

**Aus der Klinik für Visceral-, Thorax- und Gefäßchirurgie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. D. K. Bartsch**

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**In vitro Evaluation immunmodulatorischer Therapien
zur Behandlung des anaplastischen
Schilddrüsenkarzinoms**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von:

Franziska Knauff aus Alsfeld

Marburg, 2023

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 16.05.2023

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

Dekanin: Frau Prof. Dr. D. Hilfiker-Kleiner

Referentin: Frau Prof. Dr. K. Holzer

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. M. Luster

Für Kristina

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	1
1.1	Abkürzungen	1
1.2	Tabellen.....	3
1.3	Abbildungen	3
2	Einleitung.....	6
2.1	Das anaplastische Schilddrüsenkarzinom	6
2.1.1	Epidemiologie und Prognose	6
2.1.2	Pathogenese.....	6
2.1.3	Klinische Symptomatik.....	6
2.1.4	Therapie des ATCs	7
2.2	Molekularbasierte, zielgerichtete Therapieoptionen zur Behandlung des ATC	9
2.2.1	Histondeacetylaseinhibitoren (HDACi).....	9
2.2.2	Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs).....	10
2.3	Programmed cell death protein 1 / Programmed cell death 1 ligand 1	12
2.3.1	Atezolizumab.....	15
2.3.2	Expression von PD-L1 in Zellen des ATCs	16
2.3.3	Immunmodulatorische Therapie des ATCs als Kombinationstherapie	17
2.4	Autophagie.....	19
2.4.1	Die zweischneidige Rolle der Autophagie in der Entstehung und Behandlung von Karzinomen.....	22
2.5	Ziele dieser Arbeit	24
3	Material und Methoden.....	26
3.1	Materialien.....	26
3.1.1	Geräte.....	26
3.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	28
3.1.3	Primer und Antikörper	30
3.1.4	Kits.....	31
3.1.5	Chemikalien und Reagenzien	33
3.1.6	Pufferlösungen	35
3.1.7	Gele	36
3.1.8	Zellkulturmedium	36
3.1.9	Zelllinien und Gewebeproben.....	36
3.2	Methoden.....	38
3.2.1	Zellkultur	38
3.2.2	Prinzip der Zellviabilitätsmessung mittels RealTime-Glo™	41

3.2.3	Isolierung von totaler RNA aus Zellen	44
3.2.4	Umschreiben von totaler RNA in cDNA.....	46
3.2.5	Prinzip der Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR).....	47
3.2.6	Prinzip der Proteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure -Assay	48
3.2.7	Prinzip des Western Blots	50
3.2.8	Statistische Analyse	53
4	Ergebnisse	54
4.1	Ergebnisse der Zellviabilitätsmessung via RealTime-Glo™	54
4.1.1	Zellviabilitätsmessung bei singulärer Behandlung von Sphäroiden der Zelllinie C643 (Versuchsreihe 1)	54
4.1.2	Zellviabilitätsmessung bei kombinierter Behandlung von Sphäroiden der Zelllinie C643 (Versuchsreihe 2).....	56
4.1.3	Untersuchung der synergetischen Wirkung der Kombinationsbehandlungen.	57
4.1.4	Zusammenfassung der Ergebnisse der Zellviabilitätsmessung mittels RealTime-Glo™	58
4.2	Beeinflussung der Ultrastruktur der Sphäroide durch die Behandlung mit Atezolizumab, Panobinostat und Sorafenib.....	59
4.2.1	Ultrastruktur der unbehandelten Sphäroide	59
4.2.2	Ultrastruktur der Sphäroide nach Behandlung mit 500 ng/ml Atezolizumab ..	60
4.2.3	Ultrastruktur der Sphäroide nach Behandlung mit 1 nM Panobinostat	60
4.2.4	Ultrastruktur der Sphäroide nach Behandlung mit 500 ng/ml Atezolizumab + 1 nM Panobinostat	61
4.2.5	Ultrastruktur der Sphäroide nach Behandlung mit 10 nM Panobinostat	61
4.2.6	Ultrastruktur der Sphäroide nach Behandlung mit 500 ng/ml Atezolizumab + 10 nM Panobinostat.....	62
4.2.7	Ultrastruktur der Sphäroide nach Behandlung mit 1 µM Sorafenib	62
4.2.8	Ultrastruktur der Sphäroide nach Behandlung mit 500 ng/ml Atezolizumab + 1 µM Sorafenib.....	63
4.3	Ergebnisse der qRT-PCR	63
4.3.1	Expression der Autophagiemarker nach der Behandlung mit 500 ng/ml Atezolizumab.....	64
4.3.2	Expression der Autophagiemarker nach der Behandlung mit 10 nM Panobinostat	64
4.3.3	Expression der Autophagiemarker nach der Behandlung mit 1 µM Sorafenib	65
4.3.4	Expression der Autophagiemarker nach der Behandlung mit 500 ng/ml Atezolizumab + 10 nM Panobinostat	65
4.3.5	Expression der Autophagiemarker nach der Behandlung mit 500 ng/ml Atezolizumab + 1 µM Sorafenib	66
4.4	Ergebnisse der Western Blots	67

4.4.1	Expression der Autophagiemarker in der Primärkultur Patient 2.....	68
4.4.2	Expression der Autophagiemarker in der Primärkultur Patient 3.....	70
4.4.3	Expression des Proteins PD-L1	72
5	Diskussion.....	74
5.1	Beeinflussung der Zellviabilität durch die zielgerichtete Behandlung mit PD-L1-Inhibitoren, HDACis und TKIs und durch die synergetische Wirkung einer Kombinationstherapie.....	75
5.2	Die Rolle der Autophagie bei der Reduktion der Zellviabilität und sich daraus ergebende Therapieansätze.....	78
5.3	Reduktion der Zellviabilität über ein Zusammenspiel von Autophagie und Apoptose	81
5.4	Auswirkung der antitumoralen Therapie auf die Expression von PD-L1.....	83
5.5	Ausblick	85
6	Zusammenfassung.....	87
6.1	Deutsche Zusammenfassung	87
6.2	Abstract	88
7	Literaturverzeichnis.....	90
8	Anhang	106
8.1	Western Blot Ergebnisse der Zelllinie C643, der Primärkultur Patient 1 und der Zelllinie Nthy-ori 3-1.....	106
8.1.1	Expression der Autophagiemarker in der Zelllinie C643	106
8.1.2	Expression der Autophagiemarker der Primärkultur Patient 1.....	107
8.1.3	Expression der Autophagiemarker in der Zelllinie Nthy-ori 3-1.....	108
8.2	Verzeichnis meiner akademischen Lehrer	109
8.3	Danksagung	110

1 Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

1.1 Abkürzungen

3D	dreidimensional
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
AK	Antikörper
ATC	engl. anaplastic thyroid cancer / anaplastisches (undifferenziertes) Schilddrüsenkarzinom
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
CA	Karzinom
ca.	Circa
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CPS	engl. combined positivity score / kombinierter positiver Anteil
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphate
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EGFR	engl. epidermal growth factor receptor
ERK	engl. extracellular-signal regulated kinases
evtl.	eventuell
FBS	Fetal Bovine Serum
HCC	engl. hepatocellular carcinoma / Hepatozelluläres Karzinom
HDACi	Histondeacetylaseinhibitor
inkl.	inklusive
KI	Kinaseinhibitor
LC3B	protein light chain 3B
MAP1LC3B	engl. microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B
MEK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinasen
mTOR	engl. mammalian target of rapamycin
mRNA	messenger Ribonukleinsäure

NSCLC	engl. non-small-cell lung cancer / nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
NIS	Natrium-Iodid-Symporter
OS	engl. overall survival / Gesamtüberleben
P-AMPK	phosphorylierte AMP-aktivierte Proteinkinase
pAK	primärer Antikörper
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PFS	engl. progression free survival / Progressionsfreies Überleben
PD-1	engl. programmed cell death protein 1
PD-L1	engl. programmed cell death 1 ligand 1
PDGFR	engl. platelet-derived growth factor receptor
PDTC	engl. poorly differentiated thyroid cancer / schlecht differenziertes Schilddrüsenkarzinom
PDTTs	engl. patient-derived human tumor tissue / Primärkultur
PTC	engl. papillary thyroid carcinoma / papilläres Schilddrüsenkarzinom
RAF	engl. rapidly accelerated fibrosarcoma
RLU	relative Lichteinheit
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	engl. revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
s.	siehe
sAK	sekundärer Antikörper
SD-CA	Schilddrüsenkarzinom
SQSTM1	engl. Sequestosome-1
TBS	engl. Tris-buffered saline
TBST	engl. Tris-buffered saline with Tween20
TFEB	engl. Transcription factor EB
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor

UKGM	Universitätsklinikum Gießen und Marburg
UVRAG	engl. UV radiation resistance-associated gene
VEGFR	engl. Vascular endothelial growth factor receptor
vgl.	Vergleiche

1.2 Tabellen

Tabelle 1: Übersicht über einige Autophagie-relevante Proteine/Transkriptionsfaktoren.....	21
Tabelle 2: Darstellung der Eigenschaften der ATC-Zelllinie C643 und der untersuchten Primärkulturen	37
Tabelle 3: Gegenüberstellung der Häufigkeiten und der Verhältnisse beim Passagieren der genutzten Zelllinien.....	39
Tabelle 4: Darstellung der genutzten Konzentrationen zur Behandlung der Sphäroide zur Messung der Zellviabilität mittels RealTime-Glo™	43
Tabelle 5: Zyklen der RT-qPCR (Optimized Cycling Conditions for qPCR, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Systems).....	48

1.3 Abbildungen

Abbildung 1: Schematische Darstellung des PD-1/PD-L1 Signalweges	13
Abbildung 2: Schematische Darstellung des PD-1/PD-L1 Signalweges bei der Expression von PD-L1 durch Tumorzellen.....	14
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Wirkweise eines PD-1/PD-L1-Inhibitors	15
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Autophagie.....	19
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Doppelrolle der Autophagie	23
Abbildung 6: Induktion der Autophagie als Resistenzmechanismus gegen antitumorale Therapien	23
Abbildung 7: Echtzeit Zellviabilitätsanalyse von Sphäroiden der Zelllinie C643 (singuläre Behandlung)	55
Abbildung 8: Echtzeit Zellviabilitätsanalyse von Sphäroiden der Zelllinie C643 (Kombinationsbehandlung).....	57
Abbildung 9: Combination Index (CI) der kombinierten Behandlung der Sphäroide von C643	58
Abbildung 10: Darstellung der 3D Struktur der Sphäroide einer unbehandelten Kontrolle	59

Abbildung 11: Darstellung der 3D Struktur der Sphäroide nach der Behandlung mit 500 ng/ml Atezolizumab	60
Abbildung 12: Darstellung der 3D Struktur der Sphäroide nach der Behandlung mit 1 nM Panobinostat	60
Abbildung 13: Darstellung der 3D Struktur der Sphäroide nach der Behandlung mit 500 ng/ml Atezolizumab + 1 nM Panobinostat	61
Abbildung 14: Darstellung der 3D Struktur der Sphäroide nach der Behandlung mit 10 nM Panobinostat	61
Abbildung 15: Darstellung der 3D Struktur der Sphäroide nach der Behandlung mit 500 ng/ml Atezolizumab + 10 nM Panobinostat	62
Abbildung 16: Darstellung der 3D Struktur der Sphäroide nach der Behandlung mit 1 µM Sorafenib	62
Abbildung 17: Darstellung der 3D Struktur der Sphäroide nach der Behandlung mit 500 ng/ml Atezolizumab + 1 µM Sorafenib	63
Abbildung 18: Box-Whisker-Plot der RT-qPCR der Zelllinie C643 und der drei Primärkulturen nach der Behandlung mit 500 ng/ml Atezolizumab und einer Behandlungsdauer von 48h ...	64
Abbildung 19: Box-Whisker-Plot der RT-qPCR der Zelllinie C643 und der drei Primärkulturen nach der Behandlung mit 10 nM Panobinostat und einer Behandlungsdauer von 48h	65
Abbildung 20: Box-Whisker-Plot der RT-qPCR der Zelllinie C643 und der drei Primärkulturen nach der Behandlung mit 1 µM Sorafenib und einer Behandlungsdauer von 48h.....	65
Abbildung 21: Box-Whisker-Plot der RT-qPCR der Zelllinie C643 und der drei Primärkulturen nach der Behandlung mit 500 ng/ml Atezolizumab + 10 nM Panobinostat und einer Behandlungsdauer von 48h:	66
Abbildung 22: Box-Whisker-Plot der RT-qPCR der Zelllinie C643 und der drei Primärkulturen nach der Behandlung mit 500 ng/ml Atezolizumab + 1 µM Sorafenib und einer Behandlungsdauer von 48h:	66
Abbildung 23: Western Blot Membranen der Primärkultur Patient 2	68
Abbildung 24: Densitometrie der Proteinexpression in der Primärkultur Patient 2	69
Abbildung 25: Western Blot Membranen der Primärkultur Patient 3	70
Abbildung 26: Densitometrie der Proteinexpression in der Primärkultur Patient 3	71
Abbildung 27: Western Blot Membranen der Expression des Proteins PD-L1	72
Abbildung 28: Densitometrie der Proteinexpression des Proteins PD-L1	73
Abbildung 29: Western Blot Membranen der Zelllinie C643	106
Abbildung 30: Densitometrie der Proteinexpression in der Zelllinie C643	106
Abbildung 31: Western Blot Membranen der Primärkultur Patient 1	107

Abbildung 32: Densitometrie der Proteinexpression in der Primärkultur Patient 1	107
Abbildung 33: Western Blot Membranen der Zelllinie Nthy-ori 3-1.....	108
Abbildung 34: Densitometrie der Proteinexpression in der Zelllinie Nthy-ori 3-1	108

2 Einleitung

2.1 Das anaplastische Schilddrüsenkarzinom

2.1.1 Epidemiologie und Prognose

Das anaplastische Schilddrüsenkarzinom (ATC = engl. anaplastic thyroid carcinoma) macht weniger als 2% aller Schilddrüsenkarzinome (SD-CA) aus, dennoch ist es für bis zu 40% der durch SD-CAs verursachten Todesfälle verantwortlich (Smallridge und Copland 2010; Smallridge et al. 2012; Bible et al. 2021). Somit zählt das ATC zu den aggressivsten und tödlichsten Karzinomerkrankungen, das nach Erstdiagnose mit einem medianen Überleben von nur 3-5 Monate assoziiert ist (Kebebew et al. 2005; Smallridge et al. 2012; Smallridge und Copland 2010; Wächter et al. 2020). Trotz neuer und multimodaler Therapiekonzepte konnte in den letzten 10 Jahren keine Verbesserung dieser schlechten Prognose erreicht werden (Lin et al. 2019). Die Anzahl der neu diagnostizierten ATCs in Deutschland beträgt pro Jahr etwa 140 (Kraywinkel 2018).

2.1.2 Pathogenese

Das ATC kann sowohl de novo entstehen oder sich aus bereits bestehenden gut differenzierten (papillären oder follikulären) SD-CAs entwickeln (Nikiforova et al. 2003; Pozdeyev et al. 2018). Dieser Dedifferenzierung liegen verschiedene Mutationen zu Grunde, welche oft in Kombination vorliegen. Häufig treten zum Beispiel Mutationen im Tumorsuppressorgen *TP53* und *TERT*-Mutationen auf, andere wichtige Mutationen sind die *BRAFV600E*- und *RAS*-Mutationen, welche beim ATC Treibermutation darzustellen scheinen. (Landa et al. 2016; Xu und Ghossein 2016).

Die Mutation des *BRAFV600E*-Gens führt dabei zu einer Veränderung der Kinase, welche hierdurch kontinuierlich aktiv ist. Dies bewirkt die Aktivierung weiterer nachgeschalteter Kinasen, wie zum Beispiel MEK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase). Eine *BRAFV600E* Mutation scheint in diesem Zusammenhang mit einer vermehrten Angiogenese und vaskulären Invasion assoziiert zu sein, welche zum Beispiel für ein Wachstum des Tumors oder eine extrathyreoidale Extension verantwortlich sein können (Elisei et al. 2008).

2.1.3 Klinische Symptomatik

Das ATC zeigt ein sehr aggressives Wachstum mit einer frühzeitigen Infiltration oder Kompression benachbarter Strukturen. Hieraus ergibt sich eine ausgeprägte klinische Symptomatik. Lokal zeigt sich meist eine rasch progrediente Schwellung des Halses, diese geht mit Schmerzen, Stridor und/oder Dysphagie einher (Wendler et al. 2016). Zuletzt genannte Symptome sind durch eine Kompression oder Invasion der Trachea bzw. des Ösophagus

bedingt. Weitere mögliche Symptome sind z.B. ein Horner Syndrom durch Tumorinfiltration des Parasympathikus oder eine obere Einflusstauung durch Infiltration der Jugularvenen (Keutgen et al. 2015). Außerdem kann durch eine Infiltration des Nervus laryngeus recurrens eine Heiserkeit bestehen (Wächter et al. 2020; Wendler et al. 2016). Bei 20-40% der Patienten sind bei der Erstdiagnose Fernmetastasen nachweisbar (Fan et al. 2020; Kebebew et al. 2005) diese finden sich primär in der Lunge und in der Pleura, können aber auch ossär, abdominell oder zerebral vorliegen (Wendler et al. 2016). Bei weiteren 40-60% der Patienten ist eine lokale Metastasierung in zervikale Lymphknoten festzustellen (Kebebew et al. 2005; Keutgen et al. 2015).

Bei allen ATCs liegt das UICC (engl. Union for International Cancer Control) Stadium IV vor, dieses wird weiter in UICC Stadium IVA, IVB und IVC unterteilt. Im UICC Stadium IVA ist das ATC noch auf die Schilddrüse begrenzt, es liegen außerdem keine Lymphknotenmetastasen oder Fernmetastasen vor. Das UICC Stadium IVB hingegen ist durch ein extrathyreoidales Wachstum und/oder das Vorliegen von Lymphknotenmetastasen gekennzeichnet. Beim Vorhandensein von Fernmetastasen liegt ein UICC Stadium IVC vor (Bible et al. 2021).

2.1.4 Therapie des ATCs

Zur Behandlung des ATCs wird heute ein multimodales Therapiekonzept genutzt, welches Operation, Chemotherapie, Bestrahlung und molekularbasiertes, zielgerichtete Therapie (näheres hierzu s. 2.2) beinhaltet. Hierbei müssen das Behandlungskonzept und die Therapieziele individuell an den Patienten angepasst werden und sowohl das Tumorstadium, wie aber auch den Allgemeinzustand und die Wünsche des Patienten berücksichtigen (Bible et al. 2021).

2.1.4.1 Operative Therapie

Die Indikation zur operativen Therapie ist nach aktueller Leitlinie lediglich gegeben, wenn ein Stadium IVA oder ein „resektables“ Stadium IVB vorliegt. Resektabel bedeutet in diesem Zusammenhang, dass eine extrathyreoidale Tumorinfiltration ohne Infiltration des oberen Aerodigestivtraktes vorliegt (Bible et al. 2021; Wächter et al. 2020). In zahlreichen Studien konnte belegt werden, dass insbesondere für die genannten Stadien eine kurative R0-Resektion mit einem deutlichen Überlebensvorteil einhergeht (Goffredo et al. 2015; Wendler et al. 2016). Liegt hingegen bei Diagnosestellung ein Stadium IVB (mit Infiltration des oberen Aerodigestivtraktes) oder ein Stadium IVC (mit Fernmetastasen) vor, ist selten Indikation für ein operatives Vorgehen gegeben (Bible et al. 2021).

2.1.4.2 Strahlentherapie

Wie eingangs bereits erwähnt, spielt auch die Strahlentherapie bei der Therapie des ATCs eine wichtige Rolle. Der Einsatz der Radiatio kann sowohl neoadjuvant erfolgen, um ein potenziell resektables Tumorstadium zu erreichen, oder adjuvant, um nach einer Operation das Auftreten eines Lokalrezidivs zu verhindern. Des Weiteren erfolgt die Anwendung der Strahlentherapie auch in palliativen Situationen, z.B. für die Behandlung zerebraler oder ossärer Metastasen (Bible et al. 2021).

Zahlreiche retrospektive Studien belegen, dass eine Radiatio mit einem verlängerten Gesamtüberleben (OS = engl. overall survival) von ATC Patienten assoziiert ist (Kwon et al. 2016; Pezzi et al. 2017). Die Arbeitsgruppe von Kwon et al. konnte anhand einer Meta-Analyse, welche 1147 Patientin mit einem ATC einschloss, zeigen, dass eine adjuvante Strahlentherapie vor allem einen signifikanten Überlebensvorteil für Patienten bildete, welche an einem ATC des Stadiums IVA oder IVB erkrankt waren (Kwon et al. 2016). Eine weitere retrospektive Auswertung von Haymart et al. konnte an 2743 ATC Patienten demonstrieren, dass eine Radiatio das mediane OS auf 5 Monate versus 1,8 Monate ohne Radiatio verlängern kann (Haymart et al. 2013).

2.1.4.3 Chemotherapie

Die meisten retrospektiven Studien zeigen, dass durch die Anwendung einer Chemotherapie im Rahmen eines multimodalen Therapiekonzepts, welches Operation, Chemotherapie und Bestrahlung beinhaltet, ein verlängertes OS der an einem ATC erkrankten Patienten ermöglicht werden kann (Haymart et al. 2013; Wendler et al. 2016). Eine prospektive Studie wurde von Sosa et. al durchgeführt, diese demonstrierte, dass die Kombinationstherapie aus Paclitaxel und Carboplatin mit Fosbretabulin mit einem (statistisch nicht signifikanten) längeren OS assoziiert war, als die singuläre Behandlung mit Paclitaxel und Carboplatin (1-Jahres-Überleben 25.9% vs. 8.7%) (Sosa et al. 2014).

In der aktuellen Leitlinie wird bezüglich des Einsatzes von Chemotherapeutika beispielsweise eine Kombination aus Taxanen und/oder Anthrazyklinen und/oder Platin genannt (Bible et al. 2021).

2.1.4.4 Radioiodtherapie

Die Radioiodtherapie nach einer Thyreoidektomie zählt zu den Standardtherapie von Patienten mit einem differenzierten SD-CA (Luster et al. 2008). ATCs sind allerdings gegen diese Therapie resistent. Grund hierfür ist eine Fehlfunktion des Natrium-Iodid-Symporters, resultierend aus einer Suppression des zugehörigen Gens *-SLC5A5-* und/oder einem fehlerhaften Einbau des Transporters in die Membran (Damanakis et al. 2016; Wächter et al. 2018a).

2.1.4.5 Multimodale Therapiekonzepte

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass ein multimodales Therapiekonzept, welches Operation, Strahlentherapie und Chemotherapie beinhaltet, den Standard für Patienten darstellt, welche ein ATC im Stadium IVA oder ein resektables Stadium IVB aufweisen. Retrospektiv ist dieses Therapiekonzept mit einem verlängerten OS assoziiert (Bible et al. 2021; Haymart et al. 2013). Liegt hingegen ein fortgeschrittenes Stadium IVB oder ein Stadium IVC vor, wird in der Regel von einer Operation abgesehen, da multiviszerale und Debulking-Operationen keinen signifikanten Vorteil für den Patienten bilden. Stattdessen werden konservative Therapien bevorzugt (Bible et al. 2021).

In den letzten Jahren haben zunehmend zielgerichtete, individualisierte Tumorthérapien an Bedeutung gewonnen. Wichtig ist hierbei, eine für jeden Patienten möglichst individuelle Therapie zu finden, welche auf der Entschlüsselung potentieller molekularer Targets und der Aufarbeitung von Signaltransduktionswegen beruht. In diesem Zusammenhang wurde bereits festgestellt, dass eine Behandlung, welche individuell an die Mutationen des zu behandelnden Karzinoms angepasst ist, die Prognose des Patienten verbessern kann (Eckhardt et al. 2016; Wächter et al. 2018b). Entsprechend sollte bei allen Patienten mit ATC eine molekulargenetische Untersuchung des Tumors erfolgen, um die Möglichkeiten für individuelle/zielgerichtete Therapien zu evaluieren (Bible et al. 2021). Ein Teil dieser molekularbasierten, zielgerichteten Therapieoptionen soll im Folgenden vorgestellt werden.

2.2 Molekularbasierte, zielgerichtete Therapieoptionen zur Behandlung des ATC

2.2.1 Histondeacetylaseinhibitoren (HDACi)

Die Histondeacetylierung ist ein Vorgang, welcher die Struktur von Chromatin verdichtet und entsprechend zu einer geringer ausgeprägten Transkription von Genen führt. Umgekehrt führt die Acetylierung von Histonen zu einer Aktivierung der Transkription. An diesem Vorgang setzen die HDACis an, welche die Deacetylierung von Histonen verhindern, was zu einer offenen Struktur des Chromatins und einer vermehrten Transkription führt. Auf diese Weise können HDACis über epigenetische Modifikationen die Genexpression der Zellen beeinflussen (Walkinshaw und Yang 2008).

Vorangegangene Studien konnten zeigen, dass HDACis im Allgemeinen eine antiproliferative und pro-apoptische Wirkung auf Zellen des ATCs haben können. Außerdem konnte eine Differenzierung der schlecht differenzierten Tumoren bewirkt und das Potenzial zur Bildung von Metastasen gesenkt werden (Zhang et al. 2015). Die Arbeitsgruppe von Wächter et al. konnte außerdem eine dosisabhängige Zytotoxizität von HDACis gegenüber ATC-Zellen

nachweisen, besonders der HDACi Panobinostat zeigte eine hohe Wirkung auf die Tumorzellen, wobei eine vergleichsweise niedrige Konzentration von 10 nM gewählt wurde. Des Weiteren konnte durch die Therapie mit HDACis die Natrium-Iodid-Symporter (NIS) assoziiert mRNA *SLC5A5* hochreguliert werden, wie auch die NIS-Protein-Expression (Wächter et al. 2018a). Wie unter 2.1.4.4 dargestellt, ist das ATC eigentlich resistent gegen die Behandlung mit Radioiodid, durch die dargestellte Studie konnte jedoch demonstriert werden, dass eine Re-Expression des Natrium-Iodid-Transporters und die damit verbundene Aufnahme von radioaktivem Iod einen neuen Therapieansatz zur Behandlung des ATCs darstellen könnte (Wächter et al. 2018a).

2.2.1.1 Panobinostat

In der hier vorliegenden Arbeit wurde der HDACi Panobinostat eingesetzt, mit einem Molekulargewicht von 349.4 g/mol und der chemischen Summenformel C₂₁H₂₃N₃O₂.

Panobinostat hemmt selektiv Histondeacetylasen und induziert so die Hyperacetylierung von Histonen, wodurch eine Beeinflussung der Expression von Proteinen des Zellzyklus möglich ist. Außerdem kann eine Unterbrechung des Zellzyklus in der G₂/M-Phase oder Apoptose induziert und die Expression von Genen moduliert werden, welche für die Angiogenese wichtig sind. Auf diese Weise kann die Chemotaxis und die Invasion von Endothelzellen beeinträchtigt werden (PubChem 2021a).

Bezüglich der Therapie des ATCs mit Panobinostat existieren bisher nur präklinische Studien. Diese konnten unter anderem eine verminderte Tumorzellmigration und –invasion und eine erhöhte Expression von NIS auf Gen- und Proteinebene nachweisen, welche mit einer Radioiod-Aufnahme assoziiert war (Catalano et al. 2012; Pugliese et al. 2013) (vgl. auch 2.2.1).

2.2.2 Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs)

Die Aufgabe von TKIs ist, den Transfer einer γ -Phosphatgruppe von Adenosintriphosphat (ATP) auf ein Zielprotein zu katalysieren. Sie können unterteilt werden in Rezeptor-Proteinkinasen, welche an Rezeptoren an der Zelloberfläche binden und eine wichtige Rolle in der Transduktion von extrazellulären Signalen spielen, und in Proteinkinasen, welche in das Innere der Zelle gelangen können und dort intrazelluläre Signale übermitteln (Arora und Scholar 2005). Damit modulieren TKIs u.a. für das Zellwachstum essentielle Signalwege und stellen aufgrund dessen wichtige Ziele in der Behandlung unterschiedlicher Karzinomentitäten dar, beispielsweise zählt der TKI Sorafenib zur Standardtherapie des HCCs (engl. Hepatocellular Carcinoma) (Gordan et al. 2020).

Verschiedene Studien untersuchten bereits die Wirksamkeit von TKIs bei der Behandlung des SD-CAs. Die Arbeitsgruppe von Schlumberger et al. publizierte 2015 eine randomisierte, kontrollierte, multizentrische Phase-III-Studie, welche 392 Patienten einschloss, die an einem

Iod-131-resistenten SD-CA erkrankt waren. 261 Patienten wurden mit dem TKI Lenvatinib behandelt. In der Lenvatinib-Gruppe konnte eine Verlängerung des PFS (engl. progression free survival) auf 18,3 Monate im Vergleich zu 3,6 Monaten in der Placebo-Gruppe verzeichnet werden ($p < 0,001$; 99% CI 0,14-0,31). Allerdings wurden in der Lenvatinib-Gruppe auch vermehrt unerwünschte Nebenwirkungen beobachtet, die aber über eine Modifikation der Dosis und durch medizinische Therapie behandelbar waren (Schlumberger et al. 2015). Bezogen auf das ATC zeigte eine Phase-II-Studie an 17 ATC-Patienten ein gutes klinisches Ansprechen auf Lenvatinib, mit einem medianen PFS von 7,4 Monaten (95% CI 1,7–12,9) und einem medianen OS von 10,6 Monaten (95% CI 3,8–19,8) (Takahashi et al. 2019).

2.2.2.1 Sorafenib

Der in dieser Arbeit eingesetzte TKI war der Multi-Kinase-Inhibitor Sorafenib. Sorafenib hat ein Molekulargewicht von 464,8 g/mol und die Summenformel $C_{21}H_{16}ClF_3N_4O_3$. Es ist ein oral eingenommener Multi-Kinase-Inhibitor, welcher das Enzym RAF-Kinase blockt, dieses stellt eine wichtige Komponente des RAF/MEK/ERK Signalweges dar, welcher die Zellteilung und Proliferation kontrolliert. Außerdem inhibiert Sorafenib die VEGFR-2/PDGFR-beta Signalkaskade, wodurch die Angiogenese des Tumors geblockt wird (PubChem 2021b).

Bei einer in vitro Untersuchung verschiedener Zelllinien des SD-CAs, unter anderem auch des ATCs, zeigte sich, dass Sorafenib über die Inhibition verschiedener intrazellulärer Signalwege die Proliferation aller Zelllinien hemmen konnte. Hierbei zeigte sich Sorafenib gegen alle Zelllinien effektiv, unabhängig von ihrem *BRAF*-Mutationsstatus und dem histologischen Subtyp. Über eine Analyse des Zellzyklus und der Caspasen konnte festgestellt werden, dass durch die Behandlung der Zellen mit Sorafenib eine Induktion der Apoptose erfolgte (Broecker-Preuss et al. 2015). Es konnte außerdem demonstriert werden, dass Sorafenib das Wachstum endothelialer Zellen, welches durch die Zellen des ATCs über verschiedene humorale Faktoren stimuliert wird, inhibieren kann (Ishihara et al. 2019).

Sorafenib ist auf Grundlage einer multizentrischen, randomisierten, Placebo-kontrollierten Phase-III-Studie für die Behandlung des radioiodrefraktären SD-CAs zugelassen. In dieser Studie konnte für 417 Patienten, welche an einem fortgeschrittenen, radioiodrefraktären SD-CA erkrankt waren, eine Verlängerung des PFS in der Sorafenib-Gruppe ($n=207$) auf 10,8 Monate vs. 5,8 Monate in der Placebo-Gruppe ($n=210$) beobachtet werden ($p < 0,0001$; 95% CI 0,45-0,76) (Brose et al. 2014).

Der TKI Sorafenib wurde auch als potenzieller Therapieansatz für die Behandlung des ATCs untersucht. In verschiedenen Phase-II-Studien konnte bisher kein klarer therapeutischer Effekt bei der Behandlung des ATCs mit Sorafenib nachgewiesen werden (Ito et al. 2017; Savvides et

al. 2013). Die Arbeitsgruppe von Savvides et al. untersuchte hierbei 20 ATC-Patienten, welche mit Sorafenib behandelt worden waren. Nur bei 2 von 20 Patienten konnte ein partielles Therapieansprechen beobachtet werden, 5 der 20 Patienten zeigte eine stabile Erkrankung. Das mediane PFS lag bei 1,9 Monaten (95% CI 1,3–3,6 Monate), das mediane OS lag bei 3,9 Monaten (95% CI 2,2–7,1 Monate) (Savvides et al. 2013).

Ein vielversprechender neuer Behandlungsansatz für das ATC könnte deshalb eine Kombinationstherapie aus dem TKI Sorafenib mit anderen zielgerichteten Medikamenten wie z.B. Immuncheckpointinhibitoren darstellen (Ishihara et al. 2019). Hierbei zeigten sich bereits vielversprechende Ergebnisse bei der Kombination von TKIs mit Pembrolizumab, näheres hierzu siehe 2.3.3.

2.3 Programmed cell death protein 1 / Programmed cell death 1 ligand 1

Das Protein Programmed cell death protein 1 (im Folgenden kurz PD-1) wird von verschiedenen Zellen des Immunsystems, unter anderem von aktivierten T-Zellen, exprimiert (Agata et al. 1996). Es stellt ein wichtiges Protein in der Regulation des Immunsystems dar und ist unter anderem verantwortlich für die negative Regulation des Immunsystems, außerdem spielt PD-1 eine wichtige Rolle in der Toleranzentwicklung gegenüber körpereigenen Proteinen (Giancetti et al. 2013). PD-1 bindet zwei Liganden: PD-L1 (Programmed cell death 1 ligand 1) und PD-L2 (Programmed cell death 1 ligand 2) (He et al. 2004). Im Gegensatz zu PD-L2 kommt PD-L1 auf hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen vor. PD-L1 ist bei Bindung an seinen Rezeptor dazu in der Lage, die Aktivität von zytotoxischen T-Zellen runter zu regulieren und so die körpereigenen, „normalen“ Zellen vor der Zerstörung durch Zellen des Immunsystems zu schützen (Park et al. 2010) (vgl. Abbildung 1). Hier zeigt sich die Wichtigkeit dieses Signalweges für die Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz.

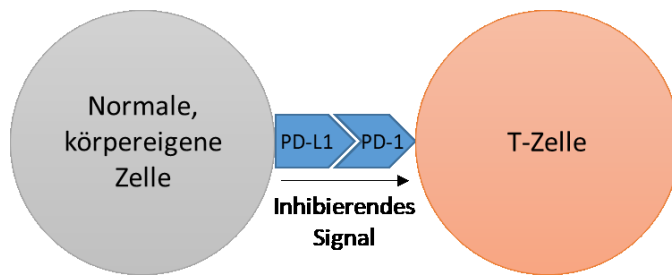


Abbildung 1: Schematische Darstellung des PD-1/PD-L1 Signalweges. Eine normale, körpereigene Zelle exprimiert PD-L1 und sendet über den PD-1/PD-L1 Signalweg ein inhibierendes Signal an die zytotoxische T-Zelle, welche hierdurch in ihrer Aktivität gehemmt wird. Auf diese Weise wird (unter anderem) eine Toleranz der T-Zelle bzw. des Immunsystems gegen die körpereigenen Zellen gewährleistet. Quelle: Eigene Abbildung, modifiziert nach (Salmaninejad et al. 2018).

Allerdings konnte beobachtet werden, dass auch verschiedene Karzinome (wie zum Beispiel das maligne Melanom oder das Bronchialkarzinom) dazu in der Lage sind, PD-L1 vermehrt zu exprimieren, sich auf diese Weise der körpereigenen Abwehr durch zytotoxische T-Zellen zu entziehen und die antitumorale Immunität auf diese Weise zu hemmen (Mahoney et al. 2015; Shimizu et al. 2018). Die Expression von PD-L1 durch die Tumorzellen führt dazu, dass die zerstörende Wirkung der T-Zelle durch ein inhibierendes Signal gehemmt wird, wodurch die Immunantwort gegen den Tumor eingeschränkt wird (Giancchetti et al. 2013) (vgl. Abbildung 2). Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass eine hohe Expression von PD-L1 seitens der Tumorzellen mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko assoziiert ist und mit einer schlechteren Prognose korreliert (Francisco et al. 2010). Es wird deutlich, dass der PD-1/PD-L1 Signalweg sowohl hilfreich, aber auch hinderlich für die körpereigene Abwehr fremder bzw. entarteter Zellen sein kann.

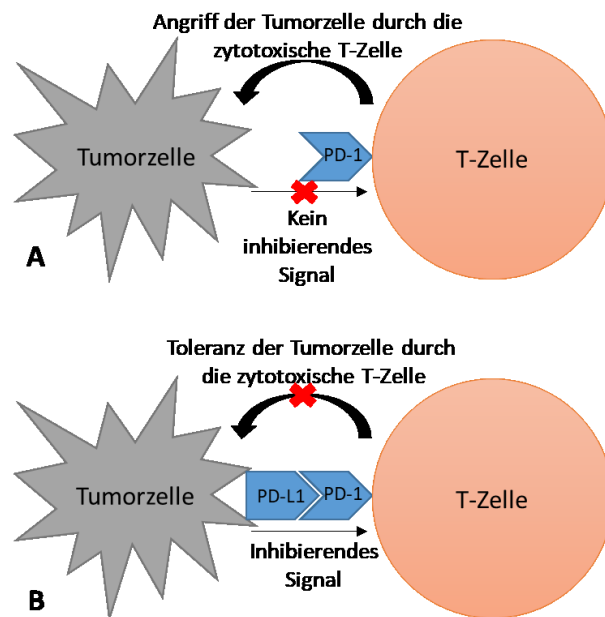


Abbildung 2: Schematische Darstellung des PD-1/PD-L1 Signalweges bei der Expression von PD-L1 durch Tumorzellen. A: Die Tumorzelle exprimiert kein PD-L1. Sie wird (unter anderem) durch die fehlende PD-L1-Expression von der zytotoxischen T-Zelle als fremd erkannt und zerstört. **B:** Die Tumorzelle exprimiert PD-L1 und sendet ein hemmendes Signal an die zytotoxische T-Zelle, welche sich hierdurch der Tumorzelle gegenüber tolerant zeigt und diese nicht zerstört. Quelle: Eigene Abbildung, modifiziert nach (Salmaninejad et al. 2018).

Auf Grundlage dieser Beobachtungen konnte erfolgreich nachgewiesen werden, dass eine Blockade des PD-1/PD-L1 Signalweges durch eine immunmodulatorische Therapie potenziell dazu in der Lage ist, die körpereigene, antitumorale Immunantwort zu stärken, beispielsweise über eine Steigerung der Aktivität von T-Lymphozyten (vgl. Abbildung 3) oder durch eine erhöhte Zytokinfreisetzung (Brown et al. 2003). Es entstand außerdem die Hypothese, dass Antikörper, welche den PD-1/PD-L1 Signalweg blockieren, eine synergistische Wirkung mit anderen therapeutischen Substanzen haben könnten, welche ebenfalls über eine Verstärkung der körpereigenen Immunität gegen die Tumorzellen wirken (Salmaninejad et al. 2018).

Durch die Blockade des PD-1/PD-L1 Signalweges konnte in zahlreichen Studien bereits das Gesamtüberleben von Patienten mit verschiedensten Tumorerkrankungen signifikant verlängert werden (Bellmunt et al. 2017; Chen et al. 2017; Motzer et al. 2015; Reck et al. 2016). Die PD-L1-Expression ist dabei ein potenzieller Biomarker für die Reaktion von verschiedenen Tumoren auf die Behandlung mit PD-1- oder PD-L1-Antikörpern (Page et al. 2014).

