Mancuso, A., Daikhin, E., Nissim, I., Yudkoff, M., Wehrli, S., Thompson, C. B. (2007). Beyond aerobic glycolysis: Transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (49), 19345–19350
- [49] Cabodevilla, A. G., Sánchez-Caballero, L., Nintou, E., Boiadjieva, V. G., Picatoste, F., Gubern, A., Claro, E. (2013). Cell Survival during Complete Nutrient Deprivation Depends on Lipid Droplet-fueled β -Oxidation of Fatty Acids. *Journal of Biological Chemistry* 288 (39), 27777–27788
- [50] Buzzai, M., Bauer, D. E., Jones, R. G., DeBerardinis, R. J., Hatzivassiliou, G., Elstrom, R. L., Thompson, C. B. (2005). The glucose dependence of Akt-transformed cells can be reversed by pharmacologic activation of fatty acid β -oxidation. *Oncogene* 24 (26), 4165–4173
- [51] Berge, K., Tronstad, K. J., Bohov, P., Madsen, L., Berge, R. K. (2003). Impact of mitochondrial β -oxidation in fatty acid-mediated inhibition of glioma cell proliferation. *Journal of Lipid Research* 44 (1), 118–127
- [52] Duman, C., Yaqubi, K., Hoffmann, A., Acikgöz, A. A., Korshunov, A., Bendszus, M., Herold-Mende, C., Liu, H.-K., Alfonso, J. (2019). Acyl-CoA-Binding Protein Drives Glioblastoma Tumorigenesis by Sustaining Fatty Acid Oxidation. *Cell Metabolism* 30 (2), 274-289.e1-e5
- [53] Bi, J., Mischel, P. S. (2019). Acyl-CoA-Binding Protein Fuels Gliomagenesis. *Cell Metabolism* 30 (2), 229–230
- [54] Zhang, Y., Nguyen, T. T. T., Shang, E., Mela, A., Humala, N., Mahajan, A., Zhao, J., Shu, C., Torrini, C., Sanchez-Quintero, M. J., Kleiner, G., Bianchetti, E., Westhoff, M.-

- A., Quinzii, C. M., Karpel-Massler, G., Bruce, J. N., Canoll, P., Siegelin, M. D. (2020). MET Inhibition Elicits PGC1 α -Dependent Metabolic Reprogramming in Glioblastoma. *Cancer Research* 80 (1), 30–43
- [55] Pike, L. S., Smift, A. L., Croteau, N. J., Ferrick, D. A., Wu, M. (2011). Inhibition of fatty acid oxidation by etomoxir impairs NADPH production and increases reactive oxygen species resulting in ATP depletion and cell death in human glioblastoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1807 (6), 726–734
- [56] Kant, S., Kesarwani, P., Prabhu, A., Graham, S. F., Buelow, K. L., Nakano, I., Chinaiyan, P. (2020). Enhanced fatty acid oxidation provides glioblastoma cells metabolic plasticity to accommodate to its dynamic nutrient microenvironment. *Cell Death Dis* 11 (4), 253
- [57] Parsons, D. W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J. C.-H., Leary, R. J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I.-M., Gallia, G. L., Olivi, A., McLendon, R., Rasheed, B. A., Keir, S., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Busam, D. A., Tekleab, H., Diaz, L. A., Hartigan, J., Smith, D. R., Strausberg, R. L., Marie, S. K. N., Shinjo, S. M. O., Yan, H., Riggins, G. J., Bigner, D. D., Karchin, R., Papadopoulos, N., Parmigiani, G., Vogelstein, B., Velculescu, V. E., Kinzler, K. W. (2008). An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. *Science* 321 (5897), 1807–1812
- [58] Miyata, S., Tominaga, K., Sakashita, E., Urabe, M., Onuki, Y., Gomi, A., Yamaguchi, T., Mieno, M., Mizukami, H., Kume, A., Ozawa, K., Watanabe, E., Kawai, K., Endo, H. (2019). Comprehensive Metabolomic Analysis of IDH1R132H Clinical Glioma Samples Reveals Suppression of β -oxidation Due to Carnitine Deficiency. *Sci Rep* 9 (1), 9787
- [59] Maher, E. A., Marin-Valencia, I., Bachoo, R. M., Mashimo, T., Raisanen, J., Hatanpaa, K. J., Jindal, A., Jeffrey, F. M., Choi, C., Madden, C., Mathews, D., Pascual, J. M., Mickey, B. E., Malloy, C. R., DeBerardinis, R. J. (2012). Metabolism of [U-¹³C]glucose in human brain tumors *in vivo*. *NMR Biomed.* 25 (11), 1234–1244
- [60] Lin, H., Patel, S., Affleck, V. S., Wilson, I., Turnbull, D. M., Joshi, A. R., Maxwell, R., Stoll, E. A. (2017). Fatty acid oxidation is required for the respiration and proliferation of malignant glioma cells. *Neuro-Oncology* 19 (1), 43–54
- [61] Woolf, E. C., Scheck, A. C. (2015). The ketogenic diet for the treatment of malignant glioma. *Journal of Lipid Research* 56 (1), 5–10
- [62] Lane, J., Brown, N. I., Williams, S., Plaisance, E. P., Fontaine, K. R. (2021). Ketogenic Diet for Cancer: Critical Assessment and Research Recommendations. *Nutrients* 13 (10), 3562
- [63] Champ, C. E., Palmer, J. D., Volek, J. S., Werner-Wasik, M., Andrews, D. W., Evans, J. J., Glass, J., Kim, L., Shi, W. (2014). Targeting metabolism with a ketogenic diet during the treatment of glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 117 (1), 125–131
- [64] Poff, A., Koutnik, A. P., Egan, K. M., Sahebjam, S., D’Agostino, D., Kumar, N. B. (2019). Targeting the Warburg effect for cancer treatment: Ketogenic diets for management of glioma. *Seminars in Cancer Biology* 56, 135–148
- [65] Martin-McGill, K. J., Marson, A. G., Tudur Smith, C., Young, B., Mills, S. J., Cherry, M. G., Jenkinson, M. D. (2020). Ketogenic diets as an adjuvant therapy for glioblastoma (KEATING): a randomized, mixed methods, feasibility study. *J Neurooncol* 147 (1), 213–227
- [66] Klein, P., Tyrlikova, I., Zuccoli, G., Tyrlik, A., Maroon, J. C. (2020). Treatment of glioblastoma multiforme with “classic” 4:1 ketogenic diet total meal replacement. *Cancer Metab* 8 (1), 24
- [67] van der Louw, E. J. T. M., Olieman, J. F., van den Bemt, P. M. L. A., Bromberg, J. E. C., Oomen-de Hoop, E., Neuteboom, R. F., Catsman-Berrevoets, C. E., Vincent, A. J. P. E. (2019). Ketogenic diet treatment as adjuvant to standard treatment of glioblastoma multiforme: a feasibility and safety study. *Ther Adv Med Oncol* 11, 1–13