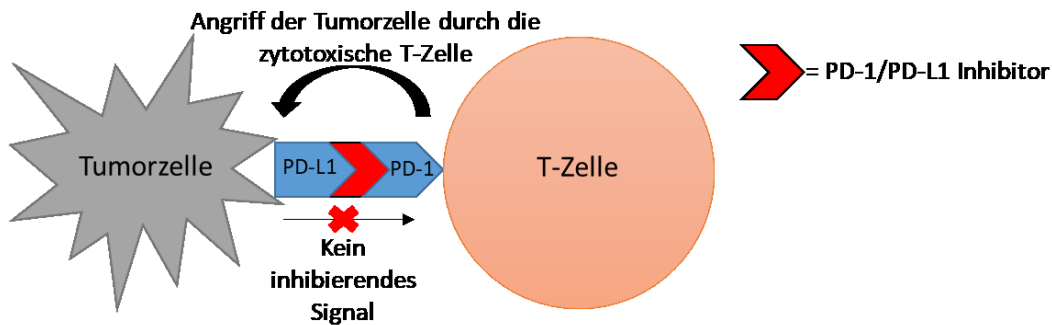


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Wirkweise eines PD-1/PD-L1-Inhibitors. Durch die Blockade des PD-1/PD-L1 Signalweges ist die zytotoxische T-Zelle dazu in der Lage, die Tumorzelle als fremd zu erkennen. Über eine Aktivierung der T-Zelle kommt es zum Angriff der Tumorzelle durch die zytotoxische T-Zelle. Quelle: Eigene Abbildung, modifiziert nach (Salmaninejad et al. 2018).

Ein Antikörper, der bei der Blockade des PD-1/PD-L1 Signalweges die letzten Jahre zunehmend an Bedeutung gewonnen hat, ist der PD-1-Blocker Pembrolizumab. Ein Beispiel hierfür ist die Phase-III-Studie von Reck et al., welche 305 Patienten untersuchte, die an einem fortgeschrittenen kleinzelligen Lungenkarzinom erkrankt waren und eine PD-L1-Expression der Tumorzellen von mindestens 50% aufwiesen. Durch die Behandlung mit Pembrolizumab konnte, im Vergleich zur Platin-basierten Chemotherapie, ein signifikant längeres medianes PFS (10,3 Monate vs. 6 Monate; $p < 0,001$; 95% CI 0,37-0,68) wie auch ein signifikant längeres medianes OS und das Auftreten weniger unerwünschter Nebenwirkungen beobachtet werden (Reck et al. 2016). Aber auch bei der Behandlung des ATCs spielt Pembrolizumab eine wichtige Rolle. Besonders wichtig ist in diesem Zusammenhang auch die Kombinationstherapie von Pembrolizumab, unter anderem mit TKIs, näheres hierzu siehe 2.3.3.

2.3.1 Atezolizumab

Zur Blockade des PD-1/PD-L1 Signalweges wurde in dieser Arbeit der PD-L1-Antikörper Atezolizumab eingesetzt. Auch dieser stellt eine vielversprechende neue Therapiemethode bei der Behandlung verschiedener Karzinomentitäten dar. Ein Beispiel ist eine randomisierte Phase-III-Studie von Herbst et al., welche 572 Patienten mit metastasiertem NSCLC (engl. non-small-cell lung cancer) einschloss. Hierbei konnte für Patienten, welche ein NSCLC mit einem EGFR- und AKT-Wildtyp und eine hohe Expression von PD-L1 aufwiesen, durch die Therapie mit Atezolizumab ein signifikant längeres OS beobachtet werden als in der Vergleichsgruppe, welche mit einer Platin-basierten Chemotherapie behandelt wurde (OS 20,2 Monate vs. 13,1 Monate; $p = 0,01$; 95% CI 0,40-0,89) (Herbst et al. 2020).

Ein weiteres Beispiel für die Effektivität von Atezolizumab ist das metastasierte, triple-negative Mammakarzinom. Bei dieser Karzinomentität konnte durch die Behandlung mit Atezolizumab

in Kombination mit Paclitaxel, im Vergleich zu einer Therapie mit Paclitaxel und Placebo, eine Verlängerung des PFS gezeigt werden. Hierbei schienen besonders Patienten mit einem PD-L1 positiven Tumor von der Kombinationsbehandlung mit Atezolizumab zu profitieren (PFS 7,5 Monate vs. 5,0 Monate in der Placebo-Gruppe; $p < 0,001$; 95% CI 0,49-0,78) (Schmid et al. 2018). Anhand des zuletzt genannten Beispiels zeigt sich, wie wirksam die Kombination von PD-1/PD-L1-Inhibitoren mit weiteren antitumoralen Substanzen sein kann und dass dies dazu beiträgt, ein möglichst effektives Therapiekonzept zu entwickeln.

Für die Therapie des ATCs mit dem PD-L1-Inhibitor Atezolizumab sind aktuell noch keine klinischen Arbeiten verfügbar.

2.3.2 Expression von PD-L1 in Zellen des ATCs

Die Anzahl PD-L1 positiver Zellen in SD-CAs ist variabel (Ahn et al. 2017). Bisher ist nicht genau geklärt, wo und in welchem Umfang PD-1 und PD-L1 in den Tumorzellen lokalisiert ist und in welchem Maße die Expression das PFS und das OS der betroffenen Patienten beeinflusst. Eine retrospektive Datenevaluation einer kleinen Patientengruppe ($n = 48$) durch die Arbeitsgruppe von Chintakuntlawar et al. legt allerdings nahe, dass eine stark ausgeprägte Expression von PD-L1 in den Tumorzellen des ATCs mit einem verkürzten OS und PFS einhergeht (Chintakuntlawar et al. 2017).

Eine Untersuchung von Zwaenpol et al. zur Expression von PD-L1 in Zellen des ATCs konnte PD-L1 in 28,6% aller untersuchten Tumoren des ATCs nachweisen. Hingegen war der zugehörige Rezeptor, PD-1, nicht in den Tumorzellen exprimiert (Zwaenepoel et al. 2017). Die Arbeitsgruppe von Wu et al. kam zu ähnlichen Ergebnissen: eine Expression von PD-L1 in Zellen des ATCs konnte in 3 von 13 Patienten (23%) nachgewiesen werden (Wu et al. 2015). Diese Patienten waren alle nicht operabel, aufgrund eines großen, nicht resektablen Tumors und eines schlechten Allgemeinzustandes. Hieraus wurde geschlossen, dass vor allem Patienten, welche an einem nicht resektablen Tumor erkrankt sind, von einer Immuntherapie des ATCs profitieren könnten (Wu et al. 2015). Diese Ergebnisse passen zu der Beobachtung von Ahn et al., dass vor allem Zellen fortgeschrittener SD-CAs einen hohen Anteil PD-L1 positiver Zellen besitzen (Ahn et al. 2017).

Es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass in den Zellen des ATCs mehr PD-L1 positive Tumorzellen zu finden sind, als in Zellen des DTCs. Des Weiteren ist auch die Infiltration mit Lymphozyten in Zellen des ATCs höher und die Lymphozyten in den Proben des ATCs wiesen ebenfalls eine höhere Expression von PD-1 und PD-L1 auf (Ahn et al. 2021).

2.3.3 Immunmodulatorische Therapie des ATCs als Kombinationstherapie

Wie unter 2.3 bereits erwähnt, hat sich in der Therapie des ATCs eine Kombinationstherapie aus dem PD-1-Inhibitor Pembrolizumab mit anderen zielgerichteten Medikamenten, zum Beispiel mit TKIs etabliert. Dass Pembrolizumab in Kombination mit TKIs das Therapieansprechen von Patienten verbessern kann, konnte beispielsweise bereits bei der Therapie des malignen Melanoms demonstriert werden (Szczepaniak Sloane et al. 2017).

Ausgangspunkt zur Kombination der genannten Substanzen bei der Behandlung des ATCs war die Beobachtung, dass bei der alleinigen Therapie mit Kinaseinhibitoren (KIs) nach einem initialen Therapieansprechen eine erneute Progression des Tumors möglich ist. Dies führte zu der Annahme, dass die Zellen des ATCs Resistenzmechanismen gegen die Therapie mit KIs entwickelt haben könnten (Danysh et al. 2016; Iyer et al. 2018). Auf Grundlage der Erkenntnis, dass auch die Zellen des ATCs PD-L1 exprimieren, kombinierte die Arbeitsgruppe von Iyer et al. verschiedene KIs (u.a. Dabrafenib, Trametinib oder Lenvatinib) mit Pembrolizumab, sobald unter der singulären Therapie mit dem KI ein Fortschreiten der Erkrankung beobachtet werden konnte. Insgesamt wurden in dieser Studie 12 Patienten, welche an einem ATC erkrankt waren, untersucht. Von diesen zeigten fünf Patienten ein partielles Tumoransprechen, vier Patienten eine stabile Erkrankungssituation und bei drei Patienten war ein Progress des Karzinoms zu verzeichnen. Hieraus wurde geschlossen, dass Patienten von der Kombination aus KIs mit PD-1-Inhibitoren profitieren könnten (Iyer et al. 2018). Fragliche bleibt allerdings, ob die Gabe des PD-1-Inhibitors erst bei Progression der Erkrankung unter singulärer Therapie mit einem KI erfolgen sollte oder ob die Patienten eher von einer von Anfang an bestehenden Kombinationstherapie profitieren würden (Iyer et al. 2018).

Eine weitere wegweisende Arbeit zu Kombinationstherapien mit Pembrolizumab wurde 2021 von der Arbeitsgruppe Dierks et al. veröffentlicht. In dieser Studie wurden 6 Patienten, welche an einem ATC erkrankt waren, mit einer Kombination aus Pembrolizumab und dem KI Lenvatinib behandelt. Durch diese Kombination konnte ein medianes PFS von 16,5 Monaten und ein medianes OS von 18,5 Monaten erreicht werden, 4 von 6 Patienten zeigten eine komplette Remission. Hierbei konnten besonders die Patienten von der Behandlung profitieren, deren Anteil an PD-L1 positiven Tumorzellen über 50% betrug (Dierks et al. 2021).

Ein anderer Therapieansatz zur kombinierten Behandlung des ATCs ist die Kombination von PD-L1-Inhibitoren mit *BRAF*-Inhibitoren. Eine *BRAFV600E* Mutation kann bei etwa 45% der ATC-Patienten nachgewiesen werden (Landa et al. 2016). Die Arbeitsgruppe von Brauner et al. konnte mit Hilfe eines Mausmodells demonstrieren, dass eine singuläre Blockade von PD-L1 nur einen kleinen Effekt auf das Tumorwachstum hatte. Hingegen konnte nach eine

Kombinationstherapie, bestehend aus einem PD-L1-Inhibitor und einem *BRAF*-Inhibitor, ein synergetischer Effekt der eingesetzten Substanzen festgestellt werden, welcher eine ausgeprägte Tumorregression und eine verstärkte antitumorale Immunantwort bewirken konnte (Brauner et al. 2016). *BRAF*-Inhibitoren wurden des Weiteren bereits erfolgreich in Kombination mit anderen antitumoralen Substanzen eingesetzt. Eine neoadjuvante Therapie mit dem *BRAF*-Inhibitor Dabrafenib und dem MEK-Inhibitor Trametinib führte in einer klinischen Studie von Wang et al., welche 6 ATC-Patienten mit primär irresektablem Tumor und dem Vorliegen einer *BRAFV600E*-Mutation einschloss, zu der Möglichkeit einer R0-Resektion nach entsprechender Vorbehandlung (Wang et al. 2019). Die Kombination der beiden Substanzen diente dabei dem Zweck, einer frühen Resistenz des Tumors gegen Dabrafenib entgegen zu wirken (Flaherty et al. 2012). Auf diese Weise konnte eine geringere Rate von Tracheotomien erzielt und die lokale Tumorkontrolle, sowie die klinische Symptomatik verbessert werden (Wang et al. 2019). Für ATC Patienten mit positivem *BRAFV600E*-Mutationsstatus konnte sich die Kombinationstherapie aus Dabrafenib und Trametinib, aufgrund des hohen klinischen Nutzen, bereits in den amerikanischen Leitlinien etablieren (Bible et al. 2021).

Das Potential einer Kombination der zuletzt genannten Therapie mit einem PD-1-Inhibitor zeigt sich in einem Case-Report von Cabanillas et al. Der hier dargestellte Patient litt an einem irresektablen, lokal fortgeschrittenen ATC und wurde bei Vorliegen einer *BRAFV600E* Mutation zunächst mit Dabrafenib und Trametinib behandelt. Bei Fortschreiten der Erkrankung erhielt der Patient bei einem hohen Anteil PD-L1 (PD-L1 Score in der Immunhistochemie: > 95%) positiver Zellen eine Behandlung mit Pembrolizumab. Dies ermöglichte eine komplette chirurgische Resektion des Tumors (Cabanillas et al. 2018). Die hier aufgeführten Beispiele verdeutlichen erneut die Wichtigkeit der Kombination verschiedener therapeutisch wirksamer Substanzen, um zum Beispiel der Entstehung von Resistenzen vorzubeugen.

Eine weitere spannende Beobachtung, welche allerdings nicht an Zellen des ATCs, sondern an Zellen des B-Zell-Lymphoms gemacht wurde, ist, dass die Histondeacetylase 3 einen wichtigen epigenetischen Regulator der PD-L1-Expression darstellt. Die Gabe eines HDACis resultierte in einer erhöhten Expression von PD-L1 auf Zellen des B-Zell-Lymphoms. Über diese erhöhte Expression konnte ein verstärkter antitumoraler Effekt bei einer Therapie mit einem PD-L1-Inhibitor erreicht werden. Eine Kombination von HDACis (näheres zu HDACis unter 2.2.1) mit PD-1/PD-L1-Inhibitoren kann also einen vielversprechenden Behandlungsansatz darstellen (Deng et al. 2019).

2.4 Autophagie

Autophagie stellt einen katabolen Prozess dar, welcher physiologisch auf einem basalen Level in jeder Zelle vorkommt und die zelluläre Homöostase fördert (Hale et al. 2013; Di Fazio et al. 2016). Hierbei werden beschädigte Zellorganellen beseitigt und langlebige Proteine umgesetzt. Als Reaktion auf Signale, welche eine Zellen schädigen können, wie zum Beispiel eine schlechte Stoffwechsellage, Hypoxie, Sauerstoffradikale, Infektionen oder auch Chemotherapien, können die betroffenen Zellen die Autophagie nutzen, um ihr Überleben zu sichern. Hierfür werden zytoplasmatische Materialien recycelt und für die Produktion von Energie genutzt (Yang und Klionsky 2010). Ein wichtiger Mechanismus hierbei ist die Entstehung von sogenannten Autophagosomen, welche Vesikel mit einer doppelten Zellmembran darstellen. Diese Autophagosomen bringen beschädigte zytoplasmatische Zellkomponenten zu den Lysosomen, in welchen wiederum unter den genannten Stressbedingungen ein Recycling der Zellbestandteile stattfinden kann (Yun und Lee 2018). Hierzu kommt es zu einer Fusion des Autophagosomes mit dem Lysosom und es entsteht das sogenannte Autolysosom (Parzych und Klionsky 2014). Eine schematische Darstellung dieser Vorgänge erfolgt in Abbildung 4.

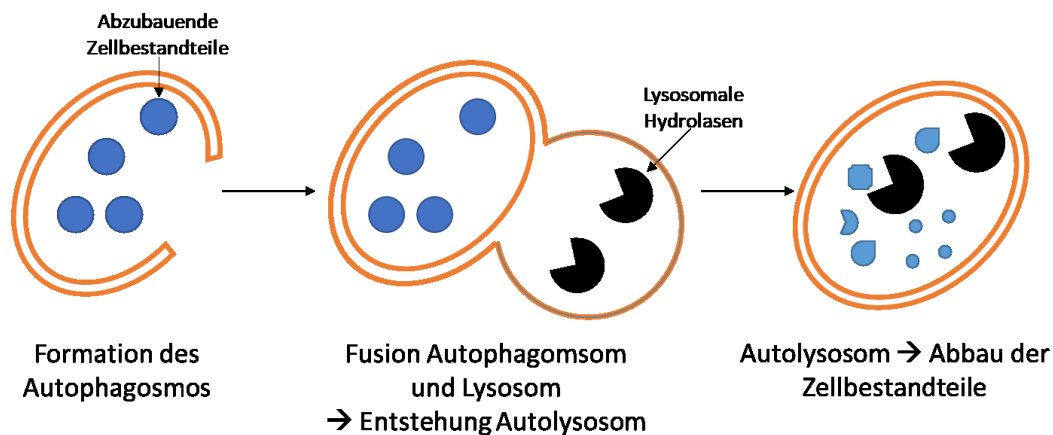


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Autophagie. Nach Formation des Autophagosomes kommt es durch die Fusion mit einem Lysosom zur Entstehung des Autolysosoms. Hier erfolgt der Abbau und das Recyclen der Zellbestandteile. Quelle: Eigene Abbildung, modifiziert nach (Parzych und Klionsky 2014).

Man kann Autophagie in eine generelle bzw. nicht-selektive und eine selektive Form unterteilen. Während die generelle Form Proteine des Zytoplasmas in Autophagosomen verpackt, ist die selektive Autophagie dazu in der Lage, spezifische Ziele wie beschädigte Zellorganellen, Protein-Bestandteile und intrazelluläre Krankheitserreger zu erkennen (Yun und Lee 2018).

Allerdings kann Autophagie bei extremem Stress auch den Zelltod der betroffenen Zellen herbeiführen. Der durch Autophagie herbeigeführte Zelltod ist dabei unabhängig von dem Zelltod, welcher durch Apoptose herbei geführt wird (Denton et al. 2012).

Eine Beeinträchtigung dieses physiologischen Mechanismus, welcher zum Beispiel daraus resultieren kann, dass Autophagie-relevante Gene ihre Funktion verlieren, ist unter anderem assoziiert mit Herz- und Muskeldegeneration, Neurodegeneration und auch der Entstehung von malignen Tumoren. Autophagie ist ein Prozess, welcher durch verschiedene Checkpoints charakterisiert und reguliert ist. Die Beeinflussung/Veränderung dieser kann zu einer pathologischen Hemmung der Autophagie führen, wodurch wiederum eine ausgeprägte Akkumulation von Metaboliten möglich ist. Dies kann zellulären Stress bedingen, aber auch zu einer genetischen Instabilität führen, was die Entstehung von malignen Tumoren fördern kann (Di Fazio et al. 2016; Levine und Kroemer 2008).

Die Regulation/Induktion der Autophagie ist von verschiedenen Transkriptionsfaktoren, Proteinen und Proteinkinasen abhängig. Hierbei stellt unter anderem die Proteinkinase mTOR (mammalian target of rapamycin) ein Enzym dar, welches als Sensor des Ernährungsstatus der Zelle eine wichtige Rolle in der zellulären Homöostase einnimmt. Die Hemmung der Proteinkinase, zum Beispiel durch nicht ausreichend vorhandene Aminosäuren, führt zu einer Inhibition des Zellwachstums und zu einer Induktion der Autophagie (Bar-Peled und Sabatini 2014). Diese Induktion wird unter anderem über die Phosphorylierung des Proteins Beclin 1 eingeleitet. Über diesen Signalweg stellt Beclin 1 einen wichtigen Tumorsuppressor dar (Wei et al. 2015). Beclin 1 interagiert anschließend unter anderem mit dem Modulator UVRAG (UV radiation resistance-associated gene protein), was der weiteren Induktion der Autophagie dient (Liang et al. 2006).

Ein weiteres Beispiel für eine regulierende Proteinkinase stellt die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) dar, welche eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Autophagie spielt. Hierbei fungiert AMPK ebenfalls als ein Energiesensor für die Zelle, welcher durch ein erhöhtes Level von AMP aktiviert wird. Ein hohes AMP-Level induziert hierbei die Autophagie, um bei Energiemangel die Bereitstellung von neuer Energie durch katabole Prozesse zu gewährleisten (Di Fazio und Matrood 2018; Villanueva-Paz et al. 2016).

Wie oben schon beschrieben, stellt die Bildung des Autophagosomes einen entscheidenden Schritt bei der Autophagie dar. An dessen Bildung ist unter anderem das Protein LC3B (protein light chain 3) beteiligt. Dieses ist in vielen Zellen im Zytosol exprimiert und kann, abhängig von der Induktion der Autophagie, in LC3B-I gespalten werden, welches über Phosphorylierung zu LC3B-II umgewandelt wird. Dieses wiederum ist an der Oberfläche der Autophagosomen zu

finden (Glick et al. 2010; Barth et al. 2010). Da die Synthese und Verarbeitung von LC3B während der Aktivierung der Autophagie ansteigt, stellt es einen wichtigen Marker für das Autophagie-Level der Zellen dar (Barth et al. 2010). Die mit der Bildung des Autophagosoms verbundene Aufnahme von Zellbestandteilen stellt nicht nur eine unspezifische Degeneration, sondern zumeist einen selektive Prozess dar, welcher unter anderem durch ein Zusammenspiel zwischen LC3B-II und dem Protein p62/SQSTM1 reguliert wird (Ichimura et al. 2008).

Einen wichtigen Transkriptionsfaktor zur Regulation der Autophagie stellt im nächsten Schritt TFEB dar. Dieser transkribiert für lysosomale Gene und Autophagie-Gene und ist ebenfalls an der Formation des Autophagosomes und der Fusion zwischen Autophagosom und Lysosom beteiligt (Settembre et al. 2011).

Eine vereinfachte Übersicht über die aufgeführten Proteine/Transkriptionsfaktoren, welche für die Regulation bzw. den Ablauf der Autophagie eine Rolle spielen, gibt Tabelle 1.

Tabelle 1: Übersicht über einige Autophagie-relevante Proteine/Transkriptionsfaktoren

Protein/Transkriptionsfaktor	Funktion	Literatur
Beclin 1	Über Phosphorylierung → Induktion der Autophagie	(Wei et al. 2015)
UVRAG	Positiver Regulator des Beclin 1 Komplexes	(Liang et al. 2006)
AMPK	Induktion / Regulation der Autophagie	(Villanueva-Paz et al. 2016)
LC3B	Beteiligt an der Bildung des Autophagosoms	(Barth et al. 2010; Glick et al. 2010)
P62/SQSTM	Selektive Aufnahme bestimmter Zellbestandteile in das Autophagosom	(Ichimura et al. 2008)
TFEB	Transkriptionsfaktor für lysosomale und Autophagie-relevante Gene	(Settembre et al. 2011)

2.4.1 Die zweiseitige Rolle der Autophagie in der Entstehung und Behandlung von Karzinomen

Die genaue Beziehung zwischen der Autophagie und der Entstehung von Karzinomen stellt sich als sehr komplex dar. So scheint die Autophagie eine gegensätzliche Rolle bei der Entstehung von Karzinomen einzunehmen, weshalb bei der Therapie verschiedener Karzinome zum einen Therapieansätze zum Einsatz kommen, welche die Autophagie stimulieren, zum anderen aber auch solche, die die Autophagie inhibieren (Levy et al. 2017).

Die Autophagie spielt hierbei zunächst eine wichtige Rolle in der Tumorsuppression: Es konnte gezeigt werden, dass eine reduzierte oder veränderte Autophagie die Degeneration von beschädigten Proteinen in den betroffenen Zellen einschränkt, was wiederum die Entstehung eines Karzinoms begünstigt. Ein basal vorhandenes Autophagielevel wird als ein wichtiger Faktor bei der Tumorsuppression angesehen (Qu et al. 2003; Yun und Lee 2018).

Zwar stellt Autophagie generell einen Mechanismus dar, welcher das Überleben der Zelle sichern soll, allerdings können erhöhte Autophagielevel unter bestimmten Bedingungen auch dazu führen, dass Zellen abgebaut werden. Somit stellt die Autophagie, wie oben bereits erwähnt, einen alternativen Weg des Zelltodes dar (Denton et al. 2012), was man sich bei der Therapie verschiedener Karzinome zu Nutze machen kann. In diesem Zusammenhang konnte unter anderem für das Osteosarkom und für neuroendokrine Neoplasien des Pankreas demonstriert werden, dass der HDACi Panobinostat dazu in der Lage ist, über die Aktivierung der Autophagie den Zelltod der Tumorzellen zu induzieren (Matrood et al. 2020; Wirries et al. 2018).

Allerdings konnte auch beobachtet werden, dass Autophagie, abhängig von den äußeren Bedingungen, dazu in der Lage ist, das Wachstum von Tumorzellen zu begünstigen und das Überleben dieser Zellen zu sichern. Mit äußeren Bedingungen ist in diesem Zusammenhang zum Beispiel das Vorliegen einer Hypoxie oder ein Nährstoffmangel gemeint, was wiederum extremen Stress für die Zellen bedeutet (Degenhardt et al. 2006; Yun und Lee 2018). Autophagie kann hier von den Tumorzellen genutzt werden, um intrazelluläre Komponenten zu Recyceln und so metabolische Substrate für die Energiegewinnung zur Verfügung zu stellen (Rabinowitz und White 2010). Eine schematische Darstellung der Doppelrolle der Autophagie erfolgt in Abbildung 5.

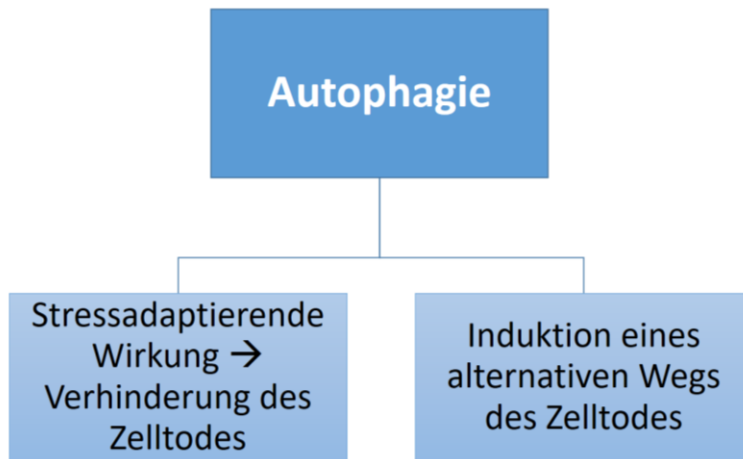


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Doppelrolle der Autophagie. Die Autophagie stellt zum einen einen alternativen Weg des Zelltodes dar, zum anderen kann sie aber auch eine stressadaptierende Wirkung haben, welche den Zelltod verhindert. Quelle: Eigene Abbildung, modifiziert nach (Maiuri et al. 2007).

Die stressadaptierende Wirkung der Autophagie spielt zum Beispiel bei der Resistenz gegen verschiedene Therapeutika eine wichtige Rolle. Autophagie scheint ein wichtiger Mechanismus der Karzinomzellen zu sein, um den durch zytotoxische Mittel induzierten Stress zu relativieren (Levine und Kroemer 2008). Dieser Mechanismus ist in Abbildung 6 dargestellt.

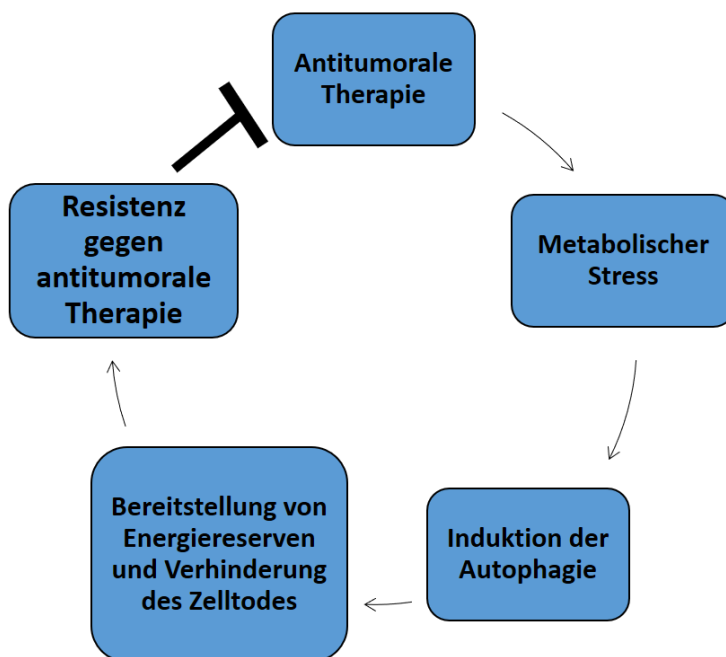


Abbildung 6: Induktion der Autophagie als Resistenzmechanismus gegen antitumorale Therapien: Die Tumorzellen sind durch eine Induktion der Autophagie dazu in der Lage, den metabolischen Stress, der durch die antitumorale Therapien (Chemotherapie, Strahlentherapie, zielgerichtete Therapie) ausgelöst wird, zu tolerieren. Die induzierte Autophagie stellt Energiereserven bereit, welche das Überleben der Tumorzellen sichern, dies resultiert in einer Resistenz gegen die antitumoralen Therapien. Quelle: eigene Abbildung, modifiziert nach (Chen et al. 2010).

Dies wiederum bedeutet, dass auch die Inhibition der Autophagie einen wichtigen Bestandteil in der Therapie von Karzinomen darstellen kann (Levine und Kroemer 2008). Vereinzelt konnte in Zelllinien von Karzinompatienten sogar ein abnorm hohes Level der Autophagie unter guten Versorgungsbedingungen nachgewiesen werden. Diese Beobachtung impliziert, dass ein erhöhter metabolischer Stress der Tumorzellen eine Aktivierung der Autophagie erfordert, um das Überleben der Zellen zu sichern. Aber auch in hypoxischen Tumorregionen konnte zur Sicherung des Zellüberlebens ein erhöhtes Autophagie-Level festgestellt werden (Degenhardt et al. 2006; White et al. 2015).

Ein Beispiel für einen Inhibitor der Autophagie stellt Hydroxychloroquin dar, welches bereits in präklinischen Studien eingesetzt wurde und über eine Hemmung der Autophagie in verschiedenen Tumorzelllinien zu einem verstärkten Effekt von zytotoxischen Chemotherapien führen konnte (Lee et al. 2015; Onorati et al. 2018).

2.5 Ziele dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, zunächst die Zytotoxizität des PD-L1-Inhibitors Atezolizumab, des HDACIs Panobinostat und des TKIs Sorafenib an verschiedenen Zellkulturen des ATCs zu untersuchen. Anschließend soll geprüft werden, inwiefern die Behandlung mit den genannten Substanzen die Gen- und Proteinexpression verschiedener Autophagiemarker modulieren kann und welche Rolle die Autophagie bei der Beeinflussung der Zellviabilität spielt.

Für diese Untersuchungen stehen vier Zelllinien des ATCs zur Verfügung: Zum einen die etablierte Zelllinie C643, zum anderen die Zelllinien dreier humaner Primärkulturen. Als Kontrollzelllinie wurde die etablierte humane Zelllinie Nthy-ori 3-1 Cell Line genutzt, welche normale, primäre Schilddrüsenfollikel-Epithelzellen darstellt.

Um die notwendigen Untersuchungen durchzuführen, kamen vier unterschiedliche in vitro Verfahren zum Einsatz:

- Zytoviabilitätsmessung von Sphäroiden der Zelllinie C643 mittels RealTime-Glo™
- mikroskopische Beobachtung/Dokumentation der 3D-Struktur der Sphäroide
- RT-qPCR zur Untersuchung der Genexpression verschiedener Autophagiemarker
- Western Blot zur Untersuchung der Proteinexpression verschiedener Autophagie-relevanter Proteine und der Expression von PD-L1

Folgenden Fragen soll im Rahmen der vorher aufgeführten Untersuchungen nachgegangen werden:

- Wird durch die Behandlung mit dem PD-L1-Inhibitor Atezolizumab, dem HDACi Panobinostat, dem TKI Sorafenib oder durch eine Kombinationsbehandlung, bestehend aus Atezolizumab und Panobinostat bzw. Atezolizumab und Sorafenib, die Zytovitalität der Zellen des ATCs beeinflusst? Ist hierbei ein synergetischer Effekt zu beobachten?
- Inwiefern wird die 3D Struktur der etablierten Sphäroide durch die oben genannten Behandlungen verändert?
- Kann durch die Behandlung mit Atezolizumab, Panobinostat, Sorafenib oder deren Kombinationen die Genexpression verschiedener Autophagie-relevanter Gene oder die Proteinexpression von Autophagie-relevanten Proteinen beeinflusst werden? Welche Bedeutung hat dies für mögliche Behandlungsansätze des ATCs?

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

Gerät	Name	Firma
Abzug	Secuflow Airflow Controller	WALDNER Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG, Wangen, Deutschland
Autoclav	Autoclav	Systec, Linden, Deutschland
Blottinggerät	Trans-Blot Turbo	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, United States
Brutschrank/CO2-Inkubator	Hera cell	Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland
cDNA-Gerät	PTC-100 Thermal Cycler	MJ Research Inc., St. Bruno (Quebec), Canada
Cycler	C1000™ Thermal Cycler Model No.: CFX96™ Optics Module	Bio-Rad Lbt., Inc., Hercules, CA, United States
Dunkelkammer	Dunkelkammer	Fusion, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland)
Einfrierer Zellen	Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Eismaschine	Eismaschine	Manitowoc Ice, Inc. Manitowoc, WI, United States
Elektrophoresekammer	Mini-Protean Tetra System	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, United States
Gefrier-/Kühlschrank	Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr International AG, Bulle FR, Schweiz
	Ultra-Low Temperature freezer (-80°C)	SANYO Electric Co. Ltd. Moriguchi, Präfektur Ōsaka, Japan
	Kühlschrank (+4°C) Bosch	Robert Bosch GmbH, Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland
	Kühlschrank (+4°C) Liebherr Comfort	Liebherr International AG, Bulle FR, Schweiz

Leistungsbringer Elektrophorese	Power Pac 200	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, United States
Lumineszenz-Messgerät	GloMax-Multi Detection System	Promega, Mannheim, Deutschland
Magnetrührer	Heidolph MR Hei-Standard	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Schwabach, Deutschland
Mikroskop	Leica EC3	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
	TMS	Nikon Metrology NV, Alzenau, Deutschland
Pipetten	verschiedene Volumina; manuell betrieben	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Pipetgirl, Pipetboy; akkubetrieben	INTEGRA Biosciences Deutschland GmbH, Biebertal, Deutschland
Proteinkonzentration Messgerät	Emax precision microplate reader	Molecular Devices, LLC, San José, CA, United States
Rollenmischer	RM5	CAT, M. Zipperer GmbH, Ballrechten-Dottingen, Deutschland
Software	Bio-1D analysis System	VILBER LOURMAT Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland
	Bio-Rad CFX-Manager	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, United States
	Fusion image capture	VILBER LOURMAT Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland
	Microsoft Excel	Microsoft Office, Microsoft Corporation, Redmond, WA, United States
	REST 2009	Qiagen, Hilden, Deutschland
Spektralphotometer	NanoDrop Lite	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland

Sterilbank	HERAsafe Sicherheitswerkbank	HS	Heraeus Instruments, Thermo Fisher Scientific, Hanau, Deutschland
	Bio-II-A		Telstar, Industrial, S.L., Terrassa, Spanien
Vakuum-Sauger	VarioAir		Drägerwerk AG & Co. KGaA, Lübeck, Deutschland
Vortexer	Combi-Spin FVL-2400N		Biosan, Riga, Lettland
Waage	Präzessionswaage PLS		Kern & Sohn GmbH, Frommern, Deutschland
Wasserbad	TW20		Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland
Western Blot Kamera	Fusion		Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Zählkammer	Neubauer Zählkammer		Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Zentrifuge	Centrifuge 5425		Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Centrifuge 5430 R		Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	GS-15R		Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
	Sprout Minizentrifuge		Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Gegenstand	Name	Firma
96-Well Platte, durchsichtig	TC-Platte 96 Well, Standard, F	Sarstedt, AG und Co. KG, Nürnbrecht, Deutschland
96-Well PCR Platte	96 Well PCR Plate, Non- Skirted, Low-Profile	STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutschland

Deckgläser	Deckgläser 24 x 50 mm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Falcon 15 ml; 50 ml	Röhre 15 ml; 50 ml	Sarstedt, AG und Co. KG, Nürnbrecht, Deutschland
Gasdurchlässige Folie	Breathe-Easy Gas Permeable Sealing Membrane for Microtiter Plates	Diversfield Biotech, Sigma- ALDRICH, Co., St. Louis, MO, United States
Glaspipette	Pasteur Pipetten	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Handschuhe	Sempercare nitrile skin ²	Semperit Investments Asia Pte Ltd, Singapore
Klebefolie PCR-Platten	StarSeal Advanced Polyolefin Film, 100	STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	SafeSeal SurPhob Spitzen, steril, Filterspitzen, Low Binding, graduiert (10µl; 1250µl)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
	Biosphere Filter Tips (0.1-2,5 µl; 2-100 µl)	Sarstedt, AG und Co. KG, Nürnbrecht, Deutschland
Serologische Pipette 2-50 ml	Serological Pipette	Sarstedt, AG und Co. KG, Nürnbrecht, Deutschland
Tube 0,2 ml; 0,5 ml	Multiply-Pro Gefäß 0,2 ml, PP; Multiply-Pro Gefäß 0,5ml, PP	Sarstedt, AG und Co. KG, Nürnbrecht, Deutschland
Tube 1,5 ml; 2,0 ml	Reagiergefäß 1,5 ml SafeSeal; Reagiergefäß 2,0 ml SafeSeal	Sarstedt, AG und Co. KG, Nürnbrecht, Deutschland
Zellkulturflasche (25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²)	25 cm ² TC Flasche T25	Sarstedt, AG und Co. KG, Nürnbrecht, Deutschland
	75 cm ² TC Flasche T75	
	175 cm ² TC Flasche T175	

3.1.3 Primer und Antikörper

Primer	Name	Firma und Katalognummer
BCEN1	Hs_BEEN1_1_SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen, Hilden, Deutschland, Cat.No. QT00004221
GAPDH	Hs_GAPDH_2_SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen, Hilden, Deutschland, Cat. No. QT01192646
MAP1LC3B	Hs MAP1LC3B_1_SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen, Hilden, Deutschland, Cat. No. QT00055069
PRKAA1_1	Hs PRKAA1_1 _SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen, Hilden, Deutschland, Cat. No. QT00009436
PRKAA2_1	Hs_PRKAA 2_1_SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen, Hilden, Deutschland, Cat.No. QT00042077
SQSTM1	Hs SQSTM1_1_SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen, Hilden, Deutschland, Cat.No. QT00095676
UVRAG	Hs_UVRAG_1_SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen, Hilden, Deutschland, Cat.No. QT00034328
TFEB	Hs_TFEB_1_SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen, Hilden, Deutschland; Cat. No. QT00069951

Antikörper	Produktname / Bestellnummer	Spezies	Verdünnung	Firma
anti- AMPKalpha	AMPKalpha Rabbit mAb / 2532S	rabbit	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc. Danvers, MA, United States
anti-β-Actin	Monoclonal Anti- β- Actin, antibody produced in mouse / A2228	Mouse	1:3000	Sigma-ALDRICH, Co., St. Louis, MO, United States
anti-Beclin	Ms mAb to Beclin / ab 114071	Mouse	1:2000	Abcam, Cambridge Großbritannien
anti-GAPDH	Rb pAB to GAPDH / ab181602	Rabbit	1:2000	Abcam, Cambridge Großbritannien

anti-LC3B	Rb pAB to LC3B / ab51520	Rabbit	1:2000	Abcam, Cambridge Großbritannien
anti-P- AMPKalpha	P-AMPKalpha (T172) (40H9) Rabbit mAb / 2535S	Rabbit	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc. Danvers, MA, United States
Anti-PD-L1	Rb mAb to PD-L1 / ab205921	Rabbit	1:100	Abcam, Cambridge Großbritannien
anti- SQSTM1 / -p62	Rb pAb to SQSTM1 / p62 / ab155686	Rabbit	1:500	Abcam, Cambridge Großbritannien
anti-UVRAG	Anti-UVRAG antibody produced in rabbit / U7508	Rabbit	1:500	Sigma-ALDRICH, Co., St. Louis, MO, United States
Polyclonal Goat Anti-Mouse	Polyclonal Goat Anti- Mouse Immunoglobulins / P0447	Goat	1:5000	Deko Denmark A/S, Glostrup, Denmark
Polyclonal Goat Anti-Rabbit	Polyclonal Goat Anti- Rabbit Immunoglobulins / P0448	Goat	1:5000	Deko Denmark A/S, Glostrup, Denmark

3.1.4 Kits

Name	Verwendung	Inhalt	Firma / Artikelnummer
GoTaq® qPCR Master Mix	PCR	- 25 × 1 ml GoTaq® qPCR Master Mix, 2X - 5 × 100 µl CXR Reference Dye - 10 × 13 ml Nuclease-Free Water	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland / A6002

iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR	Umschreiben RNA in cDNA	- 4 x 5 x iScript™ Supermix - 2 x 5 x iScript RT Supermix No-RT Control	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, United States
NucleoSpin® RNA Plus	Isolierung RNA aus Zellen und Gewebe	- 1 x 125 ml Lysis Buffer LBP - 1 x 30 ml Binding Solution BS - 1 x 60 ml Wash Buffer WB1 - 1 x 50 ml Wash Buffer WB2 (concentrate) - 1 x 60 ml RNase-free H2O - 250 x NucleoSpin® gDNA Removal Columns (yellow ring) - 250 x NucleoSpin® RNA Plus Columns (light blue ring – plus collection Tubes) - 500 x Collection Tubes (2 mL) - 250 x Collection Tubes (1,5 ml)	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland / 740984.250
Pierce® BCA Protein Assay Kit	BCA-Proteinbestimmung	- 2 x 500 ml Pierce® BCA Protein Reagent A - 1 x 25 ml Pierce® BCA Protein Reagent B	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, United States / 23225

		- 10 x 1 ml Albumin Standard Ampulle	
RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay	Echtzeit-Messung Zellwachstum	- 10 µl MT Cell Viability Substrate, 1,000X - 10 µl NanoLuc® Enzyme, 1,000X	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland / G9711
SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Detektion Proteine Western Blot	- 1 x 500 ml SuperSignal® West Pico Stable Peroxide Solution - 1 x 500 ml SuperSignal® West Pico Luminol Enhancer Solution	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, United States / 34078

3.1.5 Chemikalien und Reagenzien

Typ/Name	Hersteller / Artikelnummer
1,5% Agarose	Eigene Herstellung - 1,5 g Biozym LE Agarose - 100 ml Mili-Q-Wasser
2-Mercaptoethanol	Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, United States / M-3148
4 x Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, United States / 1610747
Albumin Fraktion V, biotinfrei	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland / 0163.4
Atezolizumab	Selleck Chemicals Llc, Houston, TX, United States / A2004
Bafilomycin	InvivoGen, Toulouse, France / tlr-baf1
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland / 840004
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland / 04693124001

Cryo-Sure DMSO	WAK-Chemie Medical GmbH, Steinbach, Deutschland / USP8B1S
DPBS (1 x) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, United States / 14190-094
Ethanol 70 % (V/V)	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland / 27669
FBS, Qualified Fetal Bovine Serum	gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, United States / 10270-106
L-Glutamin 200 mM	gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, United States / 25030024
MagicMark™ XP Western Standard	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, United States / LC 5602
Panobinostat	Novartis, Basel, Schweiz
Pen Strep Penicillin Streptomycin (10,000 Units/ml Penicillin, 10,000 µg/ml Streptomycin)	gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, United States / 15140-122
PhosphoSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland / 04906845001
ProSieve®Quad Color™ Proteine Marker 4.6-300 kDa	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland / 00193837
RedAlert™ 10X Western Blot Stain	Novagen®, Merck, Darmstadt, Deutschland / 71078
Sodium chloride puriss. p.a., ACS reagent, reag. ISO, reag. Ph. Eur.	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland / 4313
Sorafenib, p-Toluenesulfonate Salt	LC Laboratories, Woburn, MA, United States / S-8502
TRIS PUFFERAN® >/=99,9%, p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland / 9090.3
TRIS-hydrochlorid PUFFERAN® >/=99%, p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland / 9090.3
0,5% Trypsin-EDTA (10X)	gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, United States / 15400-054
Tween® 20	Chemsolute®, Th.Geyer, Renningen, Deutschland

3.1.6 Pufferlösungen

Typ/Name	Hersteller / Artikelnummer
1 x TBS	Eigene Herstellung - 100 ml 10 x TBS - 900 ml Mili-Q-Wasser - pH 7,4
1 x TBS + Tween	Eigene Herstellung - 100 ml 10 x TBS - 900 ml Mili-Q-Wasser - 1 ml Tween® 20 - pH 7,4
10 x TBS	Eigene Herstellung - 12 g Tris - 87,6 g NaCl - 1000 ml Mili-Q-Wasser - pH 8,0
10 x Tris/Glycine/SDS Buffer	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, United States / 1610772
1% BSA in TBST	Eigene Herstellung - 30 ml TBST - 10 ml 4% BSA in TBST
4% BSA in TBST	Eigene Herstellung - 2 g Albumin Fraktion V, biotinfrei - 50 ml TBST
Jie's-Puffer	Eigene Herstellung - 1000 µl NaCl - 250 µl NP40 - 200 µl Tris-HCl pH 7,4 (eigene Herstellung) - 50 µl MgCl ₂ (eigene Herstellung) - 1 Tablette complete Mini - 1 Tablette PhosSTOP - 3.500 µL dH ₂ O
Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, United States /

	46430
--	-------

3.1.7 Gele

Name	Verwendung	Hersteller / Artikelnummer
Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Gels	Western Blot Elektrophorese	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, United States
Trans-Blot Turbo Transfer Pack	Western Blot Blotting	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, United States

3.1.8 Zellkulturmedium

Name	Hersteller / Artikelnummer
Einfriermedium	Eigene Herstellung - 45% RPMI Medium 1640 (1 x) (vorherige Zugabe 50 ml FBS und 10 ml PenStrep) - 45% FBS - 10% DMSO
RPMI Medium 1640 (1 x)	gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, United States / 21875-034

3.1.9 Zelllinien und Gewebeproben

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt fünf Zelllinien verwendet, wobei vier dieser Zelllinien von ATCs stammten. Eine dieser Zelllinien war die etablierte Zelllinie C643, welche häufig in der Forschung des ATCs verwendet wird. Die Zelllinie C643 wurde freundlicherweise von Prof. A. Zielke (Diakonie-Klinikum Stuttgart, Stuttgart, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

Die anderen drei ATC-Zelllinien stellen Primärkulturen dar. Diese wurden, nach positivem Ethikvotum seitens des UKGM (Universitätsklinikum Gießen und Marburg; AZ: 92/15; 123/19) und nach unterschriebener Einverständniserklärung seitens der Patienten, im Rahmen von Schilddrüsenresektionen am UKGM (Standort Marburg) im eigenen Forschungslabor der VTG-Chirurgie aus Gewebeproben etabliert. Gleichzeitig wurden Teile der Gewebeproben bei -80°C eingefroren, um aus diesen später RNA zu isolieren, diese in DNA umzuschreiben und via RT-qPCR auf die Expression bestimmter Gene zu untersuchen. Im Folgenden werden die drei Primärkulturen mit Patient 1, Patient 2 und Patient 3 betitelt, um die Anonymität der betroffenen Patienten zu gewährleisten. Anhand des zugehörigen Datenblattes der Zelllinie

C643 und durch eine automatisierte PCR-Testung, durchgeführt durch die Pathologie des UKGM, konnte der *BRAFV600E* Mutationsstatus der einzelnen Zelllinien festgestellt werden. Eine *BRAFV600E* Mutation lag bei der Primärkultur Patient 1 vor. Ebenso wurde an den vorliegenden Tumorgewebe eine immunhistochemische Färbung von PD-L1 durchgeführt und unter anderem der CPS (engl. combined positivity score) für PD-L1 ermittelt, welcher neben membranären Färbungen in Tumorzellen auch PD-L1-Färbungen in bestimmten Immunzellen berücksichtigt (Schildhaus 2018). Eine Übersicht über die in dieser Arbeit genutzten ATC-Zelllinien bzw. Primärkulturen liefert Tabelle 2.

Als fünfte und letzte Zelllinien wurden humane Thyreozyten (Ursprungsgewebe: Humane Schilddrüsenfollikel-Epithelzellen) genutzt, welche in dieser Arbeit als Kontrollzelllinie dienen. Hierzu wurde die Zelllinie Nthy-ori 3-1 Cell Line human online über die Firma Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) erworben.

Alle Zelllinien wurden vor ihrer Kultivierung in Einfriermedium bei -80°C eingefroren, wobei durch Nutzung des Cryo 1°C Freezing Container ein langsames Einfrieren möglich war (die Temperatur nahm hierbei pro Stunde 1°C ab).

Tabelle 2: Darstellung der Eigenschaften der ATC-Zelllinie C643 und der untersuchten Primärkulturen

Name der Zelllinie / Primärkultur	C643	Patient 1	Patient 2	Patient 3
Herkunft	Etablierung aus einer Feinnadelpunktion eines Patienten mit ATC	Etablierung aus dem Primärtumor eines 82-jährigen Patienten mit einem papillären SD-CA mit anaplastischem Anteil	Etablierung aus dem Primärtumor eines 81-jährigen Patienten mit einem ATC	Etablierung aus dem Primärtumor eines 69-jährigen Patienten mit einem ATC
<i>BRAFV600E</i>-Mutationsstatus	negativ	Positiv	negativ	negativ
PD-L1 CPS		35	60	50
Literatur	(Mark et al. 1987; Morrison et al. 2015)			

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Die für diese Arbeit genutzten Zellkulturen wurden vor ihrer Kultivierung bei -80°C in Einfriermedium (Zusammensetzung siehe 3.1.8) aufbewahrt. Nach dem Auftauen wurden sie in 75 cm^2 TC Flaschen (Sarstedt, AG und Co. KG, Nürnberg, Deutschland) überführt. Die Kultivierung aller Zellen erfolgte unter Standardbedingungen (Inkubator bei 37°C , $5\% \text{ CO}_2$) in RPMI 1640 (1 x) Medium (gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, United States), welches vorher, bei einem Volumen von 500 ml, mit 5 ml Penicillin-Streptomycin (10,000 Units/ml Penicillin; 10,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin; gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, United States) und 50 ml FBS (gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, United States) versetzt worden war. Bei dem Medium, welches für die Thyreozyten verwendet wurde, erfolgte eine zusätzliche Zugabe von 5 ml L-Glutamin.

Um bei den durchgeführten Experimenten Ergebnisse mit einer möglichst hohen Validität und Reliabilität zu erreichen, wurde darauf geachtet, die Kultivierung und spätere Behandlung der einzelnen Zelllinien unter nahezu sterilen Bedingungen durchzuführen. Hierzu wurden bei allen Versuchen keimarme Einmalhandschuhe verwendet, außerdem wurde die Sterilbank (HERAsafe HS Sicherheitswerkbank; Heraeus Instruments, Thermo Fisher Scientific, Hanau, Deutschland) ca. 20 Minuten vor Beginn der Experimente angeschaltet und die Arbeitsfläche mit 70% Ethanol gereinigt. Die benötigten Chemikalien (einschließlich des Zellmediums) wurden in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt und anschließend ebenfalls mit 70% Ethanol abgesprüht und äußerlich gereinigt, bevor sie unter der Sterilbank benutzt wurden. Durch die Arbeit unter der Sterilbank konnte die Gefahr einer möglichen Kontamination geringgehalten werden. Außerdem wurden alle Zellen vor Durchführung der Experimente makroskopisch und mikroskopisch beurteilt. Hinweise auf eine Kontamination konnten beispielsweise eine Trübung des Mediums oder der mikroskopische Nachweis von Mikroorganismen sein. Zellen mit Verdacht auf eine Kontaminierung wurden umgehend verworfen.

Die Farbe des Mediums konnte außerdem ein Hinweis auf eine starke Zellproliferation und einen damit verbundenen hohen Verbrauch an Medium sein. Um ein adäquates Wachstum zu ermöglichen, wurde bei den Zellen alle 2-3 Tage das Medium gewechselt und bei einer zu hohen Zellzahl erfolgte ein Passagieren der Zellen in neue Zellkulturflaschen.

3.2.1.1 Passagieren

Die Zellzahl wurde regelmäßig mikroskopisch beurteilt, um eine Überfüllung der Zellflaschen zu vermeiden. Hierbei konnte beobachtet werden, dass die genutzten Zelllinien sich in ihrer Wachstumsgeschwindigkeit unterschieden, sodass das Passagieren der Zellen in

unterschiedlicher Regelmäßigkeit und im unterschiedlichen Verhältnis erfolgen musste (vgl. Tabelle 3).

Die Zellen wurden zum Passagieren als erstes mit DPBS (1 x) (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline; gibco, Thermo Fisher Scientific Inc.), gewaschen und anschließend, nach Zugabe von 0,5% Trypsin/EDTA (gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, United States), für 5-10 Minuten im Brutschrank unter Standardbedingungen inkubiert. Hiernach wurde mikroskopisch kontrolliert, ob die Zellen sich von der Wand der Zellkulturflasche abgelöst haben. War dies der Fall, erfolgte die Zugabe von RPMI 1640 (1 x) Medium, um die Trypsin/EDTA Reaktion zu unterbrechen. Die nun entstandene Zellsuspension wurde, je nach Zelllinie, in einem bestimmten Verhältnis aufgeteilt und in neue Zellkulturflaschen gegeben, welche bereits neues RPMI 1640 (1 x) Medium enthielten. Auf jeder Flasche wurde die Passage der entsprechenden Zelllinie notiert. Beim Überschreiten der 30. Passage wurde die entsprechende Zelllinien verworfen und es wurden neue Zellen aufgetaut.

Tabelle 3: Gegenüberstellung der Häufigkeiten und der Verhältnisse beim Passagieren der genutzten Zelllinien

Zelllinie	Häufigkeit des Passagieren	Verhältnis beim Passagieren
C643	1-2 x pro Woche	1:4 - 1:8
Nthy-ori 3-1	1-2 x pro Woche	1:3 - 1:6
Patient 1	1 x pro Woche	1:3 - 1:4
Patient 2	1-2 x pro Woche	1:4 - 1:6
Patient 3	1-2 x pro Woche	1:4 - 1:6

3.2.1.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurden volle Zellflaschen mit einer niedrigen Anzahl von Passagen genutzt. Die Zellen wurden hierbei zunächst (analog zu dem Verfahren des Passagieren, vgl. 3.2.1.1) mit Trypsin/EDTA abgelöst und anschließend mit Hilfe einer Neubauer Zellkammer gezählt. Pro 1 Millionen Zellen wurde ca. 1 ml Einfriermedium (s. 3.1.8) benötigt. Die Funktion des DMSO war hierbei, die Bildung von Eiskristallen zu verhindern, welche die Zellen zerstören würden.

Nach ihrer Ablösung wurden die Zellen für 5 Minuten bei einer Geschwindigkeit von 1.000 rpm und einer Temperatur von 5°C zentrifugiert, anschließend wurde das überständige Medium abgesaugt und der Zellpellet mit der benötigten Menge an Einfriermedium resuspendiert. Je 1,8 ml der entstandenen Suspension wurde in ein 1,8 ml CryoPure Tube gegeben, diese wurden anschließend mit Hilfe des Cryo 1°C Freezing Container (Nalgene, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) bei -80°C eingefroren.

Beim Auftauen der Zellen wurden die CyroPure Tubes für 1-2 Minuten im Wasserbad bei 37°C erwärmt und anschließend durch das Besprühen mit 70 % Ethanol desinfiziert. Die Zellen wurden dann unter der Sterilbank in eine, mit entsprechendem Zellmedium vorbereitete, 75 cm² TC Flasche gegeben.

3.2.1.3 Zählen der Zellen

Für viele der folgend dargestellten Experimente war es notwendig, die genaue Zellzahl der einzelnen Zellkulturen zu bestimmen. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit Hilfe von Trypsin/EDTA abgelöst (vgl. 3.2.1.1) und anschließend mit Hilfe des entsprechenden Mediums in einen 15 ml Falcon resuspendiert. Um die Zellzahl der so entstandenen Zellsuspension zu bestimmen, wurde eine Neubauer-Zählkammer (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland) genutzt. Dabei wurden die Zellen eines definierten Anteils der Zellsuspension bestimmt und diese Zahl anschließend auf das Gesamtvolumen hochgerechnet.

Hierzu wurden der Zellsuspension 10 µl entnommen und in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert, bis die Flüssigkeit gleichmäßig über dem sichtbaren Gitterkreuz verteilt war. Die vier Quadranten der Zählkammer wurden unter dem Mikroskop ausgezählt und anschließend wurde aus diesen vier Werten der arithmetische Mittelwert errechnet. Durch die Größe der Zählkammer muss man das Ergebnis mit dem konstanten Faktor 10⁴ multiplizieren, um so die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension zu bestimmen.

3.2.1.4 Etablierung von Sphäroiden der Zelllinie C643

Sphäroide stellen dreidimensionale Kulturen aus mehreren tausend Zellen dar und sind, ebenso wie Monolayer, für die in vitro Untersuchungen von Tumorzellen geeignet. Vorteil der 3D Struktur ist, dass sie dem in vivo Modell näherkommt als die zweidimensionale Struktur der Monolayer. In dieser Arbeit wurde die Zelllinie C643 für die Etablierung von Sphäroiden genutzt.

Im ersten Schritt musste hierfür 1,5% Agarose hergestellt werden. Hierzu wurden 2,25 g Biozym LE Agarose (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland) in einer 150 ml Flasche mit 150 ml Mili-Q-Wasser aufgelöst und anschließend im Autoclav für 20 min bei 121° aufgekocht. Anschließend wurde die jetzt flüssige Agarose mit Hilfe einer Pipette in eine durchsichtige 96-Well Platte (Sarstedt, AG und Co. KG, Nürnberg, Deutschland) pipettiert, hierbei wurden pro Well 50 µl genutzt. Die Aufbewahrung der 1,5 % Agarose erfolgte hiernach bei 4°C. Bei jeder Benutzung war es wichtig, die Agarose vollständig zu erwärmen, da sie nur dann flüssig ist und zur Vorbereitung einer 96-Well Platte für die Etablierung von Sphäroiden genutzt werden kann. Die Agarose diente hierbei dem Zweck, ein Adhärenzen der Zellen zu ermöglichen, welche sonst in den Wells nicht möglich gewesen wäre.

Nach Vorbereitung der 96-Well Platte wurde zunächst eine Zellsuspension der Zelllinie C643 hergestellt (vgl. 3.2.1.1) und mit Hilfe der Neubauer Zählkammer die Zellzahl pro ml bestimmt (vgl. 3.2.1.3). Pro Well benötigte man 150 µl Zellsuspension mit 10.000 Zellen. Diese Anzahl wurde vorher in einer Versuchsreihe bestimmt, in welcher man die Etablierung von Sphäroiden mit 1.000 - 20.000 Zellen pro Well testete. Bei einer Zellzahl von 10.000 Zellen konnte mikroskopisch die beste Aggregation der Zellen und die Ausbildung einer vollständigen Membran festgestellt werden.

Über das Zählen der Zellen und eine anschließende Verdünnung der Zellsuspension wurde eine Zellzahl von 10.000 Zellen pro 150 µl gewährleistet. Das genannte Volumen wurden anschließend in jedes Well der 96-Well Platte pipettiert. Die Platte wurde über Nacht im Inkubator unter Standardbedingungen (37°C, 5 % CO₂) inkubiert, dies erfolgte auf einem Orbitalschüttler mit einer Geschwindigkeit von ca. 100 Schüttelbewegungen pro Minute. Am nächsten Tag wurde mikroskopisch überprüft, ob die Zellen ein Aggregat gebildet hatten, um welches sich meist im Verlauf weiterer 24h eine Membran ausbildete.

Auch für die anderen Zelllinien wurde, nach oben beschriebener Methode, eine Etablierung von Sphäroiden versucht, diese war leider nur für die etablierte Zelllinie Nthy-ori 3-1 erfolgreich. Bei dem Versuch, aus den Primärkulturen Sphäroide zu gewinnen, war zwar eine Aggregation der Zellen festzustellen, allerdings bildete sich keine vollständige Membran aus, welche wiederum einen wichtigen Bestandteil eines Sphäroids darstellt. Dies ist vermutlich auf die Besonderheiten von Primärkulturen gegenüber etablierten Zelllinien zurück zu führen. Bei den genutzten Primärkulturen lagen höhere Passagen vor, außerdem wurden diese bereits häufiger aufgetaut und wieder eingefroren. Letztendlich musste folglich ein Großteil der Versuche mit Monolayern der Zelllinien durchgeführt werden.

3.2.2 Prinzip der Zellviabilitätsmessung mittels RealTime-Glo™

Das RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay ist eine Methode zur Bestimmung der Zellviabilität, welche sich das Prinzip der Lumineszenz zu Nutze macht. Um die Lebensfähigkeit der Zellen darzustellen, nutzt das Verfahren das Potenzial der Zellen, ein zugegebenes Substrat zu reduzieren.

Hierzu ist in dem Kit zum einen die NanoLuc® luciferase enthalten und zum anderen das MT Cell Viability Substrate, welches zunächst als Prosubstrat vorliegt. Das Prosubstrat und das Enzym werden im Verhältnis 1:1 zu den zu untersuchenden und mit verschiedenen Substanzen behandelten Zellen hinzu gegeben, welche sich in diesem Versuchsaufbau in einer durchsichtigen 96-Well Platte befanden (siehe 3.2.2.1).

Lebensfähige Zellen sind dazu in der Lage, das Prosubstrat zu reduzieren und so ein Substrat für die NanoLuc® Luciferase zu generieren. Dieses Substrat gelangt aus den Zellen in das umgebende Zellmedium, wo durch eine Reaktion mit der NanoLuc® Luciferase ein Lumineszenzsignal generiert wird, welches über ein entsprechendes Gerät (hier über das GloMax-Multi Detection System; Promega, Mannheim, Deutschland) gemessen werden kann. Tote Zellen sind hingegen nicht dazu in der Lage, das Prosubstrat zu reduzieren, sodass kein Substrat für die NanoLuc® Luciferase zur Verfügung steht. Entsprechend kann keine Reaktion zwischen Enzym und Substrat stattfinden und kein Lumineszenzsignal gemessen werden. Die Stärke des Signals korreliert also mit der Anzahl lebensfähiger und proliferierender Zellen.

3.2.2.1 Durchführung der Zellviabilitätsmessung mittels RealTime-Glo™

Die Zellproliferationsmessung mittels RealTime-Glo™ wurde an Sphäroiden der etablierten Zelllinie C643 durchgeführt.

Die Sphäroide wurden für diesen Versuch an Tag 1 etabliert, über Nacht auf dem Orbitalschüttler inkubiert und an Tag 2 anhand des gebildeten Aggregats und der teilweise schon ausgebildeten Membran mikroskopisch beurteilt. Im Falle einer erfolgreichen Etablierung war etwa ab Tag 5 eine vollständige Membran ausgebildet. War dies der Fall, wurde die Zellviabilitätsmessung durchgeführt.

In einer ersten Versuchsreihe wurde die singuläre Behandlung der Sphäroide untersucht. Hierzu erfolgte in einem ersten Schritt die Zugabe von 50 µL Medium, welches mit verschiedenen Konzentrationen der eingesetzten Substrate versetzt war. Die Behandlung der Zellen erfolgte mit dem PD-L1- Inhibitor Atezolizumab, dem HDACi Panobinostat und dem TKI Sorafenib. Die genauen Konzentrationen der einzelnen Behandlungen sind Tabelle 4 zu entnehmen. Hierbei beruhen die genutzten Konzentrationen von Panobinostat und Sorafenib auf vorherigen Ergebnissen der Arbeitsgruppe Schilddrüse der Visceral- Thorax- und Gefäßchirurgie Marburg (Wächter et al. 2018b). Um die mittlere effektive Konzentration von Atezolizumab zu ermitteln, wurde ein Dosierungstest durchgeführt, hierzu wurden die Zellen mit sich steigenden Konzentrationen von Atezolizumab behandelt. Anschließend erfolgte in einer zweiten Versuchsreihe eine kombinierte Behandlung der Sphäroide mit Atezolizumab + Panobinostat und Atezolizumab + Sorafenib. Erneut wurde die Beeinflussung der Zellviabilität beurteilt, gleichzeitig wurde aber auch überprüft, ob über eine Kombination ein synergetischer Effekt der Substanzen festgestellt werden kann. Der Effekt der einzelnen Substanzen bzw. ihrer Kombinationen wurde jeweils in Dreifachbestimmung untersucht und mit einer unbehandelten Kontrollprobe verglichen.

Tabelle 4: Darstellung der genutzten Konzentrationen zur Behandlung der Sphäroide zur Messung der Zellviabilität mittels RealTime-Glo™

	Atezolizumab	Panobinostat	Sorafenib
Versuchsreihe 1 (singuläre Behandlung)	- 100 ng/ml - 200 ng/ml - 500 ng/ml - 1 µg/ml	- 1 nM - 10 nM - 100 nM - 1 µM	- 1 µM - 10 µM - 100 µM
Versuchsreihe 2 (Kombinationsbehandlung)	- 500 ng/ml	- 1 nM - 10 nM	- 1 µM

Nach initialer Behandlung mit den entsprechenden Substanzen/Kombinationen, wurde nach einer Inkubationszeit von ca. 2 Stunden das Enzym NanoLuc® Luciferase und das MT Cell Viability Substrate hinzugefügt. Beide Komponenten waren vorher in RPMI 1640 (1 x) Medium gelöst worden. Insgesamt erfolgte pro Well eine Zugabe von 10 µl. Die 96-Well Platte wurde hiernach mit einer gasdurchlässigen Folie (Breathe-Easy Gas Permeable Sealing Membrane for Microtiter Plates; Diversfield Biotech, Sigma-ALDRICH, Co., St. Louis, MO, United States) abgedichtet. Anschließend wurden mit Hilfe des Leica EC3 Mikroskops (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) und einem angeschlossenen Computer Bilder der behandelten Zellen gemacht.

Die erste eigentliche Messung des Lumineszenzsignals via GloMax-Multi Detection System erfolgte ca. 3 Stunden nach der Behandlung, um zu gewährleisten, dass die lebenden Zellen die Möglichkeit hatten, das Prosubstat zu reduzieren, um so mit Hilfe des zugegebenen Enzyms ein Lumineszenzsignal zu erzeugen.

Im Anschluss an diese erste Messung erfolgten alle weiteren manuellen Messungen in festen Zeitabständen, um so die gleichmäßige Darstellung der Zellviabilität zu ermöglichen. Folglich fand eine Messung zu folgenden Zeitpunkten nach Behandlung statt: 3h, 8h, 16h, 24h, 32h, 48h, 56h, 72h, 89h, 96h.

Parallel hierzu erfolgte täglich um die gleiche Zeit die Aufnahme eines mikroskopischen Bildes der Sphäroide, um beurteilen zu können, inwiefern die eingesetzten Behandlungen die 3D Struktur der Sphäroide beeinflussen.

Anschließend galt es herauszufinden, ob sich die eingesetzten Substanzen durch eine Kombination in ihrer Wirkung gegenseitig beeinflussen und somit eine synergetische Wirkung aufzeigen. Hierzu wurde der sogenannte Combination Index berechnet: Zu allen untersuchten Zeitpunkten wurde die Stärke des Lumineszenzsignals der kombinierten Behandlung durch das

Produkt der Lumineszenzsignale der singulären Behandlungen dividiert. Die Formel lautet also CI (Combination Index) = $D3 / D1 \cdot D2$. ($D3$ = Stärke Lumineszenzsignal Kombinationsbehandlung, $D1$ bzw. $D2$ = Stärke Lumineszenzsignal singuläre Behandlung). Ein Wert < 1 spricht hierbei für einen synergetischen Effekt (Chou und Talalay 1984).

3.2.3 Isolierung von totaler RNA aus Zellen

Zur Isolierung von totaler RNA wurde das NucleoSpin® RNA Plus Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) benutzt. Dieses wurde bis zur Benutzung bei Raumtemperatur aufbewahrt. Von jeder der verwendeten Zelllinien wurden 2 unbehandelten Kontrollen gesammelt, außerdem je zwei unabhängige Proben, die folgendermaßen behandelt wurden:

- 2x Atezolizumab 500 ng/ml
- 2x Panobinostat 10 nM
- 2x Sorafenib 1 μ M
- 2x Atezolizumab 500 ng/ml + Panobinostat 10 nM
- 2x Atezolizumab 500 ng/ml + Sorafenib 1 μ M

Die benötigten Konzentrationen der Substanzen wurden vorher durch den Real Time Glo™ ermittelt. Im Folgenden wird das Prinzip der Isolierung von RNA aus den vorhandenen Zellen detailliert erläutert.

3.2.3.1 Aussäen der Zellen

Zur Vorbereitung der RNA Isolierung wurden von allen Zelllinien je 12 mittlere Zellkulturflaschen (75 cm²) vorbereitet, alle enthielten 10 ml Medium mit je 2×10^6 Zellen. Bei allen Zelllinien wurde das gleiche Verfahren angewandt und auch die Konzentrationen der zur Behandlung genutzten Substanzen war für alle Zelllinien gleich, sodass hier eine exemplarische Darstellung einer Zelllinie erfolgt.

Nach dem Aussäen der Zellen wurden die Zellkulturflaschen für 24 h inkubiert. Danach erfolgte bei zwei Zellkulturflaschen ein reiner Mediumwechsel, diese Zellen dienten als unbehandelte Kontrolle. Die Zellen der anderen Zellkulturflaschen wurden mit den oben aufgeführten Konzentrationen behandelt, hierzu wurden je 10 ml Medium mit den entsprechenden Konzentrationen der einzelnen Substanzen versetzt. Die Zellkulturflaschen wurden hiernach unter Standardbedingungen für weitere 48h inkubiert.

3.2.3.2 Ablösen und Ernten der Zellen

Nach einer Inkubationszeit von 48h erfolgte das Ablösen der Zellen wie folgt: Zunächst wurde mit Hilfe einer Pipette das Medium aus der jeweiligen Zellkulturflasche in ein 15 ml Falcon überführt. Anschließend erfolgte ein Waschen der Zellen mit 1 ml DPBS, welches hiernach

ebenfalls in das 15 ml Falcon überführt wurde. Um die restlichen Zellen vom Boden der Zellkulturflasche abzulösen, erfolgte die Zugabe von 1 ml Trypsin/EDTA und eine anschließende Inkubation von ca. 5 Minuten. Daraufhin erfolgte die Unterbrechung der Trypsin/EDTA-Reaktion mit Hilfe von 5 ml Medium, welches aus dem vorher genutzten 15 ml Falcon stammte. Die so entstandene Zellsuspension wurde jetzt wieder in den 15 ml Falcon überführt.

Die 15 ml Falcons wurden anschließend bei einer Temperatur von 4°C und einer Geschwindigkeit von 1000 rpm zentrifugiert. Danach wurde das überstehende Medium abgesaugt und verworfen. Der durch das Zentrifugieren entstandene Zellpellet wurde mit 1 ml DPBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Tube überführt. Diese Tubes wurden nun ein zweites Mal bei einer Temperatur von 4°C und einer Geschwindigkeit von 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend erneut abgesaugt und verworfen. Das nun fertige Zellpellet wurde bis zu der Isolierung von RNA bei -20°C aufbewahrt.

3.2.3.3 RNA Isolierung aus vorher gesammelten Zellpellets

Zur Isolierung der totalen RNA wurde das das NucleoSpin® RNA Plus Kit benutzt und das beiliegende Protokoll befolgt.

Zur Vorbereitung wurden die NucleoSpin® gDNA Removal Columns (yellow ring) in den beiliegenden 2 ml Sammelröhrchen platziert. Die vorher gesammelten Zellpellets wurden zunächst in 350 µl Lyse Puffer, welcher evtl. vorhandene RNasen direkt inaktiviert, durch wiederholtes auf- und abpipettieren gelöst. Anschließend wurde dieses Lysat auf die oben vorbereitete Säule pipettiert. Die Sammelröhrchen wurden bei einer Geschwindigkeit von 11.000 rpm für 30 Sekunden zentrifugiert um das Lysat zu reinigen und die kontaminierende gDNA zu entfernen. Die Säulen wurden hiernach verworfen und es erfolgte die Zugabe von 100 µl Binding Solution, welche durch wiederholtes auf- und abpipettieren mit der vorhandenen Lösung vermischt wurde. Das gesamte Lysat wurde anschließend auf eine NucleoSpin® RNA Plus Column (light blue ring) aufgetragen, welche sich in einem 2ml Sammelröhrchen befand, und bei einer Geschwindigkeit von 11.000 rpm für 15 sec zentrifugiert. Die jetzt im Röhrchen vorhandene Flüssigkeit wurde verworfen.

Nun erfolgte die erste Waschung mit dem ersten Waschpuffer. Hierzu wurden 200 µl Waschpuffer auf die Säule aufgetragen und es erfolgte ein erneutes Zentrifugieren bei 11.000 rpm für 15 sec. Die 250 x NucleoSpin® RNA Plus Column wurde anschließend in einem neuen 2 ml Sammelröhrchen platziert und es erfolgten zwei Waschung mit einem zweiten Waschpuffer (Zugabe von 600 µl bzw. 250 µl Waschpuffer, zentrifugieren für 15 sec bzw. für 2min). Die sich im Röhrchen befindende Flüssigkeit wurde nach beiden Waschungen

verworfen. Die Waschungen dienten dazu, Salze, Metabolite und makromolekulare Zellkomponenten zu entfernen.

Anschließend wurde die eigentliche Eluierung der RNA durchgeführt. Hierbei gab es eine leichte Abweichung vom Protokoll, um die RNA in einer höheren Konzentration zu sammeln. Die 250 x NucleoSpin® RNA Plus Column wurde hierzu in einem neuen 1,5 ml Sammelröhrchen platziert, dann erfolgte die Zugabe von 20 µl Nuclease-freiem H₂O und ein erneutes Zentrifugieren für 1 min bei einer Geschwindigkeit von 11.000 rpm. Das sich im Sammelröhrchen befindende H₂O wurde daraufhin erneut auf der Säule platziert und es erfolgte ein erneutes Zentrifugieren.

Anschließend wurde der RNA Gehalt mit Hilfe mithilfe des Spektralphotometers NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) bestimmt. Die gewonnen RNA Proben wurden bis zur ihrer Umschreibung in cDNA bei -80°C aufbewahrt.

3.2.4 Umschreiben von totaler RNA in cDNA

Zur Durchführung der Polymerase-Ketten-Reaktion musste die isolierte RNA (Methode siehe 3.2.3) in cDNA umgeschrieben werden. Hierzu wurde der iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR genutzt. Dieser wurde bis zu seiner Benutzung bei -20°C gelagert. In dem Supermix ist die zur Umschreibung benötigte Reverse Transkriptase enthalten. Die RNA wurde bis zu ihrer unmittelbaren Nutzung bei -80°C aufbewahrt und während des gesamten Experiments aus Eis gelagert, ebenso der Supermix. Das im Folgenden beschriebene Vorgehen, welches dem Protokoll des iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR entspricht, bezieht sich auf das Umschreiben einer RNA Probe in cDNA, mit allen anderen Proben wurde auf die gleiche Weise verfahren.

Insgesamt musste für die Reaktion ein Totalvolumen von 20 µl erreicht werden. Dieses setzte sich wie folgt zusammen:

- 4 µl Supermix
- x µl der RNA Probe (entsprechend 500 ng RNA)
- x µl Nuclease- freies H₂O (um die Probe auf 20 µl aufzufüllen)

Die genannten Bestandteile wurden in ein 0,2 ml Tube pipettiert, anschließend gemischt und für einige Sekunden zentrifugiert. Hiernach erfolgte die Inkubation der Proben im PTC-100 Thermal Cycler (MJ Research Inc., St. Bruno (Quebec), Canada) nach folgendem Protokoll:

- 5 Minuten bei 25°C (Vorbereitung)
- 30 Minuten bei 42°C (reverse Transkription)

- 5 Minuten bei 85°C (Inaktivierung der reversen Transkriptase)

Die so gewonnen cDNA Proben wurden bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

3.2.5 Prinzip der Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

Für die Durchführung der RT-qPCR (im folgenden kurz PCR) wurde der GoTaq® qPCR Master Mix (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) verwendet und das zugehörige Protokoll befolgt.

Unter geeigneten Reaktionsbedingungen kann mit Hilfe einer DNA-Polymerase und desoxy-Nukleosidtriphosphaten (dNTP) (beide Komponenten sind in dem genutzten GoTaq® qPCR Master Mix enthalten) ein Primer entlang des zu vervielfältigten DNA-Abschnittes verlängert werden und es entsteht ein doppelsträngiger DNA-Strang. Die Menge der entstandenen DNA kann mittels Fluoreszenzmessung quantifiziert werden. Hierzu dient der BRYT Green® Dye (ebenfalls in dem genutzten GoTaq® qPCR Master Mix enthalten), ein fluoreszierender Farbstoff, welcher dazu in der Lage ist, an die DNA zu binden.

Die PCR ist ein zyklisches Verfahren, wobei jeder Zyklus aus drei Schritten besteht (s. Tabelle 5).

3.2.5.1 Durchführung der RT-qPCR

Zur Durchführung der PCR wurden neben dem oben genannten GoTaq® qPCR Master Mix eine Auswahl bestimmter Primer und die vorher isolierte und umgeschriebene cDNA (vgl. 3.2.4) benötigt. Alle Primer und die entstandenen Transkripte präsentierten hierbei Gene, die bei der Regulation der Autophagie eine wichtige Rolle spielen. Die für die Reaktion benötigten Reagenzien wurden vor ihrer Nutzung bei -20°C und während der Durchführung des Experiments auf Eis gelagert.

Die PCR wurde auf einer 96-Well PCR Platte (STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Die einzelnen Wells wurden mit einem Gesamtvolumen von 20 µl ausgefüllt, welches sich wie folgt zusammensetzte:

- 10 µl GoTaq® qPCR Master Mix
- 7 µl Nuclease-freies H₂O
- 2 µl Primer
- 1 µl cDNA Probe (bzw. 1 µl Standardreihe oder 1 µl H₂O)

Die cDNA Probe wurde hierbei als letztes hinzugegeben. Zusätzlich wurde pro verwendetem Primer eine Standardreihe angefertigt. Hierzu wurden 5 µl einer unbehandelten Probe mit 5 µl

Nuclease freiem H₂O durch kurzes Vortexen und Zentrifugieren vermischt. So entstanden 10 µl einer 1:2 verdünnten Probe. Aus dieser ersten Verdünnung wurden erneut 5 µl entnommen und in ein neues Tube gegeben, in welchem ebenfalls 5 µl Nuclease-freies H₂O vorgelegt waren. Nach Vermischen des Inhalts entstand so eine 1:4 verdünnte Probe. So wurde weiterverfahren, bis eine Standardreihe mit folgenden Verdünnungen entstanden war: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32. Aus jeder Verdünnung wurde 1 µl in fünf aufeinanderfolgende Wells pipettiert. Anschließend wurde in ein sechstes Well 1 µl Nuclease-freies H₂O pipettiert, um einen Leerwert als Reinheitskontrolle zu bestimmen.

Die 96-Well PCR Platte wurde mit einer Klebefolie (STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutschland) verschlossen und 1 Minute lang bei einer Geschwindigkeit von 1.000 rpm zentrifugiert, damit sich alle Proben am Boden der Wells sammeln.

Die PCR-Platte wurde daraufhin in den entsprechenden Cycler (C1000™ Thermal Cycler Model No.: CFX96™ Optics Module) gestellt und die PCR nach dem folgenden Protokoll inkubiert:

Tabelle 5: Zyklen der RT-qPCR (Optimized Cycling Conditions for qPCR, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Systems)

Phase	Anzahl der Zyklen	Dauer pro Zyklus	Temperatur
Aktivierung der GoTaq Polymerase	1	2min	95°C
Denaturierung	40	15s	95°C
Anlagerung der Primer und Synthese der DNA-Stränge		60s	60°C
Dissoziation / Erstellung Schmelzkurve	1	0,5°C/s	60-95°C

Die gespeicherten Daten wurden mit dem Bio-Rad CFX-Manager ausgewertet und gegenüber GAPDH normalisiert, anschließend erfolgte die Auswertung der Rohdaten mit der Software Rest2009.

3.2.6 Prinzip der Proteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure -Assay

Zur Quantifizierung von Proteinmengen steht unter anderem das hier genutzte Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, United States) zur Verfügung. Das Prinzip des Kits beruht drauf, dass Proteine im alkalischen Medium Cu²⁺ zu Cu¹⁺ reduzieren können, welches mit zwei Molekülen BCA einen lilafarbenen Komplex bilden kann. Dieser Komplex besitzt eine starke Absorption bei 562 nm, welche quasi linear mit der enthaltenen Proteinkonzentration ist (Proteinbestimmung 2018). Die Verfärbung der zu untersuchenden Proben wird hierbei mit einer Standardreihe, bestehend aus Proben mit einer bekannten Protein-Konzentration, verglichen.