- [68] Klement, R. J., Sweeney, R. A., Gross, E. C., Champ, C. E. (2019). Problems associated with a highly artificial ketogenic diet: Letter to the Editor Re: van der Louw EJTM, Olieman JF, van den Bemt PMLA, *et al.* ‘Ketogenic diet treatment as adjuvant to standard treatment of glioblastoma multiforme: a feasibility and safety study’. *Ther Adv Med Oncol* 11, 1–3
- [69] van der Louw, E. J., Olieman, J. F., Catsman-Berrevoets, C. E., Vincent, A. J. P. E. (2019). Author response to ‘Problems associated with a highly artificial ketogenic diet: Letter to the Editor Re: van der Louw EJTM, Olieman JF, van den Bemt PMLA, *et al.* “Ketogenic diet treatment as adjuvant to standard treatment of glioblastoma multiforme: a feasibility and safety study”’. *Ther Adv Med Oncol* 11, 1–3
- [70] Montella, L., Sarno, F., Altucci, L., Cioffi, V., Sigona, L., Di Colandrea, S., De Simone, S., Marinelli, A., Facchini, B. A., De Vita, F., Berretta, M., de Falco, R., Facchini, G. (2021). A Root in Synapsis and the Other One in the Gut Microbiome-Brain Axis: Are the Two Poles of Ketogenic Diet Enough to Challenge Glioblastoma? *Front. Nutr.* 8, 703392
- [71] Sperry, J., Condro, M. C., Guo, L., Braas, D., Vanderveer-Harris, N., Kim, K. K. O., Pope, W. B., Divakaruni, A. S., Lai, A., Christofk, H., Castro, M. G., Lowenstein, P. R., Le Belle, J. E., Kornblum, H. I. (2020). Glioblastoma Utilizes Fatty Acids and Ketone Bodies for Growth Allowing Progression during Ketogenic Diet Therapy. *IScience* 23 (9), 101453
- [72] Koundouros, N., Poulogiannis, G. (2020). Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer. *Br J Cancer* 122 (1), 4–22
- [73] Tamai, I., Ohashi, R., Nezu, J., Yabuuchi, H., Oku, A., Shimane, M., Sai, Y., Tsuji, A. (1998). Molecular and Functional Identification of Sodium Ion-dependent, High Affinity Human Carnitine Transporter OCTN2. *Journal of Biological Chemistry* 273 (32), 20378–20382
- [74] Wu, X., Prasad, P. D., Leibach, F. H., Ganapathy, V. (1998). cDNA Sequence, Transport Function, and Genomic Organization of Human OCTN2, a New Member of the Organic Cation Transporter Family. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 246 (3), 589–595
- [75] Urban, T. J., Gallagher, R. C., Brown, C., Castro, R. A., Lagpacan, L. L., Brett, C. M., Taylor, T. R., Carlson, E. J., Ferrin, T. E., Burchard, E. G., Packman, S., Giacomini, K. M. (2006). Functional Genetic Diversity in the High-Affinity Carnitine Transporter OCTN2 (*SLC22A5*). *Mol Pharmacol* 70 (5), 1602–1611
- [76] Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., Sternberg, M. J. E. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* 10 (6), 845–858
- [77] The UniProt Consortium, Bateman, A., Martin, M.-J., Orchard, S., Magrane, M., Agivetova, R., Ahmad, S., Alpi, E., Teodoro, D., *et al.* (2021). UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research* 49 (D1), D480–D489
- [78] Ota, T., Suzuki, Y., Nishikawa, T., Otsuki, T., Sugiyama, T., Irie, R., Wakamatsu, A., Hayashi, K., Sugano, S., *et al.* (2004). Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. *Nat Genet* 36 (1), 40–45
- [79] Maekawa, S., Mori, D., Nishiya, T., Takikawa, O., Horinouchi, T., Nishimoto, A., Kajita, E., Miwa, S. (2007). OCTN2VT, a splice variant of OCTN2, does not transport carnitine because of the retention in the endoplasmic reticulum caused by insertion of 24 amino acids in the first extracellular loop of OCTN2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1773 (6), 1000–1006
- [80] Miecz, D., Januszewicz, E., Czeredys, M., Hinton, B. T., Berezowski, V., Cecchelli, R., Nałecz, K. A. (2008). Localization of organic cation/carnitine transporter (OCTN2) in cells forming the blood-brain barrier. *J Neurochem* 104 (1), 113–123

- [81] Iwata, D., Kato, Y., Wakayama, T., Sai, Y., Kubo, Y., Iseki, S., Tsuji, A. (2008). Involvement of Carnitine/organic Cation Transporter OCTN2 (SLC22A5) in Distribution of its Substrate Carnitine to the Heart. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 23 (3), 207–215
- [82] Grube, M., Ameling, S., Noutsias, M., Köck, K., Triebel, I., Bonitz, K., Meissner, K., Jedlitschky, G., Herda, L. R., Reinthaler, M., Rohde, M., Hoffmann, W., Köhl, U., Schultheiss, H.-P., Völker, U., Felix, S. B., Klingel, K., Kandolf, R., Kroemer, H. K. (2011). Selective Regulation of Cardiac Organic Cation Transporter Novel Type 2 (OCTN2) in Dilated Cardiomyopathy. *The American Journal of Pathology* 178 (6), 2547–2559
- [83] Grube, M., Meyer Zu Schwabedissen, H., Draber, K., Präger, D., Möritz, K.-U., Linneemann, K., Fusch, C., Jedlitschky, G., Kroemer, H. K. (2005). Expression, localization, and function of the carnitine transporter octn2 (slc22a5) in human placenta. *Drug Metab Dispos* 33 (1), 31–37
- [84] Ohashi, R., Tamai, I., Nezu, J., Nikaido, H., Hashimoto, N., Oku, A., Sai, Y., Shimane, M., Tsuji, A. (2001). Molecular and Physiological Evidence for Multifunctionality of Carnitine/Organic Cation Transporter OCTN2. *Mol Pharmacol* 59 (2), 358–366
- [85] Lahjouji, K., Mitchell, G. A., Qureshi, I. A. (2001). Carnitine Transport by Organic Cation Transporters and Systemic Carnitine Deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism* 73 (4), 287–297
- [86] Rebouche, C. J. (2014). Carnitine. in Ross, A. C. (Hrsg.). *Modern nutrition in health and disease*. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 11. Aufl.
- [87] Console, L., Scalise, M., Mazza, T., Pochini, L., Galluccio, M., Giangregorio, N., Tonazzi, A., Indiveri, C. (2020). Carnitine Traffic in Cells. Link With Cancer. *Front. Cell Dev. Biol.* 8, 583850
- [88] Magoulas, P. L., El-Hattab, A. W. (2012). Systemic primary carnitine deficiency: an overview of clinical manifestations, diagnosis, and management. *Orphanet J Rare Dis* 7 (1), 68
- [89] Durazzo, A., Lucarini, M., Nazhand, A., Souto, S. B., Silva, A. M., Severino, P., Souto, E. B., Santini, A. (2020). The Nutraceutical Value of Carnitine and Its Use in Dietary Supplements. *Molecules* 25 (9), 2127
- [90] Juraszek, B., Nałęcz, K. A. (2020). SLC22A5 (OCTN2) Carnitine Transporter—Indispensable for Cell Metabolism, a Jekyll and Hyde of Human Cancer. *Molecules* 25 (1), 14
- [91] Scalise, M., Galluccio, M., Accardi, R., Cornet, I., Tommasino, M., Indiveri, C. (2012). Human OCTN2 (SLC22A5) is down-regulated in virus- and nonvirus-mediated cancer. *Cell Biochem Funct* 30 (5), 419–425
- [92] Elsnerova, K., Mohelnikova-Duchonova, B., Cerovska, E., Ehrlichova, M., Gut, I., Rob, L., Skapa, P., Hrudá, M., Bartakova, A., Bouda, J., Vodicka, P., Soucek, P., Vaclavikova, R. (2016). Gene expression of membrane transporters: Importance for prognosis and progression of ovarian carcinoma. *Oncology Reports* 35 (4), 2159–2170
- [93] Wang, C., Uray, I. P., Mazumdar, A., Mayer, J. A., Brown, P. H. (2012). SLC22A5/OCTN2 expression in breast cancer is induced by estrogen via a novel intronic estrogen-response element (ERE). *Breast Cancer Res Treat* 134 (1), 101–115
- [94] Lee, J.-H., Zhao, X.-M., Yoon, I., Lee, J. Y., Kwon, N. H., Wang, Y.-Y., Lee, K.-M., Lee, M.-J., Kim, J., Moon, H.-G., In, Y., Hao, J.-K., Park, K.-M., Noh, D.-Y., Han, W., Kim, S. (2016). Integrative analysis of mutational and transcriptional profiles reveals driver mutations of metastatic breast cancers. *Cell Discov* 2 (1), 16025
- [95] Fink, M. A., Paland, H., Herzog, S., Grube, M., Vogelgesang, S., Weitmann, K., Bialke, A., Hoffmann, W., Rauch, B. H., Schroeder, H. W. S., Bien-Möller, S. (2019). L-Carnitine-Mediated Tumor Cell Protection and Poor Patient Survival Associated with OCTN2 Overexpression in Glioblastoma Multiforme. *Clinical Cancer Research* 25 (9), 2874–2886

- [96] Juraszek, B., Czarnecka-Herok, J., Nałęcz, K. A. (2021). Glioma cells survival depends both on fatty acid oxidation and on functional carnitine transport by SLC22A5. *J. Neurochem.* 156 (5), 642–657
- [97] Seligman, A. M., Shear, M. J., Alexander, L. (1939). Studies in Carcinogenesis: VIII. Experimental Production of Brain Tumors in Mice with Methylcholanthrene. *Am J Cancer* 37 (3), 364
- [98] Szatmari, T., Lumniczky, K., Desaknai, S., Trajceviski, S., Hidvegi, E. J., Hamada, H., Safrany, G. (2006). Detailed characterization of the mouse glioma 261 tumor model for experimental glioblastoma therapy. *Cancer Science* 97 (6), 546–553
- [99] Newcomb, E. W., Zagzag, D. (2009). The Murine GL261 Glioma Experimental Model to Assess Novel Brain Tumor Treatments. in Meir, E. G. (Hrsg.). *CNS Cancer*. Humana Press, Totowa, NJ, 227–241
- [100] Diserens, A. C., de Tribolet, N., Martin-Achard, A., Gaide, A. C., Schnegg, J. F., Carrel, S. (1981). Characterization of an established human malignant glioma cell line: LN-18. *Acta Neuropathologica* 53 (1), 21–28
- [101] Bien-Möller, S., Lange, S., Holm, T., Böhm, A., Paland, H., Küpper, J., Herzog, S., Weitmann, K., Havemann, C., Vogelgesang, S., Marx, S., Hoffmann, W., Schroeder, H. W. S., Rauch, B. H. (2016). Expression of S1P metabolizing enzymes and receptors correlate with survival time and regulate cell migration in glioblastoma multiforme. *Oncotarget* 7 (11), 13031–13046
- [102] Bairoch, A. (2018). The Cellosaurus, a Cell-Line Knowledge Resource. *J Biomol Tech* 29 (2), 25–38
- [103] Herzog, S., Fink, M. A., Weitmann, K., Friedel, C., Hadlich, S., Langner, S., Kindermann, K., Holm, T., Bohm, A., Eskilsson, E., Miletic, H., Hildner, M., Fritsch, M., Vogelgesang, S., Havemann, C., Ritter, C. A., Meyer zu Schwabedissen, H. E., Rauch, B., Hoffmann, W., Kroemer, H. K., Schroeder, H., Bien-Moller, S. (2015). Pim1 kinase is upregulated in glioblastoma multiforme and mediates tumor cell survival. *Neuro-Oncology* 17 (2), 223–242
- [104] Knott, J. C. A., Mahesparan, R., Garcia-Cabrera, I., Bølge Tysnes, B., Edvardsen, K., Ness, G. O., Mørk, S., Lund-Johansen, M., Bjerkvig, R. (1998). Stimulation of extracellular matrix components in the normal brain by invading glioma cells. *International Journal of Cancer* 75 (6), 864–872
- [105] R Core Team. (2017). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- [106] GIMP Development Team. (2020). *GIMP - GNU Image Manipulation Program*. <https://www.gimp.org/>
- [107] Schneider, C. A., Rasband, W. S., Eliceiri, K. W., others. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat methods* 9 (7), 671–675
- [108] Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* 9 (7), 676–682
- [109] Inkscape Development Team. (2019, Dezember 3). *Inkscape*. <https://inkscape.org>
- [110] RStudio Team. (2016). *RStudio: Integrated Development Environment for R*. RStudio, Inc., Boston, MA. <http://www.rstudio.com/>