3.2.6.1 Durchführung der Proteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure -Assay

Bei der Proteinbestimmung wurde nach dem Protokoll gearbeitet, welches dem Pierce® BCA Protein Assay Kit zugehörig ist. Das Kit wurde vor der Benutzung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Für die Isolierung und Bestimmung von Proteinen aus Monolayern mussten zunächst Zellpellets der genutzten Zellreihen gesammelt werden. Das Prinzip, wie auch die Behandlungen der Zellen entspricht eins zu eins dem unter 3.2.3.1 „Aussäen der Zellen“ und 3.2.3.2 „Ablösen und Ernten der Zellen“ beschriebenen Prinzip. Allerdings wurden hier zwei zusätzliche Proben gesammelt, welche mit dem Autophagie-Inhibitor Bafilomycin behandelt wurden. Die Konzentration von Bafilomycin betrug hierbei 100 pM (Di Fazio et al. 2016).

Die Isolierung der Proteine und die Proteinbestimmung verlief bei allen Zellpellets gleich und ist im Folgenden exemplarisch dargestellt:

Die Zellpellets, welche vorher bei -20°C gelagert wurden, wurden zunächst auf Eis aufgetaut, anschließend erfolgte die Zugabe von 30-100 µl Jie's Puffer (die genaue Menge war abhängig von der Größe der Zellpellets) und ein Auflösen der einzelnen Zellpellets durch wiederholtes auf- und abpipettieren. Nach einer Inkubation auf Eis für 30 Minuten wurden die Zellen und Puffer enthaltenden Tubes bei einer Temperatur von 4°C und einer Geschwindigkeit von 14.000 rpm für 30 Minuten zentrifugiert. Die Überstände der einzelnen Proben wurden anschließend in ein frisches 1,5 ml Tube überführt und konnten bis zur Proteinbestimmung und bis zur Durchführung des Western Blots bei -20°C gelagert werden.

Zur Proteinbestimmung wurden 5 µl der Proben zunächst in neuen 0,5 ml Tubes, durch Zugabe von 20 µl Jie's Puffer, im Verhältnis 1:5 verdünnt. Außerdem wurde nach dem beiliegenden Protokoll mit einer Albumin Standard Ampulle eine Standardreihe nach Folgendem Schema angesetzt:

- Standard A: 0 µl Verdünnungslösung + 300 µl Stocklösung → BSA Konzentration: 2000 µg/mL
- Standard B: 125 µl Verdünnungslösung + 375 µl Stocklösung → BSA Konzentration: 1500 µg/mL
- Standard C: 325 µl Verdünnungslösung + 325 µl Stocklösung → BSA Konzentration: 1000 µg/mL
- Standard D: 175 µl Verdünnungslösung + 175 µl Standard B → BSA Konzentration: 750 µg/mL

- Standard E: 325 μ L Verdünnungslösung + 325 μ L Standard C \rightarrow BSA Konzentration: 500 μ g/mL
- Standard F: 325 μ L Verdünnungslösung + 325 μ L Standard E \rightarrow BSA Konzentration: 250 μ g/mL
- Standard G: 325 μ L Verdünnungslösung + 325 μ L Standard F \rightarrow BSA Konzentration: 125 μ g/mL
- Standard H: 400 μ L Verdünnungslösung + 100 μ L v. Standard G \rightarrow BSA Konzentration 25 μ g/mL
- Standard I: 400 μ L Verdünnungslösung+ 0 μ L Stocklösung \rightarrow Blank

Die weitere Proteinbestimmung wurde auf einer 96-Well Platte durchgeführt. Zunächst wurde, nach erstelltem Plattenschema, pro Well 10 μ l der Standardreihe in Doppelbestimmung vorgelegt. Anschließend wurden die Verdünnungen der zu untersuchenden Proben ebenfalls in Doppelbestimmung aufgetragen, um von allen Proben ein vergleichbares Duplikat zu erhalten. In jedes Well wurden hiernach 200 μ l Working Reagent hinzugegeben, dieser bestand aus dem Reagent A (BCA) und Reagent B (Kupferlösung, beide Reagenzien lagen dem Kit bei) und wurde im Verhältnis 50:1 (A:B) angesetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C erfolgte die Proteinbestimmung mittels des Emax precision microplate reader bei einer Wellenlänge von 570 nm.

3.2.7 Prinzip des Western Blots

Western Blots dienen dazu, spezifische Proteine aus einer Ansammlung von Proteinen, welche aus Zellen isoliert wurden, zu identifizieren. Dies erfolgt über Antikörper, welche spezifisch an das gesuchte Protein binden (Mahmood und Yang 2012).

3.2.7.1 Durchführung des Western Blots

1. Auftrennung der Proteine via Gelelektrophorese

Bei der Auftrennung der Proteine via Gelelektrophorese wurden die Mini-PROTEAN TGX Statin-Free Gels (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, United States) genutzt und sich an das beiliegende Protokoll gehalten.

Die vorher gesammelten Proteinproben (genaues Vorgehen vgl. 3.2.6.1) wurden zunächst auf Eis aufgetaut. Parallel wurde ein Mix vorbereitet, welcher zu 95 % aus 4 x Laemmli Sample Buffer und zu 5 % aus 2-Mercaptoethanol bestand.

Insgesamt wurde eine Proteinkonzentration von 30 μ g/ μ l benötigt, sodass die vorbereiteten Proben in einem neuen 0,5 μ l Tube mit Nuclease-freiem H₂O entsprechend verdünnt wurden, das Endvolumen betrug hierbei 10 μ l. Anschließend erfolgt eine Zugabe von 2,5 μ l des Laemmli-

ß-Mercaptoethanol-Mixes, sodass ein Endvolumen von 12,5 µl entstand. Alle Proben wurden kurz gemischt und dann sofort wieder auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Proben bei 95°C für 10 Minuten erhitzt, kurz zentrifugiert und wieder sofort auf Eis gelagert.

Parallel wurde die Elektrophoreseapparatur (Mini-Protean Tetra System, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, United States) vorbereitet: Hierzu wurde zunächst ein Laufpuffer hergestellt, welcher 900 ml Mili-Q-Wasser und 100 ml 10 x Tris/Glycine/SDS Buffer (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, United States) enthielt. Die Elektrophoreseapparatur bestand aus einer inneren und einer äußeren Kammer, wobei man die innere Kammer in die äußere einsetzte und zunächst nur erstere mit dem Laufpuffer füllte, um ihre Dichtigkeit zu überprüfen. Die Wände der inneren Kammern waren hierbei zwei eingesetzte Mini-PROTEAN TGX Statin-Free Gele, welche zu diesem Zeitpunkt noch von einer Plastikhülle umschlossen waren. Von den Gelen musste man zunächst einen Kamm entfernen, um nach Vorbereitung der Kammern die Proben auftragen zu können. Die nun vorhandenen Taschen wurden mit Laufpuffer gespült, um evtl. vorhandene Luftblasen zu entfernen. Anschließend wurde auch die äußere Kammer mit Laufpuffer gefüllt.

Das Auftragen der Proben erfolgte mit Hilfe einer Pipette. In die erste Tasche wurden 5 µl MagicMark™ XP Western Standard (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, United States) aufgetragen und in die elfte Tasche 5 µl ProSieve®Quad Color™ Proteine Marker, 4.6-300 kDa (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland) - beide Reagenzien stellen einen Proteinmarker dar. Hiernach erfolgte das Auftragen der vorbereiteten Proben. Die freien Taschen wurden mit 2,5 µl des 4x-Laemmli-2-Mercaptoethanol-Mixes aufgefüllt. Anschließend wurde die Elektrophoreseapparatur mit einem Deckel verschlossen, über diesem wurde eine Spannung von 200 V für eine Dauer von 30-40 Minuten angelegt.

2. Blotting der aufgetrennten Proteine

Das Blotten der in der Elektrophorese aufgetrennten Proteine erfolgte mit Hilfe des Trans-Blot Turbos (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, United States) und des Trans-Blot Turbo Transfer Packs (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, United States). Bei der Durchführung wurde sich an das dem Transfer Pack beiliegende Protokoll gehalten.

Nach Durchführung der Elektrophorese wurden die Gele aus der inneren Kammer der Elektrophoreseapparatur herausgenommen. Ein Filterpapierstapel, inkl. Blotting Membran, wurde mit Hilfe einer Pinzette in die Mitte der Kassette des Trans-Blot-Turbos gelegt. Auf der Membran wurde nun vorsichtig ein Gel platziert. Auf dieses wurde anschließend ein zweiter

Stapel aus Filterpapieren gelegt. Die Kassette wurde fest verschlossen und zurück in den Trans-Blot Turbo gestellt. Hier wurde nun zur Durchführung des Blotting-Prozesses für 30 Minuten eine Spannung von 25 Volt angelegt.

Um anschließend den Erfolg des Blottens zu kontrollieren, wurde die Membran mit Red Alert Solution (1,44ml Red Alert + 13 ml Nuclease-freies H₂O) angefärbt, wobei sich die aufgetrennten Proteine nach Abwaschen des überschüssigen Red Alerts mit H₂O als rote Banden zeigten.

3. Blocking

Anschließend erfolgte das Blockieren der Membran in 4% BSA in TBST, welches vorher frisch angesetzt worden war. Dieses wurde folgendermaßen hergestellt: Zunächst wurde eine Pufferlösung TBS in 10-facher Konzentration angesetzt (Zusammensetzung s. 3.1.6). 100 ml der 10 x TBS-Lösung wurden anschließend mit 900 ml Wasser verdünnt und auf einen pH von 7,4 titriert. Hiernach erfolgte die Zugabe von 1 ml Tween® 20 (Chemsolute®, Th.Geyer, Renningen, Deutschland) und die Durchmischung der Reagenzien mit Hilfe des Magnetrührers. Anschließend wurden 2 g Albumin Fraktion V (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) in 50 ml TBST gelöst. Ein kleiner Anteil der angesetzten Lösung (ca. 3-10 ml) wurde zum Blockieren der Membranen in einen 50 ml Falcon gegeben, in welchem auch eine vorher angefertigte Membran bzw. einzelnen Membranbestandteile vorsichtig platziert wurden. Hiernach erfolgte auf dem Rollmischer für eine Stunde die Inkubation der Membran.

4. Primärer Antikörper

Der primäre Antikörper wurde nach Vorlage des jeweils beiliegenden Datenblattes in 4 % BSA in TBST in einem bestimmten Verhältnis verdünnt. Bis zu diesem Zeitpunkt wurden alle Antikörper bei -20°C aufbewahrt. Anschließend wurde die inzwischen geblockte Membran in dem verdünnten primären Antikörper über Nacht bei 4°C auf einem Rollenmischer inkubiert. Dies erfolgte erneut in einem 50 ml Falcon. Das Volumen des verdünnten Antikörpers betrug, je nach Größe der Membran, 2-5 ml.

5. Waschen der Membran und sekundärer Antikörper

Am nächsten Tag wurde die Membran 3x für 10 Minuten auf einem Shaker in TBST gewaschen. Hiernach erfolgte auf dem Rollenmischer und bei Raumtemperatur die einstündige Inkubation im sekundären Antikörper, welcher vorher im Verhältnis 1:5000 mit 4 % BSA in TBST verdünnt wurde. Wichtig war hierbei, abhängig von den Eigenschaften des primären Antikörpers, entweder den goat-anti mouse oder den goat-anti rabbit Antikörper zu nutzen. Die Antikörper wurden bis zu ihrer Benutzung bei 4°C aufbewahrt.

6. Waschen der Membran und Detektion

Nach der Inkubation im sekundären Antikörper erfolgte ein erneutes Waschen der Membran, welches 3 x für 5 Minuten in TBST und 1 x für 5 Minuten in TBS durchgeführt wurde. Nun konnte die Auswertung der Membran in einer Dunkelkammer (Fusion, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) erfolgen. Hierzu wurde eine SuperSignal® West Pico-Lösung (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, United States) im Verhältnis 1:1 vorbereitet. Diese bewirkt durch die Oxidation von Luminol in Anwesenheit von HRP (Meerrettichperoxidase) die Entstehung eines Lumineszenzsignals, mit dessen Hilfe die Detektion von Proteinen möglich ist. Das frisch angesetzte Substrat wurde auf die Membran gegeben, welche vorher in die Mitte der Dunkelkammer gelegt worden war. Das Signal konnte nach einer individuellen Belichtungszeit mit Hilfe einer Kamera aufgenommen werden, die genaue Belichtungszeit war dabei von dem verwendeten primären Antikörper abhängig. Die Quantifizierung der Proteindetektion erfolgte mit Hilfe der Software Fusion image capture und Bio-1D analysis System.

7. Nachweis Proteinmenge

Um nachzuweisen, dass zu Beginn des Versuches überall die gleiche Menge an Protein aufgetragen worden war, fand anschließend die Inkubation der verwendeten Membranen in GAPDH oder β -Actin statt. Hierzu musste die Membran zunächst für 15 Minuten in Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, United States) gestrippt, anschließend erneut in TBST gewaschen und für eine Stunde in 4 % BSA in TBST geblockt werden. Hiernach erfolgte bei Raumtemperatur die Inkubation der Membran in GAPDH (Verdünnung 1:1000) bzw. β -Actin (Verdünnung 1:3000) für 45-60 Minuten und die Inkubation im sekundären Antikörper (Verdünnung 1:5000) für 60 Minuten. Anschließend wurde eine erneute Detektion der Proteine durchgeführt.

3.2.8 Statistische Analyse

Das Sammeln und Auswerten der Daten erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel 2016 (Microsoft Office, Microsoft Corporation, Redmond, WA, United States). Die Errechnung der Signifikanz erfolgte, wenn möglich, anhand des T-Tests für gepaarte Stichproben. Ein *p*-Wert < 0,05 wurde als signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Zellviabilitätsmessung via RealTime-Glo™

Die Bestimmung der Zellviabilität erfolgte via RealTime-Glo™ an Sphäroiden der etablierten Zelllinie C643. Sinn dieser Untersuchung war, die effektiven Konzentrationen der genutzten Substanzen Atezolizumab (PD-L1-Inhibitor), Panobinostat (HDACi) und Sorafenib (TKI) für die weiterführenden Untersuchungen zu bestimmen.

4.1.1 Zellviabilitätsmessung bei singulärer Behandlung von Sphäroiden der Zelllinie C643 (Versuchsreihe 1)

In der ersten Versuchsreihe erfolgte zunächst die singuläre Behandlung der Sphäroide, die im folgenden beschriebenen Ergebnisse sind in Abbildung 7 dargestellt.

Bei der Behandlung der Sphäroide der Zelllinie C643 mit Panobinostat in 4 Konzentrationen (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM) zeigte sich eine effektive Hemmung der Viabilität nach 48h ab einer Konzentration von 10 nM. Bei einer Konzentration von 1 nM war keine signifikante (*p < 0,05) Hemmung des Wachstums zu beobachten (s. Abbildung 7).

Die ebenfalls durchgeführte Behandlung mit 3 Konzentrationen Sorafenib (1 µM, 10 µM, 100 µM) zeigte schon ab einer Konzentration von 1 µM und einer Behandlungsdauer von 3h einen signifikanten (*p < 0,05) Effekt auf die Viabilität der Sphäroide. Für die gesamte Dauer der Messung war ab hier keine ansteigende Viabilität der Zellen mehr zu beobachten (vgl. Abbildung 7).

Atezolizumab schließlich zeigte in den 4 genutzten Konzentrationen (100 ng/ml, 200 ng/ml, 500 ng/ml, 1 µg/ml) ähnlich wie Sorafenib schon nach 3 Stunden einen direkten negativen Effekt auf die Zellviabilität. Dieser war besonders stark bei einer Konzentration von 1 µg/ml, während er sich bei den drei niedrigeren Konzentrationen in einem ähnlichen und geringeren Bereich bewegte. Für die Konzentration von 1 µg/ml war über den Zeitraum des Experiments kein Anstieg der Viabilität mehr zu messen, bei der Behandlung mit 100 ng/ml, 200 ng/ml und 500 ng/ml konnte hingegen noch ein leichter Anstieg der Viabilität beobachtet werden, welcher für alle drei Konzentrationen in einem ähnlichen Bereich lag. Hierbei zeigte sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zunächst eine signifikante (*p < 0,05) Reduktion der Viabilität im Zeitraum von 3h bis 56h, anschließend zeigte sich jedoch eine Annäherung der Zellviabilität an die unbehandelte Kontrolle. Diese Ergebnisse sind ebenfalls in Abbildung 7 dargestellt.

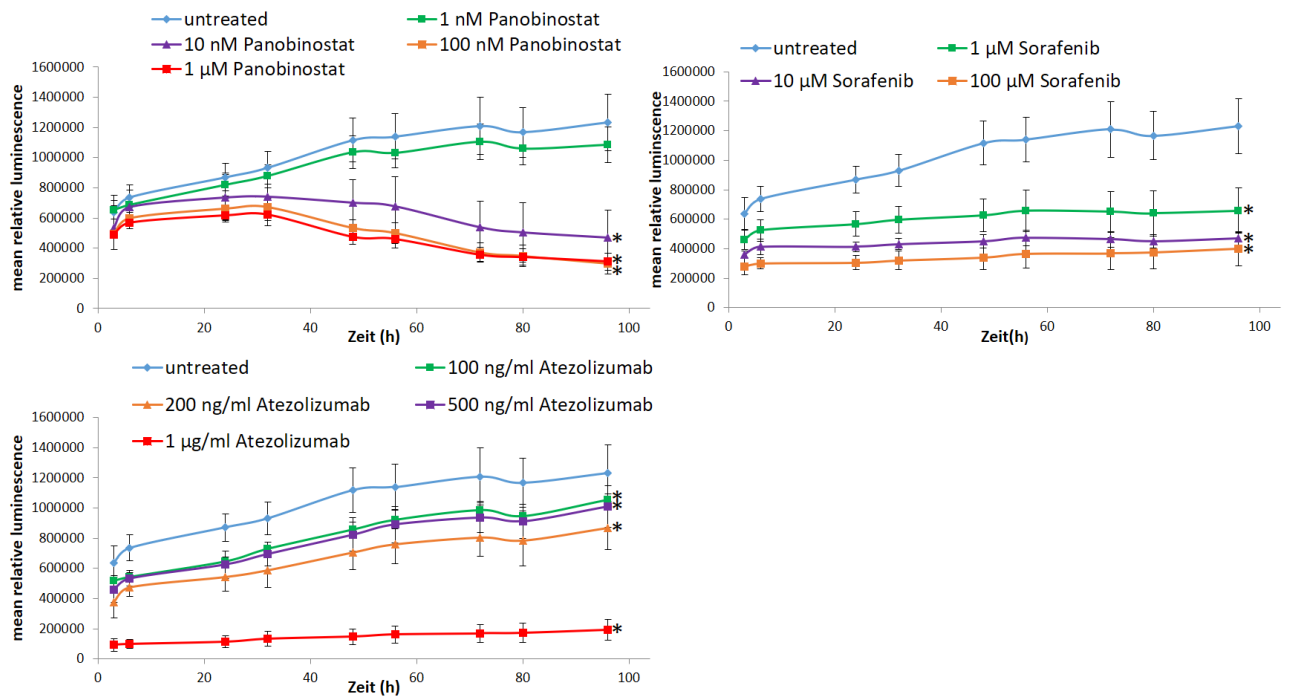


Abbildung 7: Echtzeit Zellviabilitätsanalyse von Sphäroiden der Zelllinie C643 (singuläre Behandlung): Die Sphäroide wurden auf einer 96-Well Platte etabliert und nach einer Inkubationszeit von 96h mit Atezolizumab, Panobinostat und Sorafenib in den genannten Konzentrationen behandelt. Nach 2 weiteren Stunden erfolgte die Zugabe der NanoLuc® Luciferase und des MT Cell Viability Substrate, anschließend erfolgte die regelmäßige Messung des Lumineszenz-Signals, dessen Stärke ein Maß für die Viabilität der Zellen ist. Gezeigt werden der Mittelwert +/- Standardabweichung der Analyse in dreifacher Ausführung pro Behandlung. * : Signifikante Werte (p < 0,05).

Da das Ziel dieser Arbeit war, nicht nur die Auswirkungen einer singulären Behandlung, sondern auch die einer Kombinationsbehandlung zu untersuchen, mussten nun die Konzentrationen für die weiteren Untersuchungen festgelegt werden. Bei Panobinostat war im Gegensatz zu Sorafenib und Atezolizumab erst nach 48h und bei einer Konzentration von 10 nM eine Einschränkung der Viabilität zu beobachten. Da aber nicht klar war, wie die Zellen auf die Kombination von Panobinostat mit Atezolizumab reagieren würden, wurde beschlossen, für die Kombinationsbehandlung sowohl eine Konzentration von 1 nM, wie auch 10 nM zu nutzen. Bei Sorafenib hingegen war schon ab einer Konzentration von 1 μM eine signifikante (*p < 0,05) Einschränkung der Zellviabilität zu beobachten, sodass für die weiteren Versuche eine Konzentration von 1 μM genutzt wurde. Bei Atezolizumab war für alle genutzten Konzentrationen zunächst eine Hemmung der Viabilität zu beobachten, welche bei einer Konzentration von 1 μg/ml besonders stark ausfiel. Um diese direkte und stark ausgeprägte Reduzierung der Zellviabilität zu vermeiden, aber gleichzeitig nach Möglichkeit eine effektive Hemmung der Viabilität zu gewährleisten, wurde für die folgenden Experimente eine Konzentration von 500 ng/ml gewählt.

4.1.2 Zellviabilitätsmessung bei kombinierter Behandlung von Sphäroiden der Zelllinie C643 (Versuchsreihe 2)

Anschließend an die singuläre Behandlung der Sphäroide erfolgte eine kombinierte Behandlung der Sphäroide der Zelllinie C643.

Wie in Abbildung 8 dargestellt, zeigte die singuläre Behandlung mit 500 ng/ml Atezolizumab hier im Vergleich zur unbehandelten Kontrollprobe keine signifikante ($*p < 0,05$) Hemmung der Viabilität, ebenso wie die Behandlung mit 1 nM Panobinostat. Die Kombinationsbehandlung führte hingegen zu einer gering ausgeprägten Reduktion der Viabilität, allerdings erfolgte ab 48h ein Annähern der Messwerte an die der unbehandelten Kontrolle. Im Vergleich zu den singulären Behandlungen zeigte die Kombination der beiden Substanzen keinen signifikanten ($*p < 0,05$) Unterschied.

Für die Behandlung mit 10 nM Panobinostat und der Kombination aus 10 nM Panobinostat und 500 ng/ml Atezolizumab konnte nach 3h eine geringe Beeinflussung der Zellviabilität beobachtet werden, anschließend war hier eine weitere, signifikante ($*p < 0,05$) Reduktion der Viabilität messbar. Im direkten Vergleich zur singulären Behandlung mit 10 nM Panobinostat zeigte sich bei der Kombination kein signifikanter ($*p < 0,05$) Effekt, während hingegen im Vergleich zur singulären Behandlung mit Atezolizumab eine signifikante ($*p < 0,05$) Reduktion der Zellviabilität gezeigt werden konnte (s. Abbildung 8).

1 μ M Sorafenib bewirkte, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle, eine signifikante ($*p < 0,05$) Reduktion der Viabilität. Ebenso verhielt es sich bei der Kombination mit 500 ng/ml Atezolizumab, wobei hier allerdings zu einzelnen Zeitpunkten keine signifikante ($*p < 0,05$) Abweichung gemessen werden konnte. Im direkten Vergleich der Kombinationsbehandlung mit den singulären Behandlungen konnte kein signifikanter ($*p < 0,05$) Unterschied festgestellt werden. Einzig nach 96h konnte die Kombination aus Atezolizumab und Sorafenib, im Vergleich zur singulären Behandlung mit Atezolizumab, eine signifikante ($*p < 0,05$) Reduktion der Zellviabilität erreichen (vgl. Abbildung 8).

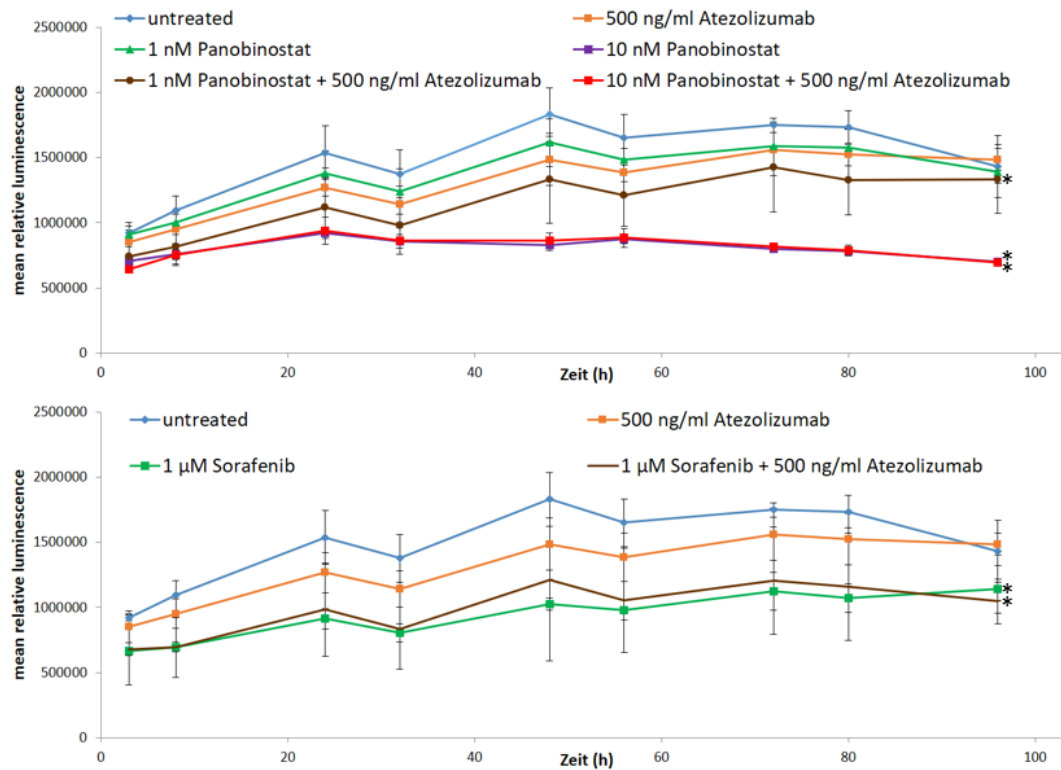


Abbildung 8: Echtzeit Zellviabilitätsanalyse von Sphäroiden der Zelllinie C643 (Kombinationsbehandlung): Die Sphäroide wurden auf einer 96-Well Platte etabliert und nach einer Inkubationszeit von 96h mit Atezolizumab, Panobinostat und Sorafenib in den genannten Konzentrationen behandelt. Nach 2 weiteren Stunden erfolgte die Zugabe der NanoLuc® luciferase und des MT Cell Viability Substrate, anschließend erfolgte die regelmäßige Messung des Lumineszenz-Signals, dessen Stärke ein Maß für die Viabilität der Zellen ist. Gezeigt werden der Mittelwert +/- Standardabweichung der Analyse in dreifacher Ausführung pro Behandlung. *: Signifikante Werte (p < 0,05).

4.1.3 Untersuchung der synergetischen Wirkung der Kombinationsbehandlungen

Die Kombinationen aus 500 ng/ml Atezolizumab mit 1 nM Panobinostat bzw. 1 µM Sorafenib zeigten (im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle) zu einzelnen Zeitpunkten eine geringe, aber signifikante (*p < 0,05) Reduktion der Zellviabilität. Die Kombination aus 500 ng/ml Atezolizumab mit 10 nM Panobinostat konnte hingegen, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle, eine deutliche Reduktion der Zellviabilität bewirken.

Um herauszufinden, ob die eingesetzten Substanzen in Kombination eine synergetische Wirkung zeigen, wurde anschließend der Combination Index berechnet. Die Formel lautet: CI (Combination Index) = D3 / D1*D2. (D3 = Stärke Lumineszenzsignal Kombinationsbehandlung, D1 bzw. D2 = Stärke Lumineszenzsignal singuläre Behandlung). Ein Wert < 1 spricht hierbei für einen synergetischen Effekt (Chou und Talalay 1984).

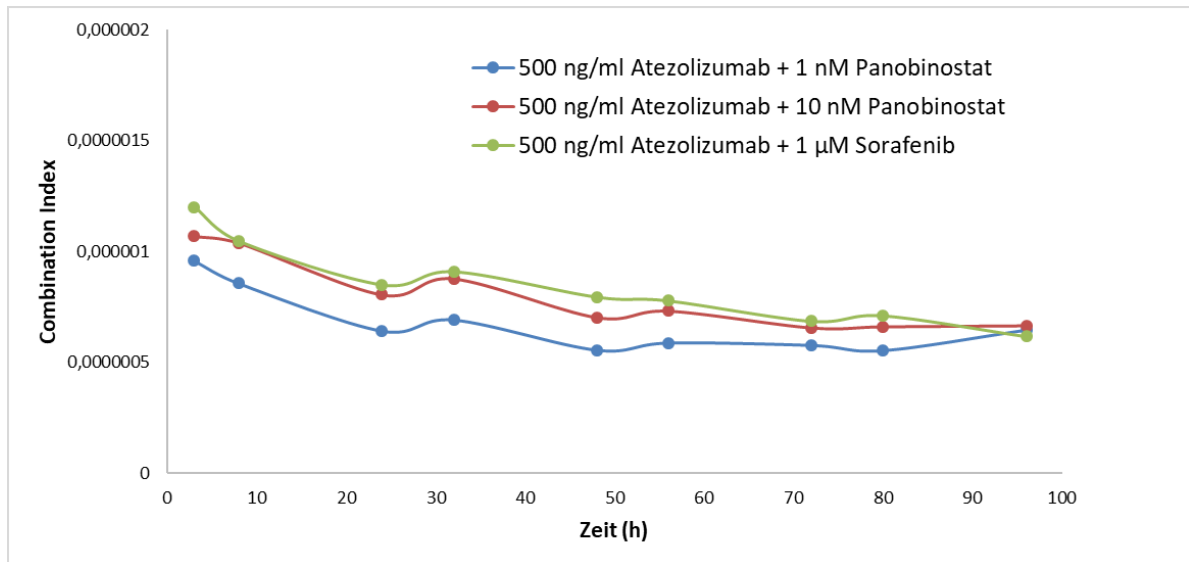


Abbildung 9: Combination Index (CI) der kombinierten Behandlung der Sphäroide von C643: Dargestellt ist der Kombinationsindex nach Behandlung der Sphäroide von C643 mit einer Kombination aus 500 ng/ml Atezolizumab + 1 nM / 10 nM Panobinostat bzw. + 1 µM Sorafenib. Ein Wert < 1 spricht hierbei für einen synergistischen Effekt.

Wie man Abbildung 9 entnehmen kann, konnte für alle genutzten Kombinationen und zu allen Zeitpunkten ein Kombinationsindex berechnet werden, welcher kleiner ist als 1. Folglich bewirkte die Kombination von 500 ng/ml Atezolizumab mit 1 nM / 10 nM Panobinostat bzw. 1 µM Sorafenib über einen synergistischen Effekt eine Reduktion der Zellviabilität der Sphäroide.

4.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Zellviabilitätsmessung mittels RealTime-Glo™

Da die Etablierung von Sphäroiden für die Primärkulturen nicht erfolgreich war (vgl. 3.2.1.4), konnte die Zellviabilitätsmessung via Real Time Glo™ nicht für Sphäroide aller Zelllinien durchgeführt werden. Die Ergebnisse der Sphäroide der etablierten Zelllinie C643 stehen damit exemplarisch für die in dieser Arbeit genutzten Primärkulturen.

Die oben aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass alle genutzten Substanzen, abhängig von der eingesetzten Konzentration, die Viabilität der Sphäroide von C643 beeinflussen können.

Atezolizumab zeigte bei einer Konzentration von 500 ng/ml zwar nur zu einzelnen Zeitpunkten eine signifikante (*p < 0,05) Einschränkung der Zellviabilität, dennoch wurde diese Konzentration für die folgenden Versuche genutzt, da bei einer Konzentration von 1 µg/ml die Viabilität der Zellen schon nach 3h stark gehemmt wurde und anschließend kein Anstieg der Viabilität mehr beobachtet werden konnte (s. Versuchsreihe 1).

Panobinostat zeigte ab einer Konzentration von 10 nM eine Einschränkung der Zellviabilität, sodass diese Konzentration für die nachfolgenden Versuche genutzt wurde (sowohl für die singuläre Behandlung, als auch für die Kombination mit Atezolizumab).

Sorafenib hingegen beeinflusste ab einer Konzentration von 1 µM die Viabilität der Zellen, weshalb diese Konzentration bei den nachfolgenden Experimenten eingesetzt wurde (sowohl für die singuläre, als auch für die Kombinationsbehandlung).

Obwohl die Etablierung von Sphäroiden für die Zelllinie C643 erfolgreich war, wurden alle im Folgenden vorgestellten RT-qPCRs und Western Blots mit Monolayern der untersuchten Zelllinien und Primärkulturen durchgeführt. Dies dient einer besseren Vergleichbarkeit der dargestellten Ergebnisse.

4.2 Beeinflussung der Ultrastruktur der Sphäroide durch die Behandlung mit Atezolizumab, Panobinostat und Sorafenib

Parallel zur Messung der Zellviabilität erfolgte täglich zum gleichen Zeitpunkt die Aufnahme eines mikroskopischen Bildes der Sphäroide, um beurteilen zu können, wie die eingesetzten Behandlungen die Ultrastruktur der Sphäroide beeinflussen. Dargestellt sind im Folgenden exemplarisch die Aufnahmen, die während der singulären und kombinierten Behandlung mit den einzelnen Substanzen entstanden (Versuchsreihe 2, vgl. 4.1.2).

Die Aufnahme der Sphäroide erfolgte 3h, 27h, 51h, 75h und 99h nach Behandlung. Im Folgenden sind nur die erste Aufnahme (nach 3h) und die letzte Aufnahme (nach 99h) je eines Sphäroiden dargestellt.

4.2.1 Ultrastruktur der unbehandelten Sphäroide

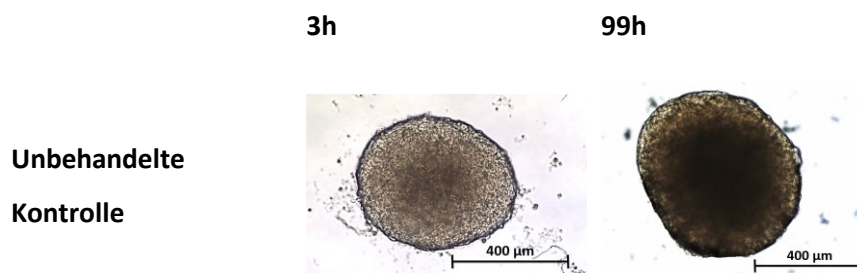


Abbildung 10: Darstellung der 3D Struktur der Sphäroide einer unbehandelten Kontrolle: Die Bilder wurden mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops aufgenommen. Der Maßstab beträgt 400 µm. Die ursprüngliche Größe der Sphäroide betrug etwa 600 µm. Exemplarisch erfolgt die Darstellung der Aufnahme nach 3h (erste Aufnahme) und nach 99h (letzte Aufnahme).

Die unbehandelten Sphäroide der Zelllinie C643, welche in diesem Versuchsaufbau als Kontrolle dienten, zeigten einen Durchmesser von etwa 600 µm (in diesem Beispiel betrug der

Durchmesser der unbehandelten Kontrolle 554,14 μm) und sowohl nach 3h, als auch nach 99h eine gut definierte, äußere Membran, die allzeit intakt war. Am letzten Tag betrug der Durchmesser hier 641,12 μm , es war also eine Größenzunahme zu beobachten (s. Abbildung 10).

4.2.2 Ultrastruktur der Sphäroide nach Behandlung mit 500 ng/ml Atezolizumab

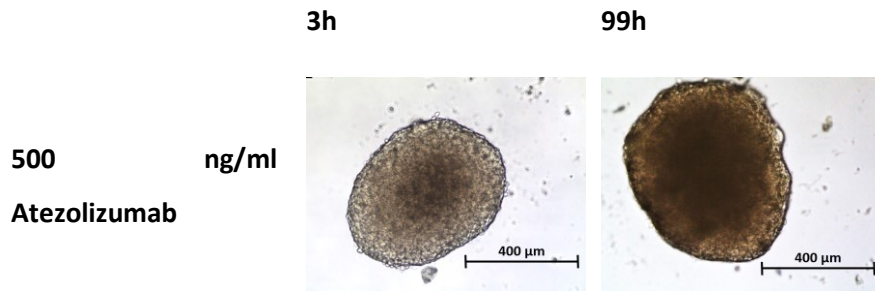


Abbildung 11: Darstellung der 3D Struktur der Sphäroide nach der Behandlung mit 500 ng/ml Atezolizumab: Die Bilder wurden mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops aufgenommen. Der Maßstab beträgt 400 μm . Die ursprüngliche Größe der Sphäroide betrug etwa 600 μm . Exemplarisch erfolgt die Darstellung der Aufnahme nach 3h (erste Aufnahme) und nach 99h (letzte Aufnahme).

Durch die Behandlung mit 500 ng/ml Atezolizumab konnte, wie in Abbildung 11 dargestellt, keine Veränderung der 3D Struktur der Sphäroide festgestellt werden. Außerdem konnte auch hier am zuletzt gemessenen Zeitpunkt eine Zunahme der Größe des Sphäroids und eine gut definierte, äußere Membran beobachtet werden. Diese Ergebnisse lassen sich gut mit den unter 4.1.2 gewonnenen Ergebnissen zur Zellviabilität vereinbaren: Es konnte, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, keine Abnahme der Viabilität der Sphäroide gemessen werden.

4.2.3 Ultrastruktur der Sphäroide nach Behandlung mit 1 nM Panobinostat

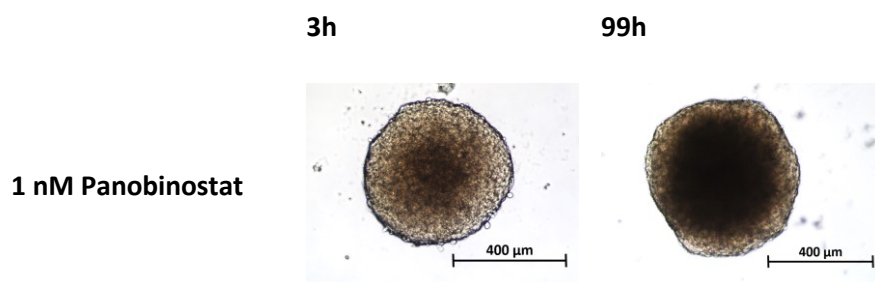


Abbildung 12: Darstellung der 3D Struktur der Sphäroide nach der Behandlung mit 1 nM Panobinostat: Die Bilder wurden mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops aufgenommen. Der Maßstab beträgt 400 μm . Die ursprüngliche Größe der Sphäroide betrug etwa 600 μm . Exemplarisch erfolgt die Darstellung der Aufnahme nach 3h (erste Aufnahme) und nach 99h (letzte Aufnahme).

Die Behandlung mit 1 nM Panobinostat induzierte eine von der Mitte ausgehende, inkomplette Verdunkelung der Sphäroide, welche sich gut durch den Vergleich der Bilder der Sphäroide nach 3h und nach 99h darstellen lässt (vgl. Abbildung 12). Die Außenmembran des Sphäroids

ist allerdings nach 99h noch gut zu erkennen und es konnte eine Zunahme des Durchmessers des Sphäroids beobachtet werden.

4.2.4 Ultrastruktur der Sphäroide nach Behandlung mit 500 ng/ml Atezolizumab + 1 nM Panobinostat

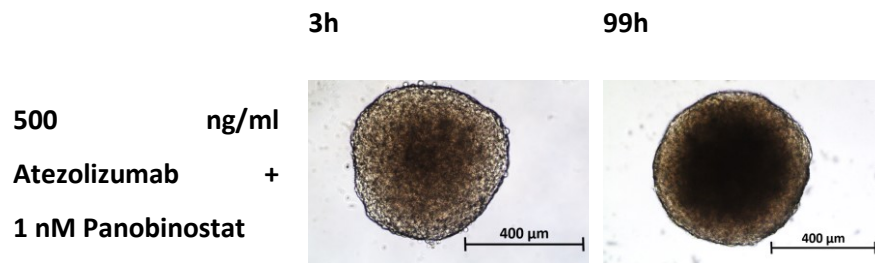


Abbildung 13: Darstellung der 3D Struktur der Sphäroide nach der Behandlung mit 500 ng/ml Atezolizumab + 1 nM Panobinostat: Die Bilder wurden mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops aufgenommen. Der Maßstab beträgt 400 µm. Die ursprüngliche Größe der Sphäroide betrug etwa 600 µm. Exemplarisch erfolgt die Darstellung der Aufnahme nach 3h (erste Aufnahme) und nach 99h (letzte Aufnahme).