- [111] Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., McGowan, L., François, R., Grolemund, G., Hayes, A., Henry, L., Hester, J., Kuhn, M., Pedersen, T., Miller, E., Bache, S., Müller, K., Ooms, J., Robinson, D., Seidel, D., Spinu, V., Takahashi, K., Vaughan, D., Wilke, C., Woo, K., Yutani, H. (2019). Welcome to the Tidyverse. *Journal of Open Source Software* 4 (43), 1686
- [112] Wilke, C., Fox, S. J., Bates, T., Manalo, K., Lang, B., Barrett, M., Stoiber, M., Philipp, A., Denney, B., Hesselberth, J., Wsteenhu, Bijl, W. V. D., Grenié, M., Selker, R., Uhlitz,

- F., Zaczap. (2021, Januar 2). cowplot (Version 1.1.1). <https://cran.r-project.org/web/packages/cowplot/>
- [113] Garnier, S., Ross, N., BoB Rudis, Filipovic-Pierucci, A., Galili, T., Timelyportfolio, Greenwell, B., Sievert, C., Harris, D. J., JJ Chen. (2021, April 11). viridis. <https://cran.r-project.org/web/packages/viridis/>
- [114] Therneau, T. M. (2022). A Package for Survival Analysis in R. <https://cran.r-project.org/package=survival>
- [115] Kassambara, A., Kosinski, M., Biecek, P. (2021). survminer: Drawing Survival Curves using ggplot2. <https://cran.r-project.org/package=survminer>
- [116] Nezu, J., Tamai, I., Oku, A., Ohashi, R., Yabuuchi, H., Hashimoto, N., Nikaido, H., Sai, Y., Koizumi, A., Shoji, Y., Takada, G., Matsuishi, T., Yoshino, M., Kato, H., Ohura, T., Tsujimoto, G., Hayakawa, J., Shimane, M., Tsuji, A. (1999). Primary systemic carnitine deficiency is caused by mutations in a gene encoding sodium ion-dependent carnitine transporter. *Nat Genet* 21 (1), 91–94
- [117] Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150 (1), 76–85
- [118] Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259), 680–685
- [119] Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76 (9), 4350–4354
- [120] Degasperi, A., Birtwistle, M. R., Volinsky, N., Rauch, J., Kolch, W., Kholodenko, B. N. (2014). Evaluating Strategies to Normalise Biological Replicates of Western Blot Data. *PLoS ONE* 9 (1), e87293
- [121] Kilkenny, C., Browne, W. J., Cuthill, I. C., Emerson, M., Altman, D. G. (2010). Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *PLoS Biology* 8 (6), e1000412
- [122] Urbaniak, G. C., Plous, S. (2013, Juni 22). Research Randomizer (Version 4.0). <http://www.randomizer.org/>
- [123] Koizumi, T., Nikaido, H., Hayakawa, J., Nonomura, A., Yoneda, T. (1988). Infantile disease with microvesicular fatty infiltration of viscera spontaneously occurring in the C3H-H-2° strain of mouse with similarities to Reye’s syndrome. *Lab Anim* 22 (1), 83–87
- [124] Kuwajima, M., Kono, N., Horiuchi, M., Imamura, Y., Ono, A., Inui, Y., Kawata, S., Koizumi, T., Hayakawa, J., Saheki, T., Tarui, S. (1991). Animal model of systemic carnitine deficiency: Analysis in C3H-H-2° strain of mouse associated with juvenile visceral steatosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 174 (3), 1090–1094
- [125] Russell, W. M. S., Burch, R. L. (1992). The principles of humane experimental technique. Universities Federation for Animal Welfare, Potters Bar, Herts, Special ed., [Nachdr. der Ausg.] London 1959
- [126] Kirschke, S., Erdmann, P., Langanke, M. (2015). Abwägung mit Maß? Empirisch-ethische Untersuchungen zur Abwägungspraxis im Tierversuchswesen. *TIERethik* 7 (11), 58–85
- [127] Gengenbacher, N., Singhal, M., Augustin, H. G. (2017). Preclinical mouse solid tumour models: status quo, challenges and perspectives. *Nat Rev Cancer* 17 (12), 751–765
- [128] Demidenko, E. (2010). Three endpoints of in vivo tumour radiobiology and their statistical estimation. *International Journal of Radiation Biology* 86 (2), 164–173
- [129] Eisenhauer, E. A., Therasse, P., Bogaerts, J., Schwartz, L. H., Sargent, D., Ford, R., Dancey, J., Arbuck, S., Gwyther, S., Mooney, M., Rubinstein, L., Shankar, L., Dodd, L., Kaplan, R., Lacombe, D., Verweij, J. (2009). New response evaluation criteria in solid

- tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *European Journal of Cancer* 45 (2), 228–247
- [130] Shah, G. D., Kesari, S., Xu, R., Batchelor, T. T., O'Neill, A. M., Hochberg, F. H., Levy, B., Bradshaw, J., Wen, P. Y. (2006). Comparison of linear and volumetric criteria in assessing tumor response in adult high-grade gliomas. *Neuro-Oncology* 8 (1), 38–46
- [131] Dülser, A., Hack, R., Krüger, C., Pils, M., Scherer, K., Schmelting, B., Schmidt, M., Weinert, H., Jourdan, T. (2017). Fachinformation aus dem Ausschuss für Tierschutzbeauftragte und dem Arbeitskreis 4 in der TVT - Empfehlung zur Substanzapplikation bei Versuchstieren (Zugriff vom 28.02.2021). http://www.gv-solas.de/fileadmin/user_upload/pdf_publication/Tierschutzbeauftragte/2017Fachinformation_Injektionsvolumina.pdf
- [132] Zhang, W., Gong, P., Tian, Q., Han, S., Wang, J., He, P., Guo, Y., Wang, G., Chen, Q., Huang, J., Li, M. (2022). The eIF4A Inhibitor Silvestrol Blocks the Growth of Human Glioblastoma Cells by Inhibiting AKT/mTOR and ERK1/2 Signaling Pathway. *Journal of Oncology* 2022, 1–10
- [133] Shafi, O., Siddiqui, G. (2022). Tracing the origins of glioblastoma by investigating the role of gliogenic and related neurogenic genes/signaling pathways in GBM development: a systematic review. *World J Surg Onc* 20 (1), 146
- [134] Hadizadeh, M., AminJafari, A., Parvizpour, S., Ghasemi, S. (2022). Novel targets to overcome antiangiogenesis therapy resistance in glioblastoma multiforme: Systems biology approach and suggestion of therapy by galunisertib. *Cell Biology International* 46 (10), 1649–1660
- [135] Knapp, A. C., Todesco, L., Török, M., Beier, K., Krähenbühl, S. (2008). Effect of Carnitine Deprivation on Carnitine Homeostasis and Energy Metabolism in Mice with Systemic Carnitine Deficiency. *Ann Nutr Metab* 52 (2), 136–144
- [136] Regev, O., Merkin, V., Blumenthal, D. T., Melamed, I., Kaisman-Elbaz, T. (2021). Tumor-Treating Fields for the treatment of glioblastoma: a systematic review and meta-analysis. *Neurooncol Pract* 8 (4), 426–440
- [137] Mashima, T., Seimiya, H., Tsuruo, T. (2009). De novo fatty-acid synthesis and related pathways as molecular targets for cancer therapy. *Br J Cancer* 100 (9), 1369–1372
- [138] Kuhajda, F. P. (2000). Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. *Nutrition* 16 (3), 202–208
- [139] Mao, C.-Y., Lu, H.-B., Kong, N., Li, J.-Y., Liu, M., Yang, C.-Y., Yang, P. (2014). Levocarnitine Protects H9c2 Rat Cardiomyocytes from H₂O₂-induced Mitochondrial Dysfunction and Apoptosis. *Int. J. Med. Sci.* 11 (11), 1107–1115
- [140] Yamada, S., Matsuda, R., Nishimura, F., Nakagawa, I., Motoyama, Y., Park, Y.-S., Nakamura, M., Nakase, H., Ouji, Y., Yoshikawa, M. (2012). Carnitine-induced senescence in glioblastoma cells. *Experimental and Therapeutic Medicine* 4 (1), 21–25
- [141] Koepsell, H. (2020). Organic Cation Transporters in Health and Disease. *Pharmacol Rev* 72 (1), 253–319
- [142] Yi, Y., Li, L., Song, F., Li, P., Chen, M., Ni, S., Zhang, H., Zhou, H., Zeng, S., Jiang, H. (2021). L-tetrahydropalmatine reduces oxaliplatin accumulation in the dorsal root ganglion and mitochondria through selectively inhibiting the transporter-mediated uptake thereby attenuates peripheral neurotoxicity. *Toxicology* 459, 152853
- [143] Console, L., Scalise, M., Tonazzi, A., Giangregorio, N., Indiveri, C. (2018). Characterization of Exosomal SLC22A5 (OCTN2) carnitine transporter. *Sci Rep* 8 (1), 3758
- [144] Qu, Q., Qu, J., Guo, Y., Zhou, B.-T., Zhou, H.-H. (2014). Luteolin potentiates the sensitivity of colorectal cancer cell lines to oxaliplatin through the PPAR γ /OCTN2 pathway. *Anti-Cancer Drugs* 25 (9), 1016–1027
- [145] Zhang, L., Gui, T., Console, L., Scalise, M., Indiveri, C., Hausler, S., Kullak-Ublick, G. A., Gai, Z., Visentin, M. (2021). Cholesterol stimulates the cellular uptake of L-carnitine

- by the carnitine/organic cation transporter novel 2 (OCTN2). *Journal of Biological Chemistry* 296, 100204
- [146] Newlands, E. S., Stevens, M. F. G., Wedge, S. R., Wheelhouse, R. T., Brock, C. (1997). Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. *Cancer Treatment Reviews* 23 (1), 35–61
- [147] De Vleeschouwer, S. (Hrsg.). (2017). *Glioblastoma*. Codon Publications, Brisbane
- [148] Serafim, R. B., da Silva, P., Cardoso, C., Di Cristofaro, L. F. M., Netto, R. P., de Almeida, R., Navegante, G., Storti, C. B., de Sousa, J. F., de Souza, F. C., Panepucci, R., Moreira, C. G., Penna, L. S., Silva, W. A., Valente, V. (2021). Expression Profiling of Glioblastoma Cell Lines Reveals Novel Extracellular Matrix-Receptor Genes Correlated With the Responsiveness of Glioma Patients to Ionizing Radiation. *Front. Oncol.* 11, 668090
- [149] Robertson, F. L., Marqués-Torrejón, M.-A., Morrison, G. M., Pollard, S. M. (2019). Experimental models and tools to tackle glioblastoma. *Dis. Model. Mech.* 12 (9), dmm040386
- [150] Paolillo, M., Comincini, S., Schinelli, S. (2021). In Vitro Glioblastoma Models: A Journey into the Third Dimension. *Cancers* 13 (10), 2449
- [151] Gómez-Oliva, R., Domínguez-García, S., Carrascal, L., Abalos-Martínez, J., Pardillo-Díaz, R., Verástegui, C., Castro, C., Nunez-Abades, P., Geribaldi-Doldán, N. (2021). Evolution of Experimental Models in the Study of Glioblastoma: Toward Finding Efficient Treatments. *Front. Oncol.* 10, 614295
- [152] Filippo, C. A. di S., Ardon, O., Longo, N. (2011). Glycosylation of the OCTN2 carnitine transporter: Study of natural mutations identified in patients with primary carnitine deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1812 (3), 312–320
- [153] Tang, N. L. S., Ganapathy, V., Wu, X., Hui, J., Seth, P., Yuen, P. M. P., Fok, T. F., Hjelm, N. M. (1999). Mutations of OCTN2, an Organic Cation/Carnitine Transporter, Lead to Deficient Cellular Carnitine Uptake in Primary Carnitine Deficiency. *Human Molecular Genetics* 8 (4), 655–660
- [154] Pochini, L., Scalise, M., Galluccio, M., Indiveri, C. (2013). OCTN Cation Transporters in Health and Disease: Role as Drug Targets and Assay Development. *J Biomol Screen* 18 (8), 851–867
- [155] Pearson, J. R. D., Regad, T. (2017). Targeting cellular pathways in glioblastoma multiforme. *Sig Transduct Target Ther* 2 (1), 17040
- [156] Persano, L., Rampazzo, E., Della Puppa, A., Pistollato, F., Basso, G. (2011). The Three-Layer Concentric Model of Glioblastoma: Cancer Stem Cells, Microenvironmental Regulation, and Therapeutic Implications. *The Scientific World Journal* 11, 1829–1841
- [157] Anerillas, C., Abdelmohsen, K., Gorospe, M. (2020). Regulation of senescence traits by MAPKs. *GeroScience* 42 (2), 397–408
- [158] McIlwain, D. R., Berger, T., Mak, T. W. (2013). Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (4), a008656
- [159] Funakoshi, Y., Hata, N., Kuga, D., Hatae, R., Sangatsuda, Y., Fujioka, Y., Takigawa, K., Yoshimoto, K., Mizoguchi, M., Iihara, K. (2021). Current trend in treatment of glioblastoma in Japan: a national survey using the diagnostic procedure combination database (J-ASPECT study-glioblastoma). *Int J Clin Oncol* 26 (8), 1441–1449