Wie in Abbildung 13 dargestellt, zeigte die Kombination aus 500 ng/ml Atezolizumab und 1 nM Panobinostat sehr ähnliche Ergebnisse, wie die singuläre Behandlung mit 1 nM Panobinostat. Auch hier konnte eine unvollständige Verdunkelung der Sphäroide festgestellt werden. Ebenfalls gleich wie nach der singulären Behandlung, ist die gut erhaltene äußere Membran und die Größenzunahme im Vergleich zwischen erster und letzter Aufnahme. Insgesamt zeigte sich, sowohl für die singuläre, als auch für die kombinierte Behandlung mit 1 nM Panobinostat, eine Vereinbarung der beschriebenen Ergebnisse mit den Ergebnissen der Zellviabilitätsmessung, bei welcher ebenfalls nur eine leichte Verminderung der Viabilität der Sphäroide festgestellt werden konnte.

4.2.5 Ultrastruktur der Sphäroide nach Behandlung mit 10 nM Panobinostat

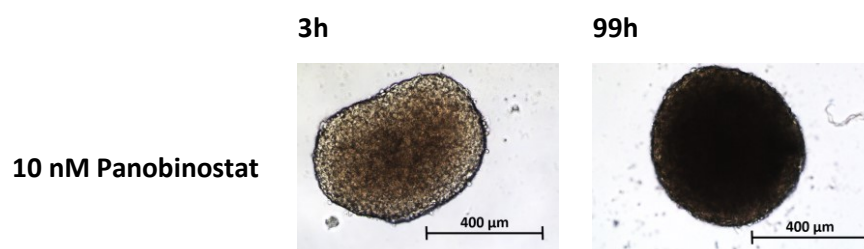


Abbildung 14: Darstellung der 3D Struktur der Sphäroide nach der Behandlung mit 10 nM Panobinostat: Die Bilder wurden mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops aufgenommen. Der Maßstab beträgt 400 µm. Die ursprüngliche Größe der Sphäroide betrug etwa 600 µm. Exemplarisch erfolgt die Darstellung der Aufnahme nach 3h (erste Aufnahme) und nach 99h (letzte Aufnahme).

Durch die Behandlung mit 10 nM Panobinostat zeigte sich nach 99h eine komplette Verdunkelung der Sphäroide. Die äußere Membran ist stellenweise nicht mehr gut zu

erkennen, außerdem nahm der Durchmesser der Sphäroide über die Zeit kontinuierlich ab. Die beschriebenen Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt. Dies und der Verlust der Grundstruktur ist gut mit den Ergebnissen der Zellviabilitätsmessung unter 4.1.2 vereinbar, da auch hier nach 96h eine signifikant reduzierte Viabilität der Sphäroide beobachtet werden konnte.

4.2.6 Ultrastruktur der Sphäroide nach Behandlung mit 500 ng/ml Atezolizumab + 10 nM Panobinostat



Abbildung 15: Darstellung der 3D Struktur der Sphäroide nach der Behandlung mit 500 ng/ml Atezolizumab + 10 nM Panobinostat: Die Bilder wurden mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops aufgenommen. Der Maßstab beträgt 400 µm. Die ursprüngliche Größe der Sphäroide betrug etwa 600 µm. Exemplarisch erfolgt die Darstellung der Aufnahme nach 3h (erste Aufnahme) und nach 99h (letzte Aufnahme).

Wie man Abbildung 15 entnehmen kann, waren die Ergebnisse nach Kombination von 500 ng/ml Atezolizumab mit 10 nM Panobinostat ähnlich wie nach der alleinigen Behandlung mit 10 nM Panobinostat, sodass hier ebenfalls eine nahezu vollständige Verdunkelung der Sphäroide und eine Abnahme des Durchmessers nach 99h beobachtet werden konnte. Dies ist vereinbar mit der durch die Ergebnisse des RealTime-Glo™ gezeigten Abnahme der Zellviabilität.

4.2.7 Ultrastruktur der Sphäroide nach Behandlung mit 1 µM Sorafenib

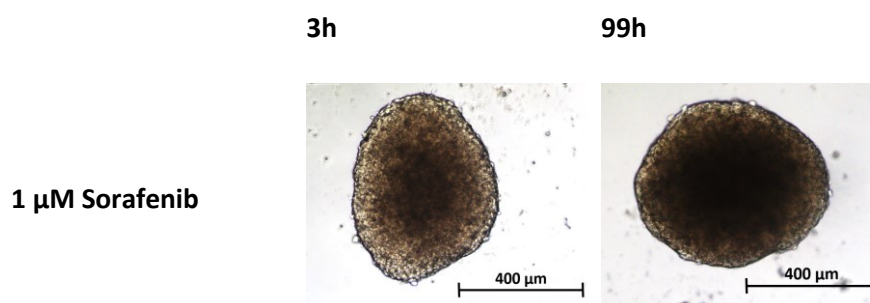


Abbildung 16: Darstellung der 3D Struktur der Sphäroide nach der Behandlung mit 1 µM Sorafenib: Die Bilder wurden mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops aufgenommen. Der Maßstab beträgt 400 µm. Die ursprüngliche Größe der Sphäroide betrug etwa 600 µm. Exemplarisch erfolgt die Darstellung der Aufnahme nach 3h (erste Aufnahme) und nach 99h (letzte Aufnahme).

Die Behandlung mit 1 μM Sorafenib zeigte, ähnlich wie die Behandlung mit 500 ng/ml Atezolizumab, keine Veränderung der Feinstruktur der Sphäroide (s. Abbildung 16). Auch nach 99h war die äußere Membran der Sphäroide als gut definierte Struktur zu erkennen. Der Durchmesser der Sphäroide veränderte sich nicht wesentlich.

4.2.8 Ultrastruktur der Sphäroide nach Behandlung mit 500 ng/ml Atezolizumab + 1 μM Sorafenib

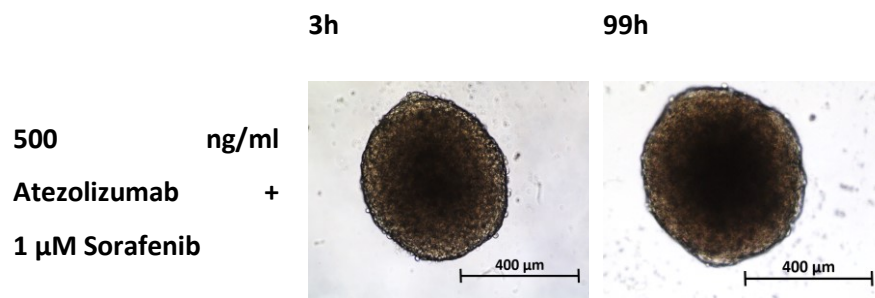


Abbildung 17: Darstellung der 3D Struktur der Sphäroide nach der Behandlung mit 500 ng/ml Atezolizumab + 1 μM Sorafenib: Die Bilder wurden mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops aufgenommen. Der Maßstab beträgt 400 μm . Die ursprüngliche Größe der Sphäroide betrug etwa 600 μm . Exemplarisch erfolgt die Darstellung der Aufnahme nach 3h (erste Aufnahme) und nach 99h (letzte Aufnahme).

Auch die Kombination aus 500 ng/ml Atezolizumab mit 1 μM Sorafenib zeigte, wie die singuläre Behandlung mit den beiden Substanzen, keinen wesentlichen Einfluss auf die Struktur der Sphäroide (vgl. Abbildung 17). Die äußere Membran war auch 99h nach Behandlung vollständig erhalten. Der Durchmesser der Sphäroide blieb, wie nach der Behandlung mit 1 μM Sorafenib, auf einem stabilen Niveau. Diese Ergebnisse für die singuläre und kombinierte Behandlung unterstützen ebenfalls die parallel gewonnenen Ergebnisse für die Zellviabilität der Sphäroide, da für diese, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, nur eine leichte Reduktion der Viabilität festgestellt werden konnte.

4.3 Ergebnisse der qRT-PCR

Durch Anwendung der qRT-PCR wurde bei den Zelllinien C643 und Nthy-ori 3-1, sowie bei den drei Primärkulturen, die Expression verschiedener Gene bestimmt, welche eine wichtige Rolle bei der Autophagie spielen (s. 2.4). Zu diesen Genen gehörten *UVRAG*, *SQSTM1*, *TFEB*, *BECN1*, *MAP1LC3B*, *PRKAA1* und *PRKAA2*. *GAPDH* wurde als Haushaltsgen genutzt. Zur Darstellung der Ergebnisse wurden diese relativ zur unbehandelten Kontrollprobe dargestellt, welche als 1,0 gesetzt wurde.

Alle Zelllinien wurden vorher zunächst mit den per RealTime-Glo™ bestimmten Konzentration von 500 ng/ml Atezolizumab, 10 nM Panobinostat, 1 μM Sorafenib und den Kombinationen aus Atezolizumab mit Panobinostat bzw. mit Sorafenib für 48h behandelt. Der Zeitpunkt von

48h wurde gewählt, um einen zytotoxischen Effekt der Substanzen zu gewährleisten, gleichzeitig aber auch eine adäquate Isolierung von RNA und Proteinen zu ermöglichen.

Zur übersichtlichen Darstellung wurden die Ergebnisse der Zelllinie C643 und die der Primärkulturen zusammengefasst und mit Hilfe eines Box-Whisker-Plots dargestellt, wobei die Darstellung abhängig von der eingesetzten Behandlung erfolgt.

4.3.1 Expression der Autophagiemarker nach der Behandlung mit 500 ng/ml Atezolizumab

Wie man dem Box-Whisker-Plot in Abbildung 18 entnehmen kann, führte die Behandlung mit 500 ng/ml Atezolizumab zu einer signifikanten Hochregulierung von *UVRAG*, *SQSTM1* und *TFEB*. Für die Transkripte von *BECN1*, *MAP1LC3B*, *PRKAA1* und *PRKAA2* konnte hingegen keine signifikante Beeinflussung durch die hier eingesetzte Behandlung gezeigt werden.

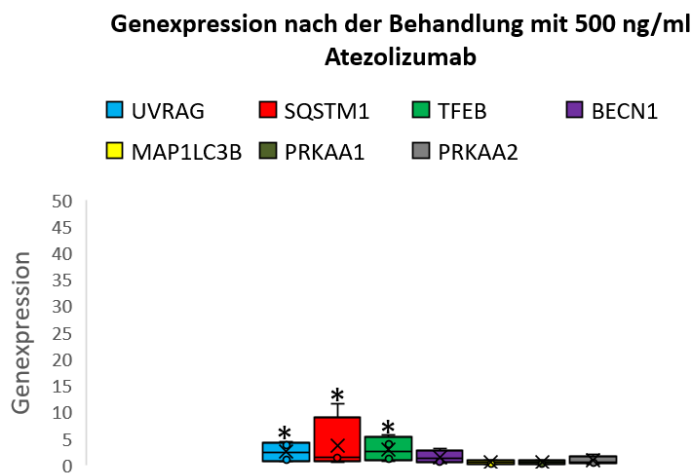


Abbildung 18: Box-Whisker-Plot der RT-qPCR der Zelllinie C643 und der drei Primärkulturen nach der Behandlung mit 500 ng/ml Atezolizumab und einer Behandlungsdauer von 48h: Die Expression wurde gegen *GAPDH* normalisiert. Die Ergebnisse sind relativ gegenüber den unbehandelten Kontrollen. *: Signifikante Werte.

4.3.2 Expression der Autophagiemarker nach der Behandlung mit 10 nM Panobinostat

Die Behandlung mit 10 nM Panobinostat zeigte nach 48h eine signifikante Hochregulierung der Gene *UVRAG*, *SQSTM1*, *TFEB*, *MAP1LC3B*, *PRKAA1* und *PRKAA2* (s. Abbildung 19). Einzig für *BECN1* konnte nach der Behandlung mit Panobinostat keine Hochregulierung des Transkripts beobachtet werden.

Genexpression nach der Behandlung mit 10 nM Panobinostat

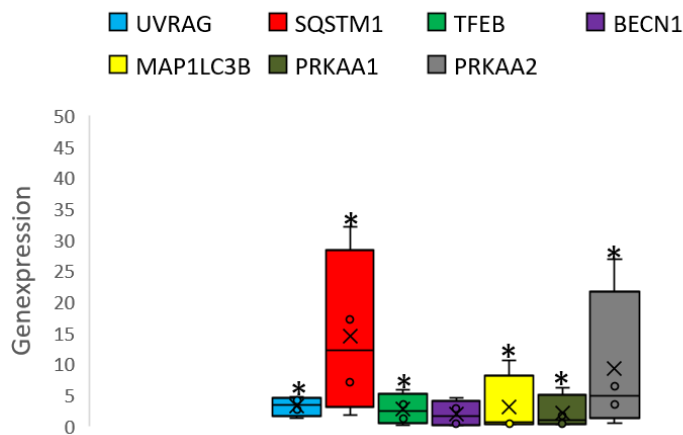


Abbildung 19: Box-Whisker-Plot der RT-qPCR der Zelllinie C643 und der drei Primärkulturen nach der Behandlung mit 10 nM Panobinostat und einer Behandlungsdauer von 48h: Die Expression wurde gegen *GAPDH* normalisiert. Die Ergebnisse sind relativ gegenüber den unbehandelten Kontrollen. *: Signifikante Werte.

4.3.3 Expression der Autophagiemarker nach der Behandlung mit 1 μ M Sorafenib

Nach der Behandlung mit 1 μ M Sorafenib für 48h konnte, wie man in Abbildung 20 sehen kann, eine signifikante Hochregulierung von *UVRAG*, *SQSTM1*, *TFEB*, *BECN1* und *PRKAA2* festgestellt werden. Hingegen blieb die Expression der Gene *MAP1LC3B* und *PRKAA1* auch nach der Behandlung mit Sorafenib stabil.

Genexpression nach der Behandlung mit 1 μ M Sorafenib

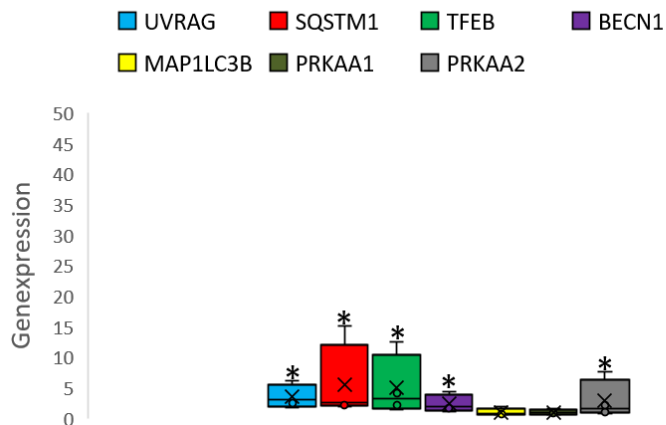


Abbildung 20: Box-Whisker-Plot der RT-qPCR der Zelllinie C643 und der drei Primärkulturen nach der Behandlung mit 1 μ M Sorafenib und einer Behandlungsdauer von 48h: Die Expression wurde gegen *GAPDH* normalisiert. Die Ergebnisse sind relativ gegenüber den unbehandelten Kontrollen. *: Signifikante Werte.

4.3.4 Expression der Autophagiemarker nach der Behandlung mit 500 ng/ml Atezolizumab + 10 nM Panobinostat

Wie man Abbildung 21 entnehmen kann, konnte nach der kombinierten Behandlung mit Atezolizumab und Panobinostat lediglich eine signifikante Hochregulierung der Transkripte von

TFEB und PRKAA2 nachgewiesen werden. Hingegen zeigte sich für UVRAG, SQSTM1, BECN1, MAP1LC3B und PRKAA1 keine Veränderung der Genexpression.

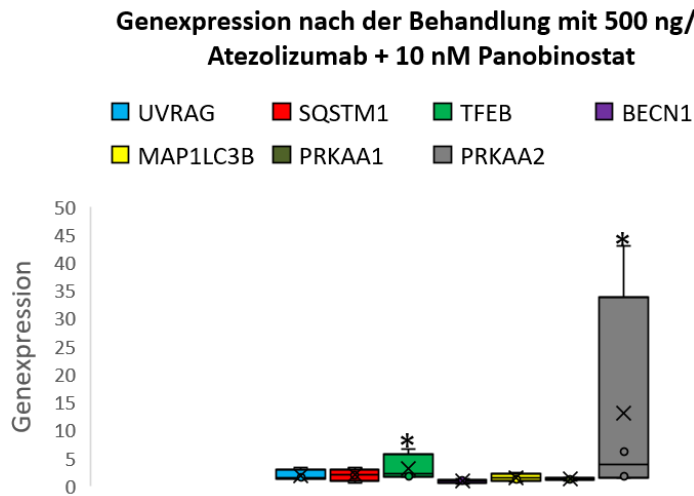


Abbildung 21: Box-Whisker-Plot der RT-qPCR der Zelllinie C643 und der drei Primärkulturen nach der Behandlung mit 500 ng/ml Atezolizumab + 10 nM Panobinostat und einer Behandlungsdauer von 48h: Die Expression wurde gegen GAPDH normalisiert. Die Ergebnisse sind relativ gegenüber den unbehandelten Kontrollen. *: Signifikante Werte.

4.3.5 Expression der Autophagiemarker nach der Behandlung mit 500 ng/ml Atezolizumab + 1 µM Sorafenib

Nach der 48h dauernden Behandlung mit 500 ng/ml Atezolizumab + 1 µM Sorafenib konnte nur für TFEB eine signifikante Hochregulierung der Expression des Transkripts nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu blieb die Expression von UVRAG, SQSTM1, BECN1, MAP1LC3B, PRKAA1 und PRKAA2 stabil. Die genannten Ergebnisse sind in Abbildung 22 dargestellt.

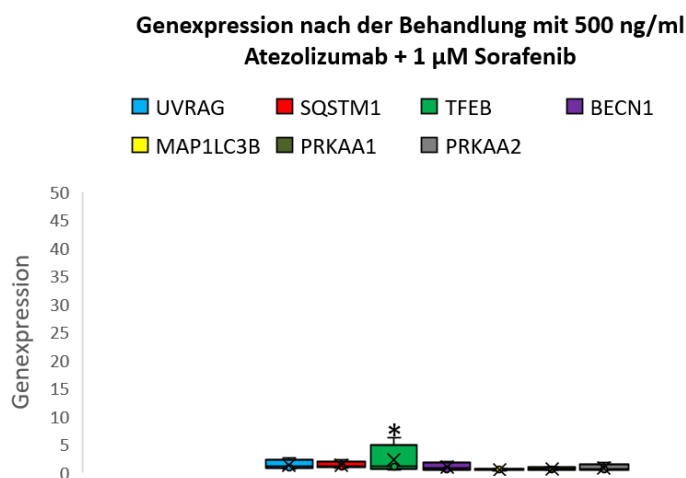


Abbildung 22: Box-Whisker-Plot der RT-qPCR der Zelllinie C643 und der drei Primärkulturen nach der Behandlung mit 500 ng/ml Atezolizumab + 1 µM Sorafenib und einer Behandlungsdauer von 48h: Die Expression wurde gegen GAPDH normalisiert. Die Ergebnisse sind relativ gegenüber den unbehandelten Kontrollen. *: Signifikante Werte.

4.4 Ergebnisse der Western Blots

Durch die vorher dargestellten Ergebnisse der RT-qPCR konnte gezeigt werden, in welchem Maße die singulären und kombinierten Behandlungen mit Atezolizumab, Panobinostat und Sorafenib die für die Autophagie relevanten Gene auf Transkriptions-Ebene beeinflussen. Um aber auch die Beeinflussung auf Proteinebene beurteilen zu können, wurden anschließend Western Blots durchgeführt, für welche die Zellen ebenfalls mit den im RealTime-Glo™ ermittelten Konzentrationen für 48h behandelt wurden. Hierbei wurde die Expression der Autophagie relevanten Proteine Beclin (zugehöriges Gen: *BECN1*), UVRAG (zugehöriges Gen: *UVRAG*), p62 (zugehöriges Gen: *SQSTM1*), LC3B (zugehöriges Gen: *MAP1LC3B*), AMPK α (zugehöriges Gen: *PRKAA1*, *PRKAA2*) und P-AMPK α (phosphorylierte und damit aktive Form von AMPK) untersucht. Durch die Behandlung mit dem Autophagie-Inhibitor Bafilomycin konnte durch einen Vergleich der Ergebnisse festgestellt werden, ob die Behandlung mit Atezolizumab, Panobinostat und Sorafenib die Autophagie in den behandelten Zelllinien bzw. Primärkulturen inhibiert oder induziert.

Für die vorliegende Arbeit wurde die Proteinexpression der oben genannten Proteine in der Zelllinie C643, den drei Primärkulturen des ATCs, und in der Kontrollzelllinie Nthy-ori 3-1 untersucht. Für alle Zelllinien (einschließlich der Kontrolle) konnte durch die Behandlung mit Atezolizumab, Panobinostat und Sorafenib eine ähnliche Beeinflussung der einzelnen Autophagie relevanten Proteine festgestellt werden. Zur Vereinfachung erfolgt im Folgenden nur die Darstellung der Western Blots der Primärkulturen Patient 2 und Patient 3, welche exemplarisch für die Ergebnisse aller untersuchten Zelllinien stehen. Die Ergebnisse der Zelllinien C643, Patient 1 und Nthy-ori 3-1 können dem Anhang entnommen werden.

Zur Darstellung der Resultate erfolgt zunächst die bildliche Darstellung der Western Blot Membranen (vgl. Abbildung 23 und Abbildung 25), anschließend erfolgt eine statistische Darstellung (s. hierzu Abbildung 24 und Abbildung 26). Die Farbintensität der Banden der untersuchten Proteine wurde hierzu über die Messung der Farbdichte mit der Farbintensität der β -Actin-/GAPDH-Bande verglichen (= Densitometrie), um so die Stärke der Expression mit der aufgetragenen Proteinmenge in Relation zu setzen. Anschließend erfolgte ein Vergleich zwischen den behandelten und den unbehandelten Zellen, um so ermitteln zu können, ob die Ergebnisse signifikant (* $p < 0,05$) sind.

Im Anschluss sind in Abbildung 27 und Abbildung 28 die Ergebnisse für das Protein PD-L1 dargestellt. Ziel war es, die basale Expression des Proteins in unbehandelten Kontrollzellen aller genutzten Zelllinien festzustellen und zu untersuchen, inwiefern die Behandlung mit dem

PD-L1-Inhibitor Atezolizumab, dem HDACi Panobinostat, dem TKI Sorafenib und dem Autophagie-Inhibitor Bafilomycin Einfluss auf die Expression des Proteins PD-L1 nimmt.

4.4.1 Expression der Autophagiemarker in der Primärkultur Patient 2

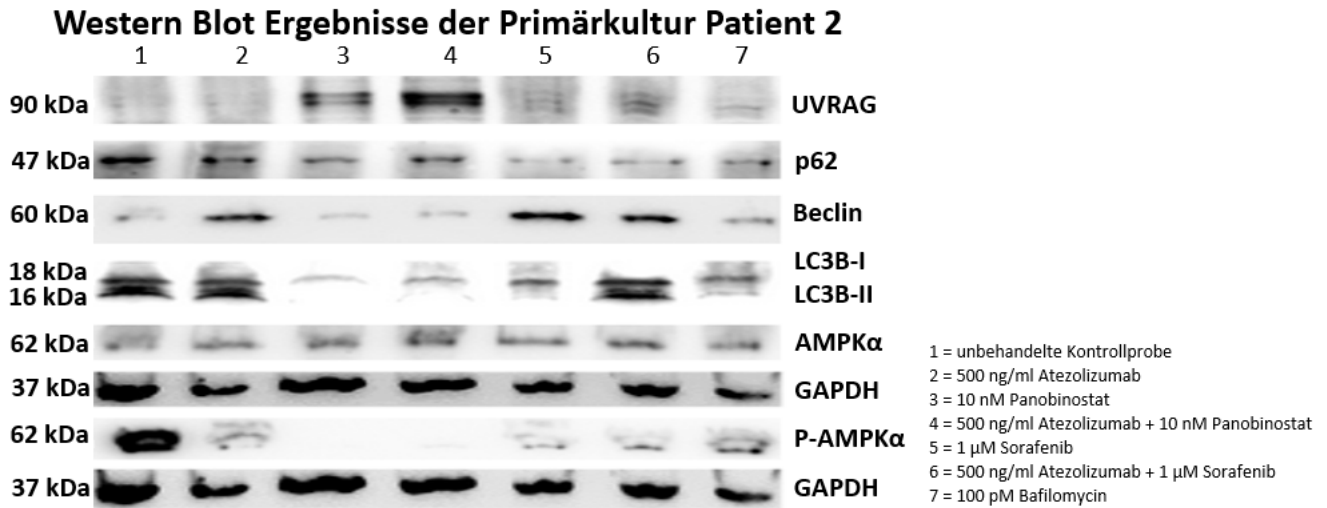


Abbildung 23: Western Blot Membranen der Primärkultur Patient 2: 1 = unbehandelte Kontrollprobe, 2 = 500 ng/ml Atezolizumab, 3 = 10 nM Panobinostat, 4 = 500 ng/ml Atezolizumab + 10 nM Panobinostat, 5 = 1 μM Sorafenib, 6 = 500 ng/ml Atezolizumab + 1 μM Sorafenib, 7 = 100 pM Bafilomycin. GAPDH (37 kDa) diente als Kontrolle.

Wie man Abbildung 23 und Abbildung 24 entnehmen kann, konnte bei der Primärkultur Patient 2 nach Behandlung mit Atezolizumab für nahezu alle Proteine eine erhöhte Expression festgestellt werden, mit Ausnahme von LC3B-II, welches nach Behandlung auf einem stabilen Level blieb.

Die Behandlungen mit Panobinostat und der Kombination aus Atezolizumab und Panobinostat führten zu untereinander vergleichbaren Ergebnissen. In beiden Fällen kam es zu einer erniedrigten Proteinexpression von LC3B-I, LC3B-II und P-AMPKα. Nach singulärer Behandlung mit Panobinostat war kein Proteinnachweis von LC3B-II mehr möglich. Durch die singuläre Behandlung mit Panobinostat konnte außerdem eine erniedrigte Expression von p62 erreicht werden, dieses Protein blieb nach der Kombinationsbehandlung auf einem stabilen Level. Ebenso verhielt es sich nach beiden Behandlungen für das Protein Beclin. AMPKα zeigte nach der Kombinationsbehandlung ebenfalls ein stabiles Proteinlevel, nach der singulären Behandlung mit Panobinostat war hingegen ein erhöhtes Proteinlevel nachweisbar. Einzig das Protein UVRAG zeigte nach beiden Behandlungen eine verstärkte Proteinexpression. Auffällig ist außerdem, dass die Expression der Proteine UVRAG, LC3B-I, LC3B-II und P-AMPKα nach singulärer Behandlung mit Panobinostat signifikant (*p < 0,05) niedriger ausfiel, als nach der Kombination mit Atezolizumab.

Auch die Ergebnisse der singulären Behandlung mit Sorafenib ähneln den Ergebnissen, die nach der Kombinationsbehandlung bestehend aus Atezolizumab und Sorafenib festgestellt werden konnten. In beiden Fällen konnten für die Proteine UVRAG, Beclin und AMPK α eine erhöhte Proteinexpression festgestellt werden, gleiches galt für das Protein LC3B-I nach kombinierter Behandlung. Hingegen zeigten LC3B-I und LC3B-II nach singulärer Behandlung mit Sorafenib eine erniedrigte Proteinexpression, wie auch p62 (nach singulärer und kombinierter Behandlung). P-AMPK α blieb nach beiden Behandlungen auf einem stabilen Proteinlevel, ebenso wie LC3B-II nach kombinierter Behandlung.

Die Behandlung mit Bafilomycin führte schlussendlich zu einer erhöhten Proteinexpression aller Proteine, mit Ausnahme des Proteins P-AMPK α , welches eine gleichbleibende Expression zeigte. Es ist außerdem auffällig, dass die Expression nahezu aller Proteine nach Behandlung mit Bafilomycin signifikant (* $p < 0,05$) höher war, als nach Behandlung mit Panobinostat (Ausnahmen: UVRAG und P-AMPK α).

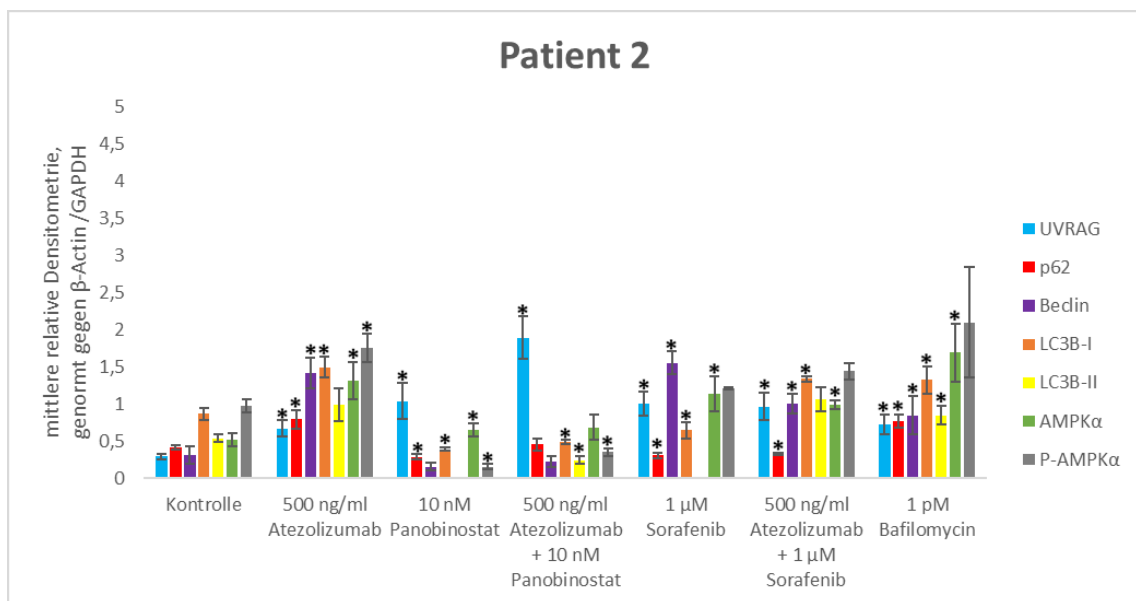


Abbildung 24: Densitometrie der Proteinexpression in der Primärkultur Patient 2: Die Zellen wurden für 48h mit Atezolizumab, Panobinostat oder Sorafenib bzw. deren Kombinationen behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung dreier unabhängiger Aufnahmen der Membranen. Die Farbintensität der Banden, welche den untersuchten Proteinen entsprechen, wurde relativ zu der Intensität von GAPDH gesetzt. Anschließend erfolgte der Vergleich zwischen der Proteinexpression der behandelten Zellen und der Proteinexpression der unbehandelten Kontrolle. *: Signifikante Werte ($p < 0,05$).

4.4.2 Expression der Autophagiemarker in der Primärkultur Patient 3

Western Blot Ergebnisse der Primärkultur Patient 3

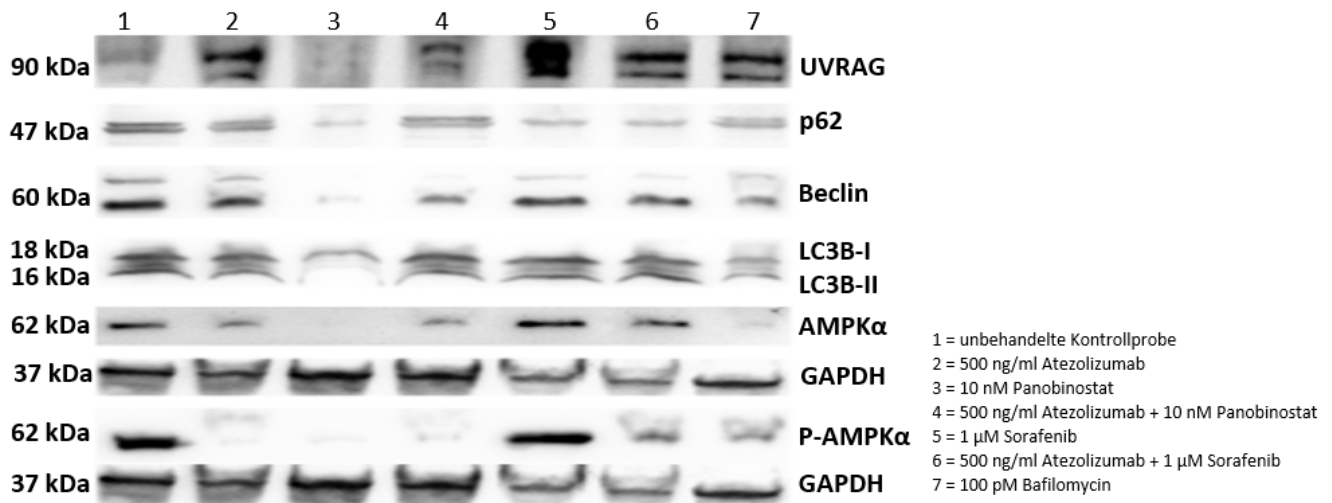


Abbildung 25: Western Blot Membranen der Primärkultur Patient 3: 1 = unbehandelte Kontrollprobe, 2 = 500 ng/ml Atezolizumab, 3 = 10 nM Panobinostat, 4 = 500 ng/ml Atezolizumab + 10 nM Panobinostat, 5 = 1 μM Sorafenib, 6 = 500 ng/ml Atezolizumab + 1 μM Sorafenib, 7 = 100 pM Bafilomycin. GAPDH (37 kDa) diente als Kontrolle.

Abbildung 25 und Abbildung 26 zeigen, dass eine Behandlung mit Atezolizumab in den Zellen der Primärkultur Patient 3, wie auch schon bei der Primärkultur Patient 2, eine Hochregulierung der Proteine UVRAG, p62, LC3B-I und AMPKα bewirkte, während hingegen die Proteine Beclin und LC3B-II auf einem stabilen Level blieben. Einzig für das Protein P-AMPKα zeigte sich eine verminderte Proteinexpression.

Die Behandlung mit Panobinostat führte, ebenso wie die Kombination mit Atezolizumab, zu einer Runterregulation nahezu aller untersuchten Proteine, wie es auch bei den Zellen des Patienten 2 beobachtet werden konnte. In allen Fällen wurde ein vermindertes Proteinlevel der Proteine LC3B-II und P-AMPKα beobachtet, LC3B-II war in den Zellen des Patienten 3 nach singulärer Behandlung mit Panobinostat nicht mehr nachweisbar. In der Primärkultur Patient 3 wurde außerdem, nach singulärer und kombinierter Behandlung, eine erniedrigte Expression von p62 und Beclin festgestellt. Die Proteinexpression von LC3B-I und AMPKα wurde hingegen durch die Behandlungen nicht signifikant ($*p < 0,05$) beeinflusst. Das Protein UVRAG war nach der singulären Behandlung mit Panobinostat nicht mehr nachweisbar, nach Kombinationsbehandlung zeigte sich hingegen ein stabiles Proteinlevel. Auffällig ist erneut, dass die Proteinexpression aller Proteine nach singulärer Behandlung mit Panobinostat signifikant ($*p < 0,05$) niedriger war, als nach der Kombinationsbehandlung mit Atezolizumab + Panobinostat.

Auch die singuläre Behandlung mit Sorafenib zeigte ähnliche Ergebnisse wie die Kombination aus Atezolizumab und Sorafenib. Wie schon bei der Primärkultur Patient 2, konnte nach singulärer und kombinierter Behandlung eine erhöhte Proteinexpression der Proteine UVRAG, Beclin und AMPK α festgestellt werden. Einzig für das Protein p62 konnte in beiden Primärkultur eine verminderte Proteinexpression nachgewiesen werden. Ausnahme war p62 in Patient 3 nach kombinierter Behandlung, hier zeigte sich das Proteinlevel stabil. Die Zellen der Primärkultur Patient 3 zeigten ansonsten, nach singulärer und nach kombinierter Behandlung, ein stabiles oder erhöhtes Proteinlevel. Ähnliches war auch in den Zellen des Patienten 2 beobachtet worden. In der Primärkultur Patient 3 konnte, neben UVRAG, Beclin und AMPK α , ein erhöhtes Proteinlevel der Proteine LC3B-I, P-AMPK α (nach singulärer) und LC3B-II (nach kombinierter Behandlung) festgestellt werden.

Abschließend führte die Behandlung mit Bafilomycin zu einem verminderten Proteinnachweis der Proteine p62, Beclin, LC3B-II und P-AMPK α , die Proteine LC3B-I und AMPK α blieben hingegen auf einem stabilen Level. Das Protein UVRAG zeigte, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, eine erhöhte Proteinexpression. Erneut ist zu bemerken, dass die Proteinexpression nach Behandlung mit Bafilomycin signifikant (* $p < 0,05$) höher ausfiel, als nach Behandlung mit Panobinostat (Ausnahme: LC3B-I).

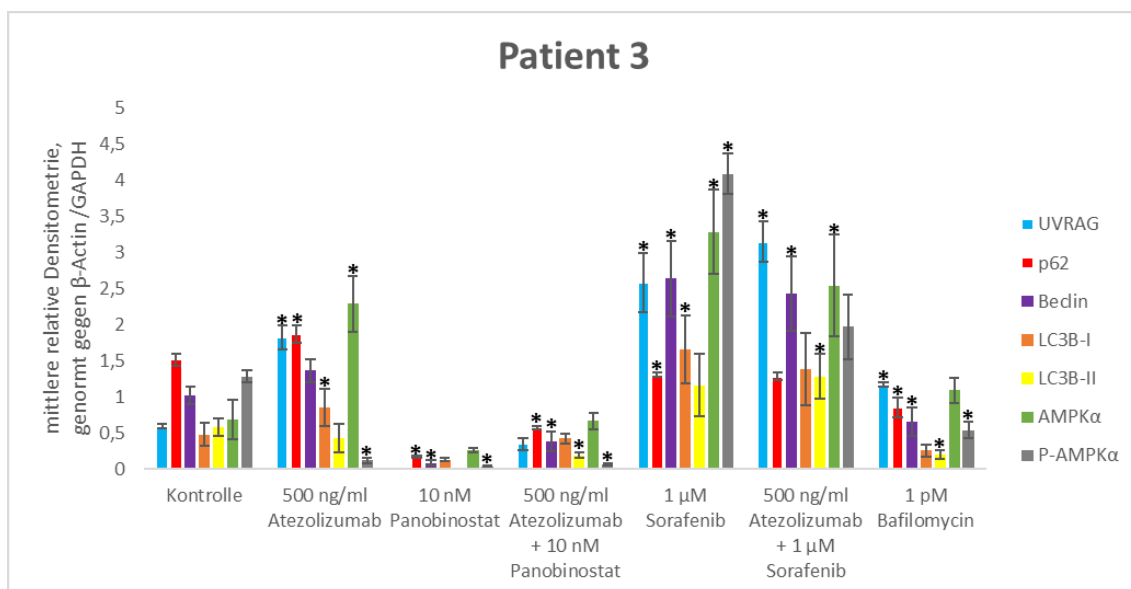


Abbildung 26: Densitometrie der Proteinexpression in der Primärkultur Patient 3: Die Zellen wurden für 48h mit Atezolizumab, Panobinostat oder Sorafenib bzw. deren Kombinationen behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung dreier unabhängiger Aufnahmen der Membranen. Die Farbintensität der Banden, welche den untersuchten Proteinen entsprechen, wurde relativ zu der Intensität von GAPDH gesetzt. Anschließend erfolgte der Vergleich zwischen der Proteinexpression der behandelten Zellen und der Proteinexpression der unbehandelten Kontrolle. *: Signifikante Werte ($p < 0,05$).

4.4.3 Expression des Proteins PD-L1

Nach Untersuchung der für die Autophagie relevanten Proteine erfolgte abschließend noch die Untersuchung des Proteins PD-L1, um festzustellen, inwiefern die basale PD-L1-Expression von den Behandlungen mit Atezolizumab, Panobinostat, Sorafenib und den Kombinationen dieser Substanzen beeinflusst wird. Die Darstellung der Proteinexpression von PD-L1 erfolgt in Abbildung 27 und Abbildung 28.