- [160] McGirt, M. J., Than, K. D., Weingart, J. D., Chaichana, K. L., Attenello, F. J., Olivi, A., Latterra, J., Kleinberg, L. R., Grossman, S. A., Brem, H., Quiñones-Hinojosa, A. (2009). Gliadel (BCNU) wafer plus concomitant temozolomide therapy after primary resection of glioblastoma multiforme: Clinical article. *JNS* 110 (3), 583–588
- [161] Ishii, T., Shimpo, Y., Matsuoka, Y., Kinoshita, K. (2000). Anti-apoptotic Effect of Acetyl-/carnitine and l-Carnitine in Primary Cultured Neurons. *Japanese Journal of Pharmacology* 83 (2), 119–124

- [162] Chao, H.-H., Liu, J.-C., Hong, H.-J., Lin, J., Chen, C.-H., Cheng, T.-H. (2011). L-carnitine reduces doxorubicin-induced apoptosis through a prostacyclin-mediated pathway in neonatal rat cardiomyocytes. *International Journal of Cardiology* 146 (2), 145–152
- [163] Valdés-Rives, S. A., Casique-Aguirre, D., Germán-Castelán, L., Velasco-Velázquez, M. A., González-Arenas, A. (2017). Apoptotic Signaling Pathways in Glioblastoma and Therapeutic Implications. *BioMed Research International* 2017, 1–12
- [164] Brat, D. J., Castellano-Sanchez, A. A., Hunter, S. B., Pecot, M., Cohen, C., Hammond, E. H., Devi, S. N., Kaur, B., Van Meir, E. G. (2004). Pseudopalisades in Glioblastoma Are Hypoxic, Express Extracellular Matrix Proteases, and Are Formed by an Actively Migrating Cell Population. *Cancer Res* 64 (3), 920–927
- [165] So, J.-S., Kim, H., Han, K.-S. (2021). Mechanisms of Invasion in Glioblastoma: Extracellular Matrix, Ca²⁺ Signaling, and Glutamate. *Front. Cell. Neurosci.* 15, 663092
- [166] Chung, H.-H., Hsieh, M.-J., Hsieh, Y.-S., Chen, P.-N., Ko, C.-P., Yu, N.-Y., Lin, C.-W., Yang, S.-F. (2021). The Inhibitory Effects of Terminalia catappa L. Extract on the Migration and Invasion of Human Glioblastoma Multiforme Cells. *Pharmaceuticals* 14 (11), 1183
- [167] Teng, J., Hejazi, S., Hiddingh, L., Carvalho, L., de Gooijer, M. C., Wakimoto, H., Barazas, M., Tannous, M., Chi, A. S., Noske, D. P., Wesseling, P., Wurdinger, T., Batchelor, T. T., Tannous, B. A. (2018). Recycling drug screen repurposes hydroxyurea as a sensitizer of glioblastomas to temozolomide targeting de novo DNA synthesis, irrespective of molecular subtype. *Neuro-Oncology* 20 (5), 642–654
- [168] Pijuan, J., Barceló, C., Moreno, D. F., Maiques, O., Sisó, P., Martí, R. M., Macià, A., Panosa, A. (2019). In vitro Cell Migration, Invasion, and Adhesion Assays: From Cell Imaging to Data Analysis. *Front. Cell Dev. Biol.* 7, 107
- [169] Kramer, N., Walzl, A., Unger, C., Rosner, M., Krupitza, G., Hengstschläger, M., Dolznig, H. (2013). In vitro cell migration and invasion assays. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 752 (1), 10–24
- [170] Bettinger, I., Thanos, S., Paulus, W. (2002). Microglia promote glioma migration. *Acta Neuropathologica* 103 (4), 351–355
- [171] Newcomb, E. W., Lukyanov, Y., Schnee, T., Esencay, M., Fischer, I., Hong, D., Shao, Y., Zagzag, D. (2007). The geldanamycin analogue 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin inhibits the growth of GL261 glioma cells in vitro and in vivo. *Anti-Cancer Drugs* 18 (8), 875–882
- [172] Guo, W., Qiu, W., Ao, X., Li, W., He, X., Ao, L., Hu, X., Li, Z., Zhu, M., Luo, D., Xing, W., Xu, X. (2020). Low-concentration DMSO accelerates skin wound healing by AKT / mTOR -mediated cell proliferation and migration in diabetic mice. *Br J Pharmacol* 177 (14), 3327–3341
- [173] Peng, S., Chen, D., Cai, J., Yuan, Z., Huang, B., Li, Y., Wang, H., Luo, Q., Kuang, Y., Liang, W., Liu, Z., Wang, Q., Cui, Y., Wang, H., Liu, X. (2021). Enhancing cancer-associated fibroblast fatty acid catabolism within a metabolically challenging tumor microenvironment drives colon cancer peritoneal metastasis. *Mol Oncol* 15 (5), 1391–1411
- [174] Reis, L. M. dos, Adamoski, D., Ornitz Oliveira Souza, R., Rodrigues Ascensão, C. F., Sousa de Oliveira, K. R., Corrêa-da-Silva, F., Malta de Sá Patroni, F., Meira Dias, M., Consonni, S. R., Mendes de Moraes-Vieira, P. M., Silber, A. M., Dias, S. M. G. (2019). Dual inhibition of glutaminase and carnitine palmitoyltransferase decreases growth and migration of glutaminase inhibition-resistant triple-negative breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry* 294 (24), 9342–9357
- [175] Zhang, Q., Wang, H., Mao, C., Sun, M., Dominah, G., Chen, L., Zhuang, Z. (2018). Fatty acid oxidation contributes to IL-1 β secretion in M2 macrophages and promotes macrophage-mediated tumor cell migration. *Molecular Immunology* 94, 27–35
- [176] Gimple, R. C., Bhargava, S., Dixit, D., Rich, J. N. (2019). Glioblastoma stem cells: lessons from the tumor hierarchy in a lethal cancer. *Genes Dev.* 33 (11–12), 591–609

- [177] Tamura, R., Miyoshi, H., Sampetean, O., Shinozaki, M., Morimoto, Y., Iwasawa, C., Fukaya, R., Mine, Y., Masuda, H., Maruyama, T., Narita, M., Saya, H., Yoshida, K., Okano, H., Toda, M. (2019). Visualization of spatiotemporal dynamics of human glioma stem cell invasion. *Mol Brain* 12 (1), 45
- [178] Volovetz, J., Berezovsky, A. D., Alban, T., Chen, Y., Lauko, A., Aranjuez, G. F., Burtscher, A., Shibuya, K., Silver, D. J., Peterson, J., Manor, D., McDonald, J. A., Lathia, J. D. (2020). Identifying conserved molecular targets required for cell migration of glioblastoma cancer stem cells. *Cell Death Dis* 11 (2), 152