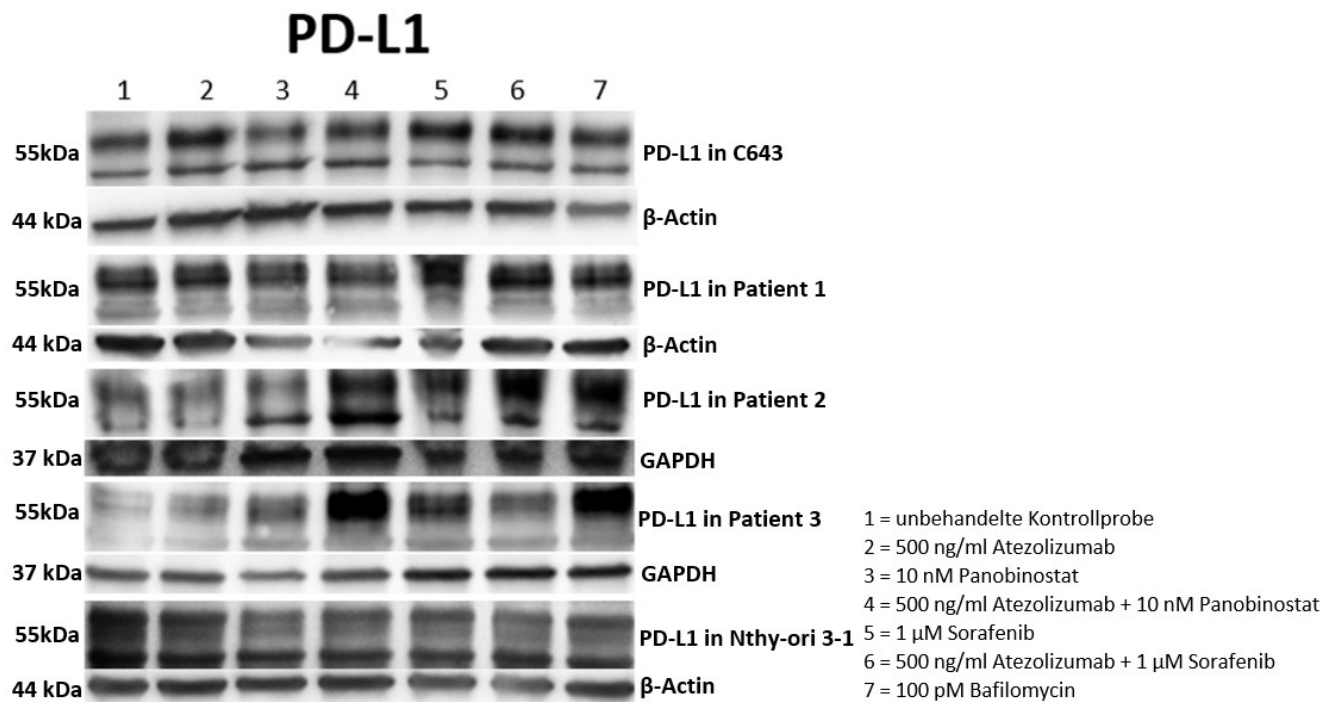


Abbildung 27: Western Blot Membranen der Expression des Proteins PD-L1: 1 = unbehandelte Kontrollprobe, 2 = 500 ng/ml Atezolizumab, 3 = 10 nM Panobinostat, 4 = 500 ng/ml Atezolizumab + 10 nM Panobinostat, 5 = 1 μM Sorafenib, 6 = 500 ng/ml Atezolizumab + 1 μM Sorafenib, 7 = 100 pM Bafilomycin. Dargestellt sind die Ergebnisse für das Protein PD-L1 (55 kDa). β-Actin (44 kDa) bzw. GAPDH (37 kDa) dienten als Kontrolle.

In allen untersuchten Zelllinien konnte in der unbehandelten Kontrolle die Expression von PD-L1 nachgewiesen werden.

Die Behandlung mit 500 ng/ml Atezolizumab beeinflusste nur in der Primärkultur des Patienten 1 die basale Expression von PD-L1 und führte zu einer Erhöhung des Proteinlevels. In allen anderen Zelllinien/Primärkulturen blieb das Proteinlevel stabil. Gleiche Ergebnisse zeigten sich auch nach der Behandlung mit 10 nM Panobinostat. Die Kombination der beiden bereits genannten Substanzen hingegen führte zu einer Erhöhung der Expression des Proteins PD-L1 in den Primärkultur Patient 1 und 3, während die Expression in den Zellen von C643, Patient 2 und Nthy-ori 3-1 stabil blieb.

Die Behandlung mit 1 μM Sorafenib führte zu einem erhöhten Proteinlevel von PD-L1 in den Zellen der Primärkultur des Patienten 1, gleiches war nach der Kombination mit 500 ng/ml Atezolizumab festzustellen. Hingegen zeigte die Primärkultur Patient 3 nach der kombinierten Behandlung eine Verringerung der Expression. In den etablierten Zelllinien und in der Primärkultur des Patienten 2 wurde die Expression nicht beeinflusst.

Bafilomycin konnte in der Zelllinie C643 und in der Primärkultur Patient 1 eine vermehrte Expression des Proteins PD-L1 bewirken, hingegen blieb die Expression in den Primärkulturen Patient 2, Patient 3 und in der Zelllinie Nthy-ori 3-1 unbeeinflusst.

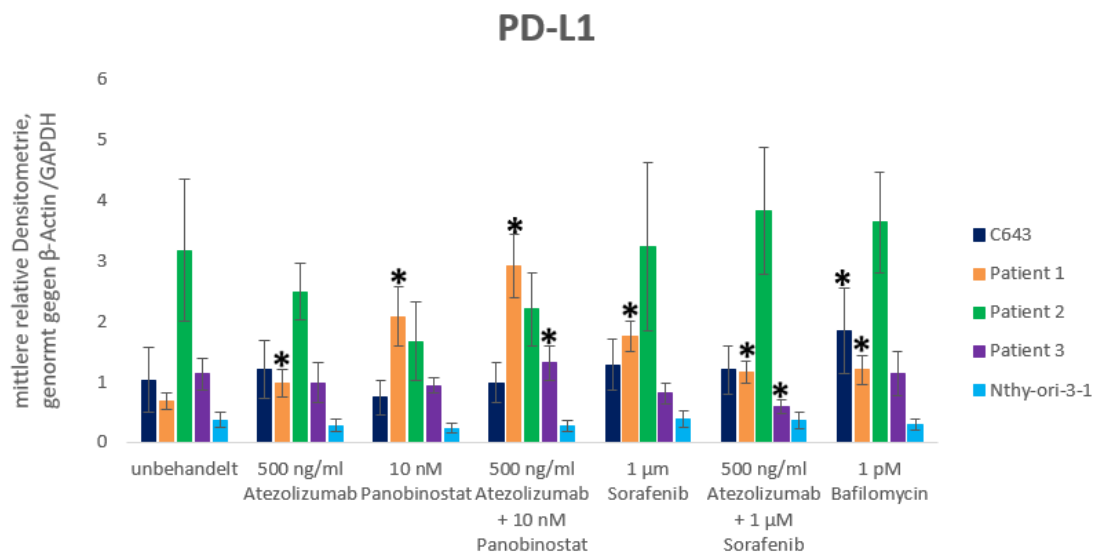


Abbildung 28: Densitometrie der Proteinexpression des Proteins PD-L1: Die Zellen aller untersuchten Zelllinien/Primärkulturen wurden für 48h mit Atezolizumab, Panobinostat oder Sorafenib bzw. deren Kombinationen behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung dreier unabhängiger Aufnahmen der Membranen. Die Farbintensität der Banden, welche PD-L1 entsprechen, wurde relativ zu der Intensität von β -Actin bzw. GAPDH gesetzt. Anschließend erfolgte der Vergleich zwischen der Proteinexpression der behandelten Zellen und der Proteinexpression der unbehandelten Kontrolle. *: Signifikante Werte ($p < 0,05$).

5 Diskussion

Die Entdeckung verschiedener Mutationen und Tumormarker, welche Signalwege in den Tumorzellen des ATCs beeinflussen können, wie auch die Etablierung der Immunmodulation als Therapieansatz, ermöglichen neue Konzepte zur Entwicklung einer gezielten und effektiven Therapie. In diesem Zusammenhang konnte durch die Arbeit von Wächter et al. bereits demonstriert werden, dass die einzelnen Primärkulturen verschiedener ATC-Patienten sehr unterschiedlich auf die Behandlung mit bestimmten Therapeutika reagieren und so die Entwicklung individueller Therapiekonzepte ein wichtiger Ansatz zur Behandlung des ATCs darstellt (Wächter et al. 2018b). Diese Ergebnisse können durch die hier vorliegende Arbeit weiter bestätigt werden.

In den letzten Jahren gab es bereits viele neue Ansätze zur Behandlung des ATCs. Einen vielversprechenden neuen Therapieansatz stellen hierbei Multi-Kinase-Inhibitoren dar. So konnte zum Beispiel der TKI Lenvatinib in klinischen Studien eine effektive Wirksamkeit mit gut tolerierbaren Nebenwirkungen bei der Behandlung von ATC-Patienten aufweisen (Schlumberger et al. 2015). Auch für Sorafenib konnte eine Aktivität gegen Zellen des ATCs *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden (Leo et al. 2020). Sorafenib ist in der Lage, die Proliferation der Zellen in verschiedenen Zelllinien des ATCS zu hemmen und das Apoptose-Level zu erhöhen (Kim et al. 2007).

Einen weiteren wichtigen Ansatz stellt die Therapie mit HDACis dar, welche bisher allerdings nur *in vitro* untersucht wurde. Die Behandlung von Zellen des ATCs mit HDACis führt hierbei durch epigenetische Modifikationen zu einer Re-Expression des *SLC5A5* Transkripts und dem zugehörigen NIS-Protein und damit zu einer erhöhten Aufnahme von radioaktivem Iod (Wächter et al. 2018a).

Neben den bereits genannten Therapieprinzipien spielt aber auch die Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren eine zunehmend wichtige Rolle. In diesem Zusammenhang haben sich vor allem PD-1/PD-L1-Inhibitoren hervorgetan, welche als alleinige Therapie oder in Kombination mit TKIs oder *BRAF*-Inhibitoren einen vielversprechenden Therapieansatz darstellen (Brauner et al. 2016; Ferrari et al. 2020; Iyer et al. 2018). Hierbei konnte sich bereits Pembrolizumab als wichtige therapeutische Substanz hervortun, wobei besonders die Kombination von Pembrolizumab mit einem TKI (zum Beispiel Lenvatinib) eine effektive Therapie des ATCs zu ermöglichen scheint (Dierks et al. 2021; Iyer et al. 2018). Die genauen molekularen Mechanismen sind allerdings bisher nicht bekannt.

In der vorliegenden Studie wurde untersucht, inwiefern die Behandlung mit dem HDACi Panobinostat, dem TKI Sorafenib und dem PD-L1-Inhibitor Atezolizumab die Zellviabilität von Zellen des ATCs beeinflusst. Zur Messung der Zellviabilität wurde hierbei eine Echtzeitanalyse via RealTime-Glo™ genutzt. Da das Lumineszenzsignal mit der Nummer vitaler Zellen korreliert, ist diese Methode laut Hersteller gut für Studien zur Zytotoxizität verschiedener Substanzen geeignet (RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay Technical Manual 2022). Sie wurde deshalb beispielsweise auch von Weicht et al. genutzt, welche unter anderem die Viabilität von Osteosarkomzellen nach Behandlung mit einem Ornithin-Decarboxylase-Hemmer untersuchten (Weicht et al. 2018).

Die Messung der Zellviabilität wurde anschließend für eine Kombinationsbehandlung, bestehend aus Atezolizumab und Panobinostat bzw. Atezolizumab und Sorafenib, durchgeführt. Außerdem wurde beobachtet, inwiefern die oben genannten Therapeutika bzw. deren Kombinationen die Ultrastruktur von Sphäroiden des ATCs beeinflussen können. Hiernach erfolgte die Analyse verschiedener Autophagie-relevanter Marker auf Gen- und Proteinebene. Von besonderem Interesse war in diesem Zusammenhang, inwiefern die oben genannten Behandlungen die Autophagie in Zellen des ATCs beeinflussen können und ob diese Beeinflussung einen potenziellen Therapieansatz bei der individualisierten Behandlung des ATCs darstellt. Außerdem galt es festzustellen, inwiefern durch eine Kombinationstherapie eine Beeinflussung der Wirksamkeit der einzelnen therapeutischen Substanzen möglich ist. Für die genannten Untersuchungen standen die etablierte ATC-Zelllinie C643, drei ATC-Primärkulturen und die etablierte, humane Thyreozyten-Zelllinie Nthy-ori 3-1 zur Verfügung, welche als Kontrolle diente.

5.1 Beeinflussung der Zellviabilität durch die zielgerichtete Behandlung mit PD-L1-Inhibitoren, HDACis und TKIs und durch die synergetische Wirkung einer Kombinationstherapie

In der vorliegenden Arbeit wurde die Beeinflussung der Zellviabilität durch den PD-L1-Inhibitor Atezolizumab, den HDACi Panobinostat und den TKI Sorafenib in Mono- und Kombinationstherapie an Sphäroiden der etablierten ATC-Zelllinie C643 untersucht.

Hierbei konnte herausgefunden werden, dass Atezolizumab ab einer Konzentration von 1 µg/ml die Zellviabilität schon nach kürzester Zeit stark beeinflusst, wobei eine genaue Ursache aus den vorliegenden Daten nicht ersichtlich ist. Am ehesten kann von einer ausgeprägten zytotoxischen Wirkung der Substanz auf die Sphäroide ausgegangen werden. Es konnte zum Beispiel auch in Zellen des Osteosarkoms demonstriert werden, dass Atezolizumab, abhängig von der eingesetzten Dosis, die Zellproliferation bzw. –viabilität der

untersuchten Zellen unterschiedlich stark beeinflusst (Liu et al. 2021). Eine zielführende Isolierung und Untersuchung von mRNA und Proteinen wäre bei einer derart negativen Beeinflussung der Zellviabilität nicht möglich gewesen, sodass für die vorliegenden Experimente eine Konzentration von 500 ng/ml Atezolizumab gewählt wurde, welche ebenfalls zu einer leichten Reduzierung der Viabilität führte.

Der HDACi Panobinostat hingegen zeigte schon bei einer Konzentration von 10 nM eine signifikante ($p < 0,05$) Reduktion der Zellviabilität. Des Weiteren konnte eine deutliche Beeinträchtigung der Ultrastruktur der Sphäroide von C643 beobachtet werden. Dies bestätigt die Beobachtung von Wächter et al., dass Panobinostat schon bei einer Konzentration von 10 nM eine sehr starke Wirkpotenz hat, welche im Vergleich mit anderen HDACis am höchsten ausfiel (Wächter et al. 2018a; Wächter et al. 2018b). Aber auch bei anderen Tumoren konnte eine effektive Hemmung des Zellwachstums durch Panobinostat festgestellt werden, so zum Beispiel in Zellen des Synovialsarkoms und Chondrosarkoms oder in Zelllinien des kolorektalen Karzinoms (Bernhart et al. 2017; Wilson et al. 2013).

Die Kombination aus Atezolizumab und Panobinostat zeigte zwar im Vergleich zur singulären Behandlung mit Panobinostat keinen signifikanten ($p < 0,05$) Unterschied bei der Reduktion der Zellviabilität, sehr wohl aber im Vergleich zur singulären Behandlung mit Atezolizumab. Mit Hilfe der Berechnung des Kombinationsindexes konnte außerdem eine synergetische Wirkung der beiden Substanzen nachgewiesen werden (s. 4.1.3). Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die dreidimensionale Struktur der Sphäroide von C643 durch die kombinierte Behandlung mit Atezolizumab und Panobinostat stark angegriffen wurde, während dies nach der singulären Behandlung mit Atezolizumab nicht der Fall war. Zu den genannten Ergebnissen passt die von Woods et al. in Melanom-Zellen getätigte Beobachtung, dass HDACis dazu in der Lage sind, PD-L1 hochzuregulieren. Außerdem führte in dieser Arbeit die Kombination eines HDACis mit einer PD-1-Blockade zu einer verstärkten Wirkung der beiden Substrate und auf diese Weise zu einer verzögerten Tumorprogression und einem verlängertem Gesamtüberleben im Mausmodell (Woods et al. 2015). Eine Kombination aus epigenetisch-basierten Therapien mit einer immunmodulierenden Therapie könnte also ein vielversprechender Ansatz sein, um einer vorbestehende oder sich entwickelnde Resistenz bei der Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren entgegen zu wirken (Perrier et al. 2020). Besonders eine Kombination aus HDACis mit anderen Therapeutika stellt also einen vielversprechenden neuen Ansatz bei der klinischen Behandlung von Karzinomen dar (Bose et al. 2014), sodass dieser Ansatz auch bei der Untersuchung neuer Kombinationstherapien für das ATC berücksichtigt werden sollte.

Der TKI Sorafenib hingegen zeigte ab einer Konzentration von 1 μM eine Beeinflussung der Zellviabilität der Sphäroide von C643, es musste also eine deutlich höhere Konzentration gewählt werden, als bei der Behandlung mit Panobinostat. Dies passt zu der Beobachtung von Wächter et al., dass Panobinostat verglichen mit TKIs eine höhere Wirkpotenz bei der Behandlung von ATCs zeigt (Wächter et al. 2018b). In dieser Studie konnte erst bei einer Konzentration von 100 μM ein zytotoxischer Effekt in allen untersuchten ATC-Primärkulturen nachgewiesen werden, allerdings erfolgte hier die Untersuchung der Viabilität mit Hilfe des xCELLigence RTCA SP system (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) an Monolayern der genutzten Primärkulturen, sodass ein direkter Vergleich der Ergebnisse nur eingeschränkt möglich ist (Wächter et al. 2018b). Passend zu der eher geringen Beeinflussung der Viabilität blieb nach der Behandlung mit 1 μM Sorafenib die Ultrastruktur der Sphäroide und die äußere Membran intakt. Zwar konnte nachgewiesen werden, dass Sorafenib in Zellen des ATCs einen Zellzyklus-Arrest bewirken und das Wachstum endothelialer Zellen über verschiedene humorale Faktoren inhibieren kann (Broecker-Preuss et al. 2015; Ishihara et al. 2019), klinische Phase-II-Studien zeigten jedoch bisher keinen klaren therapeutischen Effekt bei der Behandlung des ATCs (Savvides et al. 2013). Nach aktueller Studienlage scheint die alleinige Therapie mit Sorafenib also nur eine untergeordnete Rolle bei der Behandlung des ATCs zu spielen, jedoch stellt eine Kombination mit anderen therapeutischen Substanzen möglicherweise einen effizienten Therapieansatz dar (Leo et al. 2020).

Hierzu passend zeigte die Kombination aus 500 ng/ml Atezolizumab und 1 μM Sorafenib zwar eine geringe, aber signifikante ($p < 0,05$) Reduktion der Zellviabilität. Die Morphologie der Sphäroide konnte hingegen nicht beeinflusst werden, so blieb zum Beispiel die Außenmembran auch nach einer Behandlungsdauer von 96 Stunden weiter intakt. Wie im vorherigen Absatz bereits beschrieben, konnten Wächter et al. bei ihren Untersuchungen erst bei einer Konzentration von 100 μM Sorafenib einen zytotoxischen Effekt auf Zellen des ATCs feststellen (Wächter et al. 2018b). Hieraus könnte man die Hypothese ableiten, dass eine Konzentration von 1 μM Sorafenib, auch in Kombination mit Atezolizumab, nicht ausreicht, um die Morphologie der Sphäroide zu beeinflussen. Ob diese an Monolayern getätigte Beobachtung auf Sphäroide übertragen werden kann und ob bei einer höheren Konzentration eine Beeinflussung der Ultrastruktur des Sphäroids möglich wäre, könnte in weiteren Experimenten untersucht werden.

Zu bemerken ist allerdings, dass mit Hilfe des Kombinationsindex eine synergetische Wirkung der genutzten Substanzen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse passen zu der tierexperimentellen Studie von Gunda et al., welche bei der Therapie des ATCs einen synergetischen Effekt bei der Kombination des Multikinase-Inhibitors Lenvatinib mit einer Anti-

PD-1/PD-L1-Therapie feststellen konnte. Dieser beruhte auf einer Beeinflussung der Immunzellen in der Mikroumgebung des Tumors und führte sowohl zu einer erheblichen Tumorreduktion, wie auch zu einer Verdopplung des Überlebens der untersuchten Mäuse (Gunda et al. 2019). Aber nicht nur beim ATC konnte eine antitumorale Aktivität durch die Kombination von Lenvatinib mit einem PD-1/PDL-1-Inhibitor festgestellt werden, sondern zum Beispiel auch bei der Therapie des fortgeschrittenen Endometriumkarzinoms. Hier zeigte sich in einer Phase-Ib/Phase-II-Studie von Makker et al. eine gute antitumorale Aktivität bei Patientinnen mit einem fortgeschrittenen Endometriumkarzinom, diese Ergebnisse werden in einer aktuell laufenden Phase-III-Studien weiter untersucht (Makker et al. 2020). Alles in allem stellt also auch die Kombination aus TKIs mit PD-1/PD-L1-Inhibitoren einen vielversprechenden Ansatz bei der Therapie des ATCS dar, welcher auch schon in klinischen Studien evaluiert wurde, zum Beispiel von Iyer et al. oder Dierks et al. (Dierks et al. 2021; Iyer et al. 2018) (vgl. 2.3.3).

Wie bereits unter 2.1.4 dargestellt, sollte bei jedem ATC-Patienten eine molekulargenetische Untersuchung des Tumors erfolgen, um die Möglichkeiten für individuelle/zielgerichtete Therapien zu prüfen (Bible et al. 2021). Hierbei ergibt sich unter Berücksichtigung aktueller Daten, welche vor allem in Form von Fallberichten und kleinen Fallserien vorliegen, ein neuer und wichtiger Stellenwert der zielgerichteten Therapien auch als neoadjuvante Therapiekonzepte. Wegweisende Arbeiten wurden unter anderem von Wang et al. und Cabanillas et al. (vgl. 2.3.3) veröffentlicht. Auch McCrary et al. untersuchten vier ATC Patienten mit lokoregional fortgeschrittener Erkrankung, zwei der Patienten zeigten eine *BRAFV600E* Mutation. Diese Patienten erhielten eine neoadjuvante Therapie mit Dabrafenib und Trametinib, während hingegen die Patienten, bei welchen ein *BRAFV600E*-Wildtyp vorlag, eine neoadjuvante Therapie mit Pembrolizumab und Lenvatinib erhielten. Alle Patienten zeigten ein klinisches Ansprechen auf die Therapie mit einer Reduktion der Tumorlast, bei einem Patienten konnte durch die neoadjuvante Therapie ein primär irresektables Karzinom vollständig entfernt werden (McCrary et al. 2022). Der mögliche Einsatz multimodaler, zielgerichteter Therapiekonzepte als neoadjuvante Therapie stellt somit einen wichtigen Ansatz zur Behandlung des ATCs dar und sollte folglich in weiteren klinischen Studien untersucht werden.

5.2 Die Rolle der Autophagie bei der Reduktion der Zellviabilität und sich daraus ergebende Therapieansätze

Ziel dieser Studie war es, die molekularen Mechanismen in Zellen des ATCs zu untersuchen, die durch die Behandlung mit Atezolizumab, Panobinostat und Sorafenib beeinflusst werden. Ein besonderes Augenmerk wurde hierbei auf die Beeinflussung der Autophagie gelegt.

Der Stellenwert der Autophagie als therapeutischer Ansatzpunkt zur Behandlung des ATCs ist bisher nicht abschließend geklärt. Allerdings wurde bereits herausgefunden, dass die Expression von Autophagie-relevanten Proteinen abhängig ist vom vorliegenden Subtyp des SD-CAs - dies wiederum impliziert, dass die Regulation der Autophagie ein potenzielles therapeutisches Ziel bei der Behandlung des ATCs darstellt (Kim et al. 2017). So wies zum Beispiel die Arbeitsgruppe von Milošević et al. nach, dass eine Therapie mit dem dualen mTOR Kinase-Inhibitor Vistusertib Zellen des ATCs für eine Therapie mit dem Zytostatikum Paclitaxel sensibilisieren konnte, indem die Proliferation der Zellen gehemmt und die Autophagie induziert wurde (Milošević et al. 2018). Im Gegensatz hierzu zeigte die Arbeitsgruppe von Feng et al., dass die Inhibition der Autophagie den antitumoralen Effekt einer Therapie mit dem VEGFR2-Inhibitor Apatinib verstärkte (Feng et al. 2018). Dies verdeutlicht erneut die ggf. zweischneidige Doppelrolle der Autophagie bei der Therapie verschiedener Tumoren (vgl. 2.4.1).

Dass die Autophagie in dieser Studie eine wichtige Rolle bei der Reduktion der Zellviabilität der Zellen des ATCs spielt, konnte durch die signifikante ($p < 0,05$) Überexpression der Autophagie-relevanten Gene nach der Behandlung mit Atezolizumab, Panobinostat und Sorafenib festgestellt werden. Die genau Wirkweise und die gegenseitige Beeinflussung der einzelnen Therapeutika konnte durch die Untersuchung der Autophagie-Marker auf Proteinebene weiter aufgeschlüsselt werden.

Besonders bemerkenswert ist hierbei die Beeinflussung der Autophagie durch die singuläre Behandlung mit 10 nM Panobinostat. Diese führte sowohl bei den etablierten Zelllinien C643 (ATC) und Nthy-ori 3-1 (follikuläre epitheliale Schilddrüsenzellen), als auch bei den Zellen der drei Primärkulturen, zu einer signifikanten Reduktion des Proteinlevels nahezu aller untersuchten Autophagiemarker, wobei teilweise gar kein Nachweis des zu untersuchenden Proteins mehr möglich war. Gleichzeitig kam es nach der singulären Behandlung mit Panobinostat zu einer Überexpression nahezu aller Autophagie-relevanten Gene (Ausnahme: BECN1). Die Ergebnisse deuten auf einen stark wirksamen Autophagie-Prozess hin, welcher den Zelltod der betroffenen Zellen durch eine vorherige Therapie mit dem HDACi Panobinostat induzieren kann. Dieser Effekt von Panobinostat konnte bereits für andere Tumorzellen beschrieben werden - unter anderem für Zellen des kolorektalen Karzinoms (Gandesiri et al. 2012), des hepatozellulären Karzinoms (Di Fazio et al. 2016), der neuroendokrinen Tumoren des Pankreas (Matrood et al. 2020), des Osteosarkoms (Wirries et al. 2018) und für Zellen des Nebennierenrindenzellkarzinoms (Di Fazio et al. 2022).

Durch die Behandlung mit Atezolizumab oder Sorafenib bzw. mit einer Kombination der Substanzen konnte hingegen keine derart ausgeprägte Induktion der Autophagie beobachtet werden. Bei den Ergebnissen der qRT-PCR zeigte sich, dass nach einer Kombinationsbehandlung mit Atezolizumab und Sorafenib nahezu alle Autophagie-relevanten Gene eine stabile Expression aufwiesen (Ausnahme: TFEB). Nach der Behandlung mit Atezolizumab zeigten des Weiteren die Gene BECN1, MAP1LC3B, PRKAA1 und PRKAA2 eine stabile Expression. Vergleicht man außerdem das nach den Behandlungen ermittelte Proteinlevel mit der Proteinexpression, die nach der Behandlung mit dem Autophagie-Inhibitor Bafilomycin detektiert werden konnte, fällt auf, dass eine gewisse Vergleichbarkeit der Expression möglich ist. Diese lag zumeist signifikant höher als nach der Behandlung mit Panobinostat. Auch diese Beobachtung unterstreicht den starken Effekt von Panobinostat bei der Induktion der Autophagie.

In anderen Tumorzellen konnte hingegen eine Induktion der Autophagie nach der Behandlung mit TKIs festgestellt werden, unter anderem in den Zellen des NSCLCs. Hier führte die gezielte Therapie mit EGFR-TKIs zu einem erhöhten Autophagie-Level, welches wiederum einen Schutzmechanismus darstellte, um das Überleben der Tumorzellen zu sichern. Über eine Inhibition der Autophagie wurde wiederum der wachstumshemmende Effekt der TKIs wieder verstärkt (Han et al. 2011). Ähnliches konnte bei der Behandlung von Zellen des HCCs festgestellt werden, wo die Therapie mit Sorafenib über das Oberflächenmolekül CD24 zu einer Aktivierung der Autophagie und damit zu einer Resistenz gegenüber der Therapie mit dem TKI führte (Lu et al. 2018). Auch die Blockade des PD-1/PD-L1 Signalweges konnte das Autophagielevel in Tumorzellen erhöhen, was wiederum, zum Beispiel über das Recycling von Nährstoffen, das Überleben der Tumorzellen sichern kann (Hanahan und Weinberg 2011; Robainas et al. 2017). Hieraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass die Kombinationen eines Autophagieinhibitors mit einem PD-1/PD-L1-Inhibitor einen neuen Therapieansatz bei der Behandlung verschiedener Tumoren darstellen könnte (Robainas et al. 2017; Starobinets et al. 2016). Inwiefern ähnliche Beobachtungen auch bei der Behandlung des ATCs gemacht werden können, kann nur durch weitere Grundlagenforschung bezüglich der Interaktion zwischen Autophagie und der Therapie mit TKIs und Immunmodulatoren festgestellt werden.

Neben den Effekten der singulären Behandlung mit Atezolizumab und Panobinostat, welche in den vorherigen Absätzen bereits dargelegt wurden, wurde auch für diese beiden Substanzen die Auswirkung einer Kombinationstherapie auf die Expression der Autophagie-relevanten Gene und Proteine untersucht. Besonders auffällig war hierbei die Beobachtung, dass nach der Behandlung der ATC-Zellen mit der Kombination aus Atezolizumab und Panobinostat bestimmte Proteine, deren Nachweis nach der singulären Behandlung mit Panobinostat nicht

mehr gelang, nach der Kombinationsbehandlung wieder nachgewiesen werden konnten (Beispiele: LC3B-I in Patient 1, LC3B-II in Patient 1, 2 und 3, AMPK α in Patient 1). Der Großteil der anderen Proteinmarker zeigte nach der Kombinationsbehandlung aus Atezolizumab und Panobinostat ein höheres Proteinlevel, als es nach der singulären Behandlung mit Panobinostat der Fall gewesen war. Hingegen konnte, im Vergleich zur singulären Behandlung mit Atezolizumab, nach der Kombinationsbehandlung oftmals eine niedrigere Expression der Autophagie-relevanten Proteine festgestellt werden. Gleichzeitig fällt auf Genebene auf, dass nach einer Kombinationsbehandlung fast alle Autophagie-relevanten Gene auf einem stabilen Level blieben (Ausnahme: TFEB, PRKAA2). Aus diesen Daten kann folglich geschlossen werden, dass Atezolizumab den Autophagie-induzierenden Effekt von Panobinostat auf eine hemmende Weise beeinflusst. Trotz dieser inhibierenden Wirkung auf die Autophagie konnte in der Messung der Zellviabilität via RealTime-Glo™ eine deutliche Einschränkung der Zellviabilität nach der kombinierten Behandlung mit Atezolizumab und Panobinostat festgestellt werden. Auch die dreidimensionale Struktur der Sphäroide zeigte eine deutliche Verdunkelung der zentralen Zone des Sphäroids und eine Verkleinerung des Durchmessers, dies deutet ebenfalls auf eine Reduktion der Zellviabilität hin. Man kann also die Hypothese aufstellen, dass der Autophagie-induzierende Effekt von Panobinostat den hier festgestellten Autophagie-inhibierenden Effekt von Atezolizumab überwinden kann. Dies wiederum führt, neben anderen Mechanismen, zu einer stark ausgeprägten Reduktion der Zellviabilität der untersuchten ATC-Zellen. Die Kombination aus einem HDACi mit einem PD-L1-Inhibitor stellt also einen potenziellen Ansatz bei der Therapie des ATCs dar. Die aufgeführten Beobachtungen bestätigen erneut die Wichtigkeit kombinierter und individualisierter Therapieansätze, welche dazu in der Lage sind, die molekularen Mechanismen der Tumorzellen zu beeinflussen. Außerdem bestätigen diese Ergebnisse HDACis als einen wichtigen und vor allem in Kombination wirksamen Therapieansatz.

5.3 Reduktion der Zellviabilität über ein Zusammenspiel von Autophagie und Apoptose

Wie im vorherigen Absatz aufgeführt, führte die Behandlung mit Atezolizumab und Sorafenib nicht zu einer Induktion der Autophagie. Trotzdem konnte nach der Behandlung mit den beiden Substanzen eine geringe, aber signifikante ($p < 0,05$) Reduktion der Zellviabilität nachgewiesen werden. Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür wäre eine durch die Behandlung ausgelöste Induktion der Apoptose.

Der aktuellen Studienlage ist zu entnehmen, dass Sorafenib in anderen soliden Tumoren, wie zum Beispiel dem HCC und dem Nierenzellkarzinom, eine Inhibition der Tumorzellproliferation

über eine Aktivierung der Apoptose bewirkte (Chang et al. 2007; Llovet et al. 2008; Liu et al. 2006). Und auch bei der Behandlung von Zellen des ATCs konnte durch den Einsatz verschiedener TKIs ein erhöhtes Apoptose-Level beobachtet werden, welches zu einer Verminderung der Zellproliferation und zu einer Reduktion der Tumormasse führte (Ferrari et al. 2018; Ferrari et al. 2019; Jin et al. 2017).

Bezüglich Atezolizumab lässt sich festhalten, dass zum Beispiel in Zellen des Osteosarkoms ein Apoptose-induzierender Effekt nach der Behandlung mit dem PD-L1-Inhibitor Atezolizumab beobachtet wurde. Hierbei fand eine direkte, dosisabhängige Induktion der Apoptose in den Zellen des Osteosarkoms statt (Liu et al. 2021).

Untersuchungen von Wächter et al., welche sich aktuell noch unter Review befinden, zeigen, dass Atezolizumab und Sorafenib auch in der etablierten ATC-Zelllinie C643 eine Expression der aktiven Form der Caspasen 8 und 3 induzieren konnten. Panobinostat hingegen bewirkte eine Suppression der beiden Caspasen, ohne jedoch ihre Aktivität einzuschränken, welche auf einem stabilen Level blieb. Außerdem konnte, bezogen auf das Zusammenspiel zwischen Apoptose und Autophagie, bereits demonstriert werden, dass der Autophagie-Prozess durch Caspasen inhibiert werden kann (Tsapras und Nezis 2017). Dies könnte eine Begründung für die Ausbleibende Induktion der Autophagie nach Behandlung mit Atezolizumab und Sorafenib darstellen, welche in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde.

Des Weiteren unterstreichen die aufgeführten Daten das hohe Potenzial einer Kombinationstherapie aus Atezolizumab und Panobinostat. Panobinostat kann in Kombination den inhibitorischen Effekt von Atezolizumab auf die Autophagie überwinden, gleichzeitig kann durch die Kombination die Aktivität der Caspasen gesteigert werden. Dieser Mechanismen wiederum kann die Proliferation und Viabilität der Tumorzellen reduzieren.

Betreff eines Zusammenspiels zwischen Apoptose und Autophagie wurden bereits verschiedene Erkenntnisse erlangt. Allgemein gesprochen stellt sich dieses Zusammenspiel als sehr komplex dar, da Autophagie, wie unter 2.4 aufgeführt, zum einen ein wichtiger Mechanismus ist, um in stressigen Situationen das Überleben der Zellen zu sichern (und hierbei die Apoptose zu unterdrücken), zum anderen stellt Autophagie aber auch einen alternativen Weg des Zelltods dar (Maiuri et al. 2007).

Wie in diesem Kapitel bereits erwähnt, konnte in Zellen des Osteosarkoms eine dosisabhängige Aktivierung der Apoptose durch Atezolizumab in Osteosarkom-Zellen nachgewiesen werden (Liu et al. 2021). Gleichzeitig führte in dieser Arbeit die Behandlung mit Atezolizumab zu einer Aktivierung der Autophagie, wobei diese allerdings einen Schutzmechanismus für die

Tumorzellen darzustellen schien und den proapoptotischen Effekt von Atezolizumab inhibierte. Eine Blockade der Autophagie führte hingegen zu einer Steigerung des proapoptotischen Effekts des verwendeten PD-L1-Inhibitors (Liu et al. 2021). Ähnliche Erkenntnisse konnten für Zellen des ATCs gemacht werden. Auch hier führte eine Behandlung mit dem VEGFR-2-Inhibitor Apatinib zu einer Steigerung von Apoptose und Autophagie, außerdem konnte durch eine Blockade der Autophagie die Apoptose in den Zellen des ATCs gesteigert werden. Hieraus wurde geschlossen, dass eine Inhibition der Autophagie zu einer Verstärkung des anti-proliferativen Effekts von Apatinib führen kann (Feng et al. 2018).

Die zuletzt genannten Ergebnisse stehen damit im Gegensatz zu den in dieser Studie gewonnenen Erkenntnissen, nach welchen eine Induktion der Autophagie zu einer Reduzierung der Zellviabilität führte. Allerdings gilt es zu berücksichtigen, dass zum einen andere Substanzklassen bei der Behandlung der ATC-Zellen verwendet wurden, zum anderen unterschieden sich, bis auf die Zelllinie C643, auch die in den Arbeiten untersuchten Zelllinien. Hier gilt es, erneut zu betonen, dass die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zu großen Teilen auf die Untersuchung von Primärkulturen zurück zu führen sind. Diese lagen zum Teil in bereits hohen Passagen vor und wurden schon häufig aufgetaut und wieder eingefroren. Des Weiteren ist nicht sicher auszuschließen, dass das Ursprungsgewebe, aus welchem die Zellen gewonnen wurden, nur aus Zellen des ATCs bestand. Auch die Tatsache, dass eine Bildung von Sphäroiden mit Zellen der Primärkulturen nicht möglich war, zeigt bestehende Unterschiede zu der etablierten ATC-Zelllinie C643.

Man kann in diesem Zusammenhang die Hypothese aufstellen, dass die hier genutzten Primärkulturen des ATCs, aufgrund sich unterscheidender molekulargenetischer Eigenschaften, unterschiedlich auf die Induktion bzw. Inhibition der Autophagie reagieren. Wie genau Apoptose und Autophagie in Zellen des ATCs interagieren, ist folglich nicht abschließend zu klären. Die in dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse zur Beeinflussung der Zellviabilität über eine Induktion der Autophagie können allerdings eine wichtige Grundlage für weitere Untersuchungen bieten.

5.4 Auswirkung der antitumoralen Therapie auf die Expression von PD-L1

Es wurde bereits erwähnt, dass Zellen des ATCs eine höhere Expression von PD-L1 aufweisen, als die Zellen differenzierter SD-CAs (Ahn et al. 2021). Dies passt zu der Beobachtung von Dell'Aquila et al., dass die PD-L1-Expression auf Tumorzellen mit der Malignität der Tumoren assoziiert sein kann (Dell'Aquila et al. 2020). Gleichzeitig ist die PD-L1-Expression ein potenzieller Biomarker für die Reaktion von verschiedenen Tumoren auf die Behandlung mit PD-1- oder PD-L1-Antikörpern (Page et al. 2014).

Eine PD-L1-Expression kann in 20-30% aller ATCs nachgewiesen werden (Ahn et al. 2017; Wu et al. 2015; Zwaenepoel et al. 2017) (vgl. 2.3.2). Bemerkenswert in der Studie von Ahn et al. ist, dass in den zwei ATCs, welche eine positive PD-L1-Expression aufwiesen, 80-90% der Tumorzellen positiv für PD-L1 waren (Ahn et al. 2017). Dass eine Immuntherapie gegen PD-L1 einen potenziellen Therapieansatz zur Behandlung des ATCs darstellt, konnte bereits in vorherigen Studien belegt werden (Cantara et al. 2019; Zwaenepoel et al. 2017).

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von PD-L1 bestimmt. Die via Western Blot bestimmte PD-L1-Expression der hier untersuchten Zelllinien/Primärkulturen ist unter 4.4.3 dargestellt. Der CPS bezüglich der Expression von PD-L1 kann Tabelle 2 entnommen werden.