- [179] Aftab, S., Shakoori, A. R. (2019). Low glucose availability alters the expression of genes involved in initial adhesion of human glioblastoma cancer cell line SF767. *J of Cellular Biochemistry* 120 (10), 16824–16839
- [180] Bielecka-Wajdman, A. M., Ludyga, T., Smyk, D., Smyk, W., Mularska, M., Świderek, P., Majewski, W., Mullins, C. S., Linnebacher, M., Obuchowicz, E. (2022). Glucose Influences the Response of *Glioblastoma* Cells to Temozolomide and Dexamethasone. *Cancer Control* 29, 1–15
- [181] Miyai, M., Tomita, H., Soeda, A., Yano, H., Iwama, T., Hara, A. (2017). Current trends in mouse models of glioblastoma. *J Neurooncol* 135 (3), 423–432
- [182] Zagzag, D., Miller, D. C., Chiriboga, L., Yee, H., Newcomb, E. W. (2006). Green Fluorescent Protein Immunohistochemistry as a Novel Experimental Tool for the Detection of Glioma Cell Invasion In Vivo. *Brain Pathology* 13 (1), 34–37
- [183] Cha, S., Johnson, G., Wadghiri, Y. Z., Jin, O., Babb, J., Zagzag, D., Turnbull, D. H. (2003). Dynamic, contrast-enhanced perfusion MRI in mouse gliomas: Correlation with histopathology. *Magn. Reson. Med.* 49 (5), 848–855
- [184] Newcomb, E. W., Demaria, S., Lukyanov, Y., Shao, Y., Schnee, T., Kawashima, N., Lan, L., Dewyngaert, J. K., Zagzag, D., McBride, W. H., Formenti, S. C. (2006). The Combination of Ionizing Radiation and Peripheral Vaccination Produces Long-term Survival of Mice Bearing Established Invasive GL261 Gliomas. *Clin Cancer Res* 12 (15), 4730–4737
- [185] Mak, I. W., Evaniew, N., Ghert, M. (2014). Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. *Am J Transl Res* 6 (2), 114–118
- [186] Breschi, A., Gingeras, T. R., Guigó, R. (2017). Comparative transcriptomics in human and mouse. *Nat Rev Genet* 18 (7), 425–440
- [187] Hodge, R. D., Bakken, T. E., Miller, J. A., Smith, K. A., Barkan, E. R., Graybuck, L. T., Close, J. L., Long, B., Lein, E. S., et al. (2019). Conserved cell types with divergent features in human versus mouse cortex. *Nature* 573 (7772), 61–68
- [188] An ad hoc committee of the National Cancer Research Institute, Workman, P., Aboagye, E. O., Balkwill, F., Balmain, A., Bruder, G., Chaplin, D. J., Double, J. A., Everitt, J., Farningham, D. A. H., Glennie, M. J., Kelland, L. R., Robinson, V., Stratford, I. J., Tozer, G. M., Watson, S., Wedge, S. R., Eccles, S. A. (2010). Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *British Journal of Cancer* 102 (11), 1555–1577
- [189] Hathcock, J. N., Shao, A. (2006). Risk assessment for carnitine. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 46 (1), 23–28
- [190] Greenblatt, H. K., Greenblatt, D. J. (2016). Meldonium (Mildronate): A Performance-Enhancing Drug?: Editorial. *Clinical Pharmacology in Drug Development* 5 (3), 167–169
- [191] Berlato, D. G., Bairros, A. V. de. (2020). Meldonium: Pharmacological, toxicological, and analytical aspects. *Toxicology Research and Application* 4, 1–18
- [192] O'Connor, R. S., Guo, L., Ghassemi, S., Snyder, N. W., Worth, A. J., Weng, L., Kam, Y., Philipson, B., Trefely, S., Nunez-Cruz, S., Blair, I. A., June, C. H., Milone, M. C. (2018). The CPT1a inhibitor, etomoxir induces severe oxidative stress at commonly used concentrations. *Sci Rep* 8 (1), 6289

- [193] Tamai, I. (2013). Pharmacological and pathophysiological roles of carnitine/organic cation transporters (OCTNs: SLC22A4, SLC22A5 and Slc22a21). *Biopharm. Drug Dispos.* 34 (1), 29–44
- [194] Pekala, J., Patkowska-Sokola, B., Bodkowski, R., Jamroz, D., Nowakowski, P., Lochynski, S., Librowski, T. (2011). L-Carnitine - Metabolic Functions and Meaning in Humans *Life.* CDM 12 (7), 667–678
- [195] Mutomba, M. C., Yuan, H., Konyavko, M., Adachi, S., Yokoyama, C. B., Esser, V., McGarry, J. D., Babior, B. M., Gottlieb, R. A. (2000). Regulation of the activity of caspases by L-carnitine and palmitoylcarnitine. *FEBS Letters* 478 (1–2), 19–25
- [196] Qi, S.-N., Zhang, Z.-F., Wang, Z.-Y., Yoshida, A., Ueda, T. (2006). L-carnitine inhibits apoptotic DNA fragmentation induced by a new spin-labeled derivative of podophylotoxin via caspase-3 in Raji cells. *Oncol Rep* 15 (1), 119–122
- [197] Li, J.-L., Wang, Q.-Y., Luan, H.-Y., Kang, Z.-C., Wang, C.-B. (2012). Effects of L-carnitine against oxidative stress in human hepatocytes: involvement of peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J Biomed Sci* 19 (1), 32
- [198] Ribas, G. S., Vargas, C. R., Wajner, M. (2014). l-carnitine supplementation as a potential antioxidant therapy for inherited neurometabolic disorders. *Gene* 533 (2), 469–476
- [199] Augustyniak, A., Skrzydlewska, E. (2010). The influence of L-carnitine supplementation on the antioxidative abilities of serum and the central nervous system of ethanol-induced rats. *Metab Brain Dis* 25 (4), 381–389
- [200] Jones, L. L., McDonald, D. A., Borum, P. R. (2010). Acylcarnitines: Role in brain. *Progress in Lipid Research* 49 (1), 61–75
- [201] Lahjouji, K., Elimrani, I., Wu, J., Mitchell, G. A., Qureshi, I. A. (2002). A heterozygote phenotype is present in the *jvs +/-* mutant mouse livers. *Molecular Genetics and Metabolism* 76 (1), 76–80
- [202] Cui, M., Zorrilla-Veloz, R. I., Hu, J., Guan, B., Ma, X. (2021). Diagnostic Accuracy of PET for Differentiating True Glioma Progression From Post Treatment-Related Changes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Neurol.* 12, 671867