Während die etablierten Zelllinien C643 und Nthy-ori 3-1 auch nach der Behandlung mit Atezolizumab, Panobinostat und Sorafenib bzw. nach der Kombinationsbehandlung ein stabiles PD-L1-Level zeigten, kann bei den drei untersuchten Primärkulturen, zumindest teilweise, eine Beeinflussung der Proteinexpression nachgewiesen werden.

Auffällig ist, dass die Zellen des Patienten 2 in der unbehandelten Kontrolle die höchste Expression von PD-L1 zeigten, diese veränderte sich allerdings nach der Behandlung mit den eingesetzten Therapeutika nicht. Die Primärkultur Patient 1 zeigte hingegen die niedrigste Expression von PD-L1, welche allerdings nach der singulären und kombinierten Behandlung mit den eingesetzten Therapeutika signifikant ($p < 0,05$) erhöht wurde. Die Primärkultur Patient 3, deren Proteinlevel zwischen dem von Patient 1 und Patient 2 lag, zeigte hingegen nur nach den Kombinationsbehandlungen eine veränderte Expression von PD-L1. Hierbei war eine erhöhte Expression nach der Behandlung mit Atezolizumab und Panobinostat festzustellen, die Kombination aus Atezolizumab und Sorafenib hingegen bewirkte eine Verringerung der Expression.

Auch die Arbeitsgruppe von Hegedűs et al. konnte in Zelllinien des ATCs eine erhöhte Expression von PD-L1 nach der Behandlung mit einem HDACi nachweisen (Hegedűs et al. 2020). Dies war unter anderem auch für die Zellen der Primärkultur des Patienten 1 festzustellen, sowohl nach singulärer Behandlung mit dem HDACi Panobinostat, wie auch nach der Kombination mit Atezolizumab. Auffällig ist, dass sowohl die Primärkultur Patient 1, wie auch die in der Arbeit von Hegedűs untersuchten Zelllinien, eine *BRAFV600E*-Mutation aufwiesen (Hegedűs et al. 2020).

Bezogen auf HDACis konnte auch in Zellen des multiplen Myeloms nach der Behandlung mit dem HDACi Panobinostat ein erhöhtes Proteinlevel von PD-L1 festgestellt werden, wobei unter

anderem Histonacetylierung eine Rolle spielte (Iwasa et al. 2019). Ähnliches ließ sich für Zellen des kolorektalen Karzinoms nach Behandlung mit dem HDACi Romidepsin nachweisen (Shi et al. 2020). Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die erhöhte Expression von PD-L1 zunächst die antitumorale Aktivität von T-Zellen runterreguliert und so die Tumorzellen vor der körpereigenen Immunabwehr schützt. Gleichzeitig kann die durch HDACi-induzierte Hochregulation von PD-L1 die Infiltration von T-Zellen erhöhen, wie auch die Präsentation von Antigenen. Diese Mechanismen wiederum erhöhen den Effekt einer Immuntherapie mit PD-1/PD-L1-Inhibitoren (Shi et al. 2020). Eine Erhöhung des Proteinlevels von PD-L1 durch den Einsatz von Kombinationstherapien, welche in der hier vorgestellten Arbeit bei zwei der drei untersuchten Primärkulturen festgestellt werden konnte, stellt somit einen möglichen Therapieansatz bei der Behandlung des ATCs dar, da auf diesem Weg die Tumorzellen für die Behandlung mit PD-L1-Inhibitoren sensibilisiert werden können.

Eine Erhöhung des PD-L1-Levels konnte außerdem auch in Tumor-infiltrierenden Immunzellen des HCCs nach Behandlung mit dem TKI Sorafenib nachgewiesen werden (Lu et al. 2019). Auch für die Zellen der Primärkultur Patient 1 war dies nach der Behandlung mit Sorafenib zu beobachten. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Erhöhung der Expression von PD-L1 nach einer Kombinationsbehandlung ist also am ehesten auf den Effekt von Panobinostat und Sorafenib zurück zu führen. Des Weiteren konnte Gunda et al. mit Hilfe eines Mausmodells bereits einen synergetischen Effekt des KI Lenvatinib mit einer Anti-PD-1/PD-L1-Therapie nachweisen (Gunda et al. 2019) (vgl. 5.1).

5.5 Ausblick

Ein möglicher Ansatz, um ein effektives Therapieansprechen und die Entstehung von Resistenzen bei der Behandlung des hochaggressiven ATC zu vermeiden, stellt die Kombination verschiedener therapeutisch wirksamer Substanzen dar, welche unterschiedliche Signalwege angreifen. Dementsprechend konnte in der vorliegenden Arbeit eine synergistische Wirkung verschiedener Therapeutika nachgewiesen werden, welche potenziell dazu in der Lage ist, die Aggressivität der Tumorzellen des ATCs zu überwinden und den Zelltod zu induzieren.

Um die molekulargenetischen Auswirkungen der einzelnen Substanzen und ihrer Kombinationen zu verstehen, bedarf es weiterer Forschung, für welche diese Arbeit einen Grundstein darstellen kann. Besonders aufschlussreich könnte es hierbei sein, die Rolle der Autophagie und der Apoptose in Zellen des ATCs weiter zu untersuchen. In dieser Arbeit führte beispielsweise die Induktion der Autophagie durch den HDACi Panobinostat zu einer negativen Beeinflussung der Zellviabilität, gleichzeitig konnte Panobinostat den Autophagie-inhibierenden Effekt von Atezolizumab überwinden. Diese Beobachtungen ermutigen zu

weiteren Untersuchungen der zugrundeliegenden Mechanismen an in vitro und in vivo Modellen.

Ein weiterer potenzieller Baustein stellt die Untersuchung der Mikroumgebung des Tumors und der hier vorkommenden Makrophagen dar. Es ist bereits bekannt, dass tumor-assoziierte Makrophagen PD-L1 exprimieren und damit zu einer immunsuppressiven Wirkung der Mikroumgebung der Tumoren beitragen. Die Therapie mit PD-L1-Inhibitoren kann wiederum die antitumorale Aktivität der Makrophagen re-induzieren (Hartley et al. 2018). Eine Untersuchung dieses Mechanismus in Zellen des ATCs könnte helfen, die Wirkweise der PD-L1-Inhibitoren weiter zu verstehen.

6 Zusammenfassung

6.1 Deutsche Zusammenfassung

Das anaplastische Schilddrüsenkarzinom (ATC) zählt zu den aggressivsten und tödlichsten Tumorerkrankungen überhaupt. Gründe hierfür sind unter anderem das hohe Metastasierungspotenzial und das Fehlen effektiver Therapiekonzepte. Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit, zielgerichtete und multimodale Therapien zu etablieren und die molekulargenetischen Mechanismen in Zellen des ATCs weiter zu entschlüsseln, um eine effektive und individualisierte Behandlung zu ermöglichen.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwiefern der PD-L1-Inhibitor Atezolizumab, der Histondeacetylaseinhibitor (HDACi) Panobinostat und der Tyrosinkinaseinhibitor (TKI) Sorafenib die Zellviabilität von Zellen des ATCs beeinflussen können. Des Weiteren wurde mit Hilfe von qRT-PCR und Western Blot analysiert, inwiefern die Behandlung der Zellen die Expression der Autophagiemarker UVRAG, p62, Beclin, LC3B-I, LC3B-II, AMPK α und P-AMPK α auf Gen- bzw. Proteinebene beeinflusst und welche Rolle die Autophagie, als alternativer Weg des Zelltodes, bei der Behandlung der einzelnen Zelllinien spielt. Zuletzt wurde die mögliche Beeinflussung des Proteinlevels von PD-L1 untersucht. Für die Durchführung stand zum einen die etablierte Zelllinie C643, zum anderen die Zelllinien dreier humaner Primärkulturen zur Verfügung. Als Kontrollzelllinie wurde die etablierte, humane Zelllinie Nthy-ori 3-1 genutzt.

Mit Hilfe einer Zellviabilitätsmessung via RealTime-Glo™ konnte demonstriert werden, dass der HDACi Panobinostat schon bei einer Konzentration von 10 nM eine signifikante ($p < 0,05$) Reduktion der Zellviabilität in Sphäroiden der etablierten Zelllinie C643 bewirken kann, während dies nach der Behandlung mit 500 ng/ml Atezolizumab und 1 μ M Sorafenib nur eingeschränkt beobachtet werden konnte. Interessanterweise zeigte die Kombination von Atezolizumab mit Panobinostat bzw. Sorafenib einen synergistischen Effekt, wobei vor allem die zuerst genannte Kombination zu einer Reduktion der Zellviabilität führte. Bei der mikroskopischen Untersuchung von Sphäroiden führte die singuläre Behandlung mit Panobinostat, wie auch die Kombination mit Atezolizumab, zu einer Verdunkelung der Sphäroide und zu einem Verlust der Grundstruktur.

Außerdem konnte beobachtet werden, dass eine singuläre Behandlung mit den genannten Substanzen zu einer Überexpression einiger Gene führte, die für die Autophagie relevant sind. Eine Kombinationsbehandlung induzierte in zwei der untersuchten Transkripte eine erhöhte Expression. Hingegen war auf Proteinebene nach der Behandlung mit Panobinostat fast kein Nachweis der Autophagie-relevanten Proteine mehr möglich, dies spricht für einen stark

wirksamen Autophagieprozess, welcher letztendlich zu einer Einschränkung der Zellviabilität und zum Zelltod der behandelten Zellen führte. Bemerkenswert ist allerdings, dass nach der Kombinationsbehandlung mit Atezolizumab und Panobinostat, im Vergleich zur singulären Behandlung mit Panobinostat, eine erhöhte Expression der Autophagie-relevanten Proteine beobachtet werden konnte. Dies weist auf einen Autophagie-inhibierenden Effekt von Atezolizumab hin. Trotzdem konnte auch nach der Kombinationsbehandlung mit Atezolizumab und Panobinostat eine deutliche Einschränkung der Zellviabilität festgestellt werden, was darauf hindeutet, dass der Autophagie-induzierende Effekt von Panobinostat den Autophagie-inhibierenden Effekt von Atezolizumab überwindet und so den Zelltod der behandelten Zellen bewirkt. Derartige Beobachtungen konnten für die singuläre Behandlung mit Atezolizumab und Sorafenib bzw. deren Kombination nicht gemacht werden. Die Einschränkung der Zellviabilität nach der Behandlung mit den zuletzt genannten Substanzen ist also nicht auf eine Induktion der Autophagie zurück zu führen. Des Weiteren konnte eine potenzielle Erhöhung der PD-L1-Expression der Tumorzellen nach Behandlung mit Panobinostat und Sorafenib beobachtet werden, dies wiederum könnte die Tumorzellen für eine Behandlung mit dem PD-L1-Inhibitor Atezolizumab weiter sensibilisieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen das hohe Potenzial kombinierter und synergetisch wirkender Therapiekonzepte, wobei vor allem die Kombination des PD-L1-Inhibitors Atezolizumab mit dem HDACi Panobinostat ein wirksames Therapiekonzept bei der Behandlung des ATCs darstellen könnte. Weitere Untersuchungen werden benötigt, um die genauen Rollen von PD-L1 und Autophagie in Zellen des ATCs zu entschlüsseln, um auf diese Weise durch gezielte Therapiekonzepte eine effektive Behandlung dieser tödlichen Tumorerkrankung zu ermöglichen.

6.2 Abstract

Anaplastic thyroid carcinoma (ATC) is one of the most aggressive and deadliest malignancies because of its high metastatic potential and the lack of effective therapy. Therefore, it is strongly needed to identify targeted and multimodal effective therapies based on its aberrant molecular background.

In the present study the cell viability of ATC cells was investigated after the treatment with the PD-L1 inhibitor atezolizumab, the HDACi panobinostat and the TKI Sorafenib. Furthermore, RT-qPCR and Western Blot were used to modulation of the transcripts and proteins related to the autophagic genes *UVRAG*, *SQSTM1*, *TFEB*, *BECN1*, *MAP1LC3B*, *PRKAA1_1* and *PRKAA 2_1*. Finally, the protein level of PD-L1 was analysed. The established ATC cell line C643 and three

PDTTs were used as ATC model for this study. Thyroid follicular epithelial immortalized cells Nthy-ori 3-1 were used as control.

The viability of C643 spheroids was detected by the use of the Real Time Glo™ kit. Panobinostat caused a significant reduction of cell viability at 10 nM concentration. The treatment with 500 ng/ml of atezolizumab und 1 μM of sorafenib showed only a slight reduction of cell viability. Interestingly, the combination of 500 ng/ml of atezolizumab with 10 nM of panobinostat or 1 μM of sorafenib showed a synergic effect; especially the combination of atezolizumab and panobinostat caused a significant reduction of cell viability. Besides, the treatment with panobinostat alone and in combination with atezolizumab caused a darkening of the spheroid and a complete loss of its structure.

Furthermore, the solo administration of atezolizumab, panobinostat and sorafenib caused an over-expression of most of the autophagy transcripts, while the combination of atezolizumab with panobinostat or sorafenib caused a significant change in the expression of two autophagy transcripts. However, the solo administration with panobinostat caused a significant down-regulation of the protein level of nearly all autophagy markers, which confirmed a strong ongoing autophagy process leading to cell death. Interestingly, after treatment with the combination of atezolizumab and panobinostat a higher protein level of the autophagy proteins could be detected, compared to the solo administration with panobinostat. These results indicate an inhibitory effect on autophagy process exerted by atezolizumab. Nonetheless, the combination of atezolizumab and panobinostat led to a significant reduction of cell viability. These findings indicated that the combination with panobinostat resulted effective by overcoming the inhibitory effect exerted by atezolizumab on autophagy process, which caused a reduction of cell proliferation and finally decay. However, similar findings could not be observed after administration with atezolizumab and sorafenib or after the combination of the two compounds, therefore a reduction of cell viability is not caused by an induction of autophagy process. Another important finding was the potential upregulation of PD-L1 after treatment with panobinostat and sorafenib, supporting the possibility to sensitize ATC cells to a therapy with the PD-L1 inhibitor atezolizumab.

The results made in this study show the high potential of using combined treatment. The combination of the PD-L1 inhibitor atezolizumab and the HDACi panobinostat could be an effective therapeutic concept for patients affected by ATC. Further investigations are needed to verify the role of PD-L1 and autophagy in vivo.

7 Literaturverzeichnis

- Agata, Y.; Kawasaki, A.; Nishimura, H.; Ishida, Y.; Tsubata, T.; Yagita, H.; Honjo, T. (1996): Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. In: *International immunology* 8 (5), S. 765–772. DOI: 10.1093/intimm/8.5.765.
- Ahn, Jonghwa; Jin, Meihua; Song, Eyun; Ryu, Yeon-Mi; Song, Dong Eun; Kim, Sang-Yeob et al. (2021): Immune Profiling of Advanced Thyroid Cancers Using Fluorescent Multiplex Immunohistochemistry. In: *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 31 (1), S. 61–67. DOI: 10.1089/thy.2020.0312.
- Ahn, Soomin; Kim, Tae Hyuk; Kim, Sun Wook; Ki, Chang Seok; Jang, Hye Won; Kim, Jee Soo et al. (2017): Comprehensive screening for PD-L1 expression in thyroid cancer. In: *Endocrine-related cancer* 24 (2), S. 97–106. DOI: 10.1530/ERC-16-0421.
- Arora, Amit; Scholar, Eric M. (2005): Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 315 (3), S. 971–979. DOI: 10.1124/jpet.105.084145.
- Bar-Peled, Liron; Sabatini, David M. (2014): Regulation of mTORC1 by amino acids. In: *Trends in cell biology* 24 (7), S. 400–406. DOI: 10.1016/j.tcb.2014.03.003.
- Barth, Sandra; Glick, Danielle; Macleod, Kay F. (2010): Autophagy: assays and artifacts. In: *The Journal of pathology* 221 (2), S. 117–124. DOI: 10.1002/path.2694.
- Bellmunt, Joaquim; Wit, Ronald de; Vaughn, David J.; Fradet, Yves; Lee, Jae-Lyun; Fong, Lawrence et al. (2017): Pembrolizumab as Second-Line Therapy for Advanced Urothelial Carcinoma. In: *The New England journal of medicine* 376 (11), S. 1015–1026. DOI: 10.1056/NEJMoa1613683.
- Bernhart, Eva; Stuedl, Nicole; Kaltenecker, Heike; Windpassinger, Christian; Donohue, Nicholas; Leithner, Andreas; Lohberger, Birgit (2017): Histone deacetylase inhibitors vorinostat and panobinostat induce G1 cell cycle arrest and apoptosis in multidrug resistant sarcoma cell lines. In: *Oncotarget* 8 (44), S. 77254–77267. DOI: 10.18632/oncotarget.20460.
- Bible, Keith C.; Kebebew, Electron; Brierley, James; Brito, Juan P.; Cabanillas, Maria E.; Clark, Thomas J. et al. (2021): 2021 American Thyroid Association Guidelines for Management of Patients with Anaplastic Thyroid Cancer. In: *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 31 (3), S. 337–386. DOI: 10.1089/thy.2020.0944.

- Bose, Prithviraj; Dai, Yun; Grant, Steven (2014): Histone deacetylase inhibitor (HDACI) mechanisms of action: emerging insights. In: *Pharmacology & therapeutics* 143 (3), S. 323–336. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2014.04.004.
- Brauner, Eran; Gunda, Viswanath; Vanden Borre, Pierre; Zurakowski, David; Kim, Yon Seon; Dennett, Kate Virginia et al. (2016): Combining BRAF inhibitor and anti PD-L1 antibody dramatically improves tumor regression and anti tumor immunity in an immunocompetent murine model of anaplastic thyroid cancer. In: *Oncotarget* 7 (13), S. 17194–17211. DOI: 10.18632/oncotarget.7839.
- Broecker-Preuss, Martina; Müller, Stefan; Britten, Martin; Worm, Karl; Schmid, Kurt Werner; Mann, Klaus; Fuhrer, Dagmar (2015): Sorafenib inhibits intracellular signaling pathways and induces cell cycle arrest and cell death in thyroid carcinoma cells irrespective of histological origin or BRAF mutational status. In: *BMC cancer* 15, S. 184. DOI: 10.1186/s12885-015-1186-0.
- Brose, Marcia S.; Nutting, Christopher M.; Jarzab, Barbara; Elisei, Rossella; Siena, Salvatore; Bastholt, Lars et al. (2014): Sorafenib in radioactive iodine-refractory, locally advanced or metastatic differentiated thyroid cancer: a randomised, double-blind, phase 3 trial. In: *The Lancet* 384 (9940), S. 319–328. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)60421-9.
- Brown, Julia A.; Dorfman, David M.; Ma, Feng-Rong; Sullivan, Elizabeth L.; Munoz, Oliver; Wood, Clive R. et al. (2003): Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 170 (3), S. 1257–1266. DOI: 10.4049/jimmunol.170.3.1257.
- Cabanillas, Maria E.; Ferrarotto, Renata; Garden, Adam S.; Ahmed, Salmaan; Busaidy, Naifa L.; Dadu, Ramona et al. (2018): Neoadjuvant BRAF- and Immune-Directed Therapy for Anaplastic Thyroid Carcinoma. In: *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 28 (7), S. 945–951. DOI: 10.1089/thy.2018.0060.
- Cantara, Silvia; Bertelli, Eugenio; Occhini, Rossella; Regoli, Mari; Brilli, Lucia; Pacini, Furio et al. (2019): Blockade of the programmed death ligand 1 (PD-L1) as potential therapy for anaplastic thyroid cancer. In: *Endocrine* 64 (1), S. 122–129. DOI: 10.1007/s12020-019-01865-5.
- Catalano, Maria Graziella; Pugliese, Mariateresa; Gargantini, Eleonora; Grange, Cristina; Bussolati, Benedetta; Asioli, Sofia et al. (2012): Cytotoxic activity of the histone deacetylase inhibitor panobinostat (LBH589) in anaplastic thyroid cancer in vitro and in vivo. In: *International journal of cancer* 130 (3), S. 694–704. DOI: 10.1002/ijc.26057.

Chang, Yong S.; Adnane, Jalila; Trail, Pamela A.; Levy, Joan; Henderson, Arris; Xue, Dahai et al. (2007): Sorafenib (BAY 43-9006) inhibits tumor growth and vascularization and induces tumor apoptosis and hypoxia in RCC xenograft models. In: *Cancer chemotherapy and pharmacology* 59 (5), S. 561–574. DOI: 10.1007/s00280-006-0393-4.

Chen, Robert; Zinzani, Pier Luigi; Fanale, Michelle A.; Armand, Philippe; Johnson, Nathalie A.; Brice, Pauline et al. (2017): Phase II Study of the Efficacy and Safety of Pembrolizumab for Relapsed/Refractory Classic Hodgkin Lymphoma. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 35 (19), S. 2125–2132. DOI: 10.1200/JCO.2016.72.1316.

Chen, Suning; Rehman, Sumaiyah K.; Zhang, Wei; Wen, Aidong; Yao, Libo; Zhang, Jian (2010): Autophagy is a therapeutic target in anticancer drug resistance. In: *Biochimica et biophysica acta* 1806 (2), S. 220–229. DOI: 10.1016/j.bbcan.2010.07.003.

Chintakuntlawar, Ashish V.; Rumilla, Kandelaria M.; Smith, Carin Y.; Jenkins, Sarah M.; Foote, Robert L.; Kasperbauer, Jan L. et al. (2017): Expression of PD-1 and PD-L1 in Anaplastic Thyroid Cancer Patients Treated With Multimodal Therapy: Results From a Retrospective Study. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 102 (6), S. 1943–1950. DOI: 10.1210/jc.2016-3756.

Chou, Ting-Chao; Talalay, Paul (1984): Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. In: *Advances in Enzyme Regulation* 22, S. 27–55. DOI: 10.1016/0065-2571(84)90007-4.

Damanakis, Alexander I.; Eckhardt, Sabine; Wunderlich, Annette; Roth, Silvia; Wissniowski, Thaddeus T.; Bartsch, Detlef K.; Di Fazio, Pietro (2016): MicroRNAs let7 expression in thyroid cancer: correlation with their deputed targets HMGA2 and SLC5A5. In: *Journal of cancer research and clinical oncology* 142 (6), S. 1213–1220. DOI: 10.1007/s00432-016-2138-z.

Danysh, Brian P.; Rieger, Erin Y.; Sinha, Deepankar K.; Evers, Caitlin V.; Cote, Gilbert J.; Cabanillas, Maria E.; Hofmann, Marie-Claude (2016): Long-term vemurafenib treatment drives inhibitor resistance through a spontaneous KRAS G12D mutation in a BRAF V600E papillary thyroid carcinoma model. In: *Oncotarget* 7 (21), S. 30907–30923. DOI: 10.18632/oncotarget.9023.

Degenhardt, Kurt; Mathew, Robin; Beaudoin, Brian; Bray, Kevin; Anderson, Diana; Chen, Guanghua et al. (2006): Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. In: *Cancer cell* 10 (1), S. 51–64. DOI: 10.1016/j.ccr.2006.06.001.

Dell'Aquila, Marco; Granitto, Alessia; Martini, Maurizio; Capodimonti, Sara; Cocomazzi, Alessandra; Musarra, Teresa et al. (2020): PD-L1 and thyroid cytology: A possible diagnostic and prognostic marker. In: *Cancer cytopathology* 128 (3), S. 177–189. DOI: 10.1002/cncy.22224.

Deng, Siyu; Hu, Qianwen; Zhang, Heng; Yang, Fang; Peng, Cheng; Huang, Chuanxin (2019): HDAC3 Inhibition Upregulates PD-L1 Expression in B-Cell Lymphomas and Augments the Efficacy of Anti-PD-L1 Therapy. In: *Molecular cancer therapeutics* 18 (5), S. 900–908. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-18-1068.

Denton, D.; Nicolson, S.; Kumar, S. (2012): Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts. In: *Cell death and differentiation* 19 (1), S. 87–95. DOI: 10.1038/cdd.2011.146.

Di Fazio, Pietro; Matrood, Sami (2018): Targeting autophagy in liver cancer. In: *Translational gastroenterology and hepatology* 3, S. 39. DOI: 10.21037/tgh.2018.06.09.

Di Fazio, Pietro; Rusche, Franziska D.; Roth, Silvia; Pehl, Anika; Wächter, Sabine; Mintziras, Ioannis et al. (2022): Long Non-Coding RNA H19 Expression Correlates with Autophagy Process in Adrenocortical Carcinoma. In: *Cancer investigation* 40 (3), S. 254–267. DOI: 10.1080/07357907.2021.2001483.

Di Fazio, Pietro; Waldegger, Petra; Jabari, Samir; Lingelbach, Susanne; Montalbano, Roberta; Ocker, Matthias et al. (2016): Autophagy-related cell death by pan-histone deacetylase inhibition in liver cancer. In: *Oncotarget* 7 (20), S. 28998–29010. DOI: 10.18632/oncotarget.8585.

Dierks, Christine; Seufert, Jochen; Aumann, Konrad; Ruf, Juri; Klein, Claudius; Kiefer, Selina et al. (2021): The Lenvatinib/Pembrolizumab combination is an effective treatment option for anaplastic and poorly differentiated thyroid carcinoma. In: *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. DOI: 10.1089/THY.2020.0322.

Eckhardt, S.; Hoffmann, S.; Damanakis, A. I.; Di Fazio, P.; Pfestroff, A.; Luster, M. et al. (2016): Individualized multimodal treatment strategy for anaplastic thyroid carcinoma-Case report of long-term remission and review of literature. In: *International journal of surgery case reports* 25, S. 174–178. DOI: 10.1016/j.ijscr.2016.06.013.

Elisei, Rossella; Ugolini, Clara; Viola, David; Lupi, Cristiana; Biagini, Agnese; Giannini, Riccardo et al. (2008): BRAF(V600E) mutation and outcome of patients with papillary thyroid carcinoma: a 15-year median follow-up study. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 93 (10), S. 3943–3949. DOI: 10.1210/jc.2008-0607.

Fan, Dan; Ma, Jennifer; Bell, Andrew C.; Groen, Andries H.; Olsen, Kyrie S.; Lok, Benjamin H. et al. (2020): Outcomes of multimodal therapy in a large series of patients with anaplastic thyroid cancer. In: *Cancer* 126 (2), S. 444–452. DOI: 10.1002/cncr.32548.

Feng, Haoran; Cheng, Xi; Kuang, Jie; Chen, Lingxie; Yuen, Stanley; Shi, Minmin et al. (2018): Apatinib-induced protective autophagy and apoptosis through the AKT-mTOR pathway in anaplastic thyroid cancer. In: *Cell death & disease* 9 (10), S. 1030. DOI: 10.1038/s41419-018-1054-3.

Ferrari, Silvia Martina; Bocci, Guido; Di Desidero, Teresa; Elia, Giusy; Ruffilli, Ilaria; Ragusa, Francesca et al. (2018): Lenvatinib exhibits antineoplastic activity in anaplastic thyroid cancer in vitro and in vivo. In: *Oncology reports* 39 (5), S. 2225–2234. DOI: 10.3892/or.2018.6306.

Ferrari, Silvia Martina; Centanni, Marco; Virili, Camilla; Miccoli, Mario; Ferrari, Paola; Ruffilli, Ilaria et al. (2019): Sunitinib in the Treatment of Thyroid Cancer. In: *Current medicinal chemistry* 26 (6), S. 963–972. DOI: 10.2174/0929867324666171006165942.

Ferrari, Silvia Martina; Elia, Giusy; Ragusa, Francesca; Ruffilli, Ilaria; La Motta, Concettina; Paparo, Sabrina Rosaria et al. (2020): Novel treatments for anaplastic thyroid carcinoma. In: *Gland surgery* 9 (Suppl 1), S28-42. DOI: 10.21037/gs.2019.10.18.

Flaherty, Keith T.; Infante, Jeffery R.; Daud, Adil; Gonzalez, Rene; Kefford, Richard F.; Sosman, Jeffrey et al. (2012): Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. In: *The New England journal of medicine* 367 (18), S. 1694–1703. DOI: 10.1056/NEJMoa1210093.

Francisco, Loise M.; Sage, Peter T.; Sharpe, Arlene H. (2010): The PD-1 Pathway in Tolerance and Autoimmunity. In: *Immunological reviews* 236, S. 219–242. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2010.00923.x.

Gandesiri, Muktheshwar; Chakilam, Saritha; Ivanovska, Jelena; Benderska, Natalya; Ocker, Matthias; Di Fazio, Pietro et al. (2012): DAPK plays an important role in panobinostat-induced autophagy and commits cells to apoptosis under autophagy deficient conditions. In: *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 17 (12), S. 1300–1315. DOI: 10.1007/s10495-012-0757-7.

Giancchetti, Elena; Delfino, Domenico Vittorio; Fierabracci, Alessandra (2013): Recent insights into the role of the PD-1/PD-L1 pathway in immunological tolerance and autoimmunity. In: *Autoimmunity reviews* 12 (11), S. 1091–1100. DOI: 10.1016/j.autrev.2013.05.003.

Glick, Danielle; Barth, Sandra; Macleod, Kay F. (2010): Autophagy: cellular and molecular mechanisms. In: *The Journal of pathology* 221 (1), S. 3–12. DOI: 10.1002/path.2697.

Goffredo, Paolo; Thomas, Samantha M.; Adam, Mohamed Abdelgadir; Sosa, Julie A.; Roman, Sanziana A. (2015): Impact of Timeliness of Resection and Thyroidectomy Margin Status on Survival for Patients with Anaplastic Thyroid Cancer: An Analysis of 335 Cases. In: *Annals of surgical oncology* 22 (13), S. 4166–4174. DOI: 10.1245/s10434-015-4742-6.

Gordan, John D.; Kennedy, Erin B.; Abou-Alfa, Ghassan K.; Beg, Muhammad Shaalan; Brower, Steven T.; Gade, Terence P. et al. (2020): Systemic Therapy for Advanced Hepatocellular Carcinoma: ASCO Guideline. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 38 (36), S. 4317–4345. DOI: 10.1200/JCO.20.02672.

Gunda, Viswanath; Gigliotti, Benjamin; Ashry, Tameem; Ndishabandi, Dorothy; McCarthy, Michael; Zhou, Zhiheng et al. (2019): Anti-PD-1/PD-L1 therapy augments lenvatinib's efficacy by favorably altering the immune microenvironment of murine anaplastic thyroid cancer. In: *International journal of cancer* 144 (9), S. 2266–2278. DOI: 10.1002/ijc.32041.

Hale, Amber N.; Ledbetter, Dan J.; Gawriluk, Thomas R.; Rucker, Edmund B. (2013): Autophagy: regulation and role in development. In: *Autophagy* 9 (7), S. 951–972. DOI: 10.4161/auto.24273.

Han, Weidong; Pan, Hongming; Chen, Yan; Sun, Jie; Wang, Yanshan; Li, Jing et al. (2011): EGFR tyrosine kinase inhibitors activate autophagy as a cytoprotective response in human lung cancer cells. In: *PLoS one* 6 (6), e18691. DOI: 10.1371/journal.pone.0018691.

Hanahan, Douglas; Weinberg, Robert A. (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. In: *Cell* 144 (5), S. 646–674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

Hartley, Genevieve P.; Chow, Lyndah; Ammons, Dylan T.; Wheat, William H.; Dow, Steven W. (2018): Programmed Cell Death Ligand 1 (PD-L1) Signaling Regulates Macrophage Proliferation and Activation. In: *Cancer immunology research* 6 (10), S. 1260–1273. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0537.

Haymart, Megan R.; Banerjee, Mousumi; Yin, Huiying; Worden, Francis; Griggs, Jennifer J. (2013): Marginal treatment benefit in anaplastic thyroid cancer. In: *Cancer* 119 (17), S. 3133–3139. DOI: 10.1002/cncr.28187.

He, Yu-Fei; Zhang, Gui-Mei; Wang, Xiao-Hong; Zhang, Hui; Yuan, Ye; Li, Dong; Feng, Zuo-Hua (2004): Blocking programmed death-1 ligand-PD-1 interactions by local gene therapy results in enhancement of antitumor effect of secondary lymphoid tissue chemokine. In: *Journal of*

immunology (Baltimore, Md. : 1950) 173 (8), S. 4919–4928. DOI:
10.4049/jimmunol.173.8.4919.

Hegedűs, Luca; Rittler, Dominika; Garay, Tamás; Stockhammer, Paul; Kovács, Ildikó; Döme, Balázs et al. (2020): HDAC Inhibition Induces PD-L1 Expression in a Novel Anaplastic Thyroid Cancer Cell Line. In: *Pathology oncology research : POR* 26 (4), S. 2523–2535. DOI:
10.1007/s12253-020-00834-y.

Herbst, Roy S.; Giaccone, Giuseppe; Marinis, Filippo de; Reinmuth, Niels; Vergnenegre, Alain; Barrios, Carlos H. et al. (2020): Atezolizumab for First-Line Treatment of PD-L1-Selected Patients with NSCLC. In: *The New England journal of medicine* 383 (14), S. 1328–1339. DOI:
10.1056/NEJMoa1917346.

Ichimura, Yoshinobu; Kumanomidou, Taichi; Sou, Yu-shin; Mizushima, Tsunehiro; Ezaki, Junji; Ueno, Takashi et al. (2008): Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (33), S. 22847–22857. DOI:
10.1074/jbc.M802182200.

Ishihara, Sae; Onoda, Naoyoshi; Noda, Satoru; Asano, Yuka; Tauchi, Yukie; Morisaki, Tamami et al. (2019): Sorafenib inhibits vascular endothelial cell proliferation stimulated by anaplastic thyroid cancer cells regardless of BRAF mutation status. In: *International journal of oncology* 55 (5), S. 1069–1076. DOI: 10.3892/ijo.2019.4881.

Ito, Yasuhiro; Onoda, Naoyoshi; Ito, Ken-Ichi; Sugitani, Iwao; Takahashi, Shunji; Yamaguchi, Iku et al. (2017): Sorafenib in Japanese Patients with Locally Advanced or Metastatic Medullary Thyroid Carcinoma and Anaplastic Thyroid Carcinoma. In: *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 27 (9), S. 1142–1148. DOI: 10.1089/thy.2016.0621.

Iwasa, Masami; Harada, Takeshi; Oda, Asuka; Bat-Erdene, Ariunzaya; Teramachi, Jumpei; Tenshin, Hirofumi et al. (2019): PD-L1 upregulation in myeloma cells by panobinostat in combination with interferon- γ . In: *Oncotarget* 10 (20), S. 1903–1917. DOI:
10.18632/oncotarget.26726.

Iyer, Priyanka C.; Dadu, Ramona; Gule-Monroe, Maria; Busaidy, Naifa L.; Ferrarotto, Renata; Habra, Mouhammed Amir et al. (2018): Salvage pembrolizumab added to kinase inhibitor therapy for the treatment of anaplastic thyroid carcinoma. In: *Journal for immunotherapy of cancer* 6 (1), S. 68. DOI: 10.1186/s40425-018-0378-y.

Jin, Zhijian; Cheng, Xi; Feng, Haoran; Kuang, Jie; Yang, Weiping; Peng, Chenghong et al. (2017): Apatinib Inhibits Angiogenesis Via Suppressing Akt/GSK3 β /ANG Signaling Pathway in

- Anaplastic Thyroid Cancer. In: *Cell Physiol Biochem* 44 (4), S. 1471–1484. DOI: 10.1159/000485583.
- Kebebew, Electron; Greenspan, Francis S.; Clark, Orlo H.; Woeber, Kenneth A.; McMillan, Alex (2005): Anaplastic thyroid carcinoma. Treatment outcome and prognostic factors. In: *Cancer* 103 (7), S. 1330–1335. DOI: 10.1002/cncr.20936.
- Keutgen, Xavier M.; Sadowski, Samira M.; Kebebew, Electron (2015): Management of anaplastic thyroid cancer. In: *Gland surgery* 4 (1), S. 44–51. DOI: 10.3978/j.issn.2227-684X.2014.12.02.
- Kim, Hye Min; Kim, Eun-Sol; Koo, Ja Seung (2017): Expression of Autophagy-Related Proteins in Different Types of Thyroid Cancer. In: *International journal of molecular sciences* 18 (3). DOI: 10.3390/ijms18030540.
- Kim, Seungwon; Yazici, Yasemin D.; Calzada, Gabriel; Wang, Zhuo-Ying; Younes, Maher N.; Jasser, Samar A. et al. (2007): Sorafenib inhibits the angiogenesis and growth of orthotopic anaplastic thyroid carcinoma xenografts in nude mice. In: *Molecular cancer therapeutics* 6 (6), S. 1785–1792. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-06-0595.
- Kraywinkel, Klaus (2018): Epidemiologie ausgewählter endokriner Tumoren in Deutschland. In: *Onkologe* 24 (2), S. 99–106. DOI: 10.1007/s00761-018-0333-z.
- Kwon, Jeanny; Kim, Byoung Hyuck; Jung, Hee-Won; Besic, Nikola; Sugitani, Iwao; Wu, Hong-Gyun (2016): The prognostic impacts of postoperative radiotherapy in the patients with resected anaplastic thyroid carcinoma: A systematic review and meta-analysis. In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 59, S. 34–45. DOI: 10.1016/j.ejca.2016.02.015.
- Landa, Iñigo; Ibrahimasic, Tihana; Boucai, Laura; Sinha, Rileen; Knauf, Jeffrey A.; Shah, Ronak H. et al. (2016): Genomic and transcriptomic hallmarks of poorly differentiated and anaplastic thyroid cancers. In: *The Journal of Clinical Investigation* 126 (3), S. 1052–1066. DOI: 10.1172/JCI85271.
- Lee, Hyung-Ok; Mustafa, Aladdin; Hudes, Gary R.; Kruger, Warren D. (2015): Hydroxychloroquine Destabilizes Phospho-S6 in Human Renal Carcinoma Cells. In: *PloS one* 10 (7), e0131464. DOI: 10.1371/journal.pone.0131464.
- Leo, Simone de; Trevisan, Matteo; Fugazzola, Laura (2020): Recent advances in the management of anaplastic thyroid cancer. In: *Thyroid research* 13 (1), S. 17. DOI: 10.1186/s13044-020-00091-w.

- Levine, Beth; Kroemer, Guido (2008): Autophagy in the pathogenesis of disease. In: *Cell* 132 (1), S. 27–42. DOI: 10.1016/j.cell.2007.12.018.
- Levy, Jean M. Mulcahy; Towers, Christina G.; Thorburn, Andrew (2017): Targeting autophagy in cancer. In: *Nature reviews. Cancer* 17 (9), S. 528–542. DOI: 10.1038/nrc.2017.53.
- Liang, Chengyu; Feng, Pinghui; Ku, Bonsu; Dotan, Iris; Canaani, Dan; Oh, Byung-Ha; Jung, Jae U. (2006): Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. In: *Nature cell biology* 8 (7), S. 688–699. DOI: 10.1038/ncb1426.
- Lin, Bo; Ma, Haiqing; Ma, Maoguang; Zhang, Zhicheng; Sun, Zicheng; Hsieh, I-yun et al. (2019): The incidence and survival analysis for anaplastic thyroid cancer: a SEER database analysis. In: *American Journal of Translational Research* 11 (9), S. 5888–5896.
- Liu, Li; Cao, Yichen; Chen, Charles; Zhang, Xiaomei; McNabola, Angela; Wilkie, Dean et al. (2006): Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. In: *Cancer research* 66 (24), S. 11851–11858. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1377.
- Liu, Zhuochao; Wang, Hongyi; Hu, Chuanzhen; Wu, Chuanlong; Wang, Jun; Hu, Fangqiong et al. (2021): Targeting autophagy enhances atezolizumab-induced mitochondria-related apoptosis in osteosarcoma. In: *Cell death & disease* 12 (2), S. 164. DOI: 10.1038/s41419-021-03449-6.
- Llovet, Josep M.; Ricci, Sergio; Mazzaferro, Vincenzo; Hilgard, Philip; Gane, Edward; Blanc, Jean-Frédéric et al. (2008): Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. In: *The New England journal of medicine* 359 (4), S. 378–390. DOI: 10.1056/NEJMoa0708857.
- Lu, Li-Chun; Lee, Yi-Hsuan; Chang, Chun-Jung; Shun, Chia-Tung; Fang, Chih-Yeu; Shao, Yu-Yun et al. (2019): Increased Expression of Programmed Death-Ligand 1 in Infiltrating Immune Cells in Hepatocellular Carcinoma Tissues after Sorafenib Treatment. In: *Liver cancer* 8 (2), S. 110–120. DOI: 10.1159/000489021.
- Lu, Shuai; Yao, Yao; Xu, Guolong; Zhou, Chao; Zhang, Yuan; Sun, Jie et al. (2018): CD24 regulates sorafenib resistance via activating autophagy in hepatocellular carcinoma. In: *Cell death & disease* 9 (6), S. 646. DOI: 10.1038/s41419-018-0681-z.
- Luster, M.; Clarke, S. E.; Dietlein, M.; Lassmann, M.; Lind, P.; Oyen, W. J. G. et al. (2008): Guidelines for radioiodine therapy of differentiated thyroid cancer. In: *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 35 (10), S. 1941–1959. DOI: 10.1007/s00259-008-0883-1.