- [203] Zhao, C., Zhang, Y., Wang, J. (2014). A Meta-Analysis on the Diagnostic Performance of 18F-FDG and 11C-Methionine PET for Differentiating Brain Tumors. *American Journal of Neuroradiology* 35 (6), 1058–1065
- [204] Mashimo, T., Pichumani, K., Vemireddy, V., Hatanpaa, K. J., Singh, D. K., Sirasana-gandla, S., Nannepaga, S., Piccirillo, S. G., Kovacs, Z., Foong, C., Huang, Z., Barnett, S., Mickey, B. E., DeBerardinis, R. J., Tu, B. P., Maher, E. A., Bachoo, R. M. (2014). Acetate Is a Bioenergetic Substrate for Human Glioblastoma and Brain Metastases. *Cell* 159 (7), 1603–1614
- [205] Ramsay, R. R. (2000). The carnitine acyltransferases: modulators of acyl-CoA-dependent reactions. *Biochemical Society Transactions* 28 (2), 182–186
- [206] Voss, M., Wenger, K. J., von Mettenheim, N., Bojunga, J., Vetter, M., Diehl, B., Franz, K., Gerlach, R., Ronellenfitsch, M. W., Harter, P. N., Hattingen, E., Steinbach, J. P., Rödel, C., Rieger, J. (2022). Short-term fasting in glioma patients: analysis of diet diaries and metabolic parameters of the ERGO2 trial. *Eur J Nutr* 61 (1), 477–487
- [207] Voss, M., Wagner, M., von Mettenheim, N., Harter, P. N., Wenger, K. J., Franz, K., Bojunga, J., Vetter, M., Gerlach, R., Glatzel, M., Paulsen, F., Hattingen, E., Baehr, O., Ronellenfitsch, M. W., Fokas, E., Imhoff, D., Steinbach, J. P., Rödel, C., Rieger, J. (2020). ERGO2: A Prospective, Randomized Trial of Calorie-Restricted Ketogenic Diet and Fasting in Addition to Reirradiation for Malignant Glioma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 108 (4), 987–995
- [208] Porper, K., Shpatz, Y., Plotkin, L., Pechthold, R. G., Talianski, A., Champ, C. E., Furman, O., Shimoni-Sebag, A., Symon, Z., Amit, U., Hemi, R., Kanety, H., Mardor, Y., Cohen, Z. R., Jan, E., Genssin, H., Anikster, Y., Zach, L., Lawrence, Y. R. (2021). A

- Phase I clinical trial of dose-escalated metabolic therapy combined with concomitant radiation therapy in high-grade glioma. *J Neurooncol* 153 (3), 487–496
- [209] Noorlag, L., De Vos, F. Y., Kok, A., Broekman, M. L. D., Seute, T., Robe, P. A., Snijders, T. J. (2019). Treatment of malignant gliomas with ketogenic or caloric restricted diets: A systematic review of preclinical and early clinical studies. *Clinical Nutrition* 38 (5), 1986–1994
- [210] Lee, J. H., Lee, J. E., Kahng, J. Y., Kim, S. H., Park, J. S., Yoon, S. J., Um, J.-Y., Kim, W. K., Lee, J.-K., Park, J., Kim, E. H., Lee, J.-H., Lee, J.-H., Chung, W.-S., Ju, Y. S., Park, S.-H., Chang, J. H., Kang, S.-G., Lee, J. H. (2018). Human glioblastoma arises from subventricular zone cells with low-level driver mutations. *Nature* 560 (7717), 243–247
- [211] Muftuoglu, Y., Pajonk, F. (2021). Targeting Glioma Stem Cells. *Neurosurgery Clinics of North America* 32 (2), 283–289
- [212] Lathia, J. D., Mack, S. C., Mulkearns-Hubert, E. E., Valentim, C. L. L., Rich, J. N. (2015). Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes Dev.* 29 (12), 1203–1217
- [213] Binello, E., Germano, I. M. (2011). Targeting glioma stem cells: A novel framework for brain tumors. *Cancer Science* 102 (11), 1958–1966
- [214] Fu, Y., Liu, S., Yin, S., Niu, W., Xiong, W., Tan, M., Li, G., Zhou, M. (2017). The reverse Warburg effect is likely to be an Achilles' heel of cancer that can be exploited for cancer therapy. *Oncotarget* 8 (34), 57813–57825
- [215] Virtuoso, A., Giovannoni, R., De Luca, C., Gargano, F., Cerasuolo, M., Maggio, N., Lavitrano, M., Papa, M. (2021). The Glioblastoma Microenvironment: Morphology, Metabolism, and Molecular Signature of Glial Dynamics to Discover Metabolic Rewiring Sequence. *IJMS* 22 (7), 3301
- [216] Bergmann, N., Delbridge, C., Gempt, J., Feuchtinger, A., Walch, A., Schirmer, L., Bunk, W., Aschenbrenner, T., Liesche-Starnecker, F., Schlegel, J. (2020). The Intratumoral Heterogeneity Reflects the Intertumoral Subtypes of Glioblastoma Multiforme: A Regional Immunohistochemistry Analysis. *Front. Oncol.* 10, 494
- [217] Harrison, P. J., Heath, P. R., Eastwood, S. L., Burnet, P. W. J., McDonald, B., Pearson, R. C. A. (1995). The relative importance of premortem acidosis and postmortem interval for human brain gene expression studies: selective mRNA vulnerability and comparison with their encoded proteins. *Neuroscience Letters* 200 (3), 151–154
- [218] Heinrich, M., Matt, K., Lutz-Bonengel, S., Schmidt, U. (2007). Successful RNA extraction from various human postmortem tissues. *Int J Legal Med* 121 (2), 136–142
- [219] White, K., Yang, P., Li, L., Farshori, A., Medina, A. E., Zielke, H. R. (2018). Effect of Postmortem Interval and Years in Storage on RNA Quality of Tissue at a Repository of the NIH NeuroBioBank. *Biopreservation and Biobanking* 16 (2), 148–157
- [220] Koppelkamm, A., Vennemann, B., Lutz-Bonengel, S., Fracasso, T., Vennemann, M. (2011). RNA integrity in post-mortem samples: influencing parameters and implications on RT-qPCR assays. *Int J Legal Med* 125 (4), 573–580
- [221] Seifert, C., Balz, E., Herzog, S., Korolev, A., Gaßmann, S., Paland, H., Fink, M. A., Grube, M., Marx, S., Jedlitschky, G., Tzvetkov, M. V., Rauch, B. H., Schroeder, H. W. S., Bien-Möller, S. (2021). PIM1 Inhibition Affects Glioblastoma Stem Cell Behavior and Kills Glioblastoma Stem-like Cells. *IJMS* 22 (20), 11126