- Mahmood, Tahrin; Yang, Ping-Chang (2012): Western blot: technique, theory, and trouble shooting. In: *North American journal of medical sciences* 4 (9), S. 429–434. DOI: 10.4103/1947-2714.100998.
- Mahoney, Kathleen M.; Freeman, Gordon J.; McDermott, David F. (2015): The Next Immune-Checkpoint Inhibitors: PD-1/PD-L1 Blockade in Melanoma. In: *Clinical therapeutics* 37 (4), S. 764–782. DOI: 10.1016/j.clinthera.2015.02.018.
- Maiuri, M. Chiara; Zalckvar, Einat; Kimchi, Adi; Kroemer, Guido (2007): Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (9), S. 741–752. DOI: 10.1038/nrm2239.
- Makker, Vicky; Taylor, Matthew H.; Aghajanian, Carol; Oaknin, Ana; Mier, James; Cohn, Allen L. et al. (2020): Lenvatinib Plus Pembrolizumab in Patients With Advanced Endometrial Cancer. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 38 (26), S. 2981–2992. DOI: 10.1200/JCO.19.02627.
- Mark, J.; Ekedahl, C.; Dahlenfors, R.; Westermark, B. (1987): Cytogenetical observations in five human anaplastic thyroid carcinomas. In: *Hereditas* 107 (2), S. 163–174. DOI: 10.1111/j.1601-5223.1987.tb00281.x.
- Matrood, Sami; Prisco, Nicola de; Wissniowski, Thaddeus; Wiese, Dominik; Jabari, Samir; Griesmann, Heidi et al. (2020): Modulation of pancreatic neuroendocrine neoplastic cell fate by autophagy mediated death. In: *Neuroendocrinology*. DOI: 10.1159/000512567.
- McCrary, Hilary C.; Aoki, Joni; Huang, Yiqing; Chadwick, Barbara; Kerrigan, Katie; Witt, Benjamin et al. (2022): Mutation based approaches to the treatment of anaplastic thyroid cancer. In: *Clinical endocrinology* 96 (5), S. 734–742. DOI: 10.1111/cen.14679.
- Milošević, Zorica; Banković, Jasna; Dinić, Jelena; Tsimplouli, Chriiida; Sereti, Evangelia; Dragoj, Miodrag et al. (2018): Potential of the dual mTOR kinase inhibitor AZD2014 to overcome paclitaxel resistance in anaplastic thyroid carcinoma. In: *Cellular oncology (Dordrecht)* 41 (4), S. 409–426. DOI: 10.1007/s13402-018-0380-x.
- Morrison, Jennifer A.; Pike, Laura A.; Lund, Greg; Zhou, Qiong; Kessler, Brittelle E.; Bauerle, Kevin T. et al. (2015): Characterization of thyroid cancer cell lines in murine orthotopic and intracardiac metastasis models. In: *Hormones & cancer* 6 (2-3), S. 87–99. DOI: 10.1007/s12672-015-0219-0.
- Motzer, Robert J.; Escudier, Bernard; McDermott, David F.; George, Saby; Hammers, Hans J.; Srinivas, Sandhya et al. (2015): Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell

Carcinoma. In: *The New England journal of medicine* 373 (19), S. 1803–1813. DOI: 10.1056/NEJMoa1510665.

Nikiforova, Marina N.; Kimura, Edna T.; Gandhi, Manoj; Biddinger, Paul W.; Knauf, Jeffrey A.; Basolo, Fulvio et al. (2003): BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88 (11), S. 5399–5404. DOI: 10.1210/jc.2003-030838.

Onorati, Angélique V.; Dyczynski, Matheus; Ojha, Rani; Amaravadi, Ravi K. (2018): Targeting autophagy in cancer. In: *Cancer* 124 (16), S. 3307–3318. DOI: 10.1002/cncr.31335.

Page, David B.; Postow, Michael A.; Callahan, Margaret K.; Allison, James P.; Wolchok, Jedd D. (2014): Immune modulation in cancer with antibodies. In: *Annual review of medicine* 65, S. 185–202. DOI: 10.1146/annurev-med-092012-112807.

Park, Jang-June; Omiya, Ryusuke; Matsumura, Yumiko; Sakoda, Yukimi; Kuramasu, Atsuo; Augustine, Mathew M. et al. (2010): B7-H1/CD80 interaction is required for the induction and maintenance of peripheral T-cell tolerance. In: *Blood* 116 (8), S. 1291–1298. DOI: 10.1182/blood-2010-01-265975.

Parzych, Katherine R.; Klionsky, Daniel J. (2014): An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. In: *Antioxidants & redox signaling* 20 (3), S. 460–473. DOI: 10.1089/ars.2013.5371.

Perrier, Alexandre; Didelot, Audrey; Laurent-Puig, Pierre; Blons, Hélène; Garinet, Simon (2020): Epigenetic Mechanisms of Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors. In: *Biomolecules* 10 (7). DOI: 10.3390/biom10071061.

Pezzi, Todd A.; Mohamed, Abdallah S. R.; Sheu, Tommy; Blanchard, Pierre; Sandulache, Vlad C.; Lai, Stephen Y. et al. (2017): Radiation therapy dose is associated with improved survival for unresected anaplastic thyroid carcinoma: Outcomes from the National Cancer Data Base. In: *Cancer* 123 (9), S. 1653–1661. DOI: 10.1002/cncr.30493.

Pozdeyev, Nikita; Gay, Laurie M.; Sokol, Ethan S.; Hartmaier, Ryan; Deaver, Kelsi E.; Davis, Stephanie et al. (2018): Genetic Analysis of 779 Advanced Differentiated and Anaplastic Thyroid Cancers. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 24 (13), S. 3059–3068. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-0373.

Proteinbestimmung (2018). Online verfügbar unter <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/proteinbestimmung/54131>, zuletzt aktualisiert am 04.09.2018, zuletzt geprüft am 26.10.2021.

PubChem (2021a): Panobinostat. Online verfügbar unter <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Panobinostat>, zuletzt aktualisiert am 15.12.2021, zuletzt geprüft am 15.12.2021.

PubChem (2021b): Sorafenib. Online verfügbar unter <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sorafenib>, zuletzt aktualisiert am 15.12.2021, zuletzt geprüft am 15.12.2021.

Pugliese, Mariateresa; Fortunati, Nicoletta; Germano, Antonina; Asioli, Sofia; Marano, Francesca; Palestini, Nicola et al. (2013): Histone deacetylase inhibition affects sodium iodide symporter expression and induces 131I cytotoxicity in anaplastic thyroid cancer cells. In: *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 23 (7), S. 838–846. DOI: 10.1089/thy.2012.0359.

Qu, Xueping; Yu, Jie; Bhagat, Govind; Furuya, Norihiko; Hibshoosh, Hanina; Troxel, Andrea et al. (2003): Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. In: *The Journal of Clinical Investigation* 112 (12), S. 1809–1820. DOI: 10.1172/JCI20039.

Rabinowitz, Joshua D.; White, Eileen (2010): Autophagy and metabolism. In: *Science (New York, N.Y.)* 330 (6009), S. 1344–1348. DOI: 10.1126/science.1193497.

RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay Technical Manual (2022), zuletzt aktualisiert am 23.10.2022, zuletzt geprüft am 23.10.2022.

Reck, Martin; Rodríguez-Abreu, Delvys; Robinson, Andrew G.; Hui, Rina; Csósz, Tibor; Fülöp, Andrea et al. (2016): Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. In: *The New England journal of medicine* 375 (19), S. 1823–1833. DOI: 10.1056/NEJMoa1606774.

Robainas, Marianela; Otano, Rafael; Bueno, Stephen; Ait-Oudhia, Sihem (2017): Understanding the role of PD-L1/PD1 pathway blockade and autophagy in cancer therapy. In: *OncoTargets and therapy* 10, S. 1803–1807. DOI: 10.2147/OTT.S132508.

Salmaninejad, Arash; Khoramshahi, Vahid; Azani, Alireza; Soltaninejad, Ehsan; Aslani, Saeed; Zamani, Mohammad Reza et al. (2018): PD-1 and cancer: molecular mechanisms and polymorphisms. In: *Immunogenetics* 70 (2), S. 73–86. DOI: 10.1007/s00251-017-1015-5.

Savvides, Panayiotis; Nagaiah, Govardhanan; Lavertu, Pierre; Fu, Pingfu; Wright, John J.; Chapman, Robert et al. (2013): Phase II Trial of Sorafenib in Patients with Advanced Anaplastic Carcinoma of the Thyroid. In: *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 23 (5), S. 600–604. DOI: 10.1089/thy.2012.0103.

Schildhaus, H-U (2018): Der prädiktive Wert der PD-L1-Diagnostik. In: *Der Pathologe* 39 (6), S. 498–519. DOI: 10.1007/s00292-018-0507-x.

Schlumberger, Martin; Tahara, Makoto; Wirth, Lori J.; Robinson, Bruce; Brose, Marcia S.; Elisei, Rossella et al. (2015): Lenvatinib versus placebo in radioiodine-refractory thyroid cancer. In: *The New England journal of medicine* 372 (7), S. 621–630. DOI: 10.1056/NEJMoa1406470.

Schmid, Peter; Adams, Sylvia; Rugo, Hope S.; Schneeweiss, Andreas; Barrios, Carlos H.; Iwata, Hiroji et al. (2018): Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. In: *The New England journal of medicine* 379 (22), S. 2108–2121. DOI: 10.1056/NEJMoa1809615.

Settembre, Carmine; Di Malta, Chiara; Polito, Vinicia Assunta; Garcia Arencibia, Moises; Vetrini, Francesco; Erdin, Serkan et al. (2011): TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. In: *Science (New York, N.Y.)* 332 (6036), S. 1429–1433. DOI: 10.1126/science.1204592.

Shi, Yehui; Fu, Ying; Zhang, Xin; Zhao, Gang; Yao, Yuan; Guo, Yan et al. (2020): Romidepsin (FK228) regulates the expression of the immune checkpoint ligand PD-L1 and suppresses cellular immune functions in colon cancer. In: *Cancer Immunology, Immunotherapy* 70 (1), S. 61–73. DOI: 10.1007/s00262-020-02653-1.

Shimizu, Katsuhiko; Okita, Riki; Saisho, Shinsuke; Maeda, A. I.; Nojima, Yuji; Nakata, Masao (2018): Impact of COX2 Inhibitor for Regulation of PD-L1 Expression in Non-small Cell Lung Cancer. In: *Anticancer research* 38 (8), S. 4637–4644. DOI: 10.21873/anticancer.12768.

Smallridge, R. C.; Copland, J. A. (2010): Anaplastic thyroid carcinoma: pathogenesis and emerging therapies. In: *Clinical oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))* 22 (6), S. 486–497. DOI: 10.1016/j.clon.2010.03.013.

Smallridge, Robert C.; Ain, Kenneth B.; Asa, Sylvia L.; Bible, Keith C.; Brierley, James D.; Burman, Kenneth D. et al. (2012): American Thyroid Association guidelines for management of patients with anaplastic thyroid cancer. In: *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 22 (11), S. 1104–1139. DOI: 10.1089/thy.2012.0302.

Sosa, Julie A.; Elisei, Rossella; Jarzab, Barbara; Balkissoon, Jai; Lu, Shiao-Ping; Bal, Chandrasekhar et al. (2014): Randomized safety and efficacy study of fosbretabulin with paclitaxel/carboplatin against anaplastic thyroid carcinoma. In: *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 24 (2), S. 232–240. DOI: 10.1089/thy.2013.0078.

Starobinets, Hanna; Ye, Jordan; Broz, Miranda; Barry, Kevin; Goldsmith, Juliet; Marsh, Timothy et al. (2016): Antitumor adaptive immunity remains intact following inhibition of

autophagy and antimalarial treatment. In: *The Journal of Clinical Investigation* 126 (12), S. 4417–4429. DOI: 10.1172/JCI85705.

Szczepaniak Sloane, Robert A.; Gopalakrishnan, Vancheswaran; Reddy, Sangeetha M.; Zhang, Xue; Reuben, Alexandre; Wargo, Jennifer A. (2017): Interaction of molecular alterations with immune response in melanoma. In: *Cancer* 123 (S11), S. 2130–2142. DOI: 10.1002/cncr.30681.

Takahashi, Shunji; Kiyota, Naomi; Yamazaki, Tomoko; Chayahara, Naoko; Nakano, Kenji; Inagaki, Lina et al. (2019): A Phase II study of the safety and efficacy of lenvatinib in patients with advanced thyroid cancer. In: *Future oncology (London, England)* 15 (7), S. 717–726. DOI: 10.2217/fo-2018-0557.

Tsapras, Panagiotis; Nezis, Ioannis P. (2017): Caspase involvement in autophagy. In: *Cell death and differentiation* 24 (8), S. 1369–1379. DOI: 10.1038/cdd.2017.43.

Villanueva-Paz, Marina; Cotán, David; Garrido-Maraver, Juan; Oropesa-Ávila, Manuel; La Mata, Mario de; Delgado-Pavón, Ana et al. (2016): AMPK Regulation of Cell Growth, Apoptosis, Autophagy, and Bioenergetics. In: *Experientia supplementum (2012)* 107, S. 45–71. DOI: 10.1007/978-3-319-43589-3_3.

Wächter, Sabine; Damanakis, Alexander I.; Elxnat, Moritz; Roth, Silvia; Wunderlich, Annette; Verburg, Frederik A. et al. (2018a): Epigenetic Modifications in Thyroid Cancer Cells Restore NIS and Radio-Iodine Uptake and Promote Cell Death. In: *Journal of clinical medicine* 7 (4). DOI: 10.3390/jcm7040061.

Wächter, Sabine; Vorländer, C.; Schabram, J.; Mintziras, I.; Fülber, I.; Manoharan, J. et al. (2020): Anaplastic thyroid carcinoma: changing trends of treatment strategies and associated overall survival. In: *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery* 277 (5), S. 1507–1514. DOI: 10.1007/s00405-020-05853-8.

Wächter, Sabine; Wunderlich, Annette; Roth, Silvia; Mintziras, Ioannis; Maurer, Elisabeth; Hoffmann, Sebastian et al. (2018b): Individualised Multimodal Treatment Strategies for Anaplastic and Poorly Differentiated Thyroid Cancer. In: *Journal of clinical medicine* 7 (5). DOI: 10.3390/jcm7050115.

Walkinshaw, D. R.; Yang, X. J. (2008): Histone deacetylase inhibitors as novel anticancer therapeutics. In: *Current Oncology* 15 (5), S. 237–243.

Wang, Jennifer R.; Zafereo, Mark E.; Dadu, Ramona; Ferrarotto, Renata; Busaidy, Naifa L.; Lu, Charles et al. (2019): Complete Surgical Resection Following Neoadjuvant Dabrafenib Plus Trametinib in BRAFV600E-Mutated Anaplastic Thyroid Carcinoma. In: *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 29 (8), S. 1036–1043. DOI: 10.1089/thy.2019.0133.

Wei, Yongjie; An, Zhenyi; Zou, Zhongju; Sumpter, Rhea; Su, Minfei; Zang, Xiao et al. (2015): The stress-responsive kinases MAPKAPK2/MAPKAPK3 activate starvation-induced autophagy through Beclin 1 phosphorylation. In: *eLife* 4. DOI: 10.7554/eLife.05289.

Weicht, Rebecca R.; Schultz, Chad R.; Geerts, Dirk; Uhl, Katie L.; Bachmann, André S. (2018): Polyamine Biosynthetic Pathway as a Drug Target for Osteosarcoma Therapy. In: *Medical sciences (Basel, Switzerland)* 6 (3). DOI: 10.3390/medsci6030065.

Wendler, Julia; Kroiss, Matthias; Gast, Katja; Kreissl, Michael C.; Allelein, Stephanie; Lichtenauer, Urs et al. (2016): Clinical presentation, treatment and outcome of anaplastic thyroid carcinoma: results of a multicenter study in Germany. In: *European journal of endocrinology* 175 (6), S. 521–529. DOI: 10.1530/EJE-16-0574.

White, Eileen; Mehnert, Janice M.; Chan, Chang S. (2015): Autophagy, Metabolism, and Cancer. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 21 (22), S. 5037–5046. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0490.

Wilson, Peter M.; LaBonte, Melissa J.; Martin, Shelby C.; Kuwahara, Stephanie T.; El-Khoueiry, Anthony; Lenz, Heinz-Josef; Ladner, Robert D. (2013): Sustained inhibition of deacetylases is required for the antitumor activity of the histone deacetylase inhibitors panobinostat and vorinostat in models of colorectal cancer. In: *Invest New Drugs* 31 (4), S. 845–857. DOI: 10.1007/s10637-012-9914-7.

Wirries, André; Jabari, Samir; Jansen, Esther P.; Roth, Silvia; Figueroa-Juárez, Elizabeth; Wissniowski, Thaddeus T. et al. (2018): Panobinostat mediated cell death: a novel therapeutic approach for osteosarcoma. In: *Oncotarget* 9 (68), S. 32997–33010. DOI: 10.18632/oncotarget.26038.

Woods, David M.; Sodr , Andressa L.; Villagra, Alejandro; Sarnaik, Amod; Sotomayor, Eduardo M.; Weber, Jeffrey (2015): HDAC Inhibition Upregulates PD-1 Ligands in Melanoma and Augments Immunotherapy with PD-1 Blockade. In: *Cancer immunology research* 3 (12), S. 1375–1385. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0077-T.

Wu, Hao; Sun, Yue; Ye, Huihui; Yang, Shi; Lee, Stephanie L.; las Morenas, Antonio de (2015): Anaplastic thyroid cancer: outcome and the mutation/expression profiles of potential targets. In: *Pathology oncology research : POR* 21 (3), S. 695–701. DOI: 10.1007/s12253-014-9876-5.

Xu, Bin; Ghossein, Ronald (2016): Genomic Landscape of poorly Differentiated and Anaplastic Thyroid Carcinoma. In: *Endocrine pathology* 27 (3), S. 205–212. DOI: 10.1007/s12022-016-9445-4.

Yang, Zhifen; Klionsky, Daniel J. (2010): Eaten alive: a history of macroautophagy. In: *Nature cell biology* 12 (9), S. 814–822. DOI: 10.1038/ncb0910-814.

Yun, Chul Won; Lee, Sang Hun (2018): The Roles of Autophagy in Cancer. In: *International journal of molecular sciences* 19 (11). DOI: 10.3390/ijms19113466.

Zhang, Lisa; Zhang, Yaqin; Mehta, Amit; Boufraquech, Myriem; Davis, Sean; Wang, Jing et al. (2015): Dual inhibition of HDAC and EGFR signaling with CUDC-101 induces potent suppression of tumor growth and metastasis in anaplastic thyroid cancer. In: *Oncotarget* 6 (11), S. 9073–9085.

Zwaenepoel, Karen; Jacobs, Julie; Meulenaere, Astrid de; Silence, Karen; Smits, Evelien; Siozopoulou, Vasiliki et al. (2017): CD70 and PD-L1 in anaplastic thyroid cancer - promising targets for immunotherapy. In: *Histopathology* 71 (3), S. 357–365. DOI: 10.1111/his.13230.

8 Anhang

8.1 Western Blot Ergebnisse der Zelllinie C643, der Primärkultur Patient 1 und der Zelllinie Nthy-ori 3-1

8.1.1 Expression der Autophagiemarker in der Zelllinie C643

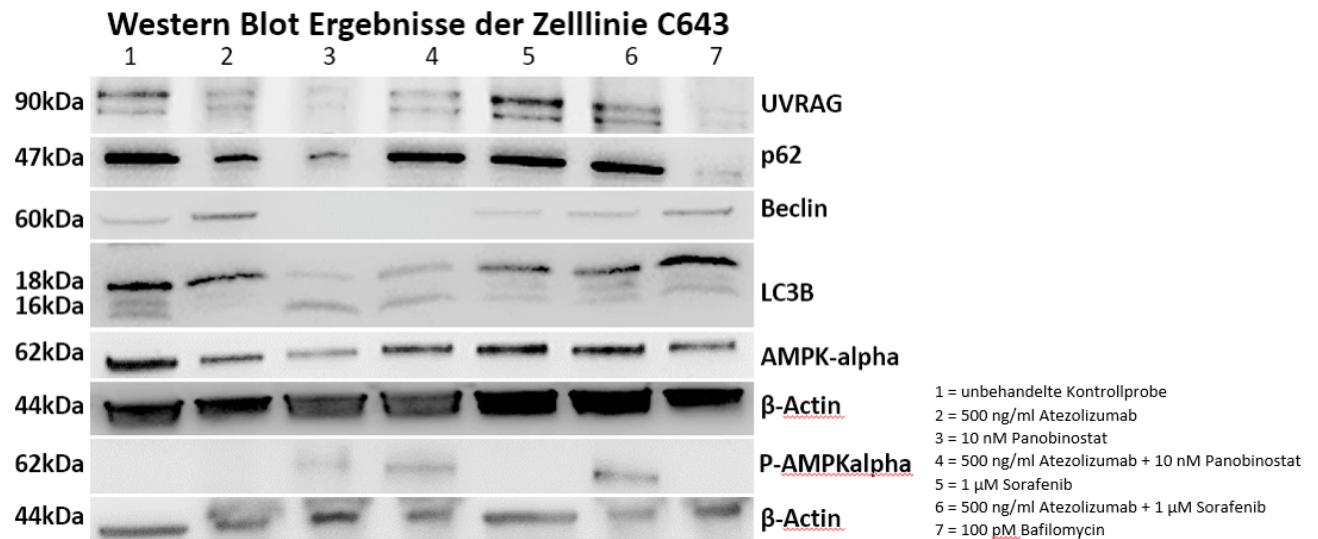


Abbildung 29: Western Blot Membranen der Zelllinie C643: 1 = unbehandelte Kontrollprobe, 2 = 500 ng/ml Atezolizumab, 3 = 10 nM Panobinostat, 4 = 500 ng/ml Atezolizumab + 10 nM Panobinostat, 5 = 1 μ M Sorafenib, 6 = 500 ng/ml Atezolizumab + 1 μ M Sorafenib, 7 = 100 pM Bafilomycin. β -Actin (44 kDa) diente als Kontrolle.

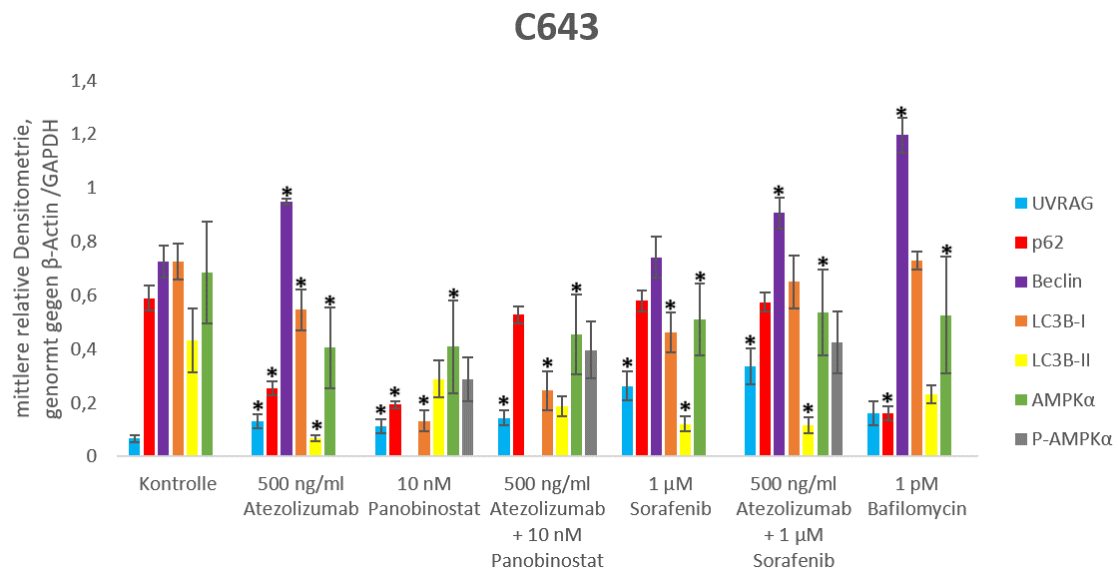


Abbildung 30: Densitometrie der Proteinexpression in der Zelllinie C643: Die Zellen wurden für 48h mit Atezolizumab, Panobinostat oder Sorafenib bzw. deren Kombinationen behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung dreier unabhängiger Aufnahmen der Membranen. Die Farbintensität der Banden, welche den untersuchten Proteinen entsprechen, wurde relativ zu der Intensität von β -Actin gesetzt. Anschließend erfolgte der Vergleich zwischen der Proteinexpression der behandelten Zellen und der Proteinexpression der unbehandelten Kontrolle. *: Signifikante Werte ($p < 0,05$).

8.1.2 Expression der Autophagiemarker der Primärkultur Patient 1

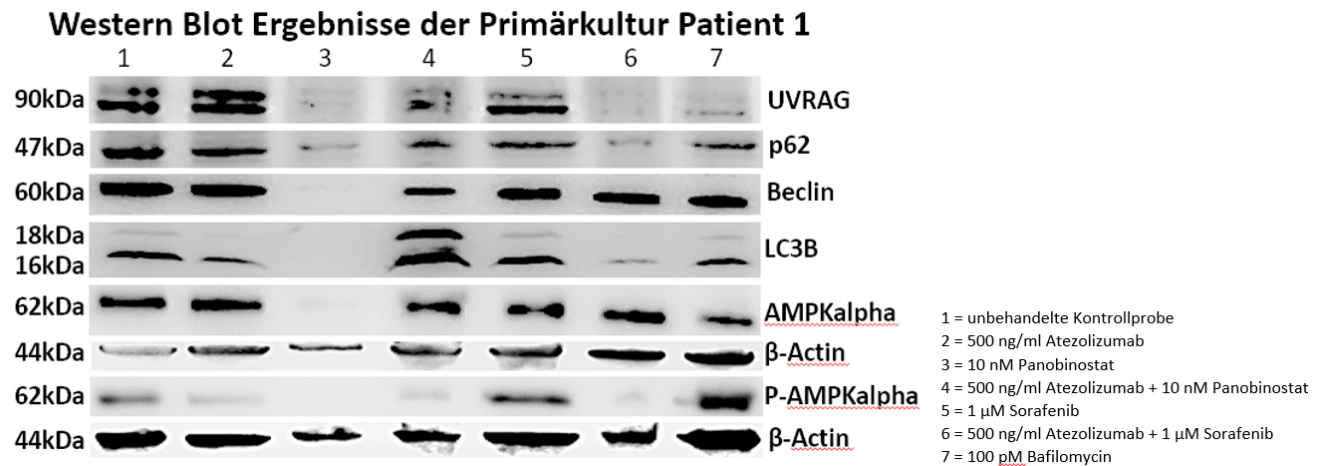


Abbildung 31: Western Blot Membranen der Primärkultur Patient 1: 1 = unbehandelte Kontrollprobe, 2 = 500 ng/ml Atezolizumab, 3 = 10 nM Panobinostat, 4 = 500 ng/ml Atezolizumab + 10 nM Panobinostat, 5 = 1 μ M Sorafenib, 6 = 500 ng/ml Atezolizumab + 1 μ M Sorafenib, 7 = 100 pM Bafilomycin. β -Actin (44 kDa) diente als Kontrolle.

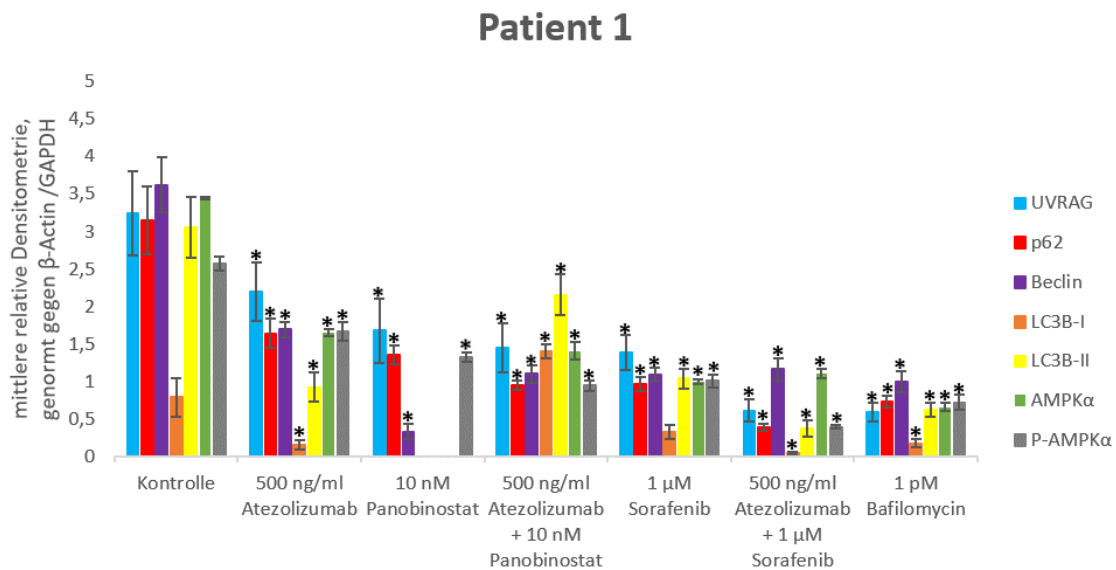


Abbildung 32: Densitometrie der Proteinexpression in der Primärkultur Patient 1: Die Zellen wurden für 48h mit Atezolizumab, Panobinostat oder Sorafenib bzw. deren Kombinationen behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung dreier unabhängiger Aufnahmen der Membranen. Die Farbintensität der Banden, welche den untersuchten Proteinen entsprechen, wurde relativ zu der Intensität von β -Actin gesetzt. Anschließend erfolgte der Vergleich zwischen der Proteinexpression der behandelten Zellen und der Proteinexpression der unbehandelten Kontrolle. *: Signifikante Werte ($p < 0,05$).

8.1.3 Expression der Autophagiemarker in der Zelllinie Nthy-ori 3-1

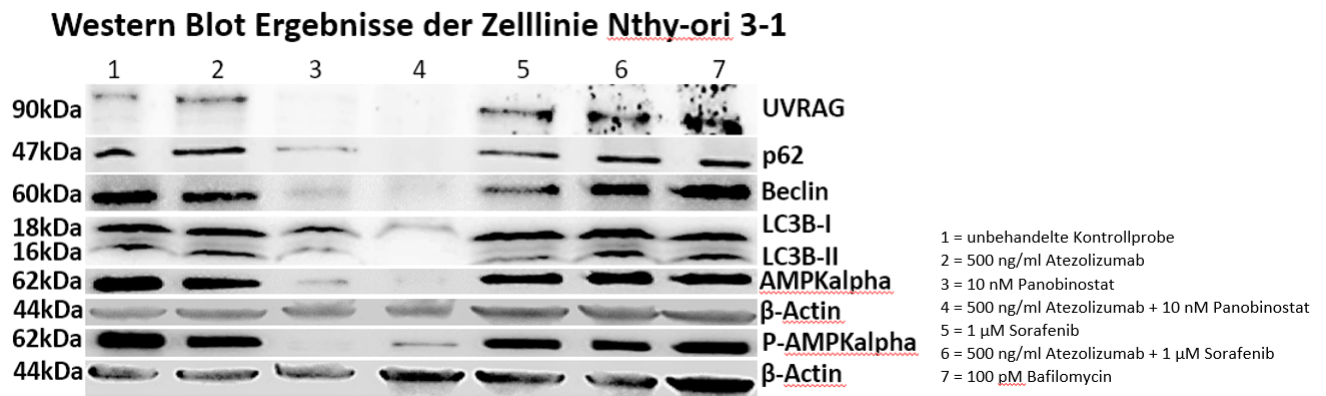


Abbildung 33: Western Blot Membranen der Zelllinie Nthy-ori 3-1: 1 = unbehandelte Kontrollprobe, 2 = 500 ng/ml Atezolizumab, 3 = 10 nM Panobinostat, 4 = 500 ng/ml Atezolizumab + 10 nM Panobinostat, 5 = 1 µM Sorafenib, 6 = 500 ng/ml Atezolizumab + 1 µM Sorafenib, 7 = 100 pM Bafilomycin. β-Actin (44 kDa) diente als Kontrolle.

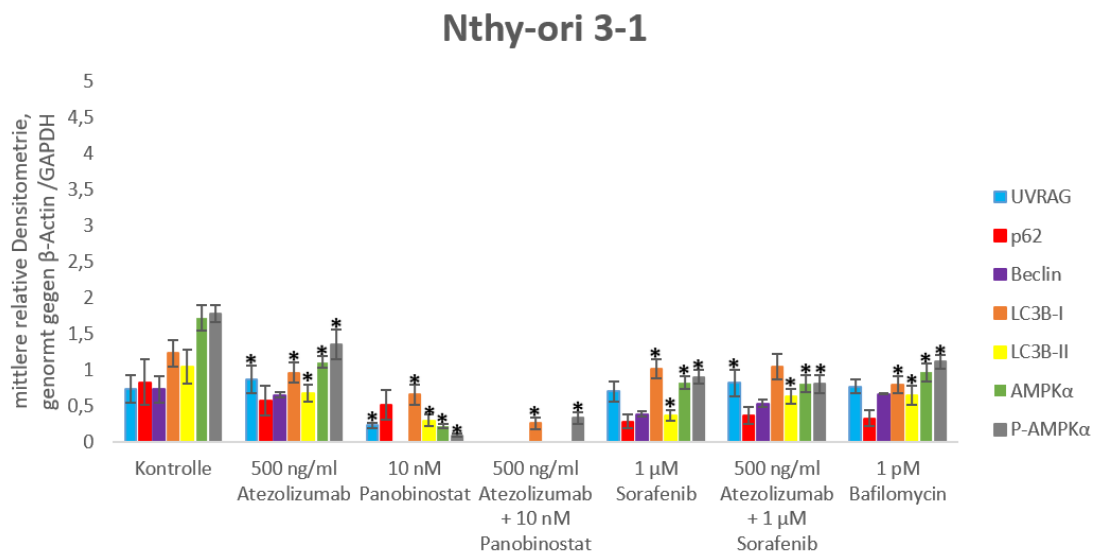


Abbildung 34: Densitometrie der Proteinexpression in der Zelllinie Nthy-ori 3-1: Die Zellen wurden für 48h mit Atezolizumab, Panobinostat oder Sorafenib bzw. deren Kombinationen behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung dreier unabhängiger Aufnahmen der Membranen. Die Farbintensität der Banden, welche den untersuchten Proteinen entsprechen, wurde relativ zu der Intensität von β-Actin gesetzt. Anschließend erfolgte der Vergleich zwischen der Proteinexpression der behandelten Zellen und der Proteinexpression der unbehandelten Kontrolle. *: Signifikante Werte ($p < 0,05$).

8.2 Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrerinnen und Lehrer waren in Marburg:

Vorklinischer Studienabschnitt:

Adamkiewicz, Baranovski, Bauer, Bette, Bertoune, Braun, Brehm, Bogdan, Bonaterra, Cetin, Daut, Decher, del Rey, Eickmann, Feuser, Grundmann, Hildebrandt, Hobiger, Kinscherf, Koolman, Lill, Löffler, Mey, Milani, Mueller, Neumüller, Oberwinkler, Oliver, Preisig-Müller, Reese, Rost, Röhm, Rust, Schratt, Schäfer, Schütz, Schwarz, Seitz, Steiniger, Schratt, Suske, Thieme, Weihe, Wertbruch, Westermann, Wilhelm, Wilhelmi, Wrocklage

Klinischer Studienabschnitt:

Aigner, Al-Fakhri, Ahrens, Barth, Bartsch, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Bender, Besgen, Best, Bien, Bliemel, Bohlander, Burchert, Carl, Czubayko, Damanakis, Dettmeyer, Divchev, Donner-Banzhoff, Duda, Eberhardt, Eming, Felgentreff, Fendrich, Fritz, Fuchs-Winkelmann, Gebhardt, Geks, Geraedts, Görg, Gress, Greulich, Grikscheit, Grimm, Grosse, Grzeschik, Haug, Hertl, Hoch, Höffken, Hofmann, Hoffmann, Holland, Holzer, Hoyer, Isselstein Jansen, Jerrentrup, Jochens, Josephs, Kampmann, Kalder, Kann, Keber, Kill, Kirschbaum, Klemmer, Klose, Knipper, Koczulla, Köhler, König, Kühnert, Leonhardt, Lohoff, Lüsebrink, Mahnken, Maier, Maisner, Mand, Maurer, Menzler, Moll, Morin, Mossdorf, Müller, Mutters, Neubauer, Nimsky, Oberkircher, Oertel, Opitz, Pagenstecher, Pankuweit, Parahuleva, Peterlein, Pfützner, Portig, Pöttgen, Plant, Rastan, Renke, Renz, Repp, Richter, Riera-Knorrenschild, Rothmund, Ruchholtz, Rüschi, Sasaki, Schäfer, Schieffer, Schmeck, Schmidt, Schneider, Schu, Schüttler, Seifert, Seipelt, Seitz, Sekundo, Sevinc, Sieveking, Sohlbach, Sommer, Stuck, Strik, Tackenberg, Thum, Timmermann, Timmesfeld, Vogelmeier, Vogt, Vojnar, Wächter, Wagner, Weber, Werner, Wiesmann, Wissniowski, Wittig, Worzfeld, Wulf, Wündisch, Zavorotny, Zemlin, Ziller, Zimmer, Zwiorek

8.3 Danksagung

An dieser Stelle heißt es, danke zu sagen. Ein ganz besonderer Dank gilt dem Labor-Team der VTG-Chirurgie in Marburg, welches mich von Anfang an gut in die Laborarbeit aufgenommen und integriert hat. Es wurde sich immer Zeit für meine Fragen genommen und im Zweifel erhielt ich jederzeit Unterstützung bei der Durchführung meiner Experimente. An erster Stelle muss ich mich bei Dr. Di Fazio bedanken, welcher mir bei allen Unklarheiten mit Rat und Tat zur Seite stand. Danke für die vielen Erklärungen, für die Hilfe beim Auswerten der Ergebnisse, für die Geduld, wenn mal wieder ein Experiment schiefgelaufen war und für die immer wieder neuen Ansätze und Denkanstöße. Ein ebenso großer Dank geht an Dr. Wächter, welche mir durch ihre hohe Motivation aus dem ein oder anderen Tief half und die es immer wieder schaffte, meine Ergebnisse in eine positive und wegweisende Richtung zu lenken. Außerdem bedanke ich mich bei beiden für die Bereitschaft, meinen regelmäßigen Ergebnispräsentationen zu lauschen und diese mit konstruktiver und hilfreicher Kritik zu kommentieren.

Ebenso möchte ich mich bei Silvia bedanken, die mir den Einstieg in die Laborarbeit so leicht wie nur irgendwie möglich gemacht hat. Die zahllosen Stunden, die wir beisammen saßen, um in der Zellkultur die Zellen zum Wachsen zu bewegen, kann ich gar nicht zählen. Jeder Versuchsaufbau wurde mir bei Bedarf wiederholt erklärt und es wurde sich immer Zeit genommen, dass Labor nach den benötigten Reagenzien abzusuchen.

Danke an Carmen, Norman, Elvira, Franzi und Yesim für den ausgeprägten Teamgeist im Labor, die lustigen, aber auch häufig sehr konstruktiven Gespräche bei einer Tasse Kaffee und die gegenseitige Unterstützung.

Abschließend geht auch ein großes Dankeschön an meine Doktormutter Prof. Dr. med. Holzer, welche sich immer wieder bei mir nach dem Fortschreiten der Arbeit erkundete und jederzeit daran interessiert war, sich meine Ergebnisse vorstellen zu lassen und diese mit mir zu diskutieren. Ohne die gemeinsamen Präsentationen und anschließenden Diskussion mit Dr. Di Fazio und Dr. Wächter wäre ein Entstehen dieser Arbeit nicht möglich gewesen